



HAL
open science

Conception, synthèse et étude de conjugués peptidiques multimériques pour la reconnaissance sélective des cellules cancéreuses

Benjamin Liet

► **To cite this version:**

Benjamin Liet. Conception, synthèse et étude de conjugués peptidiques multimériques pour la reconnaissance sélective des cellules cancéreuses. Biochimie [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV040 . tel-02613953

HAL Id: tel-02613953

<https://theses.hal.science/tel-02613953>

Submitted on 20 May 2020

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : Chimie biologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Benjamin LIET

Thèse dirigée par **Olivier RENAUDET**
et co-dirigée par **Nathalie BERTHET**

préparée au sein du **Département de Chimie Moléculaire**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Conception, synthèse et étude de conjugués peptidiques multimériques pour la reconnaissance sélective des cellules cancéreuses

Thèse soutenue publiquement le **15 Novembre 2019** devant le
jury composé de :

M. Olivier SENEQUE

Directeur de recherche, Université Grenoble Alpes Président

Mme Céline DOUAT

Chargée de recherche, Université de Munich Rapportrice

M. Francesco PERI

Professeur, Université de Milan Rapporteur

Mme Katia DUQUESNE

Maître de conférences, Aix-Marseille Université Examinatrice

M. Michele FIORE

Maître de conférences, Université Claude Bernard Lyon 1 ... Examineur

Mme Nathalie BERTHET

Maître de conférences, Université Grenoble Alpes Membre invitée

M. Olivier RENAUDET

Professeur, Université Grenoble Alpes Membre



REMERCIEMENTS

Pour commencer ces remerciements, je tiens à remercier l'European Research Council pour avoir financé ces quatre années de thèse qui m'ont permis de pouvoir travailler dans les meilleures conditions et publier de bons résultats.

Je tiens ensuite à remercier les personnes composant mon jury de thèse et ayant accepté d'évaluer mes travaux :

- Mme Céline Douat, chargée de recherche à l'Université de Munich
- M. Francesco Peri, professeur à l'Université de Milan
- Mme Katia Duquesne, maître de conférences à l'Université Aix-Marseille
- M. Michele Fiore, maître de conférences à l'Université Claude Bernard Lyon 1
- M. Olivier Sénèque, directeur de recherche à l'Université de Grenoble

Je remercie ensuite Olivier Renaudet, mon directeur de thèse, qui m'a permis de découvrir la chimie, ses difficultés et ses astuces, et surtout pour avoir été à tout instant à mon écoute, m'avoir laissé mon autonomie et m'avoir appris la plupart des choses que je sais aujourd'hui. C'est aussi grâce à Olivier que j'ai pu obtenir une quatrième année sans laquelle je n'aurais pas pu écrire cette thèse, et pour cela, je lui en suis très reconnaissant.

Bien évidemment, je remercie aussi Nathalie Berthet, ma co-directrice, qui m'a aidé, dans ces dures années d'expériences d'évaluations biologiques, à rester motivé malgré les résultats souvent décevants. Sans Nathalie, sa gentillesse et sa disponibilité, je n'aurais pas pu obtenir les résultats décrits dans ce manuscrit.

Mon intégration dans l'équipe de recherche n'aurait aussi pas pu être possible sans la gentillesse de tous ces membres, je pense en particulier à Didier Boturyn, qui m'a autorisé à utiliser son laboratoire et à me faire découvrir le peptide RGD, à Jérôme Dejeu qui m'a épaulé pour les études d'interactions dont je ne connaissais rien et à Jean-François Constant qui m'a permis de faire de la culture cellulaire dans les meilleures conditions.

Je remercie de plus toutes les personnes et les laboratoires m'ayant apporté leur aide, que ce soit pour le prêt des cellules (Jean-Luc Coll et Maxime Henry, IAB Grenoble), pour le prêt de matériel (Yahia Chebloune, PaVal Lab) ou encore pour l'utilisation du cytomètre en flux et du microscope confocal (Cécile Cottet, LBFA). Je remercie de plus l'ICMG et ses plateformes m'ayant permis d'avoir caractérisé mes molécules.

Pour m'avoir aidé à supporter ces quatre ans et leur lot de misères, je tiens à remercier mes collègues, ou plutôt mes amis et même presque ma nouvelle famille (on s'attend pour manger !). Dans un premier temps, Fabien, pour toutes ces discussions de foot (allez Bordeaux !) et de Magic, Carlo qui m'a démontré que l'italien était une langue riche et magnifique, Eugénie avec qui j'ai commencé les galères (cœur avec les mains) et enfin David qui sait déjà ce que je pense, pas besoin de mots. Ensuite, tous les copains qui ont pavé cette route : Maxime, Camille, Biagio, Jonny, Laureen, Laure, Estelle, Justin, Océane, Joao, Pierre, Yoann et Nicolas. Remerciements spéciaux à Claude (yeeeeeeesh), Hugues (merci pour les pauses), Fabien (non t'es pas chauve, t'as juste moins de cheveux que la moyenne), Romain (peu cher), Laura (la baloche), Laury-Anne (excessivement c...), Claire (pas de karaoké désolé) et bien entendu Alexandre (deux étoiles, 37%), celui qui a été là de tout temps et que je ne pourrais jamais assez remercier.

Enfin, pour clore cette partie, mes plus gros remerciements vont à mes parents, qui, tout au long de ma vie et donc de ma thèse, m'ont apporté leur soutien, leur amour et leur aide (le mot est faible), des choses qui ont fait qu'aujourd'hui, je suis là où j'en suis. Sans eux, je ne serais pas grand-chose, merci infiniment.

J'ai aussi une grosse pensée pour mes grands-parents à qui je dédie ce manuscrit.

MERCI A TOUS

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION - LE CANCER : TUMORIGENESE ET TRAITEMENTS 1

A) Généralités sur le cancer	1
B) Les thérapies anticancéreuses	3
1) La chimiothérapie	4
2) La radiothérapie	6
3) La thérapie hormonale	6
4) La chirurgie	7
5) Immunothérapie	7
(a) Les anticorps monoclonaux (mAb).....	8
(i) Différents isotypes.....	9
(ii) Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity (ADCC).....	11
(iii) Complement-dependent cytotoxicity (CDC)	12
(iv) Antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP).....	12
(v) Exemples de mAbs utilisés en thérapie	13
(b) Les immunomodulateurs	14
(c) Immunostimulants	15
(d) Effets secondaires.....	15
C) Antibody-Recruiting Molecule (ARM) :	17
D) Projet de thèse	20

II. UTILISATION DE LIGANDS CONNUS POUR LA CONCEPTION DU TBM. 21

A) Marqueurs tumoraux et ligands	21
1) Les intégrines $\alpha_v\beta_3$	22
(a) Structure et fonction	22
(b) Le ligand peptidique RGD des intégrines $\alpha_v\beta_3$	24
2) Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	27
(a) Structure et fonction	27
(b) Le ligand peptidique LARLLT d'EGFR	28
3) L'anhydrase carbonique IX (CA IX)	29
(a) Structure et fonction	29
(b) Le ligand sulfonamide (SA) de CA IX	30
4) Le transporteur du glucose (GLUT1).....	32
5) Résumé des marqueurs tumoraux et de leur ligand.....	35
B) Stratégie de synthèse du TBM	36
1) Augmentation de l'affinité par multivalence	36
2) Utilisation du RAFT comme plateforme multivalente	38
(a) Les ligations chimiosélectives	40
(b) Synthèse de la plateforme RAFT	42
3) Synthèse des ligands tumoraux monovalents et tétravalents.....	44
(a) Le peptide cRGDfK.....	44
(b) L'hexapeptide LARLLT.....	46
(c) La molécule acétazolamide AZ	47

(d) Le glucose	48
C) Evaluation de l'interaction sélective des TBMs aux cellules cancéreuses.....	49
1) Le ligand cRGDfK tétravalent	50
2) Le ligand peptidique LARLLT	54
3) Le ligand acétazolamide.....	57
4) Le glucose	58
III. IDENTIFICATION DE NOUVEAUX LIGANDS POUR LA CONCEPTION DU TBM 60	
A) Introduction au Phage Display.....	60
B) Identifications des ligands peptidiques	64
1) Cible protéique : EGFR.....	64
2) Cibles cellulaire : cellules cancéreuses mammaires BT549.....	67
C) Synthèse des peptides candidats monovalents et tétravalents	69
1) Les dodécapeptides PSY, GERS et HVH	69
2) L'heptapeptide « DEW »	71
D) Evaluation de l'interaction des peptides sélectionnés avec leur cible	73
1) Les peptides monovalents PSY et HVH avec les cellules M21-L, M21 et MCF7.....	73
2) Le peptide DEW sur BT-549 et MCF 10A	74
IV. ANTIBODY-RECRUITING MOLECULE : INTERACTION AVEC LES CELLULES TUMORALES ET RECRUTEMENT D'ANTICORPS	76
A) Historique du concept ARM.....	76
B) Sélection de l'ABM et synthèse de l'ARM.....	80
C) Liaison de l'ARM à la cellule cancéreuse	85
1) ARM avec le TBM-RGD.....	85
2) ARM avec le TBM-R4(LT) _t	92
3) ARM avec le TBM-R4(AZ) _t	94
D) Recrutement des anticorps endogènes au niveau de la cellule cancéreuses par l'ARM.....	95
E) Cytotoxicité induite par l'« Antibody-Recruiting Molecule » (ARM)	107
1) Quantification de la viabilité cellulaire par dosage de l'ATP cellulaire.....	107
2) Quantification de la viabilité cellulaire par dosage de l'activité déshydrogénase mitochondriale.....	111
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	118
VI. MATERIEL ET METHODES.....	122
A) Matériel et équipements.....	122
1) Produits, réactifs et consommables	122
2) Matériels pour la purification et l'analyse.....	123

B) Méthodes de synthèse	124
1) Procédure (A) de synthèse peptidique.....	124
(a) Synthèse peptidique (A1) sur support solide (SPPS).....	124
(b) Détachement (A2) du peptide du support.....	126
(c) Cyclisation (A3) et déprotection (A4)	126
2) Ligations chimiosélectives.....	127
(a) Procédure (B) de la cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre (CuAAC).....	127
(b) Procédure (C) de la ligation thioéther	127
C) Synthèses et caractérisations	127
1) Synthon	128
2) Modules de liaison aux cellules cancéreuses (TBMs).....	129
D) Phage Display.....	139
1) Sur EGFR comme cible	139
2) Sur la cible cellulaire BT-549	141
E) Culture cellulaire eucaryote et expériences sur cellules.....	142
1) Lignées cellulaires	142
2) Culture cellulaire.....	143
3) Expériences de cytométrie en flux	144
(a) Dosage des cibles.....	144
(b) Interaction cellule/TBM	145
(c) Interaction cellule/ARM	145
(d) Recrutement des anticorps par l'ARM	146
4) Expériences de microscopie à fluorescence	146
5) Expériences de viabilité cellulaire	147
(a) Par bioluminescence	147
(b) Par absorbance.....	148
 VII. ANNEXES.....	 149
A) Publications :	149
B) Communications :.....	149

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Changements acquis par une cellule pour devenir tumorale (issue de Hanahan et Weinberg, 2000). ¹	2
Figure 2 : Structure schématique d'un anticorps.....	8
Figure 3 : Les isotypes d'immunoglobulines.....	10
Figure 4 : Processus de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps : ADCC (issue et adaptée de Adams et Weiner 2005). ²⁴	11
Figure 5 : Processus de toxicité cellulaire dépendante du complément : CDC (issue de Adams <i>et al.</i> 2005)	12
Figure 6 : Processus de toxicité cellulaire dépendante de la phagocytose : ADCP.....	13
Figure 7 : Stratégie d'immunothérapie "Antibody-Recruiting Molecule" (ARM) (issue et adaptée de McEnaney <i>et al.</i> 2012). ⁴⁰	18
Figure 8 : Preuve de concept de conjugué ARM DUPA-DNP (a) par évaluation de sa liaison aux cellules LNCaP (b) et de sa capacité à engager une cytotoxicité (c) (issu et adapté de Murelli <i>et al.</i> 2009). ⁴³ ..	19
Figure 9 : Intégrine $\alpha\beta$ sous sa forme fermée ou inactive (A), se dépliant par liaison de cations divalents (B) permettant alors la liaison à son ligand (protéines de la matrice extracellulaire) sous sa forme ouverte (C) (issu et adapté de Hynes <i>et al.</i> 2002). ⁴⁷	23
Figure 10 : Evaluation de l'effet inhibiteur de l'adhésion cellulaire à une matrice de vitronectine des séquences peptidiques RGD linéaire (•), RGD cyclique avec une D-Val (■) et RGD cyclique avec une D-Phe (▲) (issue et adaptée de Aumailley <i>et al.</i> 1991). ⁴⁹	24
Figure 11 : Evaluation de l'effet inhibiteur de l'adhésion cellulaire à une matrice de vitronectine des peptides cRGDfK multivalents (de 1 à 16) (issue de Garanger <i>et al.</i> 2006). ⁵²	26
Figure 12 : Représentation de deux conjugués cRGDfK vectorisant soit une geldamycine et un tyrosine radioactive (a), soit du paclitaxel (b) (issue de Borgman <i>et al.</i> 2009 et Zhan <i>et al.</i> 2010). ^{54,55}	26
Figure 13 : Changement conformationnel d'un monomère d'EGFR au niveau d'une cellule saine (issue de Lammerts van Bueren <i>et al.</i> 2008). ⁵⁶	27
Figure 14 : Interaction d'un conjugué LARLLT/sulfo-Cy5/complexe de Cu^{2+} avec EGFR. Etude par fluorescence et autoradiographie (issue de Viehweger <i>et al.</i> 2014). ⁶¹	29
Figure 15 : Interaction d'un conjugué BODIPY-LARLLT aux cellules surexprimant EGFR. Etude par microscopie à fluorescence (issue et adaptée de Zhao <i>et al.</i> 2017). ⁶²	29
Figure 16 : Activité de CA IX surexprimée à la surface de cellules cancéreuses en environnement hypoxique (issue de Ditte <i>et al.</i> 2011). ⁶⁵	30
Figure 17 : Exemples de molécules sulfonamides inhibitrices des CAs.....	30
Figure 18 : Interaction du conjugué AZ-fluorescéine avec un tissu tumoral surexprimant CA IX. Etude par microscopie à fluorescence (issue et adaptée de Ahlskog <i>et al.</i> 2009). ⁶⁸	31
Figure 19 : Interaction du conjugué SA divalent-rhodamine par incubation directe ou par compétition avec deux lignées cellulaires (RCC4 et SK-RC-38) avec différentes expression de CA IX. Etude par microscopie à fluorescence (issu et adapté de Lv <i>et al.</i> 2016) ⁶⁹	32
Figure 20 : Transport du glucose exogène par GLUT1 à travers la membrane plasmique et initiation de la glycolyse intracellulaire (issue de Patching 2015). ⁷¹	33
Figure 21 : Image de PET du corps d'un patient atteint de cancer de l'oesophage après injection de l'analogue radioactif ^{18}F du β -D-glucose (issue et adaptée de Van Westreenen <i>et al.</i> 2005). ⁷³	34
Figure 22 : Test de viabilité de cellules cancéreuse de pancréas (MiaPaCa-2) après ajout de la gemcitabine ou du gluofosfamide ou des deux combinés (issu de Ammons <i>et al.</i> 2007). ⁷⁵	34
Figure 23 : Processus d'interaction ligands multivalents/cibles par effet chélate (a), clustering (b), association à un sous-site (c) et réassociation statistique (d) (issu de Kiessling <i>et al.</i> 2000). ⁷⁸	37
Figure 24 : Plateformes synthétiques disponibles pour la présentation de ligands multivalents (issue et adaptée de Roy et Shiao 2015). ⁷⁷	38
Figure 25 : Représentation schématique de la plateforme décacyclopeptidique RAFT	39

Figure 26 : Représentation schématique de la chambre d'analyse d'un cytomètre en flux avec une suspension cellulaire focalisée sur un flux. Le laser irradie les cellules et permet d'obtenir trois signaux : le FSC, le SSC et l'émission de fluorescence de la cellule.	49
Figure 27 : Exemple d'une suspension cellulaire analysée par cytométrie en flux. a. le graphique représente les paramètres SSC-A (granularité) et FSC-A (taille) de chaque cellule. A partir de celui-ci sont sélectionnées les cellules en bon état. b. les cellules en singulets et les cellules en doublets sont discriminées. c. l'intensité de fluorescence de chaque cellule est analysée sous forme d'histogramme.	50
Figure 28 : Histogramme de fluorescence d'expériences de cytométrie en flux représentant le taux d'intégrines $\alpha_v\beta_3$ sur les lignées cellulaire HEK293(β_1) et HEK293(β_3).	51
Figure 29 : Histogramme de fluorescence représentant le nombre d'intégrines $\alpha_v\beta_3$ sur les lignées cellulaire M21-L et M21. Etude par cytométrie en flux.	52
Figure 30 : Histogramme de fluorescence représentant l'interaction des TBMs cRGDfK monovalents et tétravalents fluorescents sur les cellules M21-L et M21. Etude par cytométrie en flux.	52
Figure 31 : Images de fluorescence des cellules M21-L (a, b et c) et M21 (d, e et f) incubées avec les TBMs cRGDfK monovalents (b et e) et tétravalents (c et f) fluorescents. Etude par microscope confocal à fluorescence.	53
Figure 32 : Histogrammes de fluorescence représentant le taux de protéines EGFR sur les lignées cellulaire U-87 MG, M21-L, M21, BT549, MCF7 et MCF 10A. Etude par cytométrie en flux.	55
Figure 33 : Histogrammes de fluorescence représentant l'interaction du TBM-R4(LT) _t avec les lignées cellulaire U-87 MG, M21-L, M21, BT549, MCF7 et MCF 10A. Etude par cytométrie en flux.	56
Figure 34 : Histogramme de fluorescence représentant l'interaction des acétazolamides mono- (rose) et tétravalente (rouge) avec les lignées cellulaire MCF7 et U-87 MG. Etude par cytométrie en flux.	57
Figure 35 : Histogramme de fluorescence représentant l'interaction des composés glucose mono- et tétravalent avec la lignée cellulaire M21. Etude par cytométrie en flux.	58
Figure 36 : Images de fluorescence des cellules M21 incubées avec les composés glucose monovalents et tétravalents fluorescents. Etude par microscopie confocale à fluorescence.	59
Figure 37 : Représentation schématique du bactériophage M13 cylindrique et flexible	61
Figure 38 : Différentes étapes de la sélection d'un ligand peptidique par Phage Display.	63
Figure 39 : Résultats du test ELISA évaluant la liaison EGFR-bactériophages. a. Données brutes d'absorbance correspondant au nombre de bactériophages liés à EGFR ou à la BSA (contrôle). b. Normalisation par soustraction des puits avec EGFR avec les puits contrôles.	65
Figure 40 : Histogramme de fluorescence représentant l'interaction des TBMs PSY (rouge) et HVH (bleu) avec les lignées cellulaire M21-L, M21 et MCF7. Etude par cytométrie en flux.	73
Figure 41 : Histogramme des fluorescences moyennes enregistrées lors des expériences d'interaction des TBMs R4(LT) _t , PSY et HVH avec les lignées cellulaires M21-L, M21 et MCF7 ainsi que lors du dosage de leur taux d'expression d'EGFR, par cytométrie en flux.	74
Figure 42 : Histogramme de fluorescence représentant l'interaction des TBMs DEW mono- (rose) et tétravalents (rouge) avec les lignées cellulaire MCF 10A et BT549. Etude par cytométrie en flux. ...	75
Figure 43 : Preuve de concept de l'ARM Folate-FITC. (a) Image de microscopie à fluorescence montrant sa localisation sur une tumeur murine (vert = FITC, rouge = anti-IgG-phycoérythrine). (b) survie de souris immunisées (issue et adaptée de Lu et Low 2002). ¹³²	77
Figure 44 : Preuve de concept de l'ARM Folate-DNP en étudiant son effet sur la survie de souris immunisées (issue et adaptée de Lu et Low 2002). ¹³⁴	77
Figure 45 : Preuve de concept de l'ARM mime RGD- α -Gal. Test de viabilité de cellules surexprimant les intégrines $\alpha_v\beta_3$ (rouge) et de cellules ne les exprimant pas ou peu (noir) (issue et adaptée de Carlson <i>et al.</i> 2007). ⁴⁰	78
Figure 46 : Preuve de concept de l'ARM DUPA-CP33. Test de viabilité de cellules surexprimant PSMA (issu de McEnaney <i>et al.</i> 2014). ¹³⁶	78
Figure 47 : Schéma "heatmap" obtenu par microarray de l'interaction entre les glycoconjugués présentant 1, 4 ou 16 α -L-Rha et les anticorps IgM anti- α -L-Rha présents dans le sérum humain (issue et adaptée du manuscrit de thèse d'Eugénie Laigre).	81

Figure 48 : Dosage des anticorps IgM et IgG ciblant le rhamnose, le DNP ou l' α -Gal dans différents sérums humains (issue de Sheridan et al. 2014). ¹³⁷	81
Figure 49 : Caractérisation de l'ARM 4RGD-16Rha pur. (a) Profil de HPLC-RP analytique ($\lambda = 214$ nm, 5-60 % B en 15 min.) ; (b) HRMS (ESI+-TOF) avec une m/z calculée pour $[M+7H]^{7+}$ de 1885,5187 (monoisotopique) et trouvée de 1885,5321.....	83
Figure 50 : Graphique décrivant la formation du complexe ternaire où une concentration optimale de ligand B (ou ARM dans notre cas) est nécessaire (issue de Douglas et al. 2013). ¹³⁹	86
Figure 51 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21-L et M21 incubées avec l'ARM 4RGD-16Rha à différentes concentrations, un anticorps ciblant l'ABM-R4(Rha) _t et un anticorps secondaire couplé à une PE. (a) les analyses brutes de cytométrie en flux ; (b) les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).....	86
Figure 52 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21-L incubées avec les ARMs 4RGD-4Rha, 4RGD-16Rha et 1RGD-16Rha à 100 nM, un anticorps ciblant l'ABM-R4(Rha) _t et un anticorps secondaire couplé à une PE. (a) les analyses brutes de cytométrie en flux ; (b) les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).....	88
Figure 53 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21 incubées avec les ARMs 4RGD-4Rha, 4RGD-16Rha et 1RGD-16Rha à 100 nM, un anticorps ciblant l'ABM-R4(Rha) _t et un anticorps secondaire couplé à une PE. (a) les analyses brutes de cytométrie en flux ; (b) les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).....	89
Figure 54 : Images de fluorescence des cellules M21-L (a, b et c) et M21 (d, e et f) observées au microscope confocal de fluorescence soit sans ajout de composés (a et d, autofluorescence), soit avec les anticorps permettant la révélation (b et e), soit avec tous les partenaires (ARM 4RGD-16Rha, Ac anti-R4Rha et Ac II ^{aire}) (c et f).....	91
Figure 55 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules MCF7 et MCF 10A incubées avec l'ARM 4LT-16Rha à différentes concentrations, un anticorps ciblant l'ABM-R4(Rha) _t et un anticorps secondaire couplé à une PE. (a) les analyses brutes de cytométrie en flux ; (b) les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).....	93
Figure 56 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules U-87 MG incubées avec l'ARM 4AZ-16Rha à différentes concentrations, un anticorps ciblant l'ABM-R4(Rha) _t et un anticorps secondaire couplé à une PE. (a) les analyses brutes de cytométrie en flux ; (b) les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).	94
Figure 57 : Principe de dosage des anticorps IgG et IgM anti- α -L-Rha présents dans le sérum humain réalisé en format microplaque 96 puits.	95
Figure 58 : Graphique représentant l'intensité de fluorescence analysée pour chaque puits contenant le polymère d' α -L-Rha, une concentration en sérum humain fixée (20%) et différentes concentrations d'anticorps secondaires anti-IgG ou anti-IgM humains fluorescents.	96
Figure 59 : Graphique représentant l'intensité de fluorescence analysée pour chaque puits contenant le polymère d' α -L-Rha avec différentes concentrations de sérum humain et avec les anticorps secondaires anti-IgG ou anti-IgM humains fluorescents (dilution 400 fois).....	97
Figure 60 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21-L incubées avec l'ARM 4RGD-16Rha à 100 nM, du sérum humain à différentes concentrations et l'anticorps secondaire anti-IgM humain couplé à un AlexaFluor TM 488. (a) les analyses brutes de cytométrie en flux ; (b) les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).....	98
Figure 61 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21 incubées avec l'ARM 4RGD-16Rha à 100 nM, du sérum humain à différentes concentrations et un anticorps secondaire anti-IgM humain couplé à un AlexaFluor TM 488. (a) les analyses brutes de cytométrie en flux ; (b) les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).....	99
Figure 62 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21-L incubées avec les ARMs 4RGD-16Rha et 4RGD-16 β Gal à 100 nM, 50 % de sérum humain et un anticorps secondaire couplé à un AlexaFluor TM 488 dilué au 1/400 ^{ème} . (a) les analyses brutes de cytométrie en flux ; (b) les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).....	101
Figure 63 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21 incubées avec les ARMs 4RGD-16Rha et 4RGD-16 β Gal à 100 nM, 50 % de sérum humain et un anticorps	

secondaire couplé à un AlexaFluor™ 488 dilué au 1/400 ^{ème} . (a) les analyses brutes de cytométrie en flux ; (b) les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).....	101
Figure 64 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21-L incubées avec les ARMs 4RGD-16Rha, 4RGD-16iGb3 et 4RGD-16Neu5GC à 100 nM, 50 % de sérum humain et un anticorps secondaire couplé à un AlexaFluor™ 488 anti-IgM humain dilué au 1/400^{ème}. (a) les analyses brutes de cytométrie en flux ; (b) les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).....	103
Figure 65 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21 incubées avec les ARMs 4RGD-16Rha, 4RGD-16iGb3 et 4RGD-16Neu5GC à 100 nM, 50 % de sérum humain et un anticorps secondaire couplé à un AlexaFluor™ 488 anti-IgM humain dilué au 1/400^{ème}. (a) les analyses brutes de cytométrie en flux ; (b) les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).....	104
Figure 66 : Images de fluorescence des cellules M21-L et M21 observées au microscope confocal de fluorescence soit sans ajout de composés (autofluorescence), soit avec le sérum humain et les anticorps permettant la révélation (contrôle), soit avec tous les partenaires (ARM 4RGD-16Rha, sérum humain et anticorps secondaire).....	105
Figure 67 : Dosage de l'ATP et détermination de la viabilité cellulaire par analyse de bioluminescence <i>via</i> la réaction luciférine/oxy luciférine catalysée par la luciférase.	108
Figure 68 : Viabilité cellulaire de M21-L (a) et M21 (b) par dosage de la bioluminescence de l'oxyluciférine ($\lambda = 542$ nm) après ajout du sérum humain (+ SH) et de l'ARM 4RGD-16Rha.	110
Figure 69 : Dosage de l'activité déshydrogénase mitochondriale et détermination de la viabilité cellulaire par analyse colorimétrique des cristaux de formazan (solubilisés dans le DMSO) produits à partir de MTT.....	111
Figure 70 : Viabilité cellulaire de M21-L (a) et M21 (b) par dosage de l'absorbance du formazan solubilisé dans du DMSO ($\lambda = 540$ nm) après ajout du sérum humain (+ SH) et de l'ARM 4RGD-16Rha.	112
Figure 71 : Viabilité cellulaire de M21-L (a) et M21 (b) par dosage de l'absorbance du formazan solubilisé dans du DMSO ($\lambda = 540$ nm) après ajout du sérum humain (+ SH) et de l'ARM 4RGD-16Rha.....	113
Figure 72 : Viabilité cellulaire de M21-L (a) et M21 (b) par dosage de l'absorbance du formazan solubilisé dans du DMSO ($\lambda = 540$ nm) après ajout du sérum humain (+ SH) et de l'ARM 4RGD-16Rha.	115
Figure 73 : Viabilité cellulaire de M21 par dosage de l'absorbance du formazan solubilisé dans du DMSO ($\lambda = 540$ nm) après ajout du sérum humain (+ SH) et de l'ARM 4RGD-16Rha.	116
Figure 74 : Viabilité cellulaire de M21 par dosage de l'absorbance du formazan solubilisé dans du DMSO ($\lambda = 540$ nm) après ajout du sérum humain (+ SH) et de l'ARM 4RGD-16Rha.	117

TABLE DES SCHEMAS

Schéma 1 : Composés cRGDfE au bout d'un espaceur "Hegas" monovalent (a) et tétravalent (b) par liaison amide à un dendrimère de lysines.	25
Schéma 2 : Réaction de cycloaddition alcyne-azoture catalysée au cuivre (I) (CuAAC)	41
Schéma 3 : Réaction de ligation thio-chloroacétyle.....	41
Schéma 4 : Synthèse du décapeptide cyclique RAFT avec 4 groupements azotures	42
Schéma 5 : Synthèse du décapeptide cyclique RAFT avec 4 groupements chloroacétyles sur sa face supérieure et un groupement alcyne sur sa face inférieure.	43
Schéma 6 : Synthèse du cyclopeptide cRGDfK(alcyne) (TBM-RGD).	44
Schéma 7 : Synthèse du peptide cRGDfK tétravalent TBM-R4(RGD) _t par ligation CuAAC puis du peptide TBM-R4(RGD) _t -alcyne par ajout d'un groupement alcyne.	45
Schéma 8 : Synthèse des composés TBM-RGD-alcyne et TBM-R4(RGD) _t -alcyne couplés à la fluorescéine par CuAAC.	45
Schéma 9 : Synthèse du TBM-R4(LT) _t par CuAAC et du TBM-R4(LT) _t fluorescent.....	46
Schéma 10 : Synthèse de la molécule TBM-AZ-alcyne et du TBM-R4(RGD) _t par ligation CuAAC.....	47
Schéma 11 : Synthèse des composés TBM-AZ-alcyne et TBM-R4(AZ) _t couplés à la fluorescéine par CuAAC ou par réaction en milieu basique.....	47
Schéma 12 : Synthèse du TBM-R4(Glc) _t par ligation CuAAC.....	48
Schéma 13 : Synthèse des composés TBM-Glc-alcyne et TBM-R4(Glc) _t couplés à la fluorescéine par CuAAC ou par réaction en milieu basique.....	48
Schéma 14 : Synthèse du dodécapeptide PSY-alcyne par SPPS.	69
Schéma 15 : Synthèse du dodécapeptide PSY-SH par SPPS.....	70
Schéma 16 : Synthèse du composé TBM-R4(PSY) _s par ligation TCC.....	70
Schéma 17 : Synthèse du TBM-PSY fluorescent par ligation CuAAC.....	71
Schéma 18 : Synthèse du composé TBM-R4(DEW) _s par ligation TCC.....	72
Schéma 19 : Synthèse des conjugués TBM-DEW et TBM-R4(DEW) _s fluorescents par ligation CuAAC... ..	72
Schéma 20 : Modules ABMs à motif α-L-Rha tétravalent et hexadécavalent.	82
Schéma 21 : Synthèse des modules TBM et ABM avec respectivement greffage de groupements alcyne et azoture activés par un NHS.	82
Schéma 22 : Exemple de synthèse d'une molécule finale ARM par ligation CuAAC. Ici, la synthèse de l'ARM-R4(RGD) _t -RR16(Rha) _{tt} (4RGD-16Rha).	83
Schéma 23 : Molécules d'ARM utilisés pour nos expériences.	84
Schéma 24 : Molécule ARM 4RGD-16βGal utilisée lors de l'expérience contrôle.	100
Schéma 25 : Deux nouveaux conjugués ARMs 4RGD-16iGb3 et 4RGD-16Neu5GC.	102

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples de drogues cytotoxiques utilisées en chimiothérapie anticancéreuse	5
Tableau 2 : Marqueurs tumoraux et leurs ligands.....	35
Tableau 3 : Liste des dodécapeptides sélectionnés par Phage Display comme ligand de la protéine EGFR	66
Tableau 4 : Liste des heptapeptides sélectionnés par Phage Display comme ligand de BT549	68

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

A

ABM : Antibody-Binding Module
Ac : Anticorps
ADCC : Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
ADCP : Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis
ADN : Acide DésoxyriboNucléique

APC : Antigen-Presenting Cell
ARM : Antibody-Recruiting Molecule
ARN : Acide RiboNucléique
ATP : Adénoside TriPhosphate
AZ : AcétoZolamide

B

BLI : BioLayer Interferometry
Boc : tert-ButOxyCarbonyl

BSA : Bovine Serum Albumin

C

CA : Carbonic Anhydrase
CDC : Complement-Dependent Cytotoxicity
CDR : Complementary-Determining Region
CRS : Cytokine Release Syndrome

CTL : Cytotoxic T-Lymphocyte
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CuAAC : Copper-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition
Cy5 : Cyanine 5

D

DCM : DiChloroMéthane
DIPEA : *N,N*-Diisopropyléthylamine
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF : DiMéthylFormamide
DMSO : DiMéthylSulfOxyde

DNP : DiNitroPhénol
DO : Densité Optique
DTPA : Diethylene-Triamine Pentaacetic Acid
DTT : DiThioThréitol
DUPA : 2-[3-(1,3-dicarboxylpropyl)ureido]pentanedioic acid

E

EDTA : Acide EthylèneDiamineTétraAcétique
EFS : Etablissement Français du Sang
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESI : ElectroSpray Ionisation

F

Fab : Fragment antigen-binding
Fc : Fraction cristallizable
FDA : US Food and Drug Administration
FDG : FluoroDeoxyGlucose

FITC : Fluorescéine IsoThioCyanate
Fmoc : Fluorénylméthoxycarbone
FR : Folate Receptor
FSC : Forward Scatter

G

Gal : Galactose
GalNAc : *N*-acétyl- α -D-galactosamine
Glc : Glucose

GLUT : GLUcose Transporter
GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone

H

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
HBTU : Hexafluorophosphate
Benzotriazole Tetramethyl Uronium
HEK : Human Embryon Kidney
HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HPLC : High Performance Liquid Chromatography
HPMA : *N*-(2-Hydroxypropyl MethAcrylamide)
HRMS : High Resolution Mass Spectrometry
HRP : Horse Radish Peroxydase

I

IC50 : half maximal Inhibitory Concentration
IFN- α : alpha-Interférons
Ig : Immunoglobuline
iGb3 : Isoglobotriose

IGTAV : Integrin subunit alpha v
IL-2 : Interleukines 2
IPTG : IsoPropylThio- β -D-Galactoside
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

J

JCV : John Cunningham Virus

L

LB : Lysogeny Broth

LEMP : Leucoencéphalopathie Multifocale Progressive

M

mAb : Anticorps monoclonal
Man : Mannose
MBHA : 4-MéthylBenzHydrylAmine
MFI : Mean Fluorescence Intensity

MIDAS : Metal Ion-Dependent Adhesion Site
MS : Mass Spectrometry
MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl

N

Neu5Ac : Acide sialique
Neu5GC : Acide *N*-Glycolylneuraminique
NHS : *N*-HydroxySuccinimide

NK : Natural Killer
NP : NitroPhénol

O

OPD : O-PhénylèneDiamine

P

PBMC : Peripheric Blood Mononuclear Cell
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PD-1 : Programmed Death 1
PDL-1 : Programmed Death Ligand 1
PE : PhycoErythrine
PE : PhosphatidylEthanolamine
PEG : PolyEthylène Glycol

PET : Positron Emission Topography
PFA : ParaFormAldéhyde
PFU : Plaque Forming Unit
PLA : Poly LActide
PSI : Plexins, Semaphorins and Integrins
PSMA : Prostate-Specific Membrane Antigen
PyBOP : Benzotriazol-1-yl-OxytriPyrrolidinoPhosphonium hexafluorophosphate

R

RAFT : Regioselectively Adressable Functionalized Template
Rha : Rhamnose

RP-HPLC : Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
RPMI : Roswell Park Memorial Institute

S

SA : SulfonAmide
SASRIN : Super Acid Sensitive ResIN
SDS : Sodium DodecylSulfate
SH : Sérum Humain

SPPS : Solid-Phase Peptide Synthesis
SPR : Surface Plasmonic Resonance
SSC : Side Scatter

T

TA : Température Ambiante
TASP : Template-Assembled Synthetic Proteins
TBM : Tumoral-Binding Module
TBS : TRIS-Buffered Saline
TBS-T : TBS-Tween20
t-Bu : tert-Butyl
TCC : Thio-Chloroacetyl Coupling
Tet : Tétracycline
TFA : Acide TriFluoroAcétique

TGF- α : Transforming Growth Factor alpha
THPTA : Tris(3-HydroxyPropylTriazolylmethyl)Amine
TLR-9 : Toll-Like Receptor 9
TLS : Tumoral Lysis Syndrome
TNBS : Acide TriNitroBenzene Sulfonique
TNP : TriNitroPhénol
TOF : Time-Of-Flight

U

UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography

V

VEGF-A : Vascular Endothelial Growth Factor A

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

I. INTRODUCTION - Le cancer : tumorigénèse et traitements

A) Généralités sur le cancer

Le cancer est une pathologie qui se caractérise par une prolifération anormale et anarchique des cellules eucaryotes. Il existe plus de 100 types de cancer répertoriés à ce jour (cancer du sein, de la prostate, du poumon ...), tous ont en commun la transformation d'une cellule saine en cellule tumorale en évitant les chemins métaboliques classiques permettant de contrôler leur prolifération et de maintenir une certaine homéostasie. On distingue deux types de tumeurs : les tumeurs bénignes et malignes. Les tumeurs bénignes sont des tumeurs à croissance lente, bien différenciée, délimitée et souvent sans gravité. Elles peuvent cependant entraîner de graves complications, notamment des inflammations. Les tumeurs malignes quant à elles sont plus graves du fait de leur croissance rapide, de leur invasivité et de leur mauvaise délimitation. Elles ont ainsi tendance à attaquer les tissus environnants et à produire des tumeurs filles se propageant à travers le sang ou la lymphe (métastases).

Les tumeurs prendront des noms différents en fonction du tissu où elles se développent : les cancers touchant les épithéliums sont des adénomes (tumeur bénigne d'une glande ou d'une muqueuse) et des carcinomes (tumeur maligne), ceux du tissu conjonctif sont des fibromes (tumeur bénigne) et des sarcomes (tumeur maligne) et ceux de l'os des ostéomes (tumeur bénigne uniquement). Durant les dernières décennies, il a été admis que quelques aspects cellulaires et moléculaires étaient partagés par tous ces types de cancers. En revanche, le phénomène de tumorigénèse de ces dernières n'est, encore à ce jour, toujours pas entièrement connue, d'où la complexité d'étude et de traitement de cette maladie.

En 2000, Douglas Hanahan et Robert Weinberg ont suggéré l'existence de six changements majeurs dans la physiologie de la cellule par diverses modifications génétiques pouvant expliquer la naissance d'une cellule tumorale (**Figure 1**).¹ Cette tumorigénèse cellulaire est très variable et va dépendre des mutations génétiques et des environnements cellulaires.

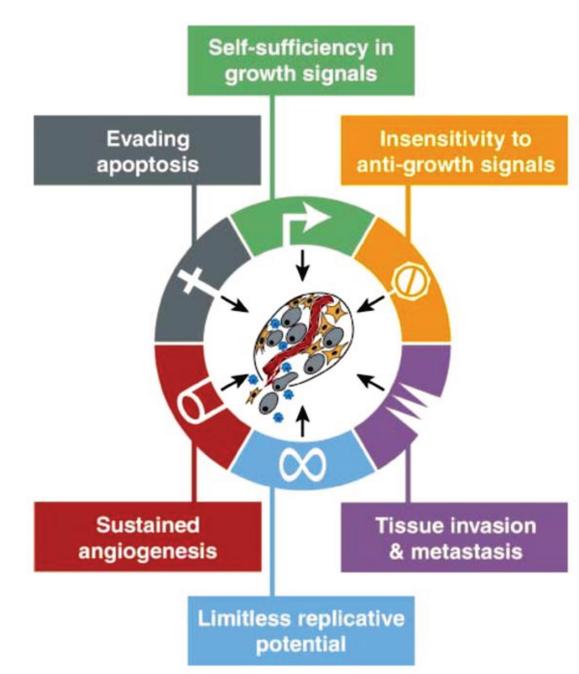


Figure 1 : Changements acquis par une cellule pour devenir tumorale (issue de Hanahan et Weinberg, 2000).¹

La première des caractéristiques physiologiques des cellules tumorales est leur capacité à **synthétiser leurs propres facteurs de croissance**. En effet, les cellules saines ont besoin de signaux de croissance pour activer leur prolifération. En sécrétant elles-mêmes ces signaux, les cellules tumorales s'affranchissent alors d'une stimulation de croissance exogène et sont capables de se multiplier indéfiniment. Une surexpression des récepteurs de facteurs de croissance à la surface des cellules cancéreuses a également été observée. Dennis J. Slamon et ses collègues ont notamment rapporté qu'une augmentation aberrante de l'expression du récepteur EGFR des facteurs de croissance (*Epidermal Growth Factor Receptor*) était un phénotype des cellules cancéreuses du sein.²

L'insensibilité aux signaux d'inhibition de la prolifération cellulaire est une autre des caractéristiques de la tumorigenèse. Le maintien d'une certaine homéostasie cellulaire est une nécessité pour les différents tissus sains humains. Les cellules cancéreuses semblent avoir acquis la capacité d'échapper à ces mécanismes d'auto-inhibition de croissance. Cette particularité peut être facilement observée dans les cultures cellulaires *in vitro* où les cellules saines vont ralentir leur prolifération lors de contacts cellulaires (confluence) alors que les lignées cancéreuses peuvent continuer à pousser, même à confluence (observation de grappes cellulaires, mort cellulaire plus tardive ...).

De la même manière, la plupart des tissus tumoraux ont acquis au cours de leur développement le potentiel de **s'immortaliser** et de **se répliquer sans limite**. Cette capacité

est notamment acquise par l'expression de certains gènes permettant à la cellule d'esquiver des points de contrôle lors de la division cellulaire.³

Les cellules néo-cancéreuses vont de plus **échapper aux signaux de mort cellulaire programmée**, appelée aussi apoptose. En effet, lorsque des cellules saines sont altérées suite à un stress physiologique (changement de pH, manque d'oxygène ...), elles vont entrer elles-mêmes en apoptose.⁴ Les cellules cancéreuses ont acquis grâce à la surexpression de certaines protéines à détourner ce phénomène.

L'environnement tumoral empêche aussi les cellules d'avoir les nutriments et l'oxygène indispensables à leur développement. Elles vont ainsi développer leur propre réseau sanguin en initiant la création d'une multitude de vaisseaux et de micro-vaisseaux : c'est la **néo-angiogenèse**. Certaines protéines responsables de l'adhésion cellulaire sont largement impliquées dans ce phénomène de néo-vasculature. C'est le cas de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dont la surexpression s'est révélée être un marqueur majeur des nouveaux vaisseaux sanguins tumoraux.⁵ Ce récepteur sera décrit plus en détail dans le chapitre II.

Enfin, la dernière caractéristique de la tumorigenèse cellulaire est la capacité de certaines cellules à devenir invasive pour envahir les tissus alentours voire plus éloignés pour établir de nouvelles colonies. De cette manière, la cellule pourra se développer dans un environnement où les nutriments et la place ne sont plus limités : ce sont des **métastases**. Plusieurs classes de protéines, telles que celles responsables de l'adhésion cellulaire (par exemple les intégrines)⁶ vont être impliquée dans ce détachement responsable des métastases.

B) Les thérapies anticancéreuses

Grâce à la compréhension des caractéristiques de la cellule tumorale, de son métabolisme et de son évolution, la recherche de traitements anticancéreux n'a fait qu'évoluer au cours du dernier siècle. Aujourd'hui, plusieurs thérapies efficaces sont utilisées sur des patients atteints de cancer à plusieurs stades (chimiothérapie, radiothérapie, thérapie hormonale et chirurgie). D'autres stratégies ont commencé à émerger ces dernières années pour devenir des alternatives prometteuses pour traiter les tumeurs de manière efficace et plus sélective (thérapies ciblées et immunothérapie).

1) La chimiothérapie

Il ne fait pas de doute que la chimiothérapie, depuis son développement à partir du milieu du 20^{ème} siècle, occupe une place importante dans les traitements antitumoraux. Jusqu'à aujourd'hui, son évolution a été exponentielle puisque la compréhension de la physiologie des cellules cancéreuses a elle aussi évolué.⁷ En effet, les premiers traitements venaient d'observations simples comme par exemple le grossissement de la masse tumorale. En utilisant des antagonistes des molécules impliquées dans les phénomènes observés, les cellules tumorales pouvaient ainsi être traitées. Ce n'est que par la suite, lors de la découverte de la double hélice d'ADN par Watson et Crick,⁸ que les avancées ont été conséquentes et que de nombreuses familles de drogues antitumorales ont été découvertes (**Tableau 1**) : les agents alkylants fonctionnant en liant les bases aminées des acides nucléiques bloquant ainsi les processus de réplication ou de réparation des brins d'ADN et entraînant la mort cellulaire programmée,⁹⁻¹¹ les antimétabolites agissant comme analogues de nucléosides et de nucléobases et empêchant la réplication et la transcription de l'ADN,¹²⁻¹⁵ les agents inhibant la dépolymérisation des microtubules dans le cytosquelette, bloquant ainsi la mitose cellulaire,^{16,17} les inhibiteurs de topoisomérases empêchant la réplication de l'ADN,¹⁸ les antibiotiques cytotoxiques à modes d'action divers.^{12,19}

Toutes ces années de recherche ont aussi permis d'établir les trois piliers de la chimiothérapie : 1- l'administration de différentes drogues à intervalles réguliers pour permettre aux tissus sains de se régénérer ; 2- la combinaison de plusieurs drogues ayant des mécanismes d'action différents ; 3- le couplage de la chimiothérapie avec d'autres traitements complémentaires (*adjuvant chemotherapy*). Néanmoins, les effets secondaires sévères sont un frein important pour l'utilisation de ces molécules. En effet, ces différentes drogues sont toxiques pour les cellules cancéreuses mais aussi pour les cellules saines, notamment les cellules de la moelle épinière et de l'épithélium gastro-intestinal se développant rapidement et donc plus sensibles aux drogues anti-mitotiques. La diminution de la production des cellules sanguines (moelle épinière sensible au traitement) provoquant une immunosuppression chez les patients traités par chimiothérapie est aussi problématique.

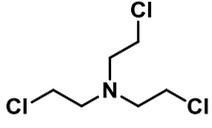
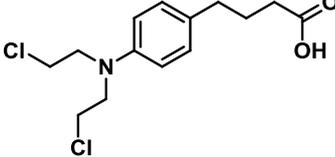
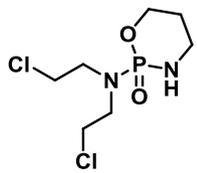
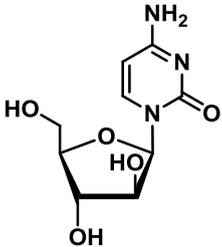
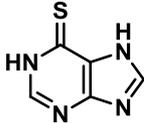
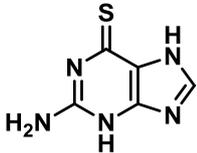
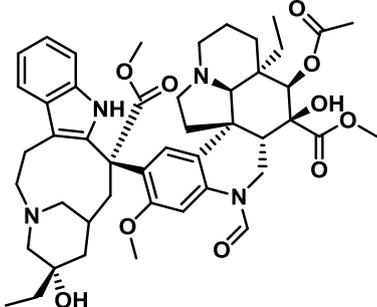
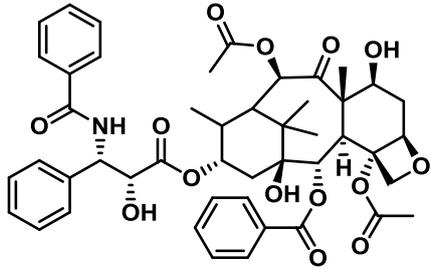
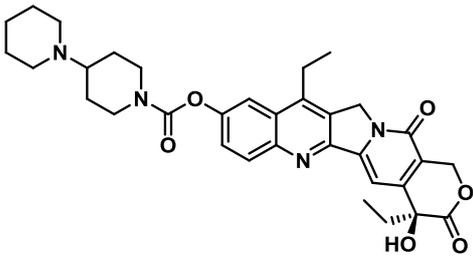
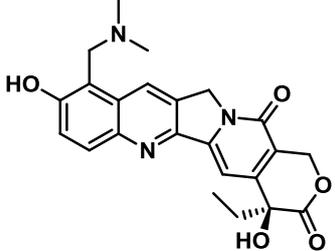
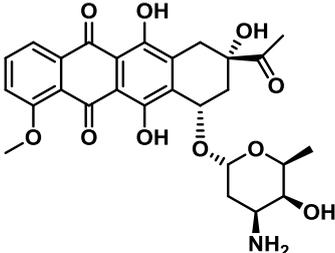
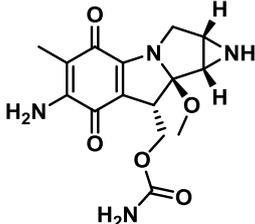
<p>Agents alkylants</p>	 <p>Gaz moutarde¹¹</p>	 <p>Chlorambucil¹⁰</p>	 <p>Cyclophosphamide⁹</p>
<p>Antimétabolites</p>	 <p>Cytarabine^{12,13}</p>	 <p>6-mercaptopurine¹⁴</p>	 <p>6-thioguanine¹⁵</p>
<p>Agent inhibant la dépolymérisation des microtubules</p>	 <p>Vincristine¹⁶</p>		 <p>Paclitaxel¹⁷</p>
<p>Inhibiteurs des topoisomérases</p>	 <p>Irinotécan¹⁸</p>	 <p>Topotécan¹⁸</p>	
<p>Antibiotiques cytotoxiques</p>	 <p>Daunorubicine¹²</p>	 <p>Mytomycine C¹⁹</p>	

Tableau 1 : Exemples de drogues cytotoxiques utilisées en chimiothérapie anticancéreuse

2) La radiothérapie

La radiothérapie est née il y a plus de 100 ans grâce aux travaux novateurs de Marie Curie découvrant plusieurs éléments radioactifs et ouvrant une nouvelle ère dans la recherche de traitements médicaux. Durant les décennies qui suivirent, le radium a été très largement utilisé puisque l'exposition à sa radiation était connue pour avoir des propriétés curatives dans de nombreuses pathologies, notamment le cancer. D'autres radio-isotopes (tel que le cobalt) ainsi que des rayons X sont aussi utilisés. En orientant le faisceau d'irradiation, les médecins sont capables de traiter uniquement la tumeur. Cette irradiation, *via* soit des photons, soit des particules chargées, conduit à des ionisations (directement ou indirectement) au niveau des bases nucléiques de l'ADN. Certaines de ces lésions ne pourront pas être réparées par la cellule cancéreuse. Cette détérioration de l'ADN engendrera alors la mort cellulaire. Néanmoins, plusieurs problèmes apparaissent liés à cette voie thérapeutique, notamment l'induction d'hypoxie dans l'environnement des cellules cancéreuses (déficience en oxygène). La cellule va développer une résistance croissante envers la radiothérapie. De plus, de nombreux effets secondaires sévères ont été observés dépendant principalement de la dose employée et du type de cancer soigné. Ces derniers peuvent aller de simples nausées en début de traitement jusqu'à des cas de maladies cardiovasculaires et de déclin cognitif.

3) La thérapie hormonale

L'utilisation d'hormones chez un patient atteint de cancer est un autre type de thérapie non-ciblée qui implique la manipulation du système endocrinien. Le principe repose sur l'utilisation d'hormones ou de drogues qui sont injectées dans le but d'inhiber la production ou l'activité de certaines hormones. Plusieurs familles de molécules sont utilisées : les inhibiteurs de la synthèse d'hormones responsables de la croissance et de la survie cellulaire (anti-aromatases) ; les analogues de la GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*) supprimant la production d'œstrogène, de progestérone et de testostérone ; les antagonistes de récepteurs hormonaux tels que les modulateurs des récepteurs de l'œstrogène ou les anti-androgènes ; la supplémentation hormonale qui va provoquer des signaux d'inhibition de croissance, voire même des effets cytotoxiques.

4) La chirurgie

Lorsque la masse tumorale est bien délimitée, qu'elle est facilement accessible et qu'il n'y a eu aucune métastase observée, il est souvent préconisé d'enlever la tumeur directement par opération chirurgicale plutôt que d'utiliser des méthodes de traitements plus invasives telles que la chimiothérapie ou la radiothérapie. La technique de chirurgie a évolué au cours de l'histoire et des innovations technologiques jusqu'à devenir aujourd'hui très bien maîtrisée. La résection de la tumeur ne sera faite que si la reconstruction de l'organe touché ainsi que des tissus voisins sera possible, ou alors que ces derniers ne sont pas essentiels pour le fonctionnement du corps humain. Cette technique chirurgicale est très délicate puisqu'il ne faut pas laisser de cellules cancéreuses sous peine d'observer une repousse après opération. Inversement, une résection trop importante peut aller contre le bon rétablissement du patient. Pour cela, cet acte chirurgical est guidé grâce à des techniques telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) avant l'opération ou la microscopie pendant et après l'opération afin de détecter la présence de cellules cancéreuses. La survie du patient opéré peut être de plus améliorée avec des thérapies supplémentaires post-opération.²⁰

5) Immunothérapie

L'immunothérapie est une forme de thérapie ciblée. Les thérapies présentées précédemment (chimiothérapie et radiothérapie) ont le défaut de mal discriminer les cellules saines des cellules cancéreuses. La thérapie ciblée, quant à elle, a pour but de reconnaître uniquement les marqueurs tumoraux exprimés à la surface des cellules cancéreuses. Cette sélectivité permet d'empêcher la plupart des effets secondaires observés. L'immunothérapie implique des anticorps exogènes ou fragments d'anticorps spécifiques des marqueurs tumoraux. Il existe deux types d'immunothérapie : l'immunothérapie passive et l'immunothérapie active. L'immunothérapie passive se base sur l'administration de cellules de l'immunité ou d'anticorps ciblant les tumeurs. Elle n'implique pas de mémoire immunologique et nécessite donc un traitement chronique. L'immunothérapie active quant à elle consiste à stimuler le système immunitaire par l'injection d'antigènes identiques aux marqueurs tumoraux. Contrairement à l'immunothérapie passive, elle a pour avantage d'avoir une réponse antitumorale plus durable évitant donc la résurgence de la tumeur.

Dans ce manuscrit, nous avons choisi de nous intéresser au développement de molécules impliquées dans l'immunothérapie passive. Les deux approches principalement utilisées en immunothérapie antitumorale sont basées pour l'une, sur

l'administration d'anticorps monoclonaux et pour l'autre, sur l'injection de composants du système immunitaire.

(a) Les anticorps monoclonaux (mAb)

Les anticorps sont des glycoprotéines sécrétées par les plasmocytes, cellules dérivées des lymphocytes B. Ils appartiennent à la famille des immunoglobulines, protéines membranaires, parfois solubles, responsable des phénomènes de reconnaissance et de liaison aux antigènes. Les anticorps sont tous composés de deux chaînes lourdes (kappa) et de deux chaînes légères (lambda), reliées entre elles par des ponts disulfures. Les régions variables VH et VL sont responsables de la reconnaissance de l'antigène. Les parties constantes (C) sont identiques pour tous les individus d'une même espèce. Les anticorps sont aussi composés de deux bras (fragments Fab) et d'un fragment Fc reconnu par le système immunitaire. (Figure 2).

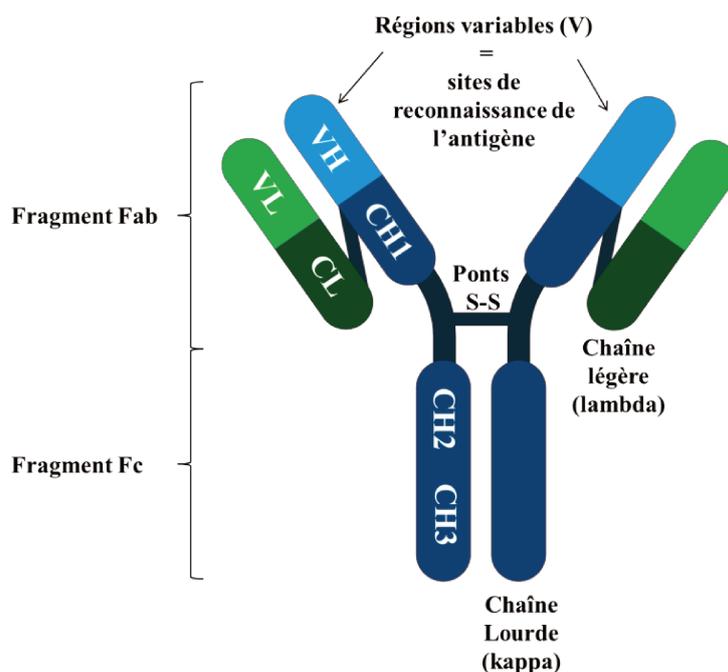


Figure 2 : Structure schématique d'un anticorps.

(i) *Différents isotypes*

Dans le système immunitaire normal, il existe 5 isotypes d'immunoglobuline (Ig) qui diffèrent de par leur partie constante Fc (*fragment crystallizable*), leurs fonctions spécifiques et leur nombre de monomère (**Figure 3**).

Les **IgM** sont les premières immunoglobulines exprimées par les cellules B après l'infection d'un antigène. Elles sont composées de 5 monomères d'immunoglobuline reliées entre elles par ponts disulfures et par un polypeptide (chaîne J) liant deux des monomères et facilitant leur sécrétion. Leur structure multivalente pentamérique leur permet de se lier à l'antigène de manière très efficace et sur plusieurs épitopes de manière simultanée. Le niveau d'IgM dans le sérum humain s'élève à 147 mg par dL de sang, soit 10 % des immunoglobulines contenues dans le sérum humain.²¹

Les **IgG** sont les anticorps les plus abondants dans le sérum humain (1118 mg/dL, soit 75% des anticorps).²¹ Ces derniers sont sécrétés sous forme de monomères. Les IgG sont divisés en 4 sous-classes définies par leur région Fc qui leur confère des réponses biologiques et fonctionnelles différentes. Elles ont néanmoins une forte homologie de séquence en acides aminés (90-95 % d'identité). Les **IgG1** constituent la sous-classe prédominante chez l'adulte sain (58-71%), suivies par les **IgG2** (19-31%), les **IgG3** (5-8%) et les **IgG4** (1-5%).²²

Les **IgA** sont sécrétés dans les voies respiratoires et dans le système intestinal et sont responsables du maintien de l'immunité dans les muqueuses. Dès qu'ils sont sous forme soluble, ils se présentent de manière monomériques, mais ils sont en réalité dimériques lorsqu'ils sont actifs au niveau des muqueuses. La classe des IgA peut être divisée en deux sous-classes : les **IgA1** comportant des régions Fc plus longues permettant d'augmenter leur sensibilité aux protéases bactériennes et les **IgA2** qui sont la sous-classe prédominante. Ils représentent 17,5 % des anticorps du sérum (262 mg/dL).²¹

Les immunoglobulines **IgE** monomériques, bien que présentes à de très faible concentrations, représentent la principale classe d'anticorps impliquée dans les réponses allergiques de par leur action dans le recrutement des mastocytes, éosinophiles et cellules de Langerhans.

Le rôle des **IgD** reste encore très peu compris. Ils se trouvent sous forme monomérique et sont exprimés au niveau des cellules B lorsqu'elles sont libérées de la moelle épinière.

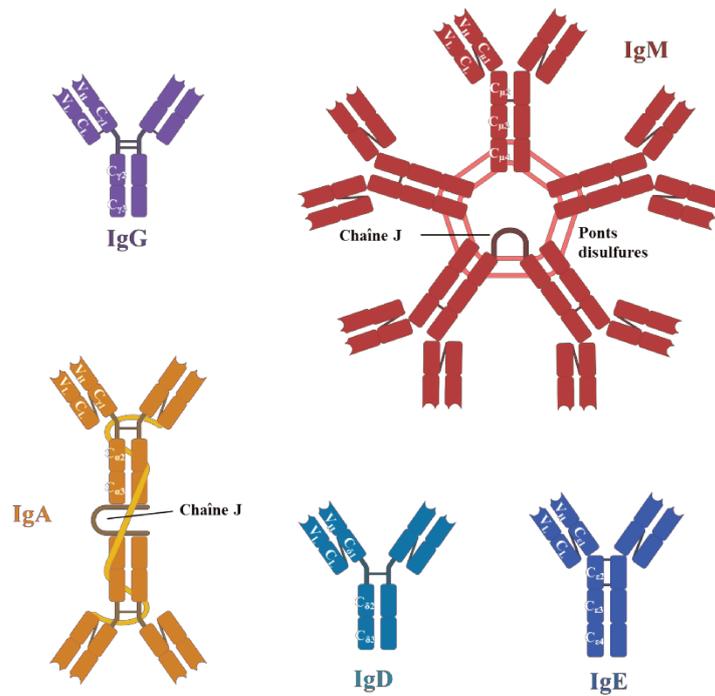


Figure 3 : Les isotypes d'immunoglobulines.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux, anticorps dérivant d'un même plasmocyte, donc appartenant au même isotype, comme traitement anti-cancéreux a été originalement expérimentée comme « magic bullet » par Kohler et Milstein, afin d'avoir un vecteur très affin pour la cible choisie.²³ Cette première génération d'anticorps extraits de souris s'est finalement révélée faiblement immunogène de par son incapacité à recruter le système immunitaire du patient. La solution qui a été proposée afin de palier à ce problème consiste à humaniser ces anticorps, soit en changeant leur partie commune et en laissant l'entièreté de la partie variable de la souris (anticorps chimérique), ou en produisant un anticorps humain avec la partie de reconnaissance (*complementary-determining region*, CDR) de l'anticorps de souris (humanisation).²⁴

La plupart des anticorps thérapeutiques utilisés à ce jour appartiennent à l'isotype IgG1 car ce sont ceux qui détiennent les meilleures réponses immunitaires *via* la reconnaissance de leur partie Fc. Les IgG2 quant à eux sont aussi utilisés dans certains traitements, mais uniquement en utilisant leur propriété de liaison à leur antigène.

Les mAbs utilisent une combinaison de mécanismes pour induire la cytotoxicité au niveau de la cellule ciblée : soit l'anticorps va empêcher la protéine choisie pour cible de fonctionner normalement en bloquant son activité (IgG2), soit il va interagir avec les composants du système immunitaire et déclencher une cascade de signaux aboutissant à la destruction cellulaire.

(ii) *Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity (ADCC)*

L'ADCC s'initie lorsque l'anticorps se lie à son antigène. Les mAbs alors liés fournissent une cible pour les récepteurs Fc γ R (**Figure 4, étape a**) présents sur les cellules effectrices du système immunitaire. L'interaction entre ces récepteurs et la partie Fc de l'anticorps est indispensable à l'activité antitumorale du mAb. Bien que la population cellulaire impliquée dans la réponse immunitaire ne soit pas encore totalement connue, celle-ci implique principalement les phagocytes mononucléaires et/ou les cellules NK (*natural killer*). Le complexe formé entre l'antigène, l'anticorps et la cellule effectrice va entraîner la libération de perforines et de granzymes qui auront pour action la lyse de la cellule cible. En plus d'induire cette cytotoxicité, une cellule du complément (*antigen-presenting cell*, APC) va récupérer les débris cellulaires (**Figure 4, étape b**) pour aller présenter ces antigènes aux cellules B et aux lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Les lymphocytes B vont alors pouvoir sécréter des IgG spécifiques de la tumeur (**Figure 4, étape c**). Quant aux CTL, après être entrés en contact avec les antigènes, ils vont être capables de reconnaître et tuer les cellules exprimant l'antigène ciblé (**Figure 4, étape d**).

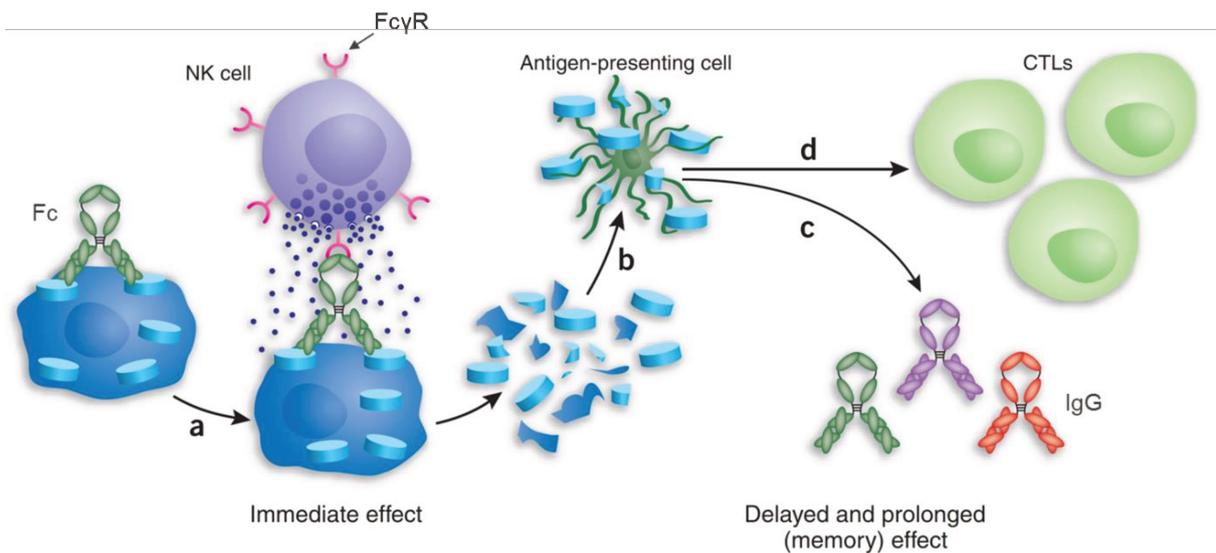


Figure 4 : Processus de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps : ADCC (issue et adaptée de Adams et Weiner 2005).²⁴

(iii) *Complement-dependent cytotoxicity (CDC)*

La cascade d'activation du mécanisme de défense immunitaire CDC est initiée par la formation du complexe anticorps/antigène. Les domaines CH2 des parties Fc des anticorps vont alors se lier à des sites présents sur les complexes C1q, protéines du complément (**Figure 5, étape b**). L'interaction C1q-IgG déclenche alors une cascade d'évènement impliquant plusieurs autres protéines du complément qui vont induire la libération des agents protéolytiques C3a et C5a (**Figure 5, étape c**) générant la formation de pores dans la membrane cellulaire (**Figure 5, étape d**). La cellule est alors détruite par choc osmotique (passage d'eau et d'ions à travers la membrane).²⁴

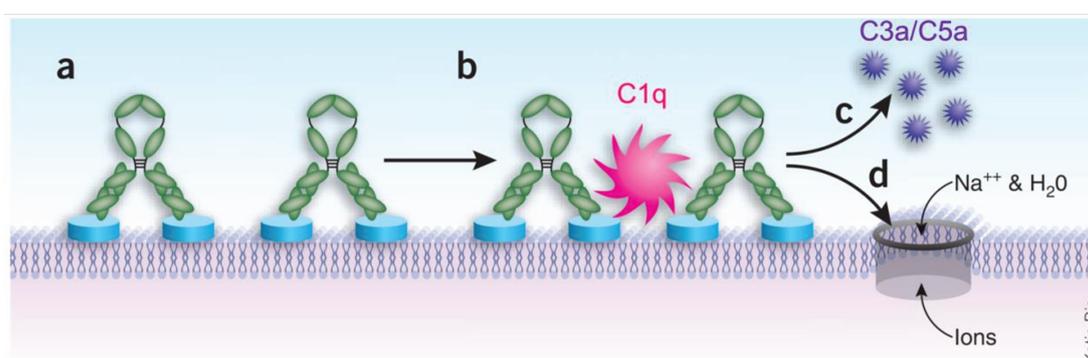


Figure 5 : Processus de toxicité cellulaire dépendante du complément : CDC (issue de Adams *et al.* 2005)²⁴

(iv) *Antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP)*

Comme l'ADCC, l'ADCP implique l'action de cellules effectrices macrophages reconnaissant la partie Fc des anticorps utilisés lors du traitement, via leur récepteurs FcγR (**Figure 6**). Lorsque ces derniers reconnaissent l'anticorps, une voie de signalisation est alors activée qui va provoquer la phagocytose de la cellule cible par internalisation dans un phagosome. Une autre voie de signalisation dans le macrophage est simultanément responsable de la maturation d'un lysosome *via* l'expression de différents marqueurs membranaires. Ce lysosome va se lier au phagosome formé, fusionner avec ce dernier pour former un phago-lysosome et finalement dégrader la cellule.²⁵ Cette reconnaissance et ce mode d'action est d'autant plus efficace lorsqu'il y a un nombre important d'anticorps à la surface de la cellule ciblée et qu'ils sont localisés au même endroit.

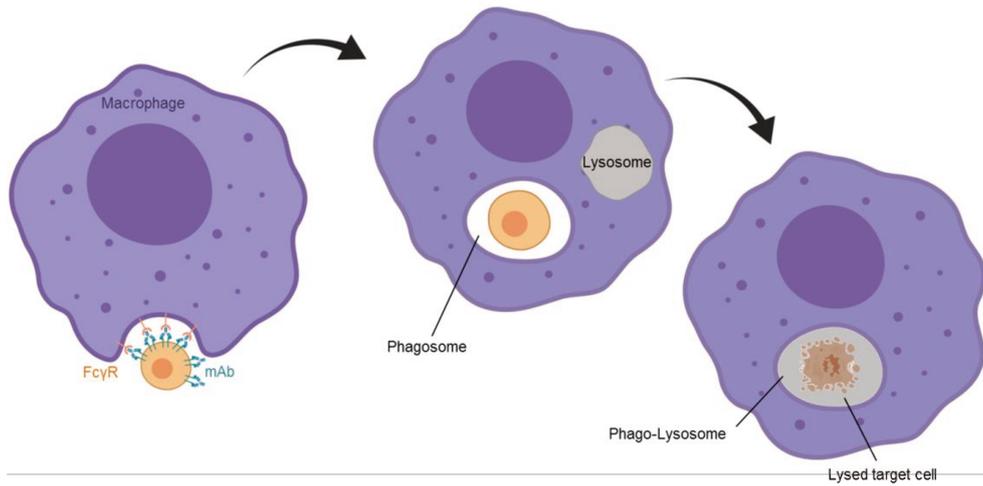


Figure 6 : Processus de toxicité cellulaire dépendante de la phagocytose : ADCP

(v) Exemples de mAbs utilisés en thérapie

Plusieurs anticorps monoclonaux ont été approuvés par la FDA (*US Food and Drug Administration*) et sont actuellement utilisés en thérapie anti-cancéreuse. La plupart appartiennent à l'isotype IgG1.

En 1998, la FDA a approuvé l'utilisation du **trastuzumab** (commercialisé sous le nom Herceptin[®]) qui est historiquement le premier anticorps monoclonal ciblant un cancer du sein mis sur le marché. Ce dernier cible la protéine HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*), une protéine transmembranaire impliquée dans les mécanismes de division cellulaire et de réparation des cellules tumorales mammaires. Le trastuzumab agit en se liant au domaine extracellulaire IV de la protéine HER2 inhibant alors l'induction de signaux cellulaires responsables de la prolifération, la survie, la motilité et l'adhésion cellulaire. Le traitement *via* ce mAb a augmenté de façon significative les cas de survie des patientes atteintes de cancer du sein à un stade précoce. Le traitement peut être néanmoins amélioré en le combinant à une chimiothérapie, ou en greffant à l'anticorps monoclonal une drogue anti-cancéreuse.²⁶

Le **rituximab** (Rituxan[®]) est quant à lui un anticorps chimérique humain/murine contenant la séquence variable de la souris et la région constante humaine IgG1. Cet anticorps monoclonal a une affinité spécifique pour la protéine antigénique transmembranaire CD20 exprimée sur les cellules B normales et surexprimée sur les cellules B malignes telles que les lymphomes de type non-Hodgkin. Il a été approuvé en 1997 par la FDA et est administré en intraveineuse. Au moins 4 mécanismes ont été identifiés comme étant responsables de l'élimination des cellules B surexprimant les protéines CD20 : par ADCC, ADCP, CDC et induction d'apoptose directe.²⁷

Le **cetuximab** (Erbix[®]), comme le rituximab, est un anticorps chimérique humain/murin approuvé par la FDA en 2004. Il se fixe avec une haute affinité à la protéine transmembranaire EGFR humaine et agit comme antagoniste du facteur de croissance EGF responsable de la division cellulaire. Les anticorps fixés vont induire une réponse immunitaire par CDC ou ADCC.²⁸

Le **bevacizumab** (Avastin[®]) est un anticorps d'isotype IgG1 humanisé se fixant sur la protéine VEGF-A (*vascular endothelial growth factor*) et neutralisant son effet. VEGF-A est responsable de la microvascularisation ainsi que de la perturbation de la barrière hémato-encéphalique et se trouve être surexprimée au niveau des glioblastomes. La FDA a autorisé la mise sur le marché de cet anticorps monoclonal pour le traitement de plusieurs cancers tels que les cancers du côlon (2004), du poumon (2006), du rein (2009) ainsi que du cervix (2014).²⁹

(b) Les immunomodulateurs

La réponse du système de défense immunitaire est régulée lorsqu'il fait face à un antigène. Cette régulation est nécessaire pour éviter des réponses immunitaires contre les cellules du soi, comme c'est le cas dans les maladies auto-immunes. Malheureusement, les cellules tumorales ont la faculté de détourner ces points de contrôles *via* plusieurs approches, par exemple en diminuant l'expression d'antigène du « non-soi » ou en générant des immunosuppresseurs dans leur microenvironnement. Les immunomodulateurs permettent de prévenir l'inhibition de la réponse immunitaire par les cellules cancéreuses. Trois approches de ce type sont actuellement utilisées cliniquement en thérapie.

La première consiste à inhiber la protéine CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) en la bloquant *via* un anticorps spécifique, appelé **Ipilimumab** (Tervoy[®]). CTLA-4 est un récepteur inhibiteur des molécules B7 présentes sur les cellules présentatrices d'antigène. En empêchant sa fonction inhibitrice, les antigènes libérés après ADCC pourront alors être présentés aux lymphocytes T pour les activer.

De la même manière, PD-1 (*programmed death 1*) est un récepteur exprimé à la surface des lymphocytes T. Ce dernier, lorsqu'il est activé par son ligand PDL-1 sécrété par les cellules cancéreuses, va provoquer la mort cellulaire des lymphocytes. En bloquant ce récepteur par un anticorps, le **pembrolizumab** (Keytruda[®]), la destruction des lymphocytes T est empêchée et donc leur action immunitaire sur les cellules pathogènes va être restaurée.

Il est aussi possible d'augmenter l'expression de facteurs de stimulation du système immunitaire. Un exemple est la protéine TLR-9 (*Toll-Like Receptor 9*), un récepteur cellulaire exprimé à la surface des cellules dendritiques, reconnaissant les dinucléotides cytosine-

guanine méthylés qui sont fréquemment trouvés dans les ADN viraux et bactériens. La stimulation de ce récepteur par un agoniste va induire l'activation et la maturation de cellules dendritiques immatures qui s'accompagne par l'expression de ces facteurs de stimulation. Des cytokines et chimiokines sont alors sécrétées par les cellules du système immunitaire, les cellules NK sont activées et les antigènes peuvent être présentés par les cellules APC.³⁰

(c) Immunostimulants

Comme évoqué précédemment, les cellules cancéreuses développent la capacité de devenir furtives par rapport au système immunitaire du patient. Ainsi, une stratégie est d'utiliser le système immunitaire du patient en administrant à ce dernier des cytokines exogènes, tels que des interleukines 2 (IL-2) ou des alpha-interférons (IFN- α) pour traiter plusieurs types de cancers, comme des mélanomes métastatiques et le carcinome rénal.

Les **IFN- α** sont des protéines qui appartiennent à la famille des interférons de type-I. Elles ont 13 sous-types fonctionnels qui partagent un récepteur commun ainsi que des fonctions biologiques similaires comprenant l'activation et la régulation du système immunitaire. Elles sont capables d'améliorer les effets des macrophages et des cellules NK qui vont aussi réguler la prolifération et la survie des lymphocytes T. Elles ont de plus un effet anti-cancéreux *via* leurs propriétés apoptotiques, anti-angiogéniques et anti-prolifératives.

Les **IL-2** sont des glycoprotéines, facteurs de croissance pour les cellules T ainsi que les cellules NK. Contrairement aux IFN- α , les IL-2 ont aussi un effet anti-cancéreux, mais indirect, par l'activation de lymphocytes effecteurs (lymphocytes T matures capables de sécréter des substances cytotoxiques).³⁰

(d) Effets secondaires

L'immunothérapie antitumorale, basée principalement sur l'utilisation de mAb, est très prometteuse et en plein essor, mais elle présente aussi plusieurs limitations.

Les anticorps sont en général bien tolérés chez les patients, mais il se peut que dans certains cas, ces derniers soient reconnus comme éléments du non-soi conduisant à des réactions immunitaires sévères. L'injection des mAbs peuvent provoquer des chocs anaphylactiques (*via* les IgE) et anaphylactoïdes, des maladies sériques, des syndromes de lyse tumorale (*tumoral lysis syndrome*, TLS) et des syndromes de relargage de cytokines (*cytokine release syndrome*, CRS), pouvant être fatals pour le patient. Par exemple, 90 % des patients traités au rituximab ont présentés des réactions immunitaires indésirables, pouvant cependant être

minimisées par une bonne hydratation, par diurèse, prémédication et incrémentation du taux d'injection.

Un effet secondaire courant de l'immunothérapie est aussi l'apparition de pathologies infectieuses suite à l'inhibition et la suppression de certains ligands ciblés par les mAbs. Une soixantaine de cas de leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP), une pathologie démyélinisante souvent fatale suite à une infection virale (John Cunningham Virus, JCV), ont été observés après traitement au rituximab.

Des cas de troubles plaquettaires et thrombotiques se manifestent également. L'injection de bevacizumab peut par exemple provoquer des maladies thromboemboliques artérielles (caillot dans la circulation sanguine).

Le traitement consistant à cibler les protéines EGFR par des anticorps monoclonaux (cetuximab par exemple) s'est révélé engendrer très souvent des dermatites (peaux sèches, démangeaisons et rougeurs).

Des effets secondaires plus graves ont pu être observés suite au traitement par trastuzumab tels que des dysfonctionnements cardiaques (4% des patientes).

Certains anticorps monoclonaux comme le rituximab vont avoir pour mode d'action de relarguer plusieurs sortes de cytokines après avoir activé de façon aberrante les cellules effectrices du système immunitaire. Ce choc cytokinique s'accompagne généralement de fièvre, de fatigue, de nausée, de maux de tête et peut être potentiellement être fatal pour le patient.³¹

De plus, la production d'anticorps monoclonaux est très coûteuse car elle requiert la culture d'un grand nombre de cellules avec plusieurs étapes de purification pour garantir une qualité optimale. Ces anticorps ont un coût de production nettement supérieur aux drogues « classiques ». Aucun substitut biologique aux anticorps n'a encore été trouvé à ce jour et donc les économies de coûts observés dans le cas des médicaments génériques ne peuvent être appliquées aux mAbs.³²

Finalement, le phénotype des cellules cancéreuses va changer au cours de leur développement ce qui fait qu'elles n'exprimeront plus les mêmes marqueurs. Ainsi, un anticorps ciblant un antigène risque de ne pas avoir la même efficacité en fonction du stade de développement de la cellule tumorale.

Pour toutes ces raisons, il semble judicieux de développer de nouvelles stratégies d'immunothérapie antitumorale en s'affranchissant de l'étape de production des anticorps monoclonaux ou autres protéines du système immunitaire. Une des solutions prometteuse est l'utilisation de molécules synthétiques capables de recruter des anticorps endogènes.

C) Antibody-Recruiting Molecule (ARM) :

Chaque être humain présente une grande quantité d'anticorps endogènes dans son système sanguin. Afin de réduire à la fois le temps de travail et le coût de production des mAbs utilisés en immunothérapie antitumorale, utiliser ces anticorps endogènes pourrait être une solution idéale. Les premières études de synthèse de petites molécules allant dans ce sens ont été entreprises par Shearer, Nelson *et al.* et Six *et al.* dans les années 1970.³³⁻³⁵ Ces derniers ont décoré des surfaces cellulaires avec des molécules antigéniques (trinitrophénol TNP, dinitrophénol, DNP, et nitrophénol, NP) grâce à plusieurs méthodes (couplage sur les amines primaires ou ancrage dans la bicouche lipidique membranaire avec un acide gras). Ils ont alors observé une cytotoxicité lorsque du sérum humain contenant les anticorps ciblant ces antigènes était ajouté. Malgré cette première preuve de concept, ce type de décoration des cellules avec un antigène n'était pas spécifique des cellules cancéreuses. Ce n'est que plus tard, à la fin des années 1980, que cette notion de sélectivité est apparue. Une série de publications se basant sur l'étude du virus VIH ont démontré que la synthèse d'un conjugué bimodal composé d'un ligand CD4 d'un marqueur du virus (gp120) et d'une partie Fc d'un anticorps pouvait recruter les composants du système immunitaire (C1q) au niveau de la particule virale.³⁶⁻³⁸ Néanmoins, la synthèse du module Fc est longue et fastidieuse puisque nécessitant une étape de production et de purification de protéine. Ainsi, un an plus tard, Shokat et Schultz ont allié le côté sélectivité du module CD4 avec l'efficacité du recrutement d'anticorps d'une molécule DNP. Là encore, le conjugué bimodal permet au complexe C1q de se lier au VIH et de provoquer sa destruction *via* le système immunitaire du patient hôte.³⁹ Ces travaux pionniers ont introduit le concept d'*Antibody-Recruiting Molecule* (ARM).

Les ARMs sont des molécules synthétiques bifonctionnelles composées de deux modules distincts. Le premier module a pour but de cibler un ou plusieurs marqueurs tumoraux sélectivement : c'est le « Tumoral-Binding Module » (TBM). A ce dernier est accroché de manière covalente le deuxième module, appelé « Antibody-Binding Module » (ABM), permettant le recrutement et la liaison avec les anticorps circulants dans le système sanguin du patient. La fixation de l'ARM à la cellule cible par son TBM permet la liaison simultanée des anticorps présents dans le sérum humain du patient qui induiront une réponse immunitaire (ADCC, CDC ou ADCP) provoquant la destruction de la cellule cible (**Figure 7**).

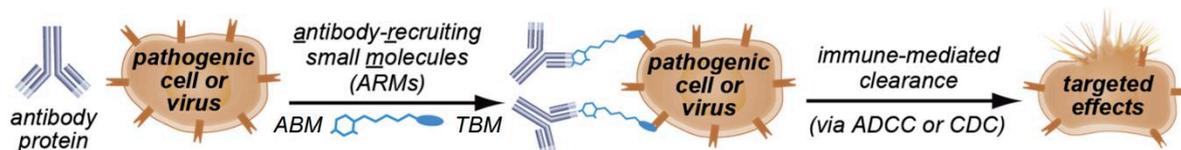


Figure 7 : Stratégie d'immunothérapie "Antibody-Recruiting Molecule" (ARM) (issue et adaptée de McEnaney *et al.* 2012).⁴⁰

Ce concept d'ARM représente donc une alternative prometteuse d'immunothérapie antitumorale lorsqu'il est utilisé pour cibler sélectivement des cellules cancéreuses. Les premières études basées sur ce concept ont été réalisées en synthétisant des ARMs contenant un groupement permettant le greffage covalent d'anticorps monoclonaux.⁴¹ Cette stratégie efficace requiert néanmoins la présence d'un anticorps purifié ne répondant pas aux problèmes de coût et de difficulté de production observés en immunothérapie. La même équipe de recherche a par la suite modifié son approche en proposant d'immuniser des souris contre le module ABM, évitant ainsi l'utilisation d'un mAb pur.⁴² Là encore, cette stratégie s'est avérée efficace puisqu'une réduction tumorale de près de 75% a pu être obtenue.

Depuis ces premiers travaux, plusieurs molécules ARMs ont été reportées avec des stratégies originales permettant de s'affranchir de l'étape de pré-immunisation. Parmi celles-ci, on peut notamment citer un conjugué ciblant d'un côté les cellules cancéreuses de la prostate *via* le marqueur protéique PSMA (*Prostate-Specific Membrane Antigen*) et recrutant de l'autre côté des anticorps ciblant le DNP utilisé comme ABM.⁴³ PSMA est une glycoprotéine transmembranaire qui s'est révélée être une cible de choix pour le ciblage du cancer de la prostate. En effet, cette protéine est exprimée dans une grande majorité de tissus tumoraux (carcinomes du rein, du pancréas, du poumon ...) mais est surexprimée d'un facteur 1000 dans le cas de cellules cancéreuses prostatiques par rapport aux cellules saines.⁴⁴ Alan Kozikowski et ses collègues ont identifié en 2004 un ligand à base d'urée à haute affinité pour ce marqueur : le DUPA (2-[3-(1,3-dicarboxypropyl)ureido]pentanedioic acid). L'équipe de David Spiegel s'est inspirée de ces travaux pour concevoir une molécule ARM présentant ce ligand comme module de reconnaissance des cellules tumorales de la prostate (LNCaP). Le module de recrutement des anticorps ABM est quant à lui composé d'un DNP (**Figure 8a**). D. Spiegel a dans un premier temps montré par microscopie à fluorescence que l'ARM se fixait bien de manière spécifique sur les cellules LNCaP (**Figure 8b**). La cytotoxicité de ces cellules par ADCC a ensuite été démontrée par l'ajout de cette molécule puis d'un anticorps anti-DNP et de cellules du complément (*Peripheric Blood Mononuclear Cell*, PBMC). En effet, les cellules contrôles n'exprimant pas PSMA (DU145) ne sont pas affectées par la présence de l'ARM (**Figure 8c**). Cet exemple, ainsi que de nombreuses études reportant l'utilisation de

molécules bimodales ARM, ont montré l'efficacité de ces composés dans des essais antitumoraux.

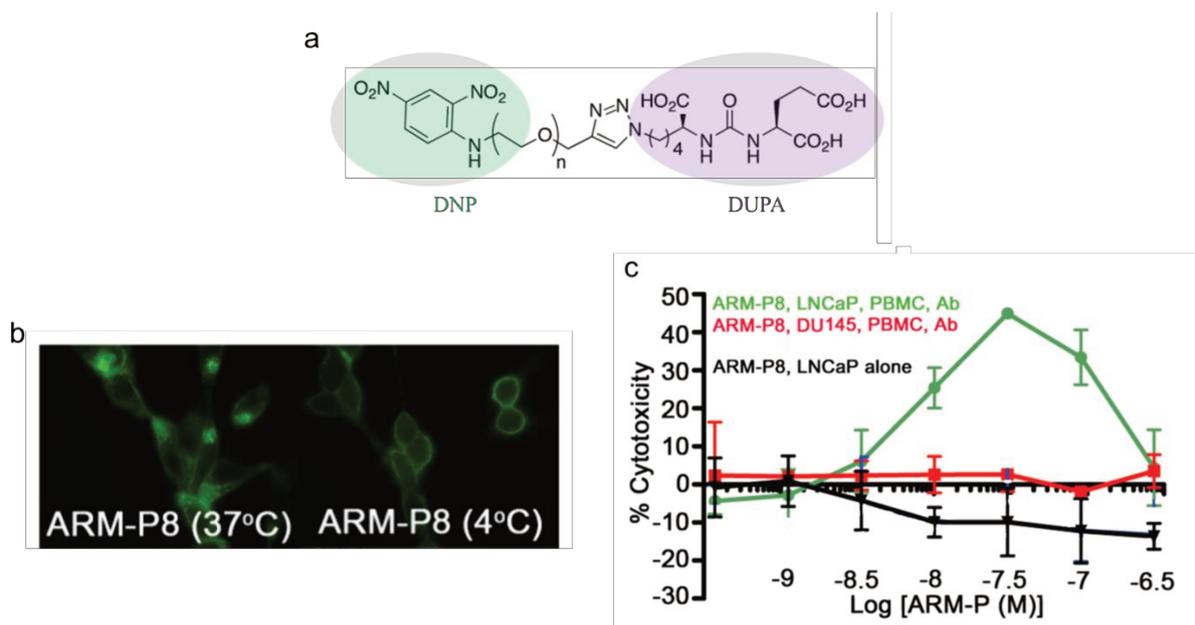


Figure 8 : Preuve de concept de conjugué ARM DOPA-DNP (a) par évaluation de sa liaison aux cellules LNCaP (b) et de sa capacité à engager une cytotoxicité (c) (issu et adapté de Murelli *et al.* 2009).⁴³

L'utilisation de telles molécules bimodales semble donc être une alternative intéressante comme traitement anticancéreux par immunothérapie. C'est dans cette stratégie que s'inscrit mon projet de thèse.

D) Projet de thèse

Nos travaux ont pour but de concevoir et synthétiser une molécule ARM anticancéreuse originale. Pour cela deux travaux de thèse ont été réalisés en parallèle : la sélection d'un ABM permettant un recrutement efficace des anticorps (thèse d'E. Laigre) et la conception d'un module TBM reconnaissant sélectivement les cellules cancéreuses. Mon projet de thèse s'inscrit dans la synthèse et l'évaluation de ce module TBM. L'originalité de ce projet réside dans plusieurs points qui seront développés au cours de ce manuscrit :

○ Dans les deux premières parties, nous nous concentrerons sur la conception, la synthèse et l'évaluation du module TBM. Le choix de ce TBM s'est orienté selon deux axes :

▪ **L'utilisation de ligands connus** pour cibler des marqueurs tumoraux et déjà utilisés dans des thérapies antitumorales (**partie II**). L'objectif étant de les présenter de façon multivalente afin d'augmenter leur affinité et leur sélectivité. Pour cela, plusieurs marqueurs seront introduits puis la stratégie de présentation sera décrite. L'interaction de ces différents modules ainsi synthétisés sera ensuite évaluée sur différentes lignées cellulaires par des expériences de cytométrie en flux et de microscopie confocale à fluorescence.

▪ **Identifier de nouveaux ligands** peptidiques ciblant des marqueurs tumoraux (EGFR et cellules cancéreuses) (**partie III**). Pour cela, nous utiliserons la technique de biochimie combinatoire Phage Display qui sera introduite au cours de cette partie. Les peptides candidats sélectionnés et synthétisés seront ensuite évalués par cytométrie en flux.

○ Dans la partie finale de ce manuscrit (**partie IV**), nous nous concentrerons sur **l'évaluation et la démonstration de la preuve de concept de la molécule ARM** que nous aurons sélectionné. Dans un premier temps, le choix du module ABM sera argumenté puis la synthèse du conjugué bimodal final sera décrite. L'évaluation de ce dernier se fera ensuite, d'une part par l'étude de sa sélectivité vis-à-vis de la cellule cancéreuse et sa capacité à recruter les anticorps du sérum humain, puis d'autre part de son aptitude à induire une toxicité cellulaire *via* le système immunitaire.

II. Utilisation de ligands connus pour la conception du TBM

Le choix de ce module représente une étape primordiale puisque c'est lui qui va dicter la spécificité et en partie l'efficacité de l'ARM. Sa conception a été réalisée selon plusieurs critères :

- Nous choisirons une cible surexprimée au niveau des cellules cancéreuses afin d'avoir un TBM avec une bonne sélectivité. Une expression des marqueurs au moins 3 fois supérieure au niveau des cellules tumorales comparé à celle des cellules saines suffit à minimiser la toxicité au niveau des tissus sains.⁴⁵
- Les récepteurs ciblés doivent être exprimés à la surface extracellulaire de manière à pouvoir être visible par les anticorps.
- La liaison à ces récepteurs ne doit pas provoquer leur internalisation afin de permettre une reconnaissance optimale avec les anticorps.
- Les TBMs doivent être suffisamment affins pour leur cible de manière à ce qu'ils ne se dissocient pas de la cellule cancéreuse pendant la phase de recrutement des anticorps endogènes.
- Nous avons fait le choix de tirer profit de la multivalence, phénomène bien connu en biologie comme nous le verrons dans le chapitre II, partie B.

A) Marqueurs tumoraux et ligands

Le point important à prendre en compte lors du choix d'un marqueur tumoral est le ratio d'expression à la surface d'une cellule cancéreuse par rapport à une cellule saine suffisant pour éviter une trop grande toxicité pour ces dernières. Dans de nombreux cas, les protéines cibles sont exprimées à la fois sur les cellules cancéreuses et sur les cellules saines. Néanmoins, une légère surexpression implique, par un effet statistique, que le ligand se liera préférentiellement sur les cellules présentant cette surexpression. En revanche, dans la majorité des cas des récepteurs ciblés, des isoformes de la protéine seront exprimés, voire surexprimés, à la surface des cellules pathogènes et non au niveau des cellules saines. Ainsi, si un ligand est sélectif de l'un des isoformes de la protéine, ce dernier garantira la sélectivité recherchée.

Le dosage des ARN messagers d'un grand nombre de lignées cellulaire nous permet aujourd'hui de connaître une très grande quantité de marqueurs tumoraux potentiels. Certains marqueurs sont devenus aujourd'hui des cibles très prometteuses, que ce soit pour

diagnostiquer un cancer, pour délivrer des drogues antitumorales ou pour vectoriser d'autres molécules à visées thérapeutiques.

J'ai fait le choix de présenter dans ce manuscrit uniquement certains de ces marqueurs ainsi que leur ligand qui sont à ce jour les plus utilisés et en étude clinique. Pour la conception de notre molécule originale ARM, et plus particulièrement du module TBM, des choix ont été faits sur la base de critères précis : différentes natures de ligands (peptide, sucre, molécule organique), un faible coût de production et une synthèse facile.

1) Les intégrines $\alpha_v\beta_3$

(a) Structure et fonction

Les intégrines sont des protéines appartenant à la famille des récepteurs hétérodimériques $\alpha\beta$ responsables de l'adhésion du cytosquelette intracellulaire et donc de la cellule à sa matrice extracellulaire. Les deux sous-unités des intégrines sont des protéines transmembranaires de type I comprenant un large domaine extracellulaire et un domaine intracellulaire plus court. Les intégrines sous forme dimérique ne sont pas liées de façon covalente puisqu'elles peuvent être dissociées grâce à des détergents ioniques. La première sous-unité appelée α présente une région extracellulaire avec 3 ou 4 domaines répétés puis un domaine I/A de 200 résidus capable de fixer un cation divalent (*metal ion-dependent adhesion site*, MIDAS). La deuxième sous-unité β possède le même domaine I/A lui aussi capable de se lier à un cation divalent, puis un domaine appelé PSI (*plexins, semaphorins and integrins*) suivi de domaines similaires à EGF riches en cystéines (**Figure 9**).⁴⁶

Les deux monomères peuvent se présenter dans deux conformations différentes : ouverte et fermée. La majorité des intégrines sont exprimées à la surface des cellules dans leur mode inactif : elles sont dites fermées et sont repliées sur elles-mêmes (**conformation A, Figure 9**). C'est lorsque les cations divalents vont entrer en coordination avec la partie MIDAS que l'hétérodimère va se retrouver dans une conformation intermédiaire où les têtes I/A ainsi que leur domaine transmembranaire vont être reliés et dépliés (**conformation B, Figure 9**). C'est dans cette position que les intégrines sont affines pour leur ligand, et non dans la position « fermée ». Quand le ligand va interagir au niveau du domaine de liaison des cations divalents, un changement conformationnel des intégrines va s'opérer et la partie transmembranaire de la sous unité β va réaliser un mouvement latéral dans la membrane plasmique (**conformation C, Figure 9**).⁴⁷

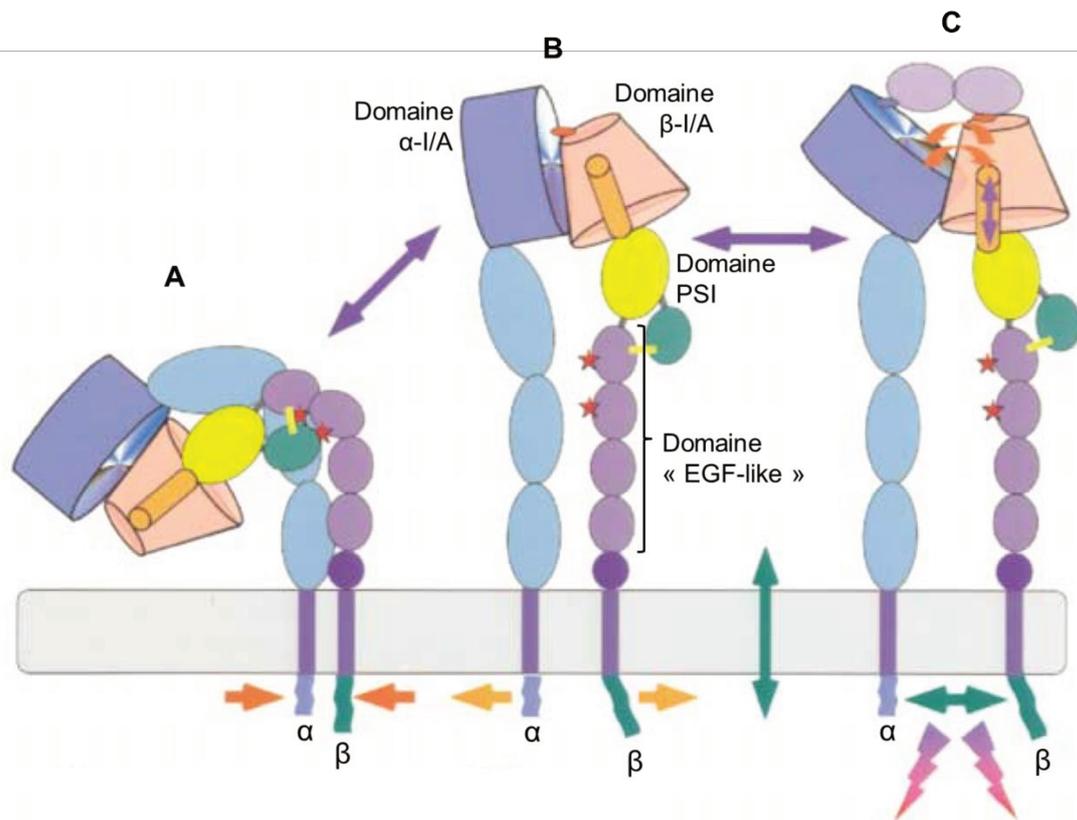


Figure 9 : Intégrine $\alpha\beta$ sous sa forme fermée ou inactive (A), se dépliant par liaison de cations divalents (B) permettant alors la liaison à son ligand (protéines de la matrice extracellulaire) sous sa forme ouverte (C) (issu et adapté de Hynes *et al.* 2002).⁴⁷

La liaison extracellulaire du ligand implique la séparation des deux parties des deux sous-unités cytoplasmiques, permettant ainsi d'avoir une interaction avec le cytosquelette et les molécules responsables de la transduction du signal. Quand les intégrines vont se lier à la matrice extracellulaire *via* les protéines ligands (fibronectine, laminine, collagène et vitronectine), elles vont se grouper dans une zone de la membrane plasmique (*clustering*) et ainsi réunir les filaments d'actines. Les intégrines ont donc un rôle d'intermédiaire entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire pour attacher les cellules à leur environnement. Elles vont aussi avoir un rôle de transduction de signal menant au contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire.⁴⁸

Les intégrines de type $\alpha_v\beta_3$ permettent l'interaction des cellules endothéliales avec les composants de leur matrice extracellulaire. Ces interactions sont critiques pour l'induction de l'angiogenèse. Les intégrines $\alpha_v\beta_3$ sont des marqueurs des vaisseaux sanguins angiogéniques et donc des tumeurs. Elles constituent donc des cibles intéressantes pour inhiber le processus d'angiogenèse en utilisant par exemple un antagoniste des intégrines $\alpha_v\beta_3$.⁵

(b) Le ligand peptidique RGD des intégrines $\alpha_v\beta_3$

La séquence tripeptidique Arg-Gly-Asp (RGD) est présente dans de nombreuses protéines extracellulaires comme la fibronectine ou encore la vitronectine qui est reconnue par les intégrines $\alpha_v\beta_3$. Ce n'est cependant qu'en 1991 que pour la première fois, l'équipe de Horst Kessler a démontré qu'un mime peptidique cyclique de la vitronectine était capable d'inhiber la fixation des cellules à leur matrice extracellulaire. En effet, leur travaux ont permis de démontrer qu'un peptide linéaire GRGDS, à une concentration de 10-50 μM était capable d'inhiber l'adhésion cellulaire sur la vitronectine. En cyclisant ce peptide covalamment et en y introduisant un acide aminé non naturel (D-Phe) (cRGDfV), cette efficacité a été multipliée par 100 par rapport à la séquence linéaire, pour atteindre des concentrations de l'ordre du micromolaire (0,1-10 μM) (Figure 10).^{49, 50}

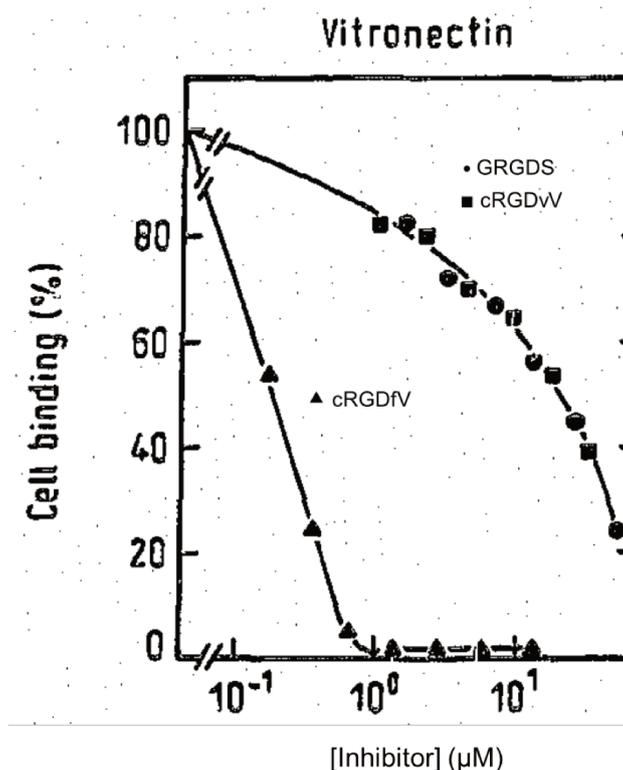


Figure 10 : Evaluation de l'effet inhibiteur de l'adhésion cellulaire à une matrice de vitronectine des séquences peptidiques RGD linéaire (●), RGD cyclique avec une D-Val (■) et RGD cyclique avec une D-Phe (▲) (issue et adaptée de Aumailley *et al.* 1991).⁴⁹

Plus de 10 ans après, la même équipe de recherche a montré que la multimérisation du peptide cyclique, à l'image de ce qui est fait naturellement chez les protéines de la matrice extracellulaire, permettait d'augmenter considérablement son affinité. Ils ont pour cela remplacé le résidu valine par un acide glutamique, afin de permettre le greffage du peptide cyclique sur un dendrimère de lysine et le présenter de façon tétravalente. Ils ont alors pu

montrer par des études d'inhibition de la liaison vitronectine/intégrine $\alpha_v\beta_3$ que des composés cRGDfE tétravalents (**Schéma 1b**) avaient une meilleure capacité d'inhibition en référence à des composés monovalents (**Schéma 1a**) (IC_{50} de respectivement 0,2 et 7 nM).⁵¹

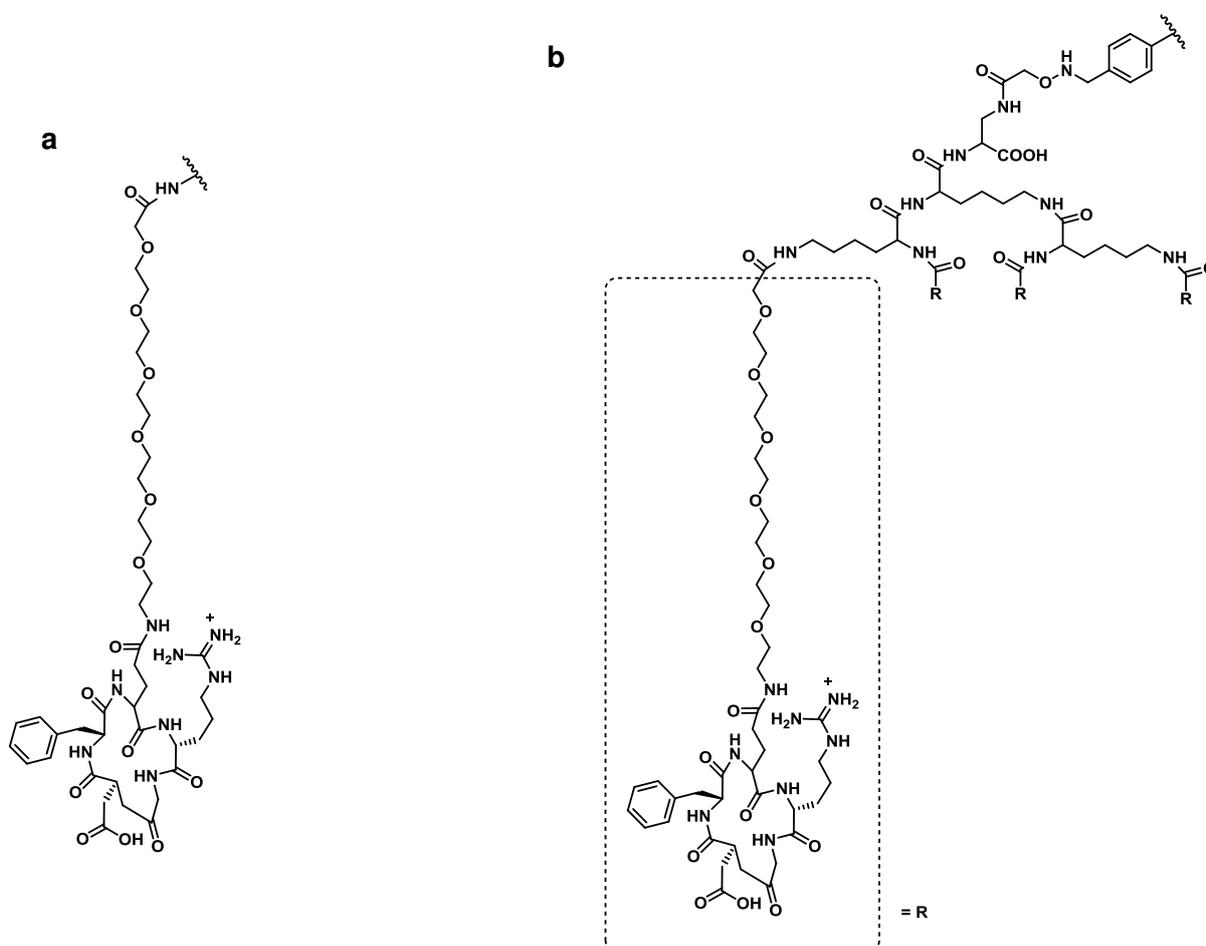


Schéma 1 : Composés cRGDfE au bout d'un espaceur "Hegas" monovalent (a) et tétravalent (b) par liaison amide à un dendrimère de lysines.

En 2006, sur la base de ces travaux préliminaires, notre laboratoire a développé des constructions originales basées sur l'utilisation d'un châssis moléculaire peptidique pour une présentation multivalente du motif cRGD. Pour cela, l'acide glutamique a été remplacé par une lysine permettant de fonctionnaliser son amine primaire pour greffer le peptide au châssis moléculaire. Ainsi, divers composés présentant 1 à 16 motifs cRGD ont été évalués par un test d'inhibition de la liaison vitronectine/intégrine $\alpha_v\beta_3$. La présentation tétravalente s'est avérée être la plus efficace (IC_{50} de 19 nM) avec une amélioration de la capacité inhibitrice de 25 par unité peptidique (**Figure 11**).⁵²

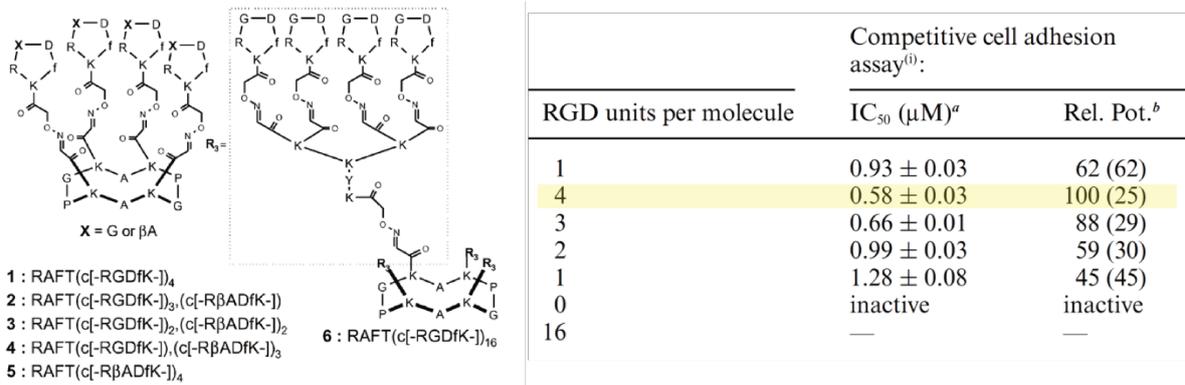


Figure 11 : Evaluation de l'effet inhibiteur de l'adhésion cellulaire à une matrice de vitronectine des peptides cRGDfK multivalents (de 1 à 16) (issue de Garanger *et al.* 2006).⁵²

Ces dernières années, de nombreux conjugués cRGDfK ont été reportés dans la littérature et certains d'entre eux sont même en phase préclinique.⁵³ C'est notamment le cas de deux conjugués composés d'un motif cRGDfK vectorisant pour l'un, une drogue cytotoxique (geldamycine) ainsi qu'une tyrosine-¹²⁵I grâce à un polymère HPMA (N-(2-hydroxypropyl methacrylamide)) (**Figure 12a**) pour une application théranostique, et pour l'autre une micelle PLA (polylactide) chargée avec du paclitaxel (**Figure 12b**). Ces deux nouvelles molécules thérapeutiques ont montré leur effet cytotoxique sur respectivement des cellules de glioblastomes et des cellules tumorales de la prostate.^{54,55}

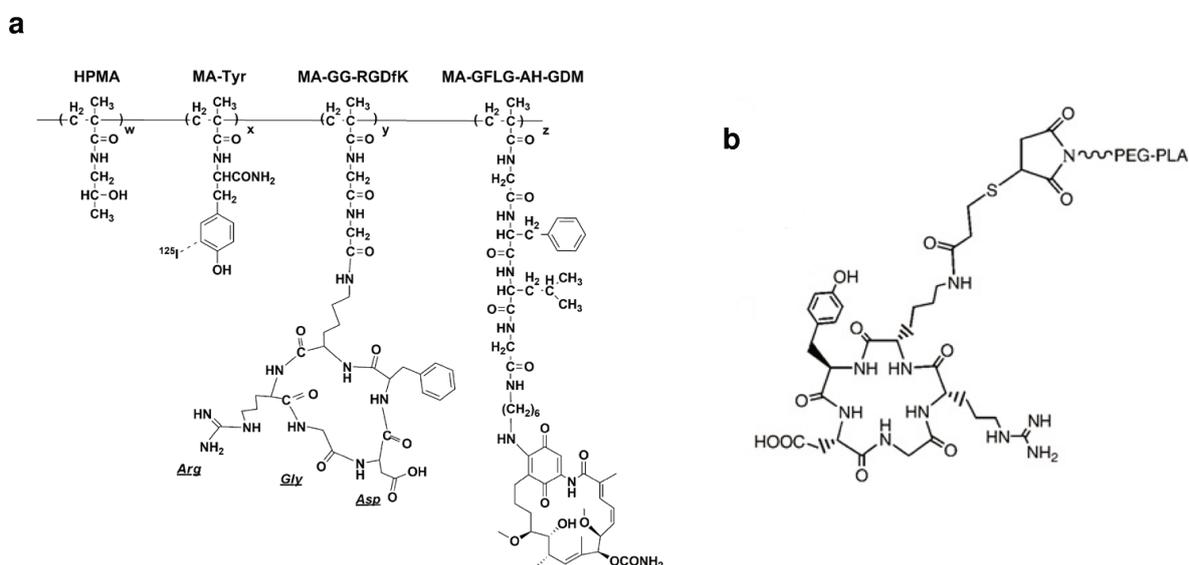


Figure 12 : Représentation de deux conjugués cRGDfK vectorisant soit une geldamycine et un tyrosine radioactive (**a**), soit du paclitaxel (**b**) (issue de Borgman *et al.* 2009 et Zhan *et al.* 2010).^{54,55}

2) Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

(a) Structure et fonction

Le récepteur des facteurs de croissance EGF (*Epidermal Growth Factor*), aussi appelé EGFR, est une protéine transmembranaire de type I. Il appartient à la famille des récepteurs ErbB dont font partie les récepteurs ErbB1 (EGFR/HER1), ErbB2 (HER2/*neu*), ErbB3 (HER3) et ErbB4 (HER4). Ces récepteurs sont impliqués dans la voie de signalisation responsable de l'activation de la division cellulaire. La protéine EGFR, lorsqu'elle est inactive, est repliée sur elle-même (**conformation A, Figure 13**). De la même manière que les intégrines, la protéine peut se retrouver sous une forme ouverte (**conformation B, Figure 13**) et active pour la liaison avec son ligand EGF (**conformation C, Figure 13**). La forme ouverte est alors stabilisée et expose le domaine II. C'est *via* ce domaine qu'une dimérisation d'EGFR intervient en initiant la phosphorylation des résidus tyrosine intracellulaire (**conformation D, Figure 13**). Dans le cas des cellules cancéreuses, où l'expression d'EGFR est anormale, cette dimérisation n'est souvent pas médiée par la liaison du ligand. En effet, leur surexpression au niveau des tumeurs leur permet de se situer relativement proche les uns des autres et ainsi de se dimériser. Une autre forme de dimérisation indépendante d'EGF implique une forme mutée d'EGFR qui va former un dimère avec une forme non-mutante d'EGFR. Dans tous les cas, les cellules tumorales ont trouvé un moyen de passer outre l'étape de liaison au ligand pour activer par elles-mêmes leur voie de division cellulaire afin de croître de façon erratique.^{56,57}

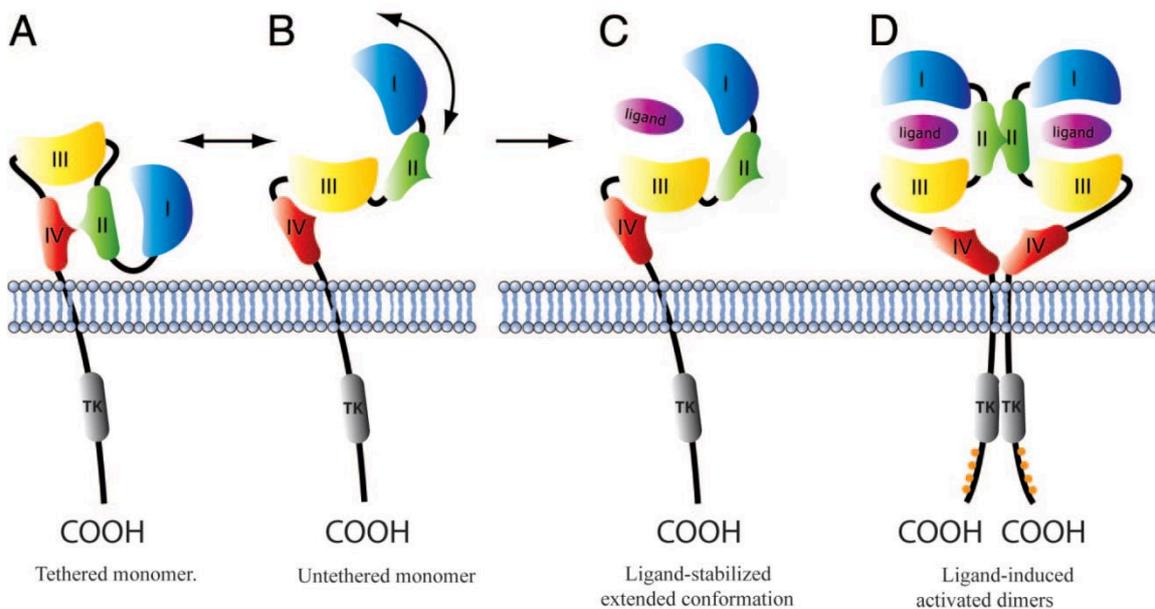


Figure 13 : Changement conformationnel d'un monomère d'EGFR au niveau d'une cellule saine (issue de Lammerts van Bueren *et al.* 2008).⁵⁶

EGFR est devenue l'une des cibles les plus étudiées pour la thérapie antitumorale depuis plus de 30 ans, et ceci pour plusieurs raisons. La première étant, comme indiqué ci-dessus, qu'EGFR est surexprimé à la surface des cellules cancéreuses, et ce dans une majorité de tissus (sein, poumon, glioblastomes, tête et nuque, vessie, colon, ovaires, prostate ...). La seconde est que les patients atteints de cancers impliquant une surexpression d'EGFR n'y survivent généralement pas. Enfin, les cellules surexprimant EGFR vont avoir tendance à élever leur taux de production de facteurs de croissance (par exemple TGF- α), encourageant alors les cellules de leur environnement proche à se développer aussi de manière aberrante. Plusieurs molécules et protéines exploitant la surexpression d'EGFR au niveau des cellules tumorales ont été élaborées et certaines sont à ce jour en phase clinique. C'est notamment le cas des composés bloquant le signal des récepteurs en empêchant soit leur dimérisation, soit la fixation des facteurs de croissance.^{58, 59}

(b) Le ligand peptidique LARLLT d'EGFR

Certaines molécules antitumorales visant non pas à inhiber l'action d'EGFR mais à l'utiliser comme cible pour des agents thérapeutiques (drogues ou anticorps) ou de diagnostics (fluorophores et composés radioactifs) sont en cours de développement. Une de ces molécules prometteuses est un hexapeptide (LARLLT) se liant à une région extracellulaire d'EGFR et éloignée du site de fixation d'EGF.⁶⁰ Néanmoins, aucune étude n'a permis à ce jour d'évaluer précisément l'affinité de ce peptide pour EGFR.

Plusieurs expériences de liaison de l'hexapeptide ont cependant été réalisées sur des cellules surexprimant le récepteur cible. Ainsi, pour une application diagnostique, un conjugué fluorescent (sulfo-Cy5) avec un agent chélateur du cuivre ont été greffés de manière covalente au peptide LARLLT. Ce dernier a été ajouté à plusieurs lignées cellulaires présentant des taux d'expressions d'EGFR variables. Après la lyse cellulaire et la purification d'EGFR, les solutions ont été analysées sur un gel en révélant la présence du cuivre (autoradiographie), du fluorophore (fluorescence), ainsi que de la protéine EGFR elle-même (immunoblot) (**Figure 14**). Ces analyses ont montré que ce composé peptidique se lie aux cellules exprimant EGFR et qu'il peut être utilisé comme candidat pour des applications diagnostiques.⁶¹

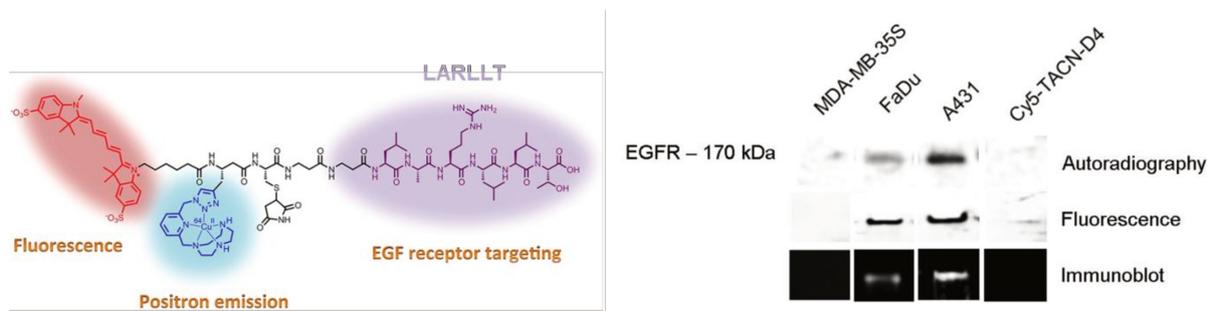


Figure 14 : Interaction d'un conjugué LARLLT/sulfo-Cy5/complexe de Cu^{2+} avec EGFR. Etude par fluorescence et autoradiographie (issue de Viehweger *et al.* 2014).⁶¹

Une autre application diagnostique a été reportée avec le conjugué BODIPY (bore-dipyrométhène, émetteur de fluorescence) greffé au peptide LARLLT. Une étude réalisée sur des cellules surexprimant EGFR en présence du conjugué a permis de mettre en évidence l'interaction de l'hexapeptide avec les cellules cibles *via* des analyses de microscopie de fluorescence (**Figure 15**).⁶²

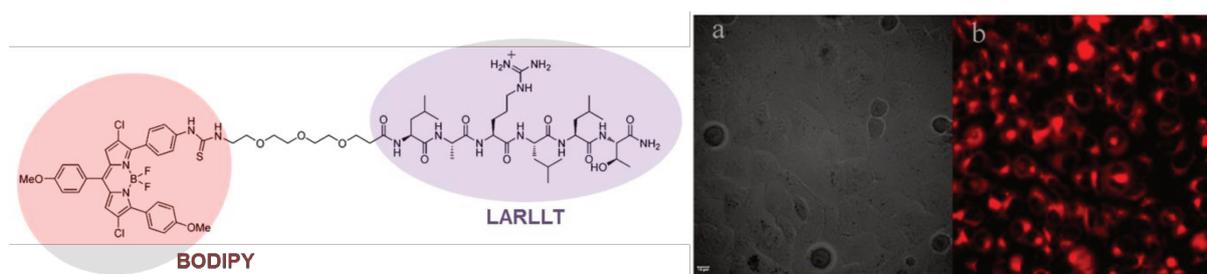


Figure 15 : Interaction d'un conjugué BODIPY-LARLLT aux cellules surexprimant EGFR. Etude par microscopie à fluorescence (issue et adaptée de Zhao *et al.* 2017).⁶²

3) L'anhydrase carbonique IX (CA IX)

(a) Structure et fonction

Les anhydrases carboniques (*carbonic anhydrase*, CA) sont une classe de protéines catalysant des réactions physiologiques fondamentales telles que l'interconversion entre le dioxyde de carbone et le bicarbonate. Cette dernière est nécessaire lors de la respiration et du transport du CO_2 vers les différents tissus et sites d'excrétion, mais aussi pour la régulation du pH. L'inhibition ou l'activation de ces enzymes peut donc être exploitée pour le traitement d'une grande variété de pathologies. Il existe 14 isoformes différents variant par leur localisation cellulaire ainsi que leur distribution tissulaire : sous forme cytosoliques (CA I-III, CA VII, CA XIII), membranaires (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV), mitochondriales (CA V) et sécrétées (CA VI).⁶³

Dans le cas de la recherche antitumorale, l'isoforme CA IX a été largement étudié puisque surexprimé sur une majorité de tissus tumoraux (carcinomes de la tête, du poumon, des poumons, du cerveau ...) et très peu au niveau des tissus sains. CA IX est en effet surexprimé dans les milieux hypoxiques, donc dans l'environnement des cellules tumorales. De plus, CA IX permet la survie des tumeurs dans des milieux à pH acides. En effet, un transporteur situé à proximité va faire entrer le HCO_3^- produit par CA IX dans la cellule et réguler le pH intracellulaire (**Figure 16**). Du fait de cette surexpression, CA IX a été très tôt utilisée comme antigène pour la production de mAbs ciblant les tumeurs.⁶⁴

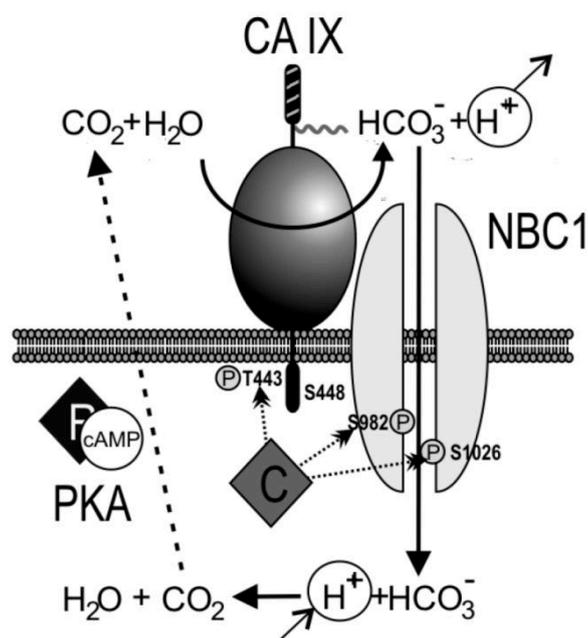
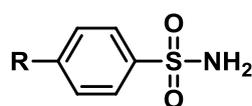


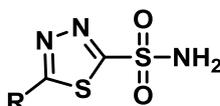
Figure 16 : Activité de CA IX surexprimée à la surface de cellules cancéreuses en environnement hypoxique (issue de Ditte *et al.* 2011).⁶⁵

(b) Le ligand sulfonamide (SA) de CA IX

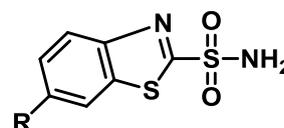
Les molécules sulfonamides aromatiques (**Figure 17 A**) et hétérocycliques (**Figure 17 B et C**) sont de très bons inhibiteurs des CAs. Ils sont utilisés depuis plus de 50 ans dans le traitement d'une grande variété de pathologies (glaucome, épilepsie, ulcères ...).



A



B



C

Figure 17 : Exemples de molécules sulfonamides inhibitrices des CAs.

Ce n'est que depuis quelques années que certaines classes de sulfonamides ont été développées pour des applications antitumorales.⁶⁶ C'est notamment le cas de la molécule acétazolamide (AZ) (**Figure 17 B**) pour laquelle le groupe de Teicher a montré que, lorsqu'elle était combinée à un traitement de chimiothérapie classique, l'efficacité antitumorale était augmentée.⁶⁷

Depuis lors, la molécule acétazolamide a été utilisée dans des recherches de traitements et de diagnostics antitumoraux. En 2009, une étude a montré qu'un conjugué AZ-fluorophore (fluorescéine) était capable de se fixer sur un tissu tumoral issu d'un adénocarcinome colorectal (**Figure 18**). L'étude a également permis de définir que les régions sur le tissu où se fixent les conjugués sont éloignées des vaisseaux sanguins (rouge), régions en général où l'environnement est hypoxique, confirmant donc que le conjugué se fixe potentiellement aux CA IX.⁶⁸

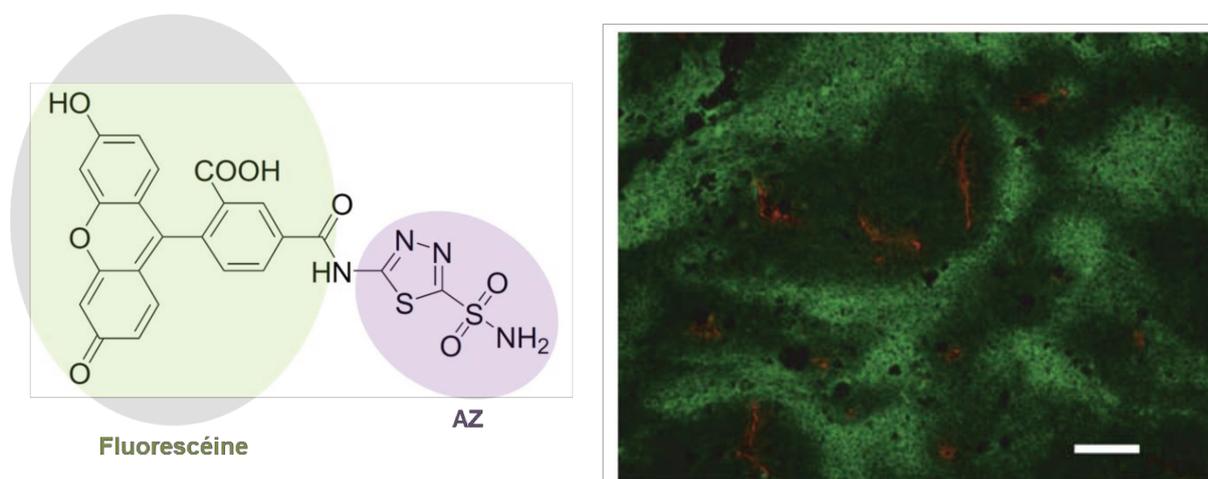


Figure 18 : Interaction du conjugué AZ-fluorescéine avec un tissu tumoral surexprimant CA IX. Etude par microscopie à fluorescence (issue et adaptée de Ahlskog *et al.* 2009).⁶⁸

La liaison de sulfonamides aromatiques multivalents a aussi été analysée. Parmi de nombreuses études réalisées, l'un d'elles a consisté à synthétiser un conjugué de sulfonamides (SA) divalents avec un fluorophore rhodamine et à l'incuber avec 4 lignées cellulaires présentant différents niveaux d'expression de CA IX. Comme attendu, les composés se sont avérés se lier de façon efficace aux cellules (**Figure 19**). Une étude par compétition, réalisée en ajoutant en excès la même molécule SA sans fluorophore a permis de montrer la spécificité de la liaison SA-CA IX.⁶⁹ Cette expérience nous montre de plus qu'ici, une présentation multivalente apporte une meilleure reconnaissance des cellules par ce composé.

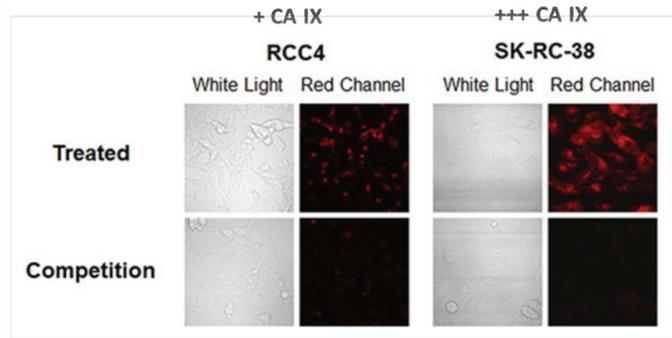
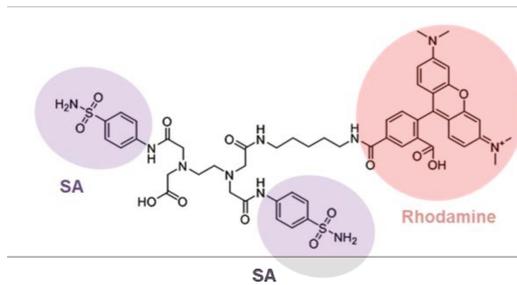


Figure 19 : Interaction du conjugué SA divalent-rhodamine par incubation directe ou par compétition avec deux lignées cellulaires (RCC4 et SK-RC-38) avec différentes expression de CA IX. Etude par microscopie à fluorescence (issu et adapté de Lv *et al.* 2016)⁶⁹

Il ne fait donc pas de doute que les molécules acétazolamide et sulfonamides sont de très bons ligands pour CA IX et qu'ils peuvent donc être utilisés comme module de reconnaissance des cellules cancéreuses.

4) Le transporteur du glucose (GLUT1)

Dans les années 1930, le futur prix Nobel Otto Heinrich Warburg a observé que les cellules cancéreuses, pour se développer, produisaient leur énergie grâce à une activité glycolytique jusqu'à 200 fois plus élevée que dans des cellules saines du même tissu. Depuis, le terme d'effet Warburg est utilisé pour décrire ce phénomène. Ainsi, les enzymes participant à ces différentes étapes du processus de glycolyse vont être surexprimées dans le cas de cellules malignes. L'étape la plus importante, puisque limitante, est le transport transmembranaire du glucose exogène à l'intérieur de la cellule.

Le D-glucose prélevé par les cellules à partir de la circulation sanguine est transporté jusque dans le compartiment intracellulaire *via* des transporteurs à diffusion facilitée « GLUT ». Plusieurs isoformes de ce transporteur existent à ce jour, tous appartenant à des types cellulaires différents. La surexpression de l'isoforme GLUT1 à la surface de cellules cancéreuses a été observée sur de nombreux tissus tels que les poumons, l'estomac, la thyroïde, le colon, l'œsophage, la vessie et les seins.⁷⁰ Cette protéine est impliquée dans la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses, ainsi que dans la progression tumorale. L'expression génétique des transporteurs GLUT1 semble changer au moment où la cellule initie sa transformation de cellule hépatique saine en hépatocarcinome.

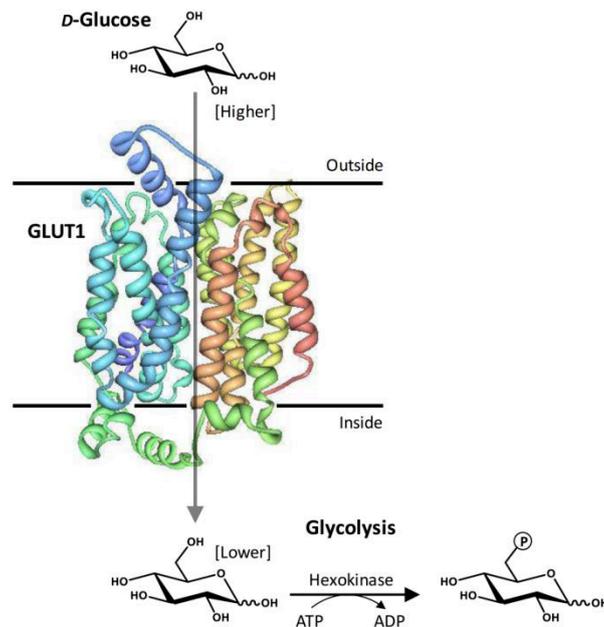


Figure 20 : Transport du glucose exogène par GLUT1 à travers la membrane plasmique et initiation de la glycolyse intracellulaire (issue de Patching 2015).⁷¹

Ainsi, le ligand de GLUT1, le β -D-glucose, a été utilisé comme vecteur pour le diagnostic et proposé dans plusieurs approches de traitement antitumoral des cellules surexprimant cet isoforme. Le ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG), un analogue radioactif du glucose, a été largement utilisé pour localiser le devenir du glucose exogène puisque pris en charge par les enzymes intervenant dans le processus de glycolyse en particulier. En effet, après transport dans le cytoplasme, le FDG va être phosphorylé en FDG-6-phosphate. En revanche, il ne sera pas reconnu par la glucose-6-phosphate isomérase. Ainsi, le FDG-6-phosphate va s'accumuler dans le cytoplasme et le ^{18}F sera détecté par PET (*Positron Emission Topography*). Il sera ainsi possible de localiser les tumeurs grâce au transport massif des FDG par GLUT1 surexprimé par les cellules cancéreuses.⁷² Ci-dessous est reporté l'analyse par PET d'un patient atteint d'un cancer de l'œsophage et ayant reçu une injection d'isotope radioactive du glucose (FDG) (**Figure 21**).⁷³

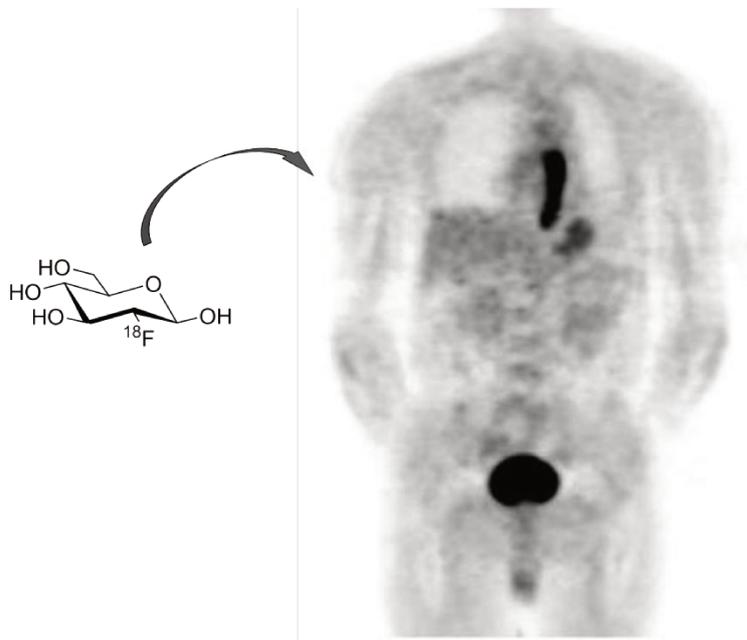


Figure 21 : Image de PET du corps d'un patient atteint de cancer de l'oesophage après injection de l'analogue radioactif ^{18}F du β -D-glucose (issue et adaptée de Van Westreenen et al. 2005).⁷³

Un dérivé du β -D-glucose, le glufosfamide, est depuis quelques années largement utilisé en chimiothérapie dans le traitement d'une grande variété de cancers. Ce composé est constitué d'un agent alkylant de la famille des moutardes azotées, l'ifosfamide, conjugué au β -D-glucose (**Figure 22**).⁷⁴ Malgré l'efficacité de ce composé, Ammons et coll. ont montré qu'il devait être associé à une autre drogue cytotoxique, la gemcitabine (anti-métabolite), pour obtenir des effets antitumoraux satisfaisants. En effet, l'inhibition de prolifération de cellules de carcinomes du pancréas (parmi d'autres) s'est avéré être totale avec cette bi-chimiothérapie, ce qui n'était pas le cas avec une mono-chimiothérapie (**Figure 22**).⁷⁵

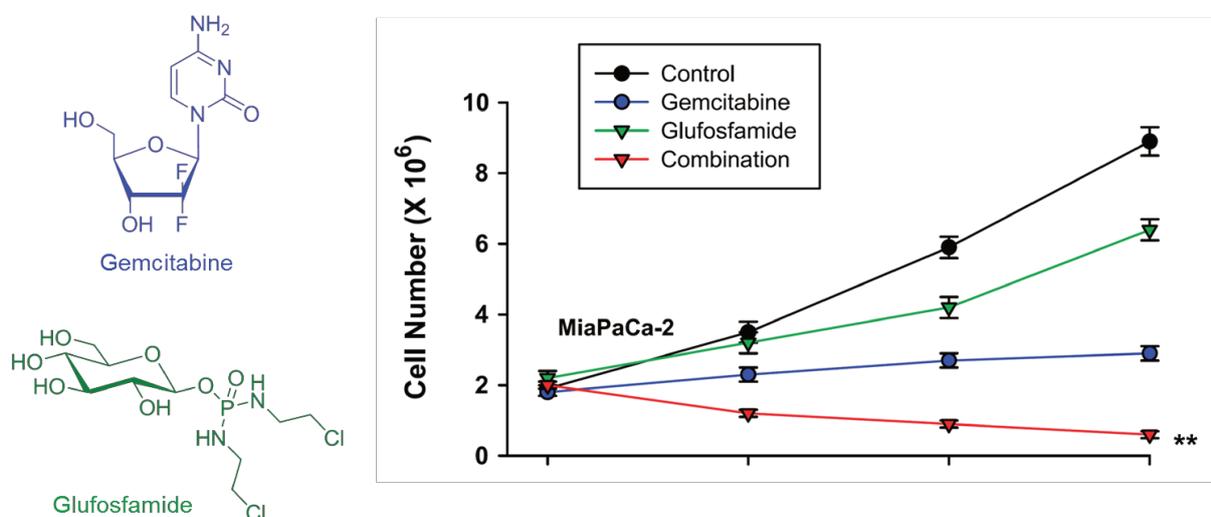


Figure 22 : Test de viabilité de cellules cancéreuse de pancréas (MiaPaCa-2) après ajout de la gemcitabine ou du glufosfamide ou des deux combinés (issu de Ammons *et al.* 2007).⁷⁵

5) Résumé des marqueurs tumoraux et de leur ligand

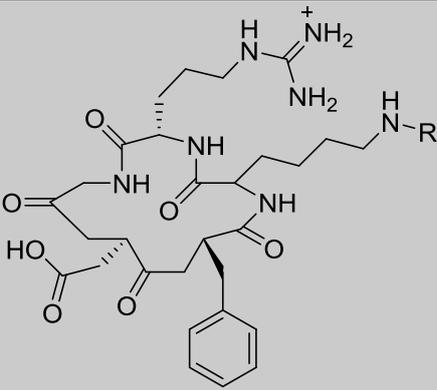
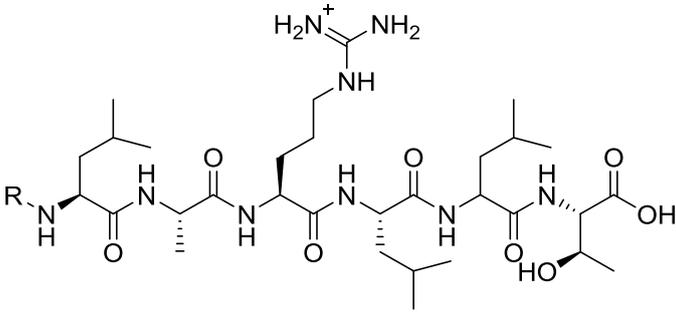
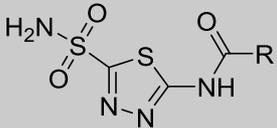
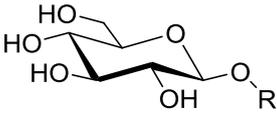
Cible	Ligand	Réf.
Intégrine $\alpha_v\beta_3$	 <p>cRGDFK</p>	46-55
EGFR	 <p>LARLLT</p>	56-62
CA IX	 <p>Acétazolamide</p>	63-69
GLUT1	 <p>β-D-glucose</p>	70-75

Tableau 2 : Marqueurs tumoraux et leurs ligands.

En nous axant sur ces 4 ligands pour concevoir le module TBM, nous avons ainsi fait le choix de faire varier les natures des molécules (peptide, molécule organique et sucre) mais aussi de cibler des protéines qui sont déjà bien connus pour être surexprimé sur des cellules cancéreuses. De plus, l'intérêt de cibler ces marqueurs réside dans la possibilité de se procurer facilement les lignées cellulaires les exprimant pour faire nos tests d'interaction *in vitro*.

B) Stratégie de synthèse du TBM

1) Augmentation de l'affinité par multivalence

Dans la nature, les processus biologiques utilisent très largement les interactions multivalentes pour augmenter l'affinité et la sélectivité des ligands pour leur cible mais aussi pour initier un *clustering* des récepteurs cellulaires, mouvement essentiels pour certaines transmissions de signaux cellulaires.⁷⁶ La présentation multivalente de ligands sur une plateforme synthétique présente donc de nombreux intérêts.⁷⁷

L'affinité apparente d'un ligand multivalent pour sa cible est supérieure à l'affinité du même ligand présenté seul. Cette propriété peut être expliquée par plusieurs processus d'interaction. L'affinité d'un ligand pour une cible est dictée par un coût énergétique de liaison. Dans certains cas, les récepteurs membranaires ciblés sont présents sous forme oligomérique. Ainsi, lorsque plusieurs ligands sont présentés simultanément sur la même molécule, le coût énergétique est majoritairement lié à la liaison de l'un d'entre eux permettant aux autres ligands de se lier sans besoin énergétique supplémentaire. Cette propriété est décrite comme **l'effet chélate (Figure 23a)**. Cet effet s'applique aussi lorsque les récepteurs sont sous forme monomérique mais qu'ils se regroupent au niveau d'une même zone : c'est le ***clustering* (Figure 23b)**. Un autre mécanisme implique des protéines cibles possédant un site de liaison secondaire qui, lorsqu'il sera occupé par l'un des ligands, va permettre au deuxième ligand de se lier plus facilement au site principal de la cible. Cette propriété est définie comme **l'association à un sous-site (Figure 23c)**. Enfin, un ligand présenté de façon multivalente va permettre d'avoir une concentration locale supérieure à celle qui serait obtenue avec un ligand monovalent. Ainsi, lorsque ces ligands interagissent avec un récepteur, leur affinité apparente est plus importante puisqu'il peut y avoir une **réassociation statistique** des ligands si l'un d'entre eux se dissocie de sa cible. (**Figure 23d**).⁷⁸

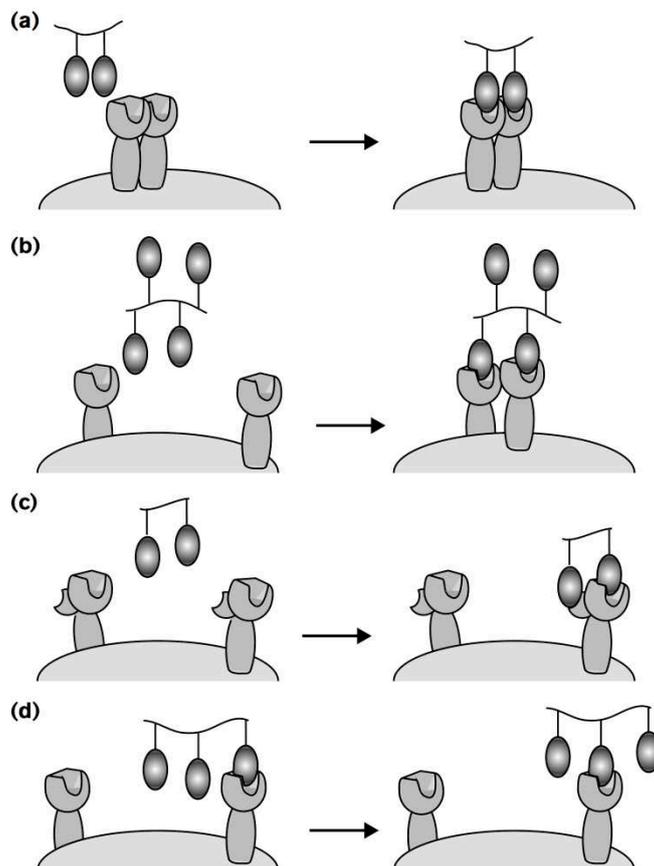


Figure 23 : Processus d'interaction ligands multivalents/cibles par effet chélate **(a)**, *clustering* **(b)**, association à un sous-site **(c)** et réassociation statistique **(d)** (issu de Kiessling *et al.* 2000).⁷⁸

Pour la conception de notre module de reconnaissance des cellules cancéreuses, il nous a donc semblé judicieux d'améliorer à la fois l'affinité et la sélectivité des ligands candidats, mais aussi de limiter au maximum la possible dissociation de ces derniers avec leur cible, en les présentant de façon multivalente. Cette stratégie requiert l'utilisation d'une plateforme présentant plusieurs bras fonctionnalisables permettant de greffer les molécules ligands sélectionnées. Pour cela une grande variété de châssis moléculaires synthétiques sont disponibles pour préparer de telles structures multivalentes (**Figure 24**). L'intérêt de ces plateformes est qu'elles sont facilement modifiables pour sélectionner les paramètres voulus qui jouent un rôle important lors de l'interaction du ligand avec sa cible, à savoir la valence, la densité et la taille :

- Pour une présentation tétravalente : plusieurs petites molécules aromatiques (**Figure 24 A à C**) ou non-aromatiques (**Figure 24 D à F**) tetrasubstituées.^{79,80}
- Pour une présentation pentavalente : des molécules commerciales, et donc permettant une synthèse plus simple, telles que le corannulène (**Figure 24 G**)⁸¹ ou le pentaazacyclopentadécane (**Figure 24 H**).⁸²
- Pour atteindre des valences plus élevées : des composés plus complexes (**Figure 24 I à U**).^{80,83-92}

Une propriété importante pour ce type de plateformes est la possibilité d'y greffer deux molécules distinctes *via* deux groupements fonctionnels différents. De telles plateformes pourraient permettre de conjuguer par exemple un ligand tumoral ainsi qu'un fluorophore. Il sera aussi possible de relier deux plateformes entre elles afin d'obtenir une architecture moléculaire d'une valence supérieure. Les molécules cyclotriphosphazène (**Figure 24 I**)⁸³ et calixarène (**Figure 24 J**)⁸⁴⁻⁸⁶ offrent notamment cette possibilité.

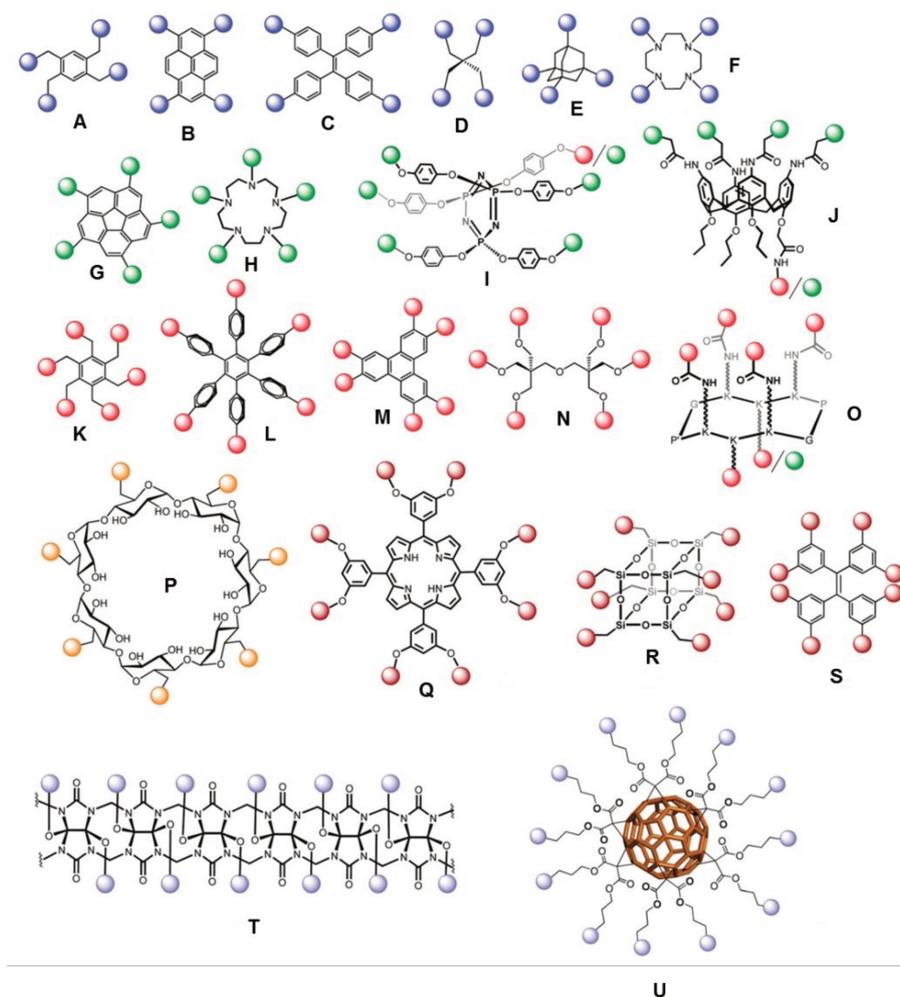


Figure 24 : Plateformes synthétiques disponibles pour la présentation de ligands multivalents (issue et adaptée de Roy et Shiao 2015).⁷⁷

2) Utilisation du RAFT comme plateforme multivalente

Dans notre équipe, nous développons des constructions biomoléculaires en greffant des peptides, des acides nucléiques ou des sucres à des plateformes multivalentes peptidiques. Le modèle utilisé est un cyclodécapeptide RAFT (*regioselectively adressable functionalized template*, **Figure 24 O**) introduit par Manfred Mutter en 1988 et qui est depuis largement utilisé pour des présentations multivalentes de ligands. A l'origine, le but était de synthétiser

un fragment protéique en mimant sa structure tertiaire, le postulat de départ étant qu'il fallait une plateforme pour contraindre les différents brins peptidiques (*template-assembled synthetic proteins*, TASP). Par modélisation moléculaire, l'équipe est arrivée à la conclusion que cette plateforme devait être composée de deux segments peptidiques antiparallèles liés par un ou deux coudes β .^{93,94}

Aujourd'hui, cette plateforme RAFT est largement utilisée pour d'autres applications au laboratoire. Elle consiste en un peptide cyclique de 10 acides aminés (cyclo(PGKAKPGKKK)) plan grâce deux coudes β (en vert, **Figure 25**), de 5 Å de large et 10 Å de long, et présentant deux faces d'adressages. Le RAFT permet de greffer des biomolécules en utilisant les 4 groupements amines modifiables des résidus lysines (en bleu, **Figure 25**) sur la face supérieure, et d'accrocher sur la face inférieure grâce l'amine primaire de la lysine restante des drogues ou des fluorophores pour des applications thérapeutiques et diagnostiques (en rouge, **Figure 25**).⁹⁵

Nous avons donc décidé pour notre projet d'utiliser ce châssis cyclodécapeptidique puisqu'il nous permet d'avoir une plateforme non seulement très bien tolérée *in vivo*, mais aussi non-immunogénique.⁹⁶

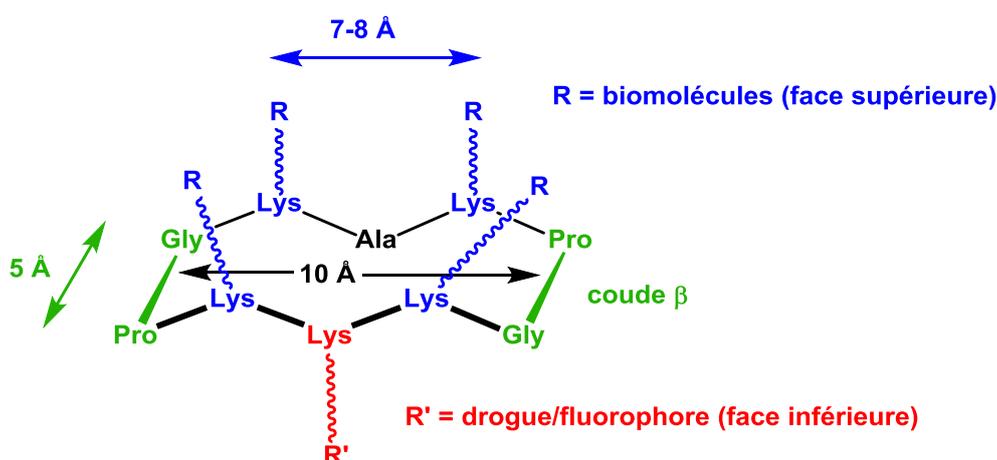


Figure 25 : Représentation schématique de la plateforme décacyclopeptidique RAFT

Le module de reconnaissance TBM consistera à présenter les ligands tumoraux à leur cible de manière tétravalente en utilisant la plateforme RAFT décrite ci-dessus. L'assemblage des ligands à la plateforme se fera par des ligations chimiosélectives. Pour ce faire, les deux partenaires devront être équipés de groupements complémentaires nécessaires pour réaliser la ligation.

(a) Les ligations chimiosélectives

Kolb, Finn et Sharpless, en 2001, ont introduit la notion de chimie « click », définissant le terme de liens hétéroatomiques de plusieurs blocs, peptidiques ou non. Ce terme de chimie click implique de remplir un certain nombre de conditions :

- Elle doit faire intervenir une grande gamme de molécules,
- Elle doit être économe en atomes,
- Elle doit donner de hauts rendements de réaction,
- Elle doit donner des produits secondaires pouvant être facilement éliminables,
- Elle doit être stéréospécifique,
- Elle doit avoir des conditions de réaction simples (c'est-à-dire qu'elle ne doit pas être sensible à l'eau ou à l'oxygène),
- Les réactifs et solvants doivent être disponibles dans le commerce,
- Elle doit se faire dans aucun solvant ou dans un solvant bénin (eau par exemple), ou facilement extractible,
- Le produit doit être facilement isolable.

L'avantage de ce genre de ligation est qu'elle permet d'avoir des produits finaux stables sous différentes conditions physiologiques.⁹⁷

Depuis son introduction, la chimie « click » est aujourd'hui très largement utilisée dans le monde scientifique, en particulier pour la conjugaison de différents blocs peptidiques. Ce type de chimie offre un large panel d'assemblages possibles faisant intervenir différents groupements, paramètres, catalyseurs ...⁹⁸ Nous nous intéresserons dans ce manuscrit à deux types de ligations chimiosélectives qui nous ont permis d'obtenir les différents assemblages de molécules finales : la cycloaddition alcyne-azoture catalysée au cuivre (CuAAC) et la ligation thioéther.

Cycloaddition de Huisgen régiosélective catalysée au cuivre (CuAAC) :

Cette cycloaddition a été introduite par Rolf Huisgen en 1963.⁹⁹ La réaction fait intervenir un groupement alcyne et un groupement azoture et conduit à la formation d'un hétérocycle de type triazole. Pour répondre aux critères de chimie « click » cités précédemment, la procédure de cycloaddition à plus tard était adaptée par l'équipe de Barry Sharpless¹⁰⁰ et celle de Morten Meldal.¹⁰¹ En effet, la régiosélectivité du produit triazole n'était à l'origine pas contrôlée, la réaction donnant deux produits 1,4- et 1,5-disubstitués. L'introduction dans la réaction d'un catalyseur cuivre (I) a alors permis de contrôler la cycloaddition pour obtenir un produit régiospécifique avec un triazole 1,4-disubstitué

(CuAAC). De nombreuses sources de Cu(I) peuvent être utilisées (CuI, CuOTf·C₆H₆ et [Cu(NCCH₃)₄][PF₆]). Il a cependant été établi que le meilleur catalyseur pour la réaction de CuAAC était préparé à partir de sels de Cu(II), suite à une réduction à l'acide ascorbique ou à l'ascorbate de sodium.

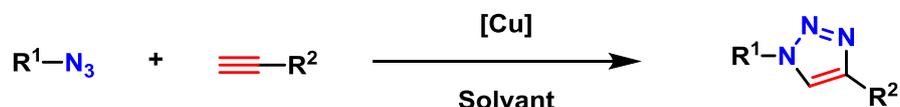


Schéma 2 : Réaction de cycloaddition alcyne-azoture catalysée au cuivre (I) (CuAAC)

L'avantage de ce type de liaison est qu'elle conduit aux produits avec de hauts rendements à température ambiante, dans de l'eau et en peu de temps (6 à 36 heures). De plus, la plupart des réactions de liaison se font à pH neutre ; or dans le cas de la CuAAC, le catalyseur fonctionne dans une large gamme de pH (4 à 12). Le produit formé présente quant à lui l'avantage d'être relativement stable, la liaison triazole étant insensible aux conditions oxydantes, réductrices et d'hydrolyse.

Couplage thiol-chloroacétyle (TCC) :

Cette méthode de chimie « click » a largement été utilisée dans les années 1980 pour réaliser des constructions multivalentes peptidiques antigéniques pour produire des anticorps. C'est notamment le cas de l'équipe de James Tam qui a utilisé un cœur dendritique de lysines afin d'amplifier la présentation de peptide ainsi que leur densité pour annuler totalement l'immunogénicité du cœur peptidique et produire des anticorps affins uniquement pour les peptides présentés.¹⁰² Cette méthode de liaison permet de lier un peptide présentant à une de ces extrémités une cystéine avec un thiol libre, à un groupement chloroacétyle, dans des conditions de pH basique en milieu aqueux et en présence d'un sel d'iodure de potassium. Le conjugué thioéther ainsi formé a l'avantage d'être stable et robuste. Cette méthode de couplage peut être utilisée pour la liaison d'autres biomolécules comme des sucres.^{103,104}

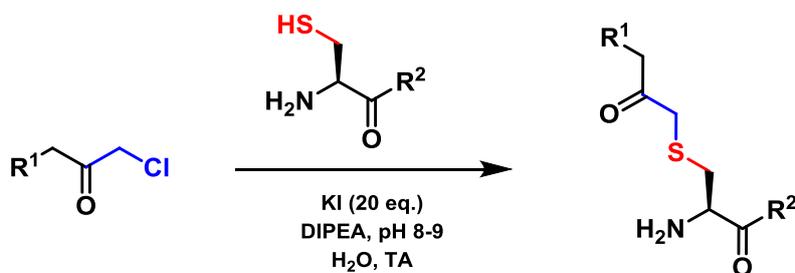


Schéma 3 : Réaction de liaison thio-chloroacétyle

(b) Synthèse de la plateforme RAFT

Dans le cas d'une ligation CuAAC, la stratégie consiste à incorporer pendant la synthèse de la plateforme peptidique RAFT des lysines modifiées par un groupement azoture **1**. Le peptide linéaire est synthétisé sur support solide (SPPS) en utilisant une stratégie Fmoc/*t*Bu. Nous avons choisi la résine Fmoc-Gly-SASRIN[®] permettant des conditions de détachement du peptide douces afin de préserver le groupement protecteur Boc de la lysine de la face inférieure et donc nous garantissant de cycliser le peptide au niveau des fonctions acide carboxylique et amine terminales. Après une première déprotection du groupement Fmoc de la glycine déjà greffée sur la résine, le premier acide aminé est lié à son amine libre avec l'aide d'un agent de couplage (PyBOP) en milieu basique (DIPEA). Après plusieurs cycles d'étapes couplage/déprotection, le peptide linéaire **2** est détaché de la résine par plusieurs traitements avec un mélange de 1% de TFA dans du DCM. Ce mélange contenant le peptide est alors neutralisé par ajout de DIPEA pour éviter la déprotection du groupement Boc restant puis le solvant est éliminé par évaporation. Sans purification du peptide, le mélange brut est resolubilisé dans du DCM et cyclisé pendant 2h à température ambiante en milieu basique à une concentration de 0,5 mM pour éviter toute réaction intermoléculaire et en présence de PyBOP. Le mélange réactionnel contenant le peptide cyclique **3** est ensuite évaporé. Enfin, l'huile obtenue est reprise dans un mélange DCM/TFA (1:1) pour déprotéger la lysine restante et obtenir le peptide **4** avec un rendement final de 64 % (Schéma 4).

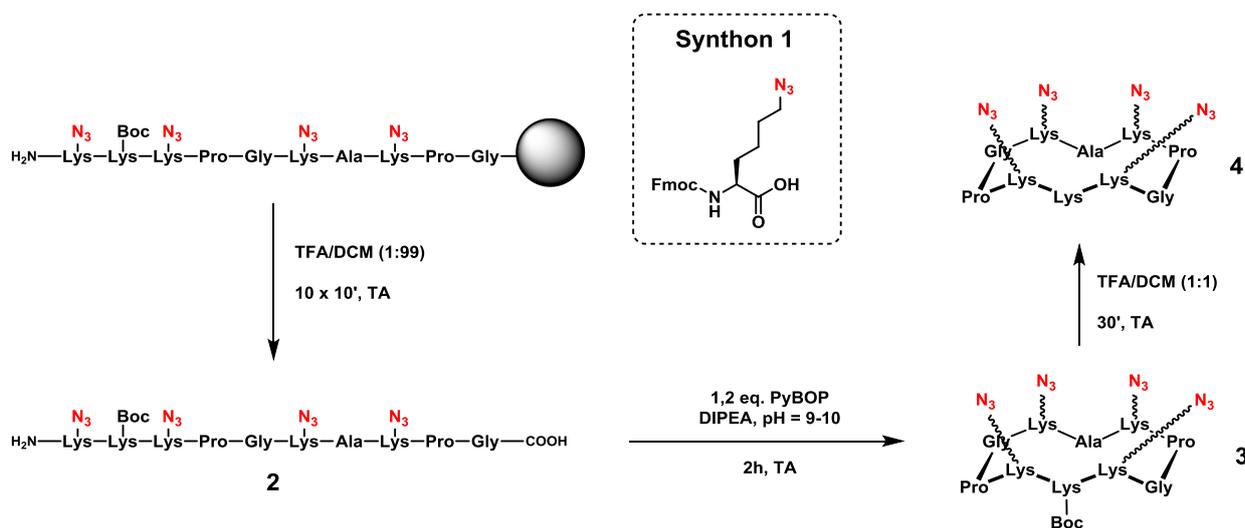


Schéma 4 : Synthèse du décapeptide cyclique RAFT avec 4 groupements azotures

La plateforme RAFT **4** avec 4 groupements azotures peut alors être utilisée pour greffer 4 peptides candidats devant porter un groupement alcyne à leur extrémité.

Dans le cas d'un couplage TCC, la stratégie consistera à synthétiser dans les mêmes conditions un peptide RAFT linéaire avec 4 lysines de la face supérieure protégées par un groupement Boc et avec la lysine de la face intérieure modifiée pour présenter un groupement alcyne (synthon **5**). Après détachement de la résine, cyclisation du peptide et déprotection des lysines, 4 groupements chloroacétyle sont ajoutés aux lysines de la face supérieure par ajout d'un anhydride chloroacétique en milieu basique pour obtenir le peptide RAFT cyclique **6** avec un rendement final de 57 % (Schéma 5).

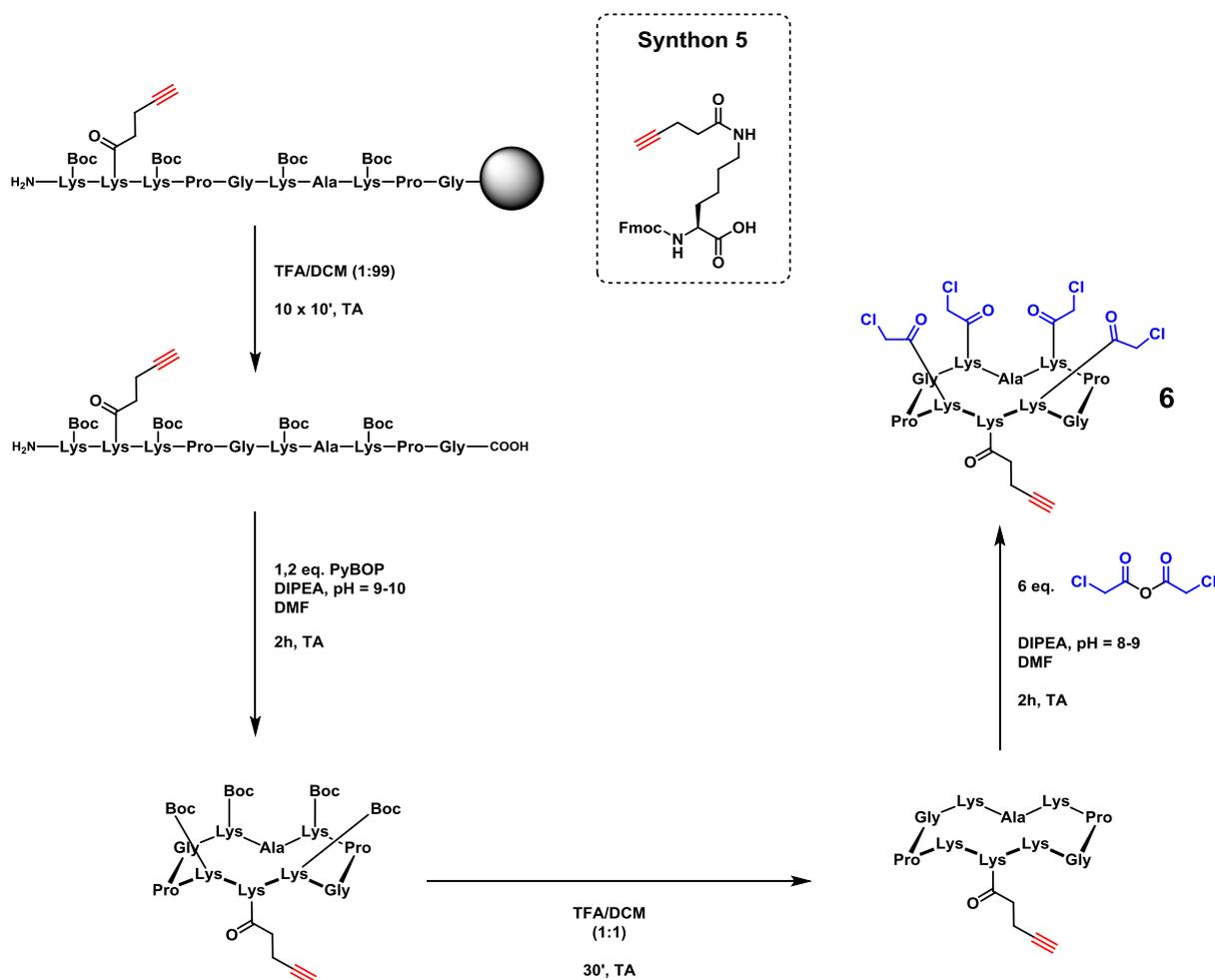


Schéma 5 : Synthèse du décapeptide cyclique RAFT avec 4 groupements chloroacétyles sur sa face supérieure et un groupement alcyne sur sa face inférieure.

La plateforme RAFT **6** avec 4 groupements chloroacétyle sur sa face supérieure peut alors être utilisée pour greffer 4 peptides candidats devant porter un groupement thiol à leur extrémité.

3) Synthèse des ligands tumoraux monovalents et tétravalents

(a) Le peptide cRGDfK

Comme présenté précédemment, le cyclopeptide cRGDfK est un très bon ligand des intégrines $\alpha_v\beta_3$ surexprimées dans une majorité de tissus tumoraux. Ce peptide cyclique a été très étudié dans notre équipe de recherche et a fait l'objet de plusieurs publications montrant son efficacité comme agent vecteur de drogue ou de fluorophore, notamment en le présentant de façon tétravalente, sur plusieurs types de cœurs moléculaires et plusieurs méthodes de ligations chimiosélectives.¹⁰⁵⁻¹⁰⁹ Dans notre cas, nous évaluerons comme TBM le peptide monovalent ainsi qu'une construction tétravalente synthétisée par ligation CuAAC sur la plateforme RAFT, cette étude n'ayant jamais été faite au laboratoire.

Pour cela, le peptide doit détenir une fonction alcyne pour pouvoir réagir avec les groupements azotures du RAFT. Le synthon Fmoc-lysine-alcyne **5** est être ajouté pendant la synthèse SPPS du peptide cRGDfK. Là encore, nous avons décidé d'utiliser une résine Fmoc-Gly-SASRIN[®] afin de garder les groupements protecteurs après détachement du peptide linéaire RGDfK protégé **7** puis pour cycliser le peptide en solution. Le peptide cyclique **8** est ensuite déprotégé pour donner le peptide cRGDfK-alcyne **9**, ou « **TBM-RGD** » avec un rendement final de 65 % (**Schéma 6**). **9** peut être ensuite greffé à la plateforme RAFT **4** présentant 4 groupements azotures par ligation CuAAC dans un mélange DMF/PBS (1:1, v/v) à pH 7,4, en présence de CuSO₄, de THPTA et de Na-ascorbate pendant 2 heures à température ambiante. Ce peptide TBM tétravalent **10** sera appelé « **TBM-R4(RGD)_t** ». Un groupement alcyne est ajouté à l'amine libre de la lysine de la face inférieure en utilisant un acide pentynoïque activé par un groupe O-succinimidyl donnant le produit **11** avec un rendement de 27 % (**Schéma 7**).

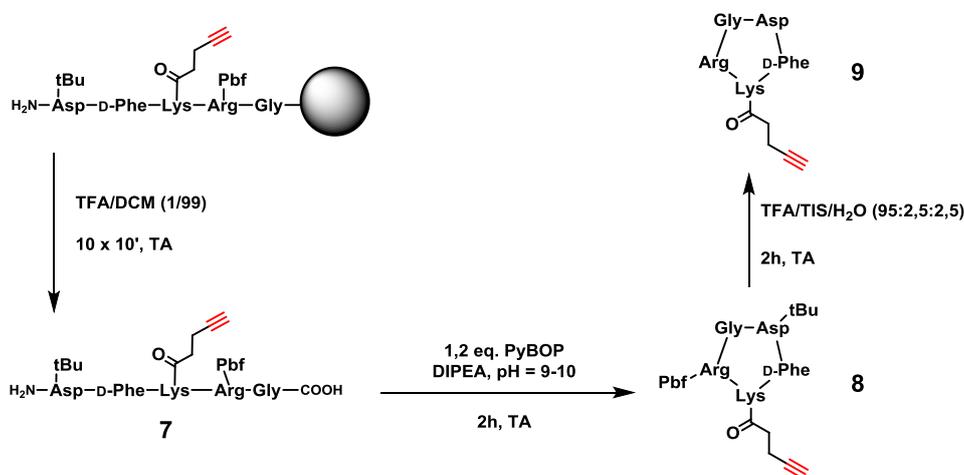


Schéma 6 : Synthèse du cyclopeptide cRGDfK(alcyne) (TBM-RGD).

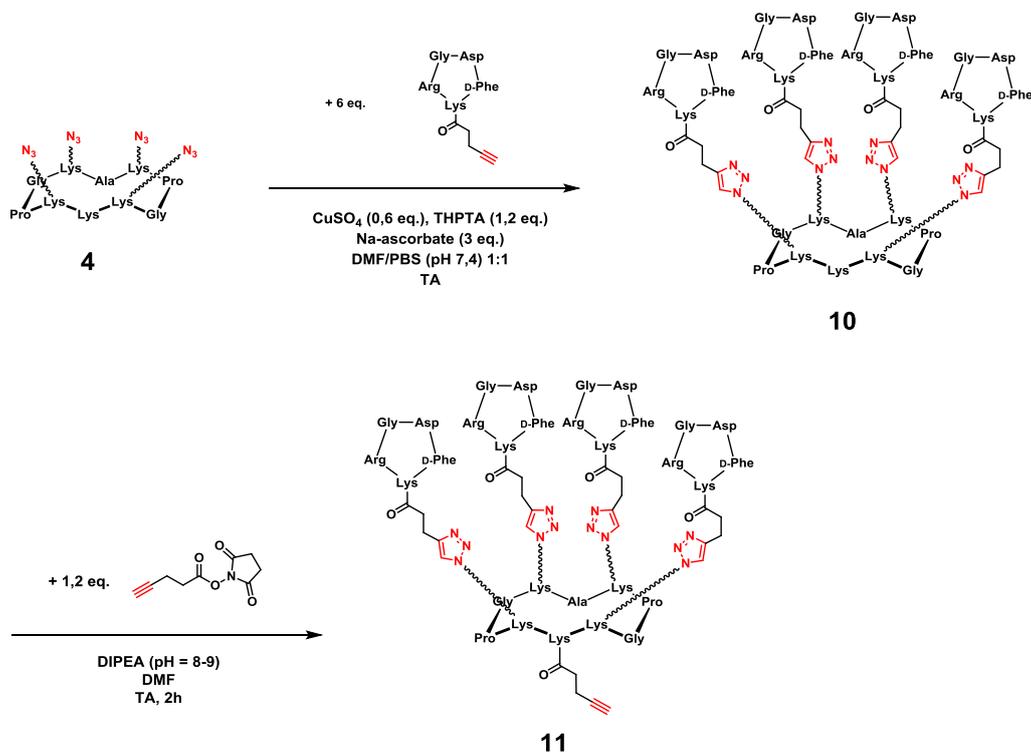


Schéma 7 : Synthèse du peptide cRGDfK tétravalent TBM-R4(RGD)₄ par ligation CuAAC puis du peptide TBM-R4(RGD)₄-alcyne par ajout d'un groupement alcyne.

Pour étudier l'interaction TBM/cellules, nous avons besoin de suivre ces peptides par fluorescence. Pour cela, une fluorescéine est ajoutée à **10** et **11** par CuAAC avec le synthon FITC-N₃ **13** pour donner les TBMs fluorescents **14** et **15** dont l'interaction avec les cellules sera étudiée par cytométrie en flux (**Schéma 8**).

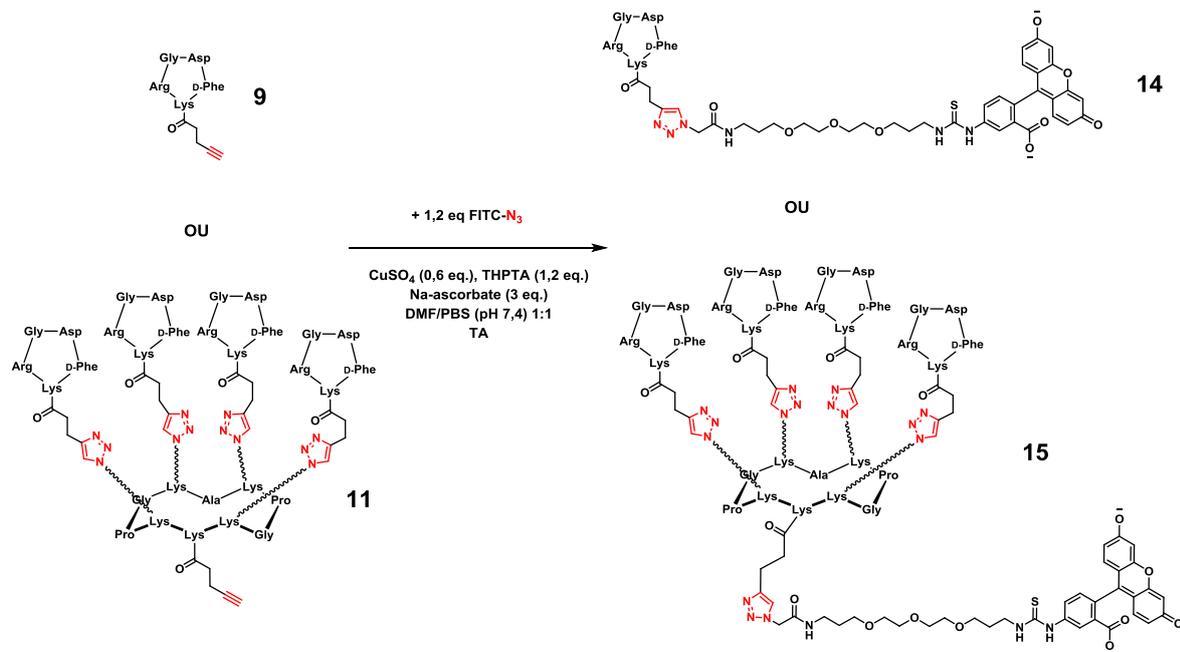


Schéma 8 : Synthèse des composés TBM-RGD-alcyne et TBM-R4(RGD)₄-alcyne couplés à la fluorescéine par CuAAC.

(b) L'hexapeptide LARLLT

L'hexapeptide linéaire LARLLT, ligand peptidique de la protéine EGFR, a lui aussi été synthétisé par SPPS en utilisant une stratégie Fmoc/*t*Bu mais cette fois-ci sur résine rink amide MBHA. En effet, la conservation des groupements protecteurs n'étant pas requise en absence d'étape de cyclisation. Cette résine permet de détacher le peptide et de déprotéger simultanément les chaînes latérales des acides aminés. Un acide pent-4-ynoïque est ajouté en fin de SPPS du côté N-terminal avec du PyBOP en milieu basique. Après détachement, précipitation et purification du peptide linéaire **16**, ce dernier est mis en solution avec la plateforme peptidique RAFT **4** afin d'être greffé par ligation CuAAC et donner le peptide LARLLT tétravalent **17**, appelé « **TBM-R4(LT)_t** », avec un rendement de 37 %. Enfin, un fluorophore FITC est attaché par réaction du groupement isothiocyanate de la FITC en condition basique sur l'amine de la lysine de la face inférieure pour donner le produit **18** (**Schéma 9**).

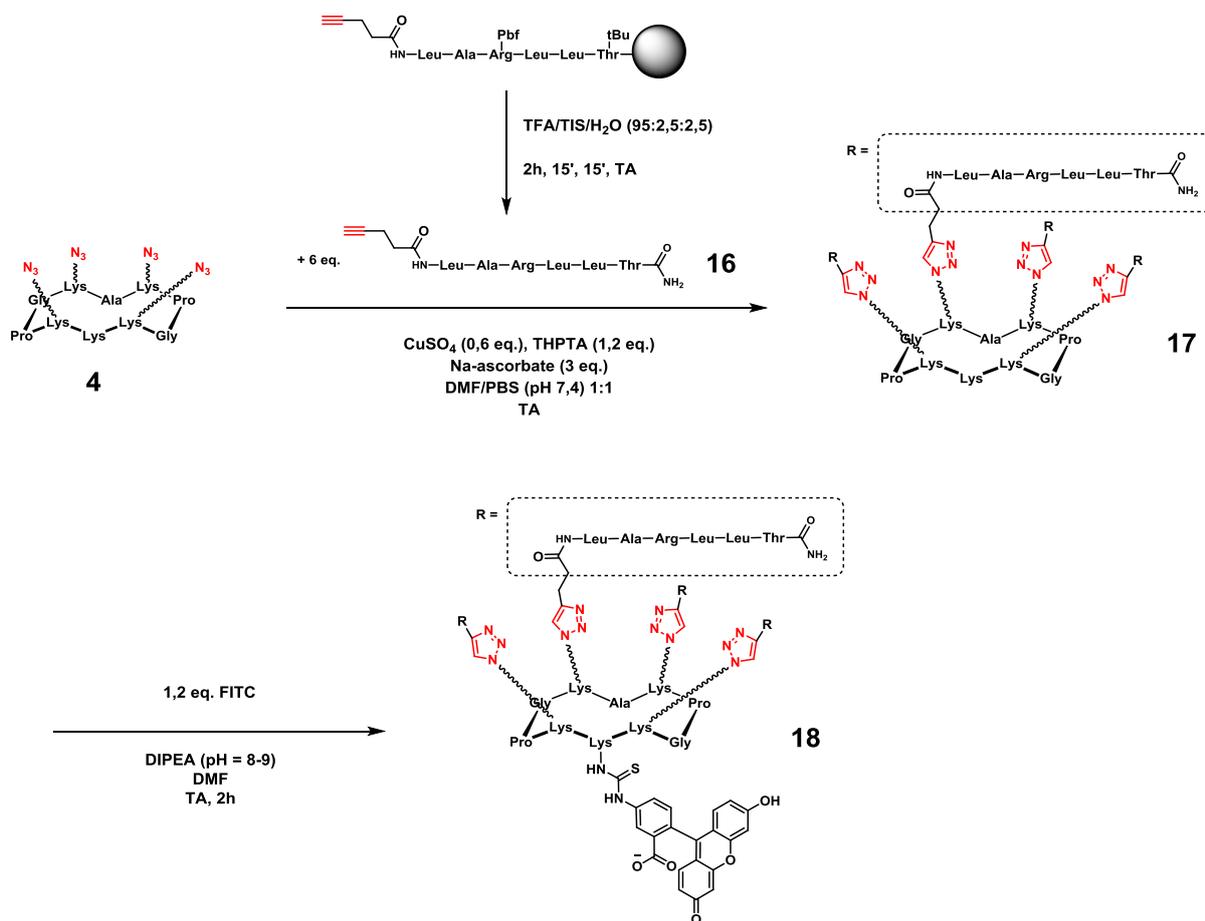


Schéma 9 : Synthèse du TBM-R4(LT)_t par CuAAC et du TBM-R4(LT)_t fluorescent.

(c) La molécule acétazolamide AZ

Nous avons choisi d'utiliser l'acétazolamide (AZ) comme molécule ligand de CA IX. Ce TBM a été synthétisé par Dr. D. Goyard (post-doctorant). L'AZ fonctionnalisée avec un groupement alcyne **19** est greffée à la plateforme RAFT **4** afin d'obtenir le TBM AZ tétravalent **20**, appelé « TBM-R4(AZ)_t » (Schéma 10). La molécule « TBM-AZ-alcyne » est rendue fluorescente par l'ajout du synton **13** par ligation CuAAC. La molécule tétravalente est quant à elle rendue fluorescente par ajout d'une FITC en conditions basique (Schéma 11). Les expériences d'interaction des TBMs monovalent et tétravalent pourront ensuite être réalisées sur des cellules surexprimant CA IX.

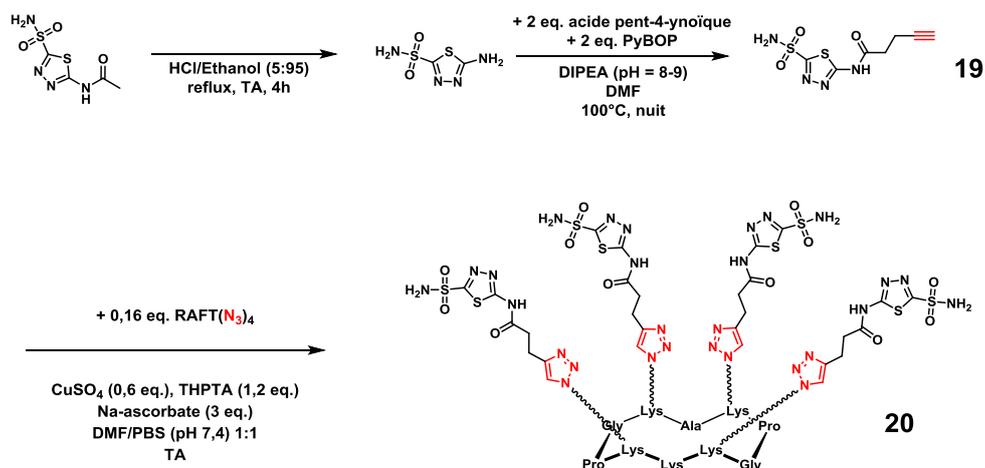


Schéma 10 : Synthèse de la molécule TBM-AZ-alcyne et du TBM-R4(RGD)_t par ligation CuAAC.

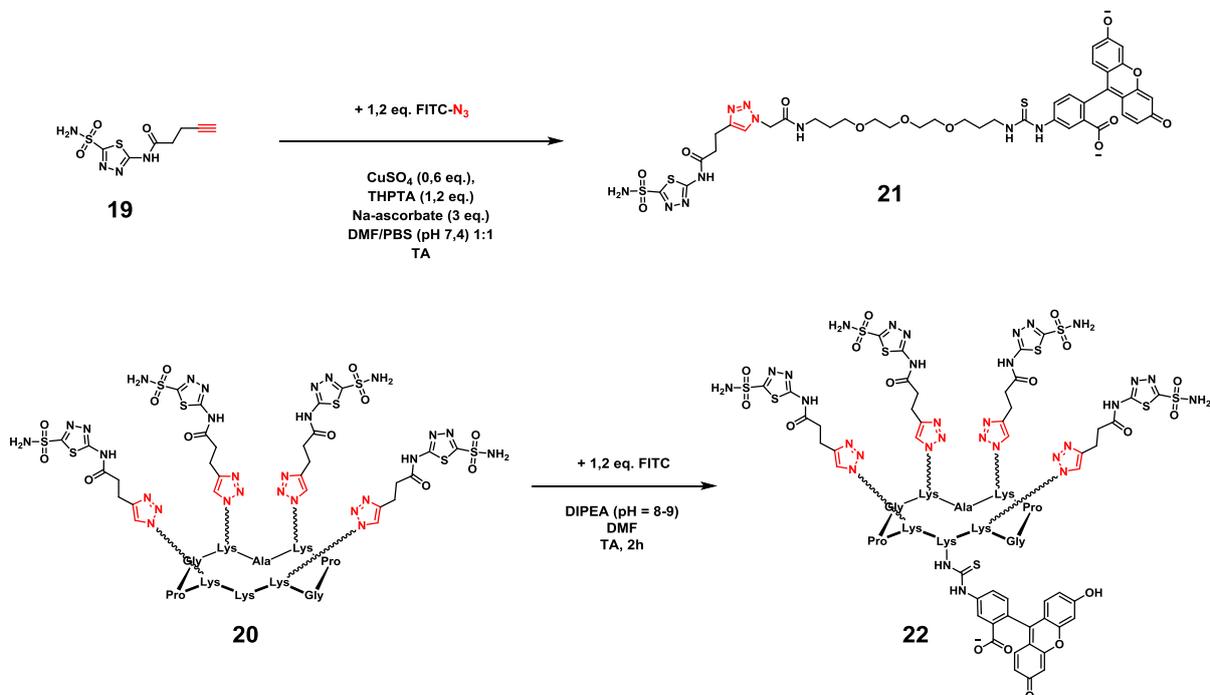


Schéma 11 : Synthèse des composés TBM-AZ-alcyne et TBM-R4(AZ)_t couplés à la fluorescéine par CuAAC ou par réaction en milieu basique.

(d) Le glucose

Les TBMs comportant le ligand de GLUT1, à savoir le β -D-glucose, ont aussi été synthétisés par Dr. D. Goyard. Une molécule de β -D-glucose propargylée **23** est greffée à la plateforme RAFT **4** par CuAAC pour obtenir la molécule de glucose tétravalente **24** appelée « TBM-R4(Glc)_t » (Schéma 12). De la même manière que pour l'AZ, la molécule TBM-Glc-alkyne est rendue fluorescente par liaison du synthon **13** par CuAAC et dans le cas de la construction tétravalente TBM-R4(Glc)_t, la FITC est ajoutée en condition basique (Schéma 13).

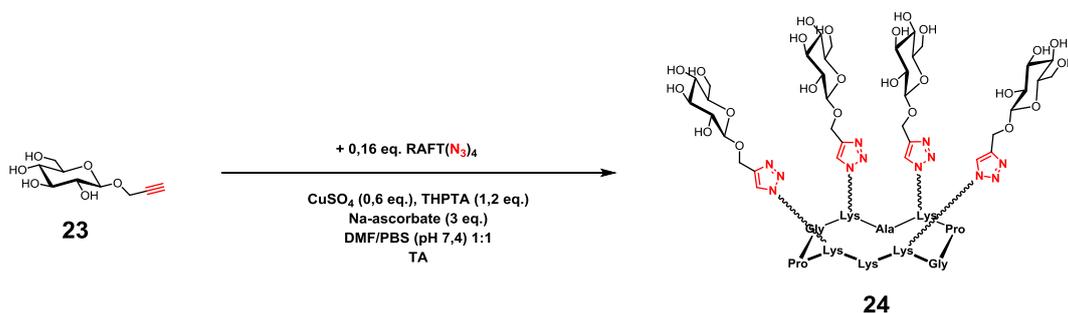


Schéma 12 : Synthèse du TBM-R4(Glc)_t par ligation CuAAC.

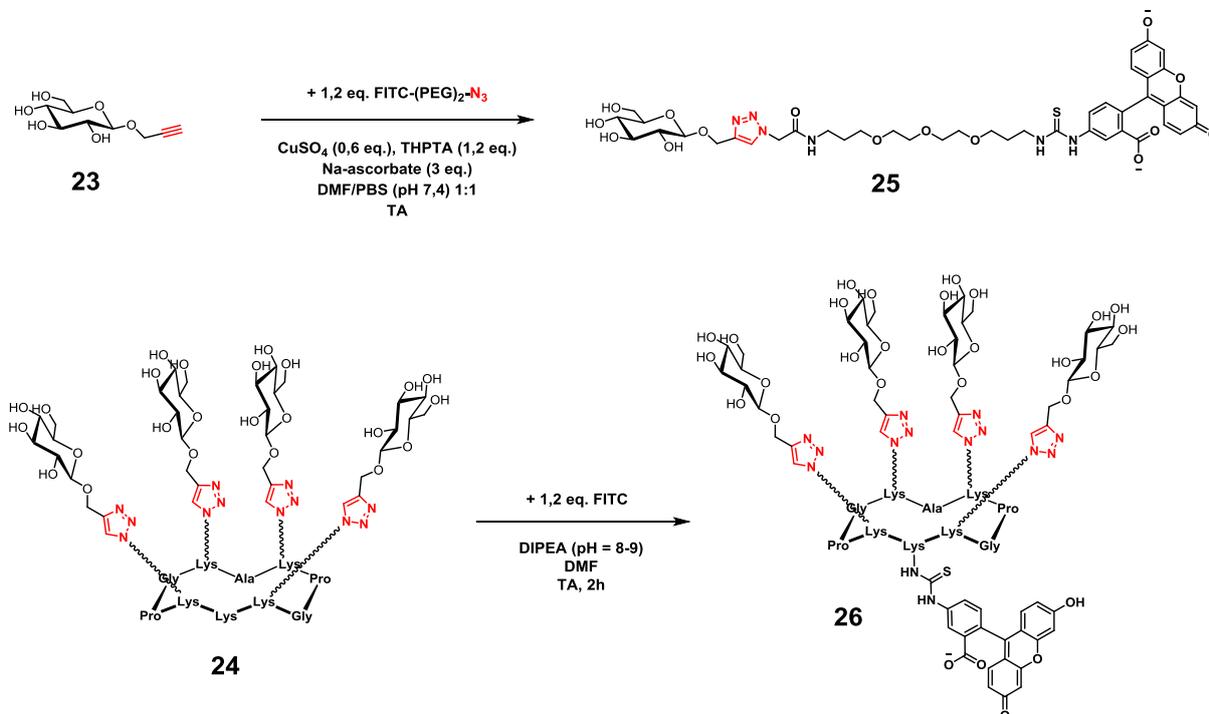


Schéma 13 : Synthèse des composés TBM-Glc-alkyne et TBM-R4(Glc)_t couplés à la fluorescéine par CuAAC ou par réaction en milieu basique.

C) Evaluation de l'interaction sélective des TBMs aux cellules cancéreuses

L'affinité et la sélectivité des TBMs synthétisés pour des cellules cancéreuses surexprimant les cibles correspondantes ont été évaluées par cytométrie en flux.

La cytométrie en flux est une technique qui permet de déterminer plusieurs caractéristiques physiques et fluorescentes de particules. Dans notre cas, elle indiquera la taille, la granularité ou la fluorescence des cellules (autofluorescence de la cellule ou fluorescence apportée par un composé). Pour cela, une suspension cellulaire est entraînée dans une chambre par un flux vecteur (gaine liquide) dont le rôle est de faire passer les cellules une à une devant une source lumineuse (généralement un laser). La lumière émise par les cellules irradiées est redirigées vers un ensemble de détecteurs par un système miroirs et filtres. Les signaux émis seront les suivants (**Figure 26**) :

- La lumière diffusée aux petits angles va nous renseigner sur la taille de la cellule : c'est le **paramètre FSC** (*forward scatter*). Plus les cellules sont petites, plus le signal de voltage reçu est faible.
- La lumière diffusée à 90° par rapport au faisceau incident renseigne sur la forme et la granularité de la cellule : c'est le **paramètre SSC** (*side scatter*). Plus la cellule est complexe et granuleuse, plus les signaux émis perpendiculairement seront importants.
- L'**émission de fluorescence** de la cellule suite à l'excitation d'un laser à une certaine longueur d'onde et récupérée grâce à un filtre d'émission.

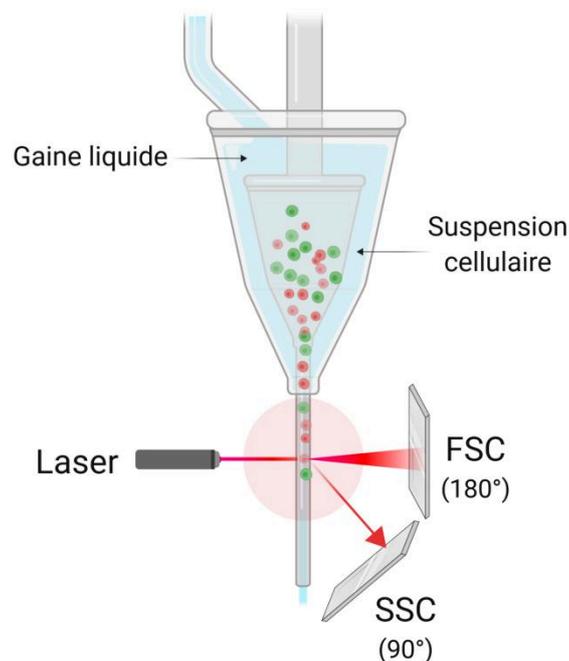


Figure 26 : Représentation schématique de la chambre d'analyse d'un cytomètre en flux avec une suspension cellulaire focalisée sur un flux. Le laser irradie les cellules et permet d'obtenir trois signaux : le FSC, le SSC et l'émission de fluorescence de la cellule.

Les données collectées sont rassemblées sous forme de graphiques dans lesquels chaque cellule (ou « évènement ») apparaît sous forme d'un point, avec une certaine valeur de FSC-A ou de SSC-A (le A signifiant l'aire du signal de voltage) ce qui permet de différencier les débris cellulaires et les cellules endommagées des cellules en bon état (**Figure 27a**). Les données peuvent aussi apparaître sous forme d'histogrammes utilisés principalement pour classer les cellules en fonction de leur intensité de fluorescence (**Figure 27c**). Ainsi, la première étape d'une expérience consiste à sélectionner et à étudier uniquement les cellules en bon état. L'étape suivante sera de sélectionner les cellules en singulet. En effet, des cellules en doublet qui passent en même temps au niveau du faisceau sont comptées comme une cellule unique et possèdent potentiellement une fluorescence deux fois plus élevée (**Figure 27b**). Enfin, l'histogramme de fluorescence permettra de déterminer si le composé fluorescent s'est fixé sur la cellule comportant le récepteur ciblé. Si c'est le cas, elle sera enregistrée et apparaîtra dans l'histogramme dans la zone de fluorescence élevée contrairement au signal d'autofluorescence des cellules qui apparaîtra dans des échelles de basse fluorescence.

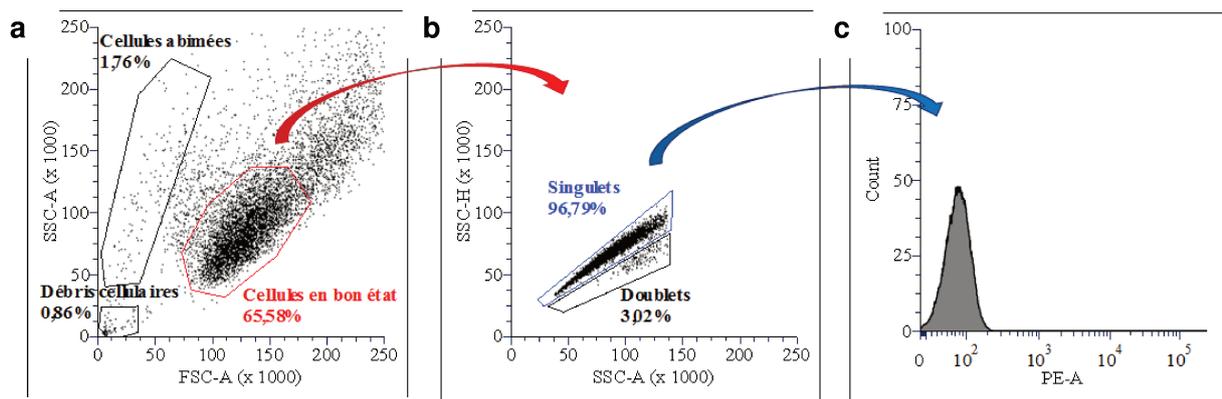


Figure 27 : Exemple d'une suspension cellulaire analysée par cytométrie en flux. **a.** le graphique représente les paramètres SSC-A (granularité) et FSC-A (taille) de chaque cellule. A partir de celui-ci sont sélectionnées les cellules en bon état. **b.** les cellules en singlets et les cellules en doublets sont discriminées. **c.** l'intensité de fluorescence de chaque cellule est analysée sous forme d'histogramme.

1) Le ligand cRGDfK tétravalent

Avant de commencer les analyses d'interaction par fluorescence des TBMs, il est important de sélectionner les lignées cellulaires adéquates pour cette étude. Ces dernières doivent être choisies en fonction de leur niveau d'expression des intégrines $\alpha_v\beta_3$, à savoir une lignée surexprimant les protéines et une autre ayant un faible taux d'expression et servant de lignée contrôle.

Les premières études ont été réalisées à partir de cellules de rein d'embryon humain (*human embryon kidney*, HEK) modifiées par transfection *via* des lentivirus de la sous-unité β_3 (HEK293(β_3)) ou β_1 (HEK293(β_1)) des intégrines (Jean-Luc Coll, IAB, Grenoble). Pour cette étude, HEK293(β_1) a servi de lignée contrôle puisque le peptide cRGDfK ne reconnaît pas cette sous-unité. Cette transfection a permis d'avoir une lignée cellulaire surexprimant les intégrines $\alpha_v\beta_3$ de façon aberrante.^{110,111} Néanmoins, après plusieurs expériences infructueuses, nous avons constaté, après dosage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ par un anticorps anti-CD55/CD61 humain (ou intégrine $\alpha_v\beta_3$, BD PharmingenTM, 550037) couplé à une phycoérythrine (PE), qu'après plusieurs passages, les cellules changeaient de phénotype et exprimaient de moins en moins ces intégrines (**Figure 28**). De ce fait, au bout d'un certain nombre de passages, plusieurs populations cellulaires différentes sont apparues. Cette évolution du phénotype cellulaire au fil des passages pose problème pour l'étude d'interaction du TBM, le taux de liaison de l'ARM n'étant pas égal sur la totalité des cellules étudiées. De plus, les expériences se sont révélées ne pas être reproductibles compte tenu de ce problème. Nous avons donc décidé d'abandonner ces lignées cellulaires.

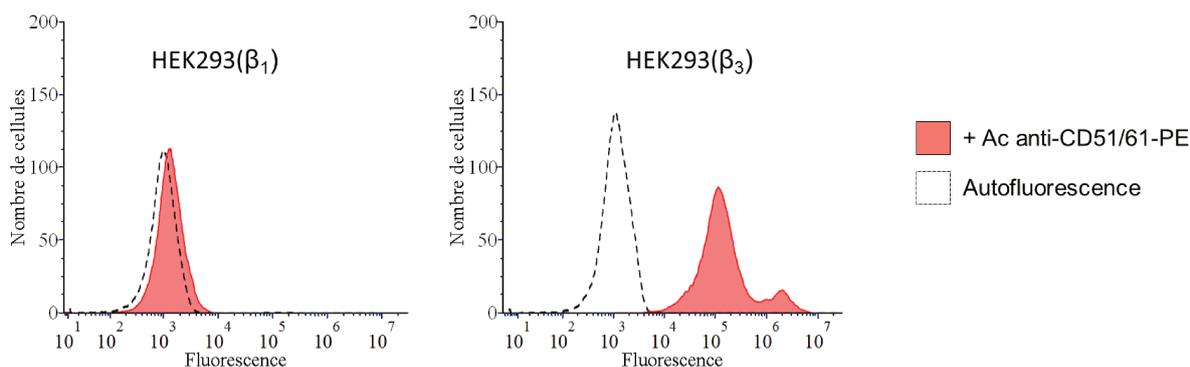


Figure 28 : Histogramme de fluorescence d'expériences de cytométrie en flux représentant le taux d'intégrines $\alpha_v\beta_3$ sur les lignées cellulaires HEK293(β_1) et HEK293(β_3).

La lignée cellulaire **M21** issue de mélanome humain est également connue pour surexprimer les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et a été largement utilisée pour des expériences d'interaction avec le peptide cRGDfK.¹¹²⁻¹¹⁶ C'est donc tout naturellement que nous avons choisi d'étudier ces cellules. De plus, une lignée cellulaire **M21-L** dérivant de cette dernière n'exprimant pas les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et pouvant servir de lignée contrôle a été élaborée. Les cellules M21-L sont identiques à M21 mais ne possèdent pas le gène codant pour la sous-unité α des intégrines (*integrin subunit alpha v*, IGTAV).¹¹⁷ A l'issue du dosage des intégrines réalisée avec ces cellules de la même façon que précédemment, deux constats ont été faits : l'absence de la sous-unité α est confirmée et malgré qu'il s'agisse d'une lignée modifiée, le phénotype est stable au cours des différents passages à la différence des lignées HEK modifiées initialement utilisées (**Figure 29**). Le taux d'expression des intégrines $\alpha_v\beta_3$ de ces cellules est par ailleurs en corrélation avec ce qui a pu être décrit dans la littérature.¹¹⁶

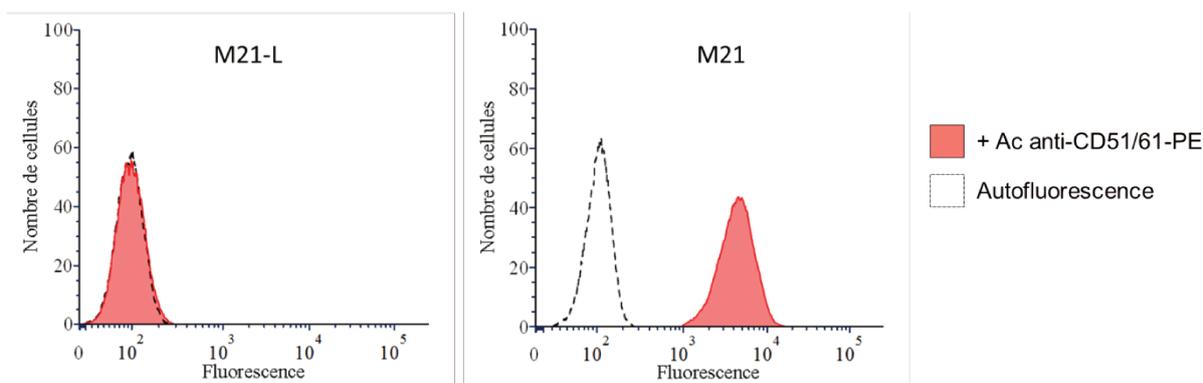


Figure 29 : Histogramme de fluorescence représentant le nombre d'intégrines $\alpha_v\beta_3$ sur les lignées cellulaires M21-L et M21. Etude par cytométrie en flux.

Ainsi, comme décrit précédemment, nous avons ensuite évalué par cytométrie en flux la capacité des composés TBM-RGD et TBM-R4(RGD)_t fluorescents à se lier aux deux lignées cellulaires. Les cellules cultivées et arrivées à confluence sont détachées de leur support, comptées et resuspendues à 1 millions de cellules dans 1 mL de tampon Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) permettant aux intégrines de se déplier et devenir active grâce aux cations divalents présents. Les composés **14** et **15** sont incubés avec les suspensions cellulaires M21 et M21-L à une concentration de 5 μ M afin de faire participer un maximum d'intégrines $\alpha_v\beta_3$ présentes à la surface des cellules. Après 1h d'incubation en solution à 37°C, la fluorescence des cellules est analysée au cytométrie en flux (**Figure 30**).

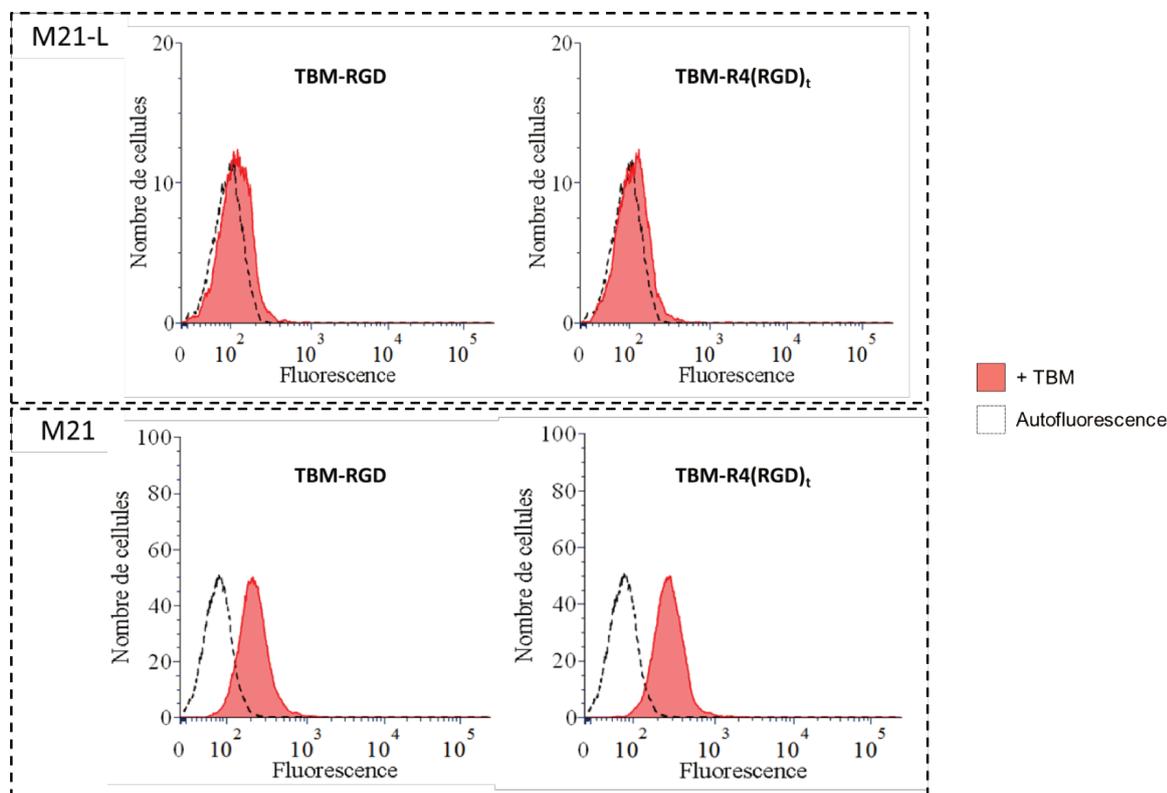


Figure 30 : Histogramme de fluorescence représentant l'interaction des TBMs cRGDFK monovalents et tétravalents fluorescents sur les cellules M21-L et M21. Etude par cytométrie en flux.

L'analyse des histogrammes montre que les TBMs se lient aux cellules M21 surexprimant les intégrines $\alpha_v\beta_3$ alors qu'une très faible augmentation de la fluorescence est observée avec les cellules contrôles M21-L, témoin d'une faible interaction des TBMs avec cette lignée cellulaire. Nous avons pu aussi observer que les constructions présentant un seul ou 4 motifs cRGDfK étaient capables de se fixer aux cellules. Cependant une augmentation de l'interaction, bien que faible, a été observée avec l'augmentation de la valence du TBM. Il avait déjà été admis par Gavriluyk et coll. que les peptides cRGD présentés de façon monovalente et divalente interagissaient efficacement avec les cellules M21. Là aussi, une très faible augmentation de fluorescence avait été observée lorsque la valence des peptides était augmentée.¹¹⁸

Pour aller plus loin dans l'analyse des interactions des TBMs, les mêmes cellules que celles utilisées pour l'étude en cytométrie en flux ont été observées par microscopie confocale (**Figure 31**). Cette technique permet d'obtenir des informations supplémentaires et importantes sur la localisation des TBMs au niveau des cellules mais aussi sur leur caractéristique de fluorescence.

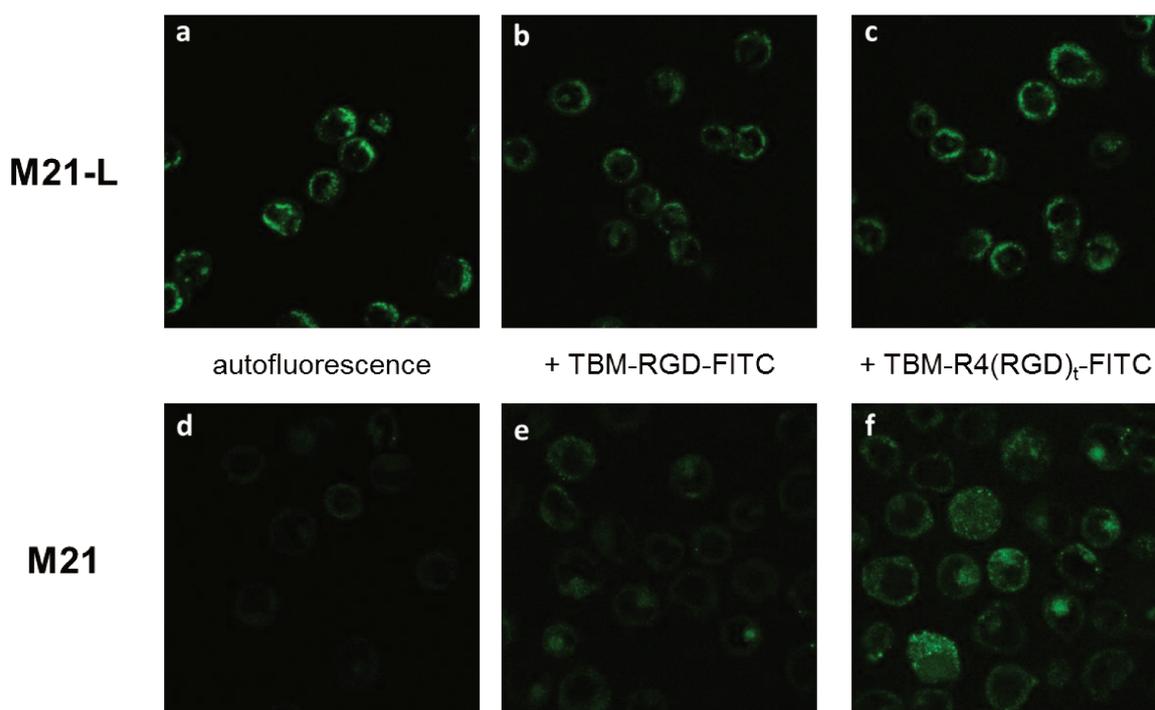


Figure 31 : Images de fluorescence des cellules M21-L (**a**, **b** et **c**) et M21 (**d**, **e** et **f**) incubées avec les TBMs cRGDfK monovalents (**b** et **e**) et tétravalents (**c** et **f**) fluorescents. Etude par microscope confocal à fluorescence.

Les images des cellules M21 incubées avec les TBMs ont montré une intensité de fluorescence plus importante en présence du TBM tétravalent comparé au TBM monovalent. Cela confirme l'augmentation de l'interaction avec la valence du TBM déjà observé dans les expériences de cytométrie en flux. Cette différence est cependant notablement plus nette sur

ces images. Les cellules M21-L quant à elles ont montré une autofluorescence importante rendant les analyses plus délicates, mais nous avons pu cependant confirmer l'absence d'augmentation de la fluorescence des cellules en présence des TBMs. La localisation des peptides, et donc des intégrines $\alpha_v\beta_3$, semble se concentrer majoritairement au niveau des membranes plasmiques avec certaines zones plus intense, très certainement dues au « clustering » des intégrines. Pour certaines des cellules, la fluorescence a été observée au niveau du cytoplasme indiquant un processus d'internalisation initié par les intégrines dès lors que l'interaction avec le TBM a eu lieu. Cet aspect pourrait être problématique pour l'application visée et nécessitera de rechercher les meilleures conditions pour minimiser le risque de ce phénomène.

2) Le ligand peptidique LARLLT

Comme pour le peptide cRGDfK, la première étape a consisté à sélectionner une lignée cellulaire surexprimant la protéine EGFR ainsi qu'une lignée contrôle n'exprimant pas ou très peu cette dernière. Pour ce faire, nous avons à notre disposition plusieurs lignées cellulaires :

- Les cellules utilisées pour les TBMs cRGDfK (**M21** et **M21-L**)
- Des lignées cellulaires utilisées pour des projets annexes, à savoir :
 - Les cellules de glioblastome **U-87 MG** (ATCC[®] HTB-14TM)
 - Les cellules d'adénocarcinome de glande mammaire dérivée d'une métastase **MCF7** (ATCC[®] HTB-22TM)
 - Les cellules **BT-549** (ATCC[®] HTB-122TM), issue d'un carcinome de glande mammaire.
 - Les cellules mammaires saines **MCF 10A** (ATCC[®] CRL-10317TM)

Le taux d'expression d'EGFR à la surface de ces différentes lignées cellulaires a donc été mesuré par incubation des différentes suspensions cellulaires avec un anticorps anti-EGFR de souris couplé à une fluorescéine (BDTM 612554), et analysé par cytométrie en flux (**Figure 32**).

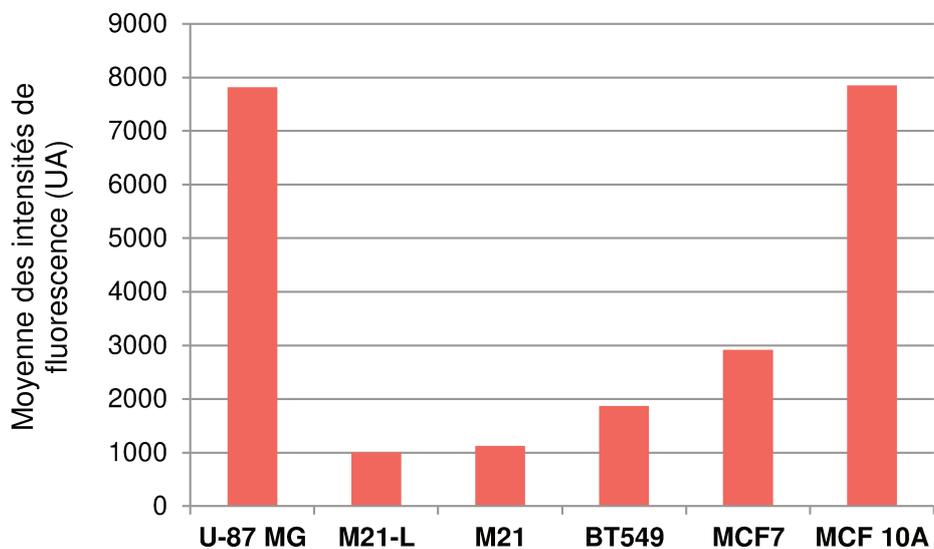
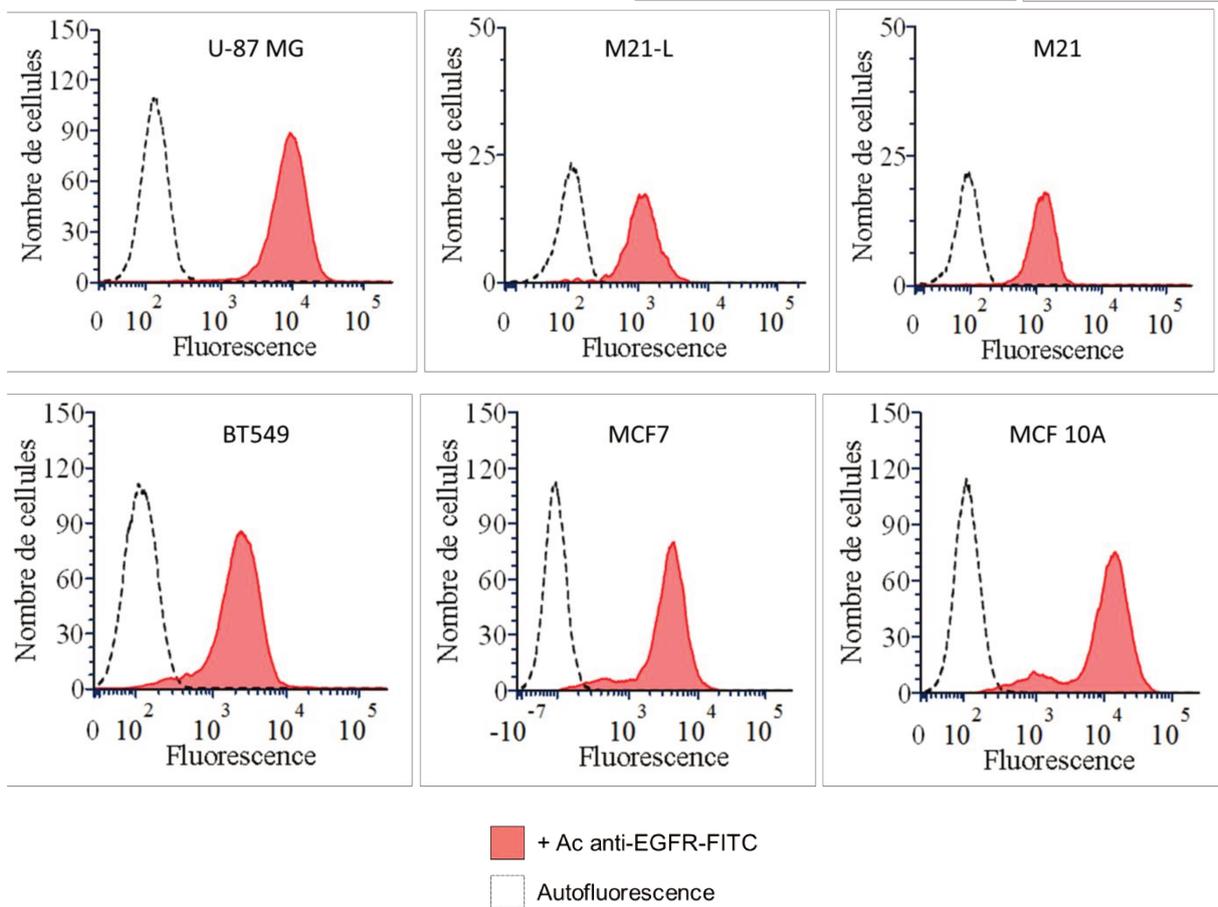


Figure 32 : Histogrammes de fluorescence représentant le taux de protéines EGFR sur les lignées cellulaire U-87 MG, M21-L, M21, BT549, MCF7 et MCF 10A. Etude par cytométrie en flux.

Comme l'indique l'histogramme reporté ci-dessus, il est apparu qu'aucune des lignées cellulaires analysées ne pouvait être utilisée comme contrôle puisque toutes expriment la protéine EGFR. Néanmoins, des différences importantes d'expression d'EGFR observées

avec certaines lignées laisse supposer un signal de fluorescence également différent pour l'interaction avec le TBM-R4(LT)_t. En effet, si les cellules MCF 10A, U-87 MG semblent surexprimer EGFR, les lignées BT549, MCF7, M21-L ou M21 présentent quant à elles un taux d'expression beaucoup plus faible. L'affinité et la spécificité du peptide LARLLT sur ces lignées a donc été étudiée. Pour cela, le TBM tétravalent **18** a été incubé avec les cellules obtenues après détachement de leur support, comptage et lavage, dans du milieu de culture DMEM à concentration saturante (25 μM) pendant 3h à température ambiante. Après lavage, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (**Figure 33**).

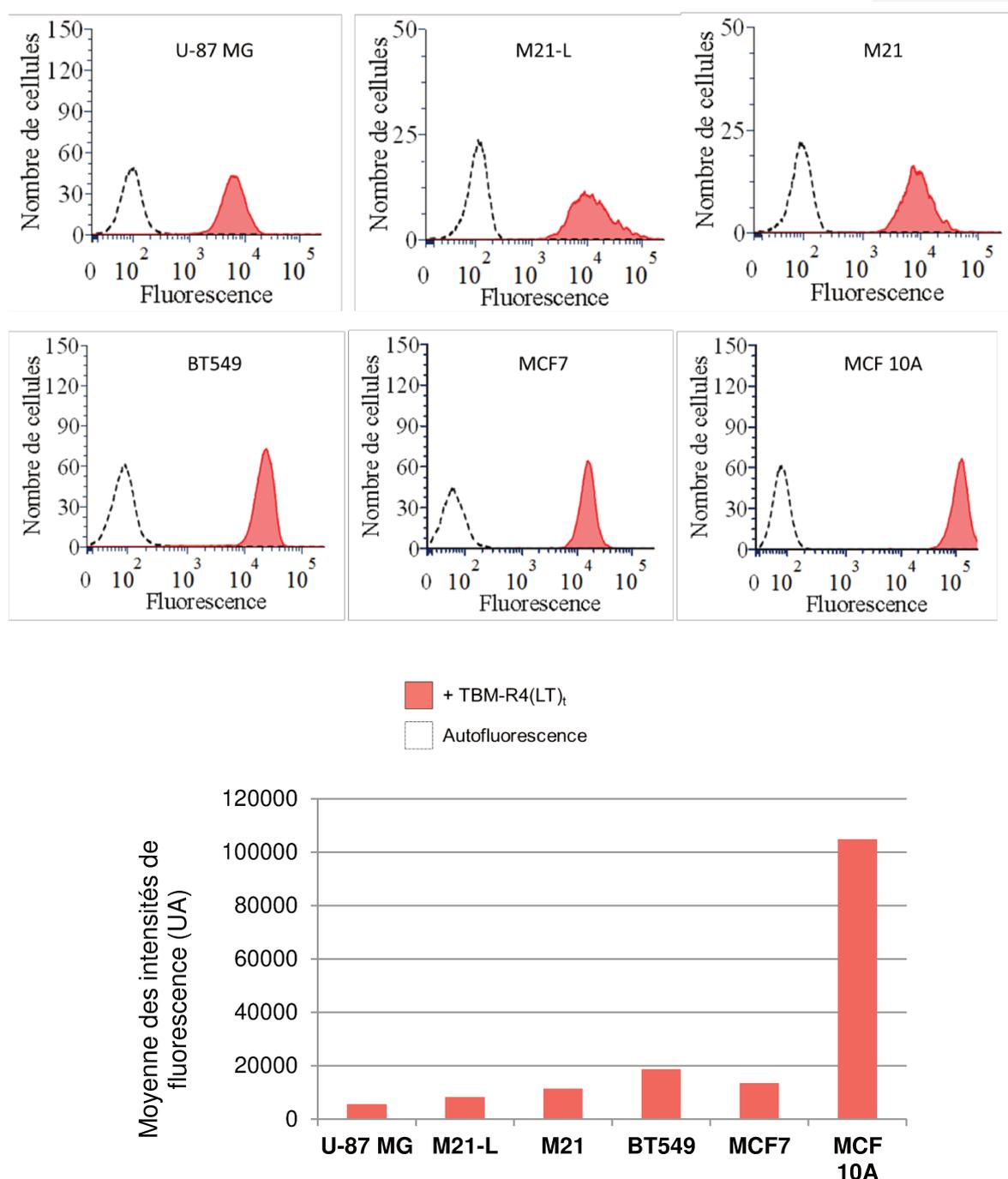


Figure 33 : Histogrammes de fluorescence représentant l'interaction du TBM-R4(LT)_t avec les lignées cellulaire U-87 MG, M21-L, M21, BT549, MCF7 et MCF 10A. Etude par cytométrie en flux.

Les analyses d'intensité de fluorescence mesurées avec les différentes lignées cellulaires en présence du TBM-R4(LT)_t ne se sont pas révélées corrélées avec les taux d'expression d'EGFR déterminés pour celles-ci. En effet, une forte augmentation du signal de fluorescence a été mesurée avec les cellules BT549 lorsqu'incubées avec le TBM, bien que cette lignée soit celle exprimant le moins le récepteur. Inversement, les cellules U-87 MG surexprimant la protéine EGFR incubées avec ce même TBM fluorescent ont montré une faible fluorescence. Ce résultat laisse supposer pour certaines lignées cellulaires une interaction non-spécifique du TBM au niveau de la surface membranaire, ce qui peut être problématique pour les expériences futures avec cet hexapeptide. Cependant, deux des lignées cellulaires répondent positivement à la règle expression d'EGFR/liaison de LARLLT : la lignée MCF 10A comme cellules à utiliser pour nos expériences et MCF7 comme contrôle négatif.

3) Le ligand acétazolamide

Le marqueur tumoral qui est dans ce cas ciblé avec les TBMs à motif AZ est CA IX. L'étude de l'interaction pour deux lignées cellulaires a été réalisée sans dosage préalable du taux d'expression de CA IX.

Les deux molécules finales fluorescentes TBM-AZ **21** et TBM-R4(AZ)_t **22** ont été incubées dans des conditions saturantes (10 μM) avec les cellules en suspension pendant 1h à température ambiante. Ces cellules ont ensuite été analysées par la technique de cytométrie en flux (**Figure 34**).

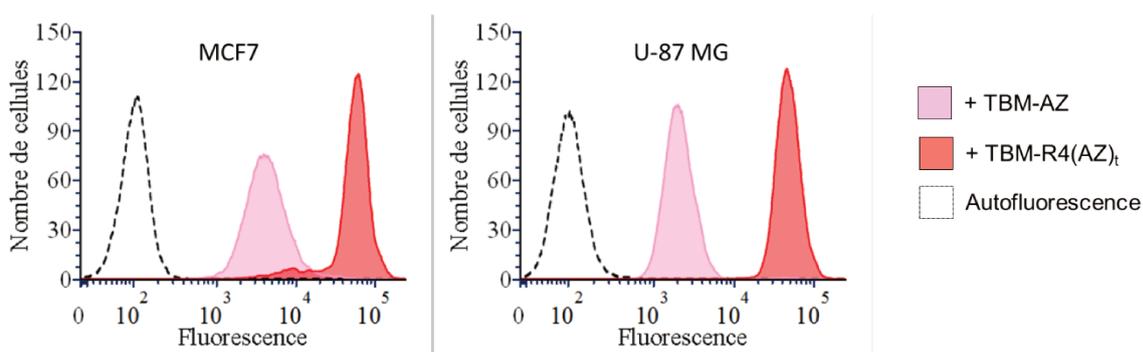


Figure 34 : Histogramme de fluorescence représentant l'interaction des acétazolamides mono- (rose) et tétravalente (rouge) avec les lignées cellulaires MCF7 et U-87 MG. Etude par cytométrie en flux.

La première chose que nous pouvons observer, c'est que les molécules sont toutes les deux capables de se lier à MCF7 et U-87 MG. Cela signifie que les deux lignées surexpriment la protéine CA IX et, dans ce cas, nous ne disposons pas de lignée pour un contrôle négatif. En revanche, le résultat intéressant est que le signal de fluorescence est bien plus élevé

lorsque les cellules sont incubées avec la molécule TBM-R4(AZ)_t tétravalente. Cela signifie donc qu'il y a un effet de multivalence renforçant l'idée qu'une présentation multivalente de AZ peut augmenter l'interaction du TBM avec les cellules

4) Le glucose

L'interaction du β -D-glucose avec les cellules surexprimant GLUT1 a été analysée de la même manière que pour les TBMs candidats précédents, à savoir en incubant les composés fluorescents mono- **25** et tétravalent **26** avec une suspension cellulaire, ici la lignée M21, et en analysant les cellules par cytométrie en flux (**Figure 35**). Les composés TBM-Glc et TBM-R4(Glc)_t ont été ajoutés à forte concentration (50 μ M) de manière à être en excès par rapport au nombre de récepteurs mais aussi à limiter la compétition avec le glucose du milieu de culture.

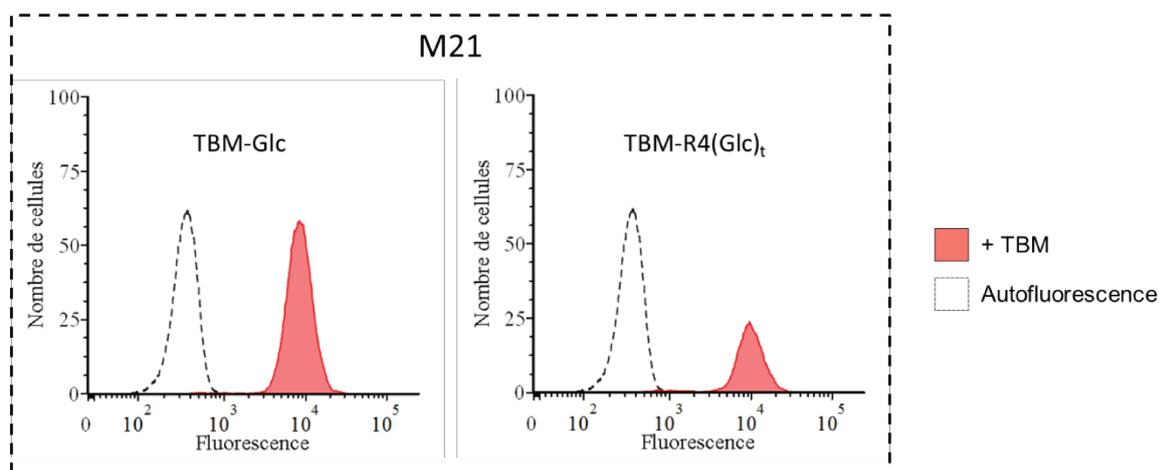


Figure 35 : Histogramme de fluorescence représentant l'interaction des composés glucose mono- et tétravalent avec la lignée cellulaire M21. Etude par cytométrie en flux.

L'analyse par cytométrie en flux des cellules M21 montre un décalage de fluorescence par rapport à l'autofluorescence des cellules. Ce résultat indique une interaction TBM-Glc/cellule, mais nous ne pouvons néanmoins être sûr de la spécificité de cette liaison. En effet, la fluorescence des cellules traitées est la même pour les composés monovalent et tétravalent, alors que nous aurions pu nous attendre à une intensité de fluorescence bien plus élevée avec le glucose tétravalent. Afin de lever cette incertitude, nous avons observé les mêmes cellules après incubation avec les composés **25** et **26** sous un microscope confocal à fluorescence (**Figure 36**).

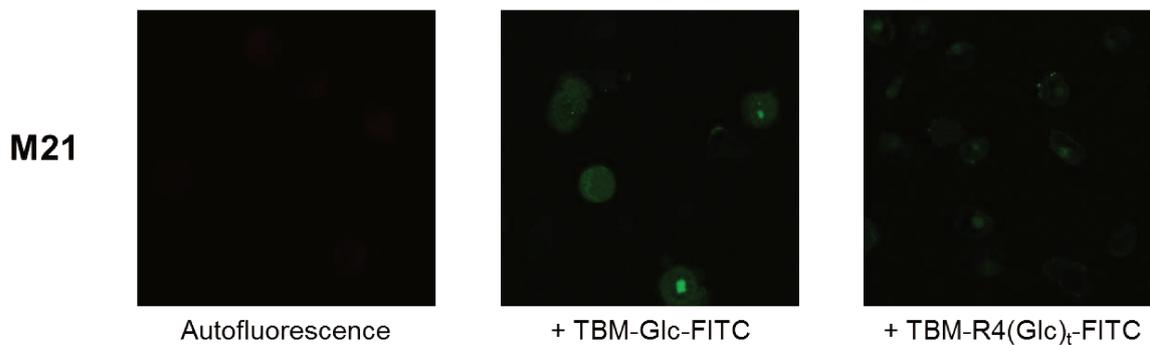


Figure 36 : Images de fluorescence des cellules M21 incubées avec les composés glucose monovalents et tétravalents fluorescents. Etude par microscopie confocale à fluorescence.

Malgré une intensité moyenne du signal de fluorescence identique pour les cellules incubées avec les TBMs monovalent et tétravalent, les images de microscopie confocale ont permis d'identifier des comportements différents pour les deux composés. En effet, il semble que le composé monovalent ait tendance à diffuser à travers la membrane pour s'accumuler dans le cytoplasme. Le composé tétravalent quant à lui à tendance à rester au niveau de la membrane cellulaire. Cette localisation pourrait s'expliquer par le fait que GLUT1 reconnaisse le glucose mais ne puisse pas transporter l'ensemble de la construction comprenant la plateforme RAFT et les sucres. Ainsi, l'utilisation du glucose tétravalent sur la plateforme RAFT trouverait du sens dans la synthèse de la molécule ARM puisque cette dernière resterait à la surface extracellulaire et donc serait accessible pour les anticorps circulants.

III. Identification de nouveaux ligands pour la conception du TBM

A) Introduction au Phage Display

La technique de Phage Display utilise la présentation de peptides aléatoires à la surface de bactériophages pour une large variété d'applications en recherche. Elle a été introduite dans le milieu des années 1980 par George Smith qui souhaitait prouver qu'en exprimant une protéine à la surface de la protéine pIII constituant la capsid virale par fusion des deux gènes correspondant, il était possible d'obtenir 1000 exemplaires de la même protéine par multiplication des bactériophages.¹¹⁹ Cette preuve de concept a ouvert de nombreuses possibilités d'utilisation du Phage Display. Il est par exemple possible d'utiliser la synthèse par biochimie combinatoire d'une multitude d'acides nucléiques pour créer une très large librairie aléatoire de gènes pouvant coder pour une grande variété de peptides différents greffés à un bactériophage. De ce fait, un lien direct entre génotype et phénotype est établi, ce qui signifie que chaque population de bactériophage ayant un même peptide à sa surface va avoir une étiquette génétique qui lui est propre. Ainsi, de ces premières expériences vont découler une très grande quantité d'applications possibles, notamment, dans notre cas, l'identification de nouveaux ligands peptidiques spécifiques d'une cible choisie.¹²⁰⁻¹²²

Les bactériophages présentant les différents peptides aléatoires à leur surface doivent être capables d'infecter des bactéries Gram-. De nombreux phages filamenteux ont été identifiés partageant tous une caractéristique commune : un génome simple brin circulaire enroulé sur lui-même et se présentant sous la forme d'un cylindre d'environ 7 nm de diamètre et de 900 à 2000 nm de longueur. Ces bactériophages sont de plus capables d'infecter *Escherichia coli* contenant le plasmide F (facteur de fertilité codant pour les *pili* bactériens et permettant l'échange d'information génétique entre les bactéries). Lorsque les phages infectent ces dernières, ils s'attachent au *pilus* bactérien, le dépolymérise pour venir à hauteur de la bactérie et fusionnent avec celle-ci pour ensuite transférer leur ADN viral. Les enzymes bactériennes interviennent ensuite pour synthétiser le brin complémentaire de l'ADN viral conduisant à une molécule nucléotidique à double brin servant de modèle pour la transcription et la traduction des protéines du phage. Ainsi, à partir d'un bactériophage, plusieurs nouvelles particules virales sont créées. Trois bactériophages ont été caractérisés, leur génome ayant été entièrement séquencé : les phages M13, fl et fd.¹²³⁻¹²⁵ Ces derniers partagent aussi des caractéristiques structurales communes.¹²⁶ En effet, leur capsid virale est composée de l'association de différentes protéines (pIII, pVI, pVII, pVIII et pIX). La protéine pVIII est la plus abondante puisque c'est elle qui, avec ses 2700 copies, va former le cylindre protéique protégeant l'ADN viral.¹²⁷ Les 4 autres protéines sont localisées à l'extrémité de la

capside et vont avoir des rôles différents. pIII notamment est responsable de l'adsorption du phage sur les bactéries et du transfert de l'ADN viral.¹²⁸ Les protéines pVI, pVII et pIX sont aussi responsables de la fusion des membranes mais leurs mécanismes n'est pas encore entièrement connu.¹²⁹ D'autres protéines sont responsables de l'assemblage du bactériophage après infection mais ne font pas partie de la particule virale (pI, pIV et pIX). Le bactériophage résultant de l'assemblage de toutes ces protéines a un diamètre de 6,5 nm et mesure 930 nm de long. A une extrémité sont insérées 5 copies de pVII et de pIX et l'autre extrémité est composée de 5 molécules de pIII et de pVI. Les 2700 monomères de pVIII constituant le cylindre viral flexible sont toutes des hélices α amphiphiles se chevauchant les unes sur les autres.

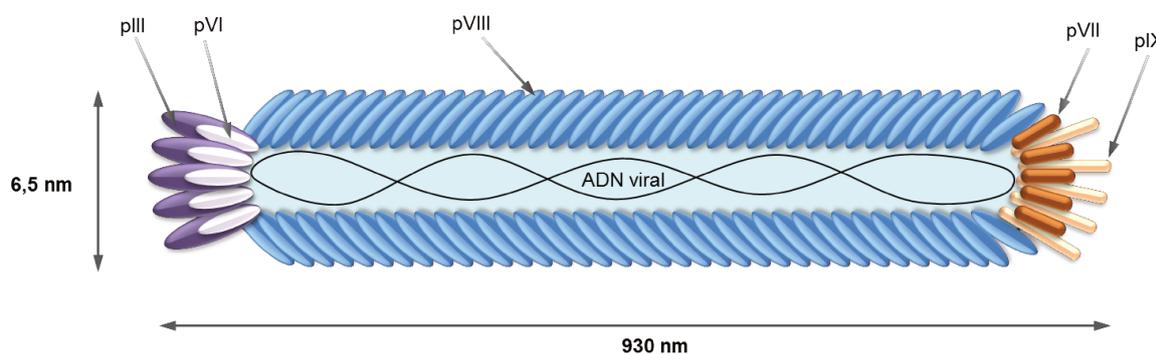


Figure 37 : Représentation schématique du bactériophage M13 cylindrique et flexible

Ainsi, ces bactériophages, dans notre cas le bactériophage M13, vont être utilisés pour cribler et identifier des ligands peptidiques de cibles d'intérêt. Pour cela, une librairie aléatoire de peptides est liée de façon covalente aux protéines pIII de la capsid virale, et comme introduit précédemment, un lien entre phénotype et génotype nous permet d'accéder à la séquence peptidique greffée par séquençage de l'ADN viral. La librairie de bactériophages doit répondre à plusieurs paramètres de qualité comme avoir la plus grande variété de séquence peptidique possible ($5 \cdot 10^9$ clones de peptides hexamériques) afin de ne pas passer à côté d'une séquence candidate. Elle doit aussi être fraîchement produite puisque les peptides sont susceptibles d'être dégradés pendant la phase de propagation des bactériophages en culture bactérienne (plus les bactériophages sont recombinaisonnés, moins la qualité du peptide exposé est sûre).

La sélection du peptide candidat est réalisée en mettant en présence la librairie de bactériophage avec une cible choisie attachée à un support (plaque, résine ou bille fonctionnalisées). Cette étape s'apparente à une purification par affinité où le bactériophage à purifier s'accroche à la cible préimmobilisée alors que les bactériophages non-liés sont éliminés par lavage. La qualité de la cible est évidemment importante. Elle doit garder son

activité pendant l'étape de purification et doit être relativement pure afin que le ligand peptidique sélectionné soit affiné pour la cible active et non pas pour un possible contaminant.

Les bactériophages liés à la cible doivent être alors récupérés par détachement/élution. Pour cela, plusieurs méthodes peuvent être utilisées. La plupart du temps, la méthode d'élution employée consiste à changer drastiquement le pH du tampon de l'expérience (pH de 2 ou 12 par rapport à un pH initialement neutre). Il en résulte une dénaturation de la cible ou du peptide, mais sans perte de l'activité et de l'infectiosité du bactériophage. La dénaturation peut aussi se faire en utilisant des tampons composés de guanidine, d'urée ou de dithiothréitol (DTT), mais ces molécules doivent être enlevées du mélange avant l'étape d'amplification des phages. Il est aussi possible d'éluer directement l'ADN viral en utilisant des détergents tels que le dodécylsulfate de sodium (SDS) ou du phénol, mais cela implique de rajouter une étape de transformation bactérienne de l'ADN pour récupérer le bactériophage entier par la suite. Le protocole d'élution peut aussi être basé sur la méthode d'immobilisation de la cible, par exemple si la cible est liée via des ions métalliques, il sera possible d'utiliser un chélateur. Enfin, plusieurs solutions d'élution impliquent l'utilisation de ligands ou de protéines interagissant avec la cible et donc éluant les bactériophages par compétition.

A l'issue de l'ensemble de ces étapes de purification par affinité avec liaison du bactériophage, lavage des bactériophages non liés et élution des bactériophages liés, environ 1% des clones viraux présentés au départ à la cible sont récupérés. C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser une grande quantité de phages à présenter à la cible afin d'avoir une quantité suffisante de phages en sortie de purification. L'amplification de ces derniers entre chaque étape de sélection permet cependant d'augmenter le nombre de particules virales d'environ 10^5 à 10^7 fois. Cette étape d'amplification peut être réalisée sur boîte de Pétri ou en solution en incubant une population bactérienne d'*E. Coli* ER2738 en pleine croissance (début de phase exponentielle de croissance) et les bactériophages élués. Néanmoins l'amplification en solution nous permet de récupérer un plus grand nombre de clones (10^6 clones /mL contre 10^4 clones /plaques). Après infection des bactéries et amplification, les bactériophages peuvent être ensuite isolés par précipitations et centrifugations successives et récupérés pour réaliser d'autres étapes de sélection/purification.

L'enrichissement de la population totale de phages en peptides ligands candidats a donc augmenté après une étape de purification/amplification. Typiquement, l'enrichissement des bactériophages liés/non-liés est d'environ 10^3 . Plusieurs étapes de purification/amplification peuvent être successivement réalisées afin d'augmenter cet enrichissement. Ainsi, mathématiquement, trois étapes sont en général suffisantes pour isoler un « bon » ligand candidat parmi 10^9 clones différents. Néanmoins, le taux d'enrichissement va varier d'une cible à l'autre. C'est pourquoi, pour définir le nombre d'étapes de sélection

nécessaires pour identifier de manière efficace un ligand peptidique, il est essentiel de contrôler après chaque étape (après amplification des phages) le taux de bactériophages se liant à la cible, par exemple avec un test immuno-enzymatique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

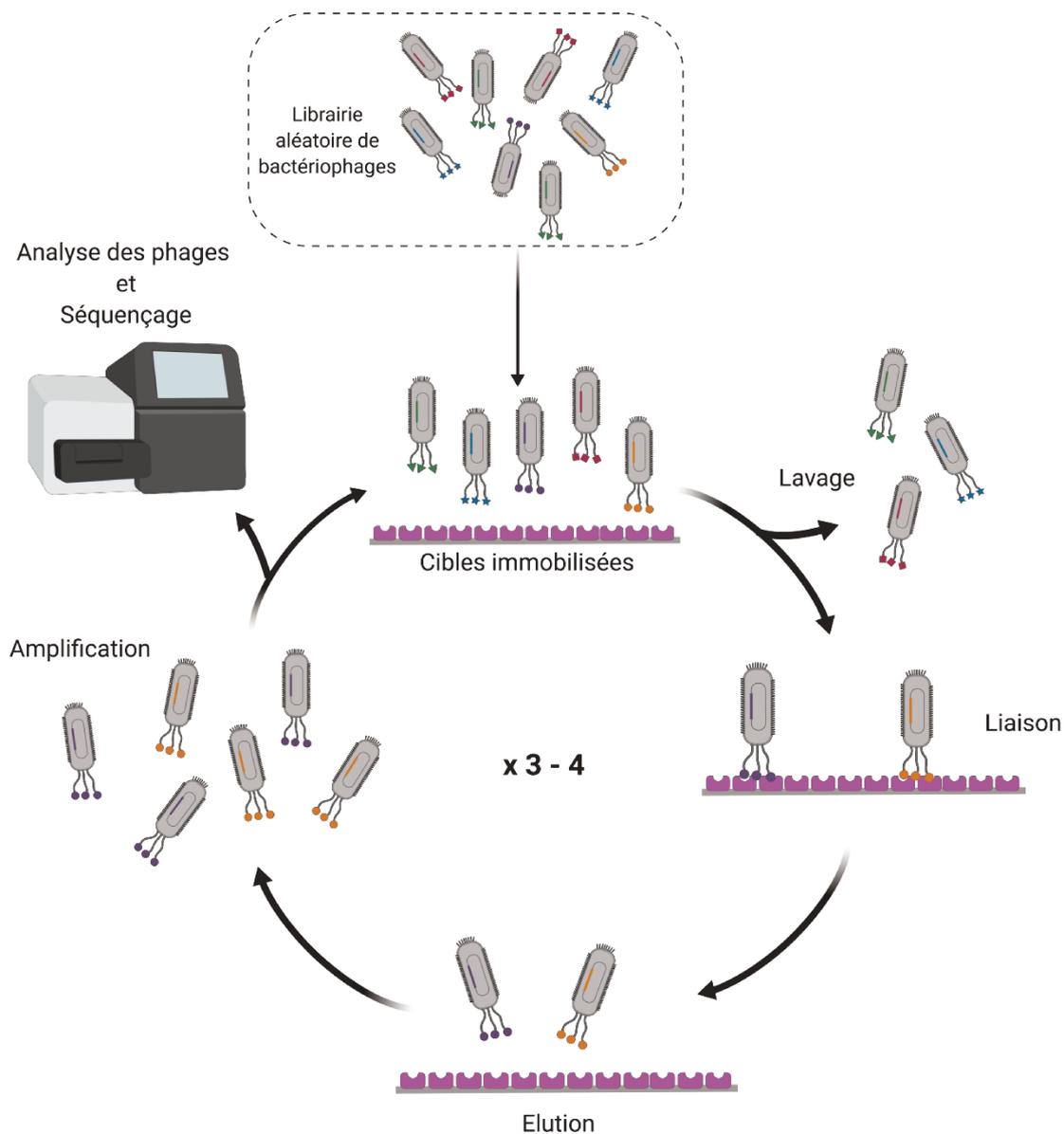


Figure 38 : Différentes étapes de la sélection d'un ligand peptidique par Phage Display.

B) Identifications des ligands peptidiques

1) Cible protéique : EGFR

La technique de Phage Display a dans un premier temps été appliquée pour la sélection d'un peptide ligand de la cible protéique EGFR. Cette expérience a été réalisée avec l'aide du Dr. J.P. Ribeiro (post-doctorant). Nous avons choisi d'opter pour une immobilisation de la protéine sur des billes magnétiques de manière à pouvoir isoler ces dernières pendant les étapes de lavages et d'éluion grâce à un portoir magnétique. La protéine EGFR utilisée pour cette sélection porte une étiquette biotine qui va permettre la liaison par interaction non-covalente à une streptavidine recouvrant les billes magnétiques. L'étape d'éluion des bactériophages liés à la cible est réalisée par traitement acide à l'aide d'un tampon de glycine à pH 2 qui va diminuer drastiquement le pH et dénaturer les protéines EGFR.

La librairie de bactériophage utilisée est une librairie aléatoire commerciale (New England BioLabs[®], E8110S) présentant 5 peptides linéaires identiques de 12 acides aminés à la surface des protéines pIII d'un clone M13. Les peptides sont reliés à pIII par un espaceur peptidique de 4 acides aminés (GGGS). 10^{11} bactériophages sont présentés à la cible en début de chaque étape de sélection.

Après 3 étapes de sélection, purification et amplification, l'enrichissement des bactériophages a été évalué par un test ELISA en immobilisant la protéine EGFR à une plaque 96 puits et en masquant les sites restant avec une albumine de sérum bovin (*bovine serum albumin*, BSA). Les bactériophages récupérés après l'étape d'amplification de chaque sélection sont présentés aux différents puits pour évaluer leur affinité vis-à-vis de la cible (**Figure 39**). Après plusieurs lavages au tampon PBS, les bactériophages interagissant avec EGFR sont révélés par utilisation d'un anticorps anti-M13 couplé à une peroxydase (*horse radish peroxydase*, HRP). L'ajout du substrat de l'enzyme, la O-phénylènediamine (OPD), permet alors d'observer et de doser le produit de la réaction, la 2-3-diaminophénazine, par absorbance à une longueur d'onde de 492 nm. L'intensité du signal mesuré est proportionnel au nombre d'anticorps liés aux bactériophages.

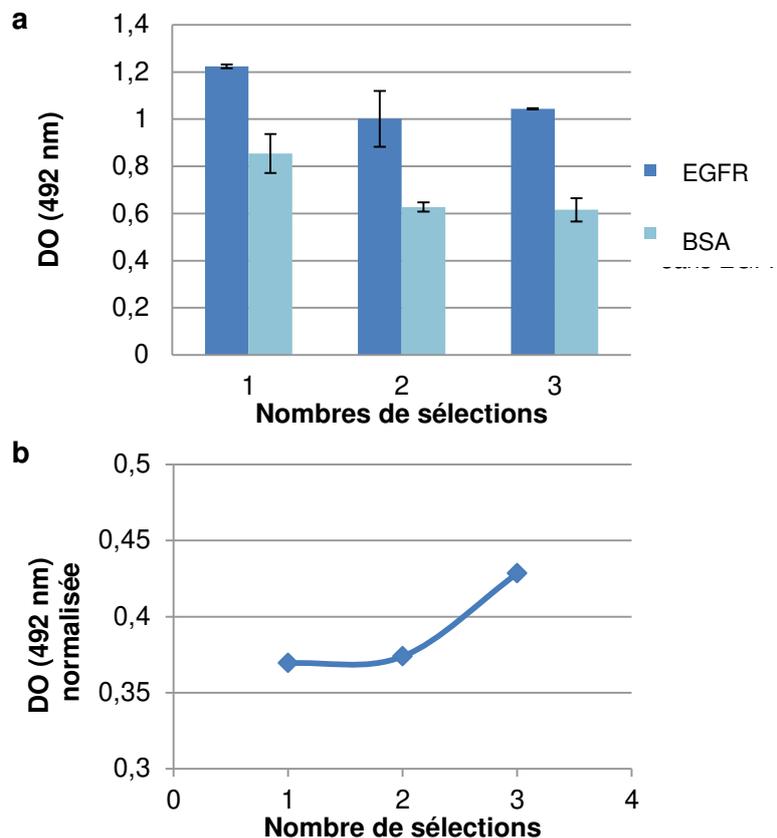


Figure 39 : Résultats du test ELISA évaluant la liaison EGFR-bactériophages. **a**. Données brutes d'absorbance correspondant au nombre de bactériophages liés à EGFR ou à la BSA (contrôle). **b**. Normalisation par soustraction des puits avec EGFR avec les puits contrôles.

Lors de cette expérience, et malgré un bruit de fond assez important lié à l'interaction des bactériophages avec la BSA, une augmentation après chaque étape de sélection de la population de clones de phages affins pour EGFR a été observée (**Figure 39b**). Ce premier résultat a permis de confirmer que le protocole de purification utilisé était adapté et que le nombre de sélection réalisé était suffisant. L'augmentation du nombre d'étapes de sélection n'est pas automatiquement bénéfique puisque le phénotype viral change à chaque étape d'amplification et le risque de dégradation peptidique augmente à chacune d'entre elles.

L'ADN viral des populations de bactériophages récupérées après 3 étapes de sélection, contenant les clones à haute affinité pour EGFR, est ensuite extrait pour être séquencé. En accédant à la séquence d'ADN suivant celle codant pour la protéine pIII, il est possible d'identifier les acides aminés des peptides ligands d'EGFR sélectionnés. Pour isoler un clone viral à partir d'une solution de phages diluée, ces derniers sont mis en présence d'une population bactérienne en début de croissance puis étalés sur une boîte de Pétri contenant du milieu de croissance bactérien LB (*lysogeny broth*). Ce milieu est supplémenté avec du X-gal (passant de l'incolore au bleu quand il est clivé par la β -galactosidase contenu dans l'ADN viral) et de l'isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG, inducteur permettant de métaboliser le X-Gal). Après une nuit d'incubation à 37°C, chaque clone de bactériophage ayant poussé donne

une colonie bleue (*plaque forming unit*, PFU) du fait de la métabolisation du X-Gal. Il est alors aisé de différencier les colonies de bactériophages des colonies de bactéries non-infectées et donc de compter le nombre total de bactériophages. La boîte de pétri comportant les différentes colonies peut alors être envoyée à séquencer par une entreprise extérieure (Genewiz®). Dans notre cas, sur 20 PFU, 10 peptides différents ont été identifiés, dont certains d’entre eux plusieurs fois (**Tableau 3**).

Peptides identifiés	Nombre de clones
H ₂ N-His-Tyr-Gly-Trp-Pro-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Tyr-His-COOH (“PSY”)	x6
H ₂ N-Gln-Val-Asn-Gly-Leu-Gly-Glu-Arg-Ser-Gln-Gln-Met-COOH (“GERS”)	x3
H ₂ N-Gly-Asn-Asn-Pro-Leu-His-Val-His-His-Asp-Lys-Arg-COOH (“HVH”)	x2
H ₂ N-Ile-Pro-Gly-Thr-Ala-Pro-Pro-Leu-Ala-Arg-Thr-Gly-COOH	x1
H ₂ N-Gly-Met-His-Gly-Lys-Cys-Tyr-Gly-Arg-Glu-Leu-Cys-COOH	x1
H ₂ N-Ser-Ash-Phe-Ala-Ser-Tyr-Tyr-Ala-Phe-Ser-Asn-Ala-COOH	x1
H ₂ N-Ser-Thr-Phe-Gln-Asp- Xxx -Arg-Gly-Arg-Met-Leu- Xxx -COOH	x1
H ₂ N-Lys-Pro-Tyr-Tyr-Thr-Val-Asp-Pro-Phe-Met-Thr-Glu-COOH	x1
H ₂ N-Ser-Gly-Thr-Ser-Asp-Tyr-Lys-Ala-Thr-Thr-Leu-Asn-COOH	x1
H ₂ N-Arg-Asp-Tyr-His-Pro-Arg-Asp-His-Thr-Ala-Thr-Trp-COOH	x1

Tableau 3 : Liste des dodécapeptides sélectionnés par Phage Display comme ligand de la protéine EGFR

Parmi les différents peptides candidats, 3 ont été identifiés sur plusieurs clones viraux. Nous avons choisi de sélectionner ces peptides candidats, que nous appellerons par la suite « PSY », « GERS » et « HVH ». Leur affinité pour EGFR sera ensuite évaluée par des expériences *in vitro* sur cellules cancéreuses exprimant cette protéine, en les conjuguant à un fluorophore.

Deux de ces peptides, GERS et HVH, ont été reportés dans la littérature comme étant identifiés par Phage Display sur des cibles différentes, respectivement CD55 (expérience faite sur des cellules HeLa, métastase issue d’un cancer de l’utérus) et les cellules Jurkat (cellules de leucémie des lymphocytes T).^{130,131} Ces études ayant été réalisées avec la même librairie de

bactériophages que celle que nous avons utilisée confirment que notre méthode de sélection est efficace. En revanche, bien que les cibles utilisées ne soit pas les mêmes, il est possible que les deux équipes de recherche aient en fait sélectionné des peptides contre les protéines EGFR exprimés par les deux lignées cellulaires utilisées. En effet, nous avons utilisé une protéine pure pour les expériences de sélection ce qui signifie que les peptides sélectionnés sont très certainement sélectif de EGFR.

2) Cibles cellulaire : cellules cancéreuses mammaires BT549

Dans le but de sélectionner un ligand peptidique ciblant les cellules cancéreuses, nous avons dans un deuxième temps choisi d'utiliser directement une lignée cellulaire cancéreuse comme cible. Nous avons choisi de travailler sur la lignée cellulaire cancéreuse mammaire adhérente **BT-549**. L'avantage d'utiliser des cellules adhérentes est l'immobilisation de la cible. En effet, cette caractéristique facilite grandement les étapes de lavages et d'élution des bactériophages lors des différentes étapes de sélections.

Comme précédemment, les lavages ont été réalisés avec du tampon PBS et l'élution par un traitement acide. L'étape d'amplification a été conduite dans les mêmes conditions décrites précédemment. En revanche cette fois-ci, nous avons décidé d'utiliser une librairie de bactériophages présentant des peptides de 7 acides aminés.

Après 4 étapes de sélection, de purification et d'amplification, l'ADN viral a été directement séquencé, l'évaluation de l'enrichissement des bactériophages par test ELISA n'ayant donné aucun résultat. L'une des hypothèses est l'internalisation des particules virales qui ne seraient donc pas disponible pour être révélés par la fixation de l'anticorps anti-M13. Cette fois-ci, l'étape de séquençage a été réalisée après l'extraction et l'isolement des ADN viraux. Pour cela, 10 PFU ont été sélectionnés à partir d'un mélange de bactériophages récupéré en fin de sélection. Ces derniers ont été lysés et l'ADN a été extrait à l'aide d'un kit d'isolation des ADN viraux M13 (VWRTM, ref. D6900-01). Les ADN provenant des 10 clones viraux différents ont ensuite été séquencés (Eurofins[©] Genomics, Courtaboeuf, France) (**Tableau 4**).

Peptides identifiés	Nombre de clones
H ₂ N-His-Leu-Asp-Glu-Trp-Pro-Tyr-COOH ("DEW")	x5
H ₂ N-Met-Gln-Glu-Met-Arg-Gln-Met-COOH	x2
H ₂ N-Ser-Val-Glu-Asn-Ser-Trp-Asn-COOH	x1
H ₂ N-Lys-Met-Pro-Gln-His-Ser-Arg-COOH	x1
H ₂ N-Ala-Gly-Asp-Ala-Ser-Asp-Gly-COOH	x1

Tableau 4 : Liste des heptapeptides sélectionnés par Phage Display comme ligand de BT549

Parmi les 10 séquences d'ADN, 5 peptides différents ont pu être identifiés avec notamment un peptide dont la séquence a été trouvée sur 5 clones différents. Un peptide ligand de BT-549 a donc été identifié à partir de l'expérience de sélection par Phage Display, dont l'affinité sera évaluée par des expériences d'incubation avec les cellules cible et par cytométrie en flux.

De plus, à notre connaissance, cette séquence peptidique n'a pas fait à ce jour l'objet de publication comme ligand d'une quelconque cible.

C) Synthèse des peptides candidats monovalents et tétravalents

1) Les dodécapeptides PSY, GERS et HVH

Les 3 peptides sont synthétisés par SPPS en utilisant une stratégie Fmoc/*t*Bu sur résine rink amide MBHA permettant de détacher le peptide et déprotéger les chaînes latérales des acides aminés de manière simultanée dans des conditions acides fortes (TFA à 95%). Le synthon **5** est ajouté pendant la synthèse SPPS du côté C-terminal du peptide pour le présenter tel qu'il est exprimé à la surface des bactériophages. Le peptide est ensuite décroché de la résine pour obtenir les peptides **27**, **28** et **29** avec respectivement des rendements de 39 %, 51 % et 62 % (Schéma 14).

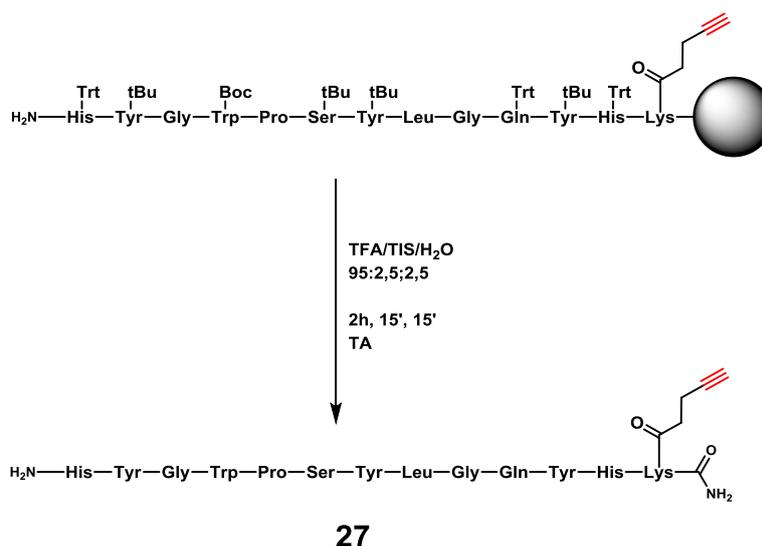


Schéma 14 : Synthèse du dodécapeptide PSY-alcyne par SPPS.

Les peptides purifiés par HPLC préparative sont finalement présentés de façon tétravalente par ligation CuAAC sur la plateforme RAFT **4**. Malheureusement, quelles que soient les conditions testées (température, catalyseur, solvant), une réaction partielle a toujours été observée. Ce problème pourrait être dû au fait que les dodécapeptides ont la capacité de chélater le catalyseur métallique, l'empêchant ainsi de participer à la formation du triazole. De plus, en chélatant le cuivre, il est possible que les peptides adoptent une conformation dans laquelle leur groupement alcyne sont peu accessibles pour réagir avec le groupement azoture du RAFT. Nous avons donc décidé de changer de technique de ligation et d'en choisir une ne nécessitant pas de catalyseur métallique : le couplage thio-chloroacétyle.

Pour cela, les nouveaux peptides **30**, **31** et **32** ont été synthétisés par SPPS comme décrit précédemment, mais en commençant la synthèse cette-fois ci par une cystéine (Schéma

15), afin d'avoir une fonction thiol nécessaire à la ligation avec la plateforme RAFT **6** présentant 4 groupements chloroacétyle.

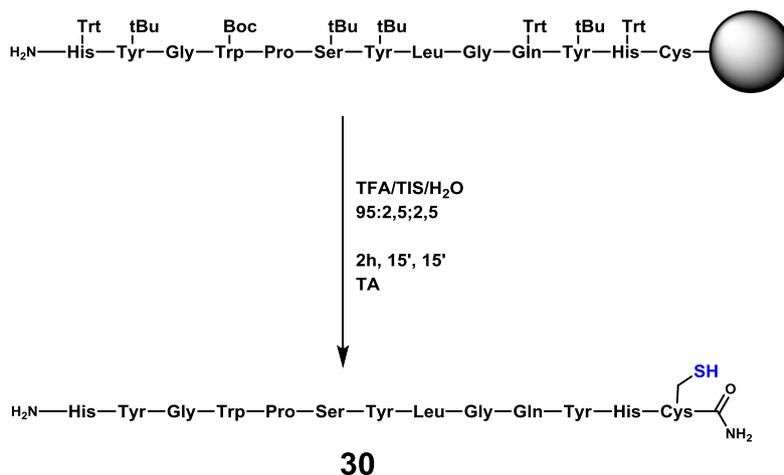


Schéma 15 : Synthèse du dodécapeptide PSY-SH par SPPS.

Le couplage TCC en présence d'iodure de potassium dans un mélange DMF/PBS (1:1, v/v) à pH basique, nous permettant ainsi d'obtenir les TBMs tétravalents **33** (TBM-R4(PSY)_s), **34** (TBM-R4(GERS)_s) et **35** (TBM-R4(HVH)_s) avec respectivement des rendements de 52 %, 60 % et 69 % (**Schéma 16**). La réaction s'est donc avérée beaucoup plus efficace que la CuAAC, malgré le risque de formation de ponts disulfures entre les fonctions thiols des dodécapeptides. Ce résultat tend à confirmer l'hypothèse qu'une telle réaction avec ces peptides doit se faire en absence de catalyseur métallique.

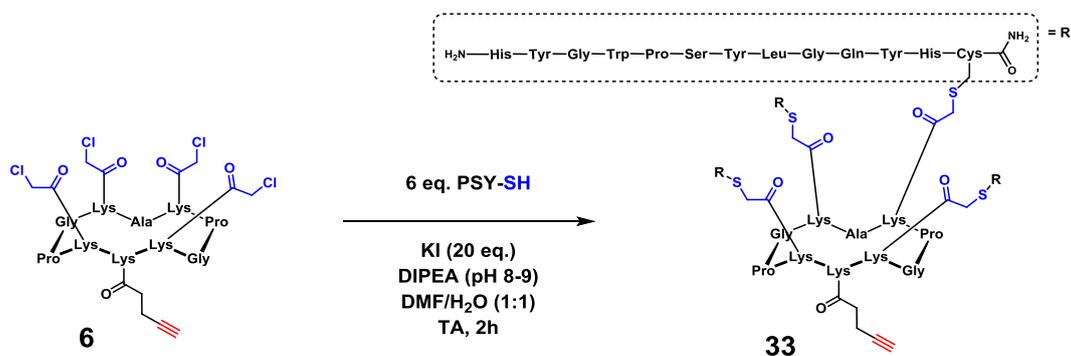


Schéma 16 : Synthèse du composé TBM-R4(PSY)_s par ligation TCC

Les peptides monovalents et tétravalents présentant une fonction alcyne doivent être conjugués par ligation CuAAC avec le synthon **13** afin d'étudier leur interaction avec les cellules choisies par cytométrie en flux. Malheureusement, la réaction n'a pu être faite que sur les peptides **27** et **29** (**Schéma 17**). En effet, nous ne sommes pas parvenu à greffer le fluorophore sur le peptide GERS-alkyne. Les constructions tétravalentes sont elles devenues

insolubles dans l'eau après réaction et donc sont impurifiables et inutilisables par la suite dans un tampon aqueux.

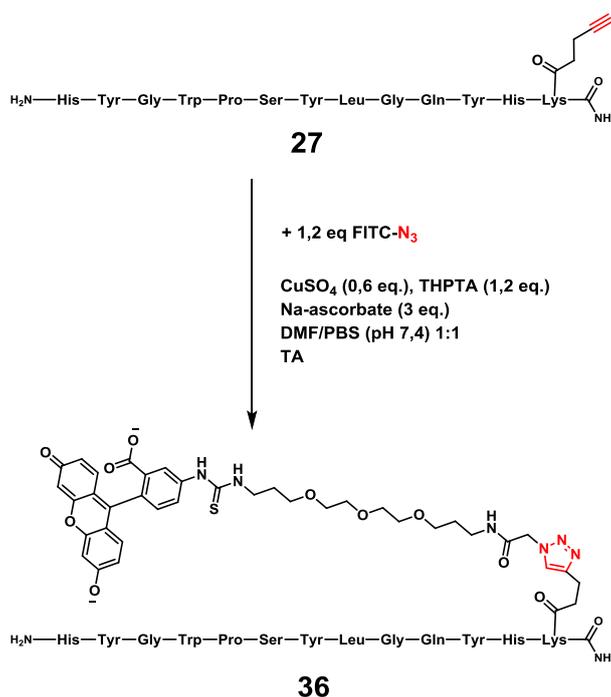


Schéma 17 : Synthèse du TBM-PSY fluorescent par ligation CuAAC

2) L'heptapeptide « DEW »

Comme les peptides PSY, GERS et HVH, le ligand peptidique DEW a été synthétisé par SPPS avec une stratégie Fmoc/*t*Bu sur une résine rink-amide MBHA. Aux vues des résultats de ligations obtenus avec les autres peptides candidats, nous avons fait le choix de greffer les peptides sur le RAFT par couplage TCC. Nous avons donc ajouté en début de synthèse une cystéine afin de conférer au peptide une fonction thiol. Après détachement du peptide, le TBM-DEW **38** a été obtenu, après purification, à un rendement de 91 %. Ce dernier est ensuite greffé à la plateforme RAFT **6** par ligation TCC pour donner le produit TBM-R4(DEW)_s **39** à un rendement de 63 % (**Schéma 18**).

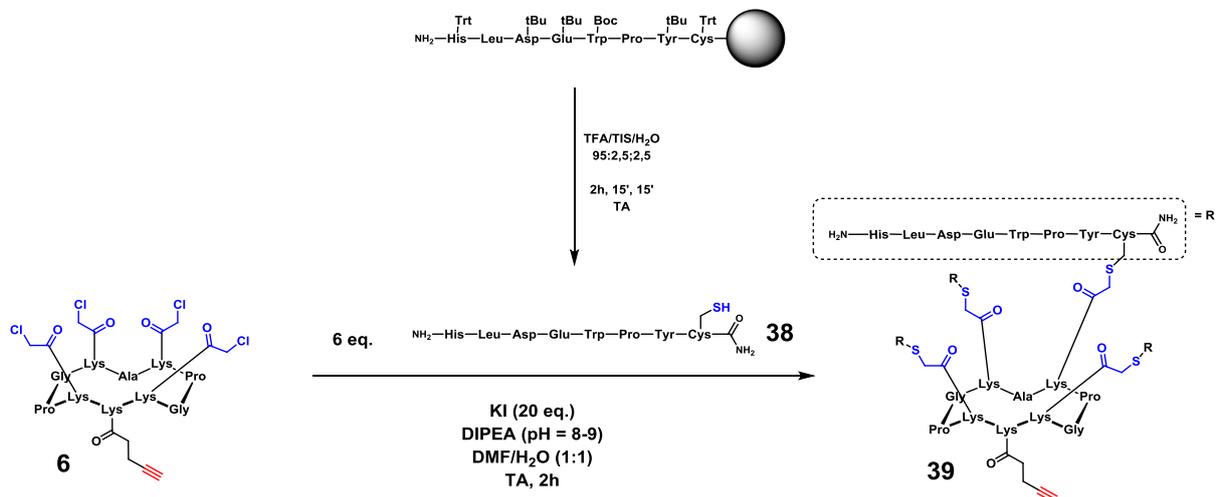


Schéma 18 : Synthèse du composé TBM-R4(DEW)_s par ligation TCC

Le peptide tétravalent est ensuite conjugué au synthon **13** via une ligation CuAAC. Cette fois-ci, le produit obtenu est soluble dans l'eau ce qui nous permet d'obtenir le TBM-R4(DEW)_s fluorescent **40** pur et utilisable dans les tests d'interaction avec les cellules. Pour greffer le FITC par CuAAC sur le peptide « DEW » monovalent, nous avons décidé de synthétiser le peptide **41** avec une fonction alcyne en C-terminal en lui ajoutant le synthon **5** en cours de SPPS (**Schéma 19**).

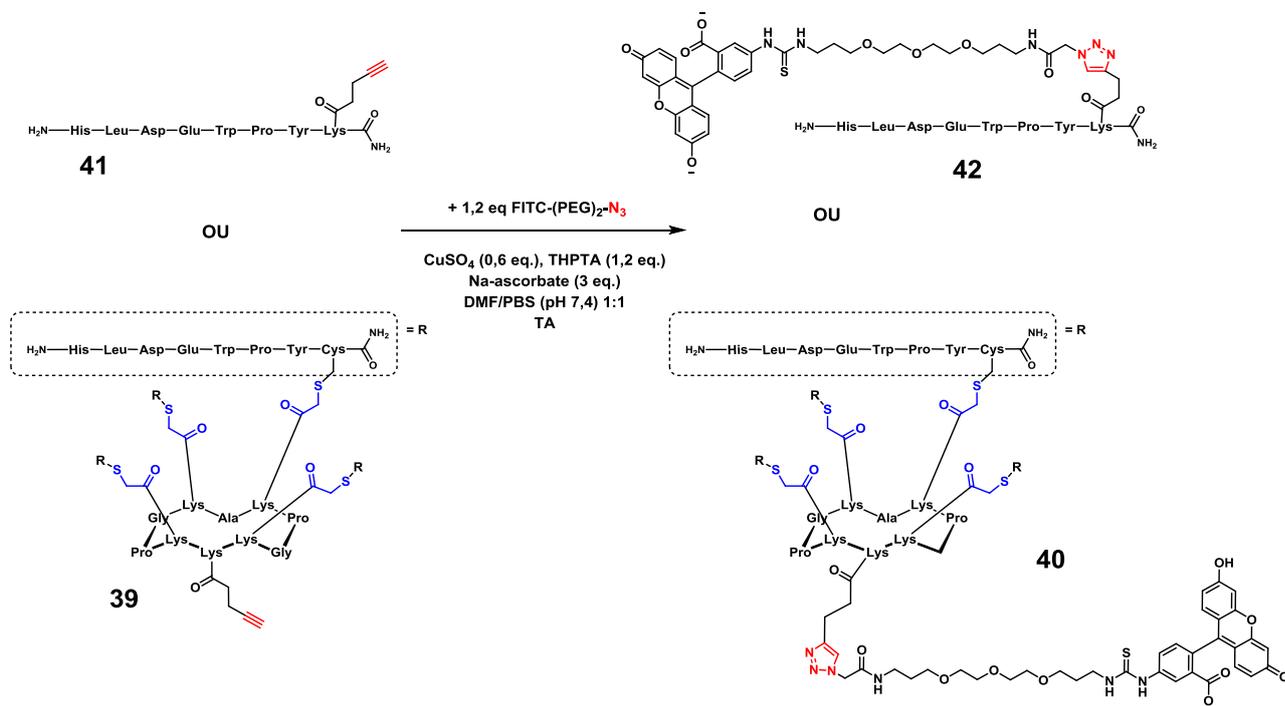


Schéma 19 : Synthèse des conjugués TBM-DEW et TBM-R4(DEW)_s fluorescents par ligation CuAAC

D) Evaluation de l'interaction des peptides sélectionnés avec leur cible

1) Les peptides monovalents PSY et HVH avec les cellules M21-L, M21 et MCF7

Comme cela a été fait pour les TBMs décrits dans le chapitre II, nous avons évalué les interactions des TBMs PSY et HVH monovalents avec des cellules cancéreuses par cytométrie en flux. Nous avons décidé d'utiliser les lignées cellulaires MCF7, M21 et M21-L qui expriment toutes les trois EGFR à des taux différents (chapitre II, partie C, 2). Les deux peptides monovalents **36** et **37** ont été ajoutés à saturation (25 μ M) avec chaque suspension cellulaire (1 millions de cellules) pendant 2 heures à température ambiante. La fluorescence des cellules a été analysée par cytométrie en flux (**Figure 40**).

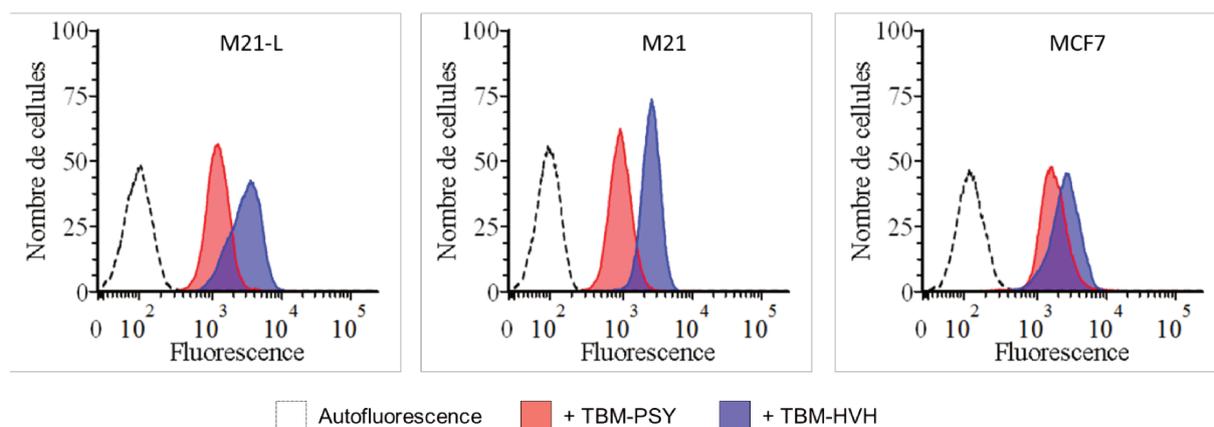


Figure 40 : Histogramme de fluorescence représentant l'interaction des TBMs PSY (rouge) et HVH (bleu) avec les lignées cellulaires M21-L, M21 et MCF7. Etude par cytométrie en flux.

Cette étude a montré que, parmi les peptides sélectionnés par Phage Display et qui ont pu être synthétisés, le TBM-HVH monovalent est celui qui interagit le plus avec les trois lignées cellulaires testées. Cependant, nous pouvons voir que les intensités de fluorescence enregistrées sont toutes équivalentes. Or, si chaque lignée présente un taux d'expression d'EGFR différent, nous pourrions nous attendre à observer des liaisons différentes du TBM, ce qui a par ailleurs été observé avec le composé TBM-PSY (**Figure 41**).

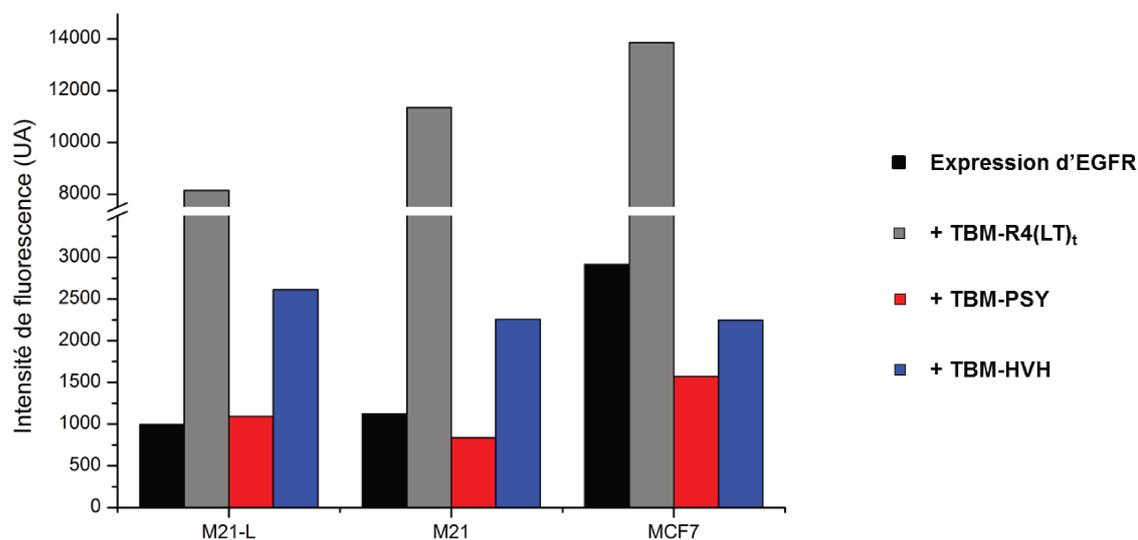


Figure 41 : Histogramme des fluorescences moyennes enregistrées lors des expériences d'interaction des TBMs R4(LT)_t, PSY et HVH avec les lignées cellulaires M21-L, M21 et MCF7 ainsi que lors du dosage de leur taux d'expression d'EGFR, par cytométrie en flux.

Nous ne pouvons donc pas nous appuyer sur ces études préliminaires de fluorescence. Il est nécessaire à ce stade de comparer les affinités des deux peptides pour une protéine EGFR purifiée en utilisant des méthodes biophysiques (SPR, BLI ...). Nous pourrions ainsi confirmer ou non les résultats des expériences de cytométrie en flux. Nous pourrions en particulier définir si HVH se lie de façon non spécifique aux cellules.

2) Le peptide DEW sur BT-549 et MCF 10A

L'interaction du peptide DEW pour sa cible a été analysée par incubation des composés fluorescents monovalent **42** et tétravalent **40**, en condition saturante (20 μM), avec les suspensions cellulaires de BT-549 (cible) et MCF 10A (cellules saines servant de lignée contrôle). Après lavage, les cellules sont analysées par cytométrie en flux (**Figure 42**).

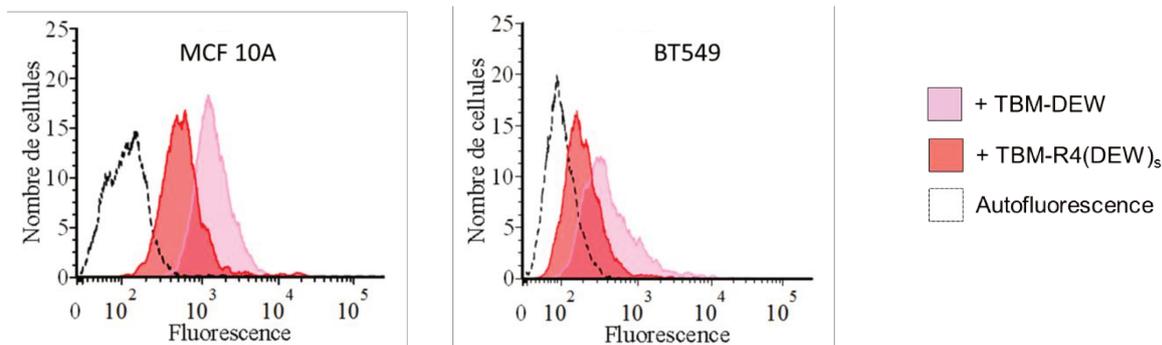


Figure 42 : Histogramme de fluorescence représentant l'interaction des TBMs DEW mono- (rose) et tétravalents (rouge) avec les lignées cellulaires MCF 10A et BT549. Etude par cytométrie en flux.

Cette étude d'interaction nous a apporté deux informations :

- Le TBM-DEW **42** s'est tout d'abord révélé interagir bien mieux avec les deux lignées cellulaires comparé au TBM-R4(DEW)₄ **40**. La présentation multivalente du peptide ne semble donc pas améliorer l'interaction avec les cellules.
- Bien que le peptide DEW ait été sélectionné pour se lier aux cellules BT549, il semble reconnaître bien mieux la lignée MCF 10A utilisée comme contrôle négatif.

Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que le peptide ait été enrichi pour cibler un marqueur présent à la surface des cellules BT549, mais exprimé en plus grande quantité à la surface de la lignée MCF 10A. Cela montre donc que le peptide DEW sélectionné par Phage Display reconnaît de façon non-négligeable une cible cellulaire exprimé à la surface de plusieurs lignées cellulaires.

IV. Antibody-Recruiting Molecule : interaction avec les cellules tumorales et recrutement d'anticorps

A) Historique du concept ARM

Comme décrit en introduction, les ARMs sont devenus des alternatives très prometteuses pour le traitement de nombreuses pathologies et notamment pour l'immunothérapie antitumorale. Aujourd'hui, plusieurs constructions ARMs ont fait leur preuve pour cibler sélectivement les cellules cancéreuses et initier leur mort.

L'une des premières études montrant la reconnaissance et la destruction de cellules cancéreuses par stratégie ARM a été publiée par Lu et Low en 2002.¹³² La construction moléculaire élaborée consistait à cibler des cellules surexprimant le récepteur de l'acide folique (*folate receptor*, FR), protéine très peu exprimée dans les tissus normaux et à l'inverse, surexprimée dans une grande majorité de tissus tumoraux. Son ligand, l'acide folique est connu pour avoir une très haute affinité pour son récepteur (de l'ordre de 10^{-10} M).¹³³ Il a ainsi été conjugué avec un fluorophore FITC comme module de recrutement des anticorps (**Figure 43**). Aucun anticorps ciblant le FITC n'est pour autant présent dans la circulation sanguine chez l'homme. Cette approche nécessite donc la préimmunisation du patient pour induire la production d'anticorps au préalable. Malgré cette étape d'immunisation supplémentaire, cette molécule a montré des résultats intéressants : la preuve de fixation de l'ARM en étudiant la localisation du FITC (**Figure 43a H**) et la preuve de recrutement d'anticorps IgG en étudiant la localisation de l'anticorps secondaire (**Figure 43a I**). Des études *in vivo* ont été finalement entreprises en ayant injecté l'ARM puis des protéines du système immunitaire (IL-2 et IFN- α) au niveau d'une tumeur implantée sur des souris préimmunisées (**Figure 43b**). Cette dernière expérience montre une survie très intéressante de la souris traitée.

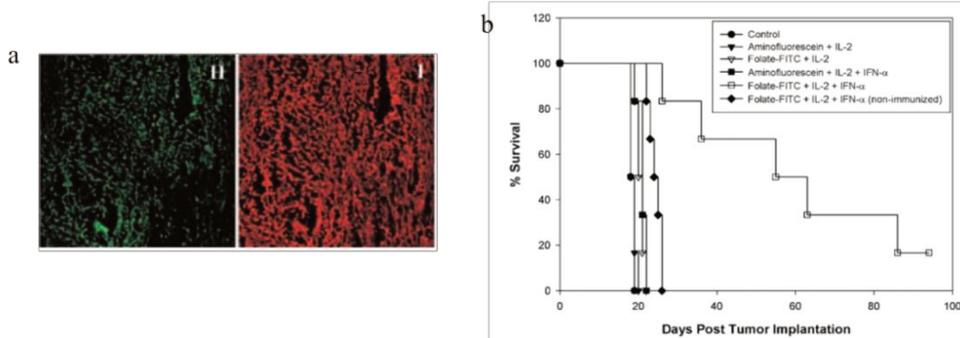
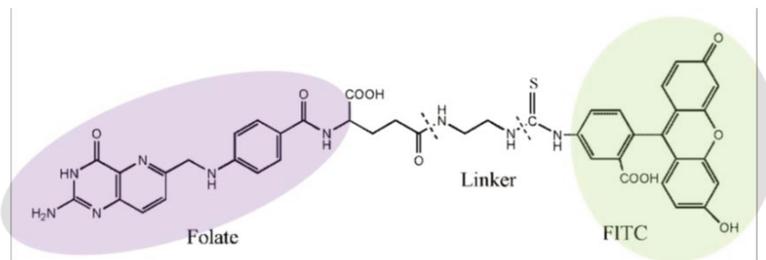


Figure 43 : Preuve de concept de l'ARM Folate-FITC. (a) Image de microscopie à fluorescence montrant sa localisation sur une tumeur murine (vert = FITC, rouge = anti-IgG-phycoérythrine). (b) survie de souris immunisées (issue et adaptée de Lu et Low 2002).¹³²

La même équipe de recherche, en 2007, a reporté une nouvelle molécule ARM variant de la précédente par la nature du module ABM.¹³⁴ Les mêmes études de survie de souris ont été entreprises avec un conjugué folate-DNP, toujours en immunisant en amont les souris avec l'antigène DNP. Là encore, les souris avec une tumeur implantée vont survivre plus longtemps grâce à l'injection de l'ARM, mais nécessitant l'injection simultanée de IL-2 et IFN- α (**Figure 44**).

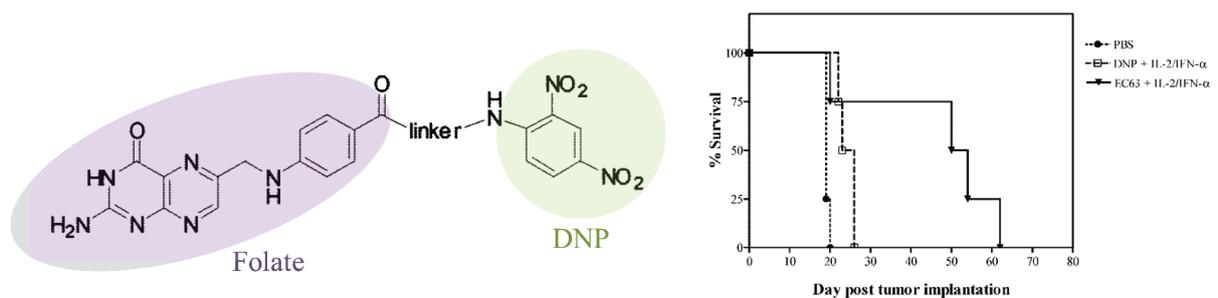


Figure 44 : Preuve de concept de l'ARM Folate-DNP en étudiant son effet sur la survie de souris immunisées (issue et adaptée de Lu et Low 2002).¹³⁴

Ces deux molécules ARMs ciblant FR ont donc montré des propriétés prometteuses *in vivo*, néanmoins elles nécessitent une étape de préimmunisation. L'équipe de Laura Kiessling a synthétisé et évalué biologiquement un conjugué permettant de s'affranchir de cette étape.⁴⁰ L'ARM élaboré était constitué d'un mime du peptide cRGDFK ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et d'un module composé de sucres α -Gal (galactosyl- $\alpha(1-3)$ galactose) chargé de recruter des anticorps endogènes. En effet, il avait été précédemment établi que des anticorps ciblant cet

antigène étaient retrouvés dans le système sanguin de l'homme.¹³⁵ Cet ARM a été évalué *in vitro*. Pour cela, le conjugué a été présenté à des cellules surexprimant les intégrines d'intérêt puis du sérum humain, source d'anticorps anti- α -Gal, a été rajouté. La destruction d'une majorité de cellules a pu être observé (**Figure 45**) montrant l'efficacité de telles constructions bimodales dans des applications antitumorales chez l'homme.

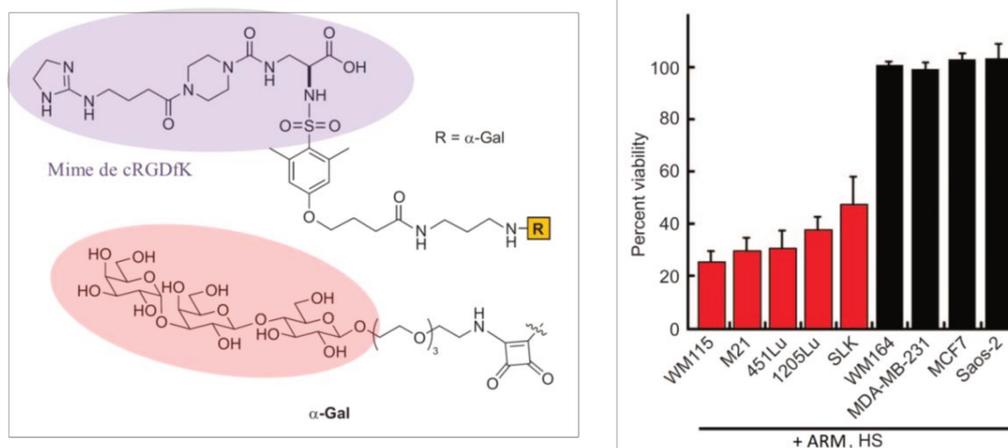


Figure 45 : Preuve de concept de l'ARM mime RGD- α -Gal. Test de viabilité de cellules surexprimant les intégrines $\alpha_v\beta_3$ (rouge) et de cellules ne les exprimant pas ou peu (noir) (issue et adaptée de Carlson *et al.* 2007).⁴⁰

Enfin, l'équipe de David Spiegel a expérimenté un nouveau type de conjugué ARM avec une stratégie innovante.¹³⁶ L'aptitude des molécules ARM à induire une réponse de cytotoxicité des cellules ciblées par recrutement non pas des anticorps mais des cellules du complément responsables de la réponse immunitaire a été évaluée. Pour cela, des constructions ciblant des protéines PSMA grâce au ligand DUPA greffé à un module CP33, groupement reconnu par les récepteurs Fc γ R des cellules de l'immunité, ont été élaborées. Cette stratégie n'implique pas de reconnaissance par les anticorps. L'ARM conçu a montré être capable de se lier aux cellules ciblées (dans une gamme de concentration de 1 à 50 nM) et de les détruire, dans ce cas par une réponse immunitaire impliquant un processus ADCP (**Figure 46**).

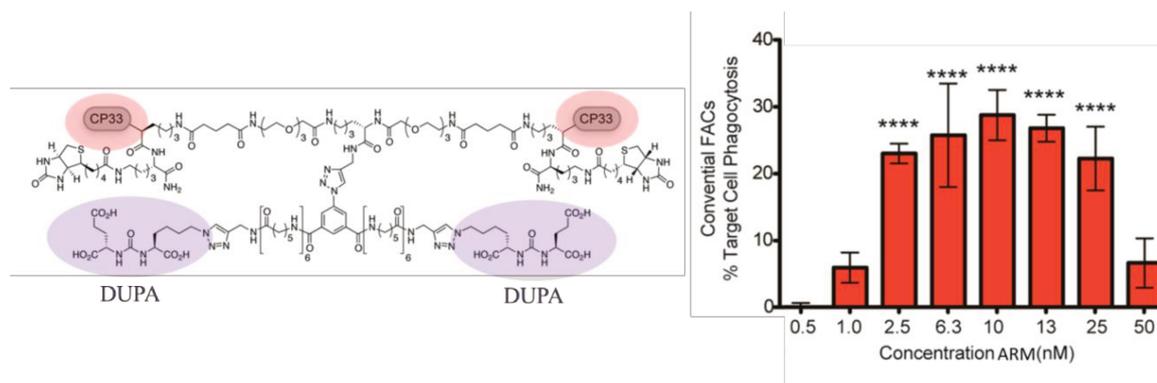


Figure 46 : Preuve de concept de l'ARM DUPA-CP33. Test de viabilité de cellules surexprimant PSMA (issu de McEnaney *et al.* 2014).¹³⁶

Dans les différents exemples d'ARMs présentés, les conjugués se sont montrés tous efficaces pour induire la reconnaissance et la mort des cellules tumorales. Cela implique que les modules de reconnaissance utilisés sont tous très sélectifs. Un autre point important pour un ARM est de recruter efficacement les anticorps pour induire une réponse cytotoxique. Cette étape cruciale fait intervenir le module ABM. Les différentes études décrites ci-dessus ont impliqué différentes sources d'anticorps : préimmunisation du patient avec l'antigène utilisé, co-injection d'un anticorps pur ciblant l'ABM et utilisation des anticorps endogènes présents dans le sérum humain. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous nous sommes concentrés sur l'étude de l'interaction de différents modules ABM avec les anticorps présents dans plusieurs sérums humains.

B) Sélection de l'ABM et synthèse de l'ARM

La sélection du meilleur ABM a fait l'objet des travaux de thèse du Dr. E. Laigre ayant travaillé sur l'identification de glycopeptides les plus affins pour les anticorps du sérum humain. Pour cette identification, des expériences de glycoarray ont été mises en place pour évaluer l'interaction sucre/anticorps. Cette technique permet de greffer sur support solide (lame de verre) des structures glycosylées (du monomère au polysaccharide complexe) en utilisant de très faibles quantités (centaine de micromètres de diamètre correspondant à quelques microlitres). Elle offre de plus la possibilité d'immobiliser plusieurs structures en parallèles à différentes concentrations permettant ainsi un gain de temps non-négligeable. Différents sérums humains, commerciaux (Sigma Aldrich[®], 5 hommes originaire des Etats-Unis et de groupe sanguin AB) ou issus de l'établissement français du sang (EFS, 20 individus français de sexe, âge et groupes sanguins différents), sont incubés avec les différents glycoconjugués immobilisés. Après lavage, des anticorps secondaires fluorescents sont ensuite incubés sur la lame afin d'observer l'interaction des anticorps du sérum avec les glycoconjugués. Le résultat observé est présenté sous forme de « heat-map », ou carte de chaleur, représentant les intensités de fluorescence enregistrées (de rouge pour les faibles intensités à blanc pour les plus fortes) (**Figure 47**).

Plusieurs sucres ont été criblés vis-à-vis de plusieurs sérums humains afin d'identifier la présence d'anticorps naturels et affins pour ces structures :

- α -D-mannose (**α -Man**)
- α -L-fucose (**α -Fuc**)
- N-acétyl- α -D-galactosamine (**α -GalNAc**)
- α -/ β -D-galactose (**α -/ β -Gal**)
- α -isoglobotriose (**iGb3**)
- acide sialique (**α -Neu5Ac**)
- α -L-rhamnose (**α -Rha**)

Les paramètres structuraux des ligands étant essentiels, des structures de différentes valences ont été testés : **mono-** (plateforme RAFT à une lysine fonctionnalisée), **tétra-** (plateforme RAFT à 4 lysines fonctionnalisées) et **hexadécavalent** (plateforme RAFT sur laquelle ont été greffées 4 autres plateformes RAFT présentant chacune 4 lysines fonctionnalisées donnant au total 16 lysines fonctionnalisées). Le glycoconjugué ayant montré les résultats les plus satisfaisants est le sucre α -Rha pour lequel de très fortes affinités avec les IgM humains ont été mesurées (**Figure 47**). Ici encore, la valence du conjugué s'est avéré

avoir une grande influence dans l'interactions avec les anticorps. Bien que les constructions tétravalentes aient montré leur aptitude à se lier aux anticorps, la meilleure affinité a été observée pour la présentation hexadécavalente de l' α -L-Rha conjugué aux RAFT par le biais de ligations triazole. Une présentation monovalente a montré peu d'efficacité à recruter les anticorps des différents sérums. Des anticorps anti- α -GalNAc et anti- α -Gal ont aussi détectés dans quelques sérums, mais en quantités faibles par rapport aux anticorps anti- α -Rha. Les autres glycoconjugués n'ont montré aucune affinité pour les anticorps des sérums utilisés.

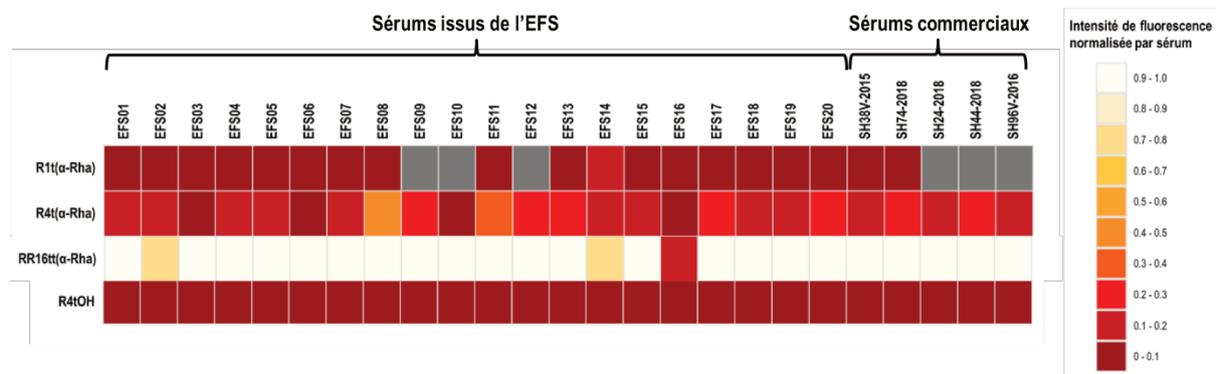


Figure 47 : Schéma "heatmap" obtenu par microarray de l'interaction entre les glycoconjugués présentant 1, 4 ou 16 α -L-Rha et les anticorps IgM anti- α -L-Rha présents dans le sérum humain (issue et adaptée du manuscrit de thèse d'Eugénie Laigre).

Ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques et démontrent que le rhamnose est une alternative prometteuse aux autres ABMs déjà reportés (**Figure 48**).^{137,138} Sur la base de l'ensemble de ces résultats, nous avons décidé d'utiliser comme module ABM, les glycoconjugués α -Rha tétravalent (ABM-R4(Rha)_t) et hexadécavalent (ABM-RR16(Rha)_{tt}) (**Schéma 20**) nous permettant d'avoir le meilleur recrutement d'anticorps présents dans les sérums humains.

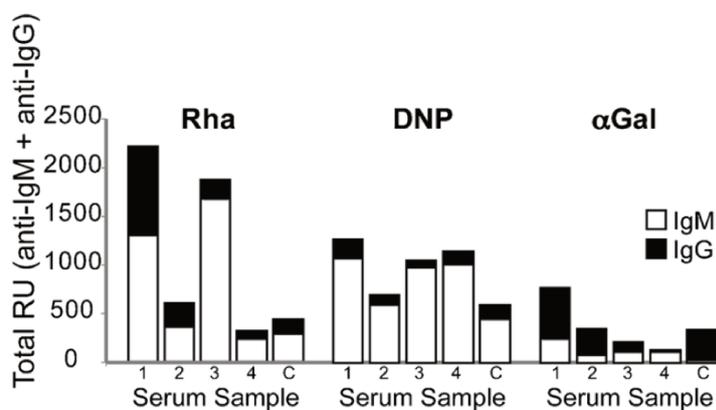


Figure 48 : Dosage des anticorps IgM et IgG ciblant le rhamnose, le DNP ou l' α -Gal dans différents sérums humains (issue de Sheridan et al. 2014).¹³⁷

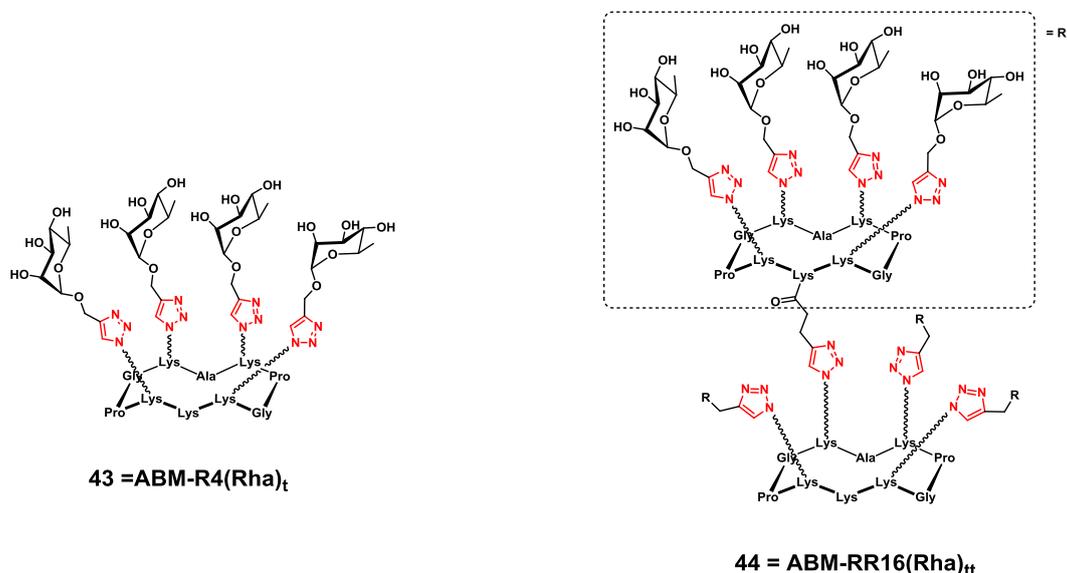


Schéma 20 : Modules ABMs à motif α -L-Rha tétravalent et hexadécavalent.

Une fois les deux modules TBM et ABM sélectionnés, ces derniers ont été conjugués covalamment afin de synthétiser la molécule ARM. Pour cela, les deux modules à assembler ont été fonctionnalisés par des groupements complémentaires pour réaliser une ligation CuAAC, à savoir un groupement alcyne sur l'amine de la lysine de la face inférieure du RAFT et un groupement azoture sur la celle de l'ABM, dans les deux cas avec l'aide de la molécule activée par un groupe NHS (**Schéma 21**).

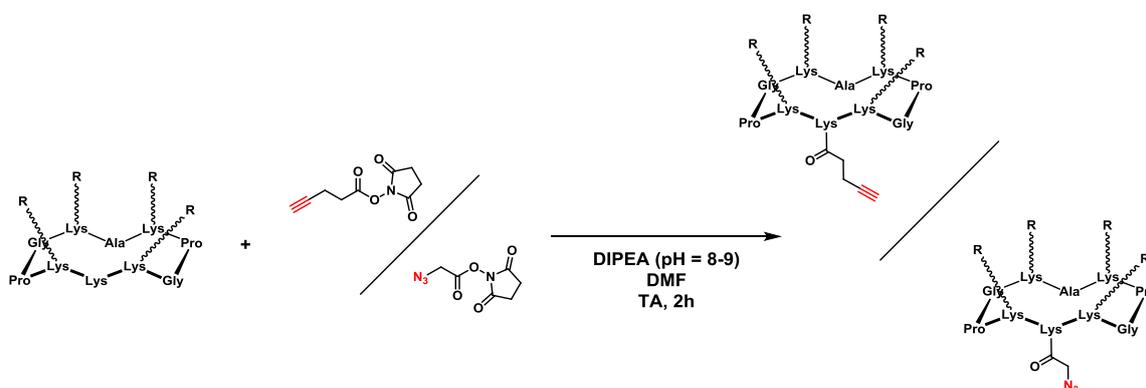


Schéma 21 : Synthèse des modules TBM et ABM avec respectivement greffage de groupements alcyne et azoture activés par un NHS.

Le produit final ARM est donc obtenu après réaction d'un TBM-alcyne avec un ABM-azoture par ligation CuAAC dans un mélange DMF/PBS (1:1, v/v) à pH 7,4, en présence de CuSO_4 , de THPTA et de Na-ascorbate. Un exemple de synthèse est présenté ci-dessous où le TBM-R4(RGD)_t et l'ABM-RR16(Rha)_{tt} sont liés ensemble donnant l'ARM appelé « 4RGD-16Rha » (**Schéma 22**). Le produit final purifié est obtenu à un rendement de 78 % et se présente sous la forme d'un seul pic nous confirmant sa pureté (**Figure 49**).

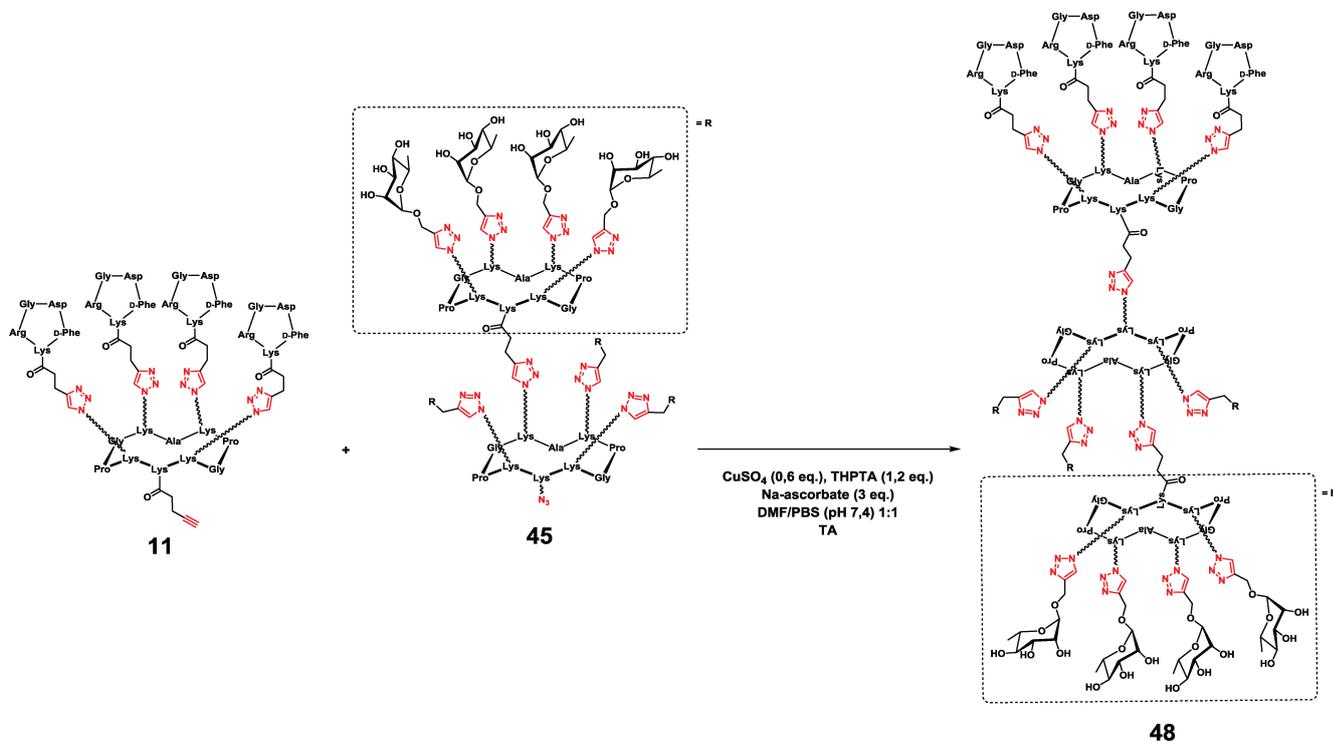


Schéma 22 : Exemple de synthèse d'une molécule finale ARM par ligation CuAAC. Ici, la synthèse de l'ARM-R4(RGD)_t-RR16(Rha)_{tt} (4RGD-16Rha).

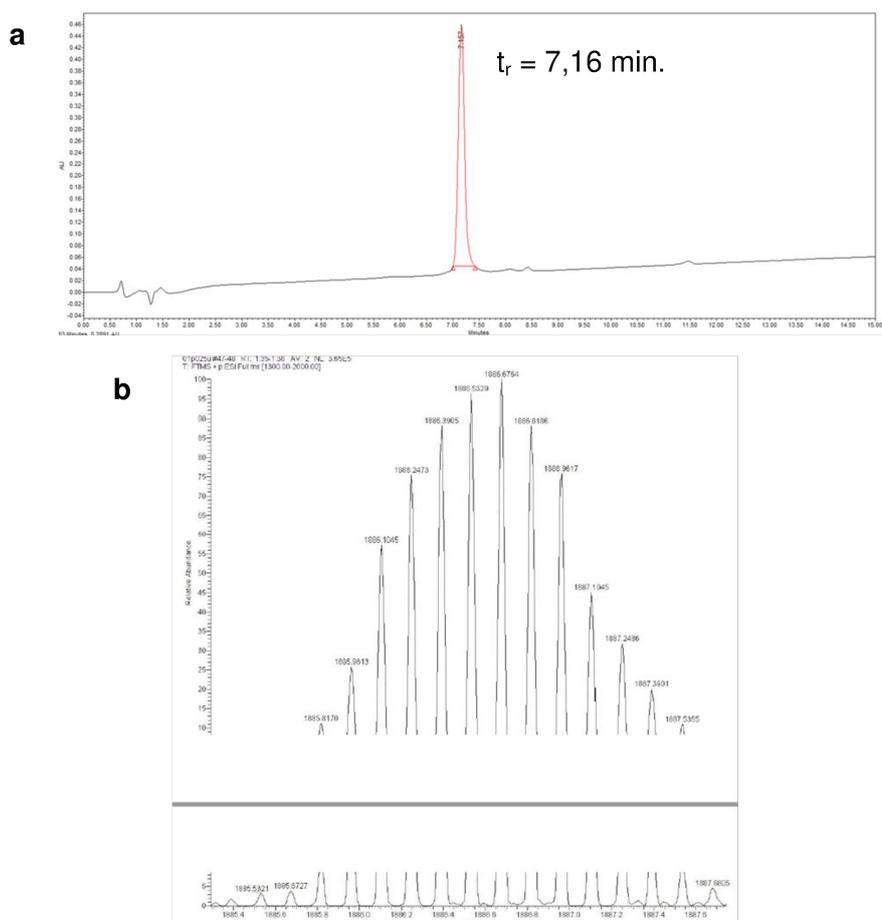


Figure 49 : Caractérisation de l'ARM 4RGD-16Rha pur. (a) Profil de HPLC-RP analytique ($\lambda = 214 \text{ nm}$, 5-60 % B en 15 min.) ; (b) HRMS (ESI+-TOF) avec une m/z calculée pour $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ de 1885,5187 (monoisotopique) et trouvée de 1885,5321.

5 constructions ARM ont été ainsi synthétisées pour les expériences d'interaction avec les cibles cellulaires (**Schéma 23**) :

- ARM avec un TBM cRGDfK monovalent et un ABM hexadécavalent (**1RGD-16Rha**)
- ARM avec un TBM cRGDfK tétravalent et un ABM tétravalent (**4RGD-4Rha**)
- ARM avec un TBM cRGDfK tétravalent et un ABM hexadécavalent (**4RGD-16Rha**)
- ARM avec un TBM LARLLT tétravalent et un ABM hexadécavalent (**4LT-16Rha**)
- ARM avec un TBM AZ tétravalent et un ABM hexadécavalent (**4AZ-16Rha**)

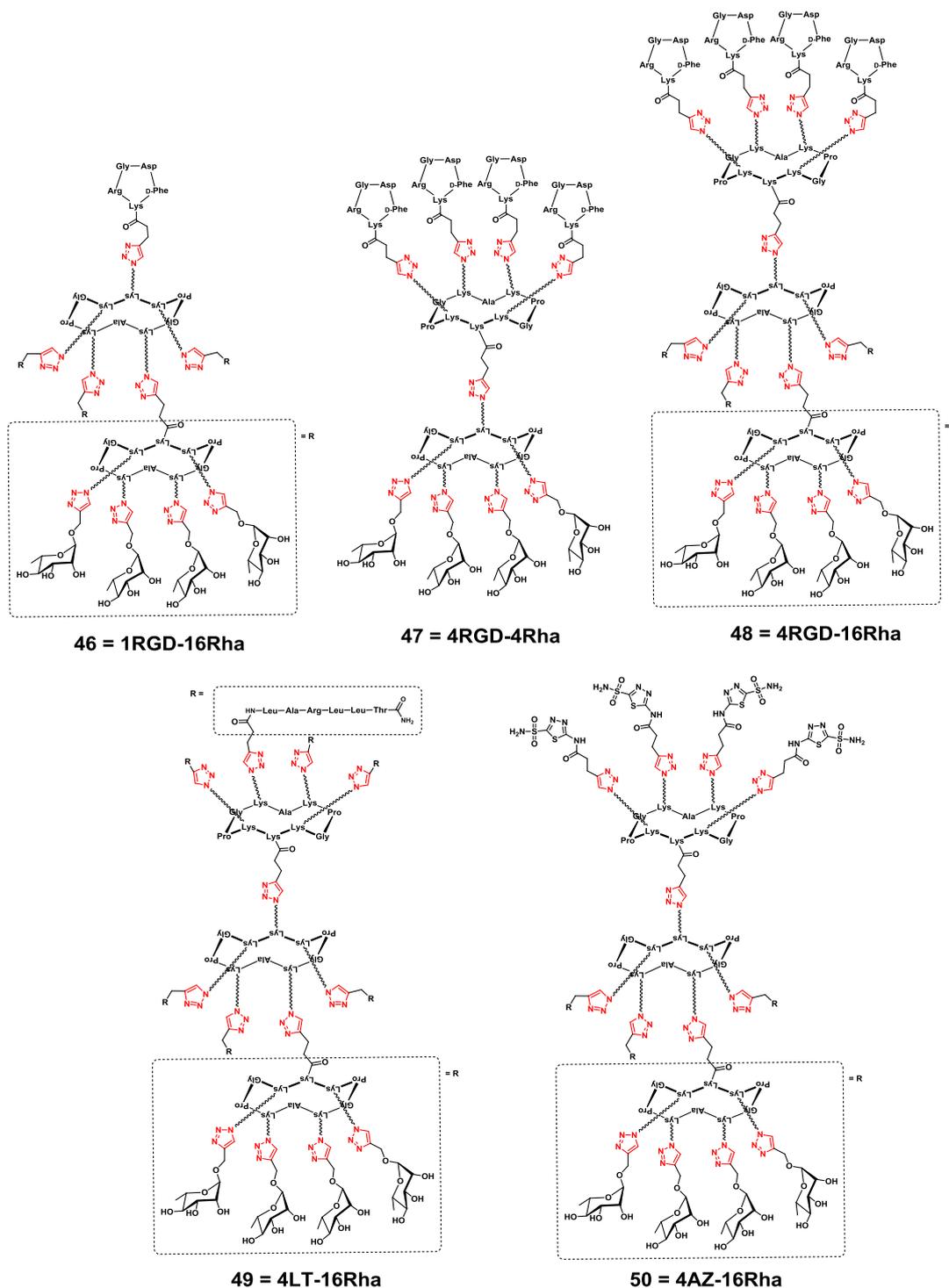


Schéma 23 : Molécules d'ARM utilisés pour nos expériences.

C) Liaison de l'ARM à la cellule cancéreuse

1) ARM avec le TBM-RGD

La première étape de la validation de la molécule ARM consiste à évaluer son efficacité à se lier aux cellules puisqu'il s'agit de l'étape primordiale pour former un complexe ternaire entre les cellules, l'ARM et les anticorps. Pour cela, nous avons analysé la fluorescence cellulaire par cytométrie en flux en utilisant tous les partenaires requis, à savoir, la cellule cancéreuse ainsi que sa cellule contrôle (M21 et M21-L respectivement), les molécules d'ARM sélectionnées (1RGD-16Rha, 4RGD-4Rha et 4RGD-16Rha) et l'anticorps fluorescent permettant de révéler la liaison. Pour cela, nous avons choisi de faire produire et purifier un anticorps monoclonal IgG de lapin ciblé contre l'ABM R4(Rha)_t **43** par une entreprise (Davids Biotechnologie GmbH, Allemagne). La liaison de cet anticorps à l'ABM sera ensuite révélée par l'utilisation d'un anticorps secondaire fluorescent (couplé à une phycoérythrine) ciblant les IgG de lapin.

Les expériences ont été menées sur les lignées cellulaires M21 et M21-L en suspension (1,5 millions de cellules/mL) dans du tampon HBSS. Pour minimiser tout risque d'internalisation lors de la liaison de cRGDfK aux intégrines $\alpha_v\beta_3$, nous avons décidé de fixer les cellules au paraformaldéhyde (PFA) 4% dans du tampon PBS, pendant 10 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite incubées avec les composés ARM dans du milieu de culture DMEM non supplémenté. Après lavage, les anticorps anti-R4(Rha)_t sont ajoutés à une concentration de 50 µg/mL et incubés pendant 2h à température ambiante. La présence du complexe ternaire sera révélée en ajoutant l'anticorps secondaire fluorescent (dilué 500 fois dans du DMEM pendant 1h à température ambiante). Après un dernier lavage, la fluorescence des cellules est analysée par cytométrie en flux.

Dans les premières expériences réalisées, nous avons choisi de faire varier la concentration de l'ARM pour connaître la quantité optimale à ajouter aux cellules afin d'avoir la meilleure liaison possible. En effet, si l'ARM est ajouté en faible quantité, une majorité d'intégrines resteront libres et le recrutement des anticorps ne sera pas optimal. Si, au contraire, l'ARM est ajouté en excès pour saturer les intégrines $\alpha_v\beta_3$, les molécules non liées fixeront les anticorps qui ne pourront plus se lier aux ARM présents à la surface cellulaire. Il a en effet été montré que la formation d'un complexe ternaire avec trois partenaires A (cellule), B (ARM) et C (anticorps), C ne se liant pas à A, répond à un équilibre sous forme d'une courbe dose/réponse en forme de cloche où il existe un maximum de formation du complexe ternaire pour une concentration optimale de B (**Figure 50**).¹³⁹

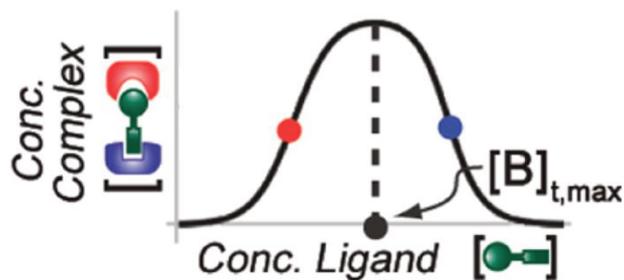


Figure 50 : Graphique décrivant la formation du complexe ternaire où une concentration optimale de ligand B (ou ARM dans notre cas) est nécessaire (issue de Douglas et al. 2013).¹³⁹

Les premières expériences ont été réalisées avec l'ARM **48** 4RGD-16Rha, dans une gamme de concentration de 10 nM à 20 μ M (**Figure 51**).

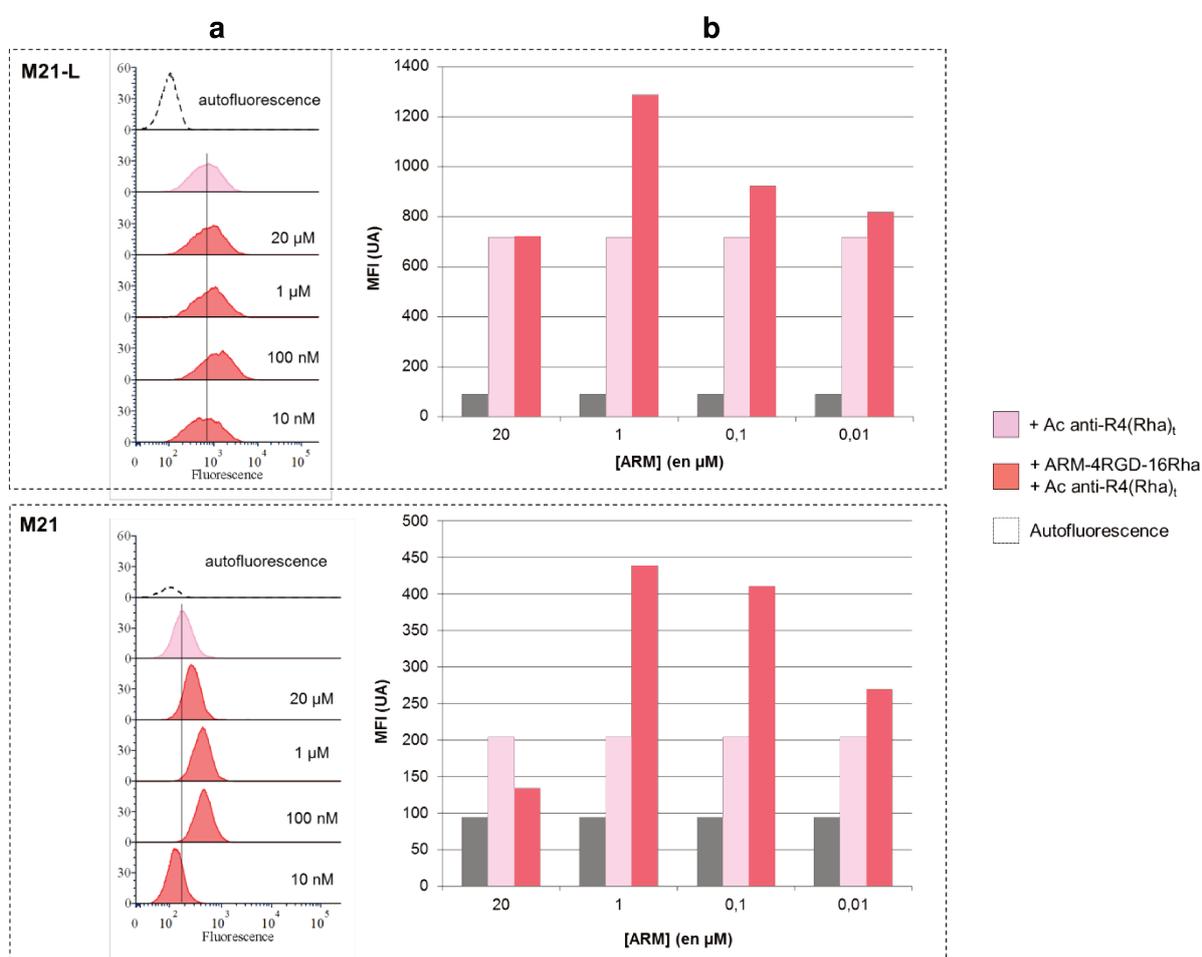


Figure 51 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21-L et M21 incubées avec l'ARM 4RGD-16Rha à différentes concentrations, un anticorps ciblant l'ABM-R4(Rha)_t et un anticorps secondaire couplé à une PE. (a) les analyses brutes de cytométrie en flux ; (b) les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).

Lors de cette expérience nous avons pu constater premièrement que les anticorps purifiés anti-R4(Rha)_t avaient tendance à se lier de façon non-spécifique aux cellules et de manière assez importante avec la lignée M21-L pour laquelle un signal de fluorescence (rose) relativement intense a pu être mesuré. Sur la base de ce signal non-spécifique, une augmentation de l'intensité de fluorescence sera alors le témoin d'une interaction spécifique de l'ARM aux intégrines $\alpha_v\beta_3$. Nous avons pu ainsi noter que pour les deux lignées cellulaires, l'ARM peut reconnaître et se lier aux cellules spécifiquement. Nous avons de plus eu confirmation que la formation du complexe ternaire répond à un équilibre sous forme de gaussienne. Pour les deux lignées cellulaires, la concentration optimale d'ARM à ajouter aux deux partenaires pour permettre la formation du complexe ternaire est de 1 μ M. Néanmoins, l'ARM se fixe de manière beaucoup plus efficace sur les cellules M21. Afin d'avoir un écart suffisamment important entre la lignée M21 et la lignée contrôle M21-L, nous avons décidé d'utiliser dans la suite des expériences une concentration en ARM de 100 nM.

Cette expérience, nous a permis de déterminer la quantité optimale de l'ARM comportant un motif cRGDfK comme TBM pour avoir la meilleure interaction avec la cellule ciblée. Néanmoins, cette concentration sera dépendante du type de TBM et donc de l'ARM, il sera donc nécessaire de répéter cette expérience pour chaque nouvel ARM testé. Nous pouvons désormais sélectionner le « meilleur » ARM parmi les 3 architectures choisies (1RGD-16Rha, 4RGD-4Rha et 4RGD-16Rha) en réalisant une expérience dans les conditions décrites précédemment, à savoir en fixant les cellules, puis en ajoutant séquentiellement 100 nM d'ARM, 50 μ g/mL d'anticorps anti-R4(Rha)_t pur et l'anticorps fluorescent secondaire dilué 500 fois (**Figure 52 et Figure 53**).

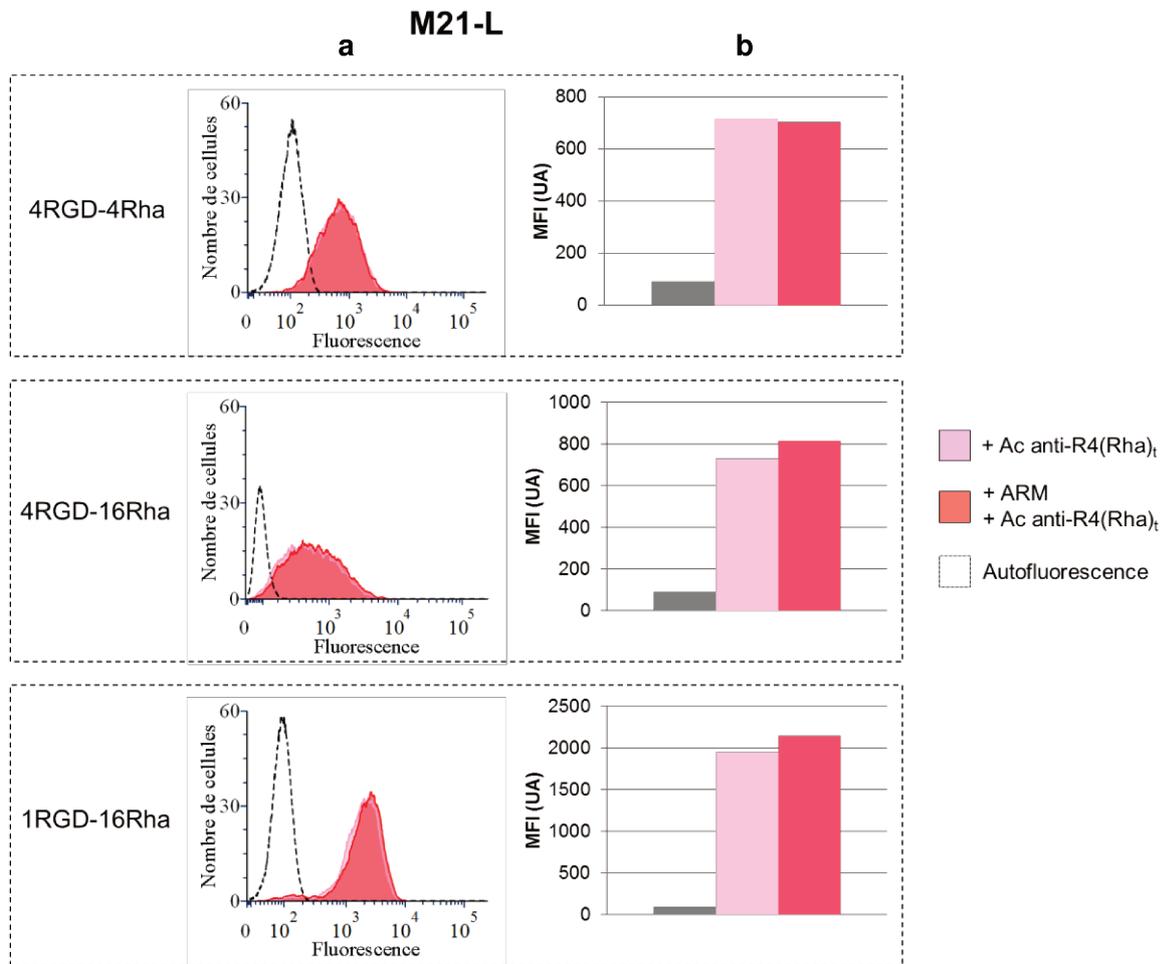


Figure 52 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21-L incubées avec les ARMs 4RGD-4Rha, 4RGD-16Rha et 1RGD-16Rha à 100 nM, un anticorps ciblant l'ABM-R4(Rha)_t et un anticorps secondaire couplé à une PE. **(a)** les analyses brutes de cytométrie en flux ; **(b)** les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).

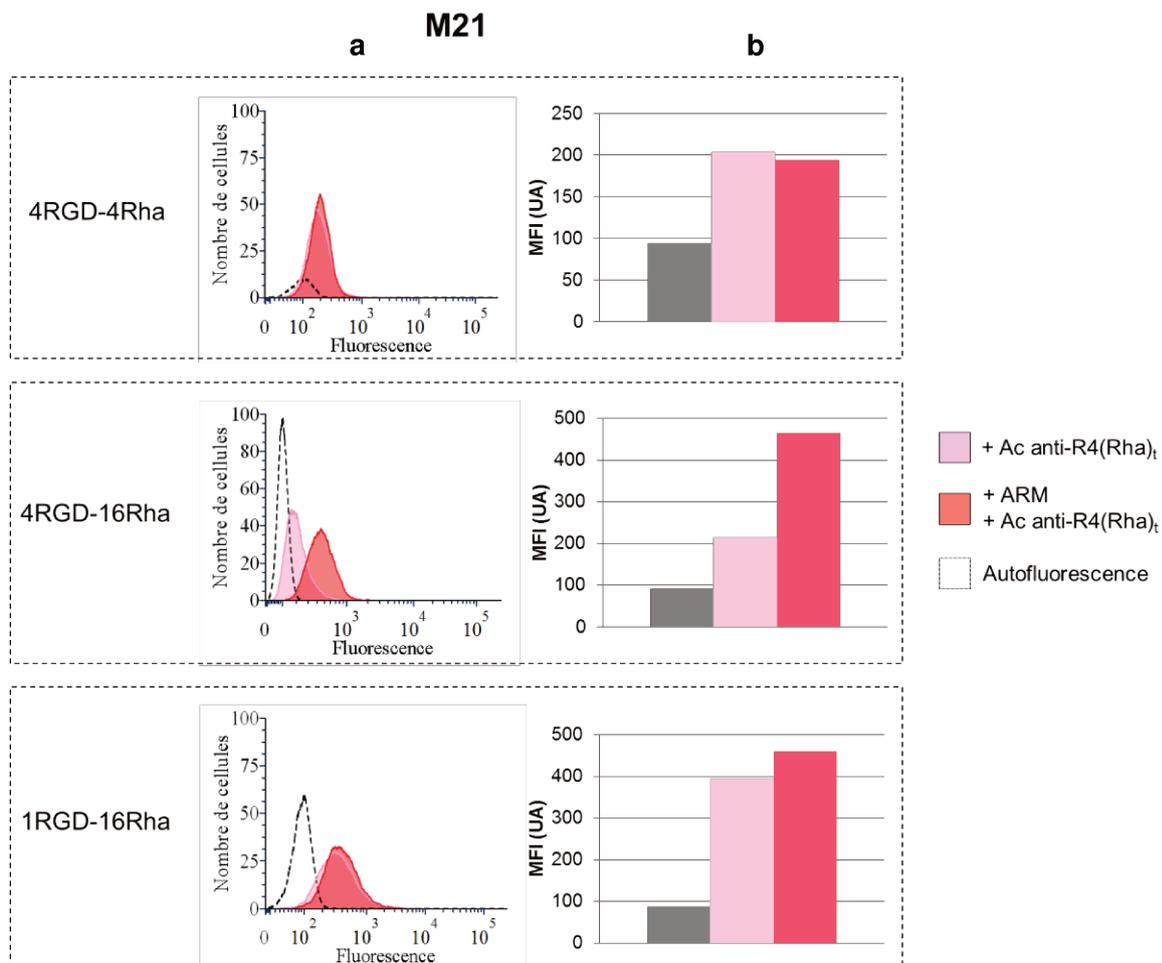


Figure 53 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21 incubées avec les ARMs 4RGD-4Rha, 4RGD-16Rha et 1RGD-16Rha à 100 nM, un anticorps ciblant l'ABM-R4(Rha)_t et un anticorps secondaire couplé à une PE. **(a)** les analyses brutes de cytométrie en flux ; **(b)** les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).

Cette expérience nous a permis de confirmer dans un premier temps que l'ARM 4RGD-16Rha induit une augmentation de l'intensité de fluorescence supérieure à celle obtenue par l'ajout uniquement des anticorps primaires et secondaires. Cela reflète donc la fixation spécifique de l'ARM aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ des cellules. De plus, elle a permis d'identifier clairement cette architecture comme étant la plus efficace parmi les 3 ARMs sélectionnés. En effet, nous avons pu constater qu'une présentation de seulement 4 unités de rhamnose au niveau de l'ABM n'était pas suffisante pour que l'anticorps ajouté reconnaisse l'ARM efficacement. En revanche, avec les deux molécules à ABM hexadécavalent, l'augmentation de l'intensité de fluorescence est clairement observable, ce qui confirme les résultats allant dans ce sens, observés par E. Laigre par microarray. Nous avons de plus confirmé que la fixation de l'ARM *via* une seule unité de cRGDfK est moins efficace qu'en utilisant une présentation tétravalente.

Ainsi, les résultats de ces deux expériences, nous ont permis de montrer que l'ARM 4RGD-16Rha est capable de se fixer de manière efficace et avec une bonne sélectivité aux cellules surexprimant les intégrines $\alpha_v\beta_3$. De plus, cet ARM doit être utilisé dans des conditions de concentration à 100 nM et incubé avec une suspension de 1,5 millions de cellules.

Nous avons ensuite décidé d'observer les cellules sous un microscope confocal à fluorescence afin d'étudier la localisation des ARM (**Figure 54**). Pour ce faire, nous avons prélevé quelques cellules en suspension utilisées pour l'analyse par cytométrie en flux. Toutefois, quelques paramètres expérimentaux ont dû être modifiés, tels que la concentration d'anticorps anti-R4(Rha)_t qui a été réduite. En effet, lorsque cet anticorps est ajouté à de fortes concentrations, il a tendance à former des clusters fluorescents rendant l'observation délicate. La concentration en anticorps secondaires fluorescents a elle été augmentée afin d'obtenir une image plus nette grâce à l'augmentation de l'intensité de fluorescence des cellules incubées avec ces derniers.

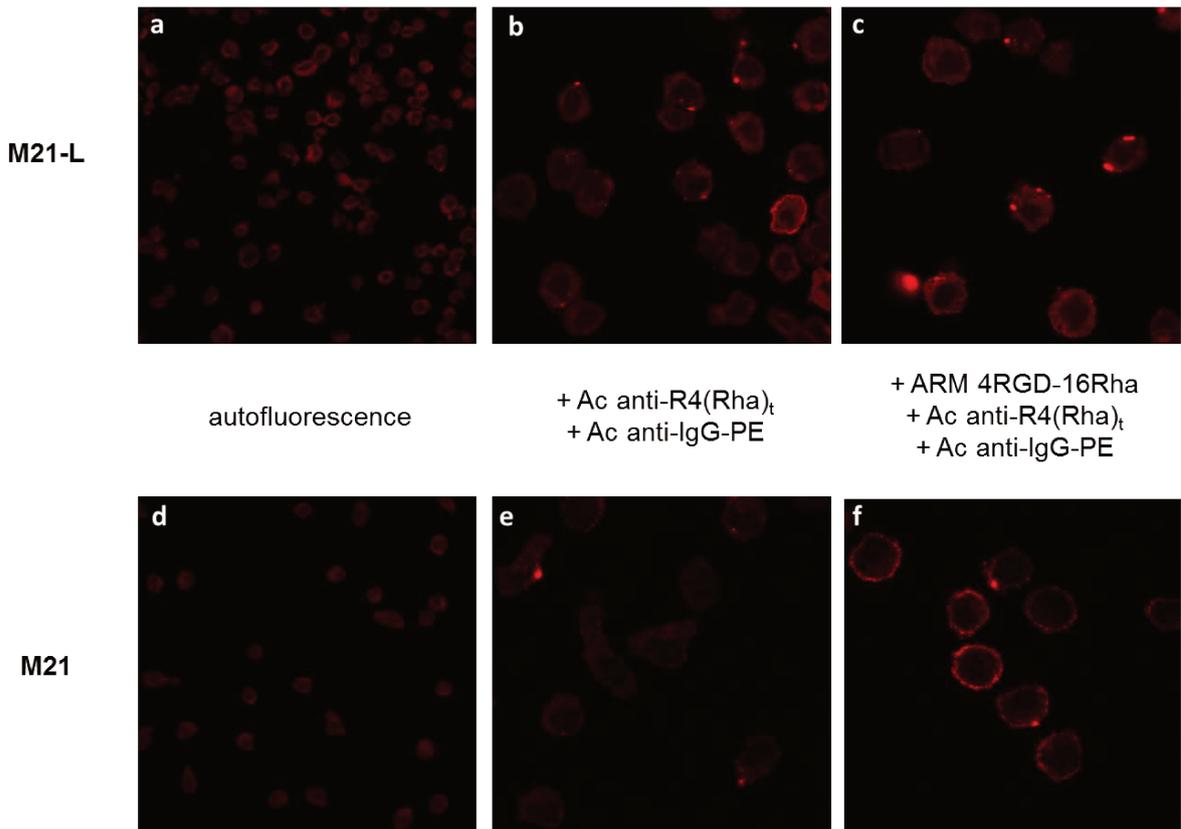


Figure 54 : Images de fluorescence des cellules M21-L (a, b et c) et M21 (d, e et f) observées au microscope confocal de fluorescence soit sans ajout de composés (a et d, autofluorescence), soit avec les anticorps permettant la révélation (b et e), soit avec tous les partenaires (ARM 4RGD-16Rha, Ac anti-R4Rha et Ac II^{aire}) (c et f).

Les images de microscopie apportent plusieurs informations. Premièrement, les cellules M21-L présentent une forte autofluorescence lorsqu'elles sont excitées à la longueur d'onde d'analyse de la phycoérythrine ($\lambda_{ex.} = 552 \text{ nm}$), ce qui ne facilite pas l'observation des cellules en présence de l'anticorps secondaire fluorescent. Il semble néanmoins que les cellules incubées avec ou sans ARM aient la même intensité de fluorescence, confirmant les résultats précédents, à savoir qu'il n'y a pas d'interaction de l'ARM avec les cellules. Les cellules M21 quant à elles sont beaucoup moins autofluorescentes et nous pouvons observer que très peu d'anticorps anti-R4(Rha)_t se fixe de manière non-spécifique. De plus, avec ces cellules, la fixation de l'ARM est clairement observée puisque nous pouvons voir une forte différence de fluorescence selon que les cellules sont incubées avec ou sans ARM. L'observation par microscopie nous a aussi permis d'observer que l'ARM se localise au niveau de la membrane plasmique des cellules M21, ceci permettant au module ABM d'être disponible du côté extracellulaire pour recruter les anticorps anti- α -L-Rha du sérum.

2) ARM avec le TBM-R4(LT)_t

De la même manière que pour les expériences précédentes, nous avons choisi d'évaluer la capacité de l'ARM 4LT-16Rha à se lier sélectivement à une lignée cellulaire choisie. Nous pourrions observer, de cette façon, si en changeant la nature du module de reconnaissance de la cellule, le recrutement des anticorps est amélioré.

Nous avons vu précédemment dans les expériences de reconnaissance cellulaire du TBM-R4(LT)_t que ce dernier était capable de se lier aux différentes lignées cellulaires utilisées, cependant, dans des proportions très différentes pour certaines d'entre elles. Cela nous a ainsi amené à sélectionner deux lignées cellulaires avec lesquelles le peptide interagit de manière différente : les cellules MCF 10A surexprimant la protéine cible EGFR, et les cellules MCF7 qui expriment aussi EGFR mais de façon beaucoup moins importante et pour lesquelles le peptide LARLLT tétravalent semble beaucoup moins interagir. Ces dernières joueront donc le rôle de cellules contrôle.

Les expériences, telles que décrites précédemment, ont été réalisées à partir d'une suspension de 1,5 millions de cellules incubée avec différentes concentrations d'ARM 4LT-16Rha (10, 1, 0,1 et 0,01 μ M). Le but est, là encore, de déterminer la concentration optimale en ARM pour former le complexe ternaire cellule/ARM/anticorps. La liaison de l'ARM avec la cellule est ensuite révélée par ajout des anticorps purs anti-R4(Rha)_t, puis des anticorps secondaires anti-IgG de lapin couplés à une phycoérythrine. Les cellules sont ensuite présentées au cytomètre en flux pour être analysées (**Figure 55**).

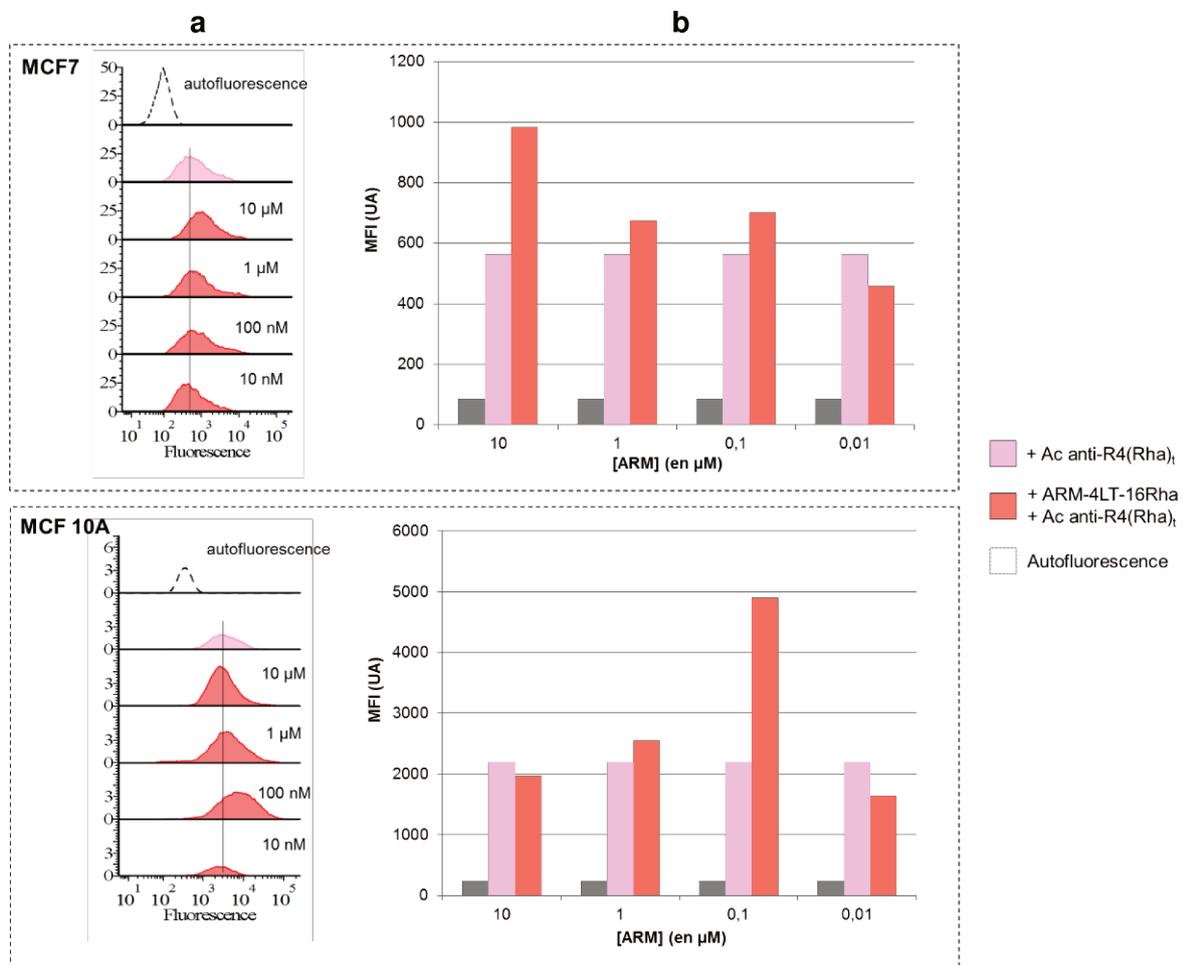


Figure 55 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules MCF7 et MCF 10A incubées avec l'ARM 4LT-16Rha à différentes concentrations, un anticorps ciblant l'ABM-R4(Rha)_t et un anticorps secondaire couplé à une PE. **(a)** les analyses brutes de cytométrie en flux ; **(b)** les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).

Nous avons pu observer la formation d'un complexe ternaire avec l'ARM présentant 4 peptides LARLLT sur les deux lignées cellulaires. Ce résultat n'est pas surprenant étant donné que nous avons démontré précédemment que le peptide était capable d'interagir avec les deux lignées, mais de manière plus importante avec MCF 10A. En revanche, nous avons pu observer que les deux complexes ne se forment pas à la même concentration d'ARM ajoutés. Or, puisque MCF 10A présentent un taux d'EGFR plus élevé que MCF7, il aurait semblé logique d'utiliser une plus grande quantité d'ARM pour former de façon efficace le complexe ternaire. Le contraire a été observé puisque la concentration optimale d'incubation de l'ARM 4LT-16Rha avec les cellules MCF7 et MCF 10A sont respectivement de 10 μ M et 100 nM. Malgré ce résultat inattendu, cela signifie qu'une quantité moindre d'ARM sera nécessaire pour former le complexe ternaire avec les cellules MCF 10A, ce qui reste intéressant. De plus, à 100 nM, nous avons constaté que le complexe ternaire ne se formait que très peu avec les cellules MCF7, elles pourraient ainsi être utilisées comme lignée contrôle.

3) ARM avec le TBM-R4(AZ)_t

Un troisième ARM, présentant cette fois-ci un motif acétazolamide comme TBM, a été testé. Ce nouvel ARM a été incubé avec les cellules U-87 MG, cellules sélectionnées car reconnues efficacement par le TBM-R4(AZ)_t lors de nos expériences d'interaction. Une nouvelle fois, pour révéler la fixation de cet ARM, des anticorps purifiés ciblant l'ABM-R4(Rha)_t, puis un anticorps secondaire anti-IgG couplé à une phycoérythrine ont été utilisés. L'intensité de fluorescence des cellules est analysée par cytométrie en flux (**Figure 56**). De manière à évaluer la quantité en ARM à utiliser pour avoir une formation optimale du complexe ternaire, plusieurs concentrations d'ARM ont été à nouveau testées (10, 1, 0,1 et 0,01 μM).

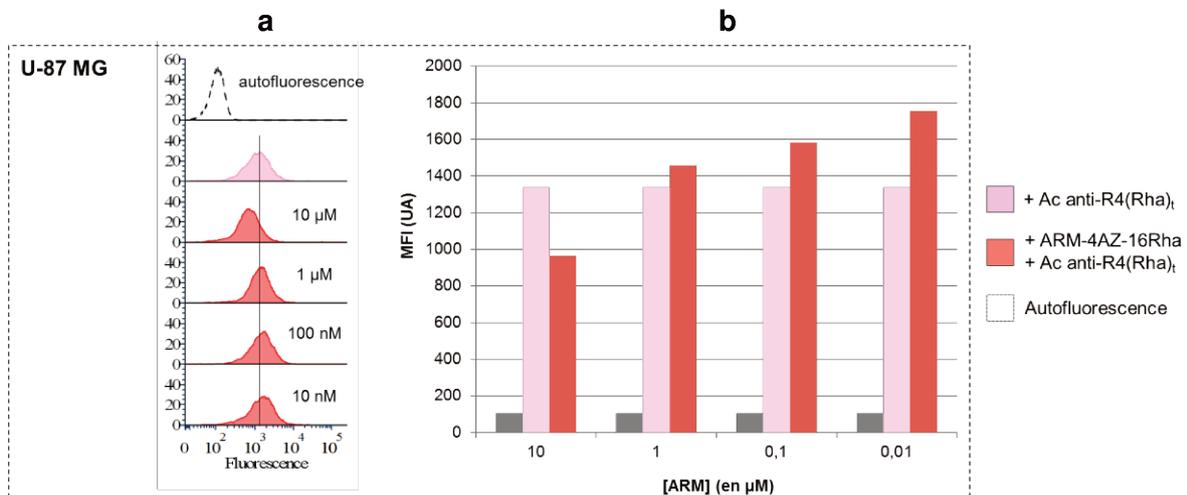


Figure 56 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules U-87 MG incubées avec l'ARM 4AZ-16Rha à différentes concentrations, un anticorps ciblant l'ABM-R4(Rha)_t et un anticorps secondaire couplé à une PE. (a) les analyses brutes de cytométrie en flux ; (b) les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).

L'expérience réalisée a permis de montrer que le TBM-R4(AZ)_t permet à l'ARM de se lier efficacement aux cellules et que, simultanément, suffisamment de modules ABM sont présentés permettant la reconnaissance de la molécule par des anticorps. De plus, comme l'indique l'histogramme d'intensité de fluorescence (**Figure 56b**), la quantité optimale d'ARM à utiliser est visiblement de 10 nM. Cet ARM apparait donc comme étant un candidat potentiel pour les études à suivre.

L'utilisation des molécules LARLLT et AZ comme TBM reste cependant pour l'instant prématurée en raison de l'absence de cellules contrôles disponibles pour prouver leur sélectivité.

La présentation tétravalente du peptide cRGDfK semble donc participer à la meilleure fixation de l'ARM à des cellules cancéreuses et non à des cellules contrôles. Nous avons ainsi montré la formation d'un complexe ternaire avec des anticorps commerciaux, la suite de ce travail à reproduire ces expériences mais en présence de sérum humain.

D) Recrutement des anticorps endogènes au niveau de la cellule cancéreuses par l'ARM

A partir des conditions expérimentales déterminées précédemment, nous avons ensuite évalué l'aptitude de l'ARM, après s'être fixé à la cellule, à recruter les anticorps endogènes présents dans la circulation sanguine du patient. La formation de ce complexe ternaire entre cellule, ARM et anticorps endogènes constitue une étape cruciale pour initier la réponse immunitaire.

Dans un premier temps, nous avons décidé de doser la quantité d'anticorps IgG et IgM dans le sérum humain se liant au rhamnose en réalisant un test d'affinité direct par révélation fluorescente sur microplaque 96 puits. Deux paramètres ont été étudiés : la concentration d'anticorps secondaire fluorescent (anti-IgG ou anti-IgM) et la concentration de sérum ajouté. Dans les deux expériences menées, les puits de la microplaque ont été recouverts d'un polymère de polyacrylamide fonctionnalisé avec du α -L-Rha (Lectiniy Holding Inc., Moscou). Ensuite ont été rajoutés séquentiellement, le sérum avec les anticorps anti- α -Rha puis les anticorps secondaires permettant la révélation par fluorescence (**Figure 57**).

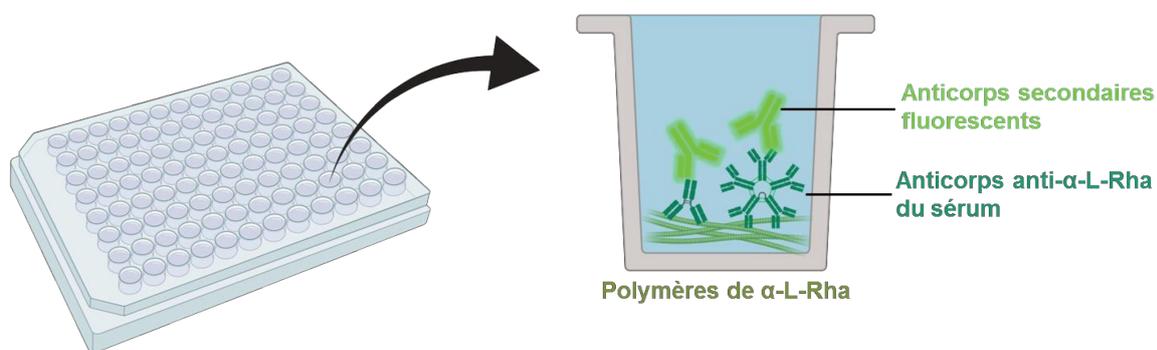


Figure 57 : Principe de dosage des anticorps IgG et IgM anti- α -L-Rha présents dans le sérum humain réalisé en format microplaque 96 puits.

La première expérience d'étalonnage réalisée a consisté à ajouter une même quantité de sérum (20% dans du tampon PBS) dans chaque puits puis à ajouter des concentrations croissantes d'anticorps secondaires fluorescents (dilutions de 1/25600 à 1/100) (**Figure 58**).

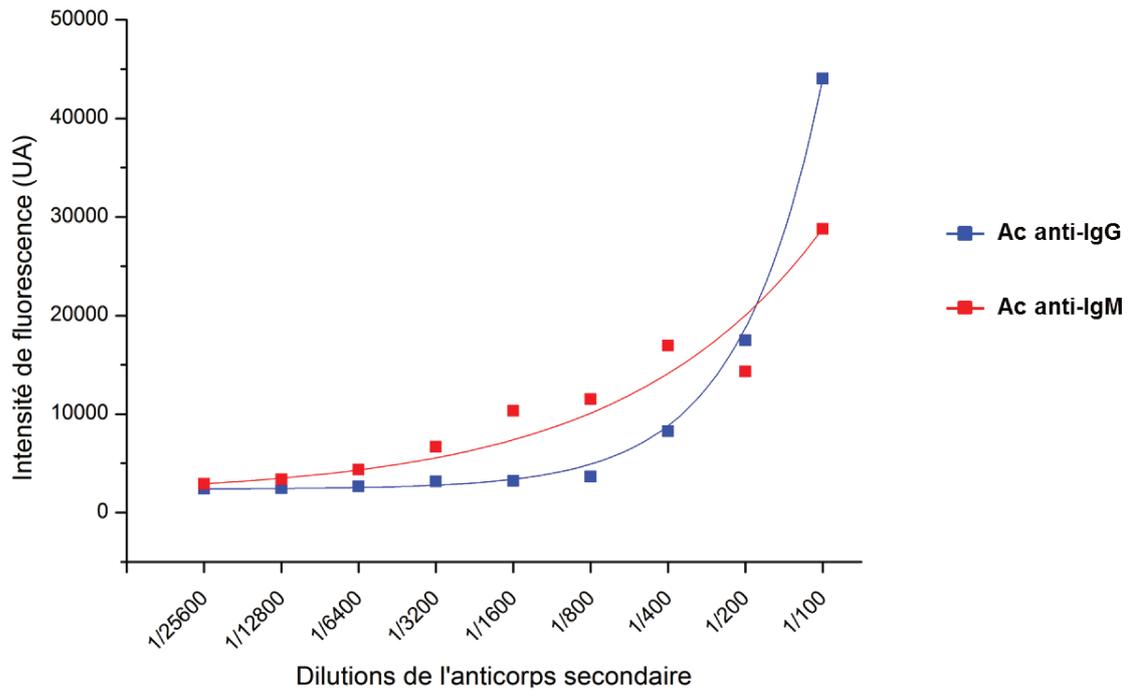


Figure 58 : Graphique représentant l'intensité de fluorescence analysée pour chaque puits contenant le polymère d' α -L-Rha, une concentration en sérum humain fixée (20%) et différentes concentrations d'anticorps secondaires anti-IgG ou anti-IgM humains fluorescents.

Comme l'indique la courbe de fluorescence en fonction de la dilution des anticorps secondaires, la fixation des IgG anti- α -L-Rha présents dans le sérum humain peut être mesurable pour un facteur de dilution inférieur à 400. Néanmoins, pour des concentrations en anticorps secondaires élevées, la fluorescence mesurée peut être due en partie à une fixation non-spécifique. La réponse de fluorescence, après ajout des anticorps secondaires anti-IgM humain, peut être observée pour des facteurs de dilution inférieurs à 3200, sans doute grâce à la présentation multivalente des immunoglobulines permettant une reconnaissance plus efficace. Ainsi, utiliser une dilution de 1/400 ou de 1/200 en anticorps anti-IgG et anti-IgM semble être adapté pour obtenir un signal de fluorescence et doser les anticorps du sérum humain. Pour les expériences suivantes, une dilution au 1/400^{ème} des anticorps secondaires sera utilisée par soucis d'économie des anticorps.

La concentration d'anticorps secondaires ayant été fixée lors de cette première expérience, nous avons ensuite déterminé la quantité de sérum humain à ajouter aux molécules de rhamnose immobilisées (**Figure 59**). Pour cela, une gamme de concentration du sérum humain (commercial, Sigma-Aldrich®, lot n° SLBS6544) a été réalisée et testée (quantité de 1,5 % à 100 %, dilutions faites dans du tampon PBS).

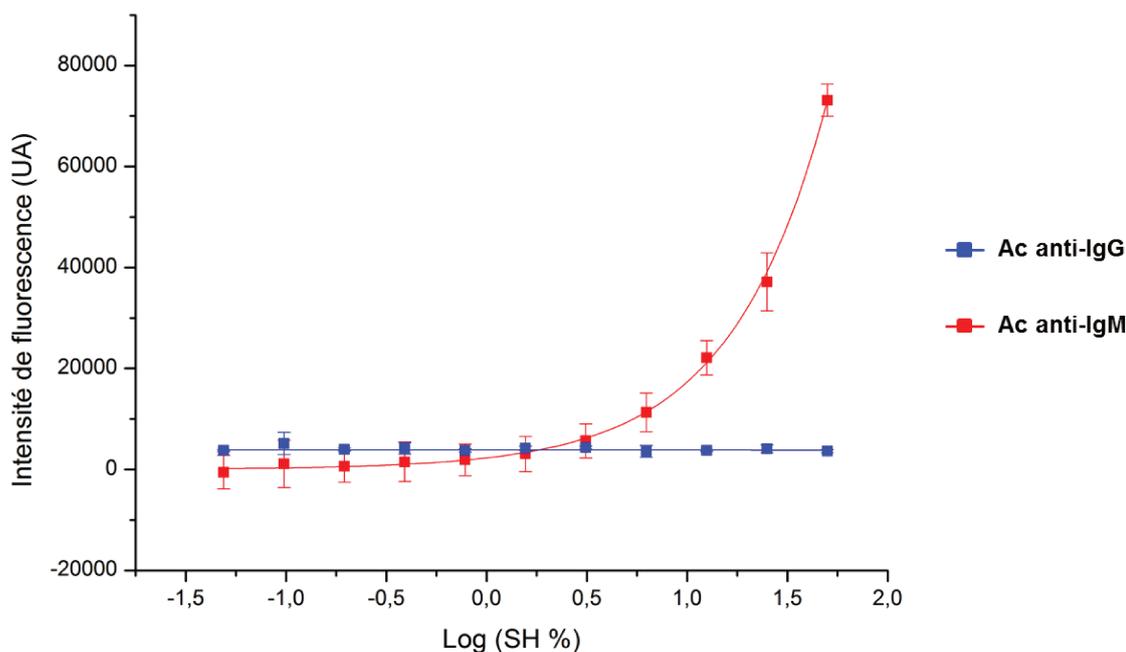


Figure 59 : Graphique représentant l'intensité de fluorescence analysée pour chaque puits contenant le polymère d' α -L-Rha avec différentes concentrations de sérum humain et avec les anticorps secondaires anti-IgG ou anti-IgM humains fluorescents (dilution 400 fois).

L'expérience nous a montré que les IgG interagissent peu avec le rhamnose immobilisé dans les puits. Les anticorps IgM du sérum humain reconnaissent en revanche les rhamnoses à partir d'une dilution au 1/5^{ème} (20 %, 50 % et 100 %). Ce résultat est en accord avec ce qui avait pu être observé par microarray dans les travaux de thèse d'E. Laigre, mais aussi lors des dosages des anticorps endogènes réalisés par l'équipe de Laura Kiessling.¹³⁷ Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que cette différence de reconnaissance est due à la multivalence des anticorps quand ils sont sous forme IgM. Nous pourrions quoiqu'il en soit avoir un signal de fluorescence bien supérieur lorsque la détection de la liaison rhamnose/anticorps sera faite par des anticorps secondaire anti-IgM.

Afin de déterminer si l'ARM sélectionné dans la partie précédente est capable de recruter les anticorps endogènes du système sanguin, nous avons mis au point une expérience similaire à celle utilisée pour analyser la liaison de l'ARM aux cellules. Les cellules M21-L et M21 sont détachées, comptées (1,5 millions de cellules par condition) puis fixées. Il s'en suit une incubation avec l'ARM 4RGD-16Rha (100 nM) pendant 1h à température ambiante. Après lavage des cellules, celles-ci sont incubées avec le sérum humain utilisé précédemment. Afin de confirmer les résultats obtenus lors de la dernière expérience de fluorescence sur microplaque, nous avons décidé, pour le premier essai, d'utiliser trois quantités différentes de sérum dilués dans du milieu de culture : 20%, 50% et non-dilué (100%). Le complexe ternaire

alors formé est révélé par un anticorps anti-IgM humain couplé à un AlexaFluor™ 488 dilué au 1/400^{ème} (dilution déterminée précédemment et permettant d'avoir des valeurs d'intensité de fluorescence mesurables) (**Figure 60 et Figure 61**).

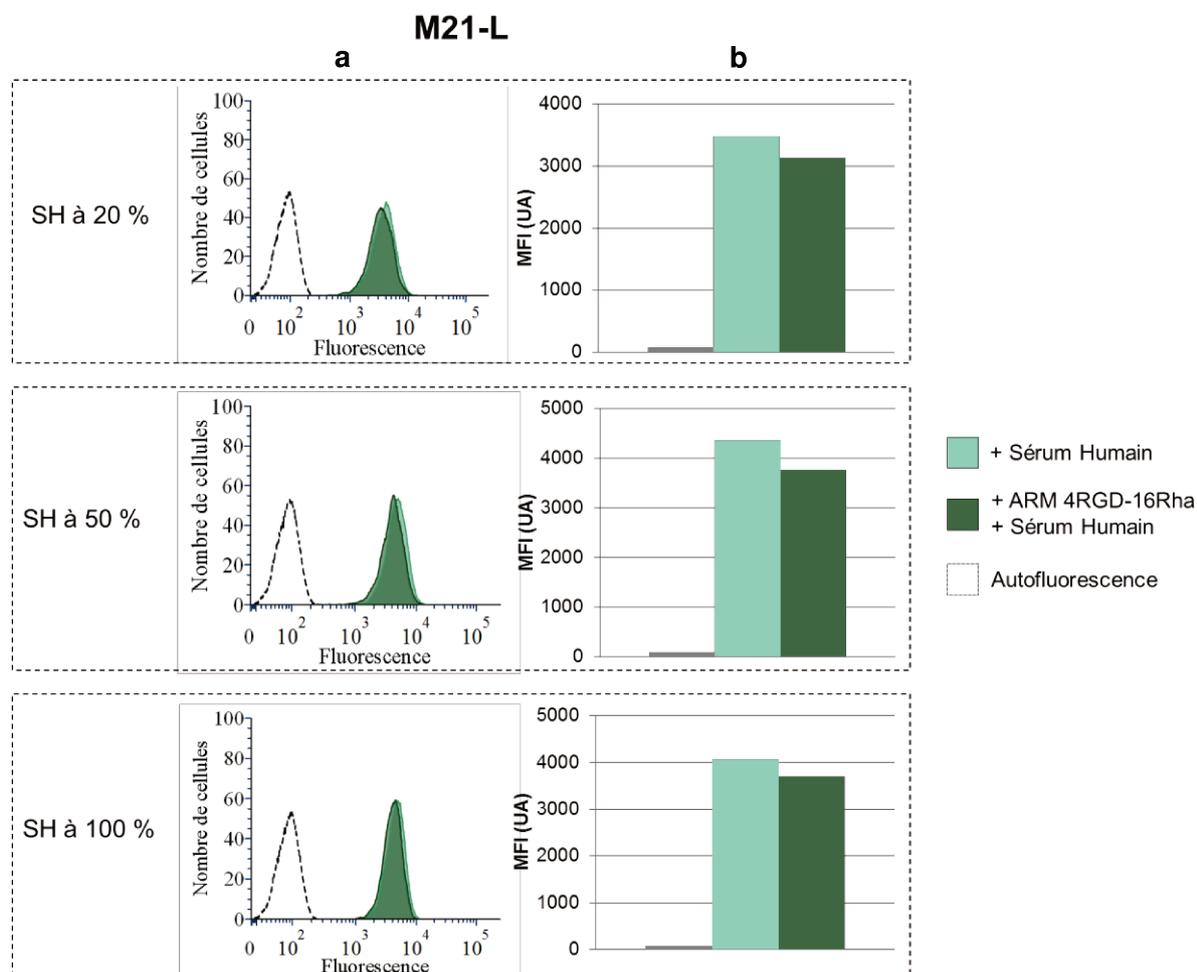


Figure 60 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21-L incubées avec l'ARM 4RGD-16Rha à 100 nM, du sérum humain à différentes concentrations et l'anticorps secondaire anti-IgM humain couplé à un AlexaFluor™ 488. **(a)** les analyses brutes de cytométrie en flux ; **(b)** les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).

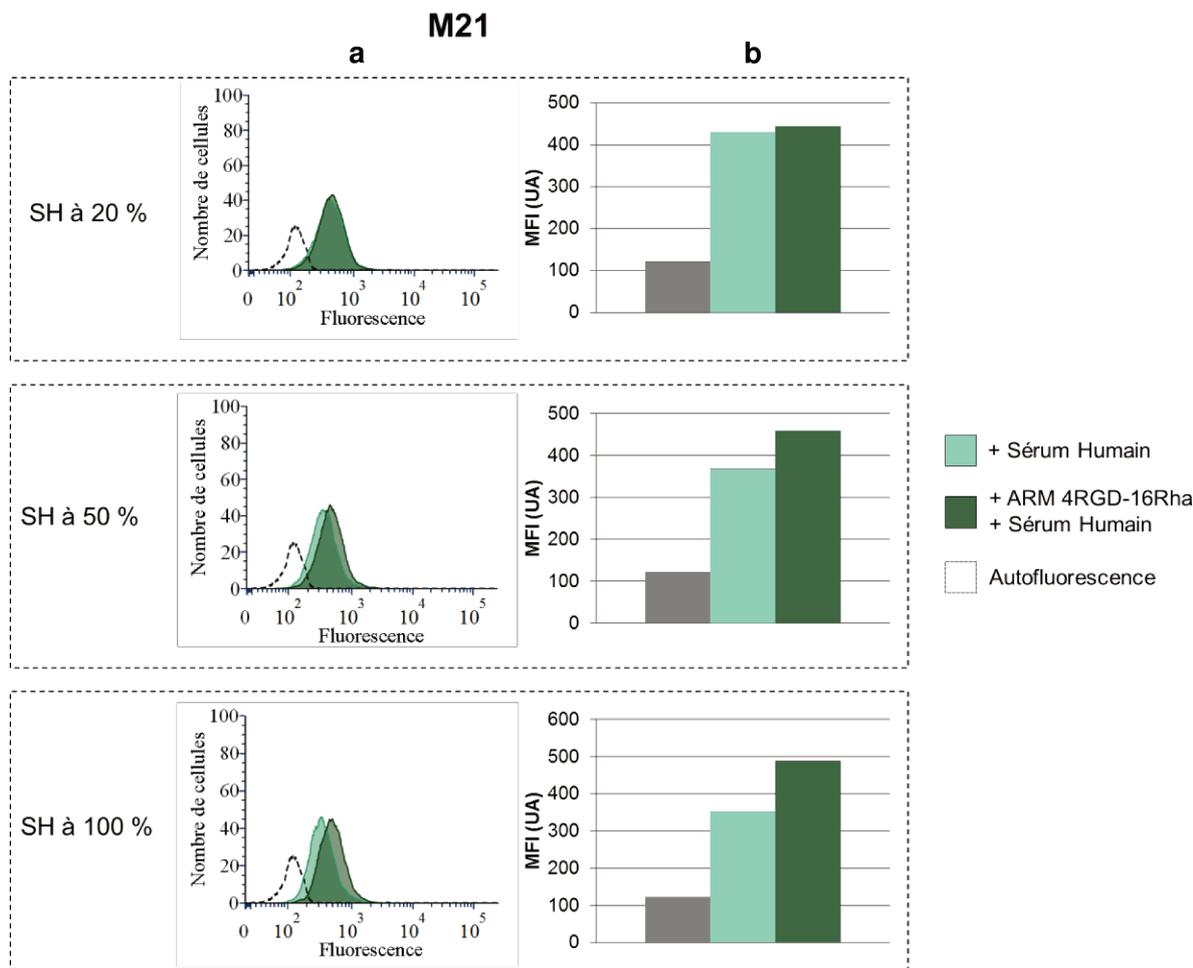
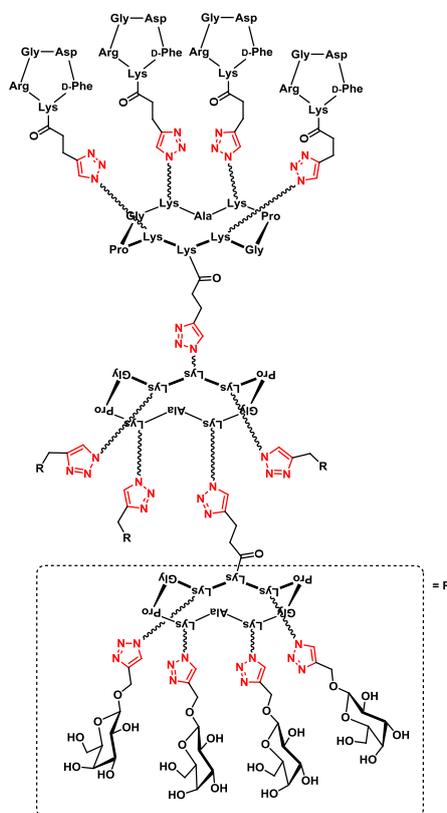


Figure 61 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21 incubées avec l'ARM 4RGD-16Rha à 100 nM, du sérum humain à différentes concentrations et un anticorps secondaire anti-IgM humain couplé à un AlexaFluor™ 488. (a) les analyses brutes de cytométrie en flux ; (b) les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).

Ces analyses de fluorescence nous ont permis de montrer premièrement que l'ARM 4RGD-16Rha se lie uniquement aux cellules M21 et non aux cellules contrôles. Cela prouve une nouvelle fois que l'ARM est sélectif pour M21. Un signal non-spécifique important peut toutefois être observé lorsque le sérum humain est ajouté aux deux lignées cellulaires, notamment dans le cas des cellules M21-L où énormément d'IgM semblent se fixer à la surface extracellulaire. Néanmoins, nous pouvons observer une nette augmentation de l'intensité de fluorescence des cellules M21 lorsque l'ARM est ajouté, signifiant la formation du complexe ternaire entre ces cellules tumorales, l'ARM et les anticorps endogènes anti- α -L-Rha. De plus, nous pouvons noter que plus le sérum humain ajouté aux cellules est concentré, plus nous pouvons observer cette augmentation d'intensité de fluorescence. Cela est en accord avec les résultats observés lors des tests de fluorescence sur microplaque. Dans la suite des expériences d'étude de formation du complexe ternaire par cytométrie en flux, et dans un souci d'économie de sérum, nous choisirons d'utiliser les conditions expérimentales

suivantes : incubation des cellules M21 (1,5 millions par condition) avec 100 nM d'ARM et du sérum humain à 50 M.

Afin de confirmer que le complexe ternaire est formé grâce aux rhamnoses, et non au reste de l'architecture (plateformes RAFT), nous avons synthétisé un ARM contrôle **51** composé d'un autre ABM, à sucres non-antigéniques, des β -D-galactoses (β -Gal), présentés de façon hexadécavalente et liés covalemment au TBM-R4(RGD)_t (**Schéma 24**).



51 = 4RGD-16 β Gal

Schéma 24 : Molécule ARM 4RGD-16 β Gal utilisée lors de l'expérience contrôle.

Conformément aux conditions définies précédemment, l'analyse de fluorescence par cytométrie en flux a été réalisée sur les cellules M21 et M21-L préalablement fixées, en ajoutant ou non les deux ARMs comportant le même TBM (cRGDfK tétravalent) mais différents ABMs (α -L-Rha et β -Gal hexadécavalents) (**Figure 62 et Figure 63**).

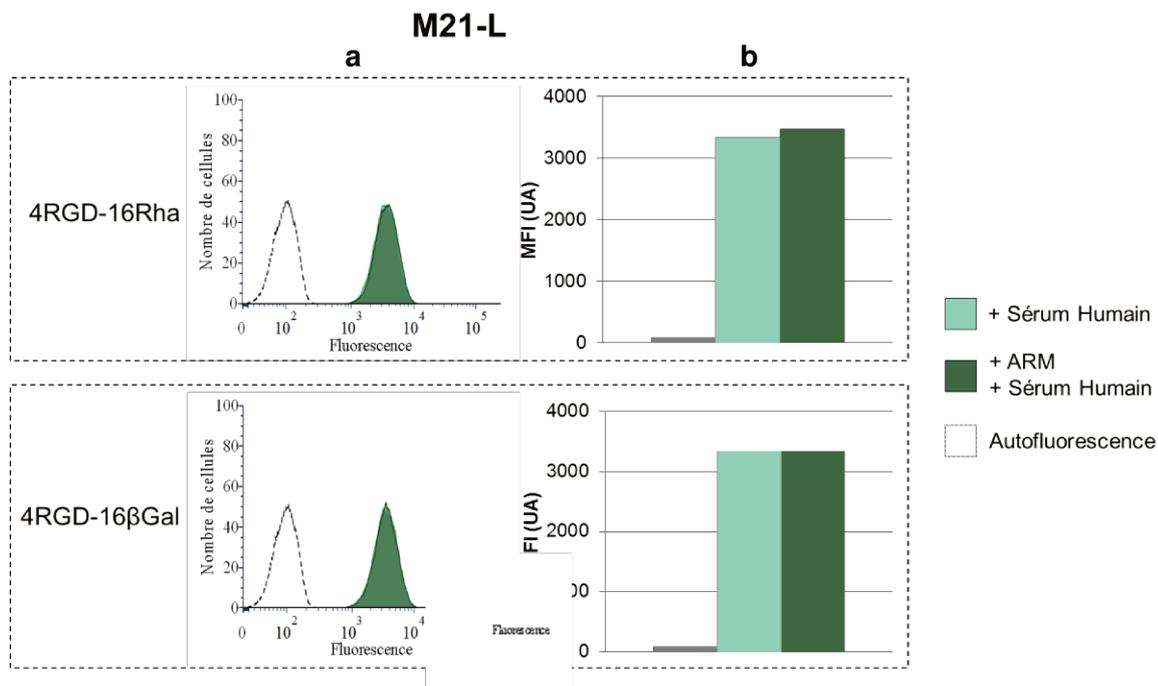


Figure 62 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21-L incubées avec les ARM 4RGD-16Rha et 4RGD-16βGal à 100 nM, 50 % de sérum humain et un anticorps secondaire couplé à un AlexaFluor™ 488 dilué au 1/400^{ème}. **(a)** les analyses brutes de cytométrie en flux ; **(b)** les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).

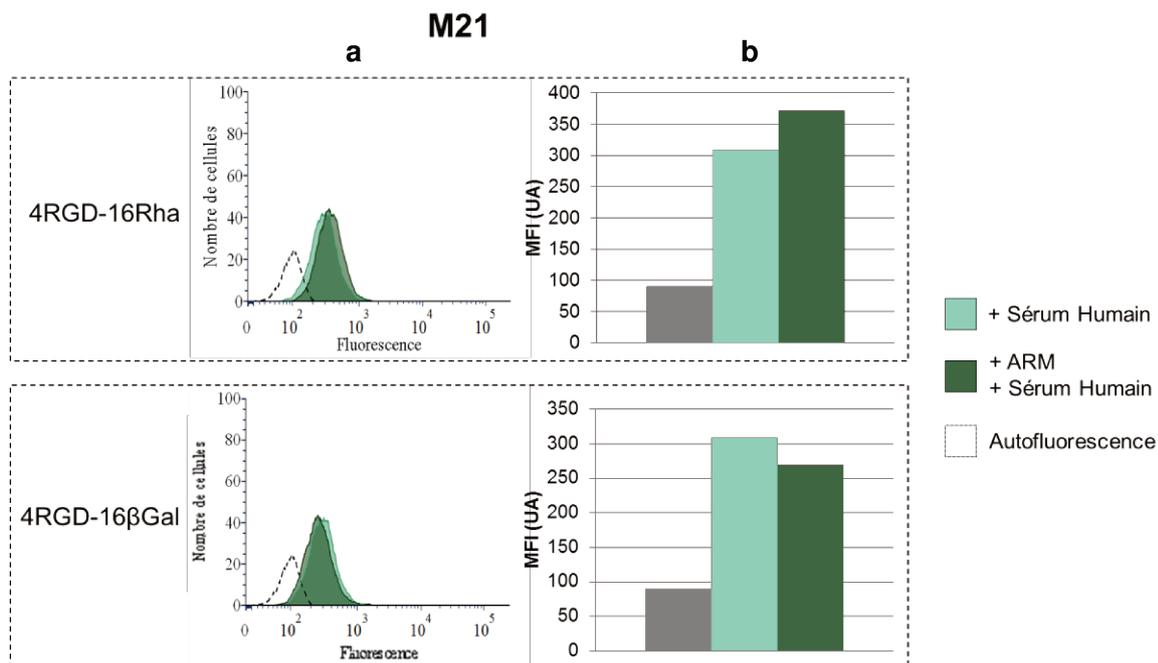


Figure 63 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21 incubées avec les ARM 4RGD-16Rha et 4RGD-16βGal à 100 nM, 50 % de sérum humain et un anticorps secondaire couplé à un AlexaFluor™ 488 dilué au 1/400^{ème}. **(a)** les analyses brutes de cytométrie en flux ; **(b)** les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).

Premièrement, l'augmentation de la fluorescence cellulaire observée lorsque l'ARM 4RGD-16Rha est ajouté nous permet de confirmer la formation d'un complexe ternaire entre les cellules M21, l'ARM et les anticorps endogène. Au contraire, aucune augmentation de

fluorescence n'a pu être observée en présence de l'ARM contrôle présentant 16 motifs β -Gal. Ce résultat montre bien que seuls les sucres α -Rha du module ABM sont responsables de la liaison aux anticorps, et non les plateformes peptidiques et que par conséquent les anticorps sont très sélectifs.

Afin de compléter cette étude, nous avons voulu tester d'autres sucres, ligands potentiels d'anticorps endogènes. Pour cela, deux nouveaux ARMs ont été synthétisés, toujours avec le même TBM mais en utilisant de nouveaux ABMs hexadécavalents : le sucre isoglobotriose (iGb3) et l'acide *N*-glycolylneuraminique (Neu5GC) (**Schéma 25**). En effet, les anticorps anti-iGb3 et anti-Neu5GC sont connus pour être présents à fortes doses dans la circulation sanguine.^{137,140}

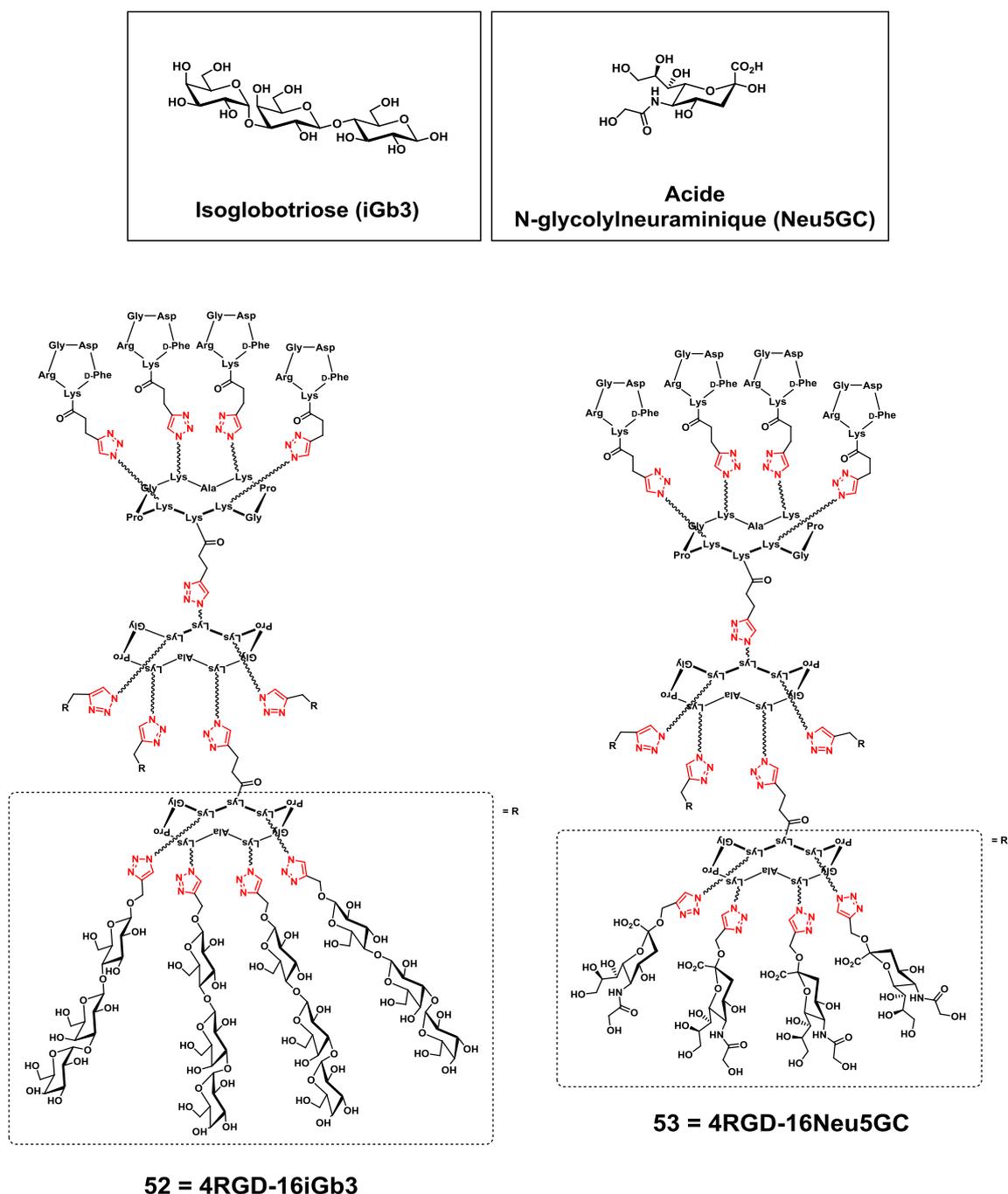


Schéma 25 : Deux nouveaux conjugués ARMs 4RGD-16iGb3 et 4RGD-16Neu5GC.

La liaison et la capacité de recrutement des anticorps du sérum humain des deux nouveaux ARMs candidats **52** et **53** ont été analysées par cytométrie en flux, dans les mêmes conditions que pour l'ARM candidat 4RGD-16Rha (**Figure 64** et **Figure 65**).

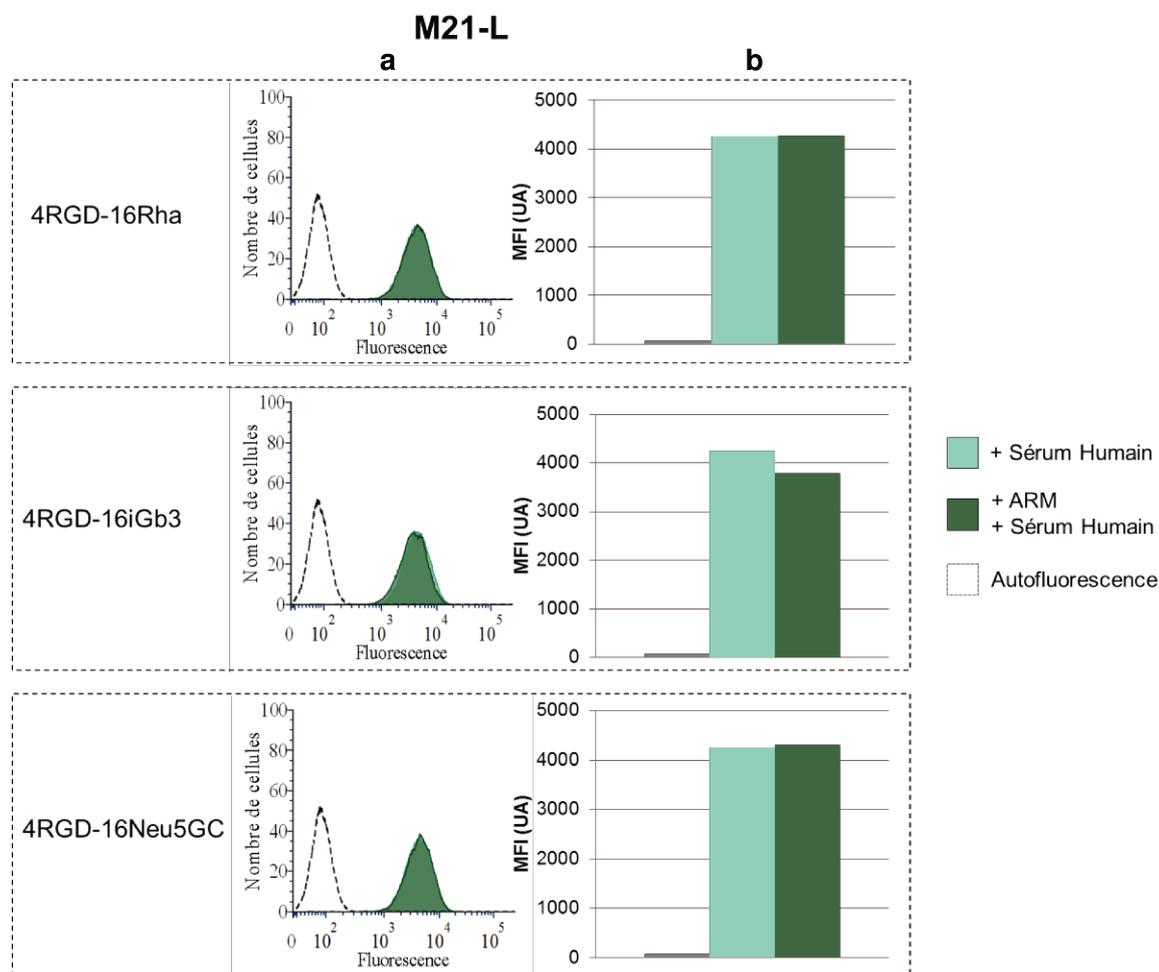


Figure 64 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21-L incubées avec les ARMs 4RGD-16Rha, 4RGD-16iGb3 et 4RGD-16Neu5GC à 100 nM, 50 % de sérum humain et un anticorps secondaire couplé à un AlexaFluor™ 488 anti-IgM humain dilué au 1/400^{ème}. (a) les analyses brutes de cytométrie en flux ; (b) les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).

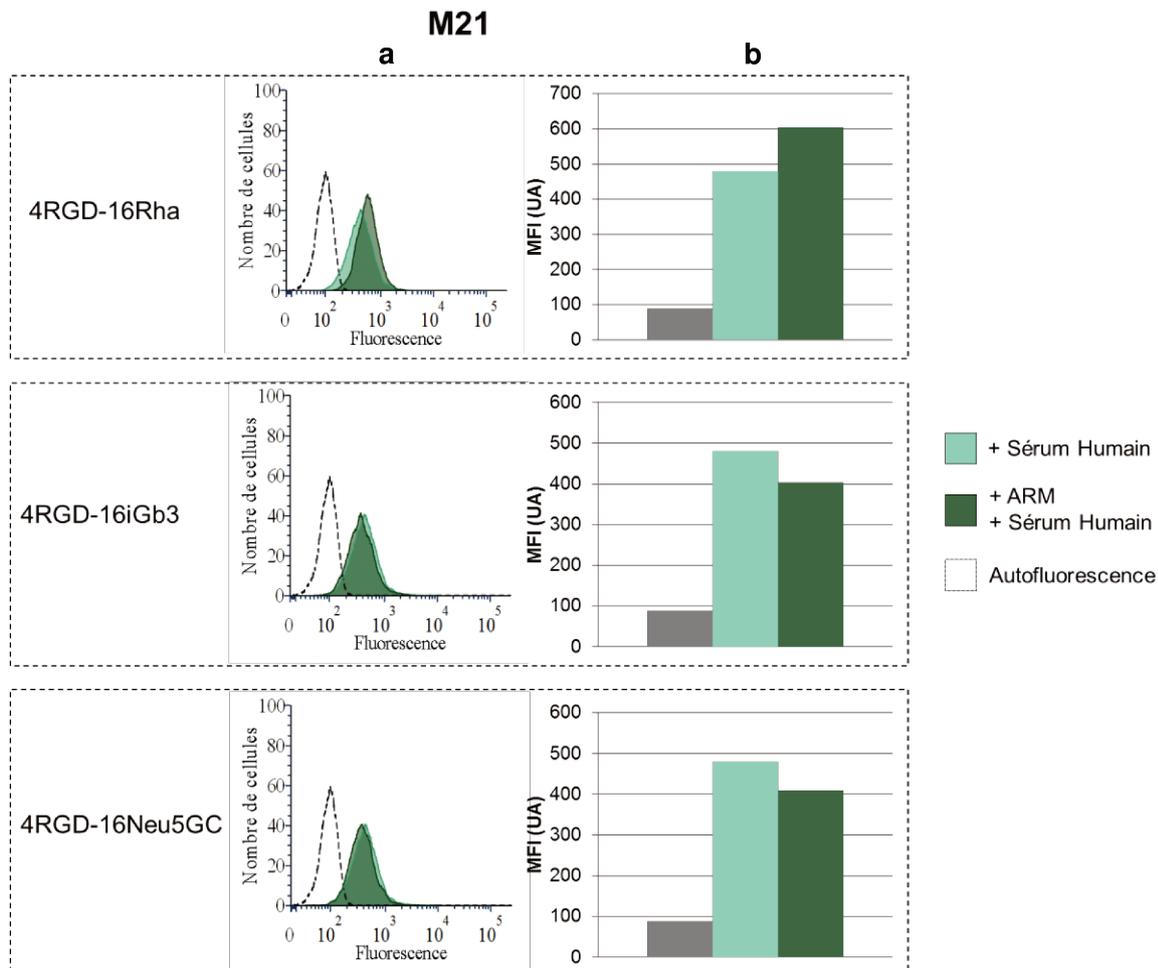


Figure 65 : Histogrammes de fluorescence analysée par cytométrie en flux des cellules M21 incubées avec les ARMs 4RGD-16Rha, 4RGD-16iGb3 et 4RGD-16Neu5GC à 100 nM, 50 % de sérum humain et un anticorps secondaire couplé à un AlexaFluor™ 488 anti-IgM humain dilué au 1/400^{ème}. (a) les analyses brutes de cytométrie en flux ; (b) les valeurs de moyenne de fluorescence (MFI).

A nouveau, nous avons pu constater que les cellules M21-L contrôles étaient toujours reconnues par de nombreux anticorps IgM présents dans le sérum mais par contre, par aucun des ARMs testés. Concernant les cellules M21, il apparaît que seul l'ARM présentant 16 unités rhamnoses est capable de se lier aux cellules d'une part et aux anticorps anti- α -Rha d'autre part. La présentation des motifs iGb3 ou Neu5GC hexadécavalents ne permet pas le recrutement des anticorps IgM du sérum testé. Nous avons donc une nouvelle fois pu confirmer que l'ARM présentant le peptide cRGDfK tétravalent du côté TBM et un ABM constitué de 16 α -L-Rha est la seule architecture de molécule bimodale parmi celles testées permettant à la fois le ciblage des cellules tumorales et le recrutement d'anticorps endogènes.

Pour confirmer ce résultat, nous avons décidé d'observer les cellules M21 et M21-L incubées avec les différents partenaires par microscopie confocale à fluorescence (**Figure 66**), notamment afin d'étudier la localisation du complexe ARM/anticorps endogène.

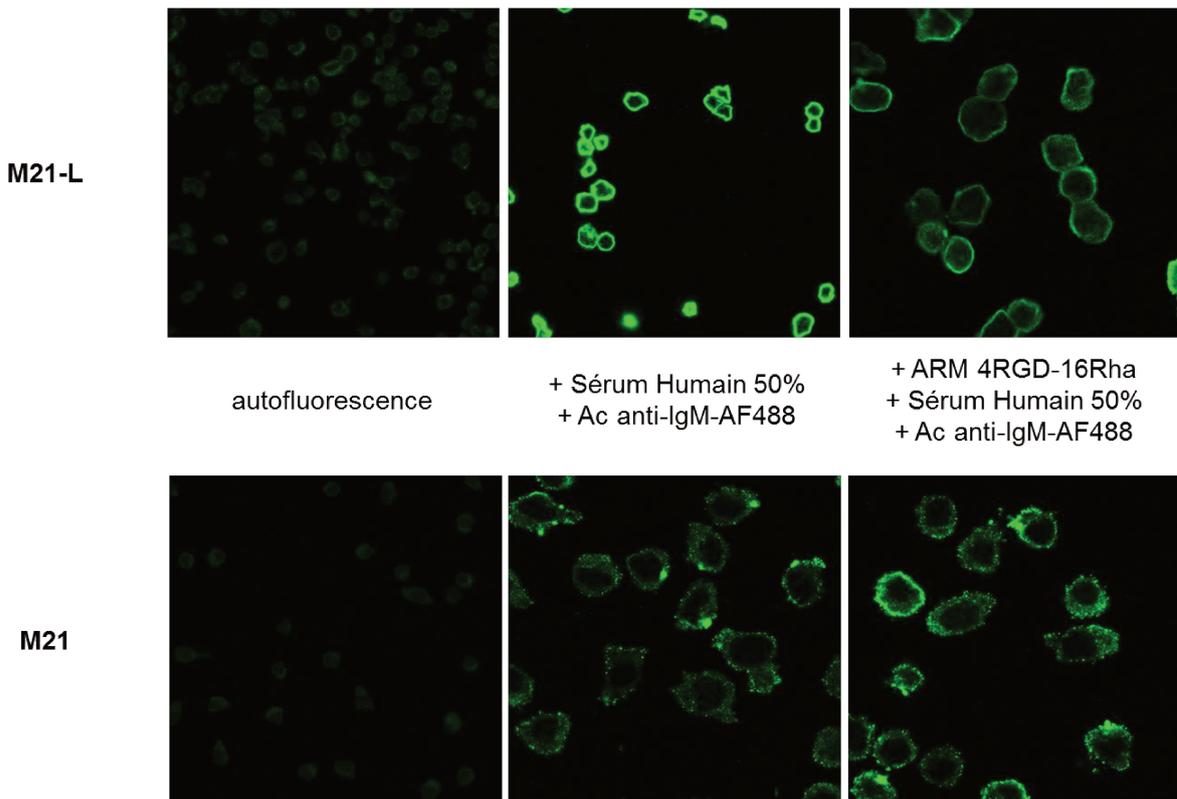


Figure 66 : Images de fluorescence des cellules M21-L et M21 observées au microscope confocal de fluorescence soit sans ajout de composés (autofluorescence), soit avec le sérum humain et les anticorps permettant la révélation (contrôle), soit avec tous les partenaires (ARM 4RGD-16Rha, sérum humain et anticorps secondaire).

Des anneaux de fluorescence très intense se situant au niveau de la membrane plasmique des cellules M21-L ont été observés, indiquant une fixation non-spécifique des anticorps lorsque celles-ci sont incubées uniquement avec le sérum et l'anticorps secondaire. Dès lors que l'ARM est ajouté à ce mélange cellulaire, cette intensité de fluorescence semble cependant légèrement diminuer. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que s'il reste quelques molécules d'ARM fixées non-spécifiquement aux cellules après leur incubation, ces dernières vont empêcher, par compétition, les anticorps d'aller se fixer à d'autres marqueurs membranaires. La forte intensité de fluorescence observée est, quant à elle, en accord les expériences de cytométrie en flux précédentes dans lesquelles nous avons pu identifier qu'un grand nombre d'anticorps IgM avaient tendance à s'attacher aux cellules M21-L. Au contraire, les anticorps du sérum semblent se fixer beaucoup moins sur les cellules M21 et leur distribution au niveau de la membrane est plus diffuse. En effet, les anticorps semblent interagir en grappe sur certaines parties uniquement de la membrane plasmique cellulaire. Lorsque l'ARM est ajouté aux autres partenaires, l'intensité de fluorescence observée augmente significativement et est répartie de manière égale sur toute la membrane formant un anneau de fluorescence.

Ainsi, l'ensemble des résultats d'analyse par cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence, nous ont permis de montrer que la molécule ARM, avec une présentation multivalente des deux modules (4RGD-16Rha), permettait de recruter des anticorps endogènes de la circulation sanguine d'un patient sélectivement au niveau des cellules cancéreuses. La prochaine étape est donc maintenant de démontrer que les protéines du complément ainsi que les cellules effectrices peuvent induire la destruction des cellules cibles.

E) Cytotoxicité induite par l'« Antibody-Recruiting Molecule » (ARM)

Comme présenté dans l'introduction, l'objectif de mes travaux de thèse est de concevoir une molécule bimodale se liant sélectivement à une cellule tumorale et capable de recruter des anticorps endogènes pour provoquer la lyse cellulaire *via* le système immunitaire. Nous avons pu sélectionner une molécule ARM répondant à ces deux critères et avons montré sa capacité à rassembler les différents partenaires pour former un complexe ternaire. Nous devons désormais prouver que ce complexe peut initier la cascade immunitaire menant à la cytotoxicité de la cellule ciblée. Pour cela, le sérum humain utilisé dans les tests précédents sera incubé avec l'ARM 4RGD-16Rha candidat et les lignées cellulaires M21-L et M21, puis la survie cellulaire sera analysée par plusieurs méthodes.

1) Quantification de la viabilité cellulaire par dosage de l'ATP cellulaire

L'adénosine triphosphate (ATP) est un métabolite énergétique jouant un rôle primordial dans les cellules actives en étant le principal donneur d'énergie libre. De ce fait, les cellules ont besoin d'ATP pour rester vivantes et pour réaliser leur divers processus métaboliques. Lorsque les cellules vont venir à manquer de substrats ou lorsque ces dernières vont initier leur mort, l'ATP cytoplasmique viendra à diminuer avec le temps. Ainsi, la mesure de l'ATP intracellulaire est un dosage de choix pour étudier la viabilité d'une population cellulaire.

Au cours des dernières décennies de recherche, une méthode de choix pour doser cet ATP a été développée devenant aujourd'hui une expérience incontournable pour déterminer la prolifération cellulaire. Cette méthode utilise le dosage d'un produit bioluminescent, l'oxyluciférine, produit de la transformation de la luciférine par l'enzyme luciférase. Cette réaction implique l'intervention de différents cofacteurs, tels que le dioxygène, le cation divalent Mg^{2+} ainsi que l'ATP (**Figure 67**). Ainsi, la bioluminescence ne sera détectée que si de l'ATP est présent dans le système et donc si des cellules sont vivantes. ¹⁴¹

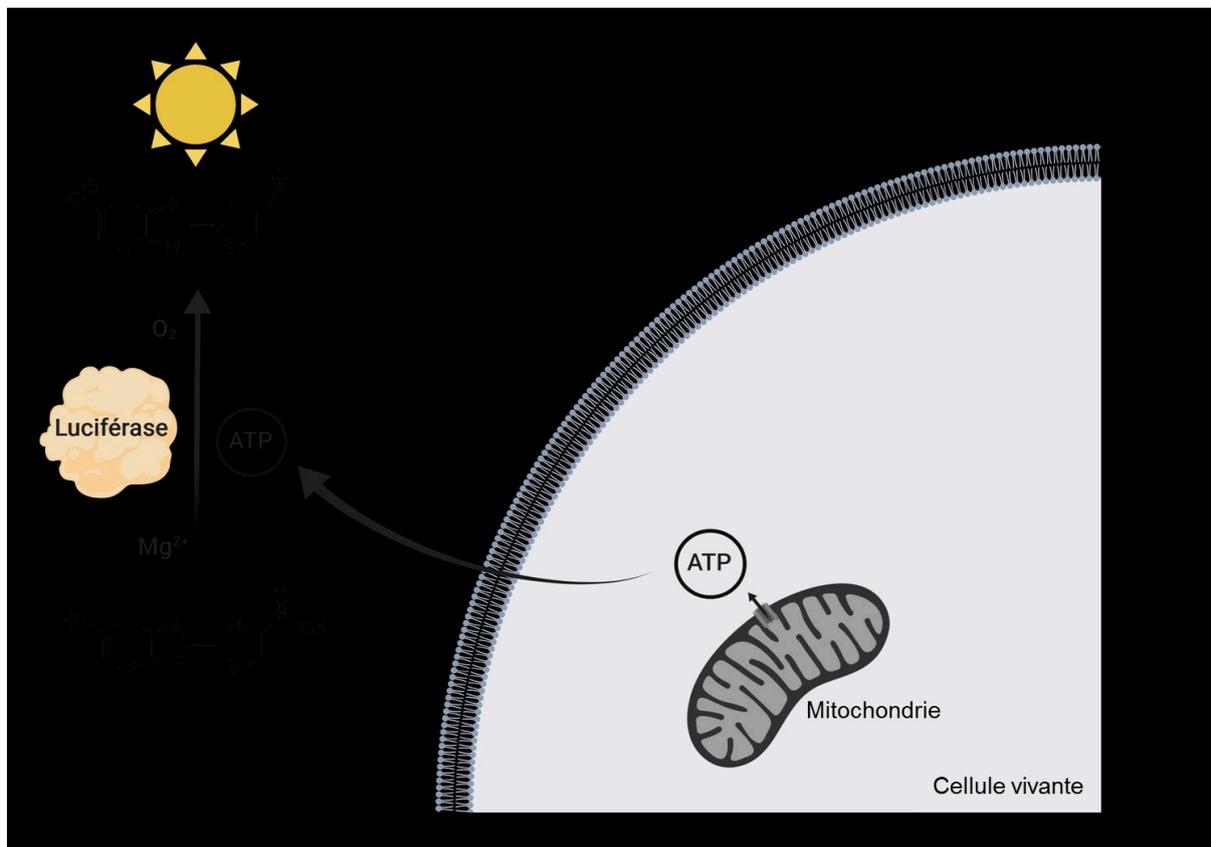


Figure 67 : Dosage de l'ATP et détermination de la viabilité cellulaire par analyse de bioluminescence *via* la réaction luciférine/oxyluciférine catalysée par la luciférase.

Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous avons utilisé un kit commercial (CellTiter-Glo®, Promega), aussi utilisé par X. Li et coll. pour déterminer la cytotoxicité de cellules traitées avec un liposome présentant des motifs rhamnose et après ajout de sérum humain.¹⁴² Ce kit comprend le substrat luciférine et l'enzyme luciférase. Celui-ci sera ajouté aux cellules adhérentes dans des puits de microplaque à 96 puits, préalablement traitées avec l'ARM et le sérum humain. L'analyse de la bioluminescence va nous permettre de déterminer si les différents composants du système immunitaire présents dans le sérum sont capables d'initier une réponse conduisant à la mort cellulaire. Ce test a l'avantage d'être très sensible et avoir une bonne reproductibilité entre les différentes expériences. Néanmoins, elle implique des étapes des lavages supplémentaires qui peuvent potentiellement provoquer le détachement les cellules de la microplaque et qui augmentent le temps d'expérience, ce qui peut être problématique dans notre cas.

L'ARM qui a été sélectionné comme étant le plus efficace pour recruter les anticorps de sérum et présentant la meilleure interaction et sélectivité pour les cellules cancéreuses est donc la construction 4RGD-16Rha **48**. Afin de savoir si le recrutement, par cet ARM, des anticorps du sérum humain à proximité des cellules cancéreuses permet d'induire leur

destruction, nous avons évalué la viabilité des cellules M21 et M21-L dans plusieurs conditions :

- Aucun traitement pour mesurer le signal de bioluminescence maximum.
- Un traitement uniquement avec du sérum humain dilué 2 fois (sans ARM) afin d'observer si le sérum seul peut entraîner une cytotoxicité potentielle. La liaison non-spécifique de quelques anticorps du sérum peut par exemple participer à cette cytotoxicité. Nous utiliserons cette valeur comme contrôlé négatif, c'est-à-dire sans ajout d'ARM.
- Un traitement séquentiel avec l'ARM à plusieurs concentrations, puis avec le sérum humain dilué 2 fois. Cette condition permettra de vérifier si nous avons une baisse de la viabilité cellulaire et donc si l'ARM provoque une toxicité de la cellule par recrutement du système immunitaire.

La première expérience d'analyse de la viabilité cellulaire par dosage de l'oxyluciférine a été réalisée en ajoutant 3 concentrations différentes d'ARM (100, 50 et 10 nM), dans du milieu de culture non-supplémenté, à 50 000 cellules M21 et M21-L adhérentes. L'inconvénient de ce test est qu'il ne permet pas de fixer les cellules puisque celles-ci doivent rester vivantes. Ainsi, nous ne pourrions pas empêcher l'internalisation potentielle de nos structures. Nous avons donc choisi de travailler à température ambiante, et non à 37°C, pour limiter au maximum cette internalisation. Les cellules n'ont pas pour autant été incubées à 4°C pour garder les cellules dans un état proche de leur condition de pousse naturelle. Comme pour les expériences d'analyses par cytométrie en flux, l'ARM est incubé avec les cellules pendant une heure puis, après 1 lavage, le sérum humain dilué 2 fois dans du milieu de culture est ajouté. La viabilité cellulaire est finalement évaluée après 2 heures d'incubation à 37°C en ajoutant les réactifs du kit permettant la conversion par les cellules vivantes de la luciférine en oxyluciférine et en dosant la bioluminescence (**Figure 68**).

a

M21-L

Figure 68 : Viabilité cellulaire de M21-L (a) et M21 (b) par dosage de la bioluminescence de l'oxyluciférine ($\lambda = 542 \text{ nm}$) après ajout du sérum humain (+ SH) et de l'ARM 4RGD-16Rha.

Nous avons pu confirmer dans un premier temps, grâce à cette analyse, que les anticorps du sérum reconnaissent de façon non-négligeable les cellules contrôles M21-L. En effet, lorsqu'on ajoute le sérum humain, une forte diminution de viabilité cellulaire est observée. Ce résultat semble de plus indiquer que le test de cytotoxicité fonctionne puisque des différences de bioluminescence sont observées selon les conditions utilisées. En revanche, la viabilité des cellules M21 ne semblent pas être impactée par l'ajout de sérum ainsi que par l'ajout d'ARM. De plus, la bioluminescence des cellules, lorsqu'elles sont incubées avec du sérum, augmente. Cette augmentation peut en revanche s'expliquer par la présence de facteurs de croissance et d'hormones dans le sérum humain.

Nous avons donc décidé de nous orienter vers un nouveau test permettant d'évaluer la viabilité cellulaire.

2) Quantification de la viabilité cellulaire par dosage de l'activité déshydrogénase mitochondriale

L'ATP intracellulaire n'est pas le seul métabolite ou composant cellulaire qui est présent à hautes doses chez les cellules eucaryotes. Certains enzymes ont une activité constante dans les cellules actives, c'est notamment le cas des déshydrogénases. Pour doser l'activité déshydrogénase intracellulaire, les sels de tétrazolium, un de leur substrat, sont utilisés. L'expérience la plus utilisée lors de ces dernières années consiste à réaliser un dosage colorimétrique des cristaux de formazan formés par la transformation d'un sel de tétrazolium, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT) par la déshydrogénase mitochondriale (**Figure 69**). Ainsi, nous allons pouvoir savoir si les mitochondries sont actives et donc que la cellule est vivante. Les cristaux de formazan étant insolubles en milieu aqueux, ils seront solubilisés dans un solvant organique (le diméthylsulfoxyde, DMSO), puis leur absorbance à une longueur d'onde de 540 nm sera mesurée

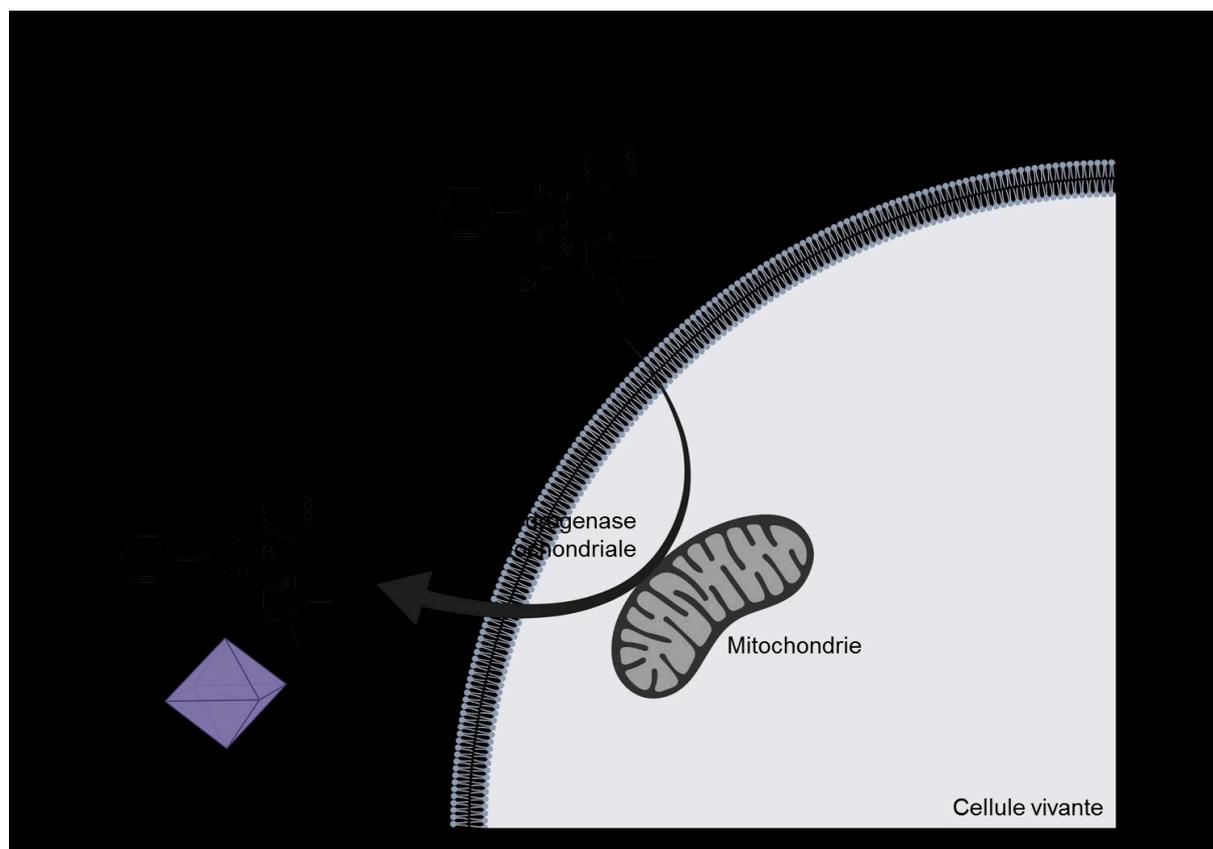


Figure 69 : Dosage de l'activité déshydrogénase mitochondriale et détermination de la viabilité cellulaire par analyse colorimétrique des cristaux de formazan (solubilisés dans le DMSO) produits à partir de MTT.

Les expériences consisteront, comme précédemment, à laisser des cellules adhérer à une microplaque 96 puits et à ajouter successivement à celles-ci, la molécule ARM puis le sérum humain. Le MTT peut être ensuite ajouté aux cellules et la mesure d'absorbance de la

solution colorée obtenue après solubilisation des cristaux formés permet alors de mesurer la viabilité cellulaire.

Si les conditions d'analyses sont différentes de celles utilisées dans le test décrit précédemment, les conditions d'incubation avec les différents partenaires restent quant à elles inchangées. Ainsi, nous avons analysé la viabilité cellulaire des lignées M21-L et M21 après ajout de sérum humain et d'ARM à trois concentrations différentes (100, 50 et 10 nM). Le MTT est ensuite ajouté aux cellules et incubé pendant 2h à 37°C. L'absorbance du produit formazan solubilisé dans du DMSO est ensuite mesurée (**Figure 70**).

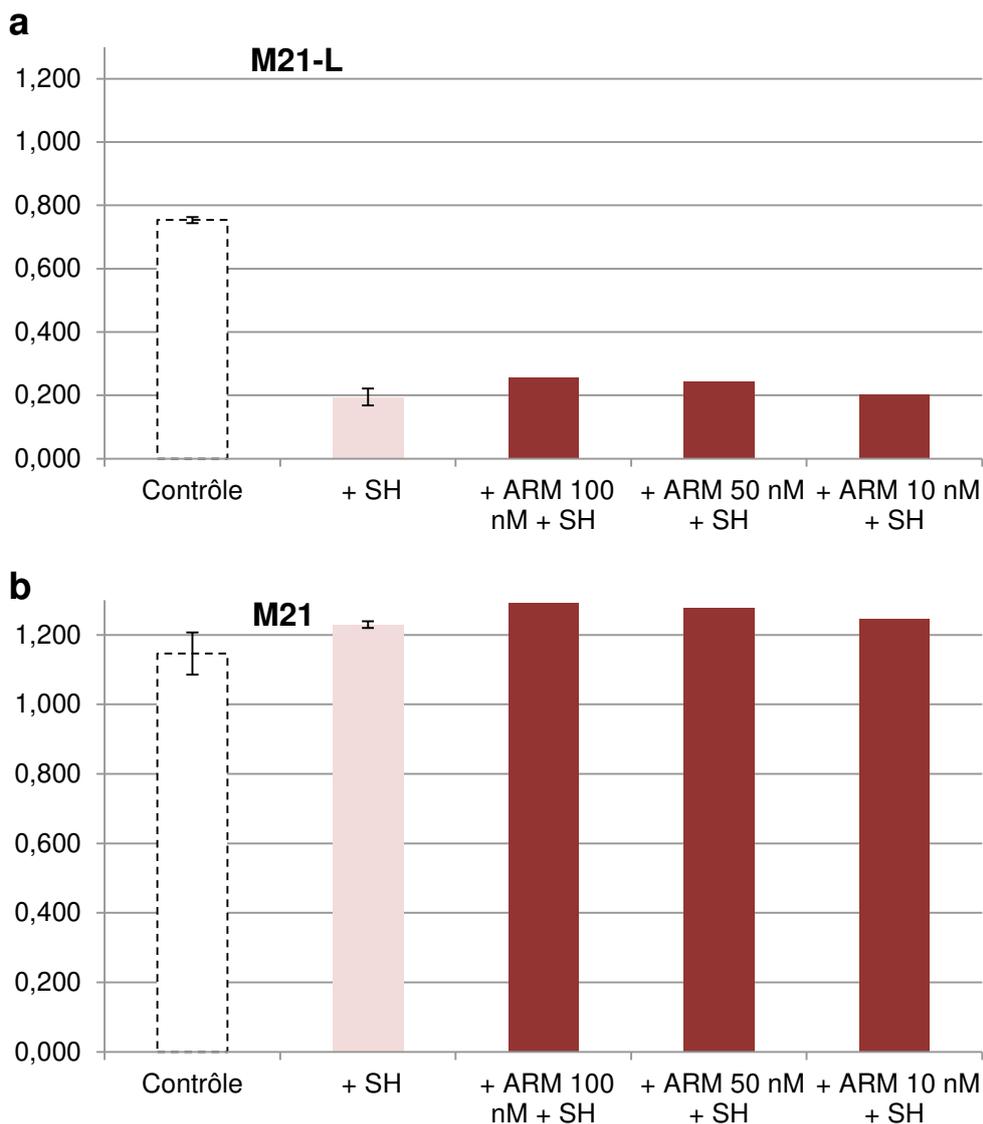


Figure 70 : Viabilité cellulaire de M21-L (a) et M21 (b) par dosage de l'absorbance du formazan solubilisé dans du DMSO ($\lambda = 540 \text{ nm}$) après ajout du sérum humain (+ SH) et de l'ARM 4RGD-16Rha.

Ce nouveau test MTT confirme les résultats que nous avons pu observer précédemment avec le test de viabilité par dosage de la bioluminescence. La viabilité de la

lignée cellulaire M21-L contrôle est apparue diminuer drastiquement lorsque le sérum humain est ajouté, résultat étant à nouveau probablement lié à la fixation non spécifique des anticorps du sérum. Les cellules M21 ont quant à elles tendance à proliférer en présence de sérum. L'ARM ne semble pas impacter la survie ou la toxicité cellulaire des deux lignées cellulaires dans les conditions du test utilisé. Le comportement des cellules est donc indépendant des réactifs du test mais bien dépendant des conditions utilisées. Il se pourrait que le temps d'incubation des cellules avec le sérum et les cellules du complément permettant d'initier une réponse immunitaire soit trop court. Nous avons donc réalisé un essai dans lequel les cellules ont été incubées avec le sérum pendant une nuit (environ 16 heures) à 37°C (**Figure 71**).

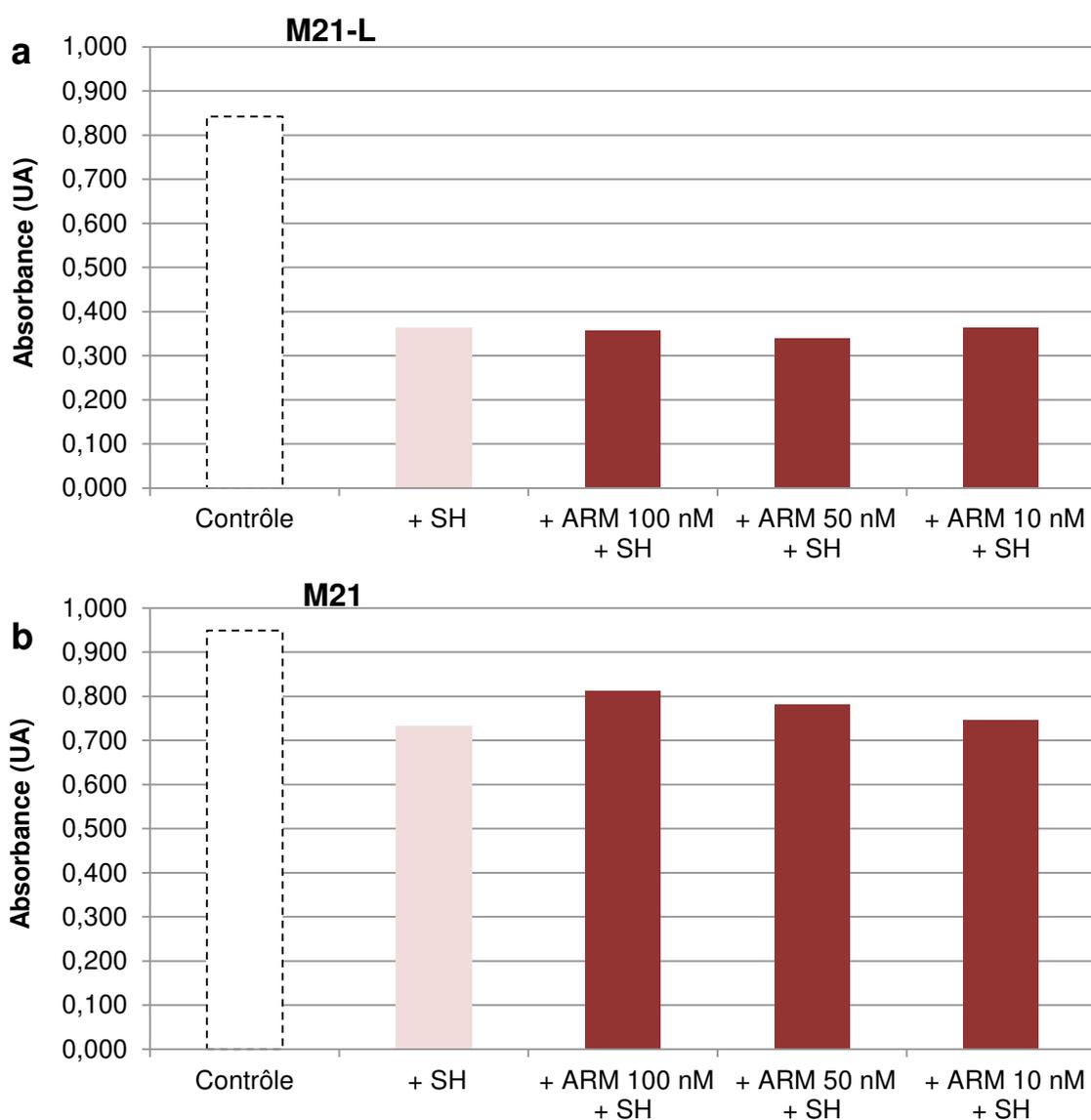


Figure 71 : Viabilité cellulaire de M21-L (a) et M21 (b) par dosage de l'absorbance du formazan solubilisé dans du DMSO ($\lambda = 540$ nm) après ajout du sérum humain (+ SH) et de l'ARM 4RGD-16Rha.

Le comportement des cellules M21-L incubées avec le sérum reste inchangé dans ses conditions. En revanche, ce n'est pas le cas pour les cellules M21 puisque nous pouvons noter une cytotoxicité en présence du sérum sans ARM qui n'avait pas été observée avec une incubation de 2 heures. Néanmoins, pour les deux lignées cellulaires, nous constatons que l'ARM n'augmente pas la toxicité cellulaire. Pour expliquer ce résultat, plusieurs hypothèses peuvent être émises :

- Malgré l'incubation à température ambiante (au lieu de 37°C, conditions utilisées pour les expériences de cytométrie en flux), l'ARM est internalisé et n'est donc pas disponible à la surface extracellulaire pour recruter les anticorps du sérum,
- Les concentrations optimales d'ARM devant être utilisées ne sont pas les mêmes que celles pour l'analyse par cytométrie en flux,
- La liaison non-spécifique des anticorps du sérum et la cytotoxicité en résultant masque la possible action de l'ARM

Pour répondre aux deux premières hypothèses, nous avons choisi d'augmenter la quantité d'ARM ajouté aux cellules. L'idée est de pallier à l'internalisation en proposant aux intégrines « recyclées » de nouveaux ligands cRGDfK. De plus, nous pourrions voir s'il est possible d'augmenter le nombre de rhamnosés présentés à la surface extracellulaire. Nous avons donc réalisé une nouvelle analyse de viabilité par dosage d'absorbance, en incubant les cellules avec le sérum, toujours pendant une nuit à 37°C, mais cette fois-ci en augmentant les concentrations d'ARM ajoutés (20, 10, 1, 0,5 et 0,1 µM) (**Figure 72**).

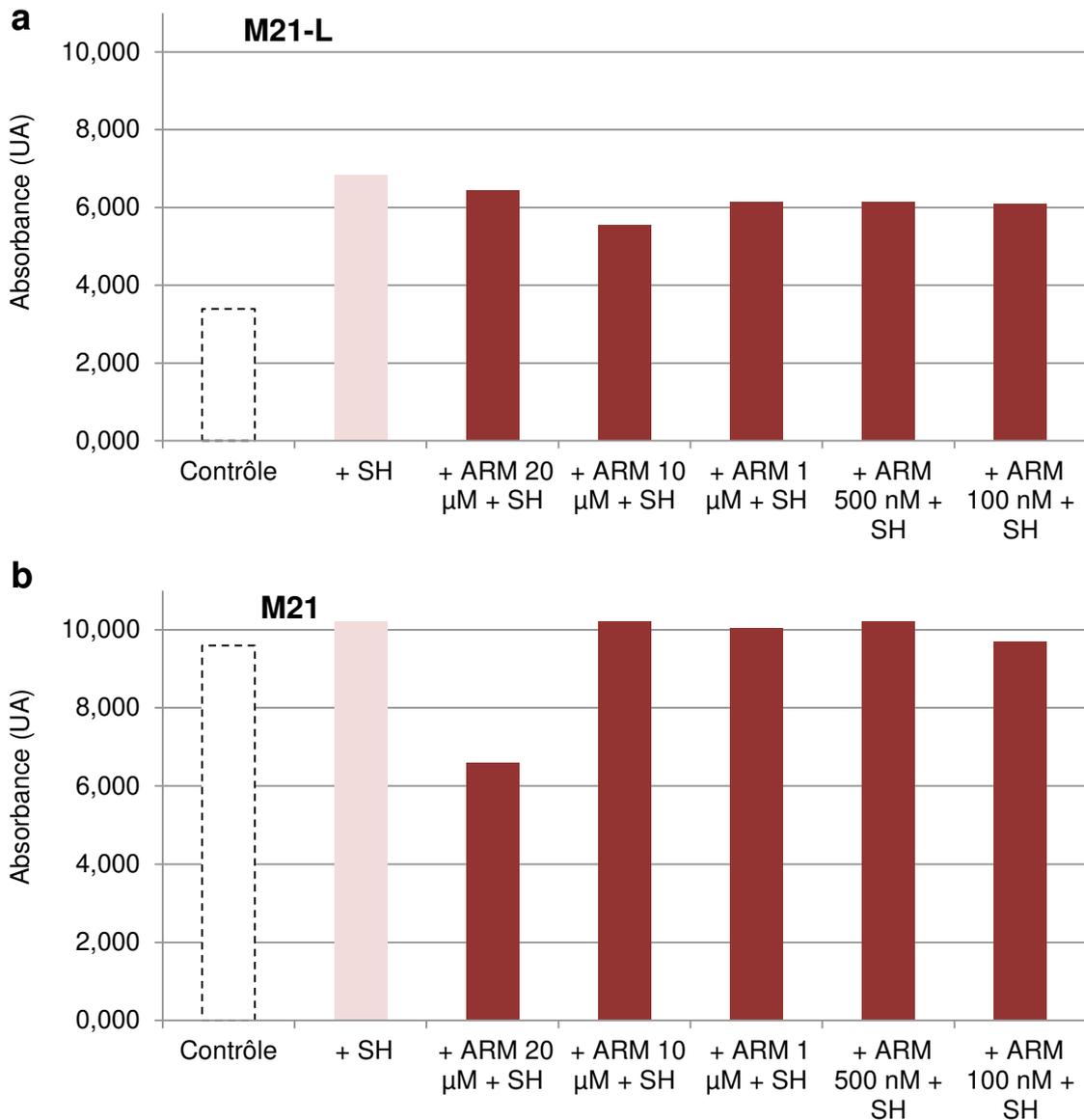


Figure 72 : Viabilité cellulaire de M21-L (a) et M21 (b) par dosage de l'absorbance du formazan solubilisé dans du DMSO ($\lambda = 540$ nm) après ajout du sérum humain (+ SH) et de l'ARM 4RGD-16Rha.

Les valeurs d'absorbance des cellules M21-L traitées ne sont pas les mêmes que celles des expériences précédentes. En effet, nous avons pu observer cette fois-ci, que les cellules M21-L avaient tendance à pousser en présence du sérum comme le faisait les cellules M21 et n'étaient plus impactées par la liaison non-spécifique des anticorps. Ce comportement des cellules peut-être problématique dans des soucis de reproductibilité des expériences. Les cellules M21, elles aussi, ne se comportent pas comme dans l'expérience précédente. En revanche, une concentration d'ARM de 20 μ M semble faire diminuer la valeur d'absorbance traduisant une baisse de la viabilité cellulaire. Il est donc possible qu'à forte concentration, l'ARM puisse recruter suffisamment d'anticorps du sérum pour apporter une réponse cytotoxique supérieure à celle induite par la présence seule du sérum. Malheureusement, nous

avons pu constater que lorsque seul l'ARM était ajouté, l'effet sur la viabilité cellulaire était le même (**Figure 73**). En effet, dans ce test, ce n'est pas vraiment la viabilité qui est analysée mais le nombre de cellules vivantes restantes dans les puits de la microplaque à l'issue de tous les traitements. Il est donc possible que lorsqu'une grande quantité d'ARM est ajoutée, les cellules se détachent de leur support. Le peptide cRGDfK risquant d'entrer en compétition avec le support et interagir avec les intégrines responsables de l'adhésion peut expliquer ce phénomène de détachement des cellules. La deuxième hypothèse serait la fragilisation des membranes cellulaires due au *clustering* des intégrines.

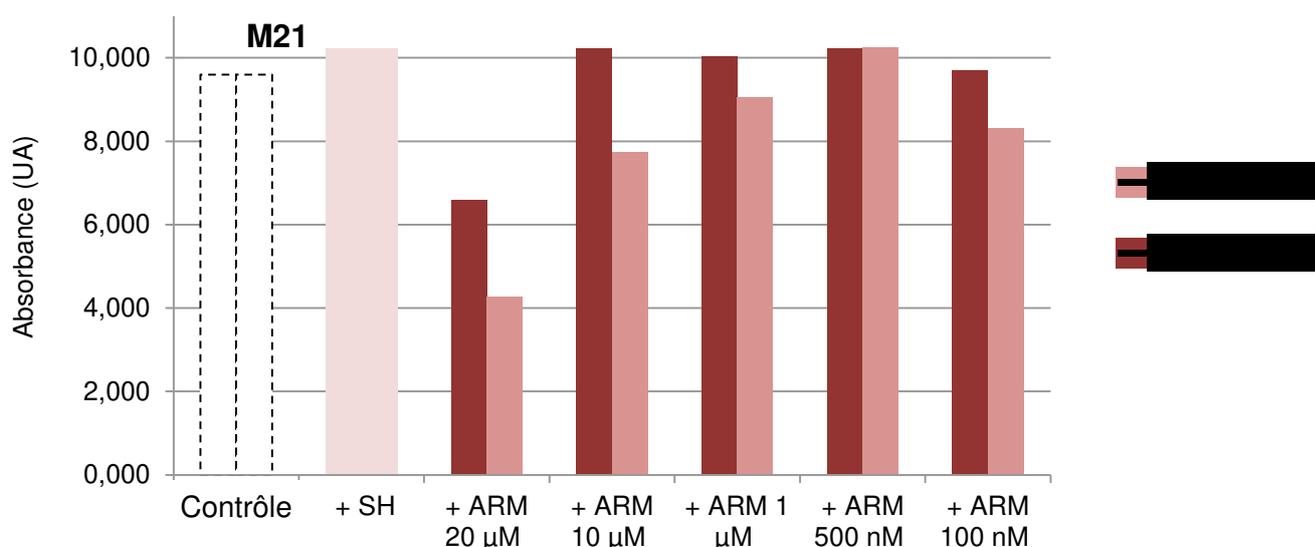


Figure 73 : Viabilité cellulaire de M21 par dosage de l'absorbance du formazan solubilisé dans du DMSO ($\lambda = 540 \text{ nm}$) après ajout du sérum humain (+ SH) et de l'ARM 4RGD-16Rha.

Pour répondre à ces hypothèses, nous avons réalisé une expérience dans des conditions identiques à celles décrites précédemment en ajoutant aux cellules uniquement le TBM-R4(RGD)₁₁, avec ou sans sérum, aux concentrations les plus élevées, à savoir 20 et 10 µM (**Figure 74**).

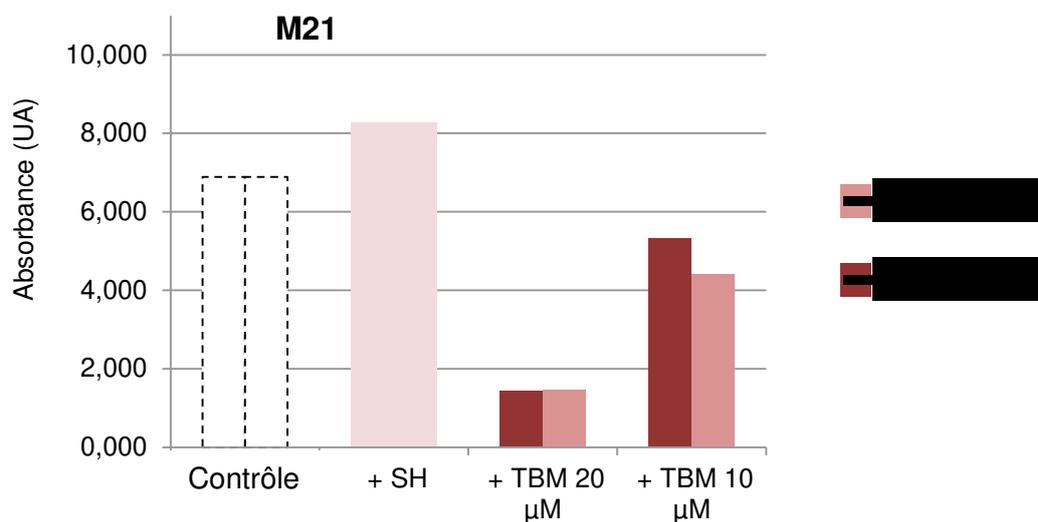


Figure 74 : Viabilité cellulaire de M21 par dosage de l'absorbance du formazan solubilisé dans du DMSO ($\lambda = 540 \text{ nm}$) après ajout du sérum humain (+ SH) et de l'ARM 4RGD-16Rha.

L'analyse de cette expérience indique dans un premier temps que le module TBM est très certainement responsable du détachement des cellules ou de la toxicité de ces dernières. Nous pouvons de plus affirmer à partir de ces deux dernières expériences que le sérum humain active la prolifération des cellules, très certainement en leur fournissant les protéines responsables de leur croissance.

Dans les conditions utilisées pour ces deux tests de dosage de la viabilité cellulaire, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'induction de la mort cellulaire après ajout de l'ARM et du sérum humain aux cellules adhérentes. Nous sommes notamment sous la contrainte de faire ces dosages sur cellules adhérentes alors que les expériences ayant montré la formation du complexe ternaire étaient faites sur cellules en suspension. Il pourrait donc être intéressant d'utiliser de nouvelles méthodes de dosage qui nous permettrait de répondre aux problèmes rencontrés.

V. Conclusion et perspectives

L'objectif de mes travaux de thèse était de concevoir et synthétiser un module de reconnaissance des cellules cancéreuses (TBM) et étudier sa liaison avec sa cible. Le but était de sélectionner des ligands, connus ou non, de biomarqueurs surexprimés à la surface des cellules tumorales, présentant la meilleure affinité vis-à-vis de leur cible. Pour cela, l'effet de la multivalence sur l'aptitude des TBMs à reconnaître les cellules a été évalué. L'étude de ce module s'est ensuite implanté dans un projet plus global de conception d'une molécule bimodale, appelée ARM, comme stratégie d'immunothérapie antitumorale. L'objectif était alors de montrer que l'ARM était capable de se lier à la cellule cancéreuse de manière spécifique et de recruter des anticorps présents naturellement dans la circulation sanguine pour provoquer la destruction de la cellule ciblée.

Dans la première partie de ces travaux (**chapitre II**), nous nous sommes concentrés sur la sélection de **ligands** de marqueurs tumoraux, **déjà connus dans la littérature**, pour concevoir le module TBM :

- Le ligand peptidique **RGD** ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$
- Le ligand peptidique **LARLLT** ciblant la protéine EGFR
- Le ligand **acétazolamide** ciblant la protéine CA IX
- Le ligand **glucose** ciblant le transporteur GLUT1

Nous avons dans un premier temps synthétisé et analysé la liaison des cyclopeptides **cRGDfK** monovalents (TBM-RGD) et tétravalents (TBM-R4(RGD)_t) avec une lignée cellulaire surexprimant les intégrines $\alpha_v\beta_3$, mais aussi une lignée ne l'exprimant pas pour étudier la sélectivité de ces TBMs. Nous avons pu montrer que les TBMs se liaient uniquement aux cellules surexprimant leur cible indiquant alors que ces derniers étaient sélectifs. Lors de ces expériences nous avons pu observer une légère amélioration de la liaison aux cellules par l'augmentation de la valence du TBM. L'observation des cellules par microscopie confocale à fluorescence nous a par ailleurs permis de localiser les modules TBMs majoritairement au niveau de la membrane plasmique cellulaire, bien qu'une internalisation des intégrines puisse intervenir après la liaison avec leur ligand.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'interaction du peptide **LARLLT** tétravalent (TBM-R4(LT)_t) avec 6 lignées cellulaires présentant différents taux d'expression d'EGFR. Nous avons observé lors de cette expérience que le peptide tétravalent reconnaissait de façon très différente les diverses lignées. Cela nous a ainsi permis de sélectionner la lignée MCF10A pour laquelle le module TBM-R4(LT)_t semble avoir une forte interaction.

Dans un troisième temps, nous avons synthétisé des ligands **acétazolamide** monovalent (TBM-AZ) et tétravalent (TBM-R4(AZ)_t) fluorescents et étudié leur capacité à se lier à deux lignées cellulaires (MCF7 et U-87 MG). Nous avons alors pu noter une reconnaissance similaire des deux lignées, néanmoins, une nette augmentation de l'interaction a pu être observée avec l'augmentation de la valence de la molécule AZ.

La recherche d'un module TBM s'est ensuite poursuivie avec l'étude de la liaison de conjugués **glucose** monovalent (TBM-Glc) et tétravalent (TBM-R4(Glc)_t) avec la lignée cellulaire M21 exprimant le récepteur GLUT1. Nous avons pu observer une interaction des ligands avec les cellules sans pour autant avoir une amélioration avec l'augmentation de la valence. En revanche, l'observation par microscopie confocale à fluorescence nous a permis de localiser les constructions tétravalentes de façon prépondérante au niveau de la membrane cellulaire. Les composés monovalents ont, quant à eux, tendance à diffuser dans le compartiment intracellulaire.

La deuxième partie de mes travaux (**chapitre III**) a consisté à **identifier de nouveaux ligands peptidiques** des cellules cancéreuses. Pour cela, la technique du Phage Display a été utilisée pour sélectionner des peptides capables d'interagir avec deux cibles différentes : la protéine **EGFR** et les cellules cancéreuses **BT549**.

Pour la **protéine EGFR cible**, nous avons pu identifier trois ligands différents : les dodécapeptides **PSY**, **GERS** et **HVH**. Seuls les peptides PSY et HVH monovalents fluorescents ont pu être synthétisés, les constructions tétravalentes ayant posé des problèmes de solubilité. Les études d'interaction avec trois lignées cellulaires M21-L, M21 et MCF7 ont montré que le peptide HVH était le meilleur ligand comparé à PSY.

Pour la **deuxième cible cellulaire**, le ligand peptidique **DEW** a été sélectionné et synthétisé sous forme de constructions fluorescentes monovalente (TBM-DEW) et tétravalente (TBM-R4(DEW)_s). L'interaction du peptide sélectionné avec la lignée cellulaire cible (BT549) a été confirmée par cytométrie en flux. Ce ligand s'est avéré reconnaître également une autre lignée cellulaire (MCF 10A) révélant donc un manque de spécificité. De plus, la construction monovalente s'est montrée interagir nettement mieux avec les deux lignées cellulaires, montrant que la multivalence ne permet pas ici d'améliorer les capacités de reconnaissance du ligand.

Après avoir sélectionné les modules TBMs et ABMs (travaux de thèse d'E. Laigre) les plus efficaces, la troisième partie de mes travaux (**chapitre IV**) ont consisté à rassembler ces derniers et à évaluer biologiquement la molécule **ARM** finale. Pour étudier son fonctionnement, nous avons utilisés trois tests : **(1)** la liaison de l'ARM à la cellule cancéreuse

en utilisant des anticorps purifiés, (2) le recrutement des anticorps endogènes à la surface cellulaire en utilisant du sérum humain et (3) l'induction de la cytotoxicité grâce à la formation du complexe ternaire cellule/ARM/anticorps.

(1) Pour étudier la **liaison** de l'ARM à la cellule cancéreuse, nous avons sélectionné 5 constructions différentes d'ARMs, toutes avec du rhamnose comme ABM :

- Trois ARMs avec un TBM comportant le peptide cRGDfK:
 - **4RGD-4Rha**
 - **4RGD-16Rha**
 - **1RGD-16Rha**
- Un ARM avec un TBM comportant le peptide LARLLT (**4LT-16Rha**)
- Un ARM avec un TBM comportant l'acétazolamide (**4AZ-16Rha**)

Nous avons pu observer à l'aide de la cytométrie en flux que trois de ces constructions pouvaient se lier aux cellules : l'ARM **4RGD-16Rha** sur M21, l'ARM **4LT-16Rha** sur MCF 10A et l'ARM **4AZ-16Rha** sur U-87 MG. L'ensemble des expériences nous a permis de définir que l'ABM devait présenter les unités rhamnoses de façon hexadécavalente pour être reconnu par les anticorps. De plus, dans le cas du peptide cRGDfK, le TBM doit être sous forme tétravalente pour se lier efficacement à la cellule et permettre à l'ABM d'être reconnu par les anticorps. La présentation multivalente des 2 unités ABM et TBM est donc indispensable dans le cas de cet ARM.

(2) L'efficacité de l'ARM, une fois lié à la cellule cible, à **recruter** les anticorps présents dans du sérum humain, a été évaluée avec l'ARM **4RGD-16Rha**, celui-ci étant apparu comme le plus efficace. Nous avons pu montrer que la construction 4RGD-16Rha permettait de lier efficacement les anticorps du sérum aux cellules. Nous avons de plus pu établir la spécificité de la liaison des anticorps à l'ABM-RR16(Rha)_{tt} puisque le complexe ternaire n'a pu être observé avec des architectures similaires mais présentant au niveau de l'ABM des motifs différents (β -Gal, iGb3 et Neu5GC).

(3) Enfin, nous avons voulu définir si le complexe ternaire cellule/ARM/anticorps formé était capable d'initier une cascade d'évènements immunologiques aboutissant à la **mort de la cellule ciblée**. Pour cela, nous avons évalué la viabilité cellulaire des cellules M21 et M21-L adhérentes par deux méthodes différentes. Aucune d'entre elles ne nous a permis de mesurer une toxicité cellulaire, quelles que soient les conditions utilisées.

L'ensemble de ces résultats nous ont permis d'identifier une nouvelle architecture de molécule bimodale capable de se fixer sélectivement aux cellules cancéreuses et recruter des anticorps présents naturellement dans la circulation sanguine. Nous avons également démontré que la présentation multivalente des deux modules est un véritable gain dans cette

nouvelle stratégie d'immunothérapie antitumorale. Ces travaux ouvrent la voie vers l'élaboration d'ARMs encore plus efficaces et plusieurs pistes d'amélioration peuvent être envisagées.

Le concept de l'ARM, à savoir sa capacité à induire une **cytotoxicité** de la cellule ciblée, est le point essentiel devant être démontré. Pour cela, plusieurs stratégies pourront être employées, notamment en changeant la méthode d'analyse de la viabilité cellulaire. Pendant la rédaction de mon manuscrit de thèse, une méthode de dosage (colorant BCECF-AM) sur cellules détachées a été testée et donne des résultats prometteurs avec des valeurs de cytotoxicité allant jusqu'à 70 %. Des tests sur souris pourront prochainement être effectués permettant de faire l'évaluation de notre molécule ARM *in vivo*.

Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives puisque plusieurs **nouvelles molécules ARMs** pourront notamment être évaluées. La structure du module ABM pourra dans un premier temps être changé (plateforme, distance, valence etc ...). La nature du module TBM ainsi que le mode de présentation seront aussi étudiés. Il sera notamment possible de faire varier la valence, en changeant la nature du châssis moléculaire utilisé (cyclotriphosphazène, callixarène, cyclodextrine, dendrimère de lysines etc ...), mais aussi de faire varier la distance entre le ligand et la plateforme (PEG). De plus, comme évoqué dans l'introduction, le phénotype des cellules cancéreuses évolue au cours de leur développement, il pourrait donc être judicieux de présenter plusieurs ligands simultanément aux cellules cancéreuses pour répondre à ce problème et pour faire face à l'hétérogénéité des expressions protéiques au niveau des membranes cellulaires.

VI. Matériel et méthodes

A) Matériel et équipements

1) Produits, réactifs et consommables

Tous les acides aminés protégés ainsi que les résines ont été commandés chez Advanced ChemTech Europe (Bruxelles, Belgique), Bachem Biochimie SARL (Voisins-Les-Bretonneux, France) et France Biochem S.A. (Meudon, France).

Le PyBOP pour la synthèse peptidique a été commandé chez France Biochem S.A. (Meudon, France).

Le Trt-NH-(PEG)₂-NH₂ a été commandé chez VWR International S.A.S (Fontenay-sous-Bois, France). Tous les autres réactifs de synthèses ont été commandés chez soit Sigma-Aldrich® (Saint-Quentin Fallavier, France), soit Acros (Noisy-Le-Grand, France).

Les milieux de cultures, sérums, enzymes, antibiotiques ainsi que le matériel pour la culture des cellules eucaryotes ont été commandé soit chez Sigma-Aldrich® (Saint-Quentin Fallavier, France), soit chez Fisher Scientific SAS (Illkirch, France).

Les cellules ont été soit commandés chez LGC Standards S.à.r.l (Molsheim, France), soit fournies par Jean-Luc Coll (laboratoire IAB, Grenoble, France).

Les différents anticorps permettant les révélations ont été commandés chez Davids Biotechnologie GmbH (Regensburg, Allemagne), Becton Dickinson S.A.S. (Grenoble, France) et Fisher Scientific SAS (Illkirch, France).

Les tests de cytotoxicité ont été commandés chez Promega (Charbonnière les bains, France) et chez Fisher Scientific SAS (Illkirch, France).

Les bactéries Echerichia Coli ER2738 ainsi que les librairies aléatoires de bactériophages M13 ont été commandés chez New England Biolabs (Evry, France).

Le séquençage de l'ADN viral des bactériophages M13 a été réalisé par Genewiz LLC (South Plainfield, NJ, Etats-Unis) et par Eurofins Genomics (Courtaboeuf, France).

2) Matériels pour la purification et l'analyse

Les purifications des peptides ont été faites par HPLC en phase inverse semi-automatique sur un équipement Waters avec un contrôleur Waters 600 et un détecteur double d'absorbance Waters 2487. Les purifications sont faites à un flux de $22 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ en utilisant un gradient linéaire A-B (solvant A : H_2O avec 0,1% d'acide formique ; solvant B : $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1 avec 0,1% d'acide formique) sur deux colonnes Waters de tailles différentes :

- Billes à particules BEH (C_{18}) de $5 \mu\text{m}$ de diamètre avec des pores de 130 \AA . Colonne de dimension 19 mm sur 250 mm.
- Billes à particules BEH (C_{18}) de $5 \mu\text{m}$ de diamètre avec des pores de 130 \AA . Colonne de dimension 19 mm sur 100 mm.

La purification est monitorée sur deux longueurs d'ondes (214 et 250 nm).

Les réactions sont suivies par UPLC en phase inverse Acquity de chez Waters couplée à un spectromètre de masse ESI SQ2 et un détecteur UV à 214 nm. Les analyses sont faites à un flux de $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ en utilisant un gradient linéaire A-B (solvant A : H_2O avec 0,1% d'acide formique ; solvant B : $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1 avec 0,1% d'acide formique) sur une colonne AerisTM à particules XB (C_{18}) de $1,7 \mu\text{m}$ de diamètre avec des pores de 100 \AA et de dimension 2,1 mm sur 50 mm.

Les produits purs sont analysés par HPLC analytique et spectrométrie de masse.

Les analyses par HPLC sur phase inverse sont réalisées sur un module de séparation Waters alliance 2695 en utilisant un détecteur UV Waters 2489. Le flux appliqué est de $1,23 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ avec un gradient linéaire A-B (solvant A : H_2O avec 0,1% TFA ; solvant B : $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1 avec 0,1% TFA) sur une colonne Waters à particules BEH (C_{18}) de $3,5 \mu\text{m}$ de diamètre avec des pores de 130 \AA et de dimension 4,6 mm sur 100 mm.

Les produits sont analysés, soit par MALDI-TOF sur une machine AutoFlex Speed Bruker après un pré-traitement des échantillons dans une microcolonne OligoR3 (Applied Biosystems, Etats-Unis) et en utilisant une matrice acide 2,5-dihydroxybenzoïque, soit par haute résolution sur une MS-ESI/LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, plateforme spectrométrie de masse de l'ICMG).

La fluorescence des cellules traitées est analysée sur un cytomètre en flux BD LSR FORTRESSA (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) équipé d'un laser 488 nm à 100 mW et d'un laser 532 nm à 50 mW pour l'excitation. L'émission de fluorescence des fluorophores

FITC et Alexa Fluor 488TM est recueillie grâce à un filtre BP 525/50. L'émission de fluorescence de la phycoérythrine est recueillie grâce à un filtre BP 575/26.

Les images de fluorescence des cellules ont été enregistrées sous un microscope confocal Leica TCS SP8 CSU équipé d'un objectif HC PL APO CS2 40x/1.30 OIL. Les images sont acquises grâce au logiciel Leica LAS X. Pour les fluorophores FITC et Alexa Fluor 488TM, l'excitation est faite par un laser 488 nm et l'émission est enregistrée par un détecteur spectral permettant d'ajuster précisément la bande d'émission (de 495 à 545 nm). Pour la phycoérythrine, l'excitation est faite par un laser 552 nm et l'émission est enregistrée par un détecteur spectral permettant d'ajuster précisément la bande d'émission (de 650 à 740 nm).

L'absorbance des puits des microplaques 96 puits est lue grâce à un spectrofluorimètre POLARstar Omega (BMG Labtech). L'absorbance des cristaux de formazan solubilisés dans le DMSO est lue à 540 nm.

La bioluminescence des puits d'une microplaque 96 puits à fond blanc est lue grâce à un spectrofluorimètre SPECTRAmax[®] GEMINI XS. La luminescence émise par l'oxyluciférine est lue à 542 nm.

B) Méthodes de synthèse

1) Procédure (A) de synthèse peptidique

(a) Synthèse peptidique (A1) sur support solide (SPPS)

Tous les peptides, linéaires ou cycliques, ont été synthétisés, manuellement ou automatiquement, en utilisant une stratégie de protection Fmoc/tBu sur support solide. Les résines utilisées ont été choisies en fonction du peptide final souhaité (Fmoc-Gly-SASRIN[®] pour un peptide cyclique, Rink amide MBHA pour un peptide linéaire).

Dans le cas d'une synthèse manuelle, les réactions ont été faites dans un réacteur en polypropylène de 150 mL (Grace SA, Etats-Unis) avec un filtre et une valve de sortie permettant d'éliminer les solutions de réactions en appliquant un flux d'air, tout en gardant la résine. L'agitation du réacteur se fait dans un agitateur orbital (IKA Vibrax VXR basic, Etats-Unis). En début de synthèse, la résine est pesée (en fonction de la quantité de peptide final souhaité), gonflée avec du DCM (10 mL/g) pendant 10 minutes, puis lavée 2 fois au DCM (1 minute) et 2 fois au DMF (1 minute). De manière à enlever le groupement Fmoc protégeant l'amine de la résine, des traitements successifs de 5, 5 et 10 minutes sont réalisés avec 20% de pipéridine dans du DMF. Après 5 lavages de la résine au DMF, l'étape de couplage du

premier acide aminé peut ensuite être réalisée en ajoutant 2 équivalents d'acide aminé protégé (Fmoc sur l'amine du carbone α et protection si nécessaire sur la chaîne latérale), 2 équivalents d'agent de couplage PyBOP et 4 équivalents de DIPEA (pH = 8-9) dans du DMF pendant 30 minutes, à température ambiante. La résine est ensuite lavée 5 fois dans du DMF. L'élongation du peptide peut ensuite être continuée en répétant les mêmes étapes.

En début et fin de synthèse, le taux de chargement de la résine peut être évalué en mesurant l'absorbance du produit de déprotection du Fmoc (dibenzofulvène-pipéridine) à 299 nm dans un volume total de 250 mL complété avec du méthanol. La quantité d'amine libre après déprotection est ensuite calculée par l'équation suivante :

$$n = \frac{A_{299} \cdot V \cdot d}{l \cdot m \cdot \epsilon_{299}} \times 1000$$

Où : n : groupements amines libres (mmol.g⁻¹)

A₂₉₉ : valeur d'absorbance à 299 nm

V : volume final de la solution à doser (0,25 L)

d : facteur de dilution (100 μ L de solution à doser dans 900 μ L de méthanol)

l : chemin optique de la cuve (cm)

m : masse de la résine utilisée (g)

ϵ_{299} : coefficient d'extinction molaire du dibenzofulvène à 299 nm (7800 L.mol⁻¹.cm⁻¹)

Après l'étape de couplage de l'acide aminé protégé, l'efficacité de cette étape est évaluée par un test colorimétrie TNBS (2,4,6-trinitrobenzène-sulphonic acid). Pour cela, quelques billes de résine sont mises dans un mélange de DIPEA/DMF (1:9), puis quelques gouttes de TNBS y sont ajoutées. Si le TNBS réagit avec des amines primaires libres un dérivé trinitrophénylé rouge-orange se formera. Ainsi, un couplage des sites libres est complet lorsque les billes restent incolores.

Dans le cas d'une synthèse automatique, les réacteurs utilisés sont des seringues de même type en polypropylène avec un filtre et une valve, mais cette fois-ci à 10 mL de contenance avec une aspiration appliquée au niveau de la valve pour éliminer les solutions (Biotage[®], Uppsala, Suède). L'agitation du ou des réacteurs se fait dans un synthétiseur peptidique Syro II (Biotage[®], Uppsala, Suède). Le principe de synthèse est le même qu'en synthèse manuelle, mise à part les temps de déprotection (3 et 10 minutes) ainsi que les équivalents de réactifs ajoutés (pipéridine à 40% dans le DMF, 4 équivalents d'acides aminés) et l'agent de couplage utilisé (4 équivalents de HBTU (hexafluorophosphate benzotriazole tetramethyl uronium)).

Les réactions ayant été faites de manière automatisées, aucune vérification (dosage ou test TNBS) ne sera possible.

(b) Détachement (A2) du peptide du support

Après synthèse du peptide linéaire sur les billes de résine, ce dernier sera détaché via différentes conditions en fonction de la résine utilisée :

- Pour la résine Fmoc-Gly-SASRIN[®], le peptide est détaché en ajoutant à 10 reprises pendant 10 minutes une solution de TFA à 1% dans du DCM. Les 10 fractions sont ensuite rassemblées, neutralisée avec du DIPEA pour éviter la déprotection des groupements protecteurs des chaînes latérales puis la solution peptidique est concentrée à l'évaporateur rotatif à une pression réduite.
- Pour la résine Rink amide MBHA, le peptide est détaché pendant 2 heures avec une solution de TFA/TIS/H₂O (95:2,5:2,5), puis la résine est lavée à deux reprises pendant 15 minutes avec la même solution. Ce détachement permet la déprotection simultanée des chaînes latérales, il n'y a donc pas besoin d'étape de neutralisation. Les trois fractions sont ensuite rassemblées, la solution est concentrée sous l'évaporateur rotatif, puis le peptide est précipité en reprenant l'huile formée dans un minimum de DCM est en l'ajoutant à un grand volume d'éther froid. Cette étape de précipitation permet d'éliminer les groupements protecteurs encore présents dans la solution après détachement. Le peptide linéaire peut être alors purifié par HPLC-RP semi-préparative et lyophilisé.

(c) Cyclisation (A3) et déprotection (A4)

En ce qui concerne les peptides cycliques, ces derniers sont dissous dans un mélange DMF/DCM (1:1) à une concentration de 0,5 mM (basé sur le chargement de la résine calculé en fin de synthèse) avec 1,2 équivalent d'agent de couplage PyBOP. Du DIPEA est ensuite ajouté au goutte à goutte jusqu'à atteindre un pH d'environ 8-9. Le mélange est alors mis à agiter pendant 2 heures puis la solution est concentrée sous l'évaporateur rotatif. Le peptide cyclisé est ensuite précipité en reprenant l'huile formée dans un minimum de DCM est en l'ajoutant dans un grand volume d'éther froid.

La déprotection des groupements Boc (protégeant dans notre cas l'amine primaire de la chaîne latérale des lysines) se fait pendant 30 minutes dans du TFA à température ambiante. Le peptide déprotégé est ensuite obtenu par évaporation du TFA, précipitation par DCM/Et₂O et purification par HPLC-RP semi-préparative.

2) Ligations chimiosélectives

(a) Procédure (B) de la cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre (CuAAC)

Une solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,1 équivalent par groupement azoture), THPTA (0,2 équivalent par groupement azoture) et d'ascorbate de sodium (1 équivalent par azoture) dans du PBS (pH 7,4) est ajouté à une solution des deux partenaires avec les groupements azotures et alcynes (1,5 équivalents par azoture) dans du DMF. La solution finale DMF/PBS 1:1 est dégazée sous argon et mise à agiter pendant 30 minutes à 4 heures à température ambiante. La réaction est analysée à différents temps par UPLC-MS afin de vérifier si celle-ci est complète. Pour éliminer le cuivre résiduel après réaction, une résine chélatrice Chelex[®] est ajoutée au mélange réactionnel pendant 45 minutes. Le produit brut est enfin purifié par HPLC-RP semi-préparative puis le produit purifié et lyophilisé.

(b) Procédure (C) de la ligation thioéther

Une solution aqueuse d'iodure de potassium (5 équivalents par chloroacétyle) est ajoutée aux deux partenaires avec les groupements chloroacétyle et thiol (1,5 équivalent par chloroacétyle) solubilisés dans du DMF. La solution finale DMF/ H_2O 1:1 est basifiée par ajout de DIPEA puis est dégazée sous argon et est mise à agiter pendant 2 heures à température ambiante. La réaction est analysée à différents temps par UPLC-MS afin de vérifier si celle-ci est complète. Le produit brut est enfin purifié par HPLC-RP semi-préparative puis le produit purifié et lyophilisé.

C) Synthèses et caractérisations

Seule la synthèse des composés ayant été faits lors de mes travaux seront détaillés avec les caractérisations.

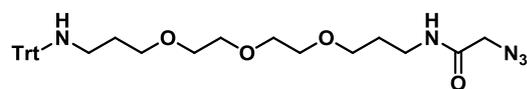
Les structures de toutes les molécules décrites pendant ce manuscrit seront présentées en annexe.

1) Synthone

FITC-NH-(PEG)₂-N₃

13

La molécule synthone **12** (64,2 mg, 324 μ mol) et du Trt-(PEG)₂-NH₂ (100 mg, 216 μ mol) sont solubilisés dans du DMF anhydre (100 mL), puis la solution est basifiée en ajoutant quelques gouttes de DIPEA (pH = 8,5). Après 2 heures à température ambiante, la réaction est arrêtée par ajout de 324 μ mol de LiOH (7,8 mg) pendant 1 heure à température ambiante. La solution est ensuite concentrée à l'évaporateur rotatif et le résidu huileux contenant le produit **13.1** est séché sous rampe à vide et utilisé sans étape supplémentaire de purification.

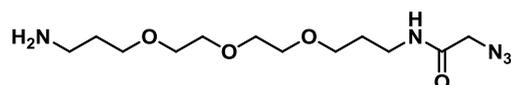


C₃₁H₃₉N₅O₄ interm. 13.1

UPLC-MS :

t_r = 1,85 min (C₁₈, 214 nm, 5-100 % B en 2,3 min)
m/z calculé [M+H]⁺ : 546,3 ; trouvé : 546,53

L'intermédiaire **13.1** (117,8 mg, 216 μ mol) est mis en solution dans un mélange TFA/DCM (1:1, 15 mL). Après 30 minutes d'agitation à température ambiante, 250 μ L de TIS sont rajoutés au mélange réactionnel. 30 minutes après, la solution est concentrée à l'évaporateur rotatif, puis le résidu huileux obtenu est resolubilisé dans un minimum de DCM. Le produit **13.2** est ensuite obtenu par précipitation à l'éther et est utilisé sans étape de purification.

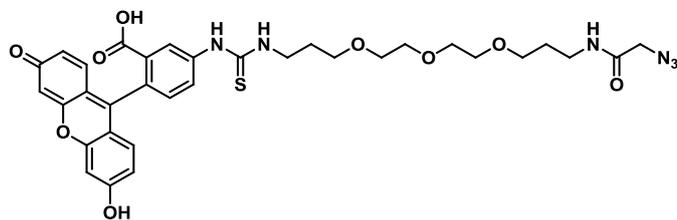


C₁₂H₂₅N₅O₄ interm. 13.2

UPLC-MS :

t_r = 1,21 min (C₁₈, 214 nm, 5-100 % B en 2,3 min)
m/z calculé [M+H]⁺ : 304,19 ; trouvé : 304,29

L'intermédiaire **13.2** (65,5 mg, 216 μ mol) est mis en solution avec de la fluorescéine isothiocyanate (84,1 mg, 216 μ mol) dans du DMF anhydre et est basifiée par ajout de quelques gouttes de DIPEA. Après 2 heures de réaction, la solution est diluée avec de l'H₂O puis purifiée par HPLC-RP semi-préparative. Le produit **13** est obtenu sous forme de poudre blanche par rassemblement des différentes fractions et lyophilisation.



C₃₃H₃₄N₆O₉S²⁻

Rendement final : 55 %

RP-HPLC : t_r = 8,065 min (C₁₈, 214 nm, 5-100 % B en 15 min)

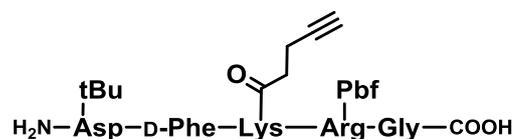
HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+H]⁺ : 693,2421, trouvé : 693,2337

2) Modules de liaison aux cellules cancéreuses (TBMs)

H-D(tBu)-f-K(alkyne)-R(Pbf)-G-OH

7

Le peptide linéaire **5** a été synthétisé sur résine « Fmoc-Gly-SASRIN[®] » (572 mg, chargement de 0,65 mmol.g⁻¹) en utilisant la stratégie **A**. La synthèse sur résine et le détachement du peptide sont fait manuellement. Le produit **5** linéaire est présent sous forme de résidu huileux jaune après évaporation de sa solution de détachement et est utilisé sans étape supplémentaire de purification.



Rendement : quantitatif

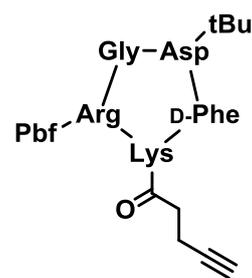
RP-HPLC : $t_r = 9,576$ min (C₁₈, 214 nm, 5-100 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+H]⁺ : 1010,50157 ; trouvé : 1010,50050

c[R(Pbf)-G-D(tBu)-f-K(alkyne)]

8

La réaction de cyclisation du peptide linéaire **7** est faite en utilisant la stratégie **A3**. Après évaporation du solvant, le peptide **8** brut est repris dans un minimum de DCM et précipité à l'éther pour l'obtenir sous forme d'un solide blanc, sans étape supplémentaire de purification.

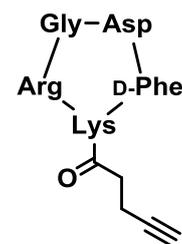


Rendement : 92 %

RP-HPLC : $t_r = 10,714$ min (C₁₈, 214 nm, 5-100 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+H]⁺ : 992,49100 ; trouvé : 992,49056

Le peptide **8** (368,6 mg, 371,8 μmol) est solubilisé dans 160 mL d'un mélange TFA/TIS/H₂O (95:2,5:2,5) pendant 2 heures à température ambiante. La solution est ensuite concentrée à l'évaporateur rotatif puis le peptide **9** est précipité à l'éther nous permettant d'obtenir un solide blanc. Ce solide est ensuite resolubilisé dans 20 mL d'un mélange H₂O/CH₃CN et purifié par RP-HPLC semi-préparative. Après rassemblement des fractions d'éluion, le peptide est obtenu sous forme d'une poudre blanche après lyophilisation (91,2 mg, 133,5 μmol).

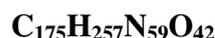
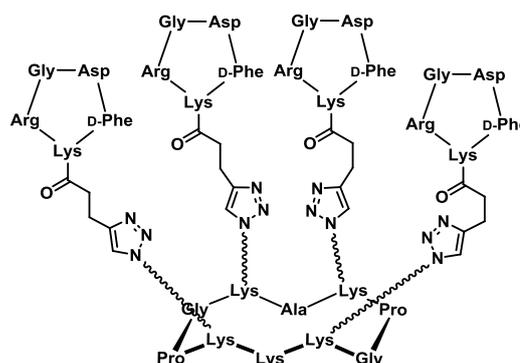


Rendement : 71 %

RP-HPLC : $t_r = 7,33$ min (C₁₈, 214 nm, 5-60 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+H]⁺ : 684,34639 ; trouvé : 684,34555

Le peptide **10** est préparé selon la stratégie **B** en mettant en solution le peptide **9** (17 mg, 24,9 μmol) et la plateforme **4** (5,6 mg, 5 μmol) dans un mélange DMF/PBS (1:1). Après 2 heures de réaction, la solution est reprise dans 3 mL de H₂O et le peptide **10** est purifié par RP-HPLC semi-préparative nous permettant de l'obtenir sous forme d'une poudre blanche après lyophilisation (3,4 mg, 0,89 μmol).

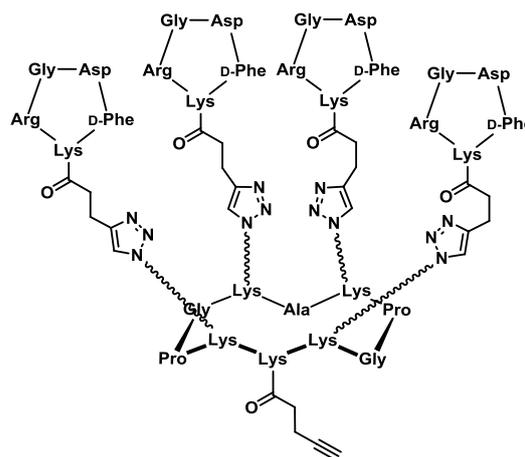


Rendement : 16 %

RP-HPLC : $t_r = 7,856$ min (C₁₈, 214 nm, 5-100 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+4H]⁴⁺ : 966,25258 ; trouvé : 966,25231

Le peptide **10** (2,61 mg, 0,625 μ mol) et le synthon **5** (183 μ g, 0,9375 μ mol) sont mis en solution dans du DMF anhydre, puis la solution est basifiée par ajout de quelques gouttes de DIPEA (pH = 8,5). Après 2 heures de réaction, la solution est diluée avec 3 mL de H₂O puis purifiée par HPLC-RP semi-préparative. Le produit **11** est obtenu sous forme de poudre blanche par rassemblement des différentes fractions et lyophilisation (0,656 mg, 0,167 μ mol).

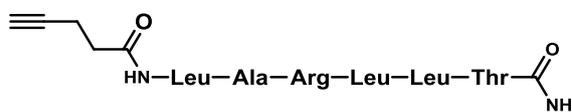


Rendement : 27 %

RP-HPLC : $t_r = 9,047$ min (C₁₈, 214 nm, 0-60 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+4H]⁴⁺ : 985,25853 ; trouvé : 985,25841

Le peptide linéaire **7** a été synthétisé sur résine « rink amide MBHA » (456 mg, chargement de 0,66 mmol.g⁻¹) en utilisant la stratégie **A**. La synthèse sur résine est faite automatiquement et l'ajout du synthon **5** (59 mg, 601,5 μ mol) ainsi que le détachement du peptide sont fait manuellement. Le résidu huileux obtenu après évaporation de la solution de détachement est ensuite solubilisé dans un mélange H₂O/acétonitrile (1:1) puis est purifié par HPLC-RP semi-préparative. Le produit **7** est finalement obtenu sous forme de poudre blanche après lyophilisation des fractions pures (178,3 mg, 233,2 μ mol).

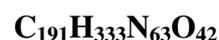
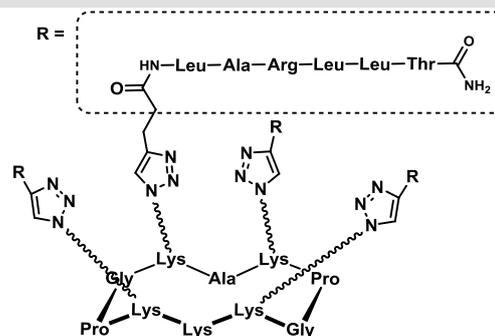


Rendement : 77 %

RP-HPLC : $t_r = 11,686$ min (C₁₈, 214 nm, 5-60 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+H]⁺ : 765,49814 ; trouvé : 765,49697

Le peptide **17** est préparé selon la stratégie **B** en mettant en solution le peptide **16** (53 mg, 69,3 µmol) et la plateforme **4** (17,7 mg, 15,7 µmol) dans un mélange DMF/PBS (1:1). Après 2 heures de réaction, la solution est reprise dans 3 mL de H₂O et le peptide **17** est purifié par RP-HPLC semi-préparative nous permettant de l'obtenir sous forme d'une poudre blanche après lyophilisation (24,4 mg, 5,8 µmol).



Rendement : 37 %

RP-HPLC : $t_r = 13,014$ min (C_{18} , 214 nm, 5-60 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé $[M+5H]^{5+}$: 837,3250 ; trouvé : 837,3221

Peptide linéaire NH₂-HYGWPSYLGQYHK(alkyne)-CO-NH₂ (PSY-alkyne)

27

Le peptide linéaire **27** a été synthétisé sur résine « rink amide MBHA » (304 mg, chargement de 0,66 mmol.g⁻¹) en utilisant la stratégie **A**. La synthèse sur résine et l'ajout du synthon **6** en début de synthèse sont faites automatiquement et le détachement du peptide est fait manuellement. Le résidu huileux obtenu après évaporation de la solution de détachement est ensuite solubilisé dans un mélange H₂O/acétonitrile (1:1) puis est purifié par HPLC-RP semi-préparative. Le produit **27** est finalement obtenu sous forme de poudre blanche après lyophilisation des fractions pures (133,7 mg, 78 µmol).

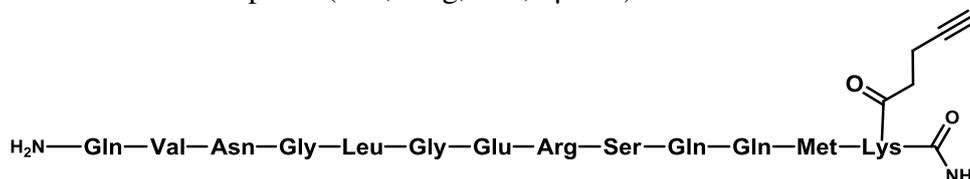


Rendement : 39 %

RP-HPLC : $t_r = 8,42$ min (C_{18} , 214 nm, 5-60 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé $[M+2H]^{2+}$: 857,90988 ; trouvé : 857,90942

Le peptide linéaire **28** a été synthétisé sur résine « rink amide MBHA » (304 mg, chargement de 0,66 mmol.g⁻¹) en utilisant la stratégie **A**. La synthèse sur résine et l'ajout du synthon **6** en début de synthèse sont faites automatiquement et le détachement du peptide est fait manuellement. Le résidu huileux obtenu après évaporation de la solution de détachement est ensuite solubilisé dans un mélange H₂O/acétonitrile (1:1) puis est purifié par HPLC-RP semi-préparative. Le produit **28** est finalement obtenu sous forme de poudre blanche après lyophilisation des fractions pures (158,9 mg, 102,3 μmol).

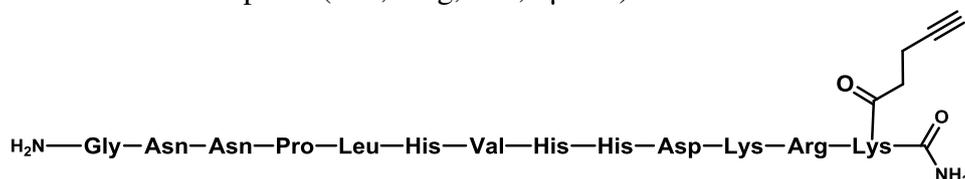


Rendement : 51 %

RP-HPLC : t_r = 5,886 min (C₁₈, 214 nm, 5-60 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+2H]²⁺ : 777,39628 ; trouvé : 777,39584

Le peptide linéaire **29** a été synthétisé sur résine « rink amide MBHA » (304 mg, chargement de 0,66 mmol.g⁻¹) en utilisant la stratégie **A**. La synthèse sur résine et l'ajout du synthon **6** en début de synthèse sont faites automatiquement et le détachement du peptide est fait manuellement. Le résidu huileux obtenu après évaporation de la solution de détachement est ensuite solubilisé dans un mélange H₂O/acétonitrile (1:1) puis est purifié par HPLC-RP semi-préparative. Le produit **29** est finalement obtenu sous forme de poudre blanche après lyophilisation des fractions pures (202,7 mg, 124,4 μmol).

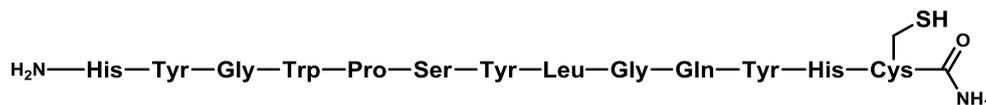


Rendement : 62 %

RP-HPLC : t_r = 5,222 min (C₁₈, 214 nm, 5-60 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+3H]³⁺ : 544,29396 ; trouvé : 544,29251

Le peptide linéaire **30** a été synthétisé sur résine « rink amide MBHA » (456 mg, chargement de 0,66 mmol.g⁻¹) en utilisant la stratégie **A**. La synthèse sur résine est faite automatiquement et le détachement du peptide est fait manuellement. Le résidu huileux obtenu après évaporation de la solution de détachement est ensuite solubilisé dans un mélange H₂O/acétonitrile (1:1) puis purifié par HPLC-RP semi-préparative. Le produit **30** est finalement obtenu sous forme de poudre blanche après lyophilisation des fractions pures (250 mg, 155,2 μmol).

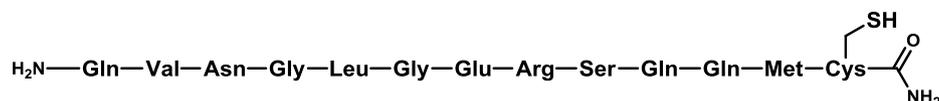


Rendement : 52 %

RP-HPLC : t_r = 9 min (C₁₈, 214 nm, 0-60 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+2H]²⁺ : 805,35388 ; trouvé : 805,35311

Le peptide linéaire **31** a été synthétisé sur résine « rink amide MBHA » (456 mg, chargement de 0,66 mmol.g⁻¹) en utilisant la stratégie **A**. La synthèse sur résine est faite automatiquement et le détachement du peptide est fait manuellement. Le résidu huileux obtenu après évaporation de la solution de détachement est ensuite solubilisé dans un mélange H₂O/acétonitrile (1:1) puis purifié par HPLC-RP semi-préparative. Le produit **31** est finalement obtenu sous forme de poudre blanche après lyophilisation des fractions pures (261,4 mg, 180,6 μmol).

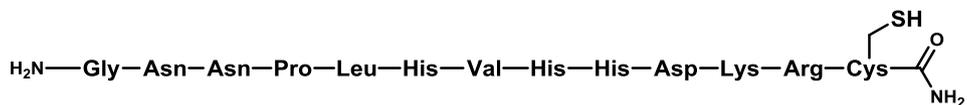


Rendement : 60 %

RP-HPLC : t_r = 8,322 min (C₁₈, 214 nm, 0-40 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+2H]²⁺ : 724,84028 ; trouvé : 724,83906

Le peptide linéaire **32** a été synthétisé sur résine « rink amide MBHA » (456 mg, chargement de 0,66 mmol.g⁻¹) en utilisant la stratégie **A**. La synthèse sur résine est faite automatiquement et le détachement du peptide est fait manuellement. Le résidu huileux obtenu après évaporation de la solution de détachement est ensuite solubilisé dans un mélange H₂O/acétonitrile (1:1) puis purifié par HPLC-RP semi-préparative. Le produit **32** est finalement obtenu sous forme de poudre blanche après lyophilisation des fractions pures (316,6 mg, 207,7 μmol).



Rendement : 69 %

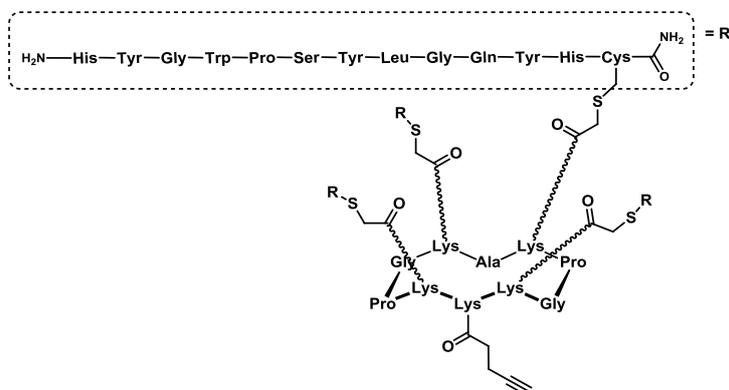
RP-HPLC : t_r = 7,4 min (C₁₈, 214 nm, 0-40 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+2H]²⁺ : 763,38130 ; trouvé : 763,38082

cRAFT 4(PSY)_s-NH(alcyne) (TBM-R4(PSY)_s)

33

Le peptide **33** est préparé par utilisation de la stratégie **C** en mettant en solution le peptide **30** (33,8 mg, 21 μmol) et la plateforme **6** (5 mg, 3,5 μmol) dans un mélange DMF/H₂O (1:1). Après 2 heures de réaction, la solution est reprise dans 3 mL de H₂O/TFA (99,9:0,1) et le peptide **33** est purifié par RP-HPLC semi-préparative nous permettant de l'obtenir sous forme d'une poudre blanche après lyophilisation (16,2 mg, 2,1 μmol).

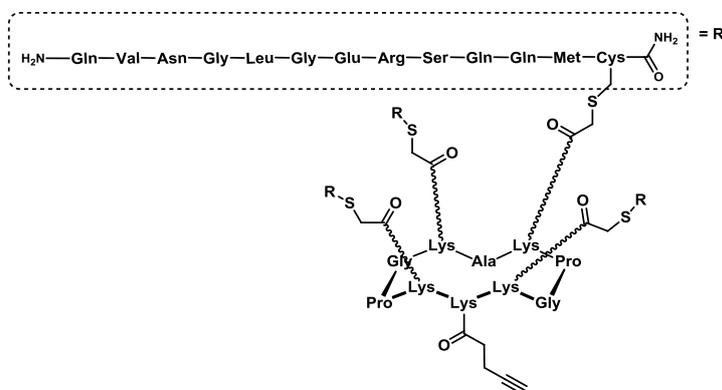


Rendement : 60 %

RP-HPLC : t_r = 9,98 min (C₁₈, 214 nm, 0-60 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+8H]⁸⁺ : 962,81217 ; trouvé : 962,81068

Le peptide **34** est préparé par utilisation de la stratégie C en mettant en solution le peptide **31** (6,23 mg, 4,3 µmol) et la plateforme **6** (1 mg, 0,71 µmol) dans un mélange DMF/H₂O (1:1). Après 2 heures de réaction, la solution est reprise dans 3 mL de H₂O/TFA (99,9:0,1) et le peptide **34** est purifié par RP-HPLC semi-préparative nous permettant de l'obtenir sous forme d'une poudre blanche après lyophilisation (3,4 mg, 0,48 µmol).

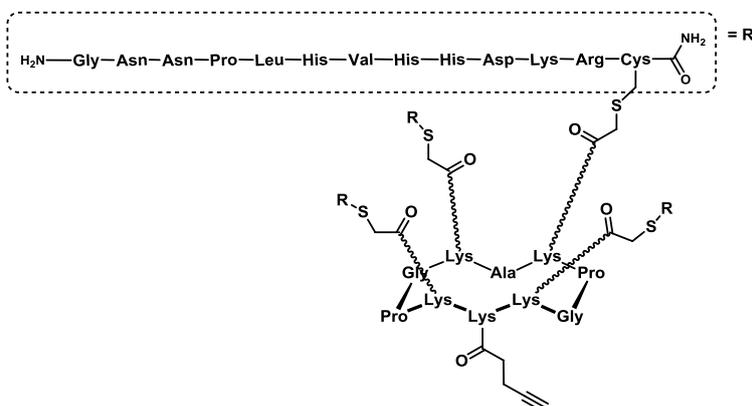


Rendement : 68 %

RP-HPLC : t_r = 7,688 min (C₁₈, 214 nm, 0-60 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+8H]⁸⁺ : 1411,07334 ; trouvé : 1411,07315

Le peptide **35** est préparé par utilisation de la stratégie C en mettant en solution le peptide **32** (6,23 mg, 4,3 µmol) et la plateforme **6** (1 mg, 0,71 µmol) dans un mélange DMF/H₂O (1:1). Après 2 heures de réaction, la solution est reprise dans 3 mL de H₂O/TFA (99,9:0,1) et le peptide **35** est purifié par RP-HPLC semi-préparative nous permettant de l'obtenir sous forme d'une poudre blanche après lyophilisation (1,46 mg, 0,2 µmol).



Rendement : 28 %

RP-HPLC : t_r = 6,07 min (C₁₈, 214 nm, 5-60 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+7H]⁷⁺ : 1052,24420 ; trouvé : 1052,24460

Le peptide linéaire **38** a été synthétisé sur résine « rink amide MBHA » (456 mg, chargement de 0,66 mmol.g⁻¹) en utilisant la stratégie **A**. La synthèse sur résine est faite automatiquement et le détachement du peptide est fait manuellement. Le résidu huileux obtenu après évaporation de la solution de détachement est ensuite solubilisé dans un mélange H₂O/acétonitrile (1:1) puis purifié par HPLC-RP semi-préparative. Le produit **38** est finalement obtenu sous forme de poudre blanche après lyophilisation des fractions pures (292 mg, 275,4 μmol).



Rendement : 91 %

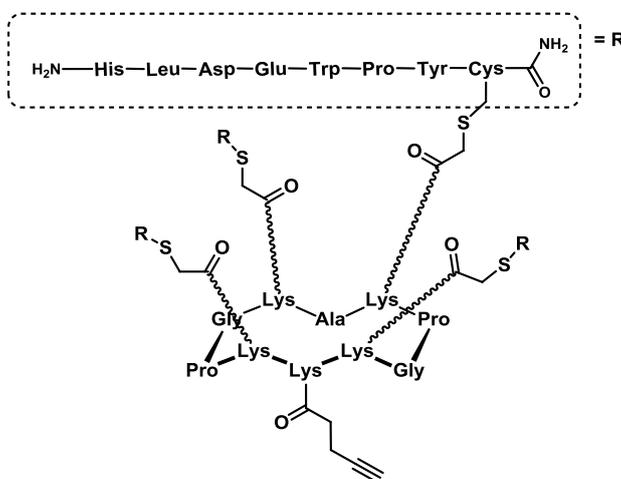
RP-HPLC : $t_r = 7,85$ min (C₁₈, 214 nm, 5-60 % B en 15 min)

MS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+H]⁺ : 1061,54 ; trouvé : 1061,60

cRAFT 4(DEW)_S-NH(alcyne) (TBM-R4(DEW)_S)

39

Le peptide **38** est préparé par utilisation de la stratégie **C** en mettant en solution le peptide **34** (22,7 mg, 21,4 μmol) et la plateforme **33** (5 mg, 3,56 μmol) dans un mélange DMF/H₂O (1:1). Après 2 heures de réaction, la solution est reprise dans 3 mL de H₂O/TFA (99,9:0,1) et le peptide **38** est purifié par RP-HPLC semi-préparative nous permettant de l'obtenir sous forme d'une poudre blanche après lyophilisation (12,3 mg, 2,23 μmol).

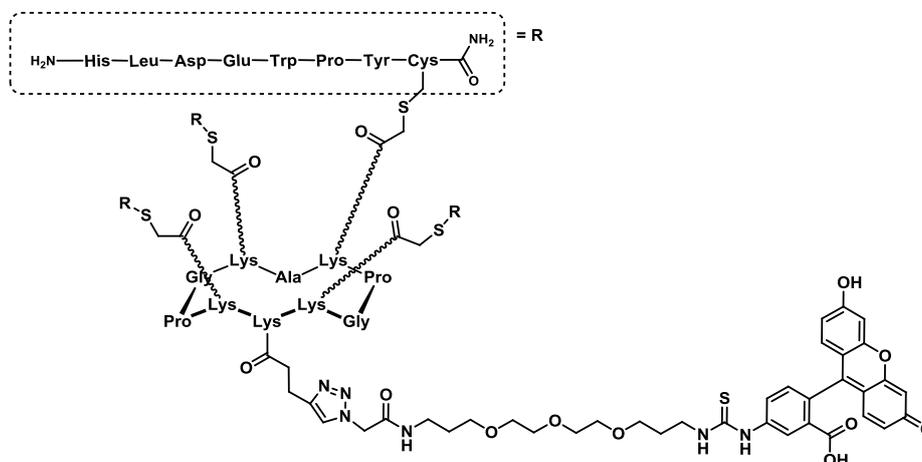


Rendement : 63 %

RP-HPLC : $t_r = 9,131$ min (C₁₈, 214 nm, 5-60 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+7H]⁷⁺ : 1101,9085 ; trouvé : 1101,8973

Le peptide **39** est préparé par utilisation de la stratégie **B** en mettant en solution le peptide **38** (5 mg, 0,907 μmol) et le synthon **13** (0,943 mg, 1,36 μmol) dans un mélange DMF/PBS (1:1). Après 2 heures de réaction, la solution est reprise dans 3 mL de H₂O et le peptide **39** est purifié par RP-HPLC semi-préparative nous permettant de l'obtenir sous forme d'une poudre jaune après lyophilisation (1,8 mg, 0,29 μmol).



Rendement : 32 %

RP-HPLC : t_r = 6,571 min (C₁₈, 214 nm, 5-100 % B en 15 min)

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z calculé [M+6H]⁶⁺ : 1033,6813 ; trouvé : 1033,7886

D) Phage Display

1) Sur EGFR comme cible

L'expérience se fait sur 3 expériences de sélection comportant chacune les étapes suivantes :

- Purification des bactériophages d'intérêt :
 - 50 µl de billes magnétiques fonctionnalisées avec de la streptavidine (Thermo Scientific™ Pierce™, réf PI88816) sont lavées avec 1 mL de tampon TBS-T (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1 %). Après séparation des billes et du tampon, le surnageant est enlevé. 3 lavages sont réalisés.
 - La protéine EGFR biotinylée (2,75 mg, Acro Biosystems, réf H822R) est solubilisée dans 90 µl de tampon TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM). A cette solution est ajoutée la librairie de bactériophages présentant 5 peptides linéaires de 12 acides aminés (New England BioLabs®, réf. E8110S). 10 µl sont ajoutés pour avoir au total 10^{11} bactériophages. Les deux partenaires sont incubés pendant 2 heures à température ambiante avec agitation.
 - 1 mL de billes lavées est ajouté à la solution EGFR/bactériophages et l'incubation est poursuivie pendant 1 heure à température ambiante avec agitation.
 - Après 10 lavages des billes au TBS-T, ces dernières sont incubées avec du tampon d'élution (Glycine-HCl 0,2 M pH 2,2) pendant 10 minutes à température ambiante. Le surnageant est ensuite récupéré puis neutralisé par ajout d'une solution de Tris-HCl 1 M, tamponnée à pH 9,1.
- Amplification des bactériophages :
 - Avant cette étape, une culture d'Escherichia Coli ER2738 (New England BioLabs®, réf. E8110S) a été réalisée sous agitation dans 10 mL de milieu LB avec 0,1 % de tétracycline pendant une nuit à 37°C.
 - 200 µL de cette préculture bactérienne sont ajoutés à 20 mL de milieu LB. 1 mL de la solution de bactériophages purifiés est ajouté à cette suspension bactérienne diluée et le mélange est mis à agiter à 180 rpm pendant 4,5 heures à 37°C, temps nécessaire à la croissance bactérienne
- Isolation des bactériophages amplifiés :
 - La culture bactérienne avec les bactériophages est centrifugée pendant 10 minutes à une vitesse de 8000 rpm à 4°C afin de culoter les bactéries. Le surnageant contenant les bactériophages est récupéré et ces derniers sont précipités par ajout de 4 mL d'un tampon PEG (PEG 20 %, NaCl 2,5 M) pendant 2 heures à 4°C.

▪ Les bactériophages sont culotés par centrifugation pendant 15 minutes à une vitesse de 8000 rpm à 4°C. Le culot de bactériophages est ensuite resuspendu dans 200 µL de tampon TBS pour obtenir la solution de bactériophages amplifiés qui peut être présentée à nouveau à la cible pour une nouvelle étape de sélection.

Entre chaque étape, les bactériophages sont dénombrés par dosage au NanoDrop à 260 nm en utilisant le calcul suivant :

$$N_{\text{bactériophages}} \text{ par mL} = \text{Abs}_{260 \text{ nm}} \times 22,14 \times 10^{10}$$

L'évaluation de l'enrichissement des bactériophages est faite par un test ELISA selon les étapes suivantes :

- 1 µg de protéine EGFR biotinyllée dans 100 µL de tampon TBS est ajouté dans chaque puits. La liaison avec le support de la microplaque 96 puits est faite pendant une nuit à 4°C.
- Après avoir enlevé la solution dans chaque puits, une solution TBS-BSA 3 % est ajoutée pour masquer les espaces de la plaque sans EGFR.
- Après une nuit à 4°C et après avoir enlevé la solution, 10¹¹ bactériophages issus de chaque étape de sélection sont ajoutés dans chaque puits de la microplaque et le mélange est incubé pendant 2 heures à température ambiante.
- Après avoir éliminé les bactériophages non liés par retournement de la microplaque et lavé 6 fois au TBS-T (tampon TBS, Tween 20 0,05 %), les bactériophages liés à EGFR sont révélés par ajout d'un anticorps anti-bactériophage M13 couplé à une HRP (Horse Radish Peroxydase) (GE Healthcare, réf. 27-9421-01) dilué 5000 fois dans du TBS.
- Après 1 heure d'incubation à température ambiante, le substrat OPD (O-phenylenediamine dihydrochloride, Sigma-Aldrich®, réf. P9187) de la HRP est ajouté et l'incubation est poursuivie pendant 5 minutes jusqu'à obtenir une coloration orange. L'action de la HRP est alors arrêtée par ajout de 50 µL de H₂SO₄ (40 %). Le produit coloré est ensuite dosé à 490 nm. Ainsi, la valeur d'absorbance sera proportionnelle au nombre de bactériophages liés aux protéines EGFR immobilisées dans chaque puits.

Pour séquencer les ADN viraux, des clones de bactériophages M13 sont sélectionnés sur boîte de Pétri. Pour cela, 20 mL d'un milieu LB-Agar sont chauffés à 50°C et 0,1 % d'un mélange IPTG/XGal (IPTG 50 mg/mL, XGal 40 mg/mL dans du DMF) est ajouté. Ce milieu de culture est coulé dans une boîte de Pétri et placé à 37°C pour le laisser gélifier. Une colonie de bactéries ER2738 est mise à pousser dans 10 mL de milieu LB-Tet (Tétracycline 0,1 %) jusqu'à atteindre leur phase de croissance semi-logarithmique ($\text{Abs}_{600 \text{ nm}} \approx 0,5 \text{ UA}$). A 200 µL

de cette suspension bactérienne sont ajoutés 10 µL de bactériophages M13 dilués (facteur de dilution de 10^9 à 10^{12}) et ce mélange est incubé pendant 1 à 5 minutes. Les bactéries infectées sont transférées dans 3 mL de milieu « Agarose-Top » (milieu LB avec 7,5 g d'agar/L), le mélange est coulé sur une boîte de Pétri (une par dilution de phage). La boîte est alors laissée quelques minutes à température ambiante afin que le milieu se gélifie, puis elle est retournée mise à incuber pendant une nuit à 37°C. La boîte ayant entre 20 et 50 plaques bleues (PFU) est envoyée à séquencer pour une vingtaine de clones viraux différents à Genewiz® New Jersey. Les séquences nucléotidiques sont ensuite traduites en séquence protéique en utilisant le logiciel BioEdit.

2) Sur la cible cellulaire BT-549

L'expérience avec les cellules entières prises pour cibles des bactériophages a été réalisée à partir de 4 procédures de sélections successives. Par rapport au protocole décrit précédemment, seule l'étape de purification est différente :

- Les cellules BT-549 sont mises en culture à 50 000 cellules/mL dans du RPMI supplémenté dans un flacon de culture de 25 cm², 6 jours avant la première sélection pour les avoir à confluence le jour de la sélection.

- La sélection commence par un changement du milieu des cellules après 2 lavages avec 2 mL de tampon PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM et KH₂PO₄ 1,8 mM pH 7,4) stérile. 5 mL de milieu RPMI non-supplémenté (sans sérum ni antibiotiques) est ensuite ajouté dans le flacon de culture et les cellules sont incubées avec ce milieu pendant 1 heure à 37°C.

- Le milieu est ensuite enlevé des cellules adhérentes et 800 µL de bactériophages (10^{11} au total) dans du tampon TBS leur sont présentés. L'incubation cellule/bactériophage a lieu pendant 1 heure à température ambiante pour minimiser au maximum leur internalisation par les cellules.

- La solution contenant les bactériophages non liés est ensuite enlevée et les cellules sont lavées 10 fois avec 2 mL de tampon de lavage (milieu RPMI, BSA 0,5 % et Tween-20 0,1 %).

- Les bactériophages sont ensuite récupérés par ajout de 800 µl de tampon d'élution (Glycine-HCl 0,1 M pH 2,2). Après 10 minutes d'incubation sur de la glace, la solution contenant les bactériophages est prélevée et neutralisée avec 150 µl de tampon Tris-HCl 1 M à pH 9,1.

Les bactériophages récupérés sont ensuite amplifiés en suivant le même protocole que précédemment.

Une dizaine de clones viraux différents sont sélectionnés sur boîte de Pétri en utilisant la même méthode que pour EGFR. Les ADN viraux sont, après la dernière étape de sélection, extraits et purifiés sur colonne en suivant le protocole du kit d'isolation E.Z.N.A.[®] M13 (VWR[™], réf. D6900). Ils sont ensuite envoyés à séquencer à Eurofins Genomics Courtaboeuf. Les séquences nucléotidiques sont ensuite traduites en séquence protéique en utilisant le logiciel BioEdit.

E) Culture cellulaire eucaryote et expériences sur cellules

1) Lignées cellulaires

Nom	Description	Source	Milieu de culture
HEK293(β1)	Cellules de rein d'embryon humain avec une surexpression de la sous unité β ₁ de l'intégrine	Dr. Jean-Luc Coll (IAB, Grenoble)	DMEM + 10 % SVF + 1 % Pen/Strep
HEK293(β3)	Cellules de rein d'embryon humain avec une surexpression de la sous unité β ₃ de l'intégrine	Dr. Jean-Luc Coll (IAB, Grenoble)	DMEM + 10 % SVF + 1 % Pen/Strep
U-87 MG	Cellules de glioblastome du cerveau d'homme	Dr. Jean-Luc Coll (IAB, Grenoble)	DMEM + 10 % SVF + 1 % Pen/Strep
MCF 10A	Cellules de glande mammaire d'une femme atteinte de maladie fibrokystique	ATCC [®] CRL-10317 [™]	DMEM + 10 % SVF + 1 % Pen/Strep + Insuline 10 µg/mL + Toxine du choléra 100 ng/mL + EGF 20 ng/mL
M21-L	Cellules de mélanome d'un homme sans l'unité α _v de l'intégrine	Dr. Jean-Luc Coll (IAB, Grenoble)	DMEM + 10 % SVF + 1 % Pen/Strep
M21	Cellules de mélanome d'un homme	Dr. Jean-Luc Coll (IAB, Grenoble)	DMEM + 10 % SVF + 1 % Pen/Strep
MCF7	Cellules d'adénocarcinome dérivé d'une métastase de glande mammaire d'une femme	ATCC [®] HTB-22 [™]	DMEM + 10 % SVF + 1 % Pen/Strep + Insuline 10 µg/mL
BT-549	Cellules de carcinome de glande mammaire d'une femme	ATCC [®] HTB-122 [™]	RPMI + 10 % SVF + 1 % Pen/Strep

2) Culture cellulaire

Les cellules eucaryotes adhérentes sont cultivées dans leur milieu de culture supplémenté (avec sérum, antibiotiques et protéines) dans des flacons de culture 75 cm² (10 mL de milieu) ou 25 cm² (5 mL de milieu) à 37°C dans un incubateur humidifié avec 5 % de CO₂.

Lorsque le tapis cellulaire arrive à confluence (ensemble de la surface de culture cellulaire utilisée) s'accompagnant d'un arrêt de la prolifération cellulaire, les cellules doivent être passées. Cette manipulation consiste à retirer le milieu de culture par aspiration, laver à deux reprises les cellules avec 5 mL de PBS stérile puis les détacher de leur support en les incubant avec 2 mL de trypsine/EDTA 0,05 % à 37°C pendant 5 à 10 minutes. L'action de la trypsine est stoppée par effet de dilution en ajoutant 8 mL de milieu frais, ainsi que par l'action des inhibiteurs de protéases présents dans le milieu. Les cellules sont ensuite comptées grâce à une cellule de Malassez puis réensemencées à une densité plus faible (en général, 50 000 cellules/mL) dans un nouveau flacon de culture neuf.

Les lignées cellulaires sont, dès que possible, mises à congeler afin de les conserver sur de longues périodes. Pour cela, les cellules sont lavées, trypsinées et comptées pour préparer 1 mL d'une suspension de 5 à 8 millions de cellules dans du milieu de culture supplémenté avec 5 % de DMSO. Les ampoules de cellules sont congelées pendant une nuit à -80°C dans de l'isopropanol puis sont conservées dans l'azote liquide.

Après une dizaine de passages, les cellules dont le phénotype a pu changer sont éliminées et une nouvelle ampoule de cellules est décongelée. Pour cela, 5 mL de milieu de culture correspondant est mis dans un flacon de culture de 25 cm² et sont incubés pendant minimum 15 minutes à 37°C avec 5 % de CO₂. Une ampoule de cellules est ensuite décongelée environ 2 minutes dans un bain marie à 37°C, puis la suspension cellulaire est mélangée à 9 mL de milieu de culture pour diluer le DMSO. Le tube contenant la suspension cellulaire est ensuite centrifugé à 125 g pendant 10 minutes, puis le culot cellulaire est repris dans le milieu mis à pré-incuber. Les cellules sont ensuite laissées à adhérer sur le support pendant une nuit, puis sont passées le lendemain.

3) Expériences de cytométrie en flux

L'appareil utilisé est un cytomètre analyseur BD LSR FORTESSA (BD Biosciences, Le Pont de Claix) mis à disposition du plateau technique du Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée (LBFA, Grenoble). Il est équipé de deux lasers d'excitation :

- Laser bleu à 488 nm d'une puissance de 100 mW
- Laser vert à 532 nm d'une puissance de 50 mW

Pour nos analyses nous avons utilisés deux filtres d'émission différents :

- La fluorescence du FITC et de l'Alexa FluorTM 488 est recueillie grâce à un filtre BP (« Band-Pass ») 525/50
- La fluorescence de la PE est recueillie grâce à un filtre BP 575/26

(a) Dosage des cibles

Les intégrines $\alpha_v\beta_3$:

Les cellules proches de la confluence sont lavées, détachées de leur support et comptées. 1,5 millions de cellules sont récupérées et mises en suspension dans 1 mL de tampon HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, NaCl 8 g/L, KCl 0,4 mg/L, KH₂PO₄ 0,6 g/L, glucose 1 g/L, Na₂HPO₄ 0,048 g/L, MgSO₄ 0,098 g/L, CaCl 0,14 g/L, NaHCO₃ 0,35 g/L). Après centrifugation des cellules à 300 g pendant 5 minutes, les cellules sont fixées par ajout de 500 μ L de PFA à 4 % dans du tampon PBS pendant 10 minutes à 37°C, puis l'action du PFA est stoppée par incubation pendant 1 minute dans la glace. Après deux lavages au HBSS, les cellules sont reprises dans 200 μ L de milieu non-supplémenté puis 20 μ L d'une solution d'anticorps anti-CD51/CD61 couplés à une phycoérythrine y sont ajoutés (BD PharmingenTM, réf. 550037). Après 1 heure d'incubation à température ambiante, les cellules sont lavées une fois et reprises dans 1 mL de HBSS pour être finalement analysées au cytomètre en flux.

Les protéines EGFR :

Le protocole pour le dosage d'EGFR est pratiquement le même que celui décrit pour le dosage des intégrines, mis à part quelques différences :

- 1 million de cellules sont utilisées.
- Les lavages et l'incubation de l'anticorps se font dans du tampon PBS avec de la BSA (5 mg/mL).
- L'anticorps utilisé est un anticorps anti-EGFR couplé à une FITC (BD Transduction LaboratoriesTM, réf. 612554).

(b) Interaction cellule/TBM

L'interaction des TBMs sélectionnés pour les cellules a été évaluée par mesure de la fluorescence. Toutes les expériences ont été réalisées sur des cellules proches de la confluence qui sont lavées, détachées et comptées. 1 million de cellules par condition dans 1 mL de tampon HBSS sont utilisées. Dans le cas de l'interaction avec cRGDfK, les cellules sont laissées 20 minutes dans le HBSS à 4°C. Dans les autres cas, les cellules sont directement centrifugées. Tous les cycles de centrifugation se font à 300 g pendant 5 minutes. Après avoir culoté les cellules, ces dernières sont incubées avec le TBM dilué dans du milieu de culture non-supplémenté. Après incubation, les cellules sont centrifugées et lavées une fois avec du HBSS.

Les conditions d'incubation seront variables selon les TBMs et les périodes auxquelles ont été faites les expériences :

TBM	Concentration	Temps d'incubation	Température d'incubation
cRGDfK	5 μ M	1h	37°C
LARLLT	25 μ M	3h	TA
AZ	10 μ M	1h	TA
Glucose	50 μ M	1h	37°C
DEW	20 μ M	2h	37°C
PSY	25 μ M	2h	TA
HVH	25 μ M	2h	TA

Les cellules sont finalement reprises dans 1 mL de HBSS et sont analysées au cytomètre en flux.

(c) Interaction cellule/ARM

Dans le cas de l'évaluation de la liaison de l'ARM aux cellules, toutes les expériences seront rigoureusement menées dans les mêmes conditions.

Les cellules proches de la confluence sont lavées, détachées et comptées pour sélectionner 1,5 millions de cellules par condition. Les cellules sont resuspendues dans du tampon HBSS,

puis, après centrifugation à 300 g pendant 5 minutes, ces dernières sont fixées par ajout de 500 µL de PFA 4% dans du PBS pendant 10 minutes à 37°C, puis incubées dans la glace pendant 1 minute. Après deux lavages au tampon HBSS, les cellules sont incubées avec 500 µL d'ARM dilué dans du milieu DMEM non-supplémenté est mises en agitation pendant 1 heure à température ambiante. Après un lavage au HBSS, les cellules sont ensuite incubées, avec agitation, pendant 2 heures à température ambiante avec un anticorps primaire produit contre **43** (Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg, Allemagne) à 50 µg/mL dans du milieu de culture non-supplémenté. Après un dernier lavage au HBSS, les cellules sont finalement incubées avec un anticorps secondaire ciblant les IgG de lapin couplé à une phycoérythrine (dilué 500 fois dans 500 µl de DMEM non-supplémenté). Après 1 heure d'incubation sous agitation à température ambiante, les cellules sont lavées une fois avec du HBSS et reprises dans 1 mL de HBSS pour être analysées au cytomètre en flux.

(d) Recrutement des anticorps par l'ARM

Les cellules proches de la confluence sont lavées, détachées puis comptées pour sélectionner 1,5 millions de cellules par condition. Ces dernières sont mises en suspension dans 1 mL de tampon HBSS puis centrifugées à 300 g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est repris dans 500 µL de PFA 4 % dans le PBS pour fixer les cellules. Après 10 minutes d'incubation à 37°C, les cellules sont placées dans la glace pendant 1 minute. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois au HBSS puis sont incubées pendant 1 heure à température ambiante (avec agitation) avec 500 µL d'ARM dilué dans le milieu de culture DMEM non-supplémenté. Les cellules sont ensuite lavées une fois avec le tampon HBSS puis sont incubées et agitées pendant 2 heures à température ambiante avec du sérum humain commercial (Sigma-Aldrich®, réf. H4522) dilué dans du milieu non-supplémenté. Après un lavage au HBSS, la fixation des anticorps est révélée en ajoutant 500 µL d'anticorps secondaire anti-IgM humain couplé à un AlexaFluor™ 488 (Fisher Scientific, réf. 10012552) dilué 400 fois dans le milieu non-supplémenté. Après un dernier lavage au HBSS, les cellules sont reprises dans 1 mL de tampon HBSS pour être analysées au cytomètre en flux.

4) Expériences de microscopie à fluorescence

L'appareil qui a été utilisé est un microscope confocal Leica TCS SP8 CSU (laboratoire LBFA, Grenoble). Il est équipé d'un objectif HC PL APO CS2 40x/1,30 OIL. Les images de fluorescence ont été acquises grâce au logiciel Leica LAS X :

- Pour les analyses de FITC ou d'Alexa Fluor™ 488 (vert) : excitation grâce à un laser à 488 nm et émission recueillie grâce à un détecteur spectral permettant d'ajuster précisément la bande d'émission de 495 à 545 nm.
- Pour les analyses de PE (rouge) : excitation grâce à un laser à 552 nm et émission recueillie grâce à un détecteur spectral permettant d'ajuster précisément la bande d'émission de 650 à 740 nm.

Les images de microscopie à fluorescence obtenues et reportées dans le manuscrit ont été faites à partir de cellules traitées et destinées dans un premier temps à l'analyse par cytométrie en flux (cf. ci-dessus). Pour cela, une goutte de suspension cellulaire a été prélevée et déposée sur une coupelle avec fond en verre. L'analyse est faite 5 minutes après dépôt de la goutte afin de pouvoir regarder des cellules statiques.

Pour l'analyse de la liaison de l'ARM à la cellule, 10 µg/mL d'anticorps anti-43 ont été utilisés et les anticorps secondaires anti-IgG de lapin sont dilués 100 fois.

5) Expériences de viabilité cellulaire

(a) Par bioluminescence

Les cellules proches de la confluence sont lavées, détachées, comptées puis réensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits d'une microplaque à fond blanc à 96 puits. Pour cela, une dilution de 500 000 cellules/mL est faite dans du milieu de culture supplémenté et 100 µL de la suspension cellulaire sont ajoutés par puits. Les cellules sont laissées à adhérer sur la microplaque pendant une nuit à 37°C et 5 % de CO₂, puis le milieu de culture est enlevé à la pipette et un lavage est effectué avec du milieu non-supplémenté. 100 µL de molécule ARM diluée dans le milieu non-supplémenté est ensuite ajouté à chaque puits pendant 1 heure à température ambiante. Le contrôle sans ARM est fait en ajoutant uniquement du milieu non-supplémenté. Après cette incubation, les cellules sont lavées deux fois avec du milieu non-supplémenté, puis 100 µl de sérum humain dilué deux fois dans le même milieu est ajouté. Après une incubation de 2 heures à 37°C et 5 % de CO₂, la microplaque est sortie de l'incubateur (pour lui permettre un retour à température ambiante). Le kit contenant les différents réactifs est recomposé, puis, après 30 minutes, 100 µl de la solution du kit CellTiter-Glo® (Promega, réf. G7570) est ajouté dans chaque puits. La lyse cellulaire est réalisée par agitation pendant 2 minutes, puis celle-ci est laissée à incuber pendant 10 minutes à température ambiante pour permettre à la luciférase d'agir et au signal de bioluminescence

de se stabiliser. La bioluminescence de chaque puits est ensuite lue avec un lecteur de plaque SPECTRAmax[®] GEMINI XS (Molecular Devices, San José, CA, Etats-Unis) à 542 nm.

(b) Par absorbance

De la même manière que pour l'évaluation de la viabilité cellulaire par bioluminescence, les cellules sont détachées et comptées pour laisser adhérer 50 000 cellules/100 µL/puits, mais cette fois-ci dans une microplaque à fond transparent. Les cellules sont traitées comme décrit précédemment, jusqu'à la révélation. Celle-ci est réalisée par ajout d'une solution de MTT (2H-tétrazolium,2-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-3,5-diphényl-bromide, 5g/mL de PBS). Après 2 heures d'incubation des cellules avec le sérum humain dilué, puis un lavage au DMEM non-supplémenté, 110 µL d'une solution de MTT diluée 10 fois (0,5 mg/mL) est ajoutée à chaque puits. Les cristaux de formazan se forment après 1 à 4 heures d'incubation à 37°C et 5 % de CO₂ (dépendant du nombre et du type de cellules). Le milieu de culture est enlevé à la pipette et les cristaux sont dissous dans 100 µL de DMSO pendant 30 minutes à 37°C. L'absorbance de chaque puits est lue à 540 nm au lecteur de plaque POLARstar[®] Omega (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France).

VII. Annexes

A) Publications :

- Rideout MC, Liet B, Gasparutto D, Berthet N. A High-Throughput Screen for Detection of Compound-Dependent Phosphodiester Bond Cleavage at Abasic Sites. *Anal. Biochem.* 2016; **513**: 93–97; DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.08.028>.
- Liet B, Laigre E, Goyard D, Todaro B, Tiertant C, Boturyn D, Berthet N, Renaudet O. Multifunctional glycoconjugates for recruiting natural antibodies against cancer cells. *ChemEurJ.* 2009; in press; DOI:<https://doi.org/10.1002/chem.201903327>

B) Communications :

Posters :

- *Engineering of molecular systems for an innovative immunotherapeutic anti-tumoral approach*
Eugénie Laigre, Benjamin Liet, Carlo Pifferi, David Goyard, Nathalie Berthet, Didier Boturyn, Olivier Renaudet
5^{ème} édition de la Journée Rhône-Alpes de Biomolécules (JRAB)
Lyon-Villeurbanne, 7 juin 2016
Journée annuelle de la Société Chimique de France (SCF)
Grenoble, 9 juin 2016
- *Synthesis and study of multimeric peptide conjugates for selective binding of cancer cells*
Benjamin Liet, Joao P. Ribeiro, Nathalie Berthet, Didier Boturyn, Olivier Renaudet
34th European Peptide Symposium (EPS)
Leipzig, Allemagne, 4 au 9 septembre 2016

Présentations “flash” :

- *Synthesis and study of multimeric peptide conjugates for selective binding of cancer cells*
Benjamin Liet, Joao P. Ribeiro, Nathalie Berthet, Didier Boturyn, Olivier Renaudet
34th European Peptide Symposium (EPS)
Leipzig, Allemagne, 4 au 9 septembre 2016

Communications orales :

- *Synthesis and study of multimeric peptide conjugates for selective binding of cancer cells*
Benjamin Liet, Joao P. Ribeiro, Nathalie Berthet, Didier Boturyn, Olivier Renaudet
20^{ème} congress du Groupe Français des Peptide et Protéines (GFPP)
Arcachon, 26 au 30 mars 2017

- *Design, synthesis and study of multimeric peptide conjugates for a new approach of anti-tumoral immunotherapy*
Benjamin Liet, Eugénie Laigre, Didier Boturyn, Nathalie Berthet, Olivier Renaudet
35th European Peptide Symposium (EPS)
Dublin, Irlande, 26 au 31 août 2018

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, *100* (1), 57.
- (2) Slamon, D. J.; Clark, G. M.; Wong, S. G.; Levin, W. J.; Ullrich, A.; McGuire, W. L. *Science* (80-.). **1987**, *235* (4785), 177 LP.
- (3) Wright, W. E.; Pereira-Smith, O. M.; Shay, J. W. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9* (7), 3088 LP.
- (4) Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. *Br. J. Cancer* **1972**, *26* (4), 239.
- (5) Brooks, P. C.; Montgomery, A. M. P.; Rosenfeld, M.; Reisfeld, R. A.; Hu, T.; Klier, G.; Cheresch, D. A. *Cell* **1994**, *79* (7), 1157.
- (6) Ganguly, K. K.; Pal, S.; Moulik, S.; Chatterjee, A. *Cell Adh. Migr.* **2013**, *7* (3), 251.
- (7) Galmarini, D.; Galmarini, C. M.; Galmarini, F. C. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2012**, *84* (2), 181.
- (8) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737.
- (9) Pinkel, D. *Cancer Chemother Rep* **1961**, No. 12, 187.
- (10) Ultmann, J. E.; Hyman, G. A.; Gellhorn, A. *JAMA* **1956**, *162* (3), 178.
- (11) Gilman, A. *Am. J. Surg.* **1963**, *105* (5), 574.
- (12) Lichtman, M. A. *Blood Cells, Mol. Dis.* **2013**, *50* (2), 119.
- (13) Ellison, R. R.; Holland, J. F.; Weil, M.; Jacquillat, C.; Boiron, M.; Bernard, J.; Sawitsky, A.; Rosner, F.; Gussoff, B.; Silver, R. T.; Karanas, A.; Cuttner, J.; Spurr, C. L.; Hayes, D. M.; Blom, J.; Leone, L. A.; Haurani, F.; Kyle, R.; Hutchinson, J. L.; Forcier, R. J.; Moon, J. H. *Blood* **1968**, *32* (4), 507 LP.
- (14) Burchenal, J. H.; Murphy, M. L.; Ellison, R. R.; Sykes, M. P.; Tan, T. C.; Leone, L. A.; Karnof-sky, D. A.; Craver, L. F.; Dargeon, H. W.; Rhoads, C. P. *Blood* **1953**, *8* (11), 965 LP.
- (15) Krakoff, I. H.; Ellison, R. R.; Tan, C. T. C. *Cancer Res.* **1961**, *21* (8), 1015 LP.
- (16) Johnson, I. S.; Armstrong, J. G.; Gorman, M.; Burnett, J. P. *Cancer Res.* **1963**, *23* (8 Part 1), 1390 LP.
- (17) Rowinsky, E. K.; Donehower, R. C. *N. Engl. J. Med.* **1995**, *332* (15), 1004.
- (18) Basili, S.; Moro, S. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2009**, *19* (5), 555.
- (19) Tomasz, M. *Chem. Biol.* **1995**, *2* (9), 575.
- (20) Fisher, B. *Cancer Res.* **2008**, *68* (24), 10007 LP.
- (21) Gonzalez-Quintela, A.; Alende, R.; Gude, F.; Campos, J.; Rey, J.; Mejjide, L. M.; Fernandez-Merino, C.; Vidal, C. *Clin. Exp. Immunol.* **2008**, *151* (1), 42.
- (22) Ochs, H. D.; Wedgwood, R. J. *Annu. Rev. Med.* **1987**, *38* (1), 325.
- (23) Köhler, G.; Milstein, C. *Nature* **1975**, *256* (5517), 495.
- (24) Adams, G. P.; Weiner, L. M. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1147.
- (25) Kamen, L.; Myneni, S.; Langsdorf, C.; Kho, E.; Ordonia, B.; Thakurta, T.; Zheng, K.; Song, A.; Chung, S. *J. Immunol. Methods* **2019**, *468*, 55.
- (26) Wilson, F. R.; Coombes, M. E.; Wylie, Q.; Yurchenko, M.; Brezden-Masley, C.; Hutton, B.; Skidmore, B.; Cameron, C. *Syst. Rev.* **2017**, *6* (1), 196.
- (27) Salles, G.; Barrett, M.; Foà, R.; Maurer, J.; O'Brien, S.; Valente, N.; Wenger, M.; Maloney, D. G. *Adv. Ther.* **2017**, *34* (10), 2232.
- (28) Holubec, L.; Polivka, J.; Safanda, M.; Karas, M.; Liska, V. *Anticancer Res.* **2016**, *36* (9), 4421.
- (29) Diaz, R. J.; Ali, S.; Qadir, M. G.; De La Fuente, M. I.; Ivan, M. E.; Komotar, R. J. *J. Neurooncol.* **2017**, *133* (3), 455.
- (30) Minda, A. G.; Awel, F. S.; Seifudin, K. A.; Gezahegne, M. K. *J. Cancer Res. Exp. Oncol.* **2016**, *8* (2), 15.
- (31) Hansel, T. T.; Kropshofer, H.; Singer, T.; Mitchell, J. A.; George, A. J. T. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 325.
- (32) Coulson, A.; Levy, A.; Gossell-Williams, M. *West Indian Med. J.* **2014**, *63* (6), 650.

- (33) Nelson, D. L.; Poplack, D. G.; Holiman, B. J.; Henkart, P. A. *Clin. Exp. Immunol.* **1979**, 35 (3), 447.
- (34) Shearer, G. M. *Eur. J. Immunol.* **1974**, 4 (8), 527.
- (35) Six, H. R.; Uemura, K.; Kinsky, S. C. *Biochemistry* **1973**, 12 (20), 4003.
- (36) Capon, D. J.; Chamow, S. M.; Mordenti, J.; Marsters, S. A.; Gregory, T.; Mitsuya, H.; Byrn, R. A.; Lucas, C.; Wurm, F. M.; Groopman, J. E.; Broder, S.; Smith, D. H. *Nature* **1989**, 337 (6207), 525.
- (37) Byrn, R. A.; Mordenti, J.; Lucas, C.; Smith, D.; Marsters, S. A.; Johnson, J. S.; Cossum, P.; Chamow, S. M.; Wurm, F. M.; Gregory, T.; Groopman, J. E.; Capon, D. J. *Nature* **1990**, 344 (6267), 667.
- (38) Traunecker, A.; Schneider, J.; Kiefer, H.; Karjalainen, K. *Nature* **1989**, 339 (6219), 68.
- (39) Shokat, K. M.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113 (5), 1861.
- (40) Carlson, C. B.; Mowery, P.; Owen, R. M.; Dykhuizen, E. C.; Kiessling, L. L. *ACS Chem. Biol.* **2007**, 2 (2), 119.
- (41) Doppalapudi, V. R.; Tryder, N.; Li, L.; Aja, T.; Griffith, D.; Liao, F.-F.; Roxas, G.; Ramprasad, M. P.; Bradshaw, C.; Barbas, C. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17 (2), 501.
- (42) Popkov, M.; Gonzalez, B.; Sinha, S. C.; Barbas 3rd, C. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106 (11), 4378.
- (43) Murelli, R. P.; Zhang, A. X.; Michel, J.; Jorgensen, W. L.; Spiegel, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (47), 17090.
- (44) Slovin, S. F. *Expert Opin. Ther. Targets* **2005**, 9 (3), 561.
- (45) Srinivasarao, M.; Low, P. S. *Chem. Rev.* **2017**, 117 (19), 12133.
- (46) Humphries, M. J. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28 (4), 311 LP.
- (47) Hynes, R. O. *Cell* **2002**, 110 (6), 673.
- (48) Giancotti, F. G.; Ruoslahti, E. *Science (80-.)*. **1999**, 285 (5430), 1028 LP.
- (49) Aumailley, M.; Gurrath, M.; Müller, G.; Calvete, J.; Timpl, R.; Kessler, H. *FEBS Lett.* **1991**, 291 (1), 50.
- (50) Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Mathä, B.; Lohof, E.; Hölzemann, G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H. *J. Med. Chem.* **1999**, 42 (16), 3033.
- (51) Thumshirn, G.; Hersel, U.; Goodman, S. L.; Kessler, H. *Chem. – A Eur. J.* **2003**, 9 (12), 2717.
- (52) Garanger, E.; Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Favrot, M.-C.; Dumy, P. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4 (10), 1958.
- (53) Danhier, F.; Le Breton, A.; Pr eat, V. *Mol. Pharm.* **2012**, 9 (11), 2961.
- (54) Borgman, M. P.; Aras, O.; Geyser-Stoops, S.; Sausville, E. A.; Ghandehari, H. *Mol. Pharm.* **2009**, 6 (6), 1836.
- (55) Zhan, C.; Gu, B.; Xie, C.; Li, J.; Liu, Y.; Lu, W. *J. Control. Release* **2010**, 143 (1), 136.
- (56) Lammerts van Bueren, J. J.; Bleeker, W. K.; Br annstr om, A.; von Euler, A.; Jansson, M.; Peipp, M.; Schneider-Merck, T.; Valerius, T.; van de Winkel, J. G. J.; Parren, P. W. H. I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105 (16), 6109 LP.
- (57) Hynes, N. E.; MacDonald, G. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, 21 (2), 177.
- (58) Arteaga, C. L. *Exp. Cell Res.* **2003**, 284 (1), 122.
- (59) Mendelsohn, J.; Baselga, J. *J. Clin. Oncol.* **2003**, 21 (14), 2787.
- (60) Song, S.; Liu, D.; Peng, J.; Deng, H.; Guo, Y.; Xu, L. X.; Miller, A. D.; Xu, Y. *FASEB J.* **2009**, 23 (5), 1396.
- (61) Viehweger, K.; Barbaro, L.; Garc a, K. P.; Joshi, T.; Geipel, G.; Steinbach, J.; Stephan, H.; Spiccia, L.; Graham, B. *Bioconjug. Chem.* **2014**, 25 (5), 1011.
- (62) Zhao, N.; Williams, T. M.; Zhou, Z.; Fronczek, F. R.; Sibrian-Vazquez, M.; Jois, S. D.; Vicente, M. G. H. *Bioconjug. Chem.* **2017**, 28 (5), 1566.
- (63) Pastorekova, S.; Parkkila, S.; Pastorek, J.; Supuran, C. T. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2004**, 19 (3), 199.

- (64) Chrastina, A.; Závada, J.; Parkkila, S.; Kaluz, Š.; Kaluzová, M.; Rajčáni, J.; Pastorek, J.; Pastoreková, S. *Int. J. Cancer* **2003**, *105* (6), 873.
- (65) Ditte, P.; Dequiedt, F.; Svastova, E.; Hulikova, A.; Ohradanova-Repic, A.; Zatovicova, M.; Csaderova, L.; Kopacek, J.; Supuran, C. T.; Pastorekova, S.; Pastorek, J. *Cancer Res.* **2011**, *71* (24), 7558 LP.
- (66) Supuran, C. T.; Briganti, F.; Tilli, S.; Chegwidde, W. R.; Scozzafava, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9* (3), 703.
- (67) Teicher, B. A.; Liu, S. D.; Liu, J. T.; Holden, S. A.; Herman, T. S. *Anticancer Res.* **1993**, *13* (5A), 1549.
- (68) Ahlskog, J. K. J.; Dumelin, C. E.; Trüssel, S.; Mårlind, J.; Neri, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (16), 4851.
- (69) Lv, P. C.; Putt, K. S.; Low, P. S. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (7), 1762.
- (70) Effert, P.; Beniers, A. J.; Tamimi, Y.; Handt, S.; Jakse, G. *Anticancer Res.* **2004**, *24* (5A), 3057.
- (71) Patching, S. *J. Diagnostic Imaging Ther.* **2015**, *2* (1), 30.
- (72) Rigo, P.; Paulus, P.; Kaschten, B. J.; Hustinx, R.; Bury, T.; Jerusalem, G.; Benoit, T.; Foidart-Willems, J. *Eur. J. Nucl. Med.* **1996**, *23* (12), 1641.
- (73) van Westreenen, H. L.; Cobben, D. C. P.; Jager, P. L.; van Dullemen, H. M.; Wesseling, J.; Elsinga, P. H.; Plukker, J. T. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46* (3), 400.
- (74) *Drugs R D* **2005**, *6* (1), 49.
- (75) Ammons, W. S.; Wang, J.-W.; Yang, Z.; Tidmarsh, G. F.; Hoffman, R. M. *Neoplasia* **2007**, *9* (8), 625.
- (76) Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1998**, *37* (20), 2754.
- (77) Roy, R.; Shiao, T. C. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (12), 3924.
- (78) Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4* (6), 696.
- (79) Gingras, M.; Chabre, Y. M.; Roy, M.; Roy, R. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (11), 4823.
- (80) Chabre, Y. M.; Roy, R. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (11), 4657.
- (81) Mattarella, M.; Berstis, L.; Baldrige, K. K.; Siegel, J. S. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (1), 115.
- (82) König, B.; Fricke, T.; Waßmann, A.; Krallmann-Wenzel, U.; Lindhorst, T. K. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (16), 2307.
- (83) Maraval, V.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P.; Blais, J.-C. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2003**, *42* (16), 1822.
- (84) Baldini, L.; Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (2), 254.
- (85) Sansone, F.; Casnati, A. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (11), 4623.
- (86) Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36* (4), 246.
- (87) Galan, M. C.; Dumy, P.; Renaudet, O. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (11), 4599.
- (88) Ortiz Mellet, C.; Defaye, J.; García Fernández, J. M. *Chem. – A Eur. J.* **2002**, *8* (9), 1982.
- (89) Fulton, D. A.; Stoddart, J. F. *Org. Lett.* **2000**, *2* (8), 1113.
- (90) Martínez, Á.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (11), 4746.
- (91) Jiménez Blanco, J. L.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (11), 4518.
- (92) Nierengarten, I.; Nierengarten, J.-F. *Chem. – An Asian J.* **2014**, *9* (6), 1436.
- (93) Mutter, M.; Altmann, E.; Altmann, K.-H.; Hersperger, R.; Koziej, P.; Nebel, K.; Tuchsecherer, G.; Vuilleumier, S.; Gremlich, H.-U.; Müller, K. *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71* (4), 835.
- (94) Mutter, M. *Trends Biochem. Sci.* **1988**, *13* (7), 260.
- (95) Boturyn, D.; Defrancq, E.; Dolphin, G. T.; Garcia, J.; Labbe, P.; Renaudet, O.; Dumy, P. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14* (2), 224.

- (96) Pifferi, C.; Berthet, N.; Renaudet, O. *Biomater. Sci.* **2017**, *5* (5), 953.
- (97) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004.
- (98) Tang, W.; Becker, M. L. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (20), 7013.
- (99) Huisgen, R.; Christl, M. *Angew. Chemie* **1967**, *79* (10), 471.
- (100) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596.
- (101) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057.
- (102) Yi-An, L.; Clavijo, P.; Galantino, M.; Zhi-Yi, S.; Wen, L.; Tam, J. P. *Mol. Immunol.* **1991**, *28* (6), 623.
- (103) Kottari, N.; Chabre, Y. M.; Shiao, T. C.; Rej, R.; Roy, R. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (16), 1983.
- (104) Fiore, M.; Daskhan, G. C.; Thomas, B.; Renaudet, O. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1557.
- (105) Jin, Z.-H.; Tsuji, A. B.; Degardin, M.; Sugyo, A.; Yoshii, Y.; Nagatsu, K.; Zhang, M.-R.; Fujibayashi, Y.; Dumy, P.; Boturyn, D.; Higashi, T. *EJNMMI Res.* **2018**, *8* (1), 54.
- (106) Thoreau, F.; Vanwonderghem, L.; Henry, M.; Coll, J.-L.; Boturyn, D. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (22), 4101.
- (107) Kajouj, S.; Marcelis, L.; Mattiuzzi, A.; Grassin, A.; Dufour, D.; Van Antwerpen, P.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Surin, M.; De Winter, J.; Gerbaux, P.; Jabin, I.; Moucheron, C. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 1758.
- (108) Foillard, S.; Dumy, P.; Boturyn, D. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (20), 4159.
- (109) Grassin, A.; Jourdan, M.; Dumy, P.; Boturyn, D. *ChemBioChem* **2016**, *17* (6), 515.
- (110) Jin, Z.; Jossierand, V.; Razkin, J.; Garanger, E.; Boturyn, D.; Favrot, M.-C.; Dumy, P.; Coll, J. *Mol. Imaging* **2006**, *5* (3), 7290.2006.00022.
- (111) Jin, Z.-H.; Jossierand, V.; Foillard, S.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Favrot, M.-C.; Coll, J.-L. *Mol. Cancer* **2007**, *6* (1), 41.
- (112) Lanza, P.; Felding-Habermann, B.; Ruggeri, Z. M.; Zanetti, M.; Billetta, R. *Blood Cells, Mol. Dis.* **1997**, *23* (2), 230.
- (113) Choi, J.; Rustique, E.; Henry, M.; Guidetti, M.; Jossierand, V.; Sancey, L.; Boutet, J.; Coll, J.-L. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532* (2), 677.
- (114) Raposo Moreira Dias, A.; Boderio, L.; Martins, A.; Arosio, D.; Gazzola, S.; Belvisi, L.; Pignataro, L.; Steinkühler, C.; Dal Corso, A.; Gennari, C.; Piarulli, U. *ChemMedChem* **2019**, *14* (9), 938.
- (115) Kessler, T.; Bieker, R.; Padró, T.; Schwöppe, C.; Persigehl, T.; Bremer, C.; Kreuter, M.; Berdel, W. E.; Mesters, R. M. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11* (17), 6317 LP.
- (116) Alam, I. S.; Witney, T. H.; Tomasi, G.; Carroll, L.; Twyman, F. J.; Nguyen, Q.-D.; Aboagye, E. O. *Mol. Imaging Biol.* **2014**, *16* (4), 558.
- (117) Felding-Habermann, B.; Mueller, B. M.; Romerdahl, C. A.; Cheresh, D. A. *J. Clin. Invest.* **1992**, *89* (6), 2018.
- (118) Gavrilyuk, J. I.; Wuellner, U.; Salahuddin, S.; Goswami, R. K.; Sinha, S. C.; Barbas, C. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (14), 3716.
- (119) Smith, G. P. *Science (80-.)*. **1985**, *228* (4705), 1315 LP.
- (120) Cwirla, S. E.; Peters, E. A.; Barrett, R. W.; Dower, W. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1990**, *87* (16), 6378 LP.
- (121) Devlin, J. J.; Panganiban, L. C.; Devlin, P. E. *Science (80-.)*. **1990**, *249* (4967), 404 LP.
- (122) Scott, J. K.; Smith, G. P. *Science (80-.)*. **1990**, *249* (4967), 386 LP.
- (123) van Wezenbeek, P. M. G. F.; Hulsebos, T. J. M.; Schoenmakers, J. G. G. *Gene* **1980**, *11* (1), 129.
- (124) Beck, E.; Zink, B. *Gene* **1981**, *16* (1), 35.
- (125) Hill, D. F.; Petersen, G. B. *J. Virol.* **1982**, *44* (1), 32.
- (126) Glucksman, M. J.; Bhattacharjee, S.; Makowski, L. *J. Mol. Biol.* **1992**, *226* (2), 455.
- (127) Wickner, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1976**, *73* (4), 1159.

- (128) Kremser, A.; Rasched, I. *Biochemistry* **1994**, *33* (46), 13954.
- (129) Simons, G. F. M.; Konings, R. N. H.; Schoenmakers, J. G. G. *Biochemistry* **1981**, *78* (7), 4194.
- (130) Yu, D.; Du, Z.; Li, W.; Chen, H.; Ye, S.; Hoffman, A. R.; Cui, J.; Hu, J.-F. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *42* (2), 519.
- (131) Liu, G.; Yin, Q.; Ji, H.; Wang, Y.; Liu, H.; Jiang, L.; Zhu, F.; Li, B. *Drug Des. Devel. Ther.* **2018**, *Volume 12*, 3899.
- (132) Lu, Y.; Low, P. S. *Cancer Immunol. Immunother.* **2002**, *51* (3), 153.
- (133) Low, P. S.; Henne, W. A.; Doorneweerd, D. D. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (1), 120.
- (134) Lu, Y.; You, F.; Vlahov, I.; Westrick, E.; Fan, M.; Low, P. S.; Leamon, C. P. *Mol. Pharm.* **2007**, *4* (5), 695.
- (135) Galili, U. *Immunol. Cell Biol.* **2005**, *83* (6), 674.
- (136) McEnaney, P. J.; Fitzgerald, K. J.; Zhang, A. X.; Douglass, E. F.; Shan, W.; Balog, A.; Kolesnikova, M. D.; Spiegel, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (52), 18034.
- (137) Sheridan, R. T. C.; Hudon, J.; Hank, J. A.; Sondel, P. M.; Kiessling, L. L. *ChemBioChem* **2014**, *15* (10), 1393.
- (138) Chen, W.; Gu, L.; Zhang, W.; Motari, E.; Cai, L.; Styslinger, T. J.; Wang, P. G. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (2), 185.
- (139) Douglass, E. F.; Miller, C. J.; Sparer, G.; Shapiro, H.; Spiegel, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (16), 6092.
- (140) Zhu, A.; Hurst, R. *Xenotransplantation* **2002**, *9* (6), 376.
- (141) Crouch, S. P. M.; Kozlowski, R.; Slater, K. J.; Fletcher, J. J. *Immunol. Methods* **1993**, *160* (1), 81.
- (142) Li, X.; Rao, X.; Cai, L.; Liu, X.; Wang, H.; Wu, W.; Zhu, C.; Chen, M.; Wang, P. G.; Yi, W. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11* (5), 1205.
- (143) Galibert, M.; Dumy, P.; Boturyn, D. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48* (14), 2576.
- (144) Vogel, K.; Glettenberg, M.; Schroeder, H.; Niemeyer, C. M. *Small* **2013**, *9* (2), 255.

Conception, synthèse et étude de conjugués peptidiques multimériques pour la reconnaissance sélective des cellules cancéreuses

Malgré des progrès significatifs dans le domaine de la thérapie antitumorale, les traitements actuels souffrent d'inconvénients majeurs. L'immunothérapie antitumorale est devenue au cours des dernières décennies une alternative idéale pour améliorer le traitement des patients atteints de cancer. Il existe néanmoins très peu de traitements disponibles aujourd'hui et une majorité de problèmes persistent (effets secondaires, coût de production ...). Dans ce contexte, nous nous intéressons à la conception de nouvelles structures bimodales appelées « Antibody-Recruiting Molecules » capables de se lier sélectivement aux cellules cancéreuses et de recruter des anticorps endogènes pour induire la destruction des cellules par réponse immunitaire, et cela sans nécessité d'immunisation préalable du patient. L'objectif de ma thèse était de synthétiser un module de reconnaissance affin et sélectif des cellules cancéreuses. Nous avons pour cela choisi dans un premier temps des ligands largement utilisés dans des thérapies anticancéreuses ciblées que nous avons présenté de manière multivalente pour essayer d'améliorer la reconnaissance de leur cible. Nous avons, dans un second temps, identifié de nouveaux ligands peptidiques des cellules cancéreuses en utilisant la technique du Phage Display. Les molécules ARMs finales combinant les modules de reconnaissance des cellules sélectionnés ainsi que les modules de liaison aux anticorps, sélectionnés dans le cadre d'autres travaux dans notre équipe, ont finalement été synthétisées. Nous avons analysé par cytométrie en flux leur capacité à interagir avec la cellule ainsi que leur capacité à recruter des anticorps endogènes présents dans du sérum humain. Nous avons pu ainsi observer la formation d'un complexe ternaire cellule/ARM/anticorps, étape clé pour induire une réponse immunitaire efficace. Ces études nous ont permis de sélectionner la meilleure architecture.

Mots-clés : Immunothérapie anticancéreuse, peptides, multivalence, Phage Display, cytométrie en flux, microscopie confocale, châssis peptidiques

Design, synthesis and study of multimeric peptide conjugates for selective binding of cancer cells

Despite significant progresses in the antitumoral therapy field, actual treatments suffer from major issues. The antitumoral immunotherapy became, in the last decades, an ideal alternative to improve the treatment of patients with cancer. There is still few available treatments nowadays and numbers of issues persist (side effects, production cost ...). In this context, we are interested in the design of new bimodal structures called Antibody-Recruiting Molecules able to bind selectively to cancer cells and recruit endogen antibodies to induce the cells destruction by immune response without a preimmunization of the patient. The goal of my thesis was to synthesize an affine and selective cell binding module. To this end, we first chose ligands already used in targeted antitumoral therapies, presented in a multivalent fashion to try to improve the binding to their target. Secondly, we identified new peptidic ligands for cancer cells by using the Phage Display technique. The final ARM molecules combining the tumoral-binding module and the antibody-binding module (selected from another work in our team) were finally synthesized. We analyzed with flow cytometry their ability to interact with the cell and their ability to recruit endogen antibodies present in the human serum. We observed the formation of a ternary complex between cells, ARM and antibodies, a key step to induce a potent immune response. These studies allow us to select the best architecture.

Keywords: Antitumoral immunotherapy, peptides, multivalency, Phage Display, flow cytometry, confocal microscopy, peptide scaffolds.