



HAL
open science

Etude et caractérisation du rituximab sur surface antigénique : conception de mimes d'anticorps

Laure Bar

► **To cite this version:**

Laure Bar. Etude et caractérisation du rituximab sur surface antigénique : conception de mimes d'anticorps. Autre. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV061 . tel-03034338

HAL Id: tel-03034338

<https://theses.hal.science/tel-03034338>

Submitted on 1 Dec 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

Laure BAR

Thèse dirigée par **Didier BOTURYN**, Directeur de recherche, CNRS
et co-dirigée par **Liliane GUERENTE**, Maître de Conférences, UGA
préparée au sein du **Département de Chimie Moléculaire**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Etude et caractérisation du rituximab sur surface antigénique : Conception de mimes d'anticorps

Thèse soutenue publiquement le **27 novembre 2019**,
devant le jury composé de :

Mr Carmelo DI PRIMO

Chargé de Recherche, Inserm, Bordeaux, Rapporteur

Mr Franck MOLINA

Directeur de Recherche, CNRS Délégation Occitanie Est, Rapporteur

Mme Fouzia BOULMEDAIS

Directeur de Recherche, CNRS Délégation Alsace, Examinatrice

Mme Catherine PICART

Professeur des Universités, Grenoble, Présidente

Mr Didier BOTURYN

Directeur de Recherche, CNRS Délégation Alpes, Directeur de thèse

Mme Liliane GUERENTE

Maître de conférences, Grenoble, Co-directrice de thèse

Mr Jérôme DEJEU

Maître de conférences, Grenoble, Membre invité



Remerciements

Ces travaux de recherche sont le fruit de trois années passées au sein de l'équipe Ingénierie et Interactions Biomoléculaires (I2BM) du département de chimie moléculaire de Grenoble. Cette thèse n'aurait pas été réalisée sans le soutien de l'Ecole doctorale Chimie et Science du Vivant qui a financé mon allocation de recherche.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude au Dr Carmelo Di Primo, Dr Franck Molina, Dr Fouzia Boulmedais, et au Professeur Catherine Picart qui m'ont fait l'honneur d'accepter de rapporter ou d'examiner ce travail.

J'adresse de sincères remerciements à mes deux directeurs de thèse : Dr Didier Boturyn et Dr Liliane Guerente. Didier, merci de m'avoir proposé ce sujet qui m'a passionné du début à la fin, de m'avoir accordé ta confiance, et de m'avoir offert la chance de développer mes connaissances même hors de France. Liliane, merci pour ta disponibilité, ta gentillesse, ton soutien et ton implication sans faille jusqu'à la correction de ce manuscrit. J'espère que ton envie constante d'aller plus loin dans les interprétations m'aura été transmise.

Je remercie chaleureusement les autres personnes du laboratoire ayant participé de près ou de loin au projet, en particulier le Dr Jérôme Dejeu, qui m'a initiée aux techniques de caractérisation de surface. Merci d'avoir continué de me suivre avec autant d'entrain, d'engagement, et de bienveillance que lorsque j'étais ta stagiaire, mais aussi de me pousser toujours vers l'avant. Merci également au Dr Angéline Van der Heyden et Hugues Bonnet pour leur aide et leur soutien. Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance envers Rémy Lartia, toujours présent pour débloquer le matériel de laboratoire, qui a participé à mon apprentissage concernant la synthèse peptidique et m'a aidé à interpréter les révélations des membranes SPOT. Merci à Sabine Chierici pour ses conseils avisés, Océane Thery Pirinen qui a

contribué à l'élaboration du système macromoléculaire synthétisé lors de ce projet, ainsi qu'à Jordan Cossu et Romain Babel pour leur implication lors de leur stage de M1.

Je remercie le Dr Hélène Jamet qui m'a fait découvrir avec enthousiasme le monde de la dynamique moléculaire.

Je remercie l'équipe Sys2Diag (Montpellier), qui en appliquant la méthode SPOT à ce projet, m'a fourni des bases solides sur lesquelles appuyer mes travaux. Une petite pensée se porte particulièrement pour le Dr Gudrun Aldrian qui, lors de notre rencontre au congrès du GFPP, m'a éclairée avec gentillesse sur plusieurs points.

J'aimerais aussi présenter mes remerciements au Dr Ralf Richter qui m'a accueillie dans son laboratoire au sein de l'université de Leeds afin de me former à l'ellipsométrie. Merci à Fouzia Bano qui m'a appris avec beaucoup de patience à utiliser cette instrumentation. Je tiens par ailleurs à remercier le groupe français des peptides et protéines d'avoir accepté de financer en partie cette mobilité.

Je remercie l'institut de chimie moléculaire de Grenoble pour m'avoir chaque jour donné accès à ses plateaux *Caractérisation des interactions* et *Synthèse de biomolécules*.

Je tiens à remercier toutes les personnes du laboratoire : permanents, doctorants, post-docs, gestionnaires administratives, qui m'ont côtoyée tout au long de ces trois (trop courtes) années.

Enfin, un grand merci à mes amis pour qui la distance n'a pas d'importance, ainsi qu'à ma famille qui, durant tout mon cursus scolaire, m'a toujours encouragée moralement et soutenue financièrement afin que je puisse faire ce que j'aime.

Sommaire

Liste des acides aminés	1
Abréviations	2
Avant-propos	5

Chapitre I : Introduction générale

I. Conception de mimes d'anticorps monoclonaux (mAbs)	11
I.1. Les mAbs : un outil thérapeutique puissant.....	11
I.2. Les dérivés ou mimes de mAbs : des alternatives avantageuses et innovantes	15
I.2.a. Les immunoconjugués	16
I.2.b. Les fragments d'anticorps.....	17
I.2.c. Les mimes synthétiques d'anticorps.....	19
I.3. Cas du rituximab	23
I.4. Conception de mimes du rituximab.....	26
II. Analyse des interactions biomoléculaires et techniques de surface	26
II.1. Biospécificité et biosélectivité des interactions biomoléculaires.....	27
II.2. Paramètres caractéristiques d'une interaction biomoléculaire	27
II.3. Caractérisation des interactions biomoléculaires	29
II.4. Principes des techniques de caractérisation de surface et d'interface	33
II.4.a. L'ellipsométrie spectroscopique (SE).....	33
II.4.b. La microbalance à quartz avec suivi de dissipation d'énergie (QCM-D)	36
II.4.c. La résonance plasmonique de surface (SPR).....	38
II.5. Méthodes de détermination des paramètres cinétiques k_{on} , k_{off} , et thermodynamique K_D des interactions biomoléculaires.....	41
II.5.a. L'isotherme de Langmuir	41
II.5.b. Représentation de Scatchard.....	42
II.5.c. Le modèle cinétique dans le cas d'interaction monovalente	43
II.5.d. Le modèle cinétique dans le cas d'une interaction bivalente	43
II.6. La fonctionnalisation sur surface d'or.....	44
II.6.a. Le greffage sur polymère	45
II.6.b. Les monocouches auto-assemblées.....	45
III. Présentation des travaux de thèse	48

Chapitre II : Développement d'une surface antigénique

I. Choix du mode de greffage de l'antigène sur la surface	53
I.1. Introduction.....	53
I.2. Stratégies envisagées.....	54
I.3. La CuAAC	59
II. Fonctionnalisation de surface par l'épitope CD20	61
II.1. Préparation et caractérisation de la SAM-azoture	61
II.2. Optimisation des conditions de chimie « click » par électrochimie	64
II.3. Formation de surfaces antigéniques par chimie click.....	66
II.3.a. Suivi du greffage par QCM-D.....	67
II.3.b. Suivi du greffage par SPR.....	68
II.3.c. Suivi du greffage par PM-IRRAS.....	70
III. Caractérisation de la surface antigénique	72
III.1. Détermination de la densité surfacique et de l'épaisseur de la couche de CD20	72
III.1.a. Caractérisation par QCM-D.....	72
III.1.b. Caractérisation par SE couplée à la QCM-D.....	73
III.1.c. Caractérisation par SPR.....	78
III.1.d. Discussion	79
III.2. Détermination du taux d'hydratation	82
III.3. Détermination de l'espace inter-antigène	85
IV. Conclusion.....	85

Chapitre III : Caractérisation de l'interaction CD20/rituximab

I. Choix du modèle SPR.....	89
I.1. Interaction mono ou bivalente ?	89
I.2. Modèle hétérogène	90
II. Propriétés de reconnaissance et spécificité de la surface antigénique ..	92

II.1. Impact de la voie in ou ex situ	92
II.2. Impact de la nature du tampon	93
II.3. Spécificité de la surface antigénique	94
III. Impact de la densité surfacique en antigène sur l'interaction Ag/Ac....	96
III.1. Modulation du K_D en fonction de la densité surfacique en antigène	97
III.1.a. Etude par SPR	97
III.1.b. Etude par QCM.....	101
III.1.c. Comparaison SPR / QCM-D	103
III.2. Etude d'interaction avec le Fab	106
III.3. Discussion	109
III.4. Corrélation avec l'efficacité clinique du rituximab	113
IV. Conclusion	116

Chapitre IV : Etude des CDR - Détermination des séquences peptidiques en interaction avec le CD20

I. Explorations de l'interaction Ag/Ac par cristallographie	119
II. Explorations de l'interaction Ag/Ac par la méthode SPOT	123
II.1. Principe.....	123
II.2. Résultats.....	127
III. Analyse de l'interaction Ag/Ac par SPR	133
III.1. Séquences analysées par SPR	133
III.2. Conditions expérimentales d'analyse SPR.....	134
III.3. Résultats du criblage	137
III.4. Détermination des acides aminés critiques par <i>Ala-Scan</i>	140
IV. Complémentarité des trois techniques	146
V. Dynamique moléculaire	149
V.1. Principe général.....	149
V.2. Application à l'interaction CD20 / rituximab.....	151
VI. Conclusion	152

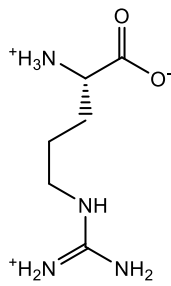
Chapitre V : Conception de mimes du Rituximab

I. La multivalence	157
II. Présentation des mimes du rituximab	159
II.1. Les peptides linéaires.....	160
II.2. Le système macromoléculaire.....	160
III. Résultats	161
III.1. Les peptides linéaires.....	161
III.1.a. Synthèses.....	161
III.1.b. Analyses SPR.....	162
III.2. Le système macromoléculaire.....	164
IV. Conclusion.....	170
Conclusion et perspectives	171
Partie expérimentale.....	177
I. Résonance plasmonique de surface	179
I.1. Appareillage et réactifs	179
I.2. Préparation de la solution de réactifs de chimie « click ».....	179
I.3. Etudes cinétiques CD20/rituximab suite à une capture streptavidine/biotine.....	180
I.3.a. Préparation des surfaces	180
I.3.b. Etudes d'interactions avec le rituximab	181
I.4. Greffage des peptides « CD20 » et « CD20 scramble » par CuAAC	182
I.4.a. Fonctionnalisation « ex situ ».....	182
I.4.b. Fonctionnalisation « in situ »	182
I.5. Etudes cinétiques CD20/rituximab suite à la CuAAC	183
I.6. Etudes cinétiques CD20/fragments de rituximab.....	184
II. BioLayer interférométrie	184
II.1. Appareillage et réactifs	184
II.2. Etudes cinétiques par capture streptavidine / biotine	184

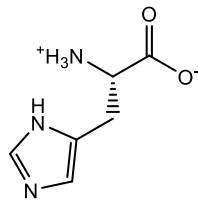
II.2.a. Préparation des biocapteurs.....	184
II.2.b. Etudes d'interactions avec le rituximab.....	185
III. Angles de contact	185
III.1. Appareillage et réactifs	185
III.2. Etudes d'angles de contact.....	186
IV. Microbalance à quartz	186
IV.1. Appareillage et réactifs	186
IV.2. Préparation de la solution de réactifs de chimie « click ».....	187
IV.3. Suivi du greffage du ferrocène-alcyne par CuAAC.....	187
IV.3.a. Préparation des surfaces	187
IV.3.b. Greffage de l'éthynylferrocène.....	187
IV.4. Suivi du greffage du CD20 ou du « CD20 scramble » par CuAAC.....	188
IV.4.a. Préparation des surfaces	188
IV.4.b. Greffage du CD20 ou du « CD20 scramble ».....	188
IV.5. Echange de solvant H ₂ O/D ₂ O	189
IV.6. Etudes de l'interaction CD20/rituximab	189
V. Voltamétrie cyclique.....	190
V.1. Appareillage et réactifs	190
V.2. Etudes électrochimiques.....	190
VI. PM-IRRAS	191
VII. Ellipsométrie spectroscopique couplée à la QCM-D	191
VII.1. Appareillage et réactifs	191
VII.2. Etudes ellipsométriques.....	192
VIII. Génération du Fab	193
VIII.1. Appareillage et réactifs	193
VIII.2. Génération des fragments	193
VIII.3. Purification des Fab	194
VIII.4. Dosage des Fab.....	194
VIII.5. Vérification par gel d'électrophorèse	195
VIII.5.a. Appareillage et réactifs.....	195
VIII.5.b. Composition des gels.....	195
VIII.5.c. Réalisation du gel SDS-PAGE natif	195

IX. Etude de l'interaction Ag/Ac par cristallographie	196
X. Méthode SPOT	196
X.1. Préparation des membranes	196
X.1.a. Appareillage	196
X.1.b. Préparation des membranes	197
X.2. Révélation des membranes	197
X.2.a. Appareillage	197
X.2.b. Révélation	197
XI. Dynamique moléculaire	198
XII. Synthèse	198
XII.1. Appareillage et réactifs	198
XII.2. Synthèse des peptides linéaires par SPPS	199
XII.3. Modifications post-synthèse	200
XII.3.a. Formation des ponts disulfure	200
XII.3.b. Ajout d'une fonction alcyne au CD20	200
XII.3.c. Formation d'un groupement aldéhyde en N-term	201
XII.3.d. Cyclisation du RAFT par couplage peptidique	201
XII.3.e. Ajout de fonctions oxyamine sur le RAFT	201
XII.3.f. Couplage oxime	202
XII.4. Peptides formés	203

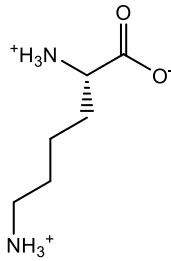
Liste des acides aminés



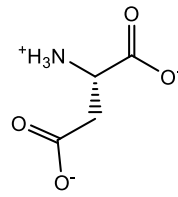
Arginine
Arg, R



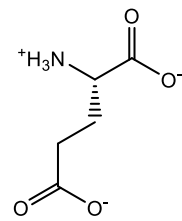
Histidine
His, H



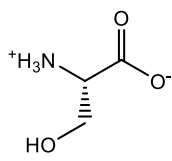
Lysine
Lys, K



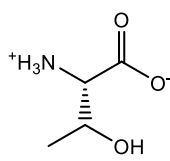
Acide aspartique
Asp, D



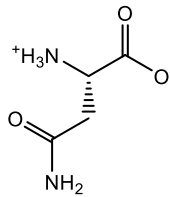
Acide glutamique
Glu, E



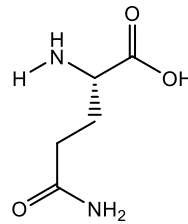
Sérine
Ser, S



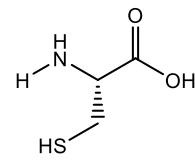
Thréonine
Thr, T



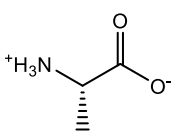
Asparagine
Asn, N



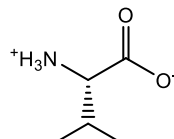
Glutamine
Gln, Q



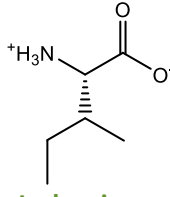
Cystéine
Cys, C



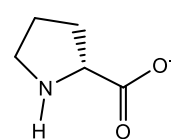
Alanine
Ala, A



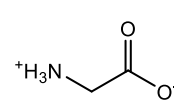
Valine
Val, V



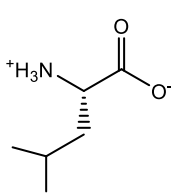
Isoleucine
Ile, I



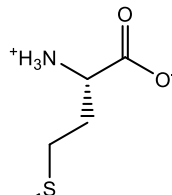
Proline
Pro, P



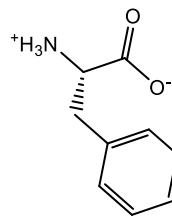
Glycine
Gly, G



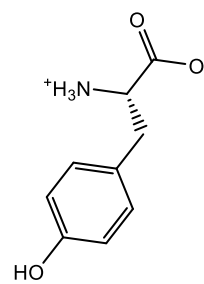
Leucine
Leu, L



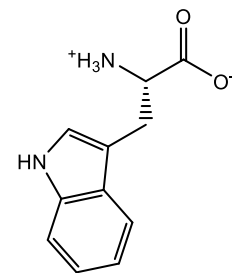
Méthionine
Met, M



Phénylalanine
Phe, F



Tyrosine
Tyr, Y



Tryptophane
Trp, W

— L - Acide aminé basique
 — L - Acide aminé polaire non chargé
 — Cas spéciaux
— L - Acide aminé acide
 — L - Acide aminé hydrophobe
 +, - : charges à pH 7,4

Abréviations

Pour rester fidèle à la signification des acronymes anglophones, ceux-ci ne seront pas traduits.

A

Ab Antibody
Ac Anticorps
ADC Antibody Drug Conjugate
ADCC Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
ADCP Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis
AFM Atomic Force Spectroscopy
Ag Antigène
Alloc Allyloxycarbonyl
AoA Acide aminooxyacétique
AON Antisens Oligonucleotide

B

BLI Biolayer interferometry
BOC tert-butoxycarbonyl
BRET Bioluminescence Resonance Energy Transfer
BSA Bovine Serum Albumine

C

CDC Complement Dependent Cytotoxicity
CDR Complementarity Determining Region
Chaîne H Chaîne lourde
Chaîne L Chaîne légère
CHO Chinese Hamster Ovary

D

DIC N,N'-Diisopropylcarbodiimide
DIEA N,N-Diisopropyléthylamine
DMF Diméthylformamide
DMSO Diméthylsulfoxyde
DNP Dinitrophénol
DSC Differential Scanning Calorimetry

E

EDC 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride
EGFR Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMSA Electrophoretic Mobility Shift Assay

F

Fab Fragment of Antigen Binding
Fc Fragment Crystallizable
FcR Fc Receptor
Fmoc 9-fluorenylméthoxycarbonyl
FRET Fluorescence resonance energy transfert

H

HBTU O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetraméthyluronium hexafluorophosphate
HER Human Epidermal Growth Factor Receptor
HOBt Hydroxybenzotriazole
HPLC High Performance Liquid Chromatography
HSA Human Serum Albumine
HS-AFM High-Speed - Atomic Force Spectroscopy

I

Ig Immunoglobuline
IgNAR Immunoglobulin New Antigen Receptor
ITC Isothermal Titration Calorimetry

L

LLC Leucémie lymphoïde chronique

M

mAb monoclonal Antibody
MAC Membrane Attack Complex
MESF Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome
MM/PBSA Molecular Mechanics Poisson – Boltzmann Surface Area
MS Mass Spectrometry
MST Microscale thermophoresis

N

NHL Non-Hodgkin Lymphoma
NHS N-hydroxysuccinimide
NK Natural Killer
NMP N-méthylpyrrolidone

O

OEG Oligoéthylène glycol

P

Pbf 2,2,4,6,7-pentaméthylidihydrobenzofurane-5-sulfonyl
PDB Protein Data Bank
PEG Polyéthylène glycol
PMLA Acide L- polymalique
PyBop Benzotriazol-1-yl-oxypyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate

Q

QCM-D Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring

R

RAFT Regioselectively Addressable Functionalized Template

RIT Radioimmunothérapie

RP-UPLC Reverse Phase Ultra Performance Liquid Chromatography

S

SAM Self-Assembled-Monolayer

scFv Single-chain Variable Fragment

SDS dodécylsulfate de sodium

SE Spectroscopic Ellipsometry

SEP Surface d'énergie potentielle

SPR Surface Plasmon Resonance

T

TASP Template Assembled Synthetic Protein

TBTA Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amine

tBu Tertiobutyle

TEMED tétraméthyléthylènediamine

Tis Triisopropylsilane

TFA Acide trifluoroacétique

TFE Trifluoroéthanol

THPTA Tris(3-hydroxypropyltriazolylméthyl)amine

TNF Tumor Necrosis Factor

Trt Trityle

U

UPLC Ultra Performance Liquid Chromatography

V

VEGFR Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Avant-propos

Chez les êtres vivants, les cellules sont continuellement soumises à des signaux extérieurs et intérieurs qui conditionnent leur devenir. Sous l'effet de forces attractives et répulsives, des biomolécules voisines interagissent les unes avec les autres afin de transmettre ces signaux par des voies complexes de signalisation. Toutes les interactions s'intègrent dans un réseau appelé interactome, terme créé par une équipe française dirigée par Bernard Jacq en 1999.¹ Ces interactions biomoléculaires peuvent être transitoires ou permanentes, se produire en continu ou à des moments très précis, et sont donc régulées par de nombreux paramètres assurant les fonctions vitales de la cellule (comme le niveau d'expression des partenaires à l'instant donné, leur distribution spatiale, ou leur affinité). Certaines interactions peuvent en revanche être pathologiques lorsqu'elles sont dérégulées, rompues, ou n'ont pas lieu d'être.

Si l'origine des interactions entre atomes a longtemps été étudiée au siècle passé, notamment par Johannes Diderik Van der Waals (prix Nobel en 1910), les chercheurs se focalisent aujourd'hui sur les conditions et conséquences de ces attractions. Que ce soit par des méthodes biochimiques, structurales, biophysiques, ou protéomiques, les études menées ont pour but de comprendre le mécanisme des biomolécules dans des conditions physiologiques. Chaque méthode étant basée sur une approche différente, et ayant des avantages distincts, seule leur union nous permet de nous rapprocher d'une description réaliste des évènements survenus *in vivo*.

Une fois ces connaissances établies, il est alors possible de les utiliser en recherche applicative afin de développer des stratégies thérapeutiques visant à inhiber, mimer, ou maintenir les interactions voulues. Pour exemple, le paclitaxel (TAXOL®) est un agent thérapeutique qui maintient les dimères de tubulines assemblés entre eux.² En inhibant ainsi la dépolymérisation des microtubules, cette molécule bloque la mitose, et donc la prolifération des cellules tumorales. Son efficacité clinique n'est plus à prouver dans le traitement des cancers du sein, de l'ovaire, et du poumon.

De nombreux exemples mettent en lumière le fait qu'étudier et connaître les mécanismes d'interactions biomoléculaires dans les moindres détails débouche sur la

conception de composés thérapeutiques plus efficaces. Dans le cadre de mon projet de thèse, nous avons développé un outil nous permettant d'étudier les interactions s'effectuant entre une protéine membranaire et une protéine thérapeutique dans le but d'optimiser l'efficacité de celle-ci. L'objectif final serait d'utiliser les informations acquises lors de ce projet pour développer des composés peptidomimétiques de l'anticorps monoclonal (mAb) rituximab (MabThera®), dont la cible est l'antigène CD20, qui se trouve sur la membrane des lymphocytes B.

Dans le chapitre I, nous verrons dans quel contexte s'inscrivent les thérapies ciblées basées sur l'utilisation des mAbs, comment celles-ci fonctionnent, et quelles sont les problèmes qui leur sont associés de sorte à identifier les limites de cette stratégie. En parallèle, des méthodes de caractérisation d'interactions sur surface seront explorées et comparées. L'accent sera mis sur les techniques utilisées durant la thèse, c'est-à-dire la microbalance à quartz, la résonance plasmonique de surface, et l'ellipsométrie spectroscopique. Dans le chapitre II, nous verrons comment développer et caractériser une surface fonctionnalisée avec l'antigène CD20 afin de pouvoir, par la suite, étudier les interactions antigène / anticorps par des techniques de détection de changement de masse. Le chapitre III sera consacré à étudier l'impact de la densité surfacique en antigène sur les paramètres de l'interaction avec le rituximab qui est une molécule bivalente. Le chapitre IV relatara comment le criblage de fragments peptidiques sur les surfaces développées a permis de cartographier les zones d'interactions situées dans la poche de reconnaissance du rituximab. Ces résultats nous ont conduit à débiter la conception de nouveaux composés destinés à mimer les parties de reconnaissance de l'anticorps pour l'antigène, qui seront introduits en chapitre V. L'évolution du projet sera enfin discutée dans la partie conclusion et perspectives.

Chapitre I

Introduction générale

Avec 382 000 nouveaux cas de cancers en 2018, la France possède un taux d'incidence qui diminue, ou qui tend à se stabiliser depuis quelques années.³ Le recul de la mortalité peut s'expliquer par l'association de plusieurs facteurs, tels que la valorisation des programmes de dépistages, la modernisation des campagnes de sensibilisation, et l'optimisation des infrastructures hospitalières de plus en plus spécialisées. Mais les avancées les plus percutantes concernent la Recherche, et notamment le développement de molécules toujours plus innovantes pour répondre à un critère grandissant : le bien-être des patients.

Les traitements classiques, c'est-à-dire la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie, conduisent en effet à des effets secondaires qui affaiblissent davantage les malades. C'est pourquoi la médecine se tourne depuis plusieurs années vers des thérapies dites "ciblées". Celles-ci ont l'avantage de s'attaquer spécifiquement aux particularités de la cellule cancéreuse car elles sont issues de la compréhension des mécanismes oncogénétiques des cellules tumorales. Les combinaisons possibles entre les traitements classiques et ces thérapies ciblées permettent d'aboutir, après l'établissement des profils génétiques des tumeurs, à des prises en charge de plus en plus efficaces car personnalisées (association des composés, dosage, temps du traitement, voie d'administration).

Les thérapies ciblées, dont l'essor a débuté dans les années 1990, regroupent de nombreux types de composés qui sont classés de multiples façons selon les auteurs, par exemple en fonction de leur mode d'action, ou encore du type de cible visée.^{4,5,6} Il est intéressant de s'attarder ici sur deux sous-groupes importants ; les molécules inhibitrices et les composés activateurs du système immunitaire :

- les molécules inhibitrices ont pour but de bloquer des voies de transduction suractivées lors des processus de cancérisation. Ces voies font majoritairement intervenir des kinases, et peuvent être bloquées de l'extérieur de la cellule par des anticorps monoclonaux. C'est le cas notamment du bevacizumab (Avastin[®]) qui en se fixant sur le VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor), inhibe l'interaction entre ce récepteur et son ligand naturel VEGF.⁷ Or, ce facteur de croissance, sur-régulé dans les tumeurs, est responsable de l'angiogénèse, qui favorise la prolifération des cellules. Grâce au blocage de ce mécanisme, il a été montré qu'en association avec une chimiothérapie, le bevacizumab

permet de prolonger la vie des patients.⁸ Les voies de transduction peuvent également être bloquées de l'intérieur de la cellule, grâce à de petites molécules capables de traverser la membrane plasmique. Très récemment, les équipes françaises de Pascal Collin, Bogdan Iorga, et Raül Duran ont pu, à partir d'une chimiothèque, mettre en évidence et optimiser un inhibiteur de la kinase mTOR, qui participe à la croissance tumorale. Le composé a déjà démontré une efficacité cent fois supérieure pour une cellule tumorale humaine que pour une cellule saine.⁹ Cette molécule prometteuse et nouvellement brevetée sera prochainement testée *in vivo*.

- les composés activateurs du système immunitaire composant le deuxième sous-groupe des thérapies ciblées permettent, *via* différents mécanismes, d'induire une réponse immunologique contre les tumeurs. Certains d'entre eux, appelés inhibiteurs de point de contrôle immunitaire, vont réactiver et favoriser la prolifération de cellules de l'immunité affaiblies par les signaux envoyés par les tumeurs. C'est le cas notamment de l'ipilimumab (Yervoy®) qui augmente l'activité des lymphocytes T cytotoxiques.¹⁰ En thérapie génique, ces mêmes lymphocytes T peuvent être extraits des patients afin de modifier leur génome de sorte à ce que les cellules expriment des récepteurs chimériques d'antigènes tumoraux. Ces lymphocytes ensuite réintroduits dans le corps et capables de reconnaître les cellules cancéreuses sont appelées « CAR T-cells ». Grâce à leur grande efficacité, ils sont considérés comme l'une des plus grosses avancées thérapeutiques de ces dernières années concernant l'immunothérapie.^{11,12} Dans ce contexte, deux médicaments ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché en Europe en juin 2018, sous le nom de Kymriah® (Novartis) et Yescarta® (Gilead).¹³

Certains anticorps vont quant à eux se lier directement aux cellules tumorales via la reconnaissance d'antigènes surfaciques. Cette interaction conduit au recrutement des cellules du système immunitaire. Ce dernier type de traitement est parfois appelé « immunothérapie passive » car il active la réponse immunitaire de manière indirecte. Il fera l'objet de la discussion qui suit.

I. Conception de mimes d'anticorps monoclonaux (mAbs)

I.1. Les mAbs : un outil thérapeutique puissant

En 1890, Emil von Behring et Shibasaburo Kitasato démontrèrent qu'une substance contenue dans le sérum d'animaux infectés par la diphtérie ou le tétanos permettait à ces mêmes animaux de devenir résistants à une nouvelle infection. Cette substance qu'ils appelèrent antitoxine valut à Mr Behring le 1^{er} prix Nobel de médecine en 1901, et l'apparition d'une nouvelle discipline : l'immunologie. Depuis cette période, les anticorps n'ont cessé d'être étudiés et utilisés pour le développement de nouveaux traitements.

Aussi nommés immunoglobulines (Ig), les anticorps (Ac) sont des glycoprotéines complexes du système immunitaire permettant à l'organisme de reconnaître le « non-soi ». Ils sont classés en 5 catégories : les IgA, IgD, IgE, IgG, et IgM, et se différencient principalement par leur valence (de 2 à 12). Celle-ci correspond au nombre de sites de liaison que possèdent les anticorps pour interagir avec leurs cibles, c'est-à-dire les antigènes. Avec une concentration sérique de 9.5 à 12.5 mg.ml⁻¹, les IgG sont les anticorps les plus abondants dans le sang humain (entre 70 et 85% des Ig totales)¹⁴ et sont d'ailleurs les immunoglobulines utilisées pour la thérapie.

D'un point de vue structural, ces anticorps possèdent deux chaînes polypeptidiques lourdes (« H » pour heavy), et deux légères (« L » pour light), reliées entre elles par des ponts disulfure pour former une protéine d'environ 150 kDa (Figure 1). Les IgG sont structurés en trois fragments, pouvant être séparés par digestion enzymatique à la papaïne : deux segments Fab (pour Fragment of antigen binding), et un segment Fc (pour Fragment crystallizable region). Le Fab est lui-même composé d'une courte partie constante, et d'une partie variable nommée paratope, conférant à chaque anticorps la capacité de reconnaître qu'une cible bien spécifique. La liaison avec l'antigène d'intérêt s'effectue dans une région hypervariable du domaine variable appelée Complementarity Determining Region (CDR). La partie Fc est quant à elle reconnue par les récepteurs Fc de certaines cellules immunitaires, et permet l'activation de la réponse biologique.

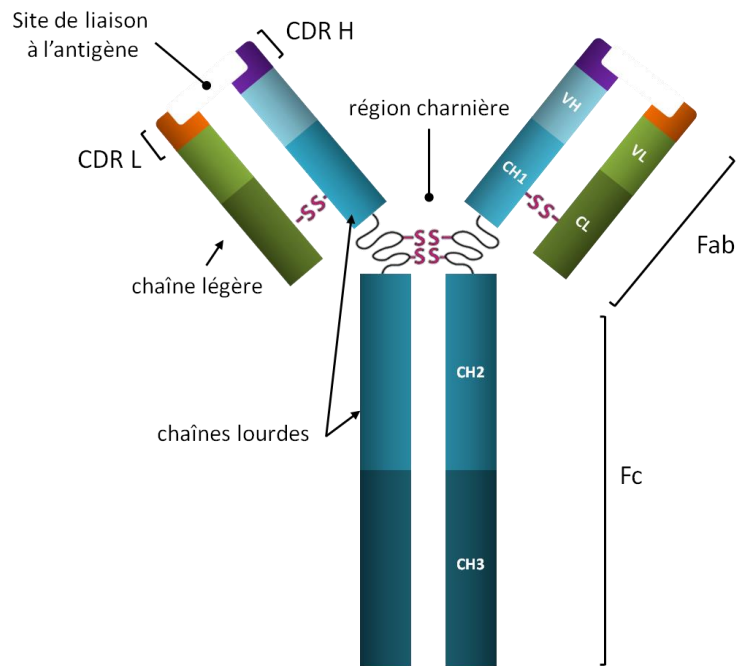


Figure 1 : Structure d'une immunoglobuline G. La partie Fab (environ 50kDa) est composée d'une chaîne légère (L) et d'une partie de la chaîne lourde (H). Le domaine constant (C) comprend les parties CH1 et CL. Le domaine variable (V) appelé paratope comprend les parties VH et VL, qui, à l'extrémité de l'anticorps, forment les CDR avec lesquels l'antigène interagit. Les CDR contiennent 3 boucles lourdes et 3 boucles légères. La partie Fc (environ 50kDa) est composée d'une partie de la chaîne lourde, les domaines CH2 et CH3.

Dans les années 1890, William Coley, un chirurgien new-yorkais, constata qu'un de ses patients atteint d'un cancer incurable avait, après avoir contracté un érysipèle (infection bactérienne), vu sa tumeur régresser de manière considérable. Le phénomène se répéta lorsqu'il injecta la bactérie à d'autres patients.¹⁵ Ce fut la 1^{ère} démonstration empirique qu'il existe un lien entre le système immunitaire et la rémission des cancers. A partir de ce moment, et durant de longues décennies, une question a fait l'objet de nombreuses discussions et controverses chez les immunologistes : *le système immunitaire peut-il éliminer les tumeurs ?*¹⁶ Au tournant des années 1980, le oui l'emporta, et le développement des anticorps pour l'oncologie fut réalisable grâce à Köhler et Milstein qui, en 1975, initièrent la technique de production d'anticorps monoclonaux par hybridomes en fusionnant un plasmocyte murin avec des cellules myélomateuses.¹⁷

Parce qu'ils étaient murins, les premiers anticorps thérapeutiques n'ont pas connu de grand succès à cause de l'immunogénicité, provoquant une élimination trop rapide par l'organisme. Pour diminuer cet effet, des améliorations ont conduit à la production d'anticorps chimériques (où 70% de la protéine est humaine, seul le domaine variable est

murin), d'anticorps humanisés (où 85-90% de la protéine est humaine, seuls les CDR sont murins), ou même totalement humains.^{18,19} Aujourd'hui sont commercialisés des anticorps chimériques, humanisés, et également humains à moindre échelle. Nous pouvons les distinguer grâce au suffixe de leurs noms, comme cela est décrit en figure 2.

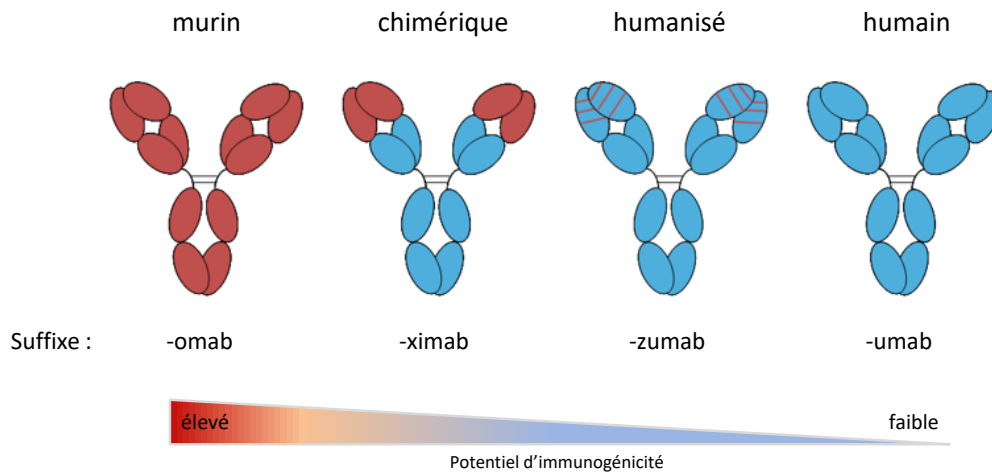


Figure 2 : Evolution des anticorps thérapeutiques. Au fil du temps, ceux-ci sont de plus en plus humanisés pour perdre en immunogénicité et gagner en efficacité *via* une meilleure reconnaissance de la partie Fc humaine.

Les anticorps produits pour l'oncologie ont plusieurs modes d'action face aux cellules cancéreuses (Figure 3) :^{20,21,22}

- **Le blocage direct.** En interagissant avec une protéine membranaire, les anticorps peuvent empêcher la fixation du ligand habituel, modifiant ainsi la transduction d'un signal souvent sur-régulé dans les cas de cancers. Pour exemple, le cetuximab (Erbix[®]) se lie au récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) bloquant ainsi la liaison avec le ligand endogène, et donc les voies conduisant à l'angiogénèse et la migration cellulaire. De plus, l'interaction de cet anticorps amène l'EGFR à être internalisé, ce qui, de surcroît, sous-régule la quantité de récepteurs à la surface.

- **Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) / Antibody-dependent cellular Phagocytosis (ADCP).** Suite à l'interaction entre l'anticorps et l'antigène, la partie Fc de l'immunoglobuline peut être reconnue par les différents récepteurs FcγR exprimés par les cellules effectrices du système immunitaire telles que les natural killer (NK), les monocytes, les macrophages, ou les éosinophiles. La stimulation de ces cellules immunitaires par le mécanisme d'ADCC conduit à la libération de protéines telles que des cytokines, des

perforines, et des granzymes, induisant la lyse de l'entité tumorale ; tandis que le mécanisme d'ADCP va engendrer la phagocytose de la cellule opsonisée.

- **Complement dependent cytotoxicity (CDC)**. Suite à l'interaction entre l'anticorps et l'antigène, la partie Fc de l'immunoglobuline peut être reconnue par la protéine C1q. S'ensuit alors une cascade protéolytique aboutissant à la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) au niveau de la membrane plasmique de la cellule à détruire.

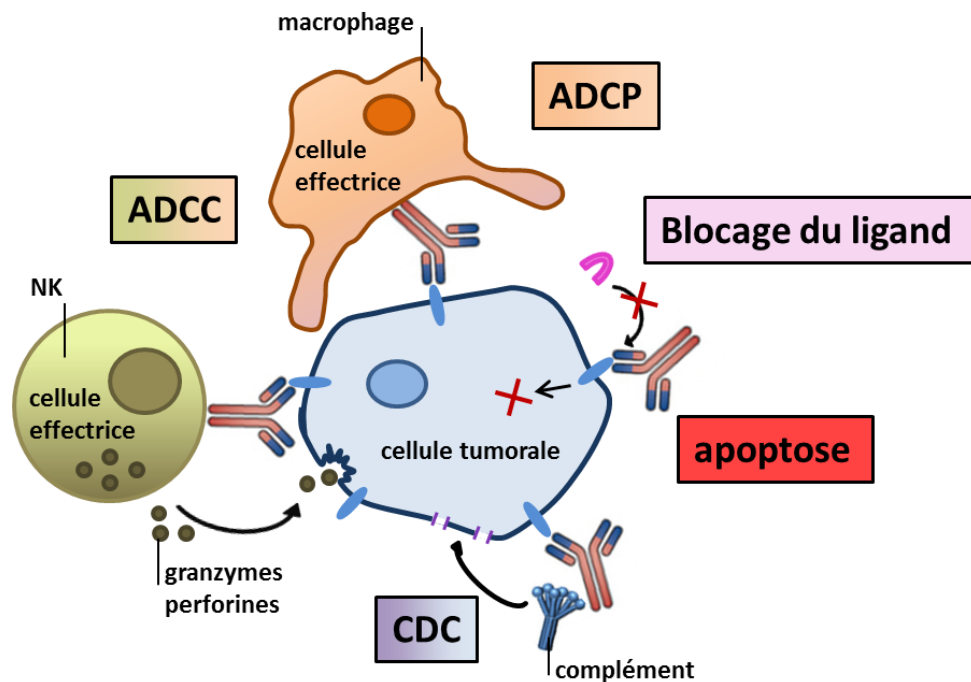


Figure 3 : Mécanismes d'action des mAbs envers les cellules tumorales.

Les anticorps utilisés en clinique combinent généralement plusieurs mécanismes, ce qui accroît par conséquent leur efficacité bien que certaines voies soient privilégiées. De plus, ces différents modes d'action agissent en synergie avec les agents de chimiothérapie, qui doivent, de ce fait, être choisis judicieusement. Le rituximab (MabThera®) par exemple, est un anticorps chimérique injecté aux patients atteints de certains types de lymphomes. Il a été démontré que sa reconnaissance avec l'antigène CD20 présent sur les cellules B enclenche tous les types de mécanismes.^{23,24} Toutefois, les voies « Fc-dépendantes » (ADCC et CDC) représentent une proportion majoritaire de l'action thérapeutique de l'anticorps. Nous pouvons facilement nous en apercevoir en étudiant les effets du polymorphisme des FcR sur l'efficacité du traitement. En effet, les patients dont les NK possèdent des récepteurs FcγRIII avec le polymorphisme homozygote $^{158}\text{Val}/^{158}\text{Val}$ (la forme la plus affine pour le

domaine Fc) ont une espérance de vie sans évolution de la maladie plus importante que les patients ayant le polymorphisme $^{158}\text{Val}/^{158}\text{Phe}$, ou $^{158}\text{Phe}/^{158}\text{Phe}$ (formes moins affines).^{25,26} La forme la plus affine du Fc γ RIII ($^{158}\text{Val}/^{158}\text{Val}$) est majoritairement observée chez les populations blanches, ce qui montre la nécessité de se tourner vers les thérapies individualisées.

I.2. Les dérivés ou mimes de mAbs : des alternatives avantageuses et innovantes

Il est aujourd'hui indéniable que la rémission des patients est favorisée lorsque les thérapies anticancéreuses classiques sont complétées par un traitement aux anticorps.^{22,27,28} Depuis la commercialisation du 1^{er} anticorps en 1986, le marché a littéralement explosé ces dernières années²⁹ pour atteindre plus de 91 milliards de dollars en 2017 dans le monde,³⁰ et 9,6 milliards de dollars rien que pour l'Europe en 2018.³¹

Toutefois, si nous observons plus en détails la nature des produits en voie de commercialisation, nous pouvons nous apercevoir que les anticorps de 1^{ère} génération (murins ou chimériques) ont évolué vers des composés dérivés pouvant pallier les problèmes rencontrés avec les biomolécules d'origine, les principaux étant :^{18,32}

- **Le polymorphisme.** Comme décrit ci-dessus avec le cas du rituximab, le polymorphisme des FcR observé chez les patients peut engendrer des réponses immunitaires variables.³³ Quelques fois, le traitement s'avère totalement inefficace alors que les effets secondaires, sont présents.

- **Le coût.** La complexité des mAbs impose une production très contrôlée, *via* la culture de cellules de mammifères,³⁴ ainsi que de longues étapes de purification. Par ailleurs, les mAb thérapeutiques sont en grande partie des IgG1, et doivent donc être injectés en grosses quantités pour faire face à la compétition induite avec les IgG1 endogènes présents dans le sérum. Le rituximab est par exemple produit par les CHO (cellules ovariennes d'hamster chinois). Selon la notice de prescription, la dose à injecter par perfusion est de 375 mg.m⁻² afin que le traitement soit efficace. Sachant que la prise en charge d'une personne mesurant 1,75 m et pesant 70 kg nécessite l'injection de 4 doses, le coût total du

traitement de l'individu s'élevait à environ 14 000 € en 2006 aux USA.³⁵ Grâce à leur utilisation grandissante, ainsi qu'au développement de composés génériques, ce coût a tendance à diminuer. Aujourd'hui en France, Roche commercialise la quantité nécessaire à 4 doses pour un montant de 4320 € HT (pour la forme perfusable). A cela doivent tout de même s'ajouter les coûts de prise en charge.

- **Le poids moléculaire.** Les mAb sont de larges molécules polaires, ce qui leur permet de ne pas être directement éliminés par le glomérule rénal, et d'atteindre une demi-vie d'environ 23 jours.^{36,14} Ce poids moléculaire important empêche cependant les mAbs de diffuser efficacement dans les tumeurs solides dont l'environnement hypervasculaire est caractérisé par un fluide interstitiel pressurisé et un sang de haute viscosité. Subissant de telles contraintes physiques, les IgG ne peuvent qu'avoir du mal à pénétrer les tissus, rendant les traitements parfois peu efficaces. Ce phénomène explique pourquoi une grosse partie des anticorps initialement commercialisés en oncologie servaient à traiter des cancers hématologiques. Cette limitation est très handicapante sachant que 85% des cancers sont paradoxalement causés par des tumeurs solides.³⁷

D'autres inconvénients liés aux difficultés de fonctionnalisation, ou à la présence d'agrégats dans les solutions commercialisables sont aussi rencontrés.^{38,39} D'importants travaux ont été entrepris par les chercheurs afin de contourner certains de ces problèmes, et ont donné lieu à de nouvelles classes de composés.

1.2.a. Les immunoconjugués

Afin d'accroître l'activité anti-tumorale des anticorps, ceux-ci peuvent être soumis à certaines transformations. Des mutagénèses ou des modifications de glycosylation de la partie Fc des mAbs conduisent par exemple à des composés de plus haute affinité pour les FcR. Pour des dérivés du rituximab défucosylés, cela a eu pour conséquence une augmentation du mécanisme d'ADCC *in vitro*, et de mort cellulaire *in vivo*.⁴⁰

Les anticorps peuvent également être couplés à des agents cytotoxiques, et sont dans ce cas utilisés comme vecteurs servant à la délivrance des molécules actives dans les zones ciblées. Ces immunoconjugués sont généralement dénommés ADCs (*antibody drug conjugates*). Pour que le complexe moléculaire soit efficace, il est important d'optimiser

certaines paramètres, tels que la stœchiométrie de l'agent cytotoxique, la nature et la stabilité du lien reliant l'anticorps à celui-ci afin que la libération, si elle doit alors lieu, ne soit déclenchée qu'au moment voulu. La localisation de la conjugaison doit également être réfléchiée pour que l'activité soit conservée.⁴¹

Les agents de couplage destinés à être libérés peuvent être des toxines. D'autres comme les radioisotopes doivent conserver un lien très stable au fil du temps. Les anticorps couplés à des toxines dont l'activité est très forte doivent être développés et utilisés avec prudence, car ils peuvent engendrer de gros effets secondaires si la cible n'est pas uniquement présente sur les cellules tumorales, ou que l'anticorps n'est pas assez spécifique. Le Mylotarg® illustre bien ce problème. Composé d'un antibiotique beaucoup plus puissant que les molécules courantes telles que la doxorubicine, ce médicament fut mis sur le marché américain, puis retiré, avant d'être récemment réintroduit aux Etats-Unis et en Europe. Il est composé du gentuzumab anti-CD33 et de la calicheamicine, capable de se lier à l'ADN et de le rompre. La libération de la toxine s'effectue par l'hydrolyse du lien hydrazone en milieu acide suite à l'internalisation.⁴²

Trois autres ADC sont actuellement sur le marché, dont deux, composés de radioisotopes, sont utilisés pour traiter les lymphomes non Hogkiniens.⁴³

1.2.b. Les fragments d'anticorps

Pour améliorer la pénétration tumorale, d'autres stratégies telles que la production de fragments d'anticorps sont utilisées. Dans ce cas précis, la portion Fc est généralement ôtée pour ne garder que les régions de reconnaissance pour l'antigène, ce qui fait sortir ces molécules du cadre de l'immunothérapie. Schématisés en figure 4, ces fragments sont générés par coupure enzymatique (Fab, Fab'₂) ou par voie génétique (scFv, bis-scFv, diabodies, minibodies).^{44,18} La diversité des combinaisons et de valences permet d'obtenir des fragments aux affinités variables. Plus rarement, il est même possible d'acquérir, à partir d'anticorps de camélidés ou de requins, des composés convexes, dont les boucles de reconnaissance s'insèrent dans des antigènes concaves, ou dont la forme empêche une bonne reconnaissance avec des anticorps classiques.^{45,46}

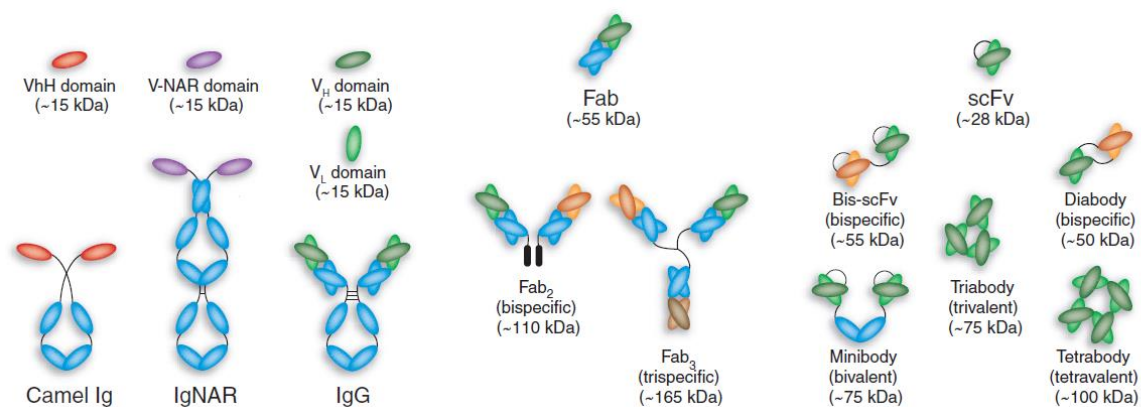


Figure 4 : Représentation schématique d'un IgG humain, d'immunoglobulines de camélidé (Camel Ig) et de requin (IgNAR), ainsi que les dérivés d'anticorps accompagnés de leur taille respective. scFv = single-chain variable fragment.⁴⁴

Avec un poids moléculaire moins important, les fragments d'anticorps ont la capacité de pénétrer beaucoup plus facilement et rapidement dans les tumeurs solides. Néanmoins, leurs temps de demi-vie sont considérablement raccourcis à quelques heures⁴⁷ : 0,5 à 2 h pour les scFv (env. 28kDa), et 14 à 15,5 h pour les Fab (env. 55kDa).⁴⁸ Les propriétés pharmacocinétiques qui les caractérisent (assimilation tumorale et clairance rapides) en font de très bons candidats pour le radiomarquage. Couplés à des radionucléides (émetteurs d'électrons Auger) tels que ¹²⁴I, les fragments d'anticorps peuvent être utilisés en imagerie et donnent lieu à des résultats beaucoup plus nets par rapport à d'autres composés utilisés couramment. Couplés à des radionucléides cytotoxiques (émetteurs de particules α ou β) tels que l' ⁹⁰Y, ils peuvent être utilisés en radioimmunothérapie (RIT), et ont par ailleurs un gros potentiel dans ce domaine.⁴³

Robinso et al ont par exemple développé un diabody anti HER2/*neu* couplé à l'astatine-211 (²¹¹At) présentant un transfert d'énergie d'environ 98 keV. μm^{-2} , qu'ils ont injecté à des souris possédant des xénogreffes de tumeurs du sein. Dans 60% des cas, une seule injection de 45 μCi fut suffisante pour détruire entièrement les tumeurs, sans qu'aucune rechute ne soit observée un an après.⁴⁹ Quelques années plus tard, les auteurs utilisèrent ce même diabody, cette fois-ci couplé à l' ¹²⁴I, comme radiotraceur afin de prédire les réponses à un traitement par Trastuzumab grâce à la quantification de HER2 exprimés *in vivo*.⁵⁰

Bien qu'ils présentent des avantages notables, seulement 5 fragments d'anticorps étaient commercialisés en 2018 (6.9% du marché des mAbs ou de leurs dérivés).⁵¹ Parmi eux, quatre sont des Fab. Le dernier composé, appelé blinatumomab, est un diabody capable

de cibler conjointement les CD19 des cellules tumorales, et les CD3 des cellules T dans le cadre du traitement des leucémies lymphoblastiques aigües.⁵² Il rentre de ce fait dans la catégorie des « bispecific T-cell engager antibody constructs »,⁵³ et représente depuis 2014 la plus petite construction disponible actuellement sur le marché (Figure 5).

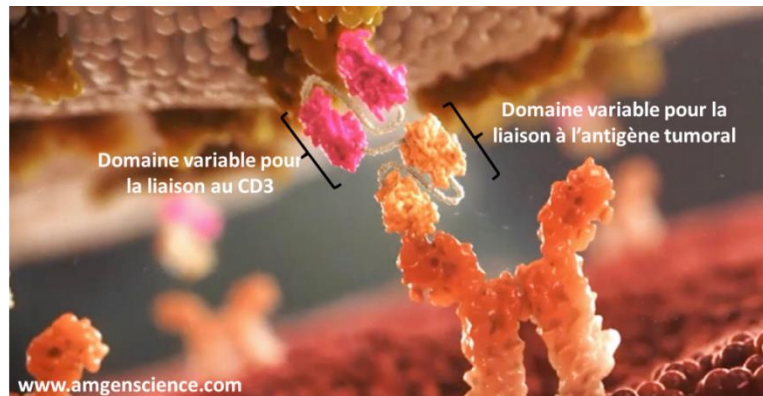


Figure 5 : La technologie "Bispecific T-cell engager" est aujourd'hui exploitée par Amgen® Science.

Si le temps de demi-vie d'un composé lui génère une trop mauvaise pharmacocinétique, il est possible de lui ajouter une chaîne polyéthylène glycol (PEG), comme cela a été fait pour le certolizumab pegol (Cimzia®), un Fab anti-TNF- α commercialisé pour le traitement de la maladie de Crohn, et dont sa demi-vie est passée de 23h à 2 semaines, suite à un gain en masse de 40kDa.^{54,55} Le couplage à d'autres molécules telles que l'albumine sérique humaine (HSA) est une méthode également envisagée dans certains cas.

1.2.c. Les mimes synthétiques d'anticorps

Un des facteurs limitant l'utilisation des anticorps en oncologie est le coût de production. Réduire la taille des protéines comme nous l'avons vu ci-dessus permet de passer du système d'expression de l'hybridome à d'autres outils moins coûteux tels que des bactéries. Toutefois, la culture cellulaire reste nécessaire. C'est pourquoi le développement de peptides semble particulièrement intéressant pour la synthèse *de novo* de mimes d'anticorps. Puisque les anticorps interagissent avec les antigènes grâce à quelques acides aminés localisés dans les CDR, des équipes de recherche ont eu l'idée de les reprendre afin de créer des molécules mimant la spécificité de l'IgG pour l'épitope. La plupart de ces travaux sont basés sur une analyse structurale de l'interaction, de la modélisation

moléculaire, et des approches computationnelles.⁵⁶⁻⁵⁸ Les peptides formés sont généralement composés d'une ou plusieurs boucles ou fragments de CDR, et peuvent être contraints par cyclisation.

Cette stratégie fut initiée en 1993 par Levi et al., qui démontrèrent qu'une séquence peptidique de 16 acides aminés incluse dans les CDR-H3 d'un anticorps anti-gp120 (une glycoprotéine de l'enveloppe du VIH) était capable de neutraliser l'infection du virus *in vitro*.⁵⁶ Depuis, une dizaine d'études ont été menées (surtout dans le domaine de la virologie),⁵⁹ certaines présentant des résultats extrêmement prometteurs. C'est le cas notamment de Kadam et al. qui en 2017 exposèrent leur démarche intéressante pour la création de peptides de haute affinité.⁶⁰ En effet, une première étude structurale leur permit d'assembler en un seul peptide les acides aminés les plus cruciaux des CDR de plusieurs anticorps visant l'hémagglutinine du virus de la grippe. En se basant sur les contacts observés par diffraction aux rayons X, ils modifièrent successivement la séquence, afin d'optimiser les interactions de chaque acide aminé. Pour y arriver, la cyclisation du peptide, ainsi que l'incorporation d'acides aminés non protéogéniques furent nécessaires. Ils passèrent alors d'un peptide initial, dont la constante de dissociation à l'équilibre (K_D) n'était pas détectable en SPR (10 μ M injecté), à un peptide optimisé dont le K_D est de 27 nM pour le virus A/H1N1, responsable de la pandémie de 2009.

En oncologie, il semble plus compliqué d'acquérir des mimes présentant des affinités submicromolaires,⁵⁸ et les exemples restent assez rares. Nous pouvons toutefois souligner le travail qu'effectue depuis 20 ans l'équipe de Murali (université de Philadelphie) sur le développement d'un peptidomimétique de l'Herceptin® nommé AHNP, ciblant l'oncoprotéine p185^{HER/neu}, surexprimée dans 25 à 35% des cancers du sein, de l'ovaire, ou du colon.⁵⁷ Avec une affinité caractérisée par un K_D de 359 nM déterminé par SPR, ce mime de 1.5 kDa, composé de 12 acides aminés, et construit à partir de l'analyse structurale du CDR3, bloque la progression tumorale chez les souris *via* une sous-régulation des voies de signalisation. L'effet thérapeutique est d'autant plus accentué avec l'addition de doxorubicine, mais reste insuffisant pour en faire un candidat clinique. C'est pourquoi de nouvelles stratégies sont progressivement mises en œuvre autour de cette molécule pour créer des composés de plus haut potentiel. En 2017, les auteurs ont proposé un

nanoconjugué consistant en un polymère d'acide malique (PMLA) sur lequel sont greffés des peptides AHNP, ainsi qu'un oligonucléotide antisens (AON) anti-HER2-ARN_m.⁶¹ Bien que celui-ci ait une affinité bien plus faible que AHNP seul (de l'ordre du micromolaire), le composé présente un excellent pouvoir anti-tumoral *in vivo*, et ce grâce à l'AON qui bloque la traduction et donc l'expression du récepteur HER2 à la surface des cellules (Figure 6).

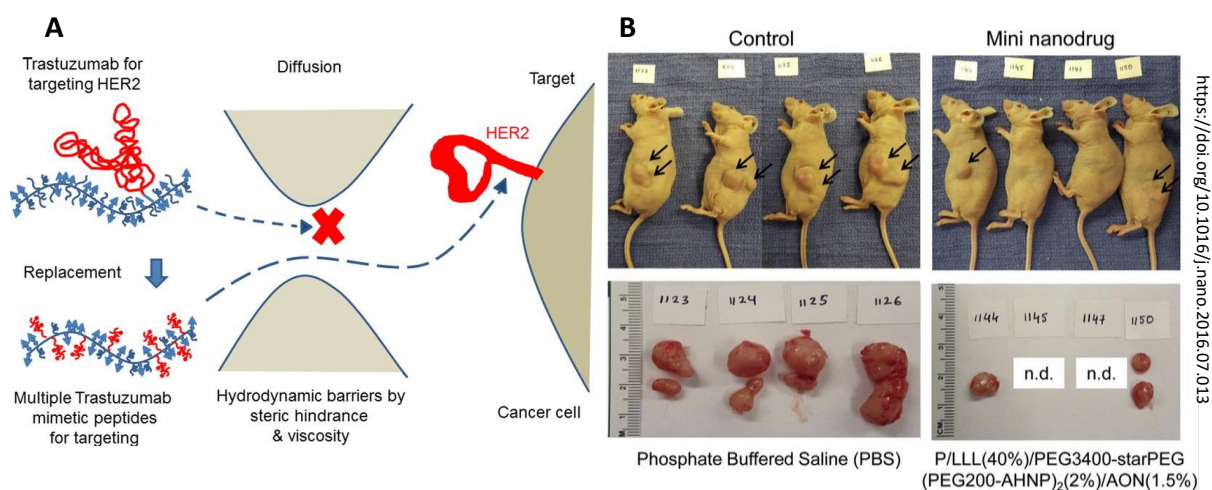


Figure 6 : Preuve de concept de l'utilisation de peptidomimétiques d'anticorps à usage oncologique. A : schématisation du polymère développé par Ding et al. B : Action de ce polymère sur la décroissance tumorale *in vivo*.⁶¹

Dans ce cas précis, les auteurs ont choisi de multimériser le fragment peptidique avec un polymère. Une autre stratégie est de réaliser cette multimérisation grâce à un châssis moléculaire capable de mieux contrôler le nombre et la nature des fragments agencés, tout en ayant une idée de la conformation globale du composé final. L'équipe de Liskamp (université de Glasgow) utilise un cyclotrimeratrilène (Figure 7A) pour assembler des boucles CDR issues de l'anticorps anti-TNF α infliximab (Remicade®), sélectionnées sur la base de la structure aux rayons X de l'IgG. Les dérivés synthétisés et publiés en 2018 (exemple en figure 7B) présentent des résultats préliminaires intéressants, avec des K_D allant de 11 à 66 μ M.⁵⁸ Ceci validerait le concept de l'utilisation des châssis moléculaires pour la synthèse de mimes d'anticorps. Les auteurs font toutefois face à de gros problèmes de solubilité.

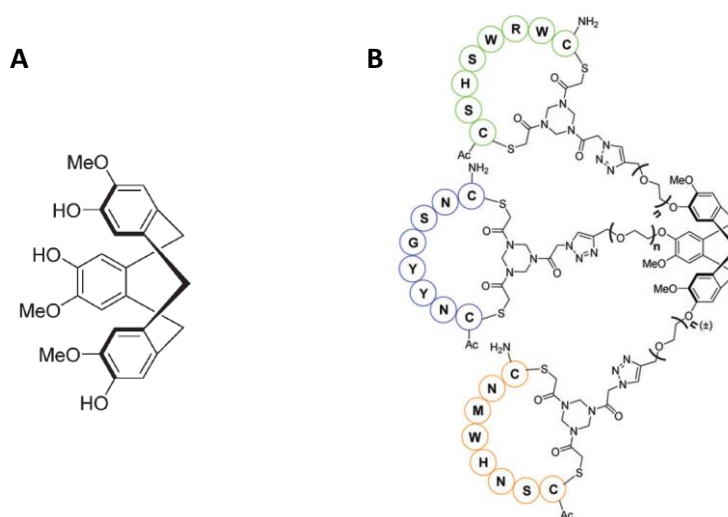


Figure 7 : Développement de mimes d'infliximab agencés sur un châssis moléculaire. A : le cyclotrivrétrilène est le châssis moléculaire utilisé comme support pour accueillir les boucles CDR. B : exemple de dérivé obtenu après la liaison des boucles par chimie-click.

En bref, les constructions peptidiques élaborées à partir de l'analyse des CDR des anticorps pourraient avoir un très fort impact thérapeutique. Toutefois, la difficulté d'acquérir à la fois une bonne capacité de reconnaissance de l'antigène, de bonnes propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, tout en possédant une activité anti-tumorale efficace respectant l'équilibre bénéfice/risque (*via* le couplage de molécules toxiques) fait que pour le moment, aucun des composés développés de manière synthétique n'a pu obtenir une autorisation de mise sur le marché.

Enfin, pour résumer cette première partie concernant les anticorps, leur nature et leur utilisation, la classification faite par Lopes dos Santos et al. (2018)⁵¹ nous permet d'avoir une vision globale du marché qui leur est lié aujourd'hui (Figure 8).

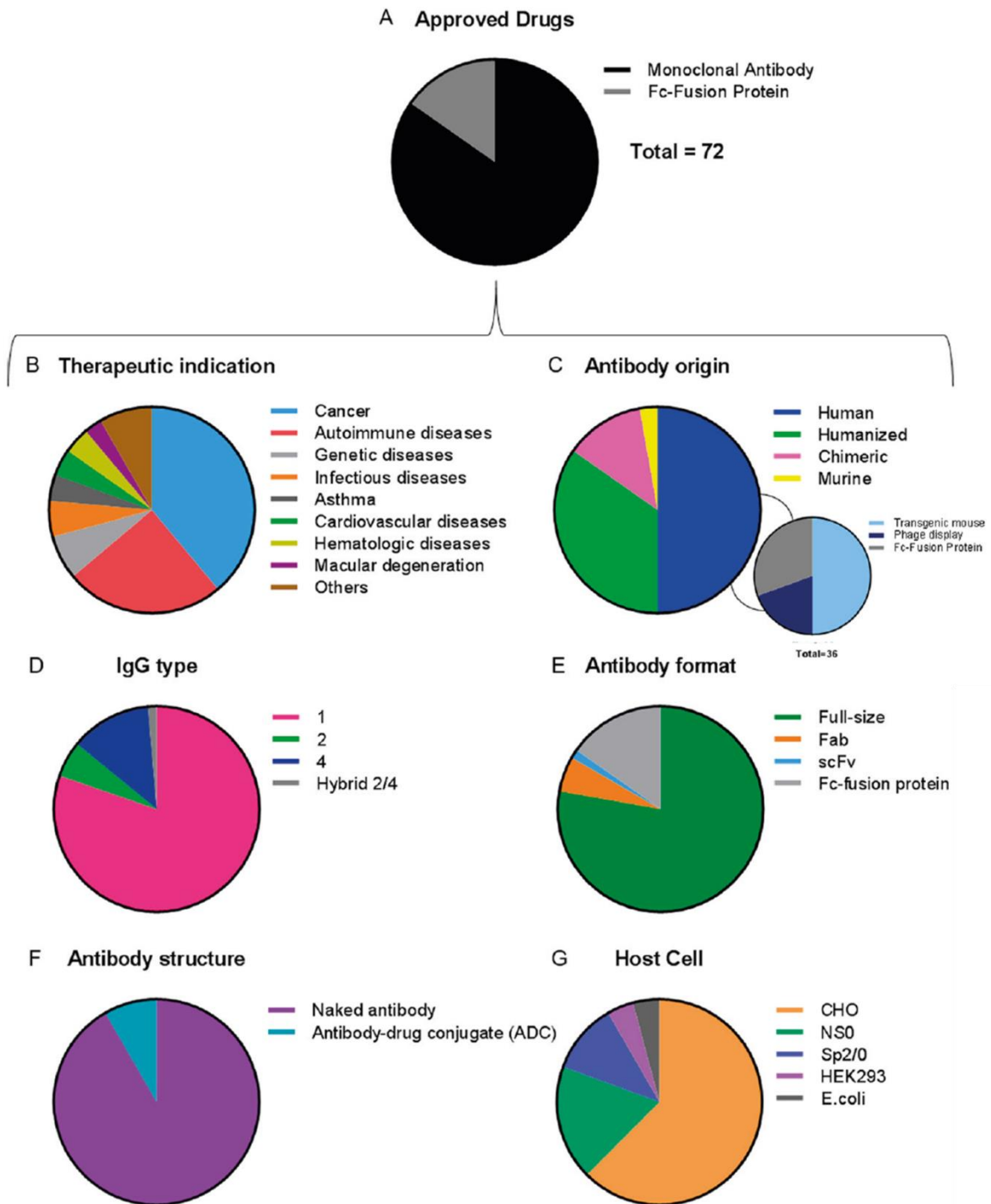


Figure 8 : Caractéristiques des anticorps ou de leurs dérivés approuvés par la Food and drug agency (FDA) et/ou l'agence européenne des médicaments (EMA) en octobre 2017.

I.3. Cas du rituximab

Dans le cadre du projet de thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au premier anticorps ayant reçu une autorisation de mise sur le marché pour une thérapie anti-cancéreuse: le rituximab. Il fut initialement développé dans le cadre de

recherches de nouvelles thérapies concernant les lymphomes non Hogkiniens (NHL) à cellules B. D'après l'Institut national du cancer, ces lymphomes sont au 5^{ème} rang des cancers les plus répandus. Causés par l'altération de lymphocytes B, ils regroupent de nombreux types de cancers tels que le lymphome folliculaire, le lymphome diffus à grandes cellules B, ou encore la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Chacune de ces maladies possède ses propres caractéristiques, évolutions et traitements. Le gonflement d'un ou plusieurs ganglions lymphatiques peut amener le patient à consulter un médecin. Malheureusement, puisque les cellules B circulent en continu dans l'ensemble du système lymphatique, il n'est pas rare que les lymphocytes anormaux se soient déjà disséminés à travers tout le corps au moment du diagnostic. Le traitement mis alors en place est généralement l'immunochimiothérapie, c'est-à-dire que l'on associe une chimiothérapie classique telle que la CHOP (Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine, Prednisone) avec le rituximab.

Utilisé depuis 1997 aux Etats-Unis, et 1998 en Europe, le rituximab est un anticorps chimérique de près de 145 000 Da, qui induit la destruction des lymphocytes B suite à la reconnaissance de l'antigène CD20, dont l'interaction est caractérisée par un K_D d'environ 5 nM d'après la publication originale.⁶² Les mécanismes d'action enclenchés par le rituximab incluent l'ADCC, la CDC, et la perturbation des voies de signalisation intracellulaire.^{24,63,64}

Sur la membrane des cellules B sont exprimés les antigènes CD19, CD22, et CD20. Mais c'est ce dernier qui fut considéré comme la meilleure des cibles, car son interaction avec l'anticorps ne l'amène pas à être internalisé.^{65,35} Le CD20 est une phosphoprotéine de 33 à 37 kDa, possédant 4 domaines transmembranaires, et deux boucles extracellulaires (Figure 9). La deuxième de ces boucles, longue de 43 acides aminés et comportant un pont disulfure, contient l'épitope reconnu par le rituximab. En effet, il a été démontré que l'anticorps interagissait particulièrement avec deux lots de résidus, ¹⁷⁰ANPS¹⁷³ et ¹⁸²YCYSI¹⁸⁶, extrêmement proches dans l'espace du fait du pont disulfure ¹⁶⁷C-¹⁸³C.⁶⁶ Les acides aminés annexes peuvent être également reconnus par d'autres anticorps, dont certains ont été introduits précédemment : ibritumomab (Zevalin[®], Spectrum), tositumomab (Bexxar[®], GlaxoSmithKline), ocrelizumab (Ocrevus[®]; Roche), ofatumumab (Arzerra[®]; GlaxoSmithKline), et obinutuzumab (Gazyvaro; Roche).

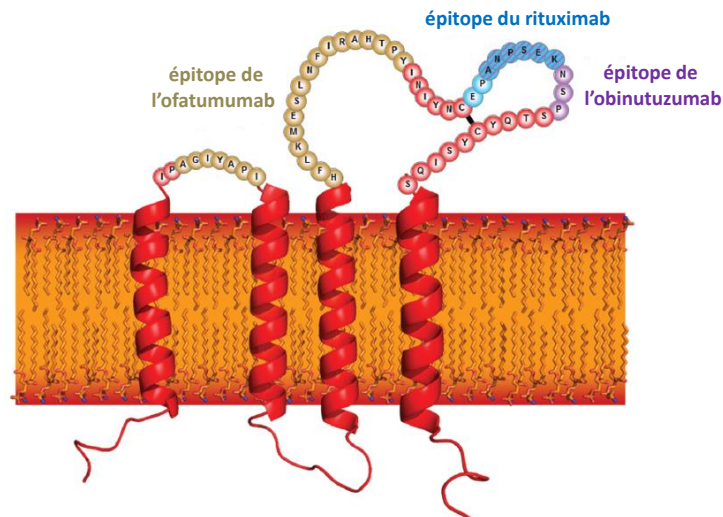


Figure 9 : Représentation de l'antigène CD20 inséré dans la membrane plasmique, avec du côté cytosolique les extrémités N-term et C-term, et du côté extracellulaire les boucles dans lesquelles se situent les épitopes reconnus par différents anticorps.⁶⁷ Un épitope est une partie de l'antigène reconnue par un anticorps.

Le CD20 n'est pas seulement exprimé sur les cellules malignes, mais aussi sur les cellules saines. Le traitement induit donc la disparition de l'ensemble des cellules B. Mais il faut savoir que l'antigène ne s'exprime qu'aux stades compris entre les pré-lymphocytes B, et les lymphocytes matures. Il n'est pas présent à la surface des cellules hématopoïétiques ni des pro-lymphocytes B. La récupération de l'ensemble des globules blancs est alors possible après l'arrêt du traitement. D'après le guide de médication, elle débute 6 mois après la dernière injection, et atteint le taux normal à 12 mois. Cette immunodéficience temporaire peut causer un développement plus important d'infections durant cette période.

La forte efficacité du rituximab contrebalance toutefois ce risque. Depuis sa mise sur le marché, de nombreuses études ont été menées dans le cadre du traitement de différents types de lymphomes, que ce soit en thérapie initiale ou lors de récives. Elles démontrent que l'anticorps conduit à une plus grande espérance de vie et une augmentation du temps sans progression de la maladie.^{68,69,70}

Enfin, le rituximab possède également une efficacité thérapeutique dans le traitement de certaines maladies auto-immunes telles que l'arthrose rhumatoïde, la polyangéite, ou le pemphigus.^{71,72}

I.4. Conception de mimes du rituximab

Il semble particulièrement compliqué d'obtenir des dérivés d'anticorps synthétiques de haute affinité touchant le domaine de l'oncologie. Comme dit précédemment, la sélection des séquences peptidiques est généralement réalisée suite à une analyse structurale de l'interaction antigène/anticorps par cristallographie, des études computationnelles, l'alignement de séquences de paratopes, ou encore l'utilisation de plateformes de librairies telles que faites par phage display. De plus, les CDR-H3 sont les régions les plus rapidement choisies, car elles sont connues dans la littérature pour être les boucles intervenant majoritairement dans l'interaction.^{73,74} Le développement de mimes réalisé sur la base de cette information généralisée à tous les anticorps, ou sur les résultats d'une seule technique de caractérisation peut parfois limiter le potentiel des composés.

C'est dans ce contexte que nous avons décidé de caractériser une interaction antigène/anticorps *via* différentes méthodes, afin d'examiner la similitude des résultats. Ces méthodes d'analyse d'interactions biomoléculaires sont par ailleurs exposées dans la partie qui suit. Par ce travail, nous espérons acquérir des bases solides pour la construction de mimes de rituximab. Cet anticorps a été sélectionné car il est aujourd'hui très bien caractérisé.

II. Analyse des interactions biomoléculaires et techniques de surface

Les interactions biomoléculaires ont un rôle clé dans les processus vitaux comme le métabolisme, la régulation ou l'immunité. Elles sont causées par des collisions stochastiques exercées entre deux partenaires biologiques, dont les chances de former un complexe moléculaire restent faibles si l'on considère ces événements indépendants. Mais la répétition de plusieurs millions de collisions à la seconde fait que cette faible probabilité devient une manifestation réelle. Les deux partenaires biologiques en interaction sont habituellement nommés ligand et récepteur, le ligand étant une molécule reconnue par un récepteur, le plus souvent des protéines présentes à la surface des cellules.

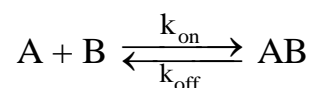
II.1. Biospécificité et biosélectivité des interactions biomoléculaires

La reconnaissance moléculaire entre un ligand et un récepteur est un processus réversible qui repose sur le caractère non-covalent des liaisons. Les mécanismes d'association d'interfaces hydrophyles ou hydrophobes se mettent en place par le biais d'atomes très peu distants les uns des autres pour former un réseau de liaisons hydrogène, d'interactions électrostatiques, hydrophobes, ou de Van der Waals. Aujourd'hui, plusieurs modèles conceptuels ont été développés pour décrire les processus de reconnaissance biomoléculaire. Dans le modèle dynamique par exemple, les molécules sont considérées comme des espèces pourvues d'une grande motilité, et capables d'adopter de nombreuses conformations dont l'une permettra la formation d'un complexe moléculaire.

Si l'action du ligand est limitée à un mécanisme précis qui ne conduit à la reconnaissance que d'un récepteur donné, l'interaction est dite spécifique. En biologie moléculaire, il est préférable d'employer le terme sélectivité, qui illustre la manière dont le ligand interagit préférentiellement avec une cible tout en pouvant exercer quelques interactions de moindre importance avec d'autres biomolécules du milieu environnant. Dans le cadre du développement d'agents thérapeutiques, la sélectivité est une notion cruciale car le rapport de l'affinité pour la cible visée sur celle des autres molécules du milieu est directement lié au rapport bénéfice/risque du médicament.

II.2. Paramètres caractéristiques d'une interaction biomoléculaire

Les interactions biomoléculaires sont régies par des paramètres cinétiques et thermodynamiques dont quelques-uns seront détaillés dans ce paragraphe basé sur les revues de Cooper,⁷⁵ Núñez et al.,⁷⁶ et Tarcsay et al.⁷⁷ Prenons par exemple un ligand A et son récepteur B, qui peuvent former un complexe AB selon la réaction réversible suivante :



avec k_{on} la constante cinétique d'association, et k_{off} celle de dissociation.

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{on} [A][B] - k_{off} [AB] \quad (1)$$

Quelles que soient les conditions initiales, le système tend vers un état d'équilibre régi par la loi de Guldberg Waage. La réaction est alors caractérisée par ses constantes d'équilibre K_A et K_D (constantes d'association et de dissociation à l'équilibre) :

$$\frac{[AB]_{eq}}{[A]_{eq} [B]_{eq}} = K_A = \frac{1}{K_D} = \frac{k_{on}}{k_{off}} \quad (2)$$

avec $[A]_{eq}$, $[B]_{eq}$, et $[AB]_{eq}$ les concentrations en ligand A, en récepteur B et en complexe AB lorsque l'équilibre est atteint.

L'affinité de deux partenaires est souvent exprimée par le K_D , qui correspond au rapport k_{off} / k_{on} . La constante K_D représente la concentration en ligand A nécessaire pour occuper 50% des récepteurs B. Plus cette valeur est faible, plus les partenaires ont une forte affinité. Dans le cas de l'interaction anticorps/antigène, les K_D sont généralement de l'ordre du nanomolaire. Il existe dans la nature des interactions moléculaires dont les K_D sont encore plus faibles, comme le couple streptavidine / biotine, qui atteint le femtomolaire, et qui illustre l'une des liaisons non-covalentes les plus fortes existantes.⁷⁸

D'un point de vue thermodynamique, la constante d'affinité est fonction de l'enthalpie libre de la réaction: $\Delta_r G^\circ$:

$$K_A = \frac{[AB]^\circ}{[A]^\circ [B]^\circ} \text{Exp}\left(\frac{-\Delta_r G^\circ}{RT}\right) \quad (3)$$

avec R, la constante des gaz parfaits (= 8,31 J.mol⁻¹.K⁻¹), T la température en Kelvin, et $[A]^\circ$, $[B]^\circ$, $[AB]^\circ = 1 \text{ M}^{-1}$.

La fonction enthalpie libre G quantifie la spontanéité d'un processus chimique. Cette spontanéité se base sur le fait qu'un système cherche à atteindre son énergie minimale pour gagner en stabilité. Si la variation d'enthalpie libre ΔG est inférieure à 0, la réaction (exergonique) est spontanée. Si ΔG est supérieur à 0, la réaction (endergonique) doit être

couplée à une réaction exergonique. En chimie médicinale, beaucoup de stratégies ont pour but de réduire l'enthalpie libre en optimisant les deux termes qui la composent : l'enthalpie (H), liée à la formation des liaisons, et l'entropie (S) liée à la déstabilisation des interactions, selon l'équation :

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad (4)$$

ΔH est fonction de l'intensité et de la spécificité de l'interaction entre A et B comparée aux interactions avec le solvant. ΔS caractérise le degré de désordre d'un système, et est liée à la solvation de A et B et aux changements d'entropie de conformation. Tandis que l'affinité, caractérisée par l'enthalpie libre, quantifie la force de l'interaction, les différents profils thermodynamiques caractérisés par ΔH et ΔS en reflètent plutôt la qualité (Figure 10). Bien les comprendre nous permet de développer des agents thérapeutiques de fort impact.⁷⁹

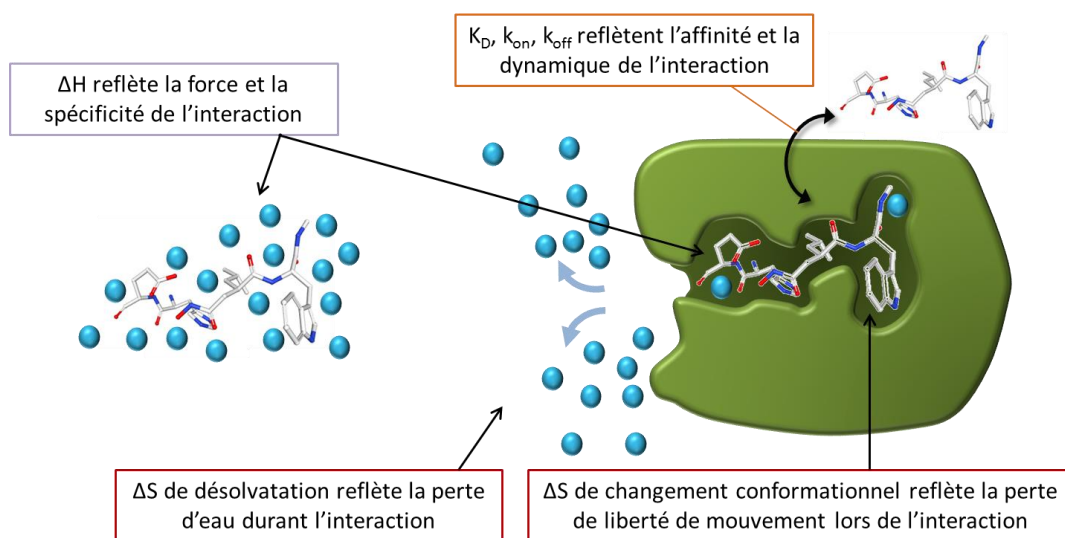


Figure 10 : Paramètres caractérisant les interactions biomoléculaires. Les billes bleues représentent les molécules d'eau.

II.3. Caractérisation des interactions biomoléculaires

Nous allons ici nous focaliser sur les différentes méthodes permettant d'analyser les interactions protéine/protéine et peptide/peptide. Les interactions protéine/protéine (PPIs) nécessitent d'être approchées de différentes manières selon le type et la précision de l'information souhaitée, faisant appel à des techniques biochimiques, génétiques, ou biophysiques ; de surface ou en solution ; avec ou sans marquage (Figure 11).^{80,81,82}

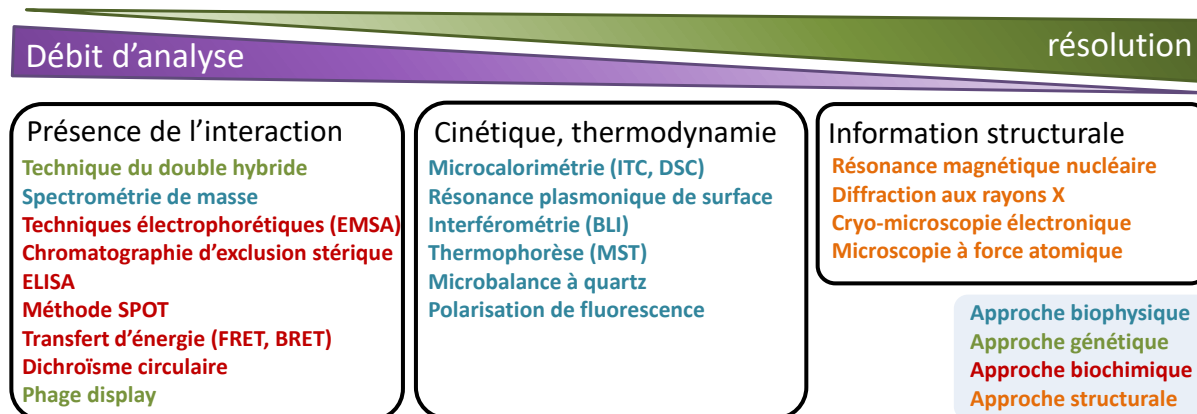


Figure 11 : Liste non exhaustive de techniques d'analyse d'interactions protéine-protéine.

Dans le tableau 1, les avantages et inconvénients de quelques-unes de ces techniques sont abordés, afin de mettre en évidence la complémentarité des approches. Dans certains cas, les limites citées et rencontrées lors de l'utilisation classique des méthodes sont progressivement contournées grâce à l'optimisation continue des procédés et appareillages. En FRET par exemple (Fluorescence resonance energy transfert), les fluorophores utilisés sont généralement des dérivés de protéines fluorescentes (comme la GFP) ou de fluorescéine, caractérisés par des temps de vie de l'ordre de quelques nanosecondes. Avec le TR-FRET (time-resolved FRET), qui fut développé pour diminuer les signaux parasites, il est maintenant possible d'utiliser des fluorophores présentant des temps de vie d'émission plus long (μs -ms) tels que des lanthanides (comme l'euporium)⁸³ ce qui permet d'observer des phénomènes d'association et de dissociation, ou de faire du criblage de haut débit à haute résolution.^{84,80}

D'autres techniques, qui ne proposent pas l'obtention de certains paramètres de manière directe, peuvent quand même les fournir suite à l'accumulation de données. A titre d'exemple, les paramètres thermodynamiques des interactions ne sont pas initialement accessibles par SPR ou MST (excepté le K_D). Mais la réalisation d'une même manipulation à différentes températures conduit à l'obtention des mêmes paramètres que l'ITC. En bref, chaque technique est caractérisée par différents niveaux de complexité : le nombre d'étapes, la nature des marqueurs fluorescents, le coût de l'appareillage, le couplage de plusieurs instrumentations, etc. Le tout est de trouver le bon équilibre entre la qualité des données souhaitées, et le temps et le budget attribués.

Technique	Phénomène observé	Type de méthode	Informations retenues	avantages	inconvénients	Gamme d'affinité	refs
Fluorescence resonance energy transfert (FRET)	Transfert d'énergie entre deux fluorophores fixés sur des molécules distantes de moins de 10 nm	- biochimique - en solution/sur cellules	- suivi spatio-temporel - quantification - mesure de distances - K_D	Suivi en temps réel d'interactions simultanées entre plusieurs partenaires	- Auto-fluorescence - besoin de fluorophores aux propriétés adaptées	nM - mM	85, 86, 83, 84
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	Réaction enzymatique chromogène ou induisant une fluorescence	- biochimique - en solution (puits)	- quantification - K_D (ELISA particulier)	Selon l'ELISA choisi, grande spécificité et sensibilité ($\approx 0.1 \text{ pg.ml}^{-1}$) - reproductibilité	Non spécificité pour l'ELISA direct - coût des Kits	-	87, 88, 89
Isothermal titration calorimetry (ITC)	Chaleur libérée lors de l'interaction	- biophysique - en solution	- K_D , ΔG , ΔH , ΔC , ΔS - stœchiométrie - constantes cinétiques (ITC particulier)	- fournit les paramètres thermodynamiques - pas de marquage	- quantité : plusieurs centaines de μg par test - long - l'interaction doit obligatoirement provoquer des changements d'enthalpie	nM - sub-mM	90, 91
Surface plasmon resonance (SPR)	Changement d'indice de réfraction	- biophysique - sur surface	- K_D , k_{on} , k_{off} - paramètres thermodynamiques*	- grande sensibilité - faibles quantités (quelques μg)	- pas de détection $<100 \text{ Da}$ - immobilisation - signaux impactés par le solvant et le transport de matière	Sub-nM - mM	80
Microscale thermophoresis (MST)	Détection du mouvement thermophorétique de molécules fluorescentes	- biophysique - en solution	- K_D - mécanisme d'interaction - stœchiométrie - paramètres thermodynamiques*	- Possibilité d'utiliser la fluorescence intrinsèque de la molécule - petites molécules détectables (ions) - utilisation d'échantillons complexes possible (ex. lysat cellulaire)	- marquage parfois délétère à l'interaction	pM-mM	92, 93, 94

Technique	Phénomène observé	Type de méthode	Informations retenues	avantages	inconvénients	Gamme d'affinité	refs
Biolayer interferometry (BLI)	Modifications d'interférence de faisceaux lumineux	- biophysique - sur surface	- K_D , k_{on} , k_{off}	- pas de microfluidique - rapide - peu coûteux	- immobilisation - pas de détection <100Da - problèmes d'évaporation si mesures longues	nM - mM	95, 96
Quartz crystal microbalance (QCM)	Changement de la fréquence de résonance d'un quartz piézoélectrique	- biophysique - sur surface	- masse hydratée - viscoélasticité du film biomoléculaire	- Possibilité de travailler avec des cellules vivantes - simple d'utilisation	- immobilisation - quantification difficile car transport de matière	nM - sub-mM	81, 82
Cristallographie aux rayons X	Diffraction des rayons X sur un cristal déterminant une carte de densité électronique	- biophysique	- image tridimensionnelle de l'interaction	- détermination des liaisons inter-moléculaires	- cristallisation du complexe - long	-	97, 81
Résonance magnétique nucléaire	Détection des modifications de la fréquence de résonance des atomes en interaction	- biophysique - en solution	- image tridimensionnelle de l'interaction - K_D	- détermination des liaisons inter-moléculaires - étude des interactions faibles (> 100 mM)	- long temps d'analyse - marquage isotopique - quantité : quelques mg	μ M - mM	98, 82
Phage display	Fixation de phages fonctionnalisés sur des peptides cibles	- génétique - combinatoire	- détermination fine des zones épitopiques des antigènes	- Criblage haut débit de nombreux ligands	- interaction parfois non retrouvée in vivo - pas de modification post-traductionnelle possible	-	99, 80

Tableau 1 : Caractéristiques, avantages, et inconvénients de méthodes permettant l'étude d'interactions biomoléculaires

*si expérimentation réalisée à différentes températures

II.4. Principes des techniques de caractérisation de surface et d'interface

Si l'on veut étudier des interactions avec des biomolécules non marquées, il est nécessaire de travailler avec des systèmes ayant la capacité de convertir les informations concernant l'interaction biomoléculaire en un signal physique interprétable de nature électrique, acoustique, ou encore lumineux. C'est ce que l'on appelle les biocapteurs.¹⁰⁰ Travailler avec des surfaces a été, dans le cadre du projet de thèse, la démarche adoptée afin d'analyser l'interaction du rituximab pour le CD20. La caractérisation des surfaces antigéniques, l'étude de l'interaction anticorps/antigène, ainsi que le développement de mimes d'anticorps ont nécessité l'utilisation majoritaire de trois techniques de caractérisation de surface : la résonance plasmonique de surface (SPR), la microbalance à quartz avec suivi de dissipation (QCM-D) et l'ellipsométrie spectroscopique (SE). Nous nous sommes tournés vers les techniques de surface pour plusieurs raisons :

- la quantité de biomolécules requise pour ces analyses est beaucoup plus faible que pour celles des techniques en solution (quelques nanomoles suffisent),

- les techniques de fluorescence nécessitent le marquage par des fluorophores. Cette fonctionnalisation peut être délétère si les groupements fluorophores sont fixés à proximité des sites d'interaction et risquent d'inhiber l'interaction.

- Le but étant ici de faire du criblage, il est assez pratique de greffer la molécule cible sur une surface et d'injecter les candidats les uns à la suite des autres.

Les trois techniques utilisées sont toutes des techniques sensibles aux changements de masse causés par l'adsorption de molécules sur une surface. Comme nous allons le voir ci-dessous, ces changements de masse sont toutefois détectés de manières différentes. Pour ne pas faire d'amalgames, il est important de noter que dans le cadre des techniques de surface, la molécule immobilisée se nomme par convention le ligand (L), et celle en solution s'appelle l'analyte (A).

II.4.a. L'ellipsométrie spectroscopique (SE)

L'ellipsométrie est une technique optique appliquée à l'étude de films à l'interface solide-liquide ou solide-air. A partir des changements de l'état de polarisation de la lumière

après réflexion sur une surface plane, l'ellipsométrie permet de mesurer l'épaisseur et l'indice de réfraction de films transparents et fins de 0.5 nm à 5 μm.¹⁰¹ Elle donne l'avantage de suivre en temps réel les changements d'épaisseurs tout en restant une méthode non destructive et non invasive.

La technique mesure les changements de réflectance et de différence de phase entre les composantes parallèle (r_p) et perpendiculaire (r_s) d'un faisceau de lumière polarisée après réflexion sur la surface du substrat à analyser (Figure 12 - Eq. 5) :

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \tan(\Psi) e^{i\Delta} \quad (5)$$

où ρ est le rapport des coefficients de réflexion défini comme le rapport entre les expressions complexes des champs électriques de l'onde lumineuse réfléchie et de l'onde incidente, $\tan(\Psi)$ représente l'amplitude et Δ la différence de phase.¹⁰²

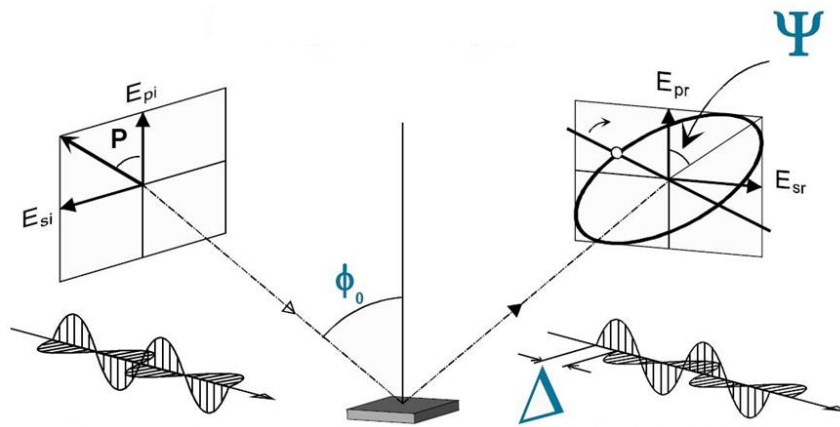


Figure 12 : réflexion de la lumière observée en ellipsométrie. E_{pi} = composante parallèle au champ électrique E d'incidence ; E_{si} = composante perpendiculaire au champ électrique E d'incidence ; E_{pr} = composante parallèle au champ électrique E réfléchi ; E_{sr} = composante perpendiculaire au champ électrique E réfléchi ; Φ_0 = angle d'incidence ; Δ = différence de phase induite par la réflexion ; Ψ = grandeur liée au ratio d'amplitude.

L'ellipsométrie classique mesure les angles ellipsométriques Ψ et Δ pour une longueur d'onde donnée. Toutefois, l'étude de systèmes complexes tels qu'un substrat biologique en milieu liquide nécessite de multiplier des jeux de données indépendantes pour assurer la précision et la reproductibilité des résultats. Avec l'ellipsométrie spectroscopique, les mesures sont réalisées à de multiples longueurs d'onde et à différents angles d'incidence.

De nombreux couples de paramètres Ψ et Δ sont ainsi obtenus pour une large gamme spectrale. Les équations reliant $\Psi(\lambda)$ et $\Delta(\lambda)$ à l'épaisseur et l'indice de réfraction des couches n'étant pas linéaires, des méthodes de régression sont utilisées pour ajuster les spectres d'ellipsométrie mesurés avec ceux calculés par un modèle optique. Ce modèle optique décrit le film en termes d'indice de réfraction (n), de coefficient d'extinction (k) et d'épaisseur (d).¹⁰³ Dans le cas le plus simple, lorsque les couches adsorbées sont considérées comme transparentes ($k=0$) et homogène, la variation de l'indice de réfraction (n) en fonction de la longueur d'onde (λ) peut être décrite en utilisant un modèle de Cauchy :

$$n_{(\lambda)} = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} \quad (6)$$

où A , B et C sont des constantes positives déterminées par les régressions non linéaires des données. Une fois le modèle permettant de décrire la couche biomoléculaire construit, l'épaisseur et l'indice de réfraction qui sont des paramètres co-variants, sont utilisés pour calculer la densité surfacique du film selon la loi de De Feijter¹⁰⁴ :

$$\Gamma = \frac{d(n_f - n_m)}{(dn/dC)} \quad (7)$$

où Γ est la masse surfacique en biomolécules du film (en nm), n_f et n_m sont respectivement les indices de réfraction du film et du milieu ambiant, dn/dC est l'incrément d'indice de réfraction provoqué par la présence de la biomolécule dans le milieu (en ml.g⁻¹). dn/dC est généralement connu ou déterminé par une mesure indépendante en utilisant un réfractomètre.

L'ellipsométrie spectroscopique (SE) est utilisée dans de nombreux domaines, allant de la métallurgie à la médecine. En biologie, elle permet d'étudier les liens existants entre épaisseurs et indices de réfraction de biofilm protéiques, pouvant donner certaines indications sur la conformation de protéines adsorbées sur des nanomatériaux. Le suivi de cette adsorption en milieu liquide offre des informations sur les mécanismes de cette dernière, et sur la cinétique de formation de monocouches de biomolécules sur des substrats variés.¹⁰⁵⁻¹⁰⁹

II.4.b. La microbalance à quartz avec suivi de dissipation d'énergie (QCM-D)

La QCM-D (quartz crystal microbalance with dissipation monitoring) est une technique dont la détection de changements de masse est fondée sur l'effet piézoélectrique inverse. L'application d'une tension électrique sur un cristal de quartz pris en sandwich entre deux électrodes d'or génère une déformation mécanique correspondant à un mouvement de cisaillement dans le plan horizontal (Figure 13 A et B). Le quartz est alors considéré comme un oscillateur harmonique possédant une fréquence de résonance f . La technique de QCM-D développée par Q-Sense (Q-Sense AB, Suède) consiste à appliquer l'excitation électrique (tension alternative) pendant des intervalles de temps brefs (typiquement quelques microsecondes), séparés de périodes de relaxation pendant lesquelles la mesure est effectuée. A l'instant où le signal d'excitation est coupé, l'amplitude des oscillations diminue de manière exponentielle en raison des forces de friction qui amortissent l'onde électroacoustique. La fréquence de résonance f , et le paramètre D correspondant à la dissipation d'énergie, sont extraits de la décroissance des oscillations (Figure 13C).

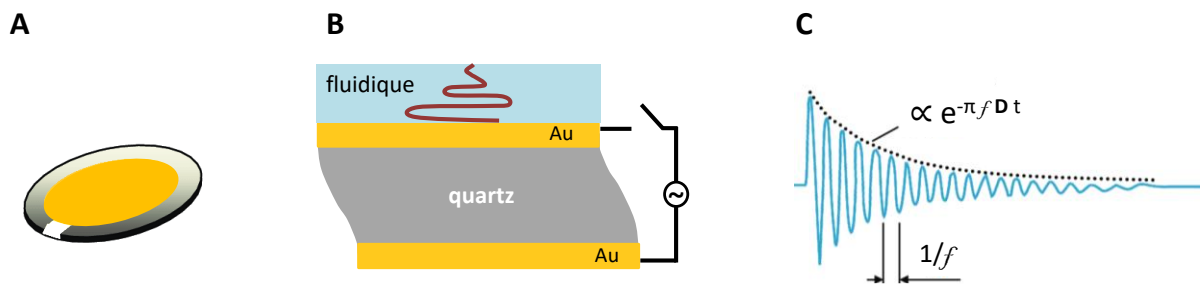


Figure 13 : Principe de la QCM-D. A : schématisation d'un quartz en or couramment utilisé. B : Application d'un courant alternatif conduisant à l'oscillation du quartz. A l'arrêt de la source d'excitation électrique, le signal est amorti. C : suivi de l'amortissement de l'oscillation, d'où est extraite la fréquence de résonance et la dissipation d'énergie.

Le facteur D est également relié aux énergies dissipées et emmagasinées :

$$D = \frac{E_{\text{dissipée}}}{2\pi E_{\text{stockée}}} \quad (8)$$

où $E_{\text{dissipée}}$ est l'énergie dissipée pendant un cycle d'oscillation et $E_{\text{stockée}}$ est l'énergie emmagasinée dans l'oscillateur. La dissipation d'énergie est corrélée aux propriétés viscoélastiques du film adsorbé à la surface du quartz.

Hormis l'oscillation en mode fondamental ($n=1$, à 5 MHz), d'autres harmoniques sont excitées ($f_n = nf_1$; $n=3; 5; 7; 9; 11; 13$). Depuis que le physicien berlinois Günter Sauerbrey démontra en 1959 qu'il existe, en ce qui concerne les films rigides, une relation directe entre le changement de fréquence du cristal et la masse hydratée adsorbée à la surface,¹¹⁰ la QCM est utilisée comme une microbalance de grande précision. La technique conduit en effet à des mesures de masse adsorbée atteignant des résolutions de l'ordre de $0,5 \text{ ng.cm}^{-2}$, ce qui permet de suivre l'adsorption de monocouches moléculaires. Les biomolécules étant couplées au solvant (l'eau le plus souvent), les masses détectées sont donc des masses hydratées.

Un dépôt de matière sur le cristal engendre une baisse de la fréquence de résonance du cristal ($\Delta f_n < 0$) et une augmentation de la dissipation ($\Delta D \geq 0$) dépendantes de l'harmonique. Dans le cas le plus simple d'un dépôt parfaitement rigide ($\Delta D / (-\Delta f_n / n) \ll 4 \cdot 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$),¹¹¹ solidaire du cristal et uniformément distribué, les variations de fréquences normalisées $\Delta f_n / n$ sont identiques. L'équation de Sauerbrey reliant de manière proportionnelle la masse adsorbée à la variation de fréquence de résonance est applicable :

$$\Delta m = -C \cdot \Delta f_n / n \quad (9)$$

avec Δm , la variation de masse (en ng), Δf_n la variation de fréquence (en Hz), n le numéro de l'harmonique, et C la constante de sensibilité de masse, qui dépend des propriétés du cristal (en $\text{ng.cm}^{-2}.\text{Hz}^{-1}$).

Lorsque les fréquences normalisées ne se superposent pas et que les variations de dissipation sont élevées, cela signifie que le biofilm est viscoélastique. La relation de Sauerbrey ne pouvant être applicable, d'autres modèles sont utilisés.^{111,112}

La QCM-D est employée que ce soit pour évaluer l'adsorption de molécules sur différentes surfaces, que pour étudier des interactions ligand/analyte impliquant de l'ADN, des protéines et peptides, des biomimétiques artificiels de membrane cellulaire, et même des cellules.^{113-115,100} C'est une technique particulièrement intéressante pour le suivi de la formation de bicouches lipidiques, puisqu'elle est capable de détecter la masse d'eau emmagasinée dans les vésicules, ainsi que son rejet lorsque les vésicules fusionnent à la

surface pour former la bicouche lipidique.¹¹⁶ La QCM-D, qui donne accès à la densité surfacique en biomolécules immobilisées, permet également de suivre l'impact de celle-ci sur la capacité de la molécule, par exemple, un aptamère, à interagir avec sa cible.¹¹⁷ Sa facilité d'utilisation lui permet également d'être associée à de la recherche clinique. Motomiya et al. ont par exemple démontré pour la 1^{ère} fois l'existence d'un complexe protéique dans des cas d'amylose rénale, induisant la formation de plaque amyloïdes et la dialyse des patients participant à cette étude.¹¹⁸ Minunni et al. ont de leur côté prouvé que la QCM-D était capable de distinguer l'ADN muté du sang des personnes souffrant de β -thalassémie, une forme d'anémie chronique sévère, par rapport à l'ADN de personnes saines, qui ne diffère que d'une base.¹¹⁹ Cela montre que cette technologie peut être employée pour le diagnostic pré-symptomatique.

Enfin, bien que la QCM soit suffisamment sensible pour caractériser les interactions biomoléculaires sur surface, il est parfois difficile d'extraire des informations quantitatives précises concernant les mesures d'affinité. Les masses calculées à partir des variations de fréquences sont en effet des masses hydratées. Or en fonction de la biomolécule étudiée, le taux d'hydratation peut varier avec le taux de couverture. Ainsi, lorsque l'analyte est capturé par une couche de biomolécules, le taux d'hydratation peut être dépendant de la concentration en analyte. De ce fait, l'affinité qui sera quantifiée par les mesures de QCM conduira à une valeur « apparente » de K_D appelée K_{Dapp} .¹²⁰

II.4.c. La résonance plasmonique de surface (SPR)

Basée sur le phénomène d'onde évanescente, la résonance plasmonique de surface (SPR) est une technique optique de surface permettant de visualiser en temps réel des interactions entre biomolécules non marquées.¹²¹⁻¹²⁴ Avec une sensibilité de l'ordre de 0,1 ng.cm⁻², la SPR permet la détermination précise des constantes cinétiques k_{on} , k_{off} , et thermodynamique K_D des interactions biomoléculaires, tout en consommant très peu de produits. Introduites à la fin des années 80, les instruments n'ont depuis cessé de progresser pour faire de la SPR une technique de premier choix dans le criblage de candidats thérapeutiques, le contrôle qualité de lots de molécules avant mise sur le marché, ou encore l'analyse alimentaire.¹²¹

En SPR, un faisceau de lumière est envoyé vers une interface verre (milieu réfringent)/liquide (milieu moins réfringent) dans des conditions de réflexion totale interne, c'est-à-dire que l'angle d'incidence est supérieur à un angle limite, entraînant une réflexion totale du rayon lumineux. Si la face opposée au faisceau est recouverte d'une mince couche métallique (de l'or par exemple), une fraction de l'énergie lumineuse est transformée en une composante électromagnétique nommée onde évanescente, qui peut interagir avec le nuage électronique de la couche métallique (les plasmons). L'onde se propage dans le milieu liquide perpendiculairement à l'interface, et sur une distance équivalente à sa longueur d'onde. Son amplitude décroît exponentiellement avec la distance de la surface métallique (Figure 14).

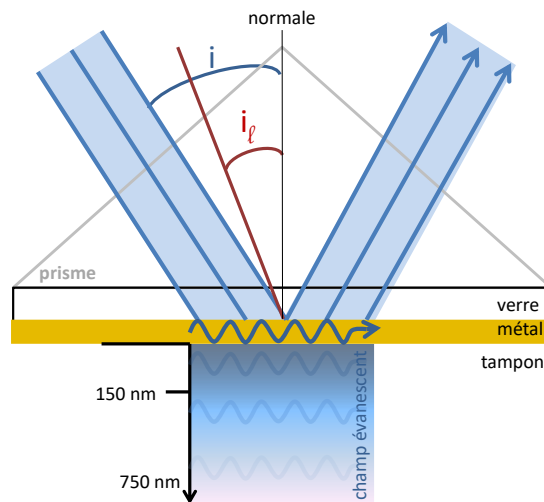


Figure 14 : Propagation de l'onde évanescente dans des conditions de réflexion totale interne. L'onde pénètre le tampon selon une exponentielle décroissante sur environ 750 nm, mais son amplitude est négligeable après 150 nm. La réflexion totale interne se produit si l'angle incident est supérieur à l'angle limite i_l (où $\sin(i_l) = n_2/n_1$, avec n_1 et n_2 les indices de réfraction des milieux traversés)

A une énergie et angle incident spécifiques, les plasmons de surface absorbent une partie de l'énergie lumineuse, occasionnant une chute de l'intensité du rayon réfléchi. L'angle pour lequel l'intensité est minimale est appelé angle de résonance, et varie avec l'indice de réfraction à l'interface.

La couche d'or forme la surface interne d'une cellule de microfluidique sur laquelle l'un des deux partenaires est immobilisé. Lorsque les analytes qui circulent à flux constant, arrivent sur la surface exposant une couche de ligand, les variations de masses provoquées

par l'association et la dissociation des complexes entraînent un changement d'indice de réfraction du milieu, et décalent l'angle de résonance (Figure 15 A et B).

Captées en sortie par une photodiode, les variations de position de l'angle de résonance sont traduites en unités de résonance RU. Pour une puce commercialisée par la technologie Biacore dite CM5, un changement de concentration de 1 ng.mm^{-2} = un changement de $0.1^\circ = 1000 \text{ RU} = 1000 \times 10^{-6}$ unités d'indice de réfraction. La représentation graphique des variations d'unités de résonance en fonction du temps est appelé sensorgramme (Figure 15C).

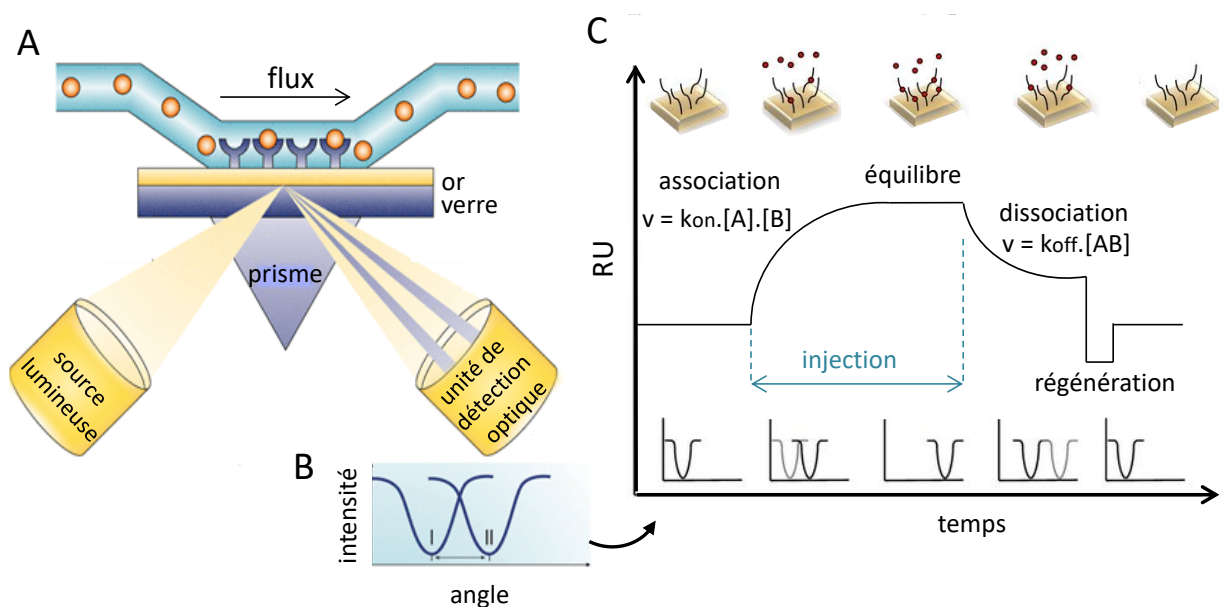


Figure 15 : Principe de la SPR. A : Dispositif expérimental de visualisation d'une interaction. ¹²¹. B : Enregistrement du décalage de l'angle de SPR. C : Sensorgramme traduisant les unités de résonance en fonction du temps.

Un sensorgramme est composé d'une phase de stabilisation correspondant à l'injection de tampon, d'une phase ascendante lorsque l'analyte est envoyé sur la surface, d'un plateau quand l'équilibre thermodynamique est atteint, et d'une phase de dissociation correspondant à une nouvelle injection de tampon. Lors d'une expérience, plusieurs injections d'analytes à différentes concentrations sont nécessaires, afin d'accroître la précision des résultats. Si un complexe ne se dissocie pas totalement lors du rinçage, une étape de régénération est alors réalisée entre chacun des cycles. Celle-ci correspond par exemple à l'injection d'une solution à pH ou à concentration saline extrêmes. Comme nous

le verrons, l'exploitation des sensorgrammes peut être faite grâce à différents modèles permettant d'extraire les paramètres cinétiques et thermodynamiques des interactions.

En plus de fournir les constantes cinétiques et thermodynamiques des interactions, cette méthode optique donne également la possibilité de déterminer les concentrations actives de biomarqueurs dans des milieux complexes.¹²⁵ Pour faire du criblage à haut débit, la SPR imaging (SPRi) est particulièrement utilisée, car le couplage à une camera CCD permet d'analyser toujours plus d'analytes en un temps très court. Enfin, la SPR peut également être couplée à la spectrométrie de masse pour l'étude d'analytes inconnus.

II.5. Méthodes de détermination des paramètres cinétiques k_{on} , k_{off} , et thermodynamique K_D des interactions biomoléculaires

De nombreuses techniques biophysiques permettent la quantification des interactions biomoléculaires, en solution ou sur surface. L'exploitation des données expérimentales est basée sur des modèles, qui permettent d'extraire les paramètres cinétiques et thermodynamiques des interactions.

II.5.a. L'isotherme de Langmuir

Développé en 1916 par Irvin Langmuir, ce modèle permet d'étudier l'adsorption d'un soluté sur une surface. L'isotherme de Langmuir peut être utilisée si l'analyte en solution n'interagit qu'avec une seule molécule d'adsorbat, en suivant toujours le même mécanisme jusqu'à l'obtention d'une monocouche à saturation.¹²⁶ L'adsorption à l'équilibre est étudiée pour différentes concentrations en analyte, le but étant ensuite de tracer les réponses obtenues à l'équilibre (R_{eq}) en fonction de la concentration en analyte ($[A]$). Le plateau de la courbe est associé à la réponse maximale R_{max} , liée à la quantité maximale d'analyte pouvant s'adsorber sur la surface (Figure 16). La valeur du K_D est par ailleurs calculée avec l'équation 10 :

$$R_{eq} = \frac{R_{max} \cdot [A]}{K_D + [A]} \quad (10)$$

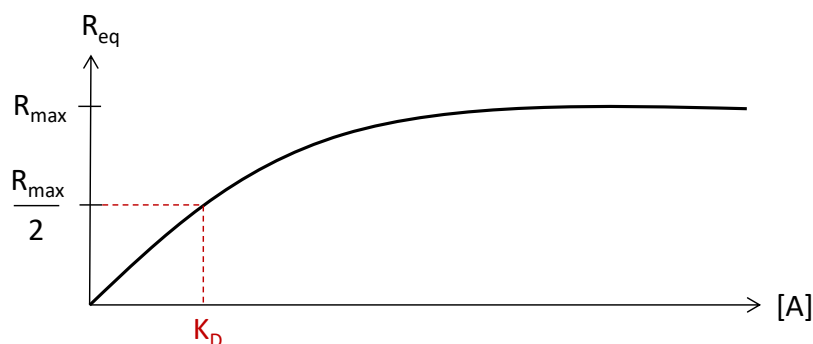


Figure 16 : Détermination du K_D par une isotherme de Langmuir

II.5.b. Représentation de Scatchard

La représentation de Scatchard, utilisée depuis 1949,¹²⁷ consiste à linéariser le modèle de Langmuir afin d'extraire facilement les paramètres d'une interaction entre une molécule immobilisée et une en solution (Figure 17). L'équation de la droite s'écrit alors :

$$\frac{R_{eq}}{[A]} = -\frac{1}{K_D} R_{eq} + \frac{R_{max}}{K_D} \quad (11)$$

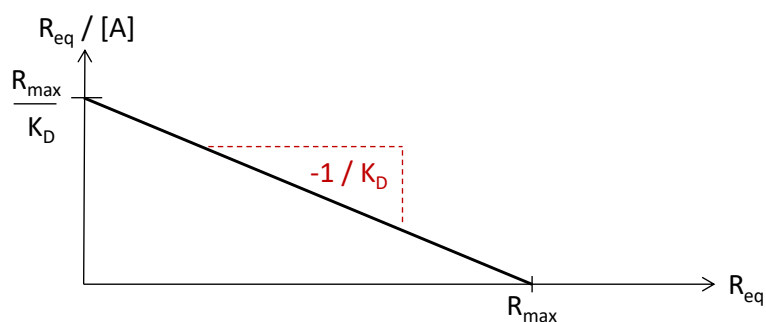


Figure 17 : Détermination du K_D par la représentation de Scatchard illustrant une interaction 1/1

Si le graphe de Scatchard est une droite, l'interaction est monovalente. L'obtention d'une courbe signifie au contraire que plusieurs sites de liaisons peuvent être impliqués, donnant lieu à des affinités différentes.

II.5.c. Le modèle cinétique dans le cas d'interaction monovalente

Lorsque l'on utilise des techniques de surface telles que la résonance plasmonique de surface, les paramètres cinétiques k_{on} et k_{off} d'une interaction peuvent être déterminés via l'utilisation d'un modèle cinétique, et conduisent à l'évaluation du K_D (Figure 18). Suite à l'injection de l'analyte sur la surface, la vitesse de réaction entre les deux partenaires suit l'équation (1). Si l'on reste sur l'exemple de la SPR, une régression non linéaire des courbes d'association et de dissociation sont effectuées. La constante cinétique de dissociation k_{off} (s^{-1}) lors de la phase de rinçage est tout d'abord déterminée par :

$$R_t = R_{eq} \cdot e^{-k_{off} \cdot t} \quad (12)$$

avec R_t la réponse obtenue à l'instant t .

La constante cinétique d'association k_{on} ($M^{-1} \cdot s^{-1}$) lors de la phase d'injection peut ensuite être calculée :

$$R_t = R_{eq} (1 - e^{-(k_{on}[A] + k_{off} \cdot t)}) \quad (13)$$

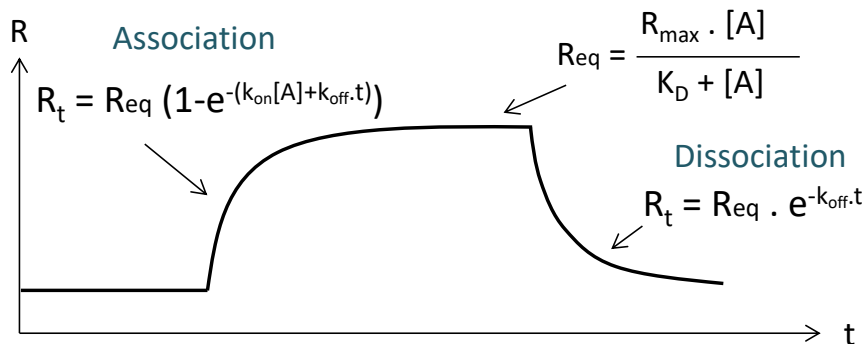
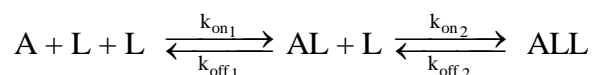


Figure 18 : Détermination des paramètres cinétiques d'une interaction 1/1 via le modèle cinétique

Grâce au k_{on} et au k_{off} , le K_D peut être calculé selon l'équation (2) p 28.

II.5.d. Le modèle cinétique dans le cas d'une interaction bivalente

Un analyte bivalent (A) a la possibilité de se lier à deux ligands distincts (L) selon le schéma réactionnel :



Avec $k_{\text{on}1}$ et $k_{\text{on}2}$ les constantes cinétiques d'association de la première et de la deuxième interaction respectivement, et $k_{\text{off}1}$ et $k_{\text{off}2}$ les constantes cinétiques de dissociation de la première et de la deuxième interaction. Les vitesses de réaction sont donc caractérisées par les équations :

$$\frac{dAL}{dt} = (2k_{\text{on}1} \cdot [A] \cdot [L] - k_{\text{off}1} \cdot [AL]) - (k_{\text{on}2} \cdot [AL] \cdot [L] - 2k_{\text{off}2} \cdot [ALL]) \quad (14)$$

$$\frac{dALL}{dt} = (k_{\text{on}2} \cdot [AL] \cdot [L] - 2k_{\text{off}2} \cdot [ALL]) \quad (15)$$

II.6. La fonctionnalisation sur surface d'or

Les analyses par des techniques de surface comme la SPR, la SE ou la QCM, nécessitent l'immobilisation de l'un des deux partenaires (le ligand) sur la surface. Parce que l'or est très stable, inerte, facile à déposer sur des supports de verre ou de quartz, et facile à fonctionnaliser, il est généralement choisi pour former la couche métallique. Nous allons donc ici nous concentrer sur les stratégies de greffage développées pour ce matériau. Celles-ci sont nombreuses, et doivent être adaptées aux propriétés des biomolécules à immobiliser.¹²⁸ Pour que la caractérisation de l'interaction se réalise dans les meilleures conditions, le ligand doit pouvoir rester facilement accessible, et être orienté de façon optimale de sorte que les propriétés de reconnaissance du couple ne soient pas affectées. Par ailleurs, la méthode de greffage doit aboutir à une immobilisation homogène sur l'ensemble de la surface, afin que les probabilités d'interactions non spécifiques entre l'analyte et les parties non fonctionnalisées du biocapteur soient minimisées. Enfin, le ligand nécessite aussi d'être fixé de manière très stable de sorte que la perte de biomolécules soit négligeable au cours de l'analyse.

Selon le type de surfaces utilisées, le greffage des ligands peut se faire en 2D ou en 3D. Quelques méthodes de fonctionnalisation vont ici être présentées. Certaines sont développées par Biacore® pour la commercialisation de surfaces appelées *sensor chips*.

II.6.a. Le greffage sur polymère

Les polymères tels que les polysaccharides contiennent de nombreuses fonctions chimiques capables de réagir avec les fonctions complémentaires des biomolécules pour les fixer covalamment dans la matrice. L'une des surfaces les plus couramment utilisées chez Biacore® est la puce CM5, qui est recouverte de dextran carboxyméthylé. Les groupements fonctionnels carboxylates confèrent à la surface des propriétés hydrophiles, réputées pour diminuer les adsorptions non spécifiques.¹²⁹ Après activation des carboxylates, le ligand est injecté sur la surface, puis est immobilisé via ses fonctions amines par un lien peptidique. La présence des fonctions carboxylates tout au long de la chaîne de polymère engendre une fonctionnalisation 3D de la surface. Le ligand peut donc être retrouvé tant en surface qu'à l'intérieur de l'hydrogel (Figure 19).

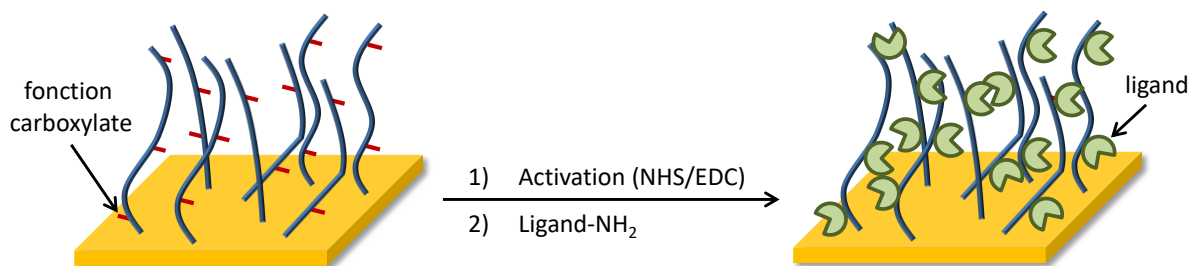
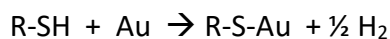


Figure 19 : Couplage amine sur surface CM5. Les fonctions carboxylates sont activées par un mélange de 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride / N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS).

II.6.b. Les monocouches auto-assemblées

Les *self-assembled-monolayers* (SAM) représentent l'arrangement spontané d'entités moléculaires qui s'adsorbent sur une surface de manière très organisée. Les constituants de la SAM sont composés de trois parties : une extrémité proximale capable de former un lien très fort avec le support, un squelette interne souvent caractérisé par une chaîne hydrocarbonée, qui, grâce aux nombreuses interactions intermoléculaires, confère au système un arrangement très ordonné, et enfin une extrémité terminale possédant une fonction chimique utile à l'immobilisation du ligand. Les SAM les plus populaires sont formées par des alcane-thiols sur des supports en Au(111). Les thiols ont la particularité de posséder une très grande affinité pour l'or, et sont en effet chimisorbés avec une force de liaison thiolate-or de 40-50 kcal.mol⁻¹ selon le schéma réactionnel suivant¹³⁰ :



Les SAM se forment par simple incubation d'une surface d'or dans une solution d'alcane-thiols. Bien que la phase de chimisorption soit rapide, le temps d'incubation est prolongé de plusieurs heures, afin de permettre aux sous-unités de se réarranger de manière optimale (Figure 20). Au final, les monocouches ont un niveau d'organisation tel, que les alcane-thiols ($n \geq 10$) possèdent une structure cristalline homogène et compacte. Ces propriétés permettent à la SAM d'orienter au mieux les biomolécules à immobiliser.¹³¹

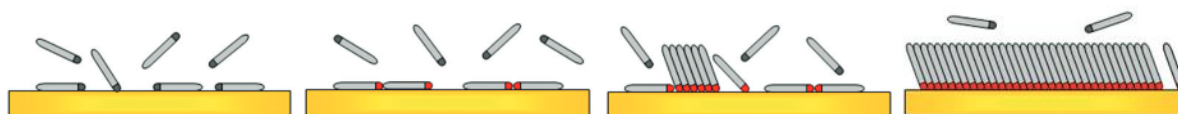


Figure 20: Formation d'une SAM. Au cours du temps, les molécules se réorganisent en monocouche structurée. Les alcane-thiols forment un angle de 30° avec la normale à la surface.¹³²

En fonction de la nature hydrophile ou hydrophobe de la surface que l'on souhaite avoir, ainsi que le type d'immobilisation voulu, les extrémités terminales peuvent être par exemple composées de fonctions $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{N}_3$ ou -biotine. Les fonctions $-\text{COOH}$ vont permettre de greffer les ligands via des couplages amines (paragraphe II.6.a), mais cette fois-ci, une surface 2D sera obtenue (Figure 21A), contrairement au greffage dans l'épaisseur d'une couche de polymère (dextran par exemple). Les SAM biotinylées vont quant à elles pouvoir accueillir des molécules de streptavidine qui viendront former une plateforme permettant l'immobilisation de ligands biotinylés (Figure 21C). Enfin, d'autres fonctions plus spécifiques telles que les fonctions azoture réagiront avec les ligands via des réactions de chimie-click afin de former des liaisons covalentes (Figure 21B). Pour un greffage efficace, l'accessibilité des groupements fonctionnels doit être assurée. Dans ce but, ils peuvent être co-adsorbés avec des fonctions inertes ($-\text{OH}$), formant ainsi des SAM « mixtes ». Par ailleurs, Whiteside et al. ont montré que les surfaces présentant une chaîne oligoéthylène glycol (OEG) entre la chaîne alcane et la fonction terminale sont résistantes à l'adsorption non spécifique de protéines sur la surface.¹³³

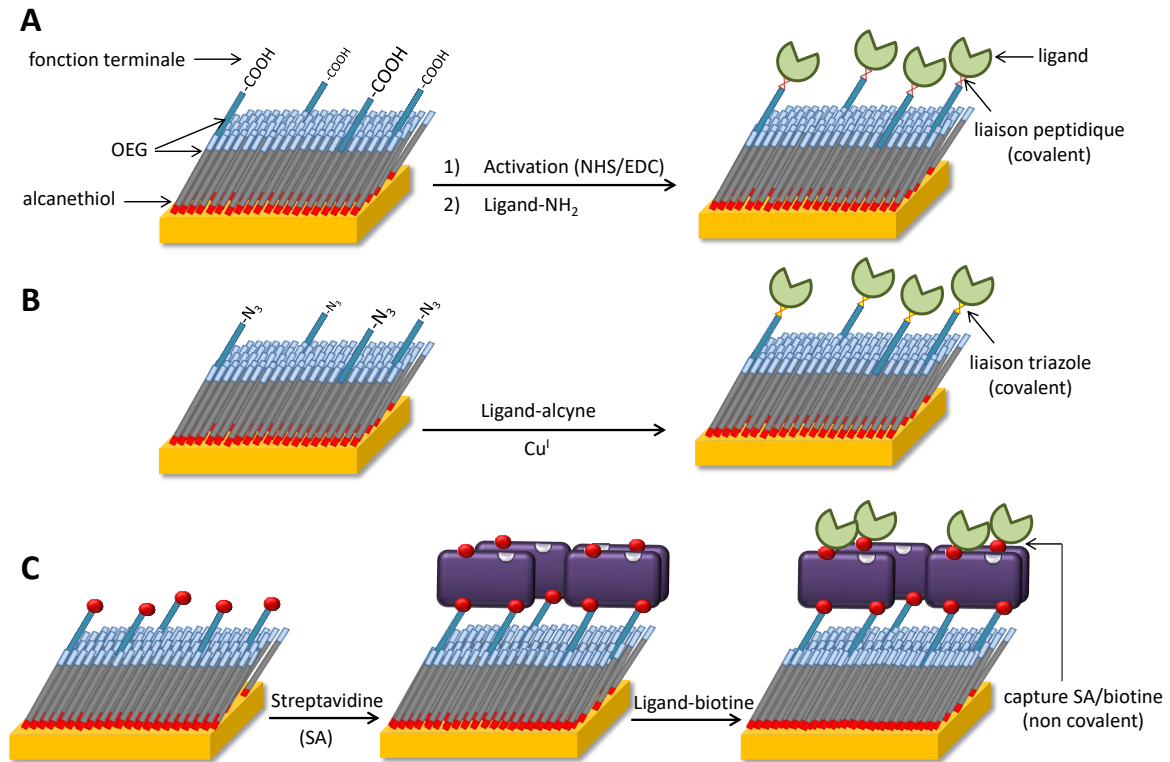


Figure 21 : Fonctionnalisation sur SAM. A : via un couplage amine qui conduit à une liaison peptidique covalente ; B : via une réaction de chimie « click », ici la cycloaddition azoture-alcyne, qui conduit à une liaison covalente par lien triazole ; C : par une capture streptavidine (SA) / biotine qui correspond à une liaison non covalente. Les SAMs sont composées d’alcane-thiols et d’oligoéthylène glycol (OEG). Dans les SAMs mixtes, les OEG portant la fonction terminale réactive sont généralement plus longs afin de faire émerger la biomolécule greffée. Les surfaces fonctionnalisées grâce aux SAMs ont une structure 2D.

De même que les alcane-thiols, les ligands possédant une fonction thiol sont capables d’interagir directement sur les surfaces d’or, sans nécessité de sous-couche intermédiaire. C’est le cas par exemple de peptides contenant des cystéines.¹³⁴ Dans ce cas, nous parlons également de SAM. Cette procédure est toutefois moins utilisée car plusieurs problèmes liés aux charges, à une orientation moins correcte, ou à la densité de surface peuvent survenir.¹³⁵

De nombreuses autres méthodes de fonctionnalisation existent. Leur choix est généralement crucial car il impactera très probablement les résultats obtenus par la suite. Il est donc important de tenir compte de la nature et des propriétés du ligand, la facilité avec laquelle nous pouvons le modifier, et l’orientation souhaitée. Les méthodes présentées ici permettent toutes d’obtenir un biofilm où chaque biomolécule est positionnée à un endroit spécifique. Il faut savoir qu’à l’inverse, il est possible de travailler avec des systèmes beaucoup plus fluides tels que les bicouches lipidiques supportées. Avec ce modèle de

membrane plasmique, les biomolécules analysées peuvent se mouvoir sur la surface comme elles le feraient au travers de la bicouche lipidique d'une cellule. Dans notre cas, les systèmes figés, et plus particulièrement les SAMs, ont souvent été utilisés afin de mieux contrôler les densités surfaciques en biomolécules. Une fois la méthode choisie, il est important de caractériser le greffage avec les techniques qui s'y prêtent.¹³⁶

III. Présentation des travaux de thèse

L'objectif global du projet est de concevoir une surface antigénique dont les caractéristiques répondent aux critères de qualité présentés ci-dessus, puis de l'utiliser dans le but de mieux comprendre l'interaction CD20/rituximab.

Les résultats aideront à développer des mimes du paratope de l'anticorps rituximab, dont le faible poids moléculaire leur permettrait de pénétrer les tumeurs solides. Synthétisés de manière chimique, leur coût de production serait moindre, comparé à une préparation par voie biologique. Les mimes consisteront en l'assemblage de peptides correspondant aux séquences CDR du rituximab les plus impliquées dans la reconnaissance spécifique du CD20. Ces peptides doivent donc être préalablement sélectionnés avec soin. Des études réalisées avant le début de la thèse avec la technique SPOT ont déjà permis d'identifier plusieurs séquences potentiellement intéressantes pour le développement des mimes. Les premiers objectifs ont donc été de confirmer, et si possible, d'affiner ces résultats via l'utilisation d'autres techniques de caractérisation telles que la SPR ou le BLI.

Les travaux de thèse ont donc évolué vers quatre objectifs :

- **le développement contrôlé et la caractérisation d'une surface antigénique.** Pour l'immobilisation de l'antigène sur la surface, notre choix s'est porté sur la réalisation d'un lien covalent formé par chimie « click ». Les conditions de cette réaction furent optimisées grâce à des expériences d'électrochimie. Les surfaces obtenues ont fait l'objet d'études, telles que la caractérisation de la densité surfacique en antigène.

- **la caractérisation de l'interaction CD20/rituximab.** Des cinétiques d'interaction entre l'anticorps et l'antigène surfacique ont été menées dans le but, d'une part, d'évaluer la

spécificité et l'affinité du rituximab pour la surface fonctionnalisée avec le CD20, et d'autre part, d'étudier en détails les paramètres intervenant dans une interaction antigène/anticorps.

- **le criblage de peptides du paratope, permettant la détermination fine du site actif de l'anticorps.** Les peptides perçus comme ayant un haut potentiel d'intérêt *via* la méthode SPOT ont été soumis à une 2^{ème} analyse par SPR. L'ensemble des résultats a donné lieu à une image très précise de la localisation de l'interaction du CD20 dans la poche du rituximab. Une comparaison des données inter-techniques a été réalisée.

- **le développement des mimes d'anticorps.** La surface et la sélection des peptides étant réalisées, nous avons donc conçu des premiers mimes du RTX, soit en fusionnant deux séquences peptidiques en un seul et même peptide linéaire, soit en agençant les différents peptides sur un châssis moléculaire.

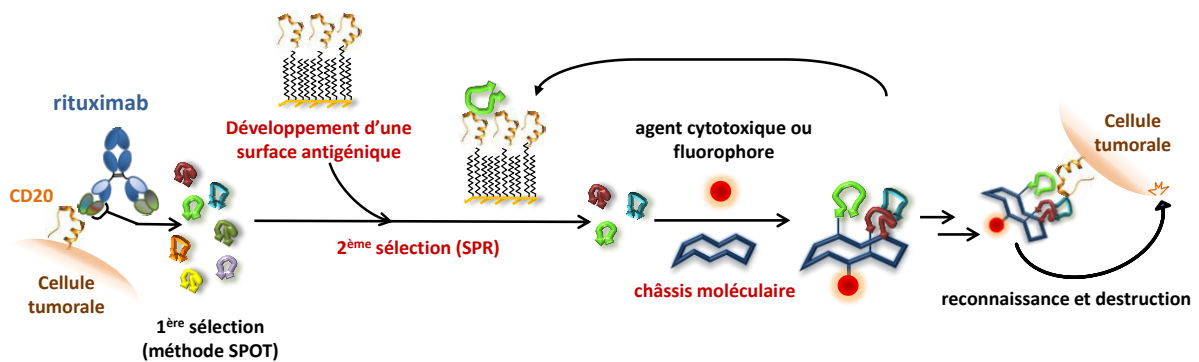


Figure 22 : Schéma global du projet de recherche, avec, en rouge, les tâches qui m'ont été confiées durant la thèse.

Chapitre II

Développement d'une surface antigénique

L'un des premiers objectifs des travaux de thèse a consisté à développer un outil permettant d'identifier les séquences peptidiques du rituximab indispensables pour la reconnaissance avec l'antigène CD20. Cribler des fragments du paratope nécessite l'utilisation de méthodes assez rapides à mettre en œuvre, consommant peu de produits, et dans l'idéal capables de fournir des informations cinétiques et thermodynamiques. Les techniques de caractérisation de surface, basées sur la détection de changements de masses (QCM-D), d'indice de réfraction (SPR), ou d'interférences d'ondes réfléchies (BLI) sont des méthodes de choix remplissant un ou plusieurs de ces critères. Parce que les interactions peptide-peptide sont complexes, il est indispensable d'optimiser l'étape de greffage du ligand qui peut, dans certains cas, impacter les résultats.^{137,138}

I. Choix du mode de greffage de l'antigène sur la surface

I.1. Introduction

Il existe plusieurs méthodes de fonctionnalisation de surfaces d'or (cf. partie biblio) qui peuvent être réparties en 2 grandes familles : les greffages covalents ou non-covalents. Le greffage covalent par couplage amine est souvent appliqué à l'immobilisation d'un peptide. C'est une stratégie qui s'avère très avantageuse à condition que le peptide possède très peu, voire une seule amine primaire libre, et que celle-ci soit assez éloignée du site actif pour ne pas gêner l'interaction. Dans le cas où plusieurs amines sont accessibles, les peptides ou protéines sont greffés de manière hétérogène, ce qui engendre des cinétiques d'interactions différentes, et des traitements de données difficiles.

L'interaction CD20/rituximab sur surface a déjà fait l'objet de quelques publications qui montrent combien le mode d'immobilisation peut provoquer des affinités variées. Tout en travaillant avec des surfaces CM5, Blasco et al. ont immobilisé le CD20 de deux manières différentes : le couplage amine d'un dérivé CD20-BSA sur dextran, ou la capture du CD20-biotine sur de la neutravidine liée de façon covalente par couplage amine au dextran. Dans le 1^{er} cas, l'affinité est évaluée à 9 μ M, alors que dans le 2^{ème}, aucune réponse ne fut observée pour la concentration injectée (1 μ M).¹³⁹ Afin de développer des bibliothèques de fragments variables anti-CD20, Liu et al. ont eux aussi constitué des surfaces antigéniques

via le couplage amine d'un dérivé CD20-Hoc sur une surface fonctionnalisée par un polymère (alginate) développée par l'instrumentation ProteOn.¹⁴⁰ Hoc est une protéine de bactériophage, et a aussi été greffée seule dans le but de quantifier la part d'interaction non spécifique. Le K_D caractérisant l'interaction CD20/rituximab fut évalué à 380 nM grâce à une isotherme de Langmuir. Enfin, Ernst et al. ont quant à eux utilisé une stratégie différente en greffant par couplage amine le rituximab sur une surface CM5, et en utilisant la protéine CD20 comme analyte. Le K_D a alors été évalué à 160 nM.¹⁴¹

Ces résultats illustrent la manière dont les K_D d'une même interaction peuvent parfois être différents selon les conditions d'analyse. Puisque l'immobilisation du ligand contraint l'analyte à n'arriver que par un côté, il est concevable que les techniques de caractérisation de surface peuvent générer des K_D sensiblement supérieurs aux techniques en solution. Mais ici, certaines des affinités citées sont très éloignées de l'originelle déterminée par cytométrie de flux ($K_D = 5\text{nM}$).⁶² Bien sûr, il est évident que les résultats obtenus sur surfaces d'or peuvent différer de ceux obtenus sur cellule, étant donné que cette dernière possède à sa surface de nombreuses autres biomolécules soumises à une dynamique spatiale et temporelle, créant un environnement très complexe. Les techniques de caractérisation de surfaces sont tout de même régulièrement utilisées pour l'étude d'interactions ligand/récepteur à l'échelle subnanomolaire. De si gros écarts ne peuvent donc pas être totalement justifiés.

Puisque la surface ici développée consiste à être utilisée pour le criblage de mimes d'anticorps, l'antigène CD20 doit être choisi comme ligand (biomolécule greffée), et le rituximab, ainsi que tous ses fragments doivent être les analytes (biomolécules en solution).

I.2. Stratégies envisagées

Ce que l'on appellera CD20 dans la suite de ce manuscrit correspond à la boucle extracellulaire de la protéine CD20 (N163-Q187) composée de 25 résidus d'acides aminés. Ce fragment peptidique de 2928 Da est l'épitope reconnu par le rituximab. Comme dans la protéine native, il est cyclisé par un pont disulfure.

Dans un premier temps, la méthode de capture par interaction streptavidine / biotine a été sélectionnée pour le greffage du CD20 sur la surface. Il est en effet très simple de former des SAM biotinylées sur des surfaces d'or nu, et de les fonctionnaliser par la streptavidine. Cette procédure, qui conduit à la formation d'une plateforme 2D de streptavidine, est bien appropriée à l'étude d'interactions biomoléculaires car elle confère au ligand une orientation optimale. De plus, cette méthode d'immobilisation est moins coûteuse que l'utilisation d'une CM5 qui a aussi l'inconvénient d'avoir une présentation en volume du ligand, générant un risque de contrainte stérique. Dans ce contexte, le peptide CD20 a été biotinylé sur sa partie N terminale. (Figure 23).

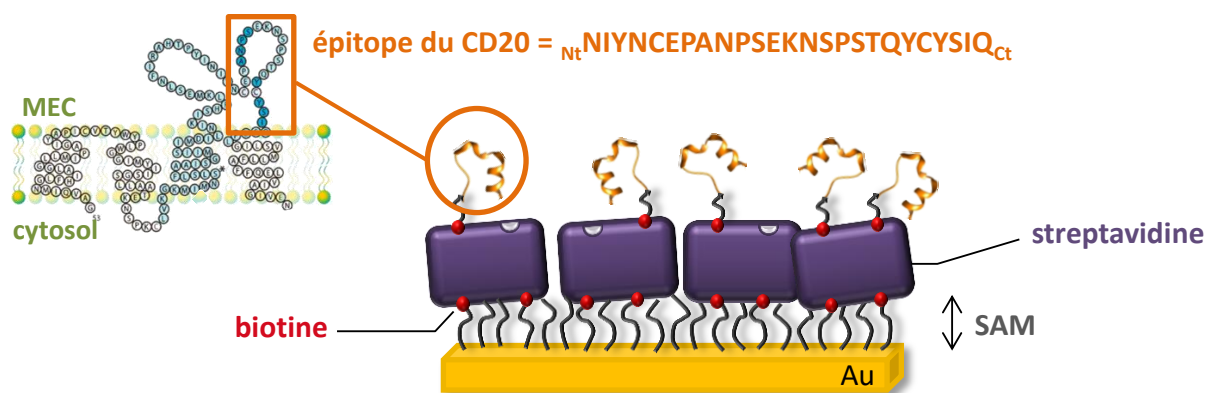


Figure 23 : Représentation schématique d'une surface fonctionnalisée avec l'épitope CD20 par une capture streptavidine/biotine. L'épitope C20 correspondant à une boucle extracellulaire de la protéine transmembranaire. MEC = matrice extracellulaire.

La surface fonctionnalisée par le CD20, présentée en figure 23, a été utilisée pour effectuer des premières mesures d'affinité avec le rituximab par SPR (Biacore T200). Il s'est avéré d'une part que l'interaction donne lieu à des signaux mesurables, mais d'autre part que la réponse provient à 96 % d'une interaction entre le rituximab et la sous-couche de streptavidine. L'injection de l'anticorps sur une piste de référence où seule la streptavidine a été greffée nous permet de le constater (Figure 24A). Si l'on se risque à réaliser une isotherme de Langmuir avec le signal correspondant uniquement à l'interaction spécifique CD20/rituximab, et que l'on y applique une régression non-linéaire, un K_D de 1,6 μM est obtenu, ce qui est beaucoup trop élevé pour caractériser une interaction antigène / anticorps (Figure 24B).

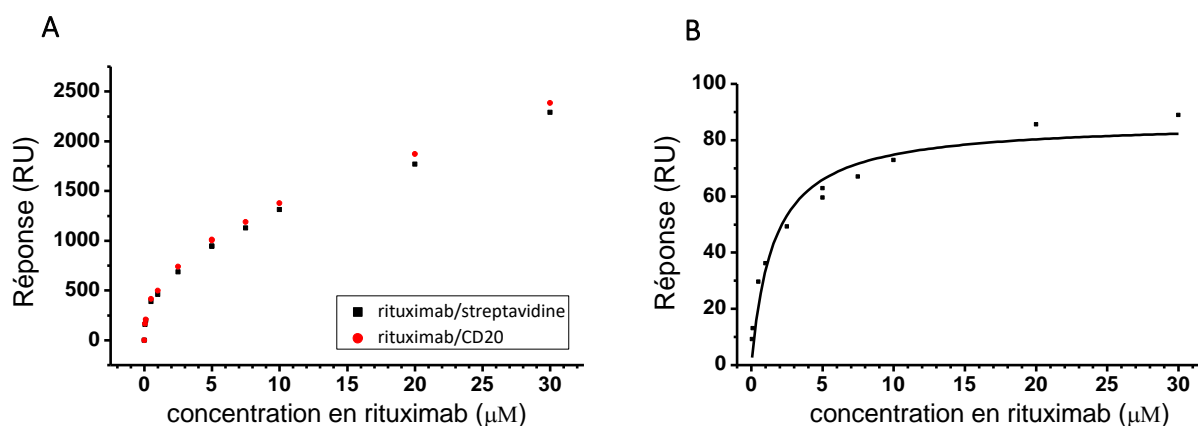


Figure 24 : Mesure d'affinité CD20/rituximab réalisée par SPR. A : Réponse observée pour le rituximab injecté à différentes concentrations sur une surface fonctionnalisée avec le CD20-biotine (rouge), et une surface 100% streptavidine (noir). B : Isotherme de Langmuir construite à partir de la soustraction des signaux CD20/rituximab – CD20-streptavidine.

En parallèle de cette étude, de rapides tests d'affinité ont été réalisés par BLI (Biolayer Interferometry). Puisque cette technique a très rapidement été écartée, son principe de fonctionnement ne fait pas l'objet d'une présentation détaillée. Le BLI est une méthode de caractérisation de surface où les capteurs sont composés de fibres optiques. Basée sur le principe d'interférométrie, cette méthode permet d'étudier les interactions biomoléculaires opérant à la surface du biocapteur plongeant dans des puits contenant la solution d'analyte. Quelques expériences ont été menées dans le but d'étudier si les interactions rituximab/streptavidine étaient diminuées avec ce type de biocapteurs. Malheureusement, les résultats n'ont pas été meilleurs, et toutes les modifications apportées au protocole pour optimiser les expériences n'ont abouti à aucune amélioration franche, les valeurs de K_D étant là aussi de l'ordre du micromolaire (Figure 25).

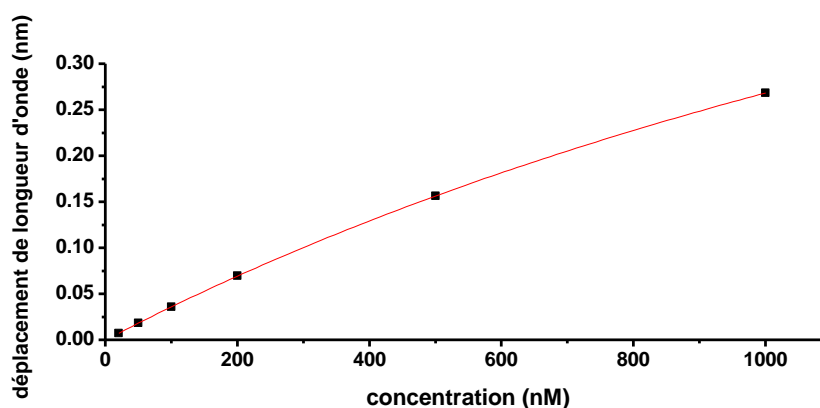


Figure 25 : Mesure d'affinité CD20/rituximab réalisée par SPR. L'isotherme de Langmuir est construite à partir des signaux issus de la soustraction CD20/rituximab – CD20-streptavidine. La spécificité du rituximab pour les capteurs CD20 ne se fait qu'à fortes concentrations, engendrant des valeurs de K_D élevées.

Les tentatives visant à diminuer les interactions non-spécifiques restant infructueuses, il était évident que les surfaces CD20 formées par capture streptavidine/biotine allaient potentiellement poser problème lors du criblage de courts fragments peptidiques.

D'autres stratégies d'immobilisation ont alors été envisagées, notamment par complexation, ou *via* différents coupages covalents :

- **la capture par étiquette Histidine** : en plus de pouvoir faciliter la purification du peptide synthétisé, les étiquettes histidine ont l'avantage de se situer à l'extrémité de ces derniers, et n'interfèrent donc pas dans l'interaction. Cependant, l'attraction des histidines pour le nickel peut souffrir de certains modes de régénération, nous obligeant parfois à immobiliser une nouvelle fois le ligand après chaque étape de régénération. D'autre part, la solution commerciale dans laquelle est stocké le rituximab est composée de citrate de sodium, un chélateur du nickel.¹⁴² Il est donc préférable de garder certaines précautions et de laisser cette stratégie de côté.

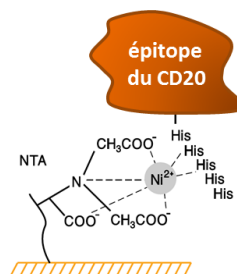


Figure 26 : Greffage du CD20 par capture d'une étiquette histidine sur une surface Biacore® nommée NTA.

- **le couplage amine** : bien qu'il soit facilement réalisable, ce mode d'immobilisation ne peut être appliqué dans notre cas. En effet, l'amine primaire libre du CD20 qui serait impliquée dans la liaison provient de la lysine ¹⁷⁵K adjacente à la séquence ¹⁷⁰ANPS¹⁷³, activement reconnue par le rituximab.⁶⁷ Le lien amide alors formé placerait cette zone de l'épitope face à la surface, l'empêchant de s'engager dans d'éventuelles interactions (Figure 27).

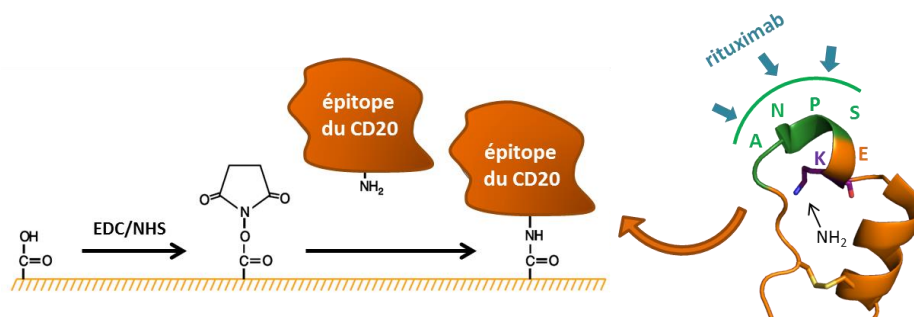


Figure 27 : Greffage du CD20 par couplage amide. Les groupements carboxyles sont activés par le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC), et le N-hydroxysuccinimide (NHS). Le CD20 représenté sur la droite comporte une lysine dont l'amine primaire libre pourrait attaquer le groupe partant alors formé sur la surface.

- **le couplage par pont disulfure** : cette méthode de greffage représente une bonne alternative au couplage amine lorsqu'un peptide possède plusieurs groupements amines libres. Bien que ces deux modes soient similaires, l'occurrence de la présence d'un thiol est moindre, et permet donc de diminuer la variabilité de présentation du peptide sur la surface (Figure 28). Malheureusement ici, le CD20 contient déjà deux cystéines engagées dans la formation d'un pont disulfure. En rajouter une troisième à son extrémité nécessiterait l'introduction de réactions orthogonales qui rendraient la synthèse plus compliquée.

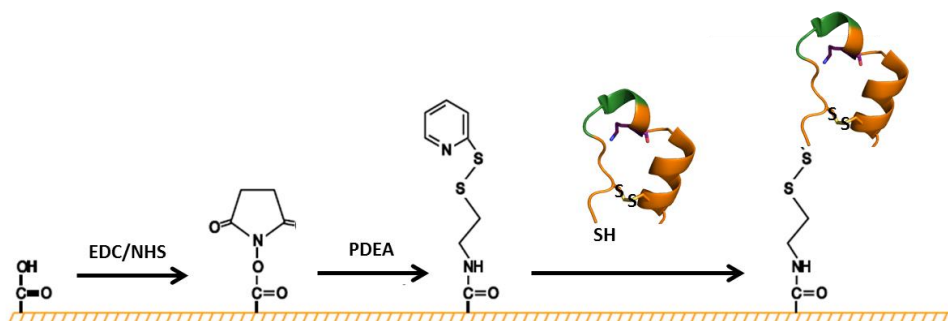


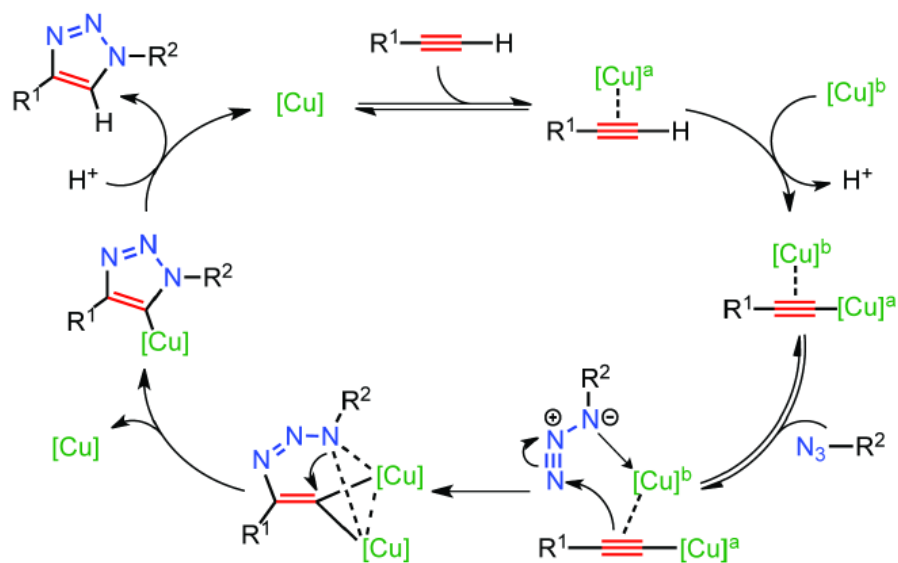
Figure 28 : Greffage du CD20 par liaison thiol, suite à l'introduction d'un pont disulfure sur la surface via le 2-(2-pyridinyldithio) éthaneamine hydrochlorate (PDEA).

- **le couplage par chimie « click »** : il consiste en une réaction chimiosélective s'effectuant entre une fonction localisée sur la surface, et sa fonction complémentaire localisée à l'extrémité du ligand. Ces groupements ne sont pas naturellement présents dans un peptide, et ne peuvent donc pas être à l'origine de réactions secondaires. Utiliser la chimie click confère plusieurs avantages : l'orientation du ligand est homogène, la concentration surfacique de celui-ci est facilement contrôlable et ne varie pas au cours du temps car la

liaison covalente engendre une grande stabilité du biocapteur. Il faut toutefois vérifier que les conditions de réaction soient compatibles avec la biomolécule à greffer. La réaction de chimie click choisie ici est la cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (CuAAC), et fait l'objet du paragraphe suivant.

I.3. La CuAAC

La notion de « chimie click » fut introduite en 2001 par Sharpless,¹⁴³ et désigne une réaction spécifique réalisée entre deux molécules dans des conditions très douces. Possédant des fonctions complémentaires, ces deux composés ont la capacité de s'assembler très rapidement, à la manière de deux pièces d'un puzzle, d'où le terme « click ». Les réactions de chimie « click » sont caractérisées par un rendement élevé, une stéréospécificité, une absence ou une très faible quantité de sous-produits formés, et des conditions douces (température ambiante, et peu ou pas de solvants organiques). L'une des réactions remplissant le mieux ces critères est la cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre.¹⁴⁴ Au départ non catalysée, cette cycloaddition consistant en la formation d'un lien triazole à partir d'un dipolarophile (alcyne) et d'un composé 1,3 dipolaire (azoture) a été décrite pour la première fois en 1893 par A. Michael, puis étudiée par R. Huisgen.^{145,144} Cette réaction était toutefois lente, ne s'effectuait qu'à haute température, et produisait deux isomères 1,4 et 1,5 disubstitués. Ce n'est qu'au début des années 2000 que les travaux de Sharpless¹⁴⁶ et ceux de Meldal^{147,148} ont démontré qu'en ajoutant un catalyseur, en l'occurrence le cuivre au degré d'oxydation (+I), la réaction est accélérée tout en ne formant que le composé 1,4 disubstitué. L'un des mécanismes proposés est présenté sur la figure 29¹⁴⁹ :

Figure 29 : Mécanisme de la CuAAC proposé par Fokin et al.¹⁴⁹

Le Cu^{I} peut être directement apporté au mélange réactionnel *via* des sels de Cu^{I} (ex. le bromure de cuivre CuBr). Il est également possible de combiner des sels de Cu^{II} (ex. le sulfate de cuivre CuSO_4) avec un agent réducteur (ex. l'ascorbate de sodium) afin de générer le Cu^{I} *in situ*. Compte tenu du manque de stabilité de l'ion Cu^+ en solution aqueuse (Cu^+ se dismute spontanément en Cu^0 et Cu^{2+}), le cuivre au degré +I est stabilisé par complexation avec un ligand tel que le tris(3-hydroxypropyltriazolylméthyl)amine (THPTA) ou le tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amine (TBTA), ce dernier nécessitant de travailler dans un milieu hydro-organique.¹⁵⁰

La littérature décrit de nombreux exemples dans lesquels la molécule d'intérêt (molécule organique ou biomolécule) est fixée par CuAAC sur une surface d'or où une SAM mixte présentant un groupe terminal azoture est chimisorbée. Les pionniers de cette technique d'immobilisation sont Chidsey et al qui ont eu l'idée en 2003, d'utiliser cette réaction pour fonctionnaliser des surfaces d'or.¹⁵¹ Ils démontrèrent que les groupes terminaux azoture des SAMs réagissent très rapidement avec les groupes alcynes, selon une réaction d'ordre 2. Dans leur étude, la constante de vitesse de la réaction de greffage d'un éthynylferrocène est en effet de $1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, conduisant la SAM azoture à être entièrement fonctionnalisée en l'espace de 3 minutes lorsque la concentration de la solution d'alcyne est à $20 \mu\text{M}$.¹⁵² La rapidité de fonctionnalisation, ainsi que la haute reproductibilité des densités surfaciques obtenues amènent la CuAAC à être de plus en plus utilisée pour l'immobilisation de peptides.^{153,154,155,156} Le greffage contrôlé du peptide d'adhésion cellulaire Arg-Gly-Asp-

Ser-Pro par chimie « click » a par exemple permis d'étudier la dépendance des concentrations surfaciques en peptide sur les mécanismes d'adhésion et de diffusion cellulaire.¹⁵³ Le développement de surfaces fonctionnalisées par CuAAC avec des protéines de la capsid du virus d'immunodéficience acquise (VIH) a aussi participé à améliorer l'efficacité des procédés visant à détecter les anticorps anti-VIH dans les milieux complexes. L'immobilisation par chimie « click » permet en effet de diminuer le seuil de détection des anticorps, comparé aux biopuces préparées avec d'autres techniques d'immobilisation.¹⁵⁴

II. Fonctionnalisation de surface par l'épitope CD20

La fonctionnalisation des surfaces d'or par l'épitope CD20 s'effectue en deux étapes : la formation de la SAM-azoture, puis le greffage du CD20-alcyne sur la SAM préformée via la réaction de CuAAC.

II.1. Préparation et caractérisation de la SAM-azoture

La construction des biocapteurs débute par la formation d'une monocouche mixte de thiol-alcane-OEG, permettant d'éloigner le peptide de la surface d'or. Par ailleurs, la présence de la chaîne OEG (un oligoéthylène glycol à 4 ou 6 motifs) limite l'adsorption non spécifique des biomolécules sur la surface.¹⁵⁷ Pour cela, cette surface est incubée dans une solution éthanolique à 1 mM des 2 thiols : HS-(CH₂)₁₁-OEG₆-N₃ et HS-(CH₂)₁₁-OEG₄-OH. Le premier composé, possédant une terminaison azoture (N₃), apporte la fonction nécessaire pour réaliser la réaction de chimie click. Le second composé, possédant une terminaison hydroxyle (OH), a pour but de diluer les fonctions azoture sur la surface. Une corrélation sera établie entre la proportion de thiol-azoture dans la solution utilisée pour préparer la SAM et la densité surfacique en biomolécule greffée. La force de la liaison or-thiol, ainsi que la conformation hélicoïdale de l'hexa(éthylène-glycol) combinée aux groupements alkyles génèrent de la robustesse et une grande organisation de la surface.^{130,158} Utiliser une chaîne OEG plus longue de deux monomères pour le composé azoture augmente par ailleurs l'accessibilité de cette fonction en la faisant émerger de la SAM (Figure 30).

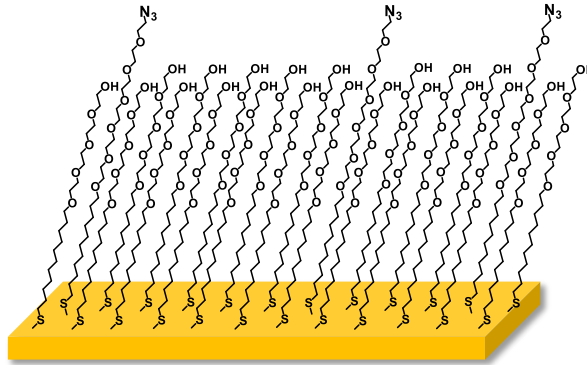


Figure 30 : Schématisation de la SAM-azoture formée sur la surface d'or.

Les propriétés hydrophile/hydrophobe de la surface générée sont corrélées à la densité en azoture présent sur la SAM. Plus la densité en azoture est élevée plus la surface est hydrophobe.¹⁵² Ce phénomène, qui peut être caractérisé par des mesures d'angle de contact (CAM), donne également la possibilité de contrôler la qualité et la reproductibilité des SAM formées. L'angle de contact représente l'angle formé entre la surface et la tangente à une goutte d'eau déposée (Figure 31). Ces angles résultent des énergies d'interface existantes entre les phases liquide, solide, et vapeur.

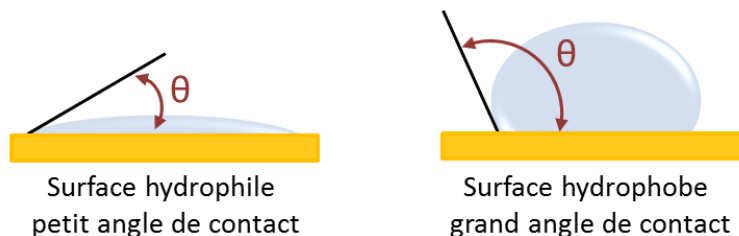


Figure 31 : Angles de contact formés entre une surface et la tangente d'une goutte d'eau déposée sur celle-ci.

Des mesures d'angle de contact ont été effectuées sur différents capteurs de QCM-D dans le but d'observer l'évolution de la mouillabilité de la surface en fonction de l'hydrophobicité de la SAM (Figure 32). Les images montrent l'évolution de la forme de la goutte d'eau ($V=5 \mu l$) déposée sur des surfaces fonctionnalisées par des SAM possédant des pourcentages variables en thiol- N_3 .

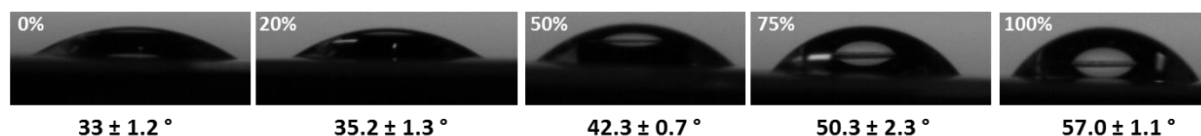


Figure 32 : Mesures d'angle de contact effectuées sur des SAM résultant de l'incubation de surfaces dans des solutions à différents pourcentages de composés azoture (0, 20, 50, 75, 100%). Les angles de contact moyens notés en dessous de chaque image représentent une moyenne d'au moins trois mesures.

Comme attendu, la convexité de la goutte est de plus en plus accentuée avec l'augmentation du nombre de fonctions azoture sur la SAM. Nous pouvons aussi noter une variation très faible de l'angle de contact pour des pourcentages en fonctions azoture s'étendant de 0 à 20 %. Il faut cependant souligner que la composition de la SAM ne reflète pas exactement la composition de la solution. La taille ou la nature du groupement terminal impactent en effet la vitesse d'adsorption de chacun des alcane-thiols, pouvant entraîner un greffage plus rapide de l'une des deux espèces dans le cas des SAM mixtes.^{152,159}

Le taux de fonctions azoture réellement greffées sur la surface est déterminé par la loi de Cassie¹⁶⁰ :

$$\cos \theta = x_1 \cos \theta_1 + x_2 \cos \theta_2 \quad (16)$$

où x_1 est la fraction molaire surfacique en HS-(CH₂)₁₁-EG₄-OH ; x_2 est la fraction molaire surfacique en HS-(CH₂)₁₁-EG₆-N₃ ; θ , θ_1 et θ_2 sont les angles de contact mesurés sur une surface fonctionnalisée respectivement par la SAM mixte, 100% OH et par 100% N₃. Grâce à l'équation 16, le pourcentage réel du composé HS-(CH₂)₁₁-EG₆-N₃ formant la SAM a pu être déterminé pour des surfaces à 20, 50, et 75% en thiol N₃ (Figure 33).

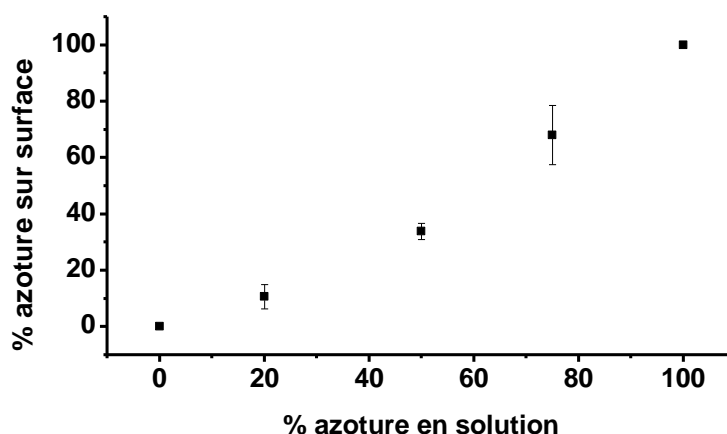


Figure 33 : Relation entre le taux de fonctions azoture sur surface et en solution déterminée à partir des angles de contact et de la loi de Cassie. Pour chaque pourcentage, les mesures ont été faites au moins en triplicat.

Lorsque le taux d'azoture en solution est de 20, 50, ou 75 %, celui calculé sur la surface n'est que de $10,6 \pm 4,3$; $33,8 \pm 2,9$; et $68,0 \pm 10,5$ respectivement. La vitesse d'adsorption des composés azoture est donc plus faible que celle des composés possédant une extrémité hydroxyle. En pratique, cette technique n'est pas très utilisée car l'adsorption préférentielle d'alcane-thiols est très dépendante de la nature et de la taille de ceux-ci, ainsi que des caractéristiques de la surface d'or (par exemple sa rugosité), et ne peut être généralisée. La mesure d'angles de contact nous permet cependant d'avoir une bonne idée de la composition finale de la SAM avec laquelle nous travaillons. En bref, le contrôle de la quantité de fonctions azoture en solution rend possible le contrôle de leur quantité sur la surface, et donc le nombre de peptides greffés par la suite. Ce nombre ne peut toutefois pas être calculé avec précision car des variations d'angle de contact trop faibles (surtout entre 0 et 20% en thiol- N_3) engendrent des incertitudes de mesures relativement élevées.

II.2. Optimisation des conditions de chimie « click » par électrochimie

L'optimisation de la réaction de cycloaddition azoture-alcyne visant à greffer l'épitope du CD20 sur la SAM a dans un premier temps été réalisée. Les conditions optimales de réaction peuvent sensiblement changer que l'on soit en solution ou sur surface. C'est pourquoi nos premiers tests ont consisté à observer l'impact de la source du cuivre (CuBr ou $CuSO_4$) ou du ligand complexant (THPTA ou TBTA) sur le rendement de la réaction, afin de sélectionner au mieux les réactifs à utiliser. Le greffage d'un éthynylferrocène dans différentes conditions a donc été suivi par QCM-D, et les variations de fréquence ont dans

chaque cas été comparées. L'éthynylferrocène fut utilisé pour limiter la consommation excessive en CD20-alcyne lors de cette étape d'optimisation. Les résultats de ces tests ont permis de répondre à deux questions :

- quelle source de cuivre choisir : CuBr (Cu^{I}) ou CuSO_4 (Cu^{II}) réduit par l'ascorbate ?

Le bromure de cuivre induisait parfois des dérives négatives et continues de la fréquence de résonance du cristal de quartz lors de l'injection des réactifs. Cette dérive négative a été interprétée par la précipitation du Cu^0 sur la surface suite à la dismutation de Cu^{I} . Le sulfate de cuivre (Cu^{II}) réduit par l'ascorbate de sodium, lui, a toujours conduit à l'obtention d'un plateau. Ce dernier a alors été sélectionné.

- quel ligand complexant du Cu(I) utilisé : THPTA ou TBTA ? Sachant que le THPTA est soluble dans l'eau, et que le TBTA ne l'est que dans les milieux hydro-organiques, cette question paraît assez importante, car elle conditionne le solvant dans lequel travailler. Alors que la présence du TBTA s'accompagnait de changements de fréquence reproductibles, ceux provoqués par le THPTA étaient très variables et instables. Le TBTA a donc été sélectionné pour la qualité des signaux obtenus.

Les variations de fréquence mesurées en QCM-D ont beaucoup aidé à la sélection des réactifs puisqu'elles sont reliées au greffage de la molécule-alcyne. Grâce aux propriétés rédox de l'éthynylferrocène, la présence de celui-ci sur la surface peut ainsi être vérifiée par voltamétrie cyclique.

La voltamétrie cyclique consiste à appliquer une variation de potentiel à une électrode (ici la surface d'or du quartz fonctionnalisé par le ferrocène). Le potentiel est balayé vers des valeurs positives croissantes pour oxyder l'espèce rédox ($\text{Fe}^{\text{II}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}} + e^-$), puis revient vers sa valeur initiale pour réduire le ferrocène ($\text{Fe}^{\text{III}} + e^- \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}$). L'échange d'électrons génère un courant électrique positif pour la réaction d'oxydation et négatif pour l'étape de réduction (Figure 34). Les paramètres caractéristiques d'une espèce rédox greffée en couche mince à la surface d'une électrode sont les suivants :

- les potentiels de pics anodique (oxydation : E_{pa}) et cathodique (réduction : E_{pc}) sont liés au potentiel standard du couple rédox tels que $E^0 \approx E_{\text{pa}} \approx E_{\text{pc}}$.

- la différence de potentiels des pics anodique et cathodique ΔE_p est proche de zéro.

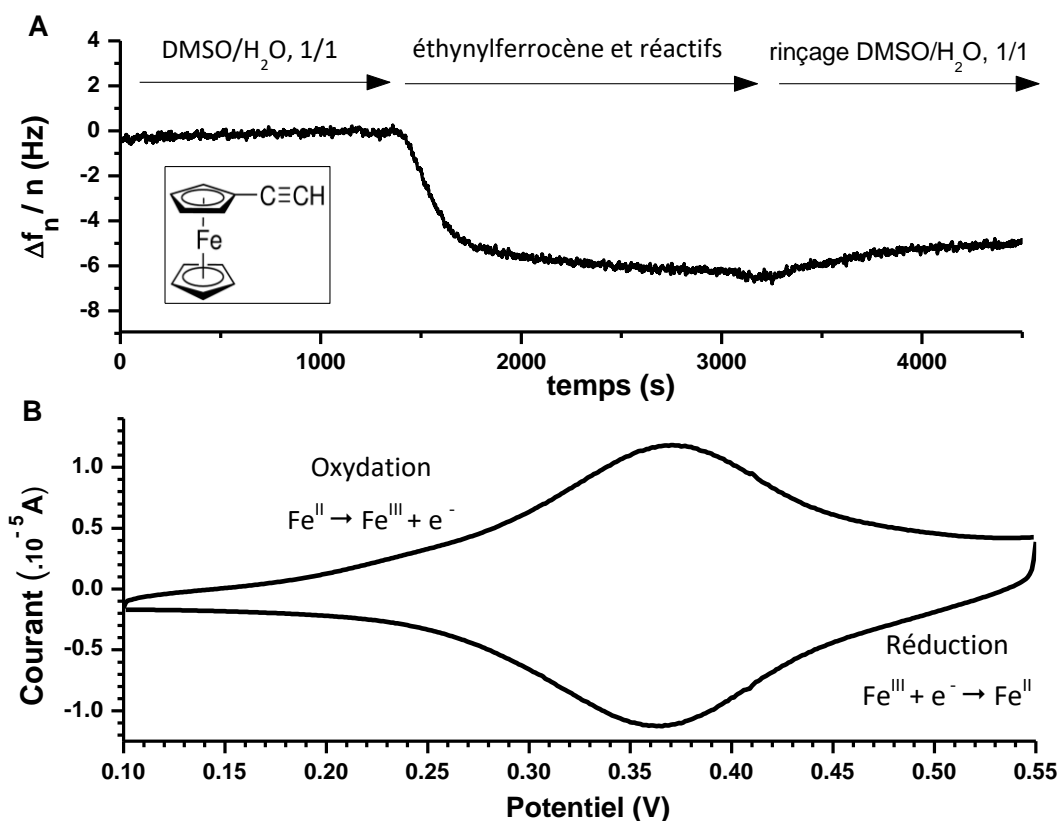


Figure 34 : Greffage du ferrocène suivi par QCM-D puis contrôlé par voltamétrie cyclique. A : Le greffage du ferrocène est effectué sur un quartz d'or dont la SAM a été préparée avec 50% de thiol-N₃. L'injection des réactifs de click (éthynylferrocène 150 μM, TBTA 0,9 μM, CuBr 0,9 μM dans DMSO/H₂O 1:1, pH 8) s'est déroulée à 10 μl.min⁻¹. La courbe représente les variations de fréquence pour l'harmonique n=7. B : Courbe de voltamétrie cyclique enregistrée sur la surface résultant du greffage du ferrocène par la réaction de click dans une solution électrolytique aqueuse 0,1 M en KPF₆ enregistrée à 20 mV.s⁻¹.

L'exemple ci-dessus illustre une expérience visant à vérifier que la diminution de fréquence mesurée en QCM-D (Figure 34A) est causée par le greffage covalent du ferrocène lorsque celui-ci a été injecté à 150 μM, que la source de cuivre était CuBr et le ligand complexant du Cu(I) était le TBTA. Les courbes de voltamétrie cyclique (Figure 34B) prouvent que le ferrocène est greffé sur la surface ($\Delta E_p = 0$).

II.3. Formation de surfaces antigéniques par chimie click

Une fois les conditions de chimie « click » optimisées, le greffage du CD20-alcyne a été étudié (Figure 35). Il a d'abord été suivi par QCM-D pour ensuite être réalisé par SPR.

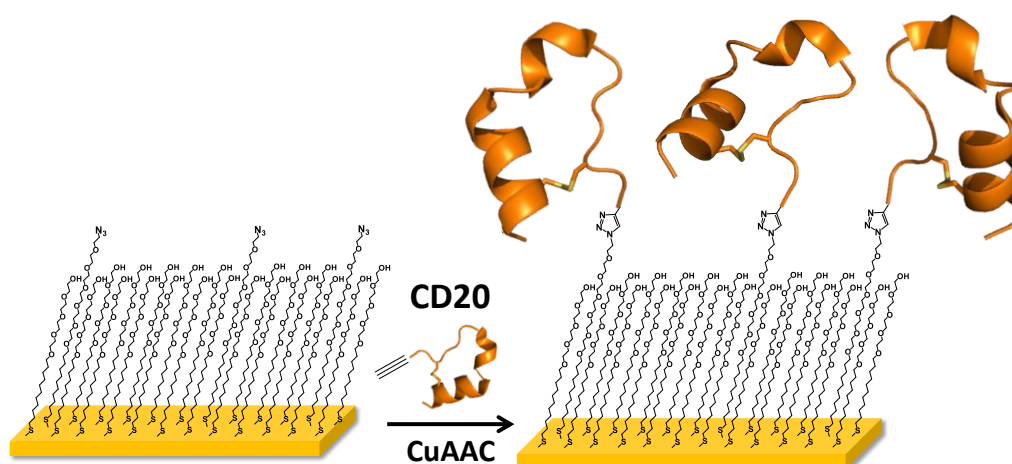


Figure 35 : Schématisation de la formation de la surface antigénique.

II.3.a. Suivi du greffage par QCM-D

De par la nature des réactifs (ligand complexant TBTA et peptide CD20), la réaction de chimie « click » sur surface se déroule en milieu DMSO:H₂O (1:1), qui représente donc le solvant d'étude. L'injection du CD20-alcyne (200 μM) et des réactifs de chimie « click » (TBTA 500 μM, CuSO₄ 500 μM, et sodium-L-ascorbate 3 mM) à 10 μl.min⁻¹ dans une chambre de mesure de 80 μl induit une prompte décroissance de la fréquence de résonance (Figure 36), caractéristique d'une augmentation de la masse du quartz fonctionnalisé par une SAM-N₃. Environ 90% du signal maximum est atteint au bout de seulement 5 min, preuve d'un mécanisme rapide de CuAAC. Par ailleurs, le signal obtenu après rinçage de la chambre de mesure reste stable sur une longue durée, illustrant un greffage robuste des peptides sur la surface. Néanmoins, nous notons une légère remontée du signal de fréquence au début de l'étape de rinçage, qui s'explique d'une part par la variation de viscosité du milieu (due à la disparition des réactifs de click dans la solution H₂O/DMSO) et d'autre part par la perte de peptides potentiellement adsorbés sur la surface sans avoir chimiquement réagi avec les groupes azoture. Enfin, il faut noter qu'aucune variation de fréquence ne se produit si la surface SAM-N₃ est mise en contact avec le CD20-alcyne sans les réactifs de click, prouvant encore une fois que les signaux obtenus ici sont causés par le greffage covalent du peptide sur la surface.

Le deuxième paramètre enregistré en QCM-D est celui de dissipation d'énergie ΔD , qui reflète les propriétés viscoélastiques du biofilm formé. Comme nous pouvons le constater

sur le graphe en figure 36, la variation de dissipation est très faible ($0,6 \cdot 10^{-6}$), ce qui est caractéristique d'une monocouche rigide. Nous pouvons alors supposer que le CD20 est immobilisé de manière ordonnée sur la surface.

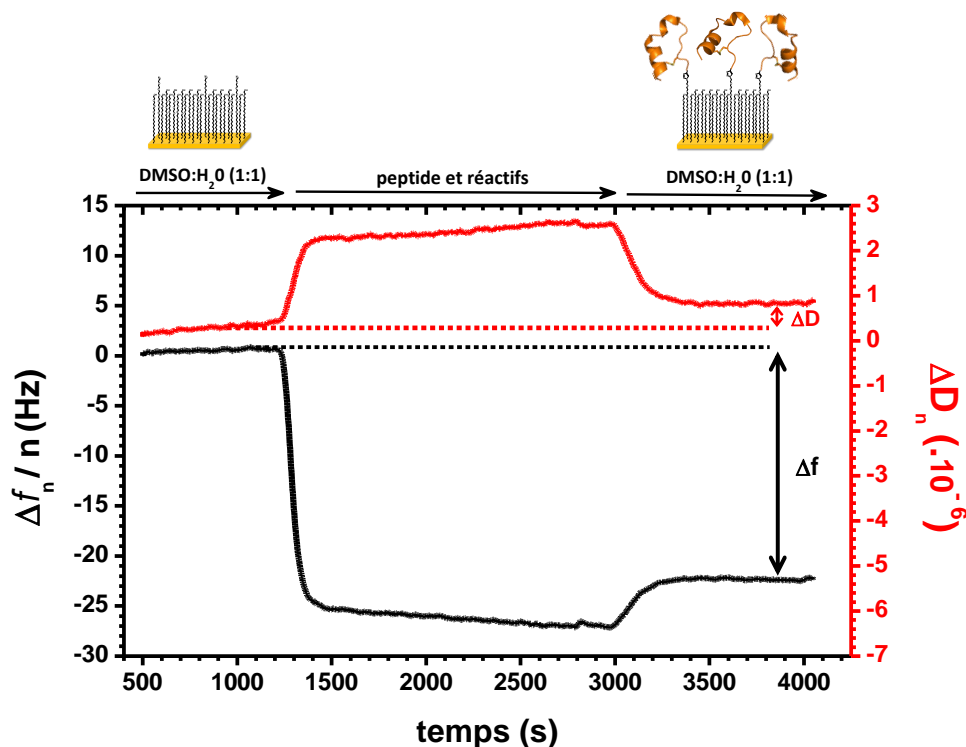


Figure 36 : Suivi du greffage du CD20 sur un quartz d'or par QCM-D. Cet exemple d'expérience a été obtenu avec une surface fonctionnalisée par une SAM contenant 12,5% de fonctions azotures. Les courbes noire et rouge représentent respectivement les variations de fréquence et de dissipation pour l'harmonique $n=7$. Débit d'injection = $10 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$

II.3.b. Suivi du greffage par SPR

Même si elle est utilisée depuis peu de temps, la CuAAC est vite devenue un moyen avantageux d'immobiliser des biomolécules sur des biopuces. Bien que certains commencent à appliquer cette méthode de fonctionnalisation de surface *in situ*, c'est-à-dire à l'intérieur de l'instrument,¹⁶¹ la CuAAC est plus généralement réalisée de manière *ex-situ* à cause de la grande proportion en solvant organique (comme le DMSO ou l'éthanol) incompatible avec l'appareillage.^{162,163} Pour ce faire, la surface d'or est simplement immergée dans le mélange de réactifs de chimie « click ». Malheureusement, la fonctionnalisation « *ex situ* » ne permet ni le contrôle de la quantité de ligand réellement greffé, ni la possibilité d'avoir une piste de référence car toute la surface est incubée dans la

même solution de réactifs. A l'opposé, le greffage *in situ* permet une fonctionnalisation indépendante des 4 pistes créées par le dispositif de microfluidique.

La réaction de chimie « click » *in situ* a été testée grâce à l'injection contrôlée des réactifs (CD20-alcyne, CuSO_4 , ascorbate et TBTA dans un mélange H_2O /DMSO (1 /1, v/v)) sur une surface dont la SAM a été préparée avec une solution à 20% de thiol- N_3 . Les solutions ont été séquentiellement injectées sur chaque piste (dont les microcanaux font 60 nl de volume) avec un débit de $2 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, et sur une durée de 8 minutes. Sachant que les consignes du constructeur limitent les injections de solutions de DMSO 50 % à 10 minutes maximum, et que les expériences de QCM-D démontrent que la réaction se fait assez rapidement, une durée d'injection de 8 minutes nous a semblé idéale. Alors que l'appareil est maintenu sous un flux continu d'eau, l'injection des réactifs de chimie « click » en solution dans le mélange H_2O /DMSO à pH 8 génère un changement important du signal de SPR. En effet, la présence de DMSO modifie très fortement l'indice de réfraction du milieu. Cette variation empêche de suivre le greffage en temps réel (Figure 37). Une quantification est tout de même possible par la différence d'amplitude de la ligne de base avant et après l'injection des réactifs de chimie « click ». (Figure 37 - encart).

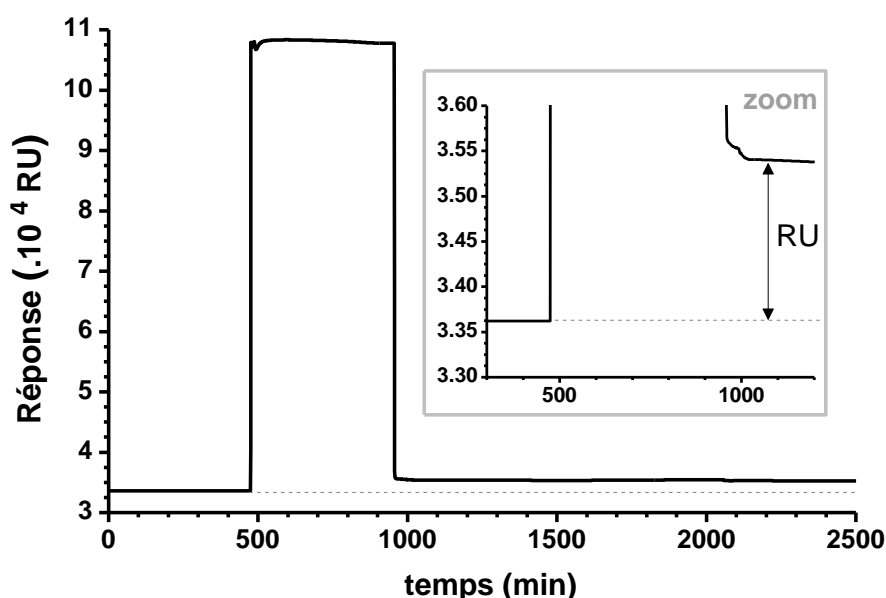


Figure 37 : Suivi du greffage du CD20-alcyne sur une SAM préparée à partir d'une solution contenant 20% de thiol- N_3 . La solution de chimie « click » qui comporte 50% de DMSO induit une augmentation importante de l'amplitude du signal (RU). La différence du signal de la ligne de base avant et après injection donne accès au nombre de RU correspondant à l'immobilisation du CD20.

L'injection d'un mélange eau /DMSO (1 /1) sans aucun réactifs sur une SAM-azoture a montré qu'après rinçage, le signal de départ retrouve sa valeur initiale. Même si la perturbation est intense lors de l'injection, la ligne de base n'est donc pas perdue. Par conséquent, le nombre d'unités de résonance gagné après rinçage est uniquement lié à la quantité de peptide greffé.

Dans le chapitre III, des cinétiques d'interaction avec le rituximab seront parallèlement effectuées sur des surfaces fonctionnalisées de manière *in* ou *ex situ*, afin de d'évaluer si le mode de greffage impacte les propriétés de reconnaissance.

II.3.c. Suivi du greffage par PM-IRRAS

En QCM-D, nous avons vu que l'immobilisation du peptide est bien causée par la réaction de chimie « click » car le CD20 n'est pas fixé sur la surface en l'absence des autres réactifs. De façon à confirmer le greffage covalent, une caractérisation de la surface a été réalisée par spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de phase (PM-IRRAS). C'est une technique d'analyse vibrationnelle qui permet la caractérisation de matériaux adsorbés ou de couches minces sur surfaces métalliques. L'échantillon est étudié par réflexion sous incidence rasante (typiquement 80°).

Pour des couches très fines (inférieures à 50 nm), la méthode nécessite d'être associée à un système modulant la polarisation du faisceau incident. La réflectivité différentielle induite par l'échantillon qui interagit avec les lumières polarisées p- et s- de manière distincte a en effet le pouvoir d'accroître la sensibilité des mesures, et donc de faciliter l'analyse de la structure chimique de la surface. Cette technique est non destructrice, qualitative et peut être quantitative.

Les analyses de PM-IRRAS ont été réalisées sur la plate-forme technique de chimie de l'institut UTINAM de Besançon. Nous avons ainsi comparé deux surfaces : la première était fonctionnalisée par une SAM 100% azoture, et sur la deuxième était greffé le peptide CD20. L'objectif était d'observer la disparition des fonctions azotures libres de la SAM, au profit de l'apparition de certaines fonctions inhérentes aux peptides. Par cette technique, Hudalla et

al. ont mis en évidence le greffage de peptides RGD (Arg-Gly- Asp) sur une SAM-azoture avec une vitesse de réaction de chimie click à $0,2 \text{ min}^{-1}$.¹⁵³

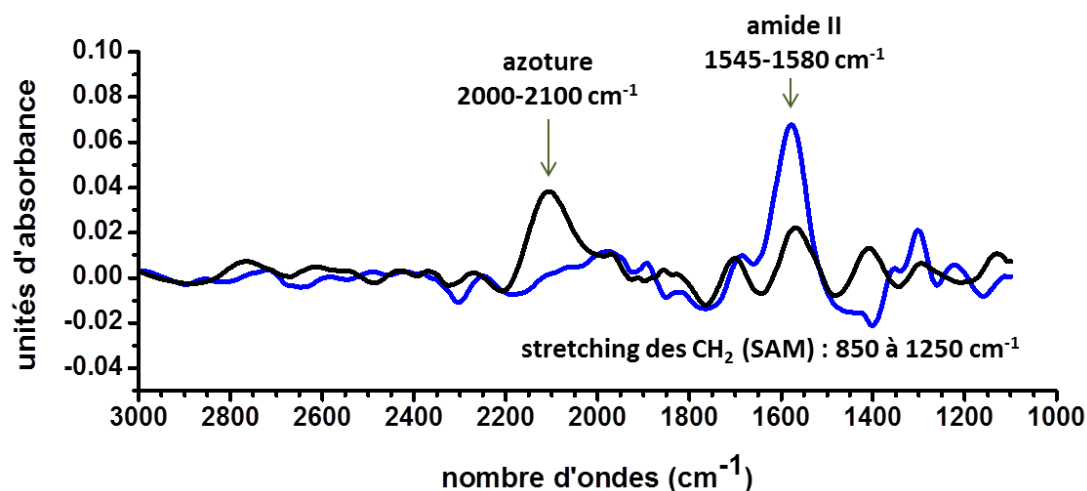


Figure 38: Spectres PM-IRRAS illustrant la réaction de chimie click pour le greffage du CD20 sur une SAM 100% azoture adsorbée sur une surface d'or de SPR. La courbe noire correspond à l'analyse de la surface portant la SAM-azoture. La courbe bleue représente l'analyse de la surface sur laquelle le greffage du CD20 a été réalisé.

Les spectres de la figure 38 sont assez bruités. Nous pouvons toutefois observer une bande d'absorption émergente autour de $2000-2100 \text{ cm}^{-1}$ pour la puce « avant réaction » (courbe noire) qui est caractéristique des fonctions azoture. Après réaction, la courbe bleue montre que cette bande a disparu alors qu'une autre, caractéristique des fonctions amide secondaires, apparaît autour des $1550-1600 \text{ cm}^{-1}$, et démontre la présence des peptides sur la surface. Néanmoins, un pic de plus faible intensité est aussi présent au même nombre d'onde pour la puce « avant réaction », et peut être dû au bruit de fond assez prononcé qui nous empêche de calculer un rendement de réaction. Les conditions d'analyse non optimisées ou le vieillissement des surfaces pourraient en être la cause (une semaine s'écoulait généralement entre la préparation à Grenoble et l'analyse à Besançon). Néanmoins ces analyses ont mis en évidence la disparition des fonctions azoture, ce qui prouve que le peptide CD20 n'est pas physisorbé sur la surface mais bien greffé de façon covalente.

III. Caractérisation de la surface antigénique

Plusieurs études suggèrent que l'augmentation de l'expression du CD20 à la surface des cellules module les réponses biologiques des mAbs comme le CDC ou l'ADCC (ADCC), qui conduisent à la mort cellulaire.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ De plus, la densité en ligand greffé joue un rôle important dans les études d'interactions sur surface et la détermination des affinités. Ce phénomène est fortement exacerbé lorsque l'un des partenaires est multivalent. Contrôler la densité surfacique en CD20 est donc un enjeu crucial pour la réalisation correcte des tests d'affinité effectués par la suite avec le rituximab ou ses fragments. C'est pourquoi la relation existant entre la composition initiale de la solution de thiols et la densité en CD20 obtenue devait être préalablement définie. Les surfaces antigéniques formées ont par conséquent fait l'objet d'une caractérisation par QCM-D, spectroscopie ellipsométrique et SPR, qui donnent accès à certaines informations comme la densité surfacique en CD20, ainsi que l'épaisseur et le taux d'hydratation de la couche biomoléculaire.

III.1. Détermination de la densité surfacique et de l'épaisseur de la couche de CD20

III.1.a. Caractérisation par QCM-D

En QCM-D, les variations de fréquence et de dissipation d'énergie offrent la possibilité de remonter aux masses surfaciques et, par la suite, aux épaisseurs. Les précédents résultats relatifs au greffage du CD20 ont révélés des variations de dissipation très faibles. Nous sommes en effet dans le cas où $\Delta D_n / (\Delta f_n / n) < 4 \cdot 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$. Le biofilm est donc considéré comme quasi-rigide, et l'équation de Sauerbrey relatant la proportionnalité entre la variation de fréquence ($\Delta f_n / n$) et le gain en masse (Δm) peut s'appliquer¹¹¹. Pour rappel :

$$\Delta m = - C_{\text{QCM}} \cdot (\Delta f_n / n) \quad (9)$$

où C_{QCM} représente la constante de sensibilité de masse, qui est égale à $18,06 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-1}$ pour un quartz caractérisé par une fréquence fondamentale $f_F = 4,95 \text{ MHz}$. La masse Δm

extraite des données de QCM-D est la somme de la masse de l'adsorbat et celle de l'eau qui lui est hydrodynamiquement couplée.

Les masses hydratées Δm des peptides ont été calculées pour plusieurs taux d'azoture (tableau 2). Le greffage de l'épitope CD20 sur une SAM composée de 12,5% de thiol-azoture conduit par exemple à une baisse de fréquence de 24 Hz, signifiant un gain en masse hydratée de 432 ng.cm⁻².

%N ₃	$\Delta f_n/n$ (Hz)	Δm en CD20 hydraté (ng.cm ⁻²)
0	-	nd
1	-5,6 ± 0.2	100,3 ± 3,6
2,5	-13,9 ± 1.9	251,2 ± 33,7
12,5	-23,9 ± 0,5	431,7 ± 8,6
20	-23,3 ± 1,2	421,4 ± 22,4
50	-22,3 ± 0,6	402,2 ± 10,3

Tableau 2 : Variations de fréquence de résonance mesurées en QCM-D lors du greffage de l'épitope CD20 sur des cristaux de quartz fonctionnalisés avec différents pourcentages de thiol-N₃ dans la solution utilisée pour préparer la SAM. Les masses surfaciques associées sont calculées à partir de la relation de Sauerbrey. Chaque pourcentage a au moins été étudié en duplicat.

D'après le tableau 1, la variation de fréquence augmente progressivement avec le pourcentage en azoture, jusqu'à parvenir à une valeur maximale de 24 Hz, déjà atteinte pour 12,5%. Il semblerait donc que nous ne puissions pas greffer plus de 430 ng.cm⁻² de peptide hydraté. Pour des pourcentages supérieurs à 12,5% en azoture, la valeur constante de la masse hydratée ne signifie pas que le nombre de peptides greffés est identique. Le taux d'hydratation de la couche de CD20 pourrait en effet varier. Celui-ci peut être déterminé en comparant les masses obtenues par QCM-D aux masses optiques extraites de mesures effectuées par ellipsométrie.

III.1.b. Caractérisation par SE couplée à la QCM-D

Coupler l'ellipsométrie spectroscopique à la QCM-D donne la possibilité de suivre les caractéristiques optiques d'un biofilm durant son processus de formation.¹⁶⁷ La densité surfacique en CD20 est estimée grâce à la détermination expérimentale de l'épaisseur d , de l'indice de réfraction n de la couche d'épitope sur la SAM et par l'application de la loi de De Feijter (Eq 7, p 35). Pour cela, nous avons utilisé un dispositif développé par R. Richter et al.

(Figure 39).¹⁶⁸ Il consiste en un ellipsomètre spectroscopique (Woollam M2000) dont le faisceau incident traverse les fenêtres transparentes d'une chambre de mesure adaptée d'un module de QCM-D et frappe la surface d'un cristal de quartz avec un angle de 65° par rapport à la normale.



Figure 39 : Dispositif de SE couplée à la QCM-D développé par R. Richter et utilisé à l'Ecole des Sciences biomédicales de l'université de Leeds. Un module ouvert de QCM- D a été modifié avec une chambre transparente et placé à la verticale de telle sorte à pouvoir injecter les solutions.

Pour étudier le film biomoléculaire, il est nécessaire de caractériser les propriétés optiques de la surface fonctionnelle à chaque étape de sa construction.

En ellipsométrie spectroscopique, l'appareil enregistre les variations d'angles ellipsométriques Ψ et Δ en fonction de la longueur d'onde ($370 \text{ nm} < \lambda < 1000 \text{ nm}$). Les masses associées des films adsorbés sont extraites de ces variations par une régression non linéaire sur la base d'un modèle multicouches : Au/SAM/air visant à déterminer la masse de la SAM, puis Au-SAM/CD20/eau visant à déterminer la masse de la couche de CD20. Les analyses ont été réalisées à l'air pour la caractérisation du substrat Au puis Au+SAM et en milieu liquide pour la suite de la construction. Le choix de commencer la caractérisation à l'air est lié au manque de stabilité de l'or nu en milieu aqueux.

Le substrat est un cristal de quartz recouvert d'une fine couche de chrome et d'un film d'or de 100 nm. Compte tenu de son épaisseur, le film d'or peut être considéré comme optiquement opaque et homogène. Déterminer les propriétés optiques de cette couche d'or non fonctionnalisée constitue la première étape de l'étude. L'indice de réfraction n et le

coefficient d'extinction k de l'or sont définis par une régression non linéaire des variations Ψ et Δ pour un grand nombre de longueurs d'onde de 370 à 1000nm. La courbe de dispersion résultante est ensuite rendue continue en utilisant une fonction de spline (interpolation) dont l'algorithme est nommé B-Spline dans le logiciel CompleteEase. Le graphe de la figure 40 montre le profil des variations d'angles ellipsométriques que l'on peut enregistrer lors d'une caractérisation de l'or nu.

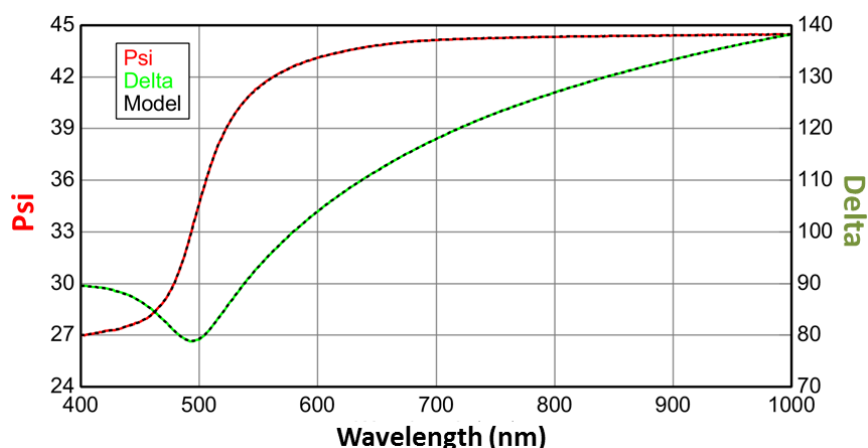


Figure 40 : Caractérisation d'une surface Au par le suivi des angles Ψ (courbe rouge) et Δ (courbe verte) en fonction de la longueur d'onde. La courbe théorique (noire) représente la régression linéaire.

Les relevés de $\Psi(\lambda)$ et $\Delta(\lambda)$ sont ensuite effectués après chaque dépôt : celui de la couche organique (SAM) et celui de la couche bioorganique (CD20). Celles-ci ne sont plus traitées par la fonction de spline mais comme des couches uniques et transparentes de Cauchy dont la loi est :

$$n_{(\lambda)} = A + \frac{B}{\lambda^2} \quad (6)$$

où A est un paramètre ajustable indépendant de la longueur d'onde ($A = 1,322$ pour l'eau), B est fixé à $0,00322$, et λ en μm . La constante C disparaît de l'équation 6 si l'on considère qu'elle est égale à 0. Chaque mesure caractérisant une SAM ou une couche peptidique conduit donc à la détermination du paramètre A (associé à l'indice de réfraction n) et à l'épaisseur d .

Plusieurs analyses ont été répétées pour caractériser des SAM à des taux d'azoture variables. Au moins deux surfaces ont été utilisées pour chaque pourcentage étudié. Quel

que soit les pourcentages de thiol-N₃, l'épaisseur obtenue d_{SAM} est de $2,5 \pm 0,6$ nm pour un indice de réfraction n_{SAM} de $1,29 \pm 0,04$ ($\lambda = 632,8$ nm), ce qui est conforme à ce que l'on peut trouver dans la littérature.¹⁶⁹ Solano et al. ont en effet caractérisé des SAM formées notamment à partir du thiol HS-(CH₂)₁₁-EG₃-OH et comparé les épaisseurs mesurées par AFM et par SE. Les mesures d'épaisseur dans l'air et dans l'eau donnent des valeurs similaires autour de $2,6 \pm 0,05$ nm.

Suite à la caractérisation de la SAM, un nouveau modèle « B-spline » est effectué pour enregistrer les paramètres de l'entité [Au-SAM] dans l'eau qui servira de substrat pour l'immobilisation du biofilm de CD20. Les réactifs de la réaction de chimie « click » sont injectés dans la cellule de mesure et les angles ellipsométriques sont suivis en fonction du temps de greffage et pour plusieurs longueurs d'onde comme le montre les graphes de la figure 41.

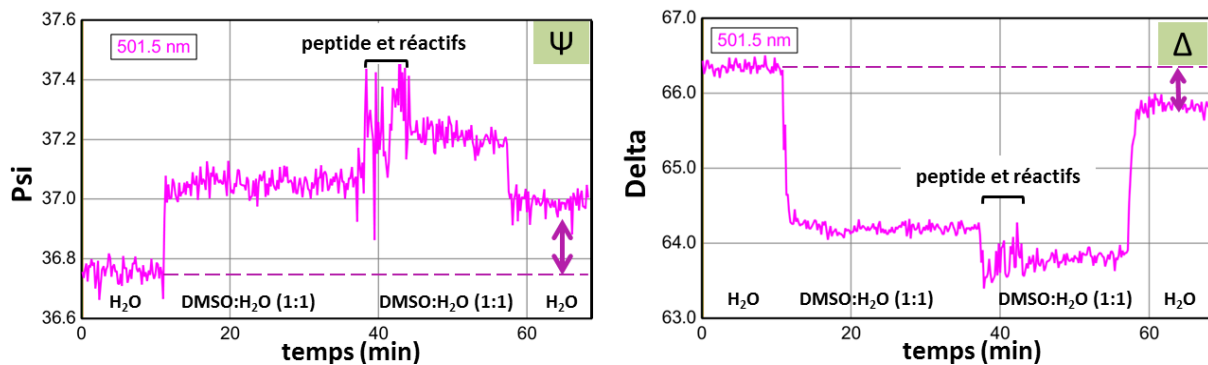


Figure 41 : Caractérisation par ellipsométrie spectroscopique du greffage de l'épitope CD20 sur une surface SAM-N₃ (préparée à partir d'un mélange contenant 12,5% de thiol-N₃). Les angles ellipsométriques Ψ et Δ sont suivis au cours du temps pour une longueur d'onde donnée (501,1 nm).

L'épaisseur d_f et la constante A_f sont extraites de ces données expérimentales grâce au modèle de Cauchy (Tableau 3). L'indice de réfraction n_f du film antigénique peut être déduit de A_f pour une longueur d'onde donnée, et la masse surfacique Γ est déterminée par la relation de De Feijter, qui peut aussi s'écrire de cette façon :

$$\Gamma = d_f \frac{(A_f - A_m)}{dn/dc} \quad (17)$$

avec A_m la constante de Cauchy du milieu ($n_{\text{eau}} = 1,322$) et dn/dc l'incrément d'indice de réfraction d'un peptide (dont la valeur moyenne est de $0,18 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$).¹⁷⁰

%N ₃	d_f	A_f	$n_f(\lambda = 632,8 \text{ nm})$	$\Gamma_{\text{CD20}}^{(1)}$ (ng.cm ⁻²)
1	3,4 ± 2,6	1,435 ± 0,096	1,443 ± 0,104	15,6 ± 1,9
2,5	5,7 ± 3,7	1,362 ± 0,029	1,370 ± 0,037	53,7 ± 0,2
12,5	4,9 ± 0,0	1,406 ± 0,002	1,414 ± 0,010	230,4 ± 7,1
20	4,4 ± 0,6	1,423 ± 0,033	1,435 ± 0,041	228,1 ± 29,9
50	4,4 ± 0,6	1,416 ± 0,015	1,424 ± 0,023	229,0 ± 3,1

Tableau 3 : Paramètres physiques extraits des analyses par SE des films de CD20 pour différents pourcentages en thiol-N₃ (utilisés pour préparer les SAM-N₃) Les valeurs moyennes sont obtenues à partir d'expériences au moins faites en duplicat. Les erreurs sont calculées à partir des écarts à la moyenne. (1) les masses surfaciques ont été calculées par la relation de De Feijter.

La forte incertitude sur l'épaisseur d_f aux faibles densités surfaciques est liée à l'hétérogénéité de la couche de CD20. En revanche aux fortes densités surfaciques les valeurs moyennes de l'épaisseur et de l'indice de réfraction de l'épitope ont été estimés à $4,6 \pm 0,4 \text{ nm}$ et $1,42 \pm 0,02$ respectivement. Or, l'étude de l'interaction CD20/rituximab par diffraction aux rayons X a permis d'évaluer la surface de l'épitope à $19,11 \text{ nm}^2$.¹⁷¹ Si l'on émet l'hypothèse que le peptide occupe un volume cubique, l'épaisseur de la couche de peptide serait de $4,4 \text{ nm}$, ce qui est très proche des mesures ellipsométriques.

Avoir n_f et d_f dans ce même tableau nous permet de bien observer la covariance existant entre ces deux paramètres. Si l'un augmente, l'autre diminue par compensation. Ces paramètres étant difficilement dissociables, le produit des deux présente quant à lui une plus grande fiabilité. Quel que soit le pourcentage en azoture, toutes les densités surfaciques calculées peuvent donc être analysées.

Ces densités sont beaucoup plus faibles que celles obtenues en QCM-D ($15\text{-}230$ vs $100\text{-}430 \text{ ng.cm}^{-2}$), ce qui est cohérent sachant que la masse déterminée par SE est une masse sèche. Comme en QCM, nous observons des valeurs moyennes similaires pour les surfaces préparées à partir de solution contenant 12,5 et 20% de thiol-N₃.

En dernier lieu, il est intéressant de tracer les variations de fréquences en fonction de la densité surfacique en CD20 extraites des expériences de SE (Figure 42).

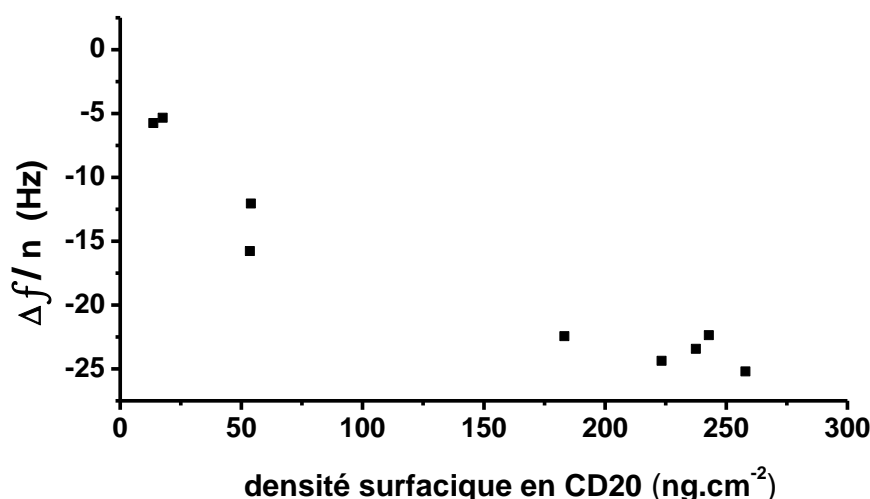


Figure 42 : Variation de la fréquence de résonance des quartz de QCM-D mesurée en fonction de la densité massique en peptide calculée par ellipsométrie spectroscopique.

En théorie, les changements de fréquence de résonance varient avec la densité massique de molécules présentes sur le quartz de manière linéaire. Lorsque l'on travaille avec des objets globulaires (comme des peptides structurés), il est possible d'attendre une légère courbure car la sensibilité de la variation de fréquence en QCM-D, c'est-à-dire l'amplitude de la pente sur ce graphe décroît avec la quantité de biomolécules adsorbées. Nous observons bien ce phénomène ici.

III.1.c. Caractérisation par SPR

Grâce au protocole de greffage *in situ*, la densité massique Γ (ng.cm⁻²) de peptide CD20 immobilisé sur les puces de SPR peut être déterminée à partir de la formule de Jung¹⁷² :

$$\Gamma = 10^6 RU \cdot \frac{d_f}{dn/dc} \cdot \frac{1}{e^{-d_{SAM}/dp} - e^{-(d_{SAM}+d_f)/dp}} \quad (18)$$

où RU est le nombre d'unités de résonance correspondant au greffage, d_f est l'épaisseur du film peptidique (= 4,6 nm d'après les mesures d'ellipsométrie), d_{SAM} est l'épaisseur de la SAM (= 2,5 nm), dn/dc est l'incrément d'indice de réfraction du peptide (= 0,18 cm³.g⁻¹ en moyenne), et dp est la profondeur de pénétration de l'onde évanescente ($dp = 175$ nm).¹⁷³

Comme le montre le tableau 4, la réponse SPR (en RU) provoquée par le greffage augmente avec le pourcentage de thiol-N₃ utilisé pour former les SAM. De cette manière, les quantités de peptide immobilisé ont été déterminées pour un ensemble de surfaces préparées avec des taux de greffages allant de 40 à 2700 RU.

%N ₃	Réponse (RU)	Γ CD20 (ng.cm ⁻²)
0,1	60 ± 11	6,0 ± 1,1
1	82 ± 22	8,2 ± 2,2
2,5	694 ± 118	69,4 ± 11,8
12,5	1352 ± 308	135,2 ± 30,8
20	1642 ± 381	164,1 ± 38,1
50	2488 ± 145	248,7 ± 14,5

Tableau 4 : Conversion de la réponse SPR induite par les CD20 immobilisés *in situ* en densité surfacique grâce à la relation de Jung. Les valeurs moyennes sont obtenues à partir d'expériences au moins faites en triplicat. Les erreurs sont calculées à partir des écarts à la moyenne.

Les données du tableau 4 montrent que la masse surfacique en CD20 augmente de façon continue avec le pourcentage en thiol-azoture. Ainsi, la gamme de densités de CD20 pouvant être caractérisées en SPR s'étend de 6 à 250 ng.cm⁻² (= 2 à 85 pmol.cm⁻²). Nos expériences ont montré qu'il est impossible de greffer plus de 250 ng.cm⁻² de CD20, même avec des surfaces à 100% de thiols-N₃.

III.1.d. Discussion

Trois techniques ont été utilisées pour déterminer la masse surfacique en CD20. La QCM-D nous a permis d'extraire les masses hydratées de l'épitope, tandis que la SPR et la SE ont fourni des masses sèches. Les masses optiques extraites des mesures réalisées par SE et SPR correspondent aux masses sèches de la couche de CD20, et donnent des résultats similaires pour les pourcentages élevés en azoture (à 50 %).

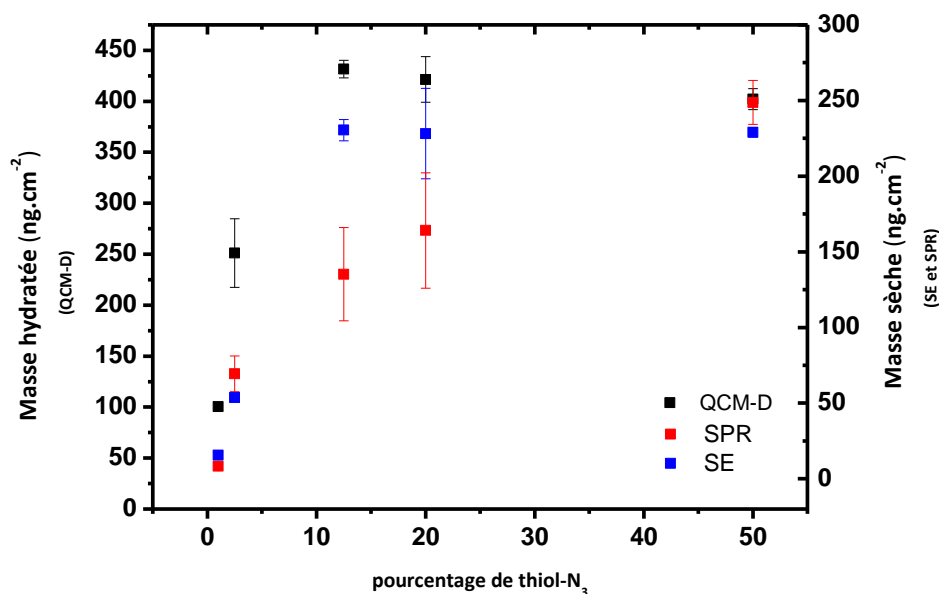


Figure 43 : Comparaison des densités surfaciques en CD20 par QCM-D, SE et SPR.

Le graphe de la figure 43 qui présente les densités surfaciques extraites des trois techniques met en avant des différences quant au pourcentage d'azoture pour lequel la saturation est atteinte. Ainsi en QCM-D et en SE, la saturation est atteinte pour 12,5% alors qu'en SPR, la densité surfacique augmente de façon continue entre 12,5 et 50% et atteint son maximum.

Pour tenter de comprendre l'évolution différentielle des masses sèches déterminées par SPR et SE, quelques hypothèses ont été émises. La microfluidique a tout d'abord été remise en cause. Entre les deux techniques, la géométrie des cellules de mesure et la différence des modes d'écoulement des fluides pourraient potentiellement conduire à des différences de rendement de réaction. En SE, il s'agit d'une cellule d'environ 2 ml de volume, qui permet la mise en contact de la surface proche de 1 cm² avec un fluide non renouvelé mais homogénéisé par la rotation d'un barreau aimanté. En SPR, les micro-canaux d'un volume de 60 nl sont parcourus par un débit de 2 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ de sorte que le renouvellement de la microcellule s'effectue toutes les 1,8s. De plus, le temps de contact des réactifs avec la SAM-N₃ est réduit dans le cas de la puce SPR. Calculer un rendement de réaction pour étayer cette hypothèse semble ici difficile car il faudrait avoir accès à la quantité précise de thiols-N₃ présents sur la surface. Mais comme nous l'avons vu précédemment, les angles de contact varient très peu entre 0 et 20%, d'où l'incertitude sur le pourcentage en N₃

surfactive calculé à partir de celui contenu dans la solution utilisée pour préparer la SAM grâce par la loi de Cassie (cf paragraphe II.1, p 63).

Une autre hypothèse s'est portée sur le mode de construction du modèle utilisé en SE. Les résultats fournis par l'ellipsométrie sont en effet très sensibles au choix des modèles utilisés, et au paramétrage de ceux-ci. Ainsi, la caractérisation de la couche de CD20 est basée sur un modèle multicouche Au-SAM/CD20/eau où la surface Au-SAM est considérée comme un substrat. Or, ce modèle ne prend pas en compte la possible modification des propriétés optiques de la SAM lors du greffage covalent du CD20. Il aurait été intéressant de considérer un autre modèle multicouche Au/[SAM+CD20]/Eau en prenant l'or comme substrat. L'inconvénient d'un tel choix concerne le manque de stabilité de l'or dans l'eau et le risque d'évolution de ses propriétés optiques au cours du temps.

Les variations de fréquence (en QCM) et les amplitudes des signaux (en SPR) survenant lors du greffage du CD20 et sur lesquels nous nous basons pour le calcul des densités surfaciques sont des phénomènes physiques observables de manière directe. En revanche, les calculs réalisés en ellipsométrie sont eux basés sur n et d , qui sont déjà deux paramètres issus d'un traitement de données expérimentales (Ψ et Δ). Sans remettre en cause les expériences d'ellipsométrie, nos raisonnements seront, pour la suite de notre étude, basés sur les densités surfaciques en CD20 extraits des mesures de SPR qui est de plus, la technique utilisée pour l'analyse cinétique avec le rituximab. L'ellipsométrie nous a néanmoins permis d'extraire les valeurs d'épaisseurs de la SAM et du peptide, qui sont essentielles à l'utilisation de la formule de Jung en SPR.

Par ailleurs, l'épaisseur peut également être extraite des données de QCM-D. Il existe en effet une équation reliant l'épaisseur de la couche biomoléculaire à ses masses hydratée et sèche :¹¹¹

$$d_{\text{QCM}} = \frac{1}{\rho_{\text{solvant}}} (m_{\text{film}} - m_{\text{adsorbat}} (1 - \frac{\rho_{\text{solvant}}}{\rho_{\text{adsorbat}}})) \quad (19)$$

avec ρ_{solvant} la masse volumique de l'eau ($= 1 \text{ kg.L}^{-1}$), ρ_{adsorbat} la masse volumique du peptide ($= 1,35 \text{ kg.L}^{-1}$ de protéine)¹⁷⁴, m_{film} = la densité surfacique du CD20 hydraté trouvée en QCM-D, et m_{adsorbat} = la densité surfacique du CD20 sec trouvée en SE.

%N ₃	d _f SE (nm)	d _{QCM} (nm)
12,5	4,9 ± 0,0	3,7 ± 0,1
20	4,4 ± 0,6	3,6 ± 0,1

Tableau 5 : Comparaison des épaisseurs de la couche de CD20 d obtenues en SE (d_f) et en QCM-D (d_{QCM}) en utilisant l'équation (19).

Encore une fois ici, nous nous focalisons uniquement sur les surfaces couvertes d'un biofilm homogène. A 12,5 et 20% en azoture, l'équation (19) prévoit des épaisseurs autour de 3,7 nm (tableau 5), ce qui rend le peptide plus court de 1 nm comparé aux résultats de SE seule (= 4,6 nm). Même si cette différence représente environ 20% de la taille du peptide calculée en SE, nous avons pu remarquer qu'elle impacte peu les résultats de SPR pour lesquels l'épaisseur est nécessaire. Par exemple, sur une surface fonctionnalisée à 12,5% d'azoture (dans la solution utilisée pour préparer la SAM), le CD20, qui présente une épaisseur de 4,6 nm, est caractérisé par une densité surfacique de 135,2 ng.cm⁻², alors qu'une épaisseur de 3,7 nm conduit à 134,8 ng.cm⁻² après l'application de la formule de Jung, soit une différence de 0.3%.

III.2. Détermination du taux d'hydratation

La QCM-D fournissant une masse hydratée (m_{QCM}) et la SPR une masse sèche associée (m_{SPR}), il est possible de calculer et de suivre le taux d'hydratation (%H) de biomolécules en fonction du taux de recouvrement de la surface, selon l'équation (20) :

$$\%H = 100 - \left(\frac{m_{\text{SPR}}}{m_{\text{QCM}}} \cdot 100 \right) \quad (20)$$

Si l'on considère que le greffage des CD20 en QCM-D et SPR conduit à la même quantité de matière adsorbée, l'évolution de l'hydratation de l'épitope en fonction de sa concentration surfacique suivrait les valeurs du tableau 6.

%N ₃	m _{QCM} (ng.cm ⁻²)	m _{SPR} (ng.cm ⁻²)	%H _{SPR/QCM}
1	100,3 ± 3,6	8,2 ± 2,2	92 ± 2
2,5	251,2 ± 33,7	69,4 ± 11,8	72 ± 1
12,5	431,7 ± 8,6	135,2 ± 30,8	69 ± 7
20	421,4 ± 22,4	164,1 ± 38,1	61 ± 7
50	402,2 ± 10,3	248,7 ± 14,5	38 ± 2

Tableau 6 : Détermination du taux d'hydratation (%H) du CD20 greffé sur la surface à différentes densités surfaciques. m_{QCM} = la densité surfacique hydratée relevée par QCM-D, et m_{SPR} = la densité surfacique sèche relevée par SPR.

La quantité d'eau couplée à la couche de peptide varie considérablement et de manière décroissante avec la densité surfacique en CD20. Pour le rapport SPR/QCM, le taux d'hydratation est évalué à 92% lorsque peu d'épitope est greffé sur la surface (8 ng.cm⁻² soit 2,8 pmol.cm⁻²), et chute à 38% lorsque le taux d'immobilisation atteint les 250 ng.cm⁻² (soit 84,9 pmol.cm⁻²). Au fur et à mesure du greffage, la biocouche devient de plus en plus dense et compacte, et moins hydratée, compte tenu du caractère peu polaire des peptides. La relation entre la densité surfacique et le taux d'hydratation a été décrite et modélisée pour des protéines globulaires.¹⁷⁵ Les auteurs montrent également une décroissance linéaire du taux d'hydratation avec la densité surfacique en biomolécules. Dans le modèle, la couche d'hydratation des biomolécules adsorbées sur des quartz de QCM-D a été représentée par des pyramides tronquées. Il est montré qu'à faible densité, ces biomolécules hydratées se comportent comme des particules isolées alors qu'à fortes densités surfaciques, les pyramides se chevauchent, faisant diminuer le taux d'hydratation moyen par particule (Figure 44).

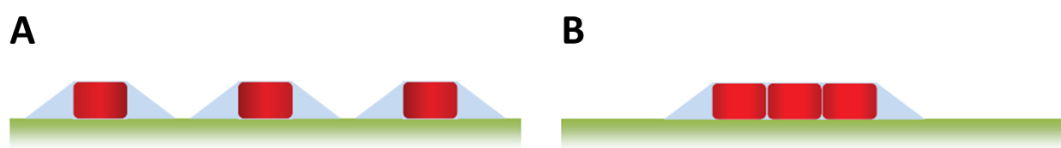


Figure 44 : Schématisation d'une couche de biomolécules hydratées.¹¹¹ A : A faible densité surfacique, l'eau représentée en bleu recouvre de part et d'autre chaque biomolécule adsorbée. B : A forte densité surfacique, le « manteau » aqueux situé entre les biomolécules est expulsé, diminuant ainsi le taux d'hydratation.

Certains auteurs pour qui l'hydratation de leur biofilm est un paramètre important tentent de calculer la part intrinsèque d'eau dans la couche en pratiquant des échanges de solvants pendant leurs mesures.¹⁷⁶ Pour cela, les variations de fréquence de résonance de quartz nus et de quartz avec un biofilm sont comparées et suivies dans l'eau. L'eau est

ensuite échangée avec de l'oxyde de deutérium (D₂O). Compte tenu de la différence de densité entre l'eau et l'eau lourde, des variations de fréquences de résonance sont enregistrées. La comparaison des variations mesurées sur le quartz nu et celui avec le biofilm permet de remonter au taux d'hydratation des biomolécules :¹⁷⁶

$$\Delta f_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{(\Delta f_{\text{film}} - \Delta f_{\text{Au nu}})}{\frac{\rho_{\text{D}_2\text{O}}}{\rho_{\text{H}_2\text{O}}} - 1} \quad (21)$$

avec $\rho_{\text{H}_2\text{O}} = 0,9982 \text{ g/cm}^3$, $\rho_{\text{D}_2\text{O}} = 1,1050 \text{ g/cm}^3$ à 20°C. Δf_{film} est la variation de fréquence associée à l'échange de solvant H₂O/D₂O sur le film alors que $\Delta f_{\text{Au nu}}$ est celle sur l'or nu. La masse d'eau couplée est alors calculée par l'application de l'équation de Sauerbrey.

Nous avons tenté d'évaluer les pourcentages d'hydratation de la couche de CD20 par cette méthode à partir de la variation de fréquence de résonance associée à l'échange de solvant H₂O/D₂O sur Au/SAM-CD20 en comparaison de celle mesurée sur Au ou Au-SAM-N₃, mais sans succès. Dans notre cas, les différences n'étaient en effet pas assez significatives pour en extraire des données fiables (Figure 45).

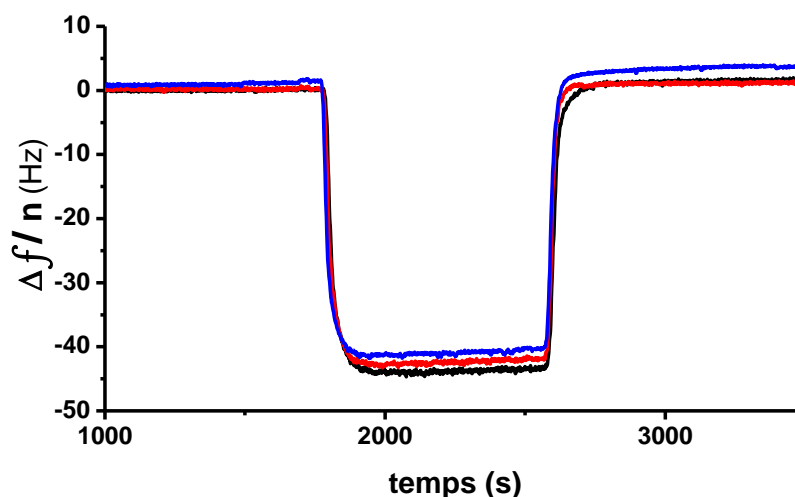


Figure 45 : Observation d'un échange de solvant par QCM-D. L'eau est échangée par du D₂O, induisant une diminution de fréquence de résonance de quartz fonctionnalisés avec une SAM-N₃ 12,5% avec CD20 (noir), une SAM-N₃ 12,5% sans CD20 (rouge), et d'un quartz d'or nu (bleu). La même variation de fréquence est observée dans ces trois cas, ce qui ne permet pas de déterminer le taux d'hydratation du peptide.

III.3. Détermination de l'espace inter-antigène

En supposant une distribution homogène de thiol-N₃ dans la SAM, et par conséquent une répartition régulière des épitopes, il est possible, à partir des densités surfaciques, de calculer les distances séparant deux CD20 sur la surface. Du nombre de molécules présentes par unité de surface, nous obtenons la surface couverte par un antigène (S). Si l'on émet l'hypothèse que le CD20 présente une surface projetée circulaire égale à S, la distance inter-ligand d_{il} est estimée par l'équation (22) :

$$d_{il} = \sqrt{\frac{4S}{\pi}} \quad (22)$$

%N ₃	Γ_{CD20} (SPR) (pmol.cm ⁻²)	d_{il} (nm)
0.1	2,1 ± 0,4	10,3 ± 0,9
1	2,8 ± 0,8	8,4 ± 1,4
2,5	23,7 ± 4,0	3,0 ± 0,2
12,5	46,1 ± 10,5	2,2 ± 0,3
20	56,0 ± 13,0	2,1 ± 0,3
50	84,9 ± 4,9	1,6 ± 0,0

Tableau 7 : Calcul des distances inter-ligand d_{il} séparant deux épitopes sur la surface en fonction de leur densité surfacique Γ_{CD20} déterminée en SPR. Pour la détermination de ces distances, la surface projetée du CD20 est considérée comme circulaire.

D'après le tableau 7, et si nous nous basons sur les densités surfaciques obtenues par SPR, les distances inter-épitope varient de 10,3 à 1,6 nm lorsque l'on passe de 2,1 à 84,9 pmol.cm⁻².

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons pu suivre pas à pas la méthodologie mise en œuvre pour la conception d'une surface antigénique adressée au criblage peptidique. Notre stratégie d'immobilisation est basée sur la cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre. Cette réaction de chimie « click » présente l'avantage d'être rapide, d'orienter les antigènes de manière dirigée, de les fixer de façon covalente sur une SAM préformée, et de conduire à une fonctionnalisation extrêmement stable en 2D. Ce dernier point est très

important lorsque les surfaces sont destinées au criblage. Grâce au protocole de chimie « click » *in situ* développé en SPR, il a été possible de fonctionnaliser une piste de référence avec un peptide « scramble » du CD20, de quantifier la densité surfacique en CD20 *via* la formule de Jung, et d'en extraire les distances inter-antigène associées. Nous pouvons maintenant évaluer les propriétés de reconnaissance et de spécificité de cette surface pour l'anticorps rituximab, ce qui représente l'un des objectifs du chapitre III.

Chapitre III

Caractérisation de l'interaction CD20/rituximab

La surface antigénique développée précédemment a été caractérisée par différentes méthodes permettant d'accéder à la densité de surface, au taux d'hydratation de la couche du biofilm de CD20, ou encore aux distances inter-épitope. Avant d'utiliser la surface pour le criblage de peptides, il est indispensable de vérifier ses propriétés de reconnaissance envers l'anticorps, ainsi que sa spécificité par SPR. La densité surfacique en épitope pouvant être contrôlée, il est également nécessaire d'étudier son impact sur l'interaction CD20 / rituximab, afin d'optimiser cette concentration surfacique pour la suite du projet.

I. Choix du modèle SPR

Parce qu'ils conditionnent tous les résultats, les modèles SPR servant à déterminer les paramètres cinétiques et thermodynamiques d'interactions biomoléculaires doivent être soigneusement choisis.

I.1. Interaction mono ou bivalente ?

Compte tenu de la structure d'un anticorps (2 sites d'interaction Fab), une interaction bivalente est prévisible entre le rituximab et l'épitope CD20. Plusieurs auteurs ont développé leurs propres modèles afin de caractériser au mieux les interactions multivalentes, voire bivalentes.^{177,178,179} Ces modèles prennent en considération les effets liés à l'avidité, la valence, ou la gêne stérique. Pour l'étude d'interactions multivalentes (par exemple avec un anticorps comme analyte), un modèle SPR, inclus dans les technologies Biacore, appelé « Bivalent Analyte » a tout spécialement été élaboré. Il permet de décrire l'association d'un analyte A ayant deux sites d'interaction identiques avec un ou deux ligands surfaciques L (complexes LA ou LLA). Des jeux de constantes cinétiques k_{on} et k_{off} sont attribués à la première, ainsi qu'à la deuxième interaction.



Dans la littérature, ce modèle est donc souvent appliqué pour l'étude de composés bivalents.^{180,181} Bien qu'il soit recommandé de l'utiliser lorsque la biomolécule étudiée est un anticorps, les valeurs qu'il fournit sont assez complexes à interpréter étant donné la

difficulté à discriminer les deux interactions qui se produisent parfois simultanément. Une fois que l'analyte est attaché à un premier ligand, l'anticorps, déjà entièrement dans le champ évanescent, ne permet plus à la deuxième interaction de contribuer à la réponse SPR. Le fait que cette deuxième interaction soit donnée en RU.s⁻¹ (au lieu d'être en M⁻¹.s⁻¹), et qu'aucun K_D global ne puisse être extrait rend parfois les résultats difficilement exploitables. De ce fait, les interactions anticorps/antigène peuvent être en parallèle analysées en utilisant un modèle monovalent 1:1 ou une isotherme de Langmuir.¹⁸¹⁻¹⁸⁵ Cette stratégie est particulièrement bien adaptée si l'anticorps est greffé sur la surface, et que l'analyte est monovalent. Toutefois, l'immobilisation de l'anticorps sur la surface est délicate car elle peut endommager le site de liaison et de ce fait diminuer les propriétés de reconnaissance du mAb. Pour s'affranchir de la bivalence, Biacore préconise également de travailler avec des concentrations surfaciques en ligand très faibles. Ainsi, les probabilités pour que l'analyte bivalent puisse se lier simultanément à deux ligands sont minimisées.

I.2. Modèle hétérogène

Même si un effort important est fourni pour immobiliser le ligand sur la surface dans des conditions permettant une présentation homogène et optimale des molécules greffées, nous pouvons toutefois considérer que leur degré de liberté autour de leur point d'accroche conduit à une certaine hétérogénéité.^{186,187} Le modèle « heterogeneous ligand » (HL) tient compte de la présence de deux espèces de ligands se liant indépendamment l'une de l'autre à l'analyte. Les espèces peuvent être des molécules différentes ou des sites de liaison distincts situés sur le même ligand.



Ce modèle peut ici être appliqué si l'on envisage un ligand unique avec deux présentations différentes correspondant à des orientations différentes. En considérant la présence de deux interactions indépendantes, ce type de modèle nous permet d'avoir une plus grande flexibilité dans le traitement de données, et donc d'obtenir des ajustements paramétriques de meilleure qualité. La réponse SPR observée est la somme des contributions des deux interactions. Le logiciel fournit alors deux constantes d'association,

k_{on1} et k_{on2} , deux constantes de dissociation, k_{off1} and k_{off2} , ainsi que deux réponses maximales, R_{max1} and R_{max2} . Le K_D est extrait des constantes cinétiques tel que $K_{D1} = k_{off1}/k_{on1}$ et $K_{D2} = k_{off2}/k_{on2}$. Le modèle HL peut être utilisé pour caractériser une interaction 1:1 si la contribution de l'une des interactions est très majoritaire. Nous considérons alors que les signaux lui étant associés sont relatifs à l'interaction spécifique, et que le faible signal permettant d'atteindre la réponse globale correspond à une interaction non spécifique. Il est généralement facile de sélectionner le signal associé à l'interaction spécifique par le biais des valeurs de R_{max} , et de la déconvolution du signal (Figure 46). Dans notre cas, nous avons identifié l'interaction spécifique comme étant celle dont le signal déconvolué représente 80-90% de l'amplitude du signal total, alors que l'interaction non-spécifique correspond à la petite fraction restante : 10-20% (Figure 46 - encart).

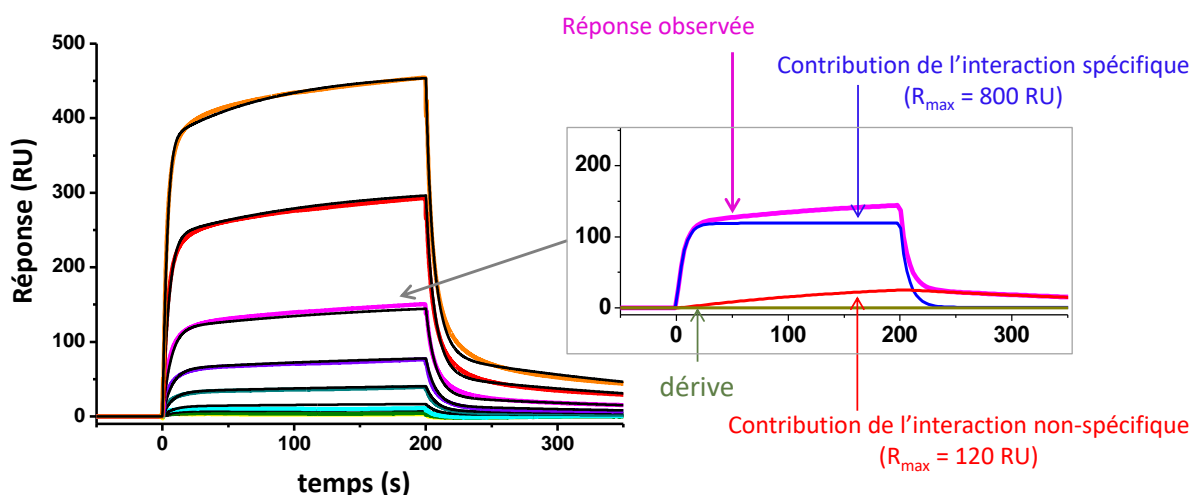


Figure 46 : Profil de sensorgramme issu de l'interaction rituximab/CD20 pour un taux de greffage de 85 pmol.cm^{-2} de CD20. La gamme de concentration du rituximab varie de 5 à 1000 nM. Le sensorgramme a été traité avec le modèle "heterogeneous ligand" dont les courbes générées ont été ajoutées au graphe (noir). Encart : Déconvolution du signal obtenu pour une injection de rituximab à 500 nM. La courbe rose est composée de la contribution de deux interactions : l'une spécifique (bleue) et l'autre non-spécifique (rouge). La correction d'indice étant fixée à zéro, la dérivée est nulle (courbe verte).

Seules les constantes cinétiques et thermodynamiques associées à l'interaction spécifique sont conservées. Il faut toutefois souligner qu'elles peuvent être qualifiées de constantes « apparentes » du fait de la bivalence potentielle de l'anticorps.

Puisque l'objectif suivant est de réaliser une étude comparative des affinités qu'entretient le CD20 avec le rituximab (bivalent) et avec des fragments peptidiques issus de celui-ci (monovalents), nous voulions utiliser un unique modèle capable d'être appliqué à

toute situation. Même pour ne travailler qu'avec le rituximab, il aurait été délicat d'utiliser un modèle destiné à la bivalence alors que différents taux de greffage sont testés, et que certains ne permettent pas d'induire d'interactions multivalentes. C'est pourquoi le modèle « heterogeneous ligand » (HL) est celui que nous avons choisi pour traiter les données de nos analyses.

II. Propriétés de reconnaissance et spécificité de la surface antigénique

Les propriétés de reconnaissance et de spécificité de la surface envers l'anticorps ont été évaluées. Si cette surface ne s'avérait pas assez spécifique pour le rituximab, il serait alors impossible de sélectionner les peptides du paratope impliqués dans la reconnaissance du CD20, tant les « faux positifs » seraient nombreux. Mais tout d'abord, l'impact de la voie de greffage sur les surfaces SPR (*in* ou *ex situ*) et celui de la nature du tampon ont dans un premier temps été étudiés afin de déterminer les conditions optimales d'étude.

II.1. Impact de la voie *in* ou *ex situ*

Dans la section précédente, nous avons tenté de fonctionnaliser les puces dans le système de microfluidique de l'appareil Biacore T200 afin de contrôler la quantité d'antigène greffé, et surtout de pouvoir préparer une piste de référence. Dans ce contexte, le CD20 avait été immobilisé *in situ*, en injectant la solution sur la surface *via* la microfluidique. Pour savoir si le mode d'immobilisation ne modifie pas les propriétés de reconnaissance des surfaces envers le rituximab, une puce a en parallèle été fonctionnalisée *ex situ*, en incubant la surface dans la solution de réaction de chimie « click » pendant 1h30. Des études d'interaction ont ensuite été menées entre l'anticorps et les puces dont les SAM ont été préparées à partir de solutions contenant 20% de thiol-azoture. Les K_D apparents représentatifs du greffage *in* ou *ex situ* du CD20 sont de 168 ± 32 et 176 ± 17 nM respectivement. Ces résultats montrent que les deux surfaces antigéniques possèdent des propriétés de reconnaissance pour l'anticorps, et que le type d'immobilisation n'aurait pas d'impact sur les résultats de cinétiques. Nous pouvons donc admettre qu'une injection de 8 minutes est aussi efficace qu'une incubation de 1h30 *ex situ*.

II.2. Impact de la nature du tampon

Les conditions d'analyse des interactions sont importantes pour caractériser les propriétés de reconnaissance, si bien que le choix du tampon est toujours une étape cruciale au début d'un projet. Le rituximab (MabThera®) est commercialisé dans une solution de stockage contenant 154 mM de NaCl, 25 mM de citrate de sodium, et 0,066% de P80. Cette solution saline a donc été testée comme tampon de course. Puisque sa composition n'est pas des plus courantes en SPR-Biacore, les tampons PBS et Hepes ont également été testés. Pour ne pas trop s'éloigner de la composition de la solution d'origine, la présence de citrate et de P80 a été conservée, mais à moindre concentration. Les cinétiques ont été réalisées sur une même surface, après avoir vérifié qu'aucun effet tampon n'apparaissait dans la gamme de concentration étudiée. L'effet tampon est lié à une différence de composition entre le tampon dans lequel est dilué l'analyte et le tampon de course. Les solutions d'anticorps sont en effet préparées en diluant la solution de stockage du rituximab dans le tampon de course. Par cette différence de composition, les deux solutions salines possèdent des propriétés optiques distinctes qui peuvent engendrer une variation du signal de SPR. En figure 47 sont reportés les sensorgrammes obtenus pour les trois conditions.

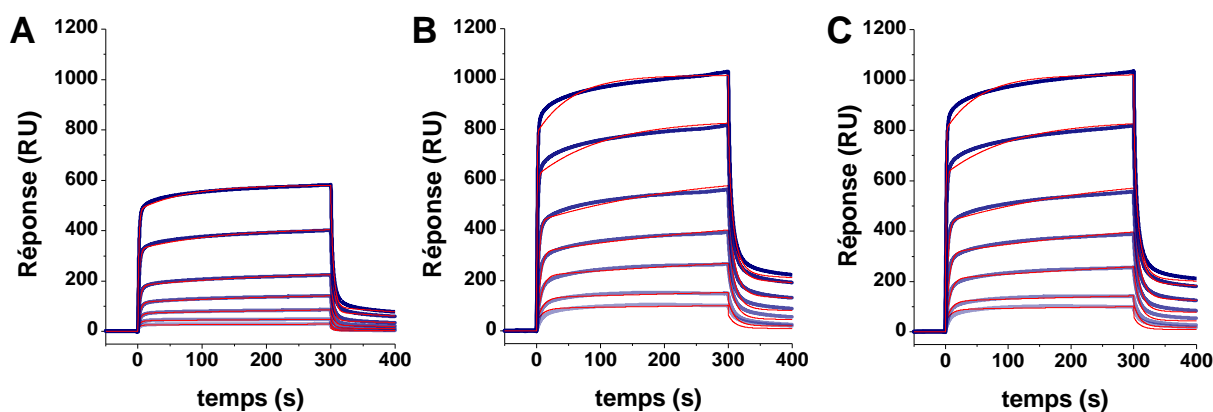


Figure 47 : Impact de la nature du tampon sur les cinétiques d'interactions CD20/rituximab par SPR. A : tampon « MabThera® » = NaCl 154 mM, citrate 25 mM, P80 0,066%. B : tampon PBS, citrate 3mM, P80 0,005%. C : tampon Hepes, citrate 3mM, P80 0,005%. Le rituximab a été injecté sur une surface fonctionnalisée à partir d'une solution de thiol- N_3 à 20%, avec la gamme de concentration : 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 nM. Les courbes rouges représentent les régressions non-linéaires du modèle « heterogeneous ligand ».

Comme le montre les sensorgrammes A, B et C de la figure 47, la nature du tampon semble affecter les interactions CD20/rituximab. En effet, les K_D apparents déterminés une nouvelle fois par le modèle heterogeneous ligand pour le tampon MabThera (A), PBS (B), et

Hepes (C) ont pour valeurs 575 nM, 125 nM, et 149 nM respectivement. Alors que les tampons PBS et Hepes engendrent des résultats assez similaires, l'affinité se retrouve diminuée d'un facteur 4 environ lorsque l'interaction s'effectue dans la solution de conservation du rituximab. Suite à ces expériences, nous avons choisi d'utiliser le tampon PBS comme tampon de course pour le reste de l'étude.

II.3. Spécificité de la surface antigénique

Bien qu'il se soit avéré qu'une reconnaissance s'effectuait entre la surface antigénique et l'anticorps, il était important de s'assurer de la spécificité de cette interaction. Celle du rituximab pour le CD20 a dans un premier temps été examinée par QCM-D en comparant les signaux engendrés par l'anticorps sur un quartz présentant l'épitope CD20, et un présentant le « CD20 scramble » (Figure 48). Ce que l'on nomme « CD20 scramble » est une séquence peptidique comprenant les mêmes acides aminés que le CD20 mais placés dans un ordre aléatoire. Tout comme l'épitope original, le « CD20 scramble » possède un pont disulfure et est utilisé ici comme peptide de référence.

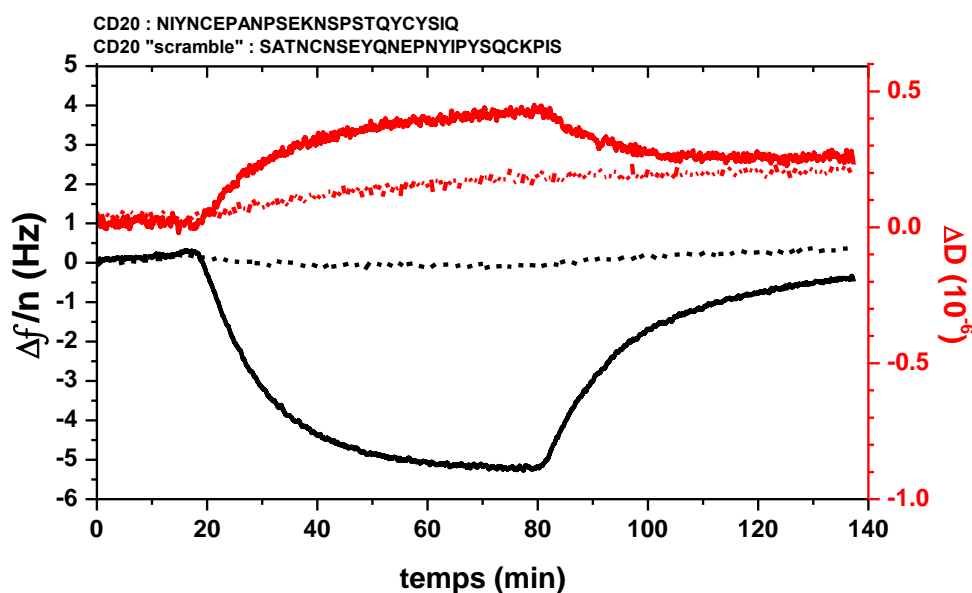


Figure 48 : Analyse de la spécificité du rituximab pour le CD20 par QCM-D. Le rituximab (5nM) en solution dans le tampon PBS induit une variation de fréquence et de dissipation pour le quartz présentant l'épitope CD20 (lignes continues), mais pas pour le CD20 scramble (lignes en pointillés). L'expérience a été réalisée sur une surface préparée à partir d'une solution contenant 12,5% d'azoture. La variation de fréquence est illustrée en noir, la dissipation en rouge.

Comme nous pouvons le constater sur la figure 48, l'injection du rituximab induit une augmentation de masse du quartz « CD20 » qui présente également une viscoélasticité plus

importante (variation notable de dissipation). Aucune réponse n'est par ailleurs relevée pour le quartz « CD20 scramble » (lignes en pointillés). Ces résultats indiquent d'une part que l'interaction CD20/rituximab est observable en QCM-D, et d'autre part que celle-ci est spécifique puisque l'anticorps ne possède pas d'affinité pour les surfaces « CD20 scramble ».

La même expérience a été reproduite en SPR afin de confirmer cette spécificité. La réponse du rituximab injecté sur une piste de mesure fonctionnalisée par le CD20 a été comparée à celle de la piste de référence contenant le « CD20 scramble ou encore à celle d'une surface composée d'une SAM 100% hydroxyle sans peptide. Les réponses induites par une injection d'anticorps sur ces 3 substrats sont présentées en figure 49.

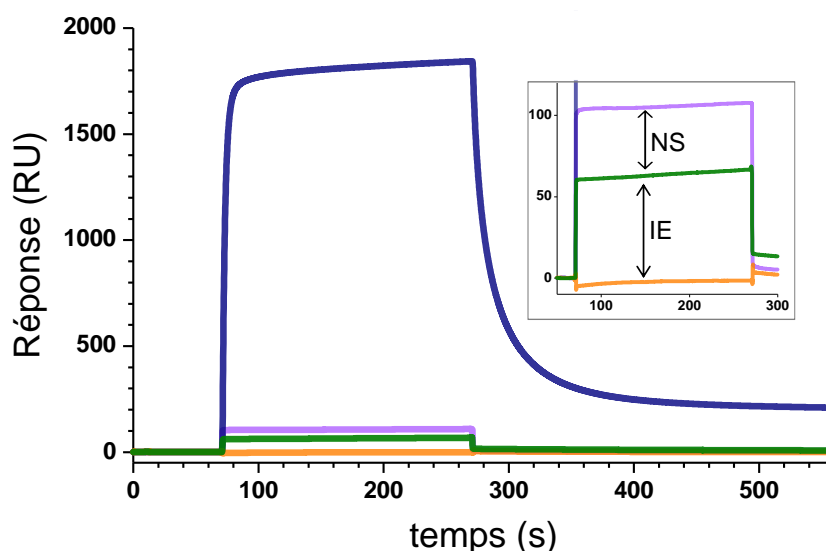


Figure 49 : Sensorgrammes SPR regroupant des expériences contrôle pour l'étude de la spécificité de l'interaction CD20/rituximab. Les signaux bruts résultent d'une injection de rituximab (1 μ M) sur une piste CD20 (bleue), CD20 scramble (gris), ou une SAM 100% thiol-OH (vert). La courbe orange représente la soustraction des signaux (CD20 moins CD20 scramble) résultant de l'injection du trastuzumab à 1 μ M sur ces deux pistes. Les surfaces fonctionnalisées avec un peptide ont été formées via des SAM à 20% en azoture.

Alors qu'une injection de rituximab à 1 μ M engendre un très grand signal sur la piste CD20 (près de 1800 RU), elle permet d'atteindre une amplitude d'environ 100 RU seulement sur la piste « CD20 scramble », ce qui montre encore une fois la spécificité bien marquée de l'anticorps pour son antigène. Afin d'évaluer la provenance de cette réponse sur la piste « CD20 scramble » (du non-spécifique ou un effet d'indice), nous avons observé les signaux obtenus pour la SAM-hydroxyle. Puisque celle-ci est inerte, nous supposons que le signal observé pour la SAM (environ 60 RU) correspond à l'incrément d'indice de réfraction de la solution due à la présence de l'anticorps. En calculant la différence de signaux obtenus sur la

piste « CD20 scramble » et la SAM, nous pouvons donc conclure que les 100 RU mesurés lors de l'injection du rituximab sur le CD20 scramble sont causés pour les deux tiers de l'effet d'indice (EI), et pour un tiers d'une interaction non spécifique (NS) – (Figure 49 - encart). La part de non spécifique étant très faible, le « CD20 scramble » nous a paru être un excellent peptide de référence pour la suite de l'étude.

Enfin, tout comme la majorité des autres anticorps utilisés en oncologie, le rituximab est une IgG. Les immunoglobulines appartenant à cette classe adoptent des structures similaires. Pour vérifier si les surfaces antigéniques sont capables de discriminer le rituximab des autres IgG thérapeutiques, nous avons injecté le Trastuzumab sur les pistes CD20 et CD20 scramble. Après avoir soustrait le signal obtenu sur la piste de référence du signal obtenu sur le CD20, plus aucune réponse n'était détectable (Figure 49 – courbe orange). La surface CD20 est donc aussi très spécifique pour son analyte.

L'optimisation du tampon, du mode de greffage, et la vérification de la spécificité des interactions ayant été effectuées, des études d'interactions antigène/anticorps avec ces surfaces ont pu débuter. L'objectif de cette étude est de mieux comprendre les paramètres régissant les interactions entre un anticorps et son antigène cible, ainsi que de bien caractériser les affinités avant de pouvoir passer au criblage de fragments peptidiques.

III. Impact de la densité surfacique en antigène sur l'interaction Ag/Ac

Des analyses cinétiques par SPR ont été réalisées avec le rituximab sur les surfaces antigéniques. Sachant qu'elle peut avoir une grande importance sur les systèmes multivalents, l'impact de la densité surfacique a tout particulièrement été analysé. L'objectif principal étant de sélectionner la densité surfacique en CD20 conduisant à une affinité optimale, nous avons étudié l'influence de celle-ci sur les propriétés de reconnaissance de l'anticorps.

III.1. Modulation du K_D en fonction de la densité surfacique en antigène

III.1.a. Etude par SPR

Nous avons montré dans le chapitre II que la densité surfacique en CD20 peut être contrôlée par la composition de la solution de thiols utilisée pour préparer la SAM- N_3 . Des analyses cinétiques ont été réalisées en SPR sur des surfaces présentant des densités surfaciques en CD20 variables, afin de déterminer l'évolution des constantes cinétiques et thermodynamiques du système rituximab/CD20. La figure 50 regroupe des sensorgrammes obtenus pour trois densités surfaciques différentes (2,8, 46 et 85 pmol.cm⁻²).

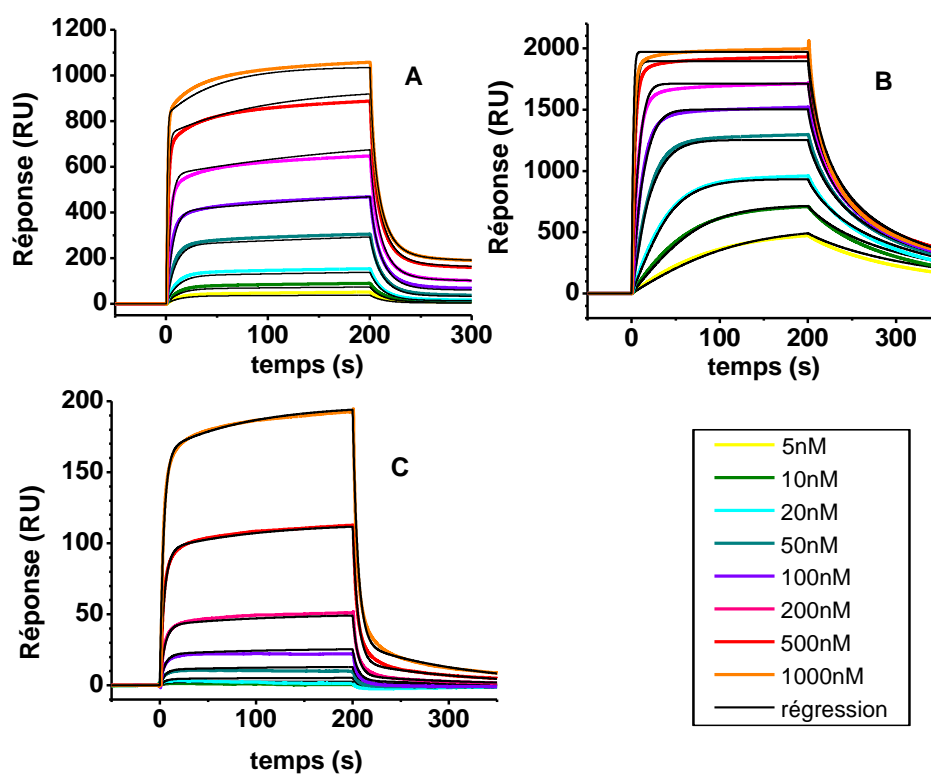


Figure 50 : Analyses cinétiques de l'interaction CD20 / rituximab par SPR. Les sensorgrammes expérimentaux (courbes de couleur) sont associés à différentes densités surfaciques : 2,8 pmol.cm⁻² (correspondant à 1% en thiol- N_3 dans la solution de thiols utilisée pour préparer la SAM- N_3 - A), 46 pmol.cm⁻² (12,5% - B), et 85 pmol.cm⁻² (50% - C). La gamme de concentration en rituximab varie de 5 à 1000 nM. Les courbes noires représentent les sensorgrammes théoriques issus du modèle HL (correction d'indice = 0). Les courbes sont le résultat de la soustraction des signaux CD20 – « CD20 scramble ».

Les sensorgrammes de la figure 50 montrent que la densité surfacique en CD20 influence l'amplitude des signaux pour des injections de rituximab de même concentration. Celle-ci semble en effet suivre l'ordre 85 < 3 < 46 pmol.cm⁻² illustrant le fait que la surface présentant 46 pmol.cm⁻² de CD20 capture une plus grande quantité d'anticorps. D'autre

part, les sensorgrammes théoriques générés par le modèle HL se superposent bien aux signaux expérimentaux sans qu'aucune correction d'indice de réfraction ne soit nécessaire. Comme nous le verrons dans le tableau 8, les valeurs de K_D apparents (K_{Dapp}) déterminées par le rapport des constantes cinétiques k_{off}/k_{on} (modèle *heterogeneous ligand*), ou *via* une isotherme de Langmuir (modèle *steady state*) sont très similaires. L'évolution de ces K_{Dapp} en fonction de la densité surfacique est présentée sur la figure 51 et résumée dans le tableau 8. Elle met clairement en évidence l'impact du taux de greffage sur les affinités anticorps/antigène.

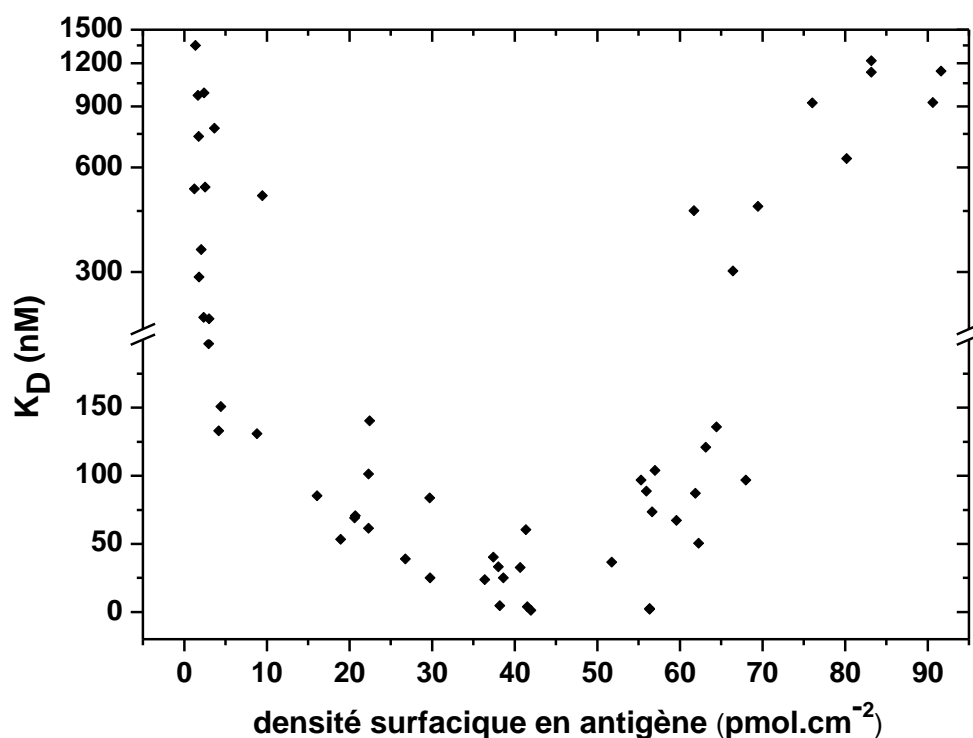


Figure 51 : Dépendance de la densité surfacique en épitope sur l'affinité rituximab/CD20 en SPR. Les K_{Dapp} ont été déterminés *via* le modèle HL par le rapport k_{off}/k_{on} , et les densités surfaciques par la formule de Jung.

% N3	Γ CD20 ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Distance inter-épitope (nm)	K_{Dapp} (HL) (nM)	K_{Dapp} (Steady-state) (nM)
0,1	$2,1 \pm 0,4$	$10,3 \pm 0,9$	977 ± 8	694 ± 37
1	$2,8 \pm 0,8$	$8,4 \pm 1,4$	248 ± 94	273 ± 72
2,5	$23,7 \pm 4,0$	$3,0 \pm 0,2$	75 ± 6	98 ± 9
12,5	$46,1 \pm 10,5$	$2,2 \pm 0,3$	35 ± 12	25 ± 12
20	$56,0 \pm 13,0$	$2,1 \pm 0,3$	152 ± 16	181 ± 16
50	$84,9 \pm 4,9$	$1,6 \pm 0,0$	1007 ± 16	1156 ± 114

Tableau 8 : Dépendance de la densité surfacique en épitope sur l'affinité rituximab/CD20 en SPR. Les densités ont été déterminées par la formule de Jung ; les distances inter-ligands ont été calculées à partir des densités surfaciques en CD20 en supposant une empreinte circulaire de l'aire projetée du peptide. La constante de dissociation apparente à l'équilibre K_{Dapp} (HL) a été déterminée via le modèle HL. Le K_{Dapp} (steady-state) a été déterminé via une isotherme de Langmuir.

A faible densité surfacique en antigène ($2,1 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$), et par conséquent à grande distance inter-CD20 (10,3 nm), la valeur du K_{Dapp} est très élevée (977 ± 8 nM), ce qui n'est pas très représentatif des affinités antigène/anticorps en biologie, situées dans des ordres de grandeur allant du pM au nM.¹⁸⁸ Lorsque l'on augmente la densité en CD20, la constante de dissociation à l'équilibre décroît progressivement, jusqu'à atteindre un minimum de 35 nM pour une surface supportant environ $46 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ d'épitopes CD20 distants les uns des autres de 2,2 nm en moyenne. A ce taux de greffage qui correspond à un optimum, les valeurs de K_{Dapp} obtenues sont très proches des valeurs reportées dans la littérature lors d'analyses in vitro réalisées sur des cellules avec des cytomètres de flux ou des compteurs gamma (5-19 nM).^{62,189} Au-delà de $46 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ en CD20, l'augmentation de la densité surfacique amoindrit l'affinité pour rejoindre des K_{Dapp} de l'ordre du micromolaire. Cette évolution des propriétés de reconnaissance peut se corrélérer à l'influence de la distance inter-antigène sur l'interaction. Si cette distance est trop faible, la couche de CD20 devient extrêmement compacte rendant l'épitope plus difficilement accessible par l'anticorps.

Les réponses maximales théoriques (R_{max}) traduisant la quantité maximale de rituximab susceptible d'interagir avec la surface antigénique ont été extraites des données de régression pour chaque expérience, et sont reportées en fonction de la densité surfacique en CD20 (Figure 52). On constate que la courbe est l'image en miroir de celle obtenue pour les K_{Dapp} (Figure 51).

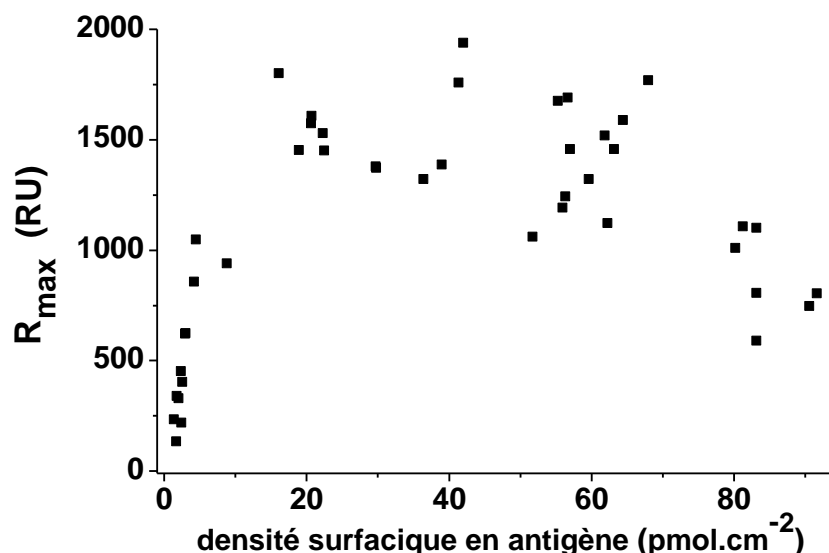


Figure 52 : Dépendance de la densité surfacique en épitope sur les réponses maximales théoriques (R_{max}) liées à l'interaction spécifique, et déterminées via le modèle HL. Les densités ont été déterminées par la formule de Jung.

A faible taux de greffage en CD20, un faible R_{max} est enregistré, et correspond donc à une faible quantité de rituximab se fixant sur la surface. Les valeurs de R_{max} augmentent ensuite avec l'accroissement de la densité surfacique en antigène, avant de diminuer à nouveau au-delà de 50-60 pmol.cm^{-2} . Comme présenté dans le paragraphe ci-dessus, cette diminution pourrait être expliquée par une accessibilité des ligands CD20 rendue difficile par la forte densité de la couche biomoléculaire. Un nombre d'épitopes qui augmente ne signifie donc pas forcément une interaction plus forte entre l'anticorps et l'antigène. Enfin, la densité pour laquelle le K_D est minimal (autour de 46 pmol.cm^{-2}) semble être aussi celle pour laquelle la quantité de rituximab se fixant sur la surface est maximale.

Toutes les variations de K_D discutées ci-dessus peuvent être corrélées aux paramètres cinétiques de l'interaction indiqués dans le tableau 9.

% N3	Γ CD20 (pmol.cm^{-2})	$k_{on}(\text{RTX})$ ($10^{+5} \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	$k_{off}(\text{RTX})$ (s^{-1})	K_D (HL) (nM)
0,1	$2,1 \pm 0,4$	$4,7 \pm 1,3$	$0,46 \pm 0,02$	977 ± 8
1	$2,8 \pm 0,8$	$17,7 \pm 7,1$	$0,46 \pm 0,24$	248 ± 94
2,5	$23,7 \pm 4,0$	$45,6 \pm 6,8$	$0,35 \pm 0,07$	75 ± 6
12,5	$46,1 \pm 10,5$	$27,5 \pm 9,3$	$0,08 \pm 0,03$	35 ± 12
20	$56,0 \pm 13,0$	$17,3 \pm 2,2$	$0,27 \pm 0,06$	152 ± 16
50	$84,9 \pm 4,9$	$4,4 \pm 2,6$	$0,47 \pm 0,32$	1007 ± 16

Tableau 9 : Influence de la densité surfacique en épitope sur l'affinité rituximab/CD20 étudiée par une analyse cinétique en SPR. Les densités ont été déterminées par la formule de Jung ; Les constantes cinétiques d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) ont été déterminées via le modèle HL.

La constante cinétique d'association (k_{on}) augmente d'un facteur 10 lorsque la densité en antigène s'élève de $2,1 \text{ pmol.cm}^{-2}$ ($4,7 \cdot 10^{+5} \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) à $23,7 \text{ pmol.cm}^{-2}$ ($45,6 \cdot 10^{+5} \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$). L'augmentation de la densité en CD20 sur la surface conduit à une vitesse d'association k_{on} de plus en plus rapide, la probabilité de rencontre entre l'antigène et l'anticorps étant plus élevée. Pour des densités plus importantes, la cinétique d'association diminue pour retrouver, à 50%, la valeur initiale des faibles densités. L'encombrement stérique ou encore une agrégation possible des antigènes sur la surface pourraient expliquer ce phénomène.

La modulation du K_D n'est pas uniquement liée à la valeur de k_{on} . Comme nous le constatons dans le tableau 9, les vitesses de dissociation varient également avec le nombre de CD20 immobilisés. Equivalentes à $0,46 \text{ s}^{-1}$ à faible densité surfacique, elles décroissent significativement pour atteindre un minimum de $0,08 \text{ s}^{-1}$ pour des densités de 46 pmol.cm^{-2} , et remontent par la suite pour rejoindre les valeurs initiales. A 46 pmol.cm^{-2} d'épitopes, l'anticorps se dissocie plus difficilement de la surface antigénique qu'à 2 ou à 85 pmol.cm^{-2} . Cet effet peut être corrélé à la structure bivalente du rituximab, capable de ralentir la dissociation par la multiplication des interactions. Le phénomène de bivalence sera plus amplement détaillé lors de la discussion.

III.1.b. Etude par QCM

Pour compléter l'étude réalisée par SPR, des expériences de QCM-D ont été menées afin de vérifier si l'évolution de l'affinité avec la densité surfacique en CD20 suit la même variation en QCM-D qu'en SPR. L'interaction CD20/rituximab a été évaluée en injectant l'anticorps à plusieurs concentrations (de 5 nM à 9 μM) sur des quartz présentant 24, 46, et 85 pmol.cm^{-2} de CD20. Un exemple de variation des fréquences de résonance enregistrées lors des injections de rituximab est présenté en figure 53.

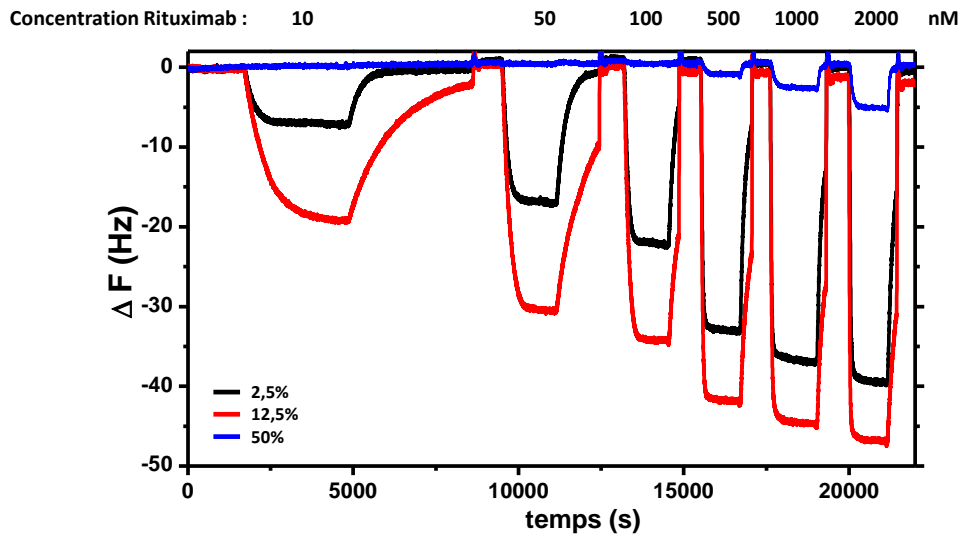


Figure 53 : Impact de la densité surfacique en antigène sur l'interaction CD20/rituximab mesuré par QCM-D. Des injections de rituximab à 10, 50, 100, 500, 1000, et 2000 nM ont été effectuées sur des surfaces fonctionnalisées à 24 (courbe noire), 46 (courbe rouge), et 85 pmol.cm⁻² (courbe bleue) en CD20. La dissociation étant longue et non totale (voir injection à 10 nM), celle-ci était accélérée par l'injection d'une solution de HCl après chaque concentration.

Les surfaces à 85 pmol.cm⁻² fournissent les signaux de plus faible amplitude, et les surfaces à 46 pmol.cm⁻² produisent les plus élevées. En figure 54, les valeurs absolues des variations de fréquence à l'équilibre ont été reportées en fonction de la concentration en rituximab injecté.

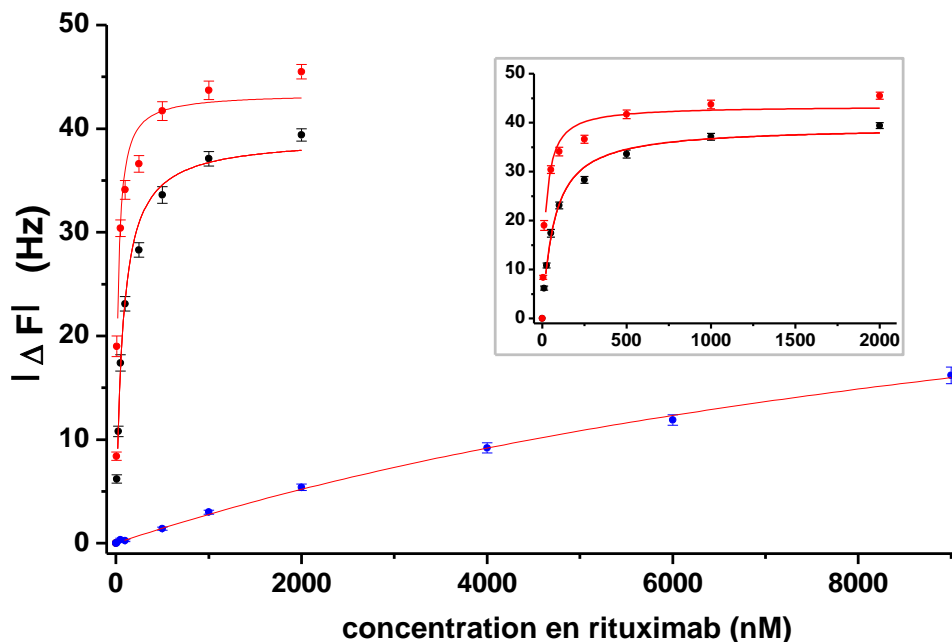


Figure 54 : Impact de la densité surfacique en antigène sur l'interaction CD20/rituximab par QCM-D. Les valeurs absolues des variations de fréquence à l'équilibre induites par le rituximab sont reportées pour des surfaces fonctionnalisées à 24 (courbe noire), 46 (courbe rouge), et 85 pmol.cm⁻² (courbe bleue) en azoture. L'encart représente un grossissement des deux premières courbes (24 et 46 pmol.cm⁻²) permettant de mieux observer les premières concentrations.

Une régression non linéaire des courbes de la figure 54 a été réalisée *via* une isotherme de Langmuir, permettant d'évaluer les valeurs de K_D apparents à 68,7 nM, 17,9 nM, et 13,0 μ M pour des surfaces fonctionnalisées à 24, 46, et 85 pmol.cm^{-2} . Il est assez délicat d'extraire des valeurs de K_D en QCM-D puisque les variations de F et D sont reliées aux changements de masses hydratées, et que le taux d'hydratation des mAbs capturés par la couche de CD20 peut varier dans la gamme de concentration en rituximab explorée. Cette technique est toutefois reportée dans la littérature pour la détermination des K_D des couples rituximab/mimes d'épitopes du CD20. L'un de ces mimes s'est avéré assez efficace en présentant une valeur de K_D de 19 nM.¹³⁴ Dans notre cas, cette technique nous a été utile pour estimer un ordre de grandeur de l'affinité CD20/rituximab, bien que les valeurs de K_D manquent de précision.

Dans le chapitre II, il avait été constaté qu'en SPR, la quantité de CD20 augmente progressivement jusqu'à atteindre un plateau lorsque la surface est préparée avec une solution à 50% de thiols- N_3 , alors qu'en QCM-D, ce plateau est atteint à 12,5%. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'au-delà de ce dernier pourcentage, de nouveaux épitopes se greffaient, mais que la masse gagnée était masquée par la baisse du taux d'hydratation de la couche devenant de plus en plus compacte. Le fait d'observer ici une différence d'affinité très marquée du rituximab pour des surfaces préparées avec 12,5 et 50% de thiols- N_3 nous permet de prouver que la quantité de CD20 n'est pas la même, bien que les variations de fréquence observées lors du greffage sont identiques.

III.1.c. Comparaison SPR / QCM-D

Que ce soit en SPR ou QCM-D, les affinités mesurées en fonction des densités en CD20 peuvent être classées selon le même ordre : $85 < 3 < 46 \text{ pmol.cm}^{-2}$. Dans les deux cas, une fonctionnalisation à 46 pmol.cm^{-2} donne lieu à une affinité plus élevée. Pour ce qui est des valeurs numériques de K_D , celles-ci restent dans les mêmes ordres de grandeurs pour les deux techniques. Les K_D apparents extraits en QCM-D ont des valeurs égales à 69 nM, 18 nM, et 13 μ M pour des surfaces fonctionnalisées à 24, 46, et 85 pmol.cm^{-2} , alors qu'en SPR celles-ci sont estimées à 75 nM, 35 nM, et 1 μ M pour ces mêmes surfaces respectivement. Une différence notable est observée pour 85 pmol.cm^{-2} , où les K_D divergent d'un facteur supérieur à 10. Celui-ci reste toutefois discutable, étant donné que l'équilibre est loin d'être

atteint en QCM-D, comme le montre la figure 54. L'absence de données à de plus hautes concentrations peut générer certaines incertitudes sur l'estimation des valeurs de K_D . Concernant l'amplitude des signaux mesurés lors de l'interaction avec le rituximab, la même tendance est observée quelle que soit la technique : la quantité d'anticorps augmente jusqu'à ce que l'affinité atteigne sa valeur maximale, puis diminue à nouveau. A forte densité surfacique en CD20, une plus faible quantité d'anticorps se fixe donc sur la surface.

Afin de comprendre pourquoi le nombre d'anticorps fixés atteint son maximum lorsque le taux de fonctionnalisation en CD20 est de 46 pmol.cm^{-2} , nous avons tenté de calculer la quantité d'antigènes réellement disponibles pour interagir avec le rituximab. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés à un modèle introduit par Perelson et al, puis développé par Cremer et al.^{177,178} La taille d'un anticorps (environ 60 nm^2)¹⁷⁸ étant largement supérieure à celle de la séquence peptidique représentant le CD20, tous les épitopes greffés ne peuvent être impliqués dans une interaction avec le rituximab. Certains vont être couverts par un anticorps déjà présent sur la surface, d'autres seront stériquement inaccessibles du fait de leur trop grande proximité avec des molécules déjà liées à un anticorps (Figure 55).

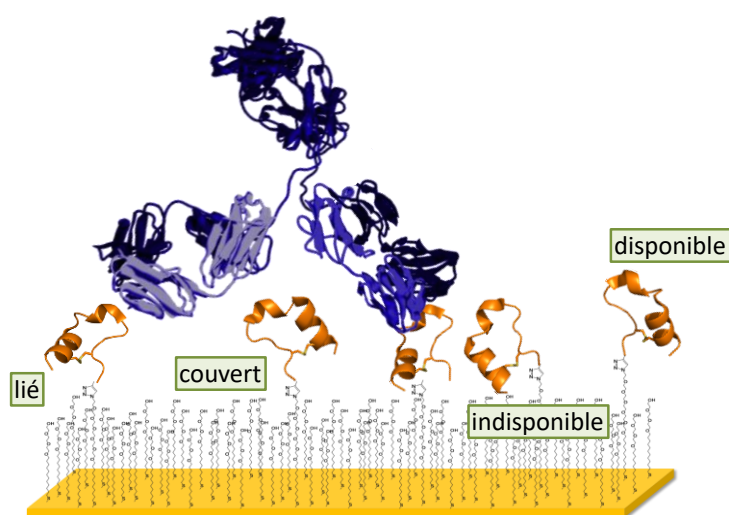


Figure 55: Représentation schématique de l'interaction CD20/ritux

En tenant compte des probabilités pour lesquelles l'antigène peut être lié, couvert, ou inaccessible, ce modèle statistique, détaillé en Annexe 1, aboutit à une équation permettant de calculer le nombre d'antigènes disponibles sur la surface. Nous n'allons ici

n'extraire que les deux formules finales de la démonstration, intéressantes pour la détermination de la densité surfacique d'épitopes accessibles.

Soit i le nombre de sites déjà occupés, et i/n la fraction de sites en interaction sachant que n est le nombre total de sites ($n =$ la densité surfacique déterminée précédemment). Le nombre de sites occupés i est calculé selon l'équation :

$$i = \frac{\left(2 + \frac{0.5na}{A}\right) - \sqrt{4 + (9.10^{-34}).n^2}}{6.10^{-17}} \quad (23)$$

où a est l'aire que recouvre un IgG (60 nm^2),¹⁷⁸ A est l'unité de l'aire surfacique, et n la densité surfacique totale de CD20. La densité surfacique d'antigènes réellement disponibles est :

$$\Gamma_{\text{CD20 disponible}} = 2(n-i) + \frac{ia(-n+i)}{A} \quad (24)$$

L'évolution de la densité surfacique théorique en CD20 disponible sur la surface en fonction de la densité totale en CD20 (calculée par la formule de Jung) est présentée sur le graphe de la figure 56.

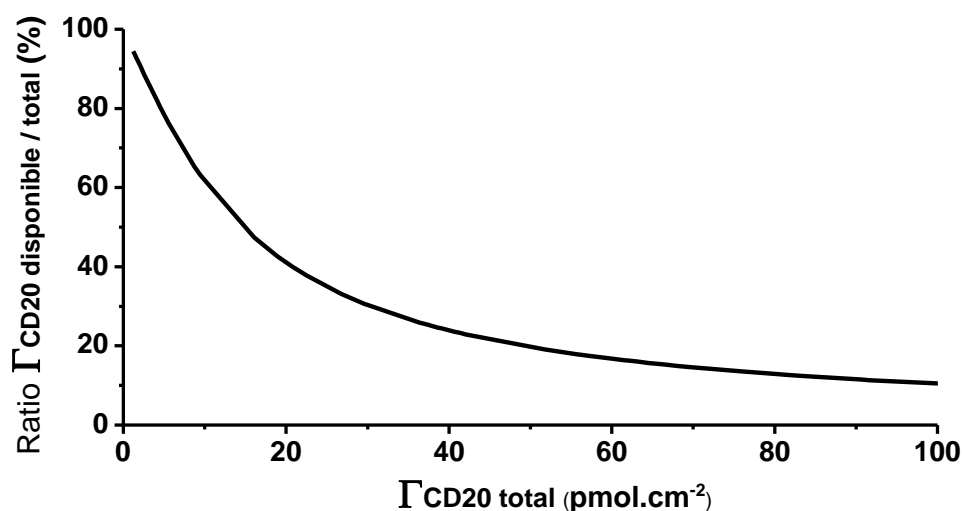


Figure 56 : Variation du pourcentage de CD20 disponibles pour une interaction en fonction du taux de CD20 total. Le taux de CD20 disponible est déterminé *via* le modèle de Cremer.

Lorsque la densité en CD20 sur la surface est faible, et de ce fait les sites assez espacés les uns des autres, la grande majorité d'entre eux ont la possibilité d'interagir avec le rituximab. Pour $2,1 \text{ pmol.cm}^{-2}$ en CD20 par exemple, 90% des CD20 totaux sont disponibles pour interagir avec le rituximab. Lorsque le taux d'épitopes surfaciques augmente, la portion de CD20 disponible pour de nouvelles interactions tend vers une valeur limite de 10% (10 pmol.cm^{-2}). Une densité surfacique totale de 46 pmol.cm^{-2} (préparée avec une solution de 12,5% de fonctions azoture) correspond à près de 90 % de la valeur à saturation des CD20 disponibles. En résumé, de $2,1$ à 46 pmol.cm^{-2} d'antigène total, la quantité de CD20 disponible augmente, ce qui accroît le nombre d'anticorps pouvant se lier à la surface jusqu'à atteindre la saturation. Des taux de fonctionnalisation en CD20 supérieurs à 46 pmol.cm^{-2} , ne permettent plus de fixer de nouveaux anticorps du fait de leur taille.

III.2. Etude d'interaction avec le Fab

Les deux techniques d'analyse de surface que sont la SPR et la QCM-D prouvent que la densité surfacique en antigène impacte fortement l'interaction antigène/anticorps. Ce phénomène peut être corrélé à la bivalence du rituximab. Pour évaluer le gain d'affinité causé par la multivalence de l'anticorps, des études cinétiques avec ses fragments Fab ont été réalisées par SPR. Pour les obtenir, le rituximab a été digéré par la papaïne, une enzyme capable de cliver les IgG au niveau de la région flexible, de sorte à libérer les deux Fab et le fragment Fc. Les Fabs ont ensuite été purifiés par chromatographie d'affinité *via* l'utilisation d'une colonne fonctionnalisée par la protéine A, capable de retenir les fragments Fc et les IgG non clivés (Figure 57). Enfin, la réalisation d'un gel SDS-PAGE nous a permis de vérifier la qualité de la solution de Fab (Annexe 2).

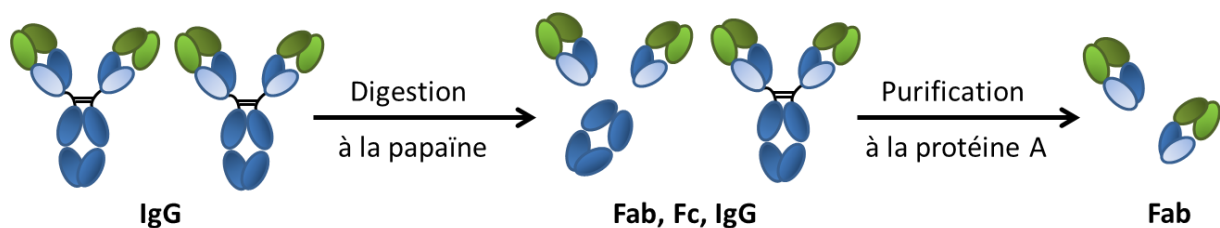


Figure 57 : Représentation schématique du processus d'obtention des Fab à partir de l'anticorps. Celui-ci est dans un premier temps clivé pour libérer les fragments Fab et Fc. La deuxième étape consiste à purifier la solution grâce à une colonne de protéine A.

La figure 58 montre un exemple de sensorgrammes obtenus lors de la caractérisation des affinités du fragment Fab pour les surfaces antigéniques. Le modèle HL a été appliqué ici pour extraire les paramètres cinétiques. Une comparaison des modèles 1:1 et HL est présentée en annexe 3, et permet de justifier notre choix.

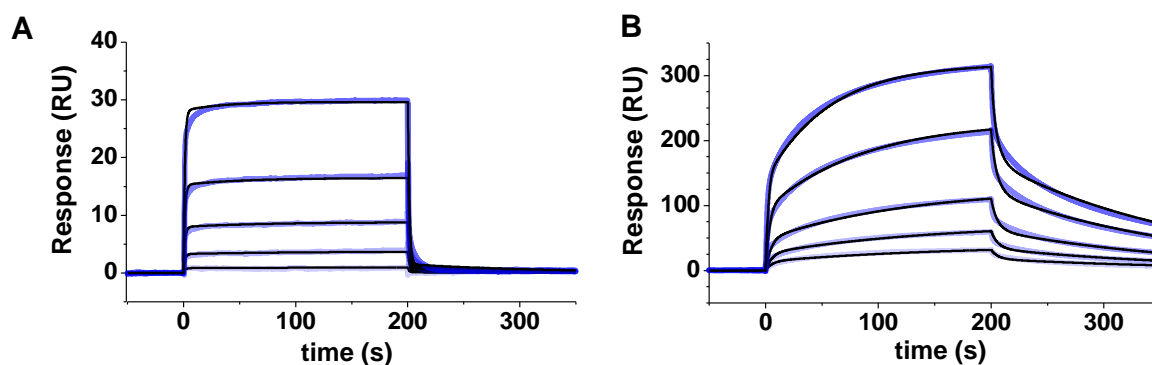


Figure 58 : Sensorgrammes illustrant l'interaction CD20 / Fab par SPR après double soustraction sur des surfaces fonctionnalisées avec A : 2,8 pmol.cm⁻² de CD20 (correspondant à 1% en thiol-N₃ dans la solution de thiols utilisée pour préparer la SAM-N₃) et B : 46 pmol.cm⁻² (12,5% en N₃). Les gammes de concentrations en Fab sont pour A : 50, 200, 500, 1000, 2000 nM, et pour B : 50, 100, 200, 500, 1000 nM. Les courbes noires représentent les sensorgrammes théoriques issus du modèle HL (correction d'indice RI = 0).

Le tableau 10 présente les résultats des cinétiques d'interaction du fragment Fab pour une gamme de concentration de 50 nM à 2 μM sur des surfaces à 2,1, 2,8 et 46 pmol.cm⁻².

Γ CD20 (pmol.cm ⁻²)	Fab			rituximab		
	k _{on} (10 ⁺⁵ M ⁻¹ .s ⁻¹)	k _{off} (10 ⁻¹ .s ⁻¹)	K _{Dapp} (nM)	k _{on} (10 ⁺⁵ M ⁻¹ .s ⁻¹)	k _{off} (10 ⁻¹ .s ⁻¹)	K _{Dapp} (nM)
2,1 ± 0,4	0,5 ± 0,4	6,0 ± 2,4	14130 ± 3827	4,7 ± 1,3	4,6 ± 0,2	977 ± 8
2,8 ± 0,8	0,6 ± 0,2	6,4 ± 1,2	12700 ± 3750	17,7 ± 7,1	4,6 ± 2,4	248 ± 94
46,1 ± 10,5	3,8 ± 0,8	2,0 ± 0,2	617 ± 74	27,5 ± 9,3	0,8 ± 0,3	35 ± 12

Tableau 10 : Paramètres cinétiques et thermodynamiques de l'interaction CD20/Fab du rituximab, et comparaison avec ceux obtenus pour l'interaction CD20/rituximab. Les constantes cinétiques d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}), ainsi que la constante d'équilibre K_D ont été déterminés via le modèle HL. Les expériences ont été réalisées au moins trois fois pour chaque pourcentage.

Il doit tout d'abord être précisé que l'interaction CD20/Fab sur les surfaces à 2,1 pmol.cm⁻² est assez difficile à étudier, du fait de la faible amplitude des signaux générés en SPR, ce qui a donné lieu à des erreurs élevées pour certains paramètres. Bien que les résultats obtenus à 0,1% n'aient pas été très reproductibles, il semblerait qu'ils tendent vers ceux obtenus à 1%. Le fait que les interactions à 0,1 et 1% soient caractérisées par des k_{on},

k_{off} , et K_D très similaires démontre que la densité surfacique en CD20 n'impacte pas encore l'interaction antigène/Fab.

Au regard des constantes cinétiques, la vitesse de dissociation (k_{off}) du fragment Fab semble diminuer d'un facteur 3 avec l'augmentation de la densité surfacique. En parallèle, la constante d'association (k_{on}) augmente d'un facteur 7 pour des densités comprises entre 2,8 et 46 pmol.cm⁻² de sorte que le Fab acquiert une vitesse d'association de $3,8 \cdot 10^{+5} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ quand la densité en antigène est de 46 pmol.cm⁻². Le fait que le fragment Fab se fixe plus rapidement pourrait être expliqué par une probabilité de rencontre plus élevée. Il est aussi possible que des interactions électrostatiques favorisent dans un premier temps l'amarrage du Fab. En effet, avec un point isoélectrique de 8,4, le Fab est positif à pH 7,4 ($pI_{\text{rituximab}} = 8,68$), tandis que la séquence peptidique du CD20 est négative ($pI = 4,15$). Les vitesses d'association restent toutefois très lentes comparées à celles observées pour le rituximab (environ 30 fois plus lente à 2,8 pmol.cm⁻², et 7 fois plus lente à 46 pmol.cm⁻²). Cette différence illustre combien la présence du second bras favorise la fixation plus rapide de l'anticorps sur la surface. D'autre part, la vitesse d'association de $3,8 \cdot 10^{+5} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ du fragment Fab sur les surfaces à 46 pmol.cm⁻² est équivalente aux $4,7 \cdot 10^{+5} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ trouvés avec le rituximab pour une surface à seulement 2,1 pmol.cm⁻². La monovalence de l'interaction est ici compensée par une augmentation du taux de greffage en CD20. Avec ce résultat nous montrons que la multivalence n'est pas le seul critère nécessaire à l'obtention d'une forte interaction. La densité surfacique joue aussi un rôle crucial dans la reconnaissance antigène/anticorps.

L'évolution des paramètres cinétiques discutés ci-dessus modifie l'affinité globale du fragment Fab par rapport au rituximab. La valeur du K_D est plus faible pour le Fab : 14 vs 1 μM pour 2 pmol.cm⁻² (0,1%) ; 13 μM vs 250 nM pour 3 pmol.cm⁻² (1%) et 617 vs 35 nM pour 46 pmol.cm⁻² (12,5%), correspondant à des ratios de K_D Fab/mAb d'environ 14, 50, et 15 respectivement. Remarquons toutefois que les K_D évalués pour 0,1 et 1% sont supérieurs à la gamme de concentrations étudiés, ce qui peut impacter la précision des valeurs.

III.3. Discussion

L'étude de l'impact de la densité surfacique en CD20 sur l'interaction antigène/anticorps a permis de démontrer que celle-ci est exacerbée lorsque le taux de greffage en CD20 atteint les 46 pmol.cm^{-2} . L'affinité mesurée pour cette densité surfacique est à corrélérer à deux phénomènes : la réassociation statistique et la bivalence. La réassociation statistique opère lorsque les distances inter-antigène sont suffisamment courtes. L'un des bras Fab de l'anticorps qui se détache d'un premier CD20 a en effet beaucoup de chances d'en rencontrer un nouveau dans son environnement immédiat, ce qui facilite la création extrêmement rapide d'une nouvelle interaction. L'anticorps restant en très grande proximité de la surface durant ces changements de partenaires, la vitesse de dissociation globale que nous sommes capables d'évaluer en SPR apparaît donc plus lente. Au phénomène de réassociation statistique vient s'ajouter la bivalence. La liaison simultanée à deux antigènes permet indéniablement de renforcer l'interaction entre le rituximab et la surface. Si l'anticorps était une molécule rigide, la bivalence serait un évènement trop rare car la distance séparant les deux paratopes devrait coïncider avec la distance inter-antigène. En réalité, les deux parties Fab de l'anticorps sont reliées au fragment Fc par une région hyperflexible permettant à l'immunoglobuline d'adopter de multiples conformations dans le but d'atteindre les antigènes. L'étude de la dynamique des anticorps a notamment démontré des angles Fab-Fab très variés, le degré de liberté entre l'angle minimal et le maximal pouvant atteindre plus de 60° (Figure 59).^{190,191}

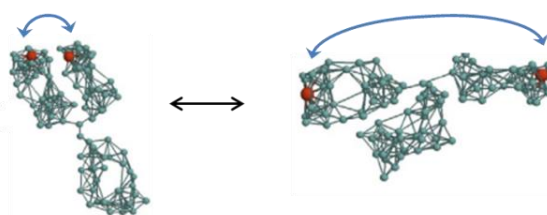


Figure 59 : Représentation schématique de la dynamique conformationnelle exercée par un anticorps.¹⁹² Les points rouges représentent les extrémités des paratopes.

L'énergie élastique qui impulse les Fab à osciller conduit à une plus grande ouverture de l'angle, et de ce fait à des distances inter-paratope pouvant aller de 5 à 17 nm.^{192,193,194} Si un anticorps est déjà lié à la surface par un de ses bras, le second Fab sera donc capable de

sonder une large surface environnante (quelques nanomètres), et, pour certaines amplitudes d'écartement, se liera lui aussi à un nouvel antigène.¹⁹⁰

Ce phénomène permettant donc à l'anticorps de dissocier puis de réassocier séquentiellement chacun de ses bras à la surface, tout en incluant parfois des moments de double association simultanée est appelé par certains la locomotion bipodale ou encore la « marche de l'anticorps ».¹⁹⁵ Grâce à la technique de l'HS-AFM (high-speed atomic force microscopy) qui permet d'obtenir des images de surfaces toutes les dizaines de milliseconde, Preiner et al. réussirent à suivre la vitesse et la trajectoire d'un anticorps se mouvant sur une surface rigide lors de la phase d'association (Figure 60).

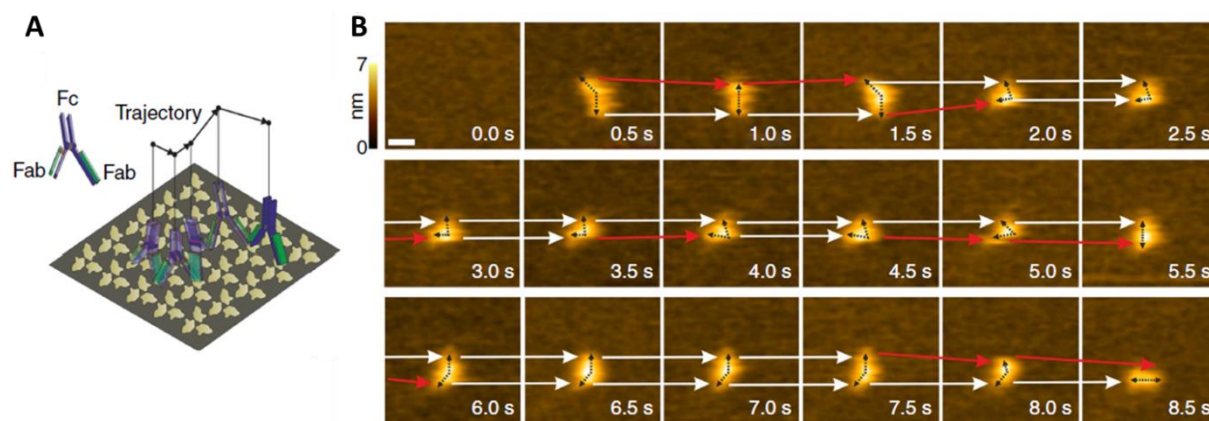


Figure 60 : Locomotion d'un anticorps sur une surface antigénique.¹⁹⁵ A : trajectoire schématique de l'anticorps sur la surface. B : Suivi de la mobilité de l'anticorps par HS-AFM. Les flèches noires représentent les Fab, les flèches blanches représentent l'immobilité du Fab, alors que les flèches rouges mettent en évidence le changement de position du bras. Echelle = 10 nm.

Les images obtenues lors de cette étude démontrèrent que la vitesse de déplacement de l'anticorps est dépendante de la densité surfacique en antigène. Il s'est en effet avéré que la gêne stérique occasionnée par une trop forte densité conduit à l'instabilité des liaisons épitope/paratope et induit donc une dissociation prématurée du bras Fab de la surface. Cet effet est d'autant plus important lorsque l'anticorps est fixé de manière bivalente car le stress stérique engendré par une double interaction est tel que le mAb ne conserve pas la bivalence très longtemps. Les dissociations sont donc plus nombreuses, mais puisque les réassociations le sont aussi, l'affinité globale observée est plus élevée.

Dans notre cas, la gêne stérique observée pour des densités plus importantes se traduit par des cinétiques d'association plus lentes, et celles de dissociation plus rapides, de

sorte que l'affinité s'amointrit pour rejoindre l'ordre du micromolaire, ce qui est très faible pour une interaction antigène/anticorps. L'agrégation peut également jouer un rôle lorsque le taux de greffage est élevé. Dans une étude portant sur l'interaction entre un ganglioside membranaire et la toxine cholérique, Cremer et al. ont en effet réussi à démontrer par AFM que la baisse d'affinité à hautes densités surfaciques étaient causées par des interactions ganglioside – ganglioside sur la surface.¹⁹⁶

Pour évaluer le gain d'affinité apporté par les phénomènes de réassociation statistique et de bivalence respectivement, des mesures ont été effectuées avec le Fab du rituximab. Concernant le Fab, il s'est avéré que les valeurs du K_D diminuent d'un facteur 23 entre les surfaces fonctionnalisées avec 2 et 46 pmol.cm⁻². Cette augmentation d'affinité est fortement influencée par la réassociation statistique. La comparaison des valeurs de K_D pour les molécules mono- et bivalente à taux de fonctionnalisation identiques nous permet quant à elle d'observer l'apport de la bivalence. L'affinité associée au rituximab est environ 14, 50, et 15 fois plus forte que celle du Fab pour des surfaces à 2, 3, et 46 pmol.cm⁻² respectivement.

Dans la littérature, il existe des exemples de comparaison d'affinités entre un IgG et son Fab. Le groupe de Cremer a par exemple caractérisé l'interaction d'anticorps anti-2,4-Dinitrophénol (DNP) et celle de leurs fragments Fab avec les ligands DNP fixés à une membrane de phospholipides. Ils ont montré que les anticorps se lient aux ligands surfaciques 3 à 30 fois plus fortement que le Fab monomère.¹⁷⁸ Pour caractériser l'apport de la bivalence sur les interactions ligand/analyte, Whitesides et al. ont aussi comparé l'affinité d'une protéine synthétique monovalente, et celle de son équivalent dimérique avec leur partenaire biologique fixé sur une SAM.¹⁷⁹ Ils déterminèrent une valeur de K_D 50 fois plus élevé pour l'analyte bivalent par rapport au monovalent. Les résultats reportés dans la littérature suggèrent que les IgG se lient plus fortement aux ligands que les Fabs, et que le gain est de l'ordre de 10 à 1000.¹⁷⁹

Pour résumer les résultats obtenus dans ce chapitre, un schéma récapitulatif illustrant l'association et la dissociation de l'anticorps et du Fab sur la surface a été réalisé (Figure 61). A faible ou forte densité en antigène, les vitesses d'association de l'anticorps sont faibles et similaires (environ $4,5 \cdot 10^{+5} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Figure 61 A et E), alors que l'affinité est

accrue pour des densités moyennes ($45 \cdot 10^{+5} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Injecté sur une surface de faible densité, l'anticorps se lie de manière monovalente à un CD20. Lorsqu'un bras du mAb se détache, le second peut alors s'associer à un autre antigène (flèches rouges). Cet effet est toutefois probablement limité à faible densité surfacique en CD20, étant donné que les antigènes sont très espacés les uns des autres (plus de 10 nm). A l'opposé, pour des surfaces de forte densité, l'anticorps se lie aussi de manière monovalente mais cette fois-ci à cause de l'encombrement stérique limitant l'accessibilité des CD20. Il peut aussi se déplacer sur la surface mais ne le fait majoritairement que par des interactions monovalentes. Lorsque le taux de greffage est optimal ($46 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2}$), le rituximab se fixe plus rapidement à la surface. Il peut alors être engagé dans des interactions bivalentes (Figure 61C) ou se déplacer de façon très dynamique sur la surface grâce à des réassociations permanentes avec les antigènes. Ces phénomènes, facilités par une courte distance inter-CD20 d'environ 2.2 nm, participent à l'augmentation de l'affinité antigène/anticorps observée pour ces conditions. Tout comme le rituximab, le fragment Fab est caractérisé par une vitesse d'association plus élevée sur les surfaces présentant $46 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2}$ d'antigène (Figure 61D).

Durant la phase de dissociation, nous avons constaté que le rituximab met beaucoup plus de temps à se dissocier des surfaces à taux de greffage moyen, du fait de la bivalence (Figure 61C'). La vitesse de dissociation du Fab est, quant à elle, un peu moins impactée par la densité surfacique.

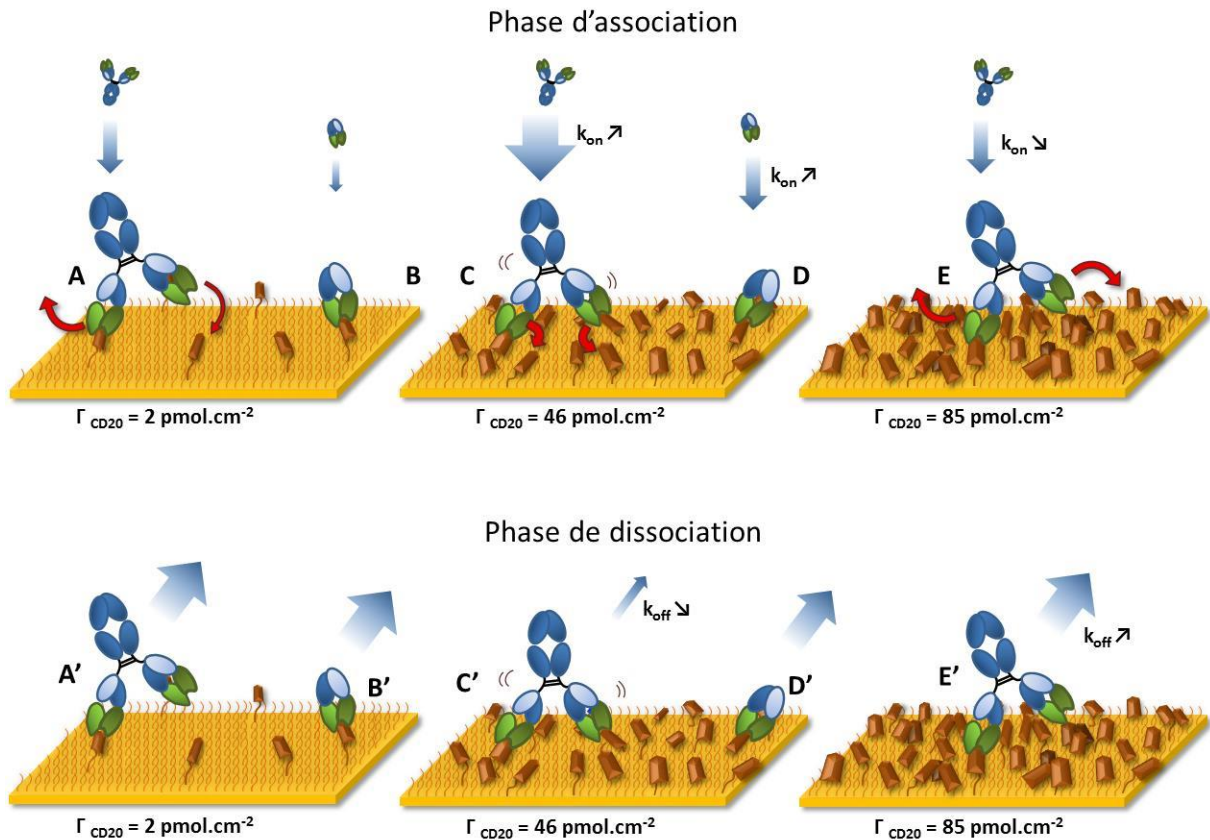


Figure 61 : Schéma général illustrant l'association (A, B, C, D, et E) et la dissociation (A', B', C', D', et E') du rituximab et de son fragment Fab sur des surfaces antigéniques de différentes densités : 2.8 pmol.cm⁻² (1%), 46 pmol.cm⁻² (12.5%), et 85 pmol.cm⁻² (50%). Les flèches bleues représentent l'arrivée et le départ de l'anticorps sur la surface. Les flèches rouges illustrent les remaniements possibles effectués sur la surface. La grosseur des flèches est représentative des vitesses des constantes cinétiques. Les flèches ↗ et ↘, associées aux k_{on} et k_{off} signifient augmentation et diminution respectivement.

III.4. Corrélation avec l'efficacité clinique du rituximab

L'étude présentée ci-dessus a permis de démontrer qu'il existe une densité surfacique en antigène pour laquelle l'interaction CD20/rituximab est très favorable. Les surfaces dont la densité est de 46 pmol.cm⁻², et les distances inter-antigène de 2.2 nm en moyenne, sont associées à des valeurs de K_D proches de 35 nM. Bien que nous ne puissions pas comparer une SAM fonctionnalisée avec une surface cellulaire qui est beaucoup plus complexe, nous pouvons toutefois noter que ces K_D sont proches de ceux déterminés *in vitro* (5-19 nM).

Aujourd'hui, les retours cliniques mettent en évidence l'impact du taux d'antigène membranaire sur l'efficacité des anticorps en oncologie.^{166,197,198} Pour le rituximab, il a par exemple été démontré que la réponse thérapeutique est plus importante dans le cas des

lymphomes folliculaires, comparé à la leucémie lymphoïde chronique. Or, la différence qu'ont les cellules à l'origine de ces cancers est justement le taux d'expression des CD20, qui est plus élevé sur les cellules de lymphomes folliculaires.^{166,199} En analysant les cellules tumorales de 218 patients présentant 6 types de lymphomes différents, Prevodnik et al. démontrèrent combien les taux d'expression de CD20 peuvent varier d'un individu à l'autre, ou d'un type de cancer à l'autre. La gamme s'est en effet étendue de 2 737 à 679 577 MESF, l'acronyme MESF (Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome) étant une unité de mesure standard utilisée en fluorescence, et reliée au nombre de molécules membranaires détectées.¹⁹⁹ En suivant les réponses cliniques, ils déterminèrent une valeur seuil d'expression de CD20 de 25 000 MESF pour laquelle le traitement par rituximab commence à être efficace. Cette valeur seuil n'est pas atteinte chez 74 % des patients souffrant d'une leucémie lymphoïde chronique. Le taux d'expression des antigènes est donc un facteur prédictif de la réponse au rituximab.

Pour comprendre ce phénomène, certaines études ont eu pour but de déterminer quels mécanismes sont mis en jeu. Il semblerait que le système CDC soit très affecté par le nombre de CD20 situés à la surface des cellules. D'après Meerten et al., ce mécanisme de destruction cellulaire augmenterait avec la densité surfacique en CD20 selon une sigmoïde ascendante.¹⁶⁶

Par ailleurs, des études de microscopie de fluorescence ont été menées par Melhus et al., afin d'observer la distribution des antigènes sur la membrane plasmique.¹⁸⁹ Pour cela, ils utilisèrent du rituximab fluorescent qu'ils incubèrent avec des cellules Raji (une lignée cellulaire de lymphomes) possédant, d'après leur calcul, environ 248 000 antigènes disponibles sur la surface. D'après les images (dont l'une est reportée Figure 62), la distribution des CD20 dans la membrane plasmique est très hétérogène.

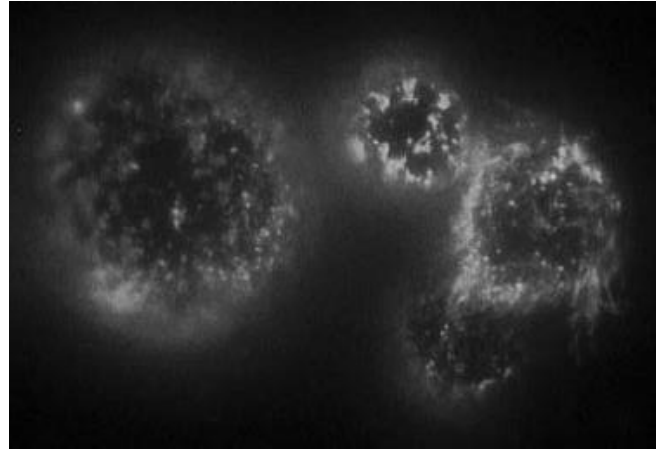


Figure 62 : Localisation du rituximab-Alexa sur la membrane de cellules Raji observée par Melhus et al.¹⁸⁹ en microscopie de fluorescence.

Avec des taux allant d'environ 3 000 à 700 000 antigènes par cellule B environ (la plupart étant dans la gamme 200 000 - 600 000),^{166,189,197,198} et en considérant le diamètre d'une cellule B autour de 8 μm , une distribution homogène des CD20 conduirait à des densités surfaciques comprises entre 2,5 fmol.cm^{-2} et 0,58 pmol.cm^{-2} . Or, ces valeurs sont bien inférieures aux densités minimales étudiées lors de nos expériences de SPR (2 pmol.cm^{-2}), pour lesquelles nous avons constaté des affinités très faibles pour le rituximab. Avec ces faibles densités surfaciques, aucune efficacité clinique ne peut être attendue. Ces données confirmeraient donc la distribution hétérogène des CD20 dans la membrane plasmique, et plus particulièrement la formation de groupements localisés où la distance inter-épitope pourrait peut-être de l'ordre de 2 nm.

Le niveau d'expression des antigènes surfaciques est un paramètre devant impérativement être pris en compte dans le développement des nouvelles stratégies thérapeutiques. Il permet de plus de prédire l'efficacité du traitement et d'éviter des soins inutiles dans les cas de résistance induite par les faibles niveaux d'expression des antigènes. Pour ces cas, une des solutions serait d'augmenter artificiellement la quantité de CD20 à la surface des cellules B. La radiation ionisante est une technique capable de provoquer des variations d'expression du taux de CD20.²⁰⁰ Singh et al. ont par exemple étudié les effets d'irradiation sur des cellules de la lignée Daudi, issue du lymphome de Burkitt.¹⁹⁸ Ils démontrèrent que 20h après une exposition de 0,5 Gy de radiations γ , le nombre d'antigènes par cellule était passé de 220 000 à 380 000. Grâce à ce phénomène, les

combinaisons [0,5 Gy de radiations/rituximab] et [1,5 Gy de radiations/rituximab] permettent d'induire respectivement une mort cellulaire 2,5 et 4,5 fois plus importante que le rituximab seul. Une irradiation des patients juste avant la séance d'immunothérapie pourrait donc devenir une nouvelle voie de traitement, surtout dans les tumeurs agressives résistantes aux thérapies classiques.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré que les surfaces fonctionnalisées par l'épitope CD20 possèdent des propriétés de reconnaissance et une remarquable spécificité pour l'anticorps rituximab. Afin de mieux comprendre les mécanismes de reconnaissance mis en jeu, nous avons ensuite étudié l'impact de la densité surfacique en CD20 sur l'interaction anticorps/antigène. En concevant des surfaces à différents taux de CD20 sur lesquelles nous avons réalisé des cinétiques d'interaction avec le rituximab, des variations importantes d'affinité ont été mesurées. Celles-ci sont directement reliées aux distances inter-antigène, qui causent des interactions monovalentes, bivalentes, de l'encombrement stérique, voire de l'agrégation. La plus forte affinité est observée sur des surfaces dont la densité surfacique en CD20 est de 46 pmol.cm^{-2} . La distance inter-antigène moyenne de 2,2 nm est optimale pour favoriser l'interaction avec le mAb, donnant lieu à des valeurs de K_D d'environ 35 nM, proche de celles habituellement déterminées *in vitro*. Cet écart entre les techniques de surface et sur cellules est par ailleurs plus faible que ce qui a été jusqu'à présent décrit dans la littérature, où les K_D sont compris entre 160 nM et 9 μM (cf chapitre II, partie I.1). Les surfaces aux densités surfaciques de 46 pmol.cm^{-2} ont donc été sélectionnées afin de réaliser le criblage de séquences peptidiques situées dans le paratope du rituximab.

Chapitre IV

Etude des CDR : Détermination des séquences peptidiques en interaction avec le CD20

La conception de mimes de mAb de très hautes affinités et une spécificité semblable à celle de l'anticorps d'origine représente un défi. L'équipe de Liskamp est très probablement le groupe de recherche dont les stratégies se rapprochent le plus des nôtres. Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographie (paragraphe 1.2.c), ils utilisent en effet des châssis moléculaires pré-organisés (analogues du cyclotrivératrylène) afin d'y greffer les CDR de l'inflximab.⁵⁸ Les composés synthétisés présentent des K_D de l'ordre de quelques dizaines de micromolaires, ce qui est déjà très bien au vu de la perte de la majorité du paratope. Pourtant, ces affinités sont trop faibles pour espérer une réponse thérapeutique.

Pour nous aider à optimiser l'activité des mimes de paratopes, il est nécessaire de déterminer le plus précisément possible les zones où l'interaction s'effectue entre les boucles peptidiques et l'épitope de l'antigène. Connaître les acides aminés mis en jeu, ainsi que la manière dont ils interagissent avec l'antigène permettrait de justifier leur présence dans les boucles à greffer, ainsi que de les orienter de manière optimale par rapport au châssis pour qu'ils puissent avoir facilement accès à la cible.

L'interaction CD20/rituximab est ici étudiée *via* trois techniques différentes et complémentaires. Dans un premier temps, nous regarderons les données fournies par l'analyse structurale des deux biomolécules en interaction et archivées dans la PDB (Protein Data Bank). Nous étudierons ensuite les résultats obtenus par nos collaborateurs avec la méthode SPOT, ayant servi à la sélection des fragments peptidiques issus du paratope du rituximab. Enfin, nous examinerons nos données déterminées après le criblage des fragments sélectionnés par SPR. Une étude comparative des trois techniques sera en dernier lieu réalisée.

I. Explorations de l'interaction Ag/Ac par cristallographie

La cristallographie par diffraction de rayons X est une des techniques les plus résolutive pour caractériser la structure 3D des protéines ou de complexes protéiques en interaction à un niveau atomique. Comparée à la RMN, cette méthode a l'avantage de fournir des descriptions plus statiques des structures des biomolécules, dont le poids moléculaire n'est pas limité. Pour cela, des rayons X sont envoyés sur un cristal formé par

des unités de répétition de la macromolécule à analyser, formant ainsi un réseau symétrique et périodique. La façon dont ces rayons X sont diffractés permet de localiser précisément chaque atome composant la macromolécule.²⁰¹ Pour les complexes protéiques, des informations concernant les interactions inter-moléculaires sont également obtenues.

En 2007, Du et al. déterminèrent la structure cristallographique du fragment Fab du rituximab en interaction avec l'épitope du CD20.¹⁷¹ Cet épitope est celui que nous avons utilisé pour nos études SPR. En figure 63, nous pouvons reconnaître la chaîne lourde du Fab (V_H) longue de 224 acides aminés, et sa chaîne légère (V_L) longue de 213 acides aminés. Plus de détails sur les séquences peptidiques sont accessibles en Annexe 3. En couleur sont représentés les six CDR (H1, H2, H3 pour la chaîne lourde et L1, L2, et L3 pour la chaîne légère). Pour les situer, il est nécessaire de recourir à un système de numérotation des domaines variables. Nous allons ici nous baser sur celui créé par Kabat dans les années 70.^{202,203} Après avoir développé une banque de données de paratopes, cet immunochimiste réalisa un alignement de séquences et calcula la variabilité des acides aminés pour chaque position. Ceci lui permit de localiser les 6 régions hypervariables dont les positions peuvent être reportées sur la plupart des Fab afin de visualiser les zones probables d'interaction.

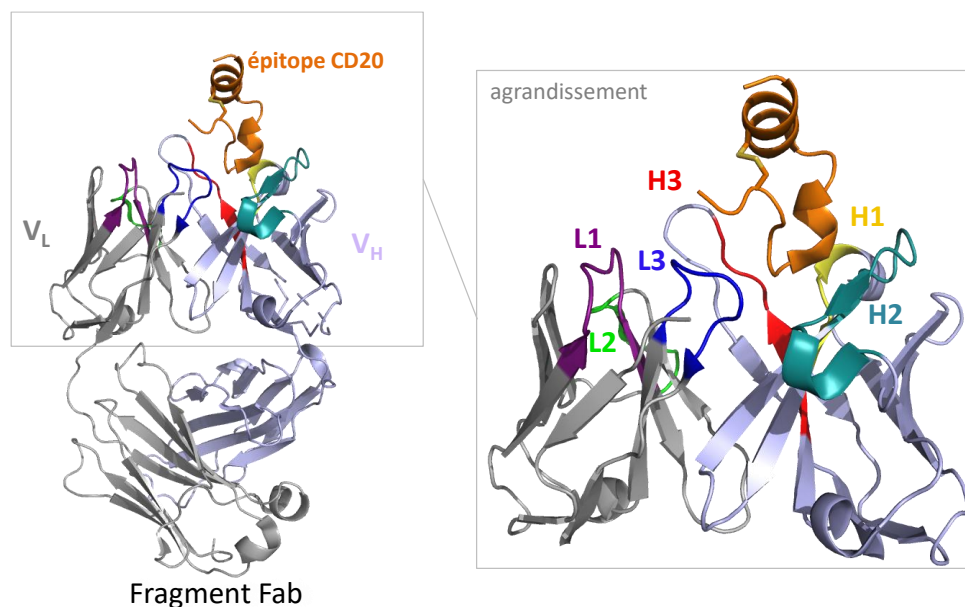


Figure 63 : Structure du Fab du rituximab en interaction avec l'épitope CD20 déterminée par cristallographie aux rayons X.¹⁷¹ Le Fab est composé d'une chaîne légère V_L (grise) et d'une chaîne lourde V_H (bleue). A leur extrémité se trouvent les régions hypervariables H1, H2, H3, L1, L2, et L3 déterminées via la numérotation de Kabat. Le cadre délimite le paratope. L'épitope CD20 est coloré en orange. La modélisation a été réalisée par Pymol. PDB code : 2OSL.

D'après la figure 64, les boucles L3, H1, H2, et H3 forment l'embouchure d'une poche d'interaction destinée à accueillir le CD20 bien que son interaction déterminée par RX apparaisse en surface. D'après l'article, l'interaction Fab/CD20 couvre une surface de 4.4 nm², ce qui représente 23% de la surface de l'épitope (19.1 nm²) et 2.3% de celle du Fab (194.0 nm²). Dans cette zone, les résidus du Fab impliqués dans les interactions avec le CD20 appartiennent pour la plupart aux régions hypervariables déterminées plus tôt. Que ce soit pour les liaisons hydrogène ou pour les interactions de Van der Waals, une forte prédominance est observée pour les CDR de la chaîne lourde (H), surtout pour H2. La contribution des chaînes légères est en effet très faible, et n'implique que la boucle L3. En ce qui concerne le CD20, le motif ¹⁷⁰ANPS¹⁷³, déjà connu comme responsable de la reconnaissance, est effectivement impliqué dans 5 liaisons hydrogène sur 8, et 79 interactions de Van der Waals sur 97. Le fait qu'il soit situé au niveau de la courbure inférieure du peptide lui confère une position stratégique pour être au plus près des CDR.

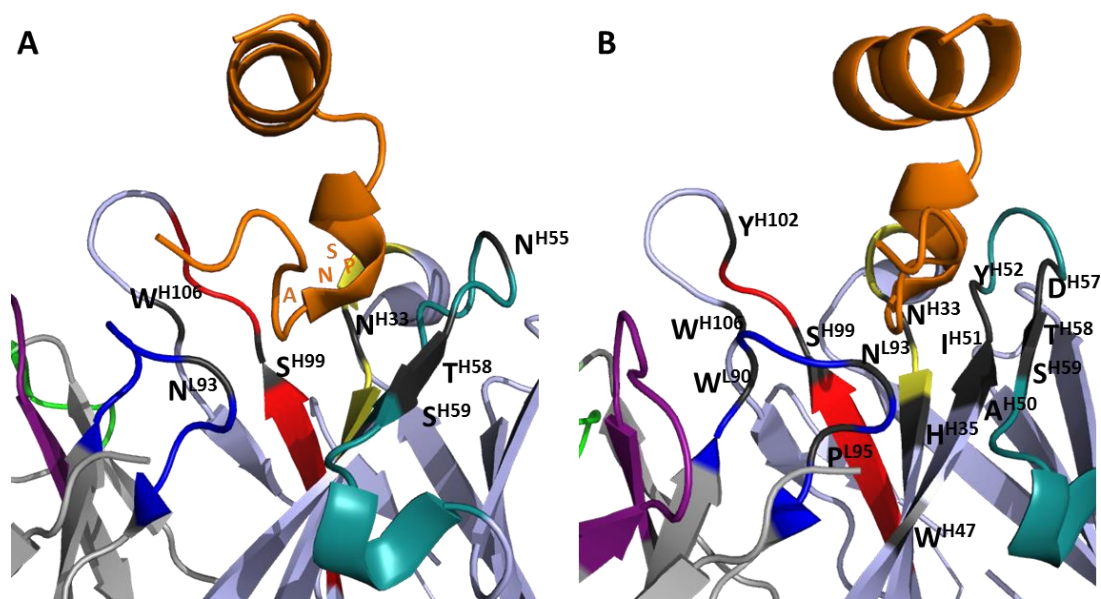


Figure 64 : Mise en évidence des acides aminés du Fab (gris foncé) interagissant avec le CD20 (orange) via les liaisons hydrogène (A) ou des interactions de Van der Waals ≤ 4 Å (B). La cible du Fab est principalement le motif ANPS du CD20.

Les résidus de Fab définis par cristallographie comme potentiellement intéressants pour la composition des mimes de paratopes sont regroupés dans le tableau 11.

Boucle CDR	liaisons hydrogène	Interactions de Van der Waals $\leq 4 \text{ \AA}$
H1	N ³³	N ³³ , H ³⁵
H2	N ⁵⁵ , T ⁵⁸ -S ⁵⁹	W ^{47*} , A ⁵⁰ -I ⁵¹ -Y ⁵² , D ⁵⁷ -T ⁵⁸ -S ⁵⁹
H3	S ⁹⁹ , W ^{106*}	S ⁹⁹ , Y ¹⁰² , W ^{106*}
L3	N ⁹³	W ⁹⁰ , N ⁹³ , P ⁹⁵

Tableau 11 : Liste des acides aminés impliquant des interactions par liaison hydrogène ou de type Van der Waals avec l'épitope du CD20. Les acides aminés marqués par des étoiles ne font pas partie d'une boucle CDR, mais ont été rattachés à la boucle la plus proche.

Bien que la cristallographie aux rayons X soit la méthode de choix pour extraire des informations structurales d'une interaction protéine/peptide, elle ne décrit pas exactement les phénomènes observés pour un couple protéique isolé. S'effectuant en phase solide avec des complexes protéiques collés les uns aux autres, la diffraction donne accès à deux types d'interactions : les interactions biologiques, existantes dans des conditions physiologiques, et les artéfacts dus à la compacité du cristal, c'est-à-dire toutes les interactions causées par l'assemblage de plusieurs complexes, et qui n'existent pas en solution. La difficulté du traitement de données est alors de distinguer les interactions biologiques de ce que l'on appelle en anglais les « crystal-packing contacts ». ^{204,205} Les études computationnelles peuvent aider, mais il est préférable d'utiliser des techniques complémentaires, qu'elles soient structurales ou fonctionnelles. Si celles-ci sont basées sur des approches dynamiques, elles permettent également de confirmer la structure du complexe protéique en activité. La cristallographie aux rayons X ne permet en effet que d'observer la conformation adoptée par le couple protéine/peptide au moment de la cristallisation, qui peut ne pas représenter la conformation majoritaire du complexe. La cristallisation nécessite parfois des conditions particulières (salinité, solvant) qui peuvent impacter la configuration prise par les molécules. Ainsi, il est possible que la structure obtenue ne représente pas la conformation de moindre énergie, mais correspond toutefois à la conformation de plus faible énergie que le complexe ait pu adopter dans ces conditions. ²⁰⁶

Dans notre cas, l'utilisation de nouvelles techniques permettrait de comparer la position du CD20 par rapport au Fab. Il est en effet curieux de constater que les interactions se font toutes à la surface de la poche, alors que celle-ci, vue du dessus, paraît à première vue assez large pour que le CD20 vienne s'ancrer plus profondément (Figure 65).

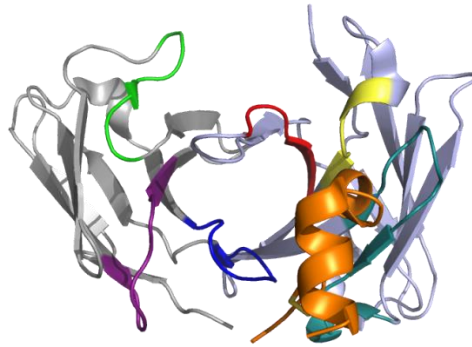


Figure 65 : Poche du fragment Fab du rituximab vue du dessus.

Les techniques que nous avons choisies pour réaliser ce travail de comparaison des séquences peptidiques et localiser au mieux des motifs de reconnaissance sont la méthode SPOT et la SPR.

II. Explorations de l'interaction Ag/Ac par la méthode SPOT

Présentée pour la première fois par Ronald Franck (Université de Brunswick, Allemagne) au début des années 90,²⁰⁷ la méthode SPOT permet d'une part de synthétiser et d'autre part de cribler des centaines de peptides sur un seul et même support. Cette technologie s'est développée dans un contexte où la recherche de nouvelles cibles, surtout en immunologie, se voulait plus intense et plus rapide. Cela s'est traduit par une volonté d'automatiser et de miniaturiser les processus de synthèse.²⁰⁸ Les systèmes biologiques aujourd'hui concernés par cette technique sont très larges, et peuvent toucher aux interactions antigène/anticorps, ligand/récepteur, ADN/protéine, voire impliquer des entités entières comme des bactéries interagissant avec des peptides antimicrobiens. Dans notre cas, la méthode SPOT a permis de localiser les fragments du paratope possédant une activité de reconnaissance pour l'antigène marqueur des cellules B.

II.1. Principe

La méthode de synthèse SPOT est basée sur les capacités absorbantes de certaines matrices planes, telles que les membranes de cellulose. Le dépôt d'un très petit volume de liquide conduit à la formation d'une tâche circulaire appelée SPOT. Si l'on fonctionnalise cette membrane avec des acides aminés solubilisés dans des solvants de faible volatilité, ces

SPOTs peuvent être utilisés comme micro-réacteurs. En fonction de la taille de la membrane et de la taille des SPOTs, le nombre de peptides synthétisés peut aller de quelques dizaines à plusieurs milliers.^{209,210} Cette synthèse se réalise aujourd'hui de manière automatique par l'intermédiaire de robots (Figure 66).

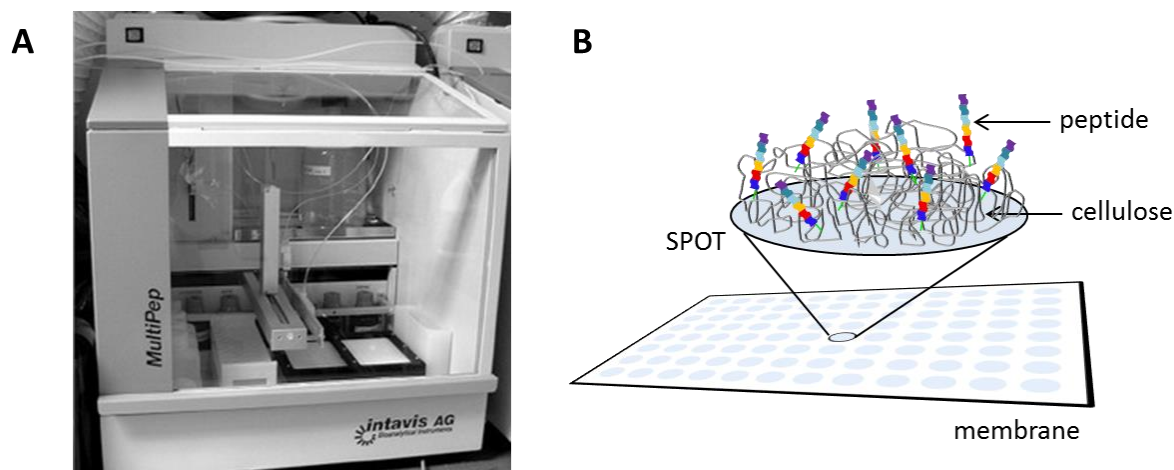


Figure 66 : La méthode de synthèse SPOT. A : synthétiseur automatique commercialisé par Intavis AG (Allemagne). Photo : Dirk Winkler²¹¹ ; B : représentation schématique d'un SPOT où les peptides sont ancrés dans la cellulose.

Pour une meilleure réactivité de la membrane qui ne possède au départ que des fonctions hydroxyles (de la cellulose), la première étape consiste en l'introduction uniforme de fonctions amines, apportées par exemple par un acide aminé ou un amino-PEG, qui vont également jouer le rôle d'espaceurs afin de rendre les peptides plus accessibles.²¹¹ Une seconde étape de fonctionnalisation va elle ne s'effectuer que par dépôt localisé dans le but de former les SPOT. Dans les protocoles de R. Franck par exemple, deux β -Alanine sont utilisées.^{207,212} Pour limiter le risque d'agrégation des peptides par la suite, le contrôle du taux de composés aminés greffés est très important. Selon leur nature, la densité varie généralement de 0,2 à 2 $\mu\text{moles.cm}^{-2}$, pouvant générer 1 à 100 nmoles de peptides par SPOT.^{208,211} Toutes les fonctions amine n'ayant pas réagi lors de la seconde étape sont ensuite bloquées par acétylation. Après la déprotection de la partie N-terminale (N-term) de l'espaceur, les peptides sont synthétisés selon la technique de synthèse peptidique sur support solide (SPPS), développée dans les années 60 par Merrifield.²¹³ Celle-ci consiste à coupler successivement des acides aminés (protégés sur leur fonction N-terminale (N-term) et sur leur chaîne latérale) à un acide aminé (fonction N-term déprotégée) sur support (Figure 67). L'élongation du peptide se fait du C-term vers le N-term, et le groupe protecteur

temporaire est généralement un carbamate (Boc ou Fmoc). Chaque couplage est ensuite suivi par la déprotection du groupe protecteur temporaire de l'acide aminé nouvellement introduit. La synthèse, réalisée selon la stratégie Fmoc/tBu,²¹⁴ suit le cycle suivant :

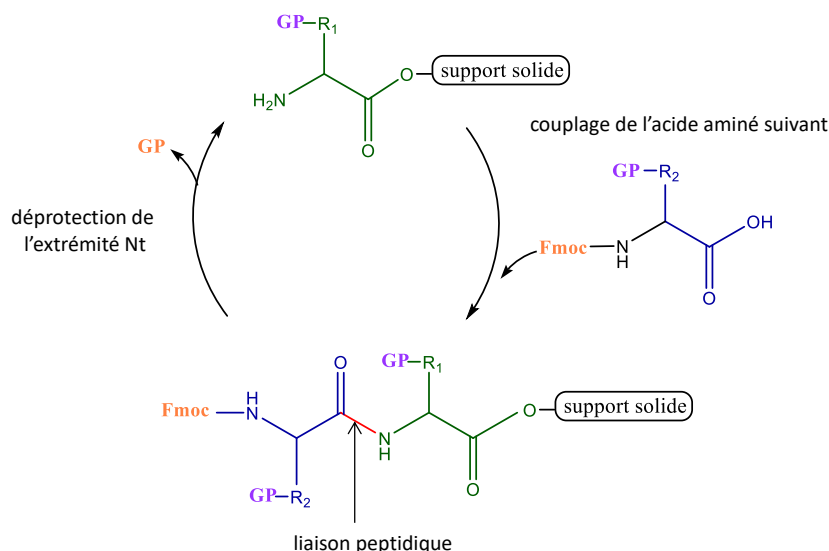


Figure 67 : Cycle d'addition/déprotection suivi lors de la synthèse sur support solide. GP = groupement protecteur.

Après l'élongation du peptide, une déprotection des chaînes latérales est réalisée, et des modifications post-synthèse peuvent être conduites sur les membranes, telles qu'une acétylation en N-term,²¹⁵ ou une cyclisation par ponts disulfure.²¹⁶

Bien que les domaines d'études s'élargissent de plus en plus, les membranes SPOT sont principalement utilisées pour le balayage de séquences épitopiques (*peptide scanning*), l'étude de l'impact de substitutions d'acides aminés dans certaines interactions protéine/protéine, ou le criblage de bibliothèques aléatoires.^{217,218,209} Pour localiser la section épitopique d'un antigène reconnu par un anticorps, la protéine antigénique est fragmentée en plusieurs peptides dont les séquences peuvent se chevaucher. Une fois la région identifiée, il est possible de faire varier la longueur du fragment afin de délimiter la séquence minimale pour laquelle l'activité de reconnaissance est conservée.²¹⁹ Aussi, la substitution d'un acide aminé par l'un des 19 autres peut dans certains cas conduire à améliorer l'affinité entre les deux partenaires.²²⁰ La substitution particulière consistant à changer séquentiellement un acide aminé par une alanine neutre permet de jauger l'importance que

présente chaque résidu substitué pour l'interaction.^{221,222} Ce procédé, qui sera rediscuté par la suite, est appelé *Alanine scanning (Ala-Scan)*.

Tout comme les tests ELISA, la révélation des membranes peut être réalisée grâce à des anticorps couplés à des enzymes qui, en présence d'un substrat chromogène, vont colorer les SPOTs pour lesquels une interaction a lieu (Figure 68). Il est également possible de recourir à l'utilisation de radioisotopes ou de fluorophores.

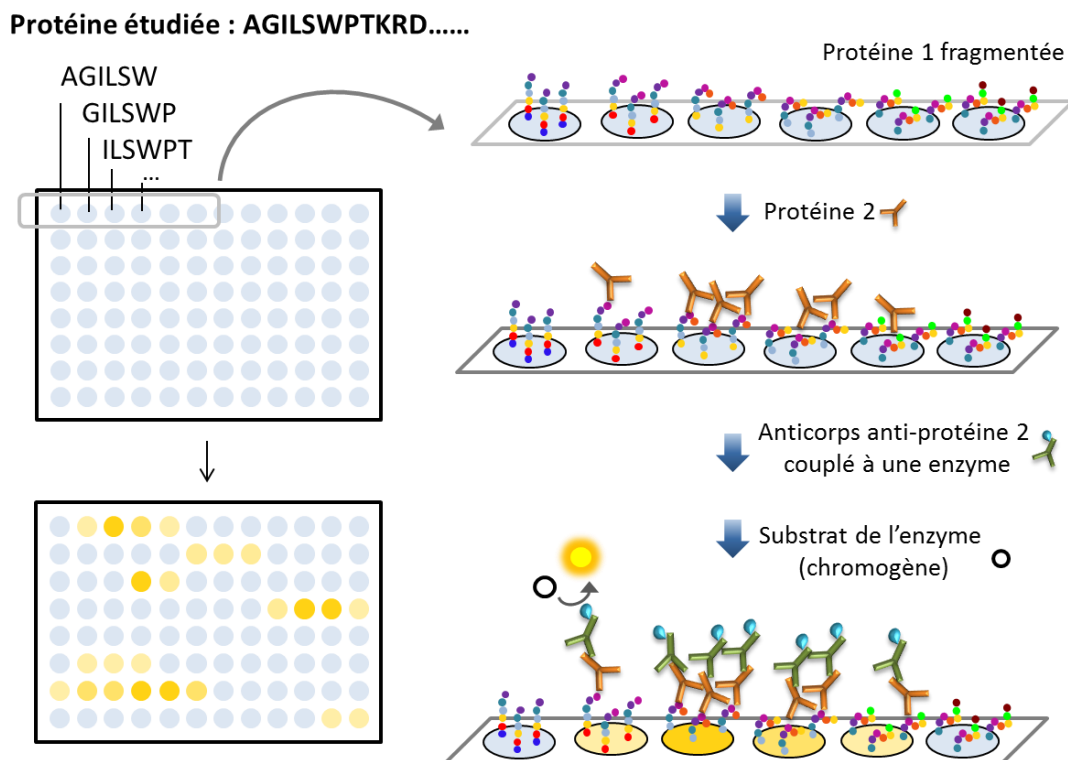


Figure 68 : Exemple de révélation d'une membrane SPOT par réaction enzymatique. La membrane comportant la protéine 1 fragmentée (ex. un épitope) est incubée avec la protéine 2 (ex. l'anticorps) qui ne se fixe qu'au niveau des SPOTs où se trouvent les fragments responsables de l'interaction protéine 1/protéine 2. La fixation d'un anticorps secondaire couplé à une enzyme va permettre de colorer ces SPOTs via la catalyse d'un substrat chromogène.

Dans le cas des études d'interactions antigène/anticorps, il est plus courant de fonctionnaliser les membranes avec l'antigène, et d'incuber celles-ci avec les anticorps en solution. Il existe toutefois des études pour lesquelles la stratégie inverse a été suivie (fragments du paratope sur la membrane), le but étant cette fois-ci de déterminer les parties du paratope réalisant les liaisons avec l'antigène.^{215,223} Dans le cadre d'un projet collaboratif, nous avons utilisé cette méthode pour déterminer les régions du rituximab interagissant avec le CD20. Forte de son expérience dans le domaine de la synthèse SPOT, l'équipe de

Franck Molina (Sys2Diag - Montpellier) a réalisé la synthèse des fragments d'anticorps sur plusieurs membranes de cellulose, qui ont par la suite été révélées dans notre équipe avant le début de ma thèse.

II.2. Résultats

Des synthèses d'hexapeptides et de dodécapeptides ont été réalisées sur plusieurs membranes de cellulose. L'ensemble des séquences consensus du paratope du Rituximab a été synthétisé par fragments hexapeptidiques dont les séquences chevauchantes étaient décalées d'un acide aminé par rapport au peptide précédent (Figure 69).

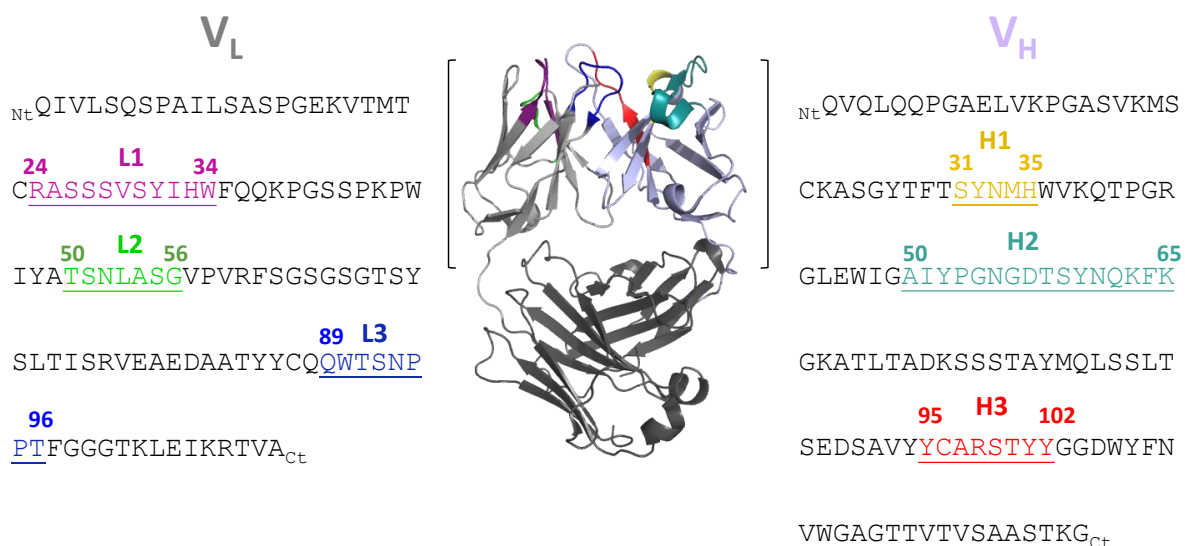


Figure 69 : Séquences V_L et V_H dont les fragments ont été criblés par la méthode SPOT. Chaque SPOT correspond à un hexapeptide contenu dans ces deux séquences.

Puisque les peptides isolés ne sont soumis à aucune contrainte structurale, leur conformation peut être très variable, ce qui engendre une hétérogénéité au sein d'un même SPOT. La cyclisation par formation de pont disulfure est un moyen de limiter le degré de liberté de ces fragments peptidiques et donc de diminuer le nombre de conformations possibles. Suite à l'augmentation de leur stabilité, des peptides cycliques ont déjà démontré des affinités ou des sélectivités supérieures à celles de leurs homologues linéaires.^{224,225} Les hexapeptides issus du paratope du rituximab ont de ce fait été parallèlement préparés de manière linéaire et cyclique. Pour les fragments cyclisés, une cystéine a été ajoutée à chaque extrémité de la séquence linéaire afin de former un pont disulfure en milieu oxydant (10%

DMSO). Pour éviter la formation de ponts annexes, toutes les cystéines des séquences à synthétiser (linéaires ou cycliques) ont été substituées par une sérine.

Les membranes chargées en peptides ont ensuite été incubées avec l'épitope du CD20 préalablement marqué par la Cyanine 5. Après rinçage, tous les fragments ayant retenu l'épitope CD20 sont directement visualisables sur les feuilles de cellulose (Figure 70).

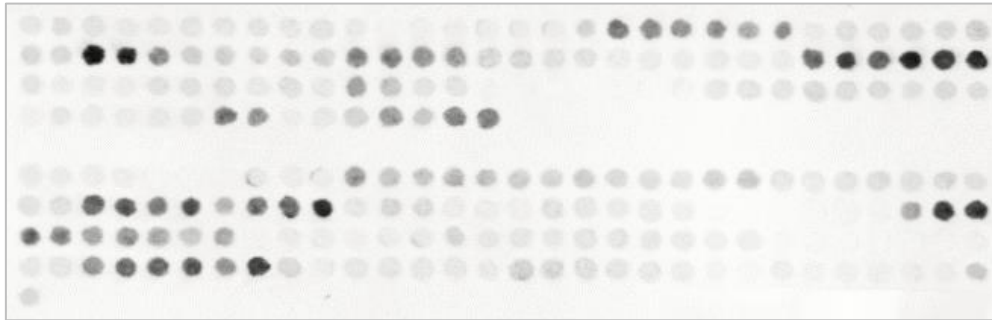


Figure 70 : Membrane SPOT révélée par fluorimétrie. La partie du haut représente les fragments peptidiques cyclisés de la chaîne V_L du rituximab en interaction avec le CD20-Cyanine 5. La partie du bas représente les fragments peptidiques cyclisés de la chaîne V_H du rituximab en interaction avec le CD20-Cyanine 5. $\lambda_{\text{excitation}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 670 \text{ nm}$.

Durant ces expériences, il a été noté quelques problèmes d'auto-fluorescence de la membrane avant même l'ajout du CD20-Cyanine 5, pouvant s'expliquer par la formation d'adduits du tryptophane. Une soustraction des signaux obtenus avant incubation avec le fluorophore a été appliquée dans le but d'ôter ces artéfacts.

Les intensités de fluorescence ont par la suite été normalisées par rapport à la valeur maximale atteinte pour chaque révélation. Que ce soit pour les dodécapeptides ou les hexapeptides, les mêmes résultats ont été obtenus. Ceux présentés ci-dessous représentent la moyenne des données issues de trois membranes distinctes ayant servi à étudier les hexapeptides (Figure 71).

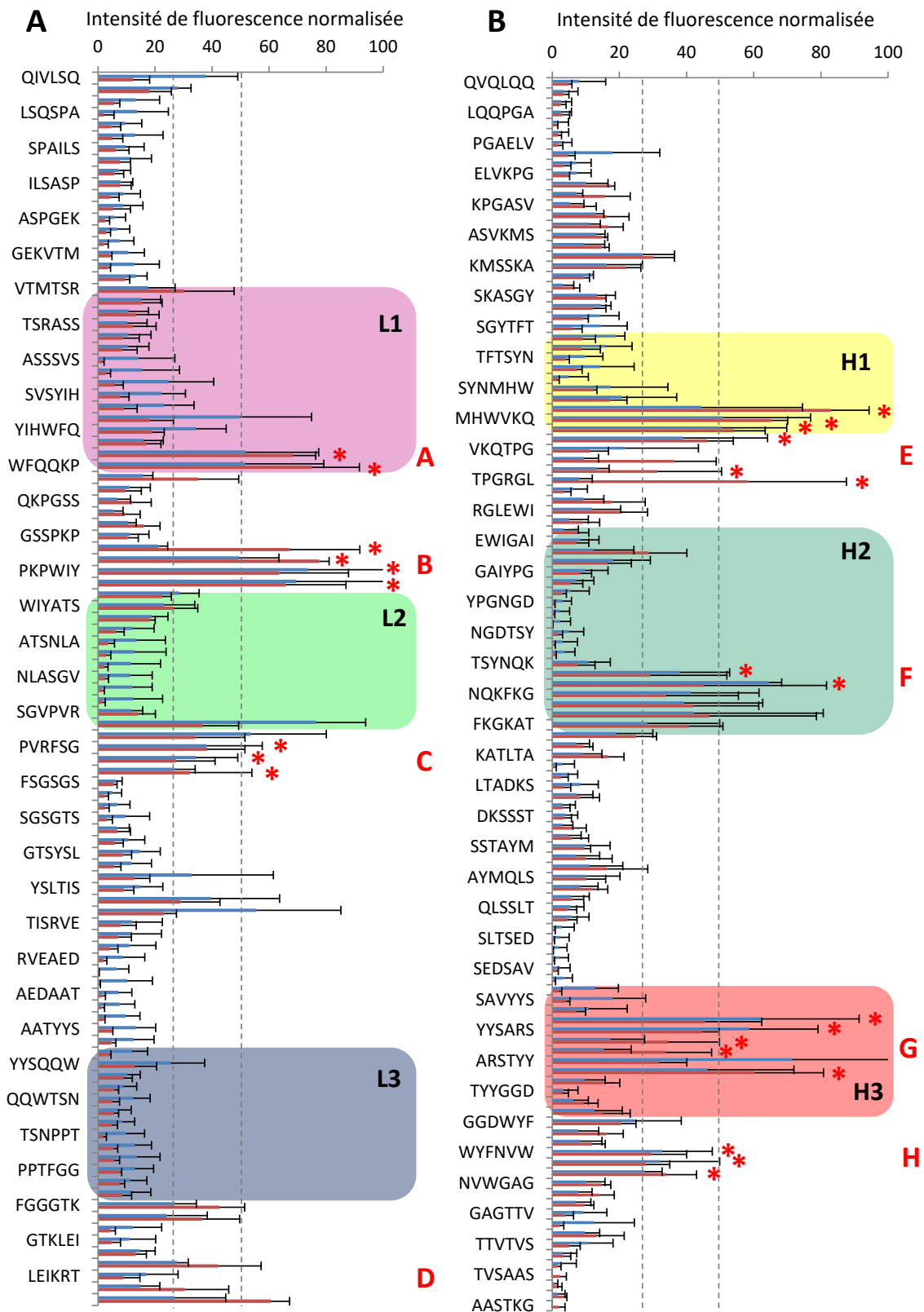


Figure 71 : Intensités de fluorescence normalisées relevées pour les SPOTs après incubation de la membrane avec l'épitope fluorescent. Les fragments peptidiques linéaires (bleu) et cycliques (rouge) de la chaîne légère (A) et de la chaîne lourde (B) sont représentés. Une séquence est notée tous les trois intervalles ; les deux intermédiaires étant déduites par décalage d'un acide aminé par intervalle. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart à la moyenne obtenue suite à trois expériences. Deux seuils à 25 et 50% de l'intensité maximale sont représentés en traits pointillés pour mettre en évidence les peptides intéressants (régions A à H), dont certains ont été étudiés par la suite (étoiles rouges).

Tout d'abord, de grosses disparités peuvent être observées entre les différents SPOTs : certains génèrent très peu de fluorescence et d'autre beaucoup, ce qui montre bien que des fragments du paratope sont plus impliqués dans la reconnaissance de l'antigène que d'autres. Ces peptides semblent de plus regroupés dans des îlots, de sorte à former des zones d'interactions de 8 à 12 résidus. En superposant les domaines des boucles CDR définis par Kabat sur les graphes (zones colorées), nous constatons que des zones d'interactions sont entièrement incluses dans les boucles hypervariables (ex. H3), alors que d'autres ne le sont pas (par exemple, la région B située entre les boucles L1 et L2). La technique SPOT permet donc ici de mieux cibler les boucles ou les parties des boucles impliquées dans l'interaction, conduisant à une analyse plus fine du domaine d'interaction.

Dans les régions où il n'existe pas ou très peu d'interactions, les signaux obtenus pour les hexapeptides linéaires et cycliques sont sensiblement de même intensité, voire légèrement supérieurs pour les linéaires. Cette différence, aussi minime soit-elle, pourrait illustrer une plus grande spécificité des peptides cycliques. Dans les zones de plus forte interaction, la cyclisation des peptides ne permet pas, en général, d'augmenter l'intensité des signaux de manière significative, bien que certaines séquences telles que ^{H40}TPGRGL⁴⁵ ne sont actives que cyclisées. Le but étant de synthétiser des composés de grande stabilité, nous nous sommes par la suite focalisés sur les peptides cycliques, et avons arbitrairement établi deux seuils d'intensité (25 et 50%) avec lesquels travailler pour déterminer les séquences potentiellement intéressantes.

Le seuil positionné à 25% d'intensité maximale (1^{er} trait pointillé, Figure 71), situé juste au-dessus du bruit de fond, permet d'éliminer les interactions non spécifiques ou de faibles affinités. Au-delà de celui-ci, huit lots de SPOTs semblent interagir avec le CD20 (régions A à H, en lettres rouges sur la figure 71). Les régions du paratope leur étant associées sont représentées en figure 72. Cinq d'entre elles sont des feuilletts β formant le contour de la poche du Fab, ce qui est très cohérent (A, B, E, G, H). Contrairement à ce qui a été vu en cristallographie aux rayons X où l'interaction ne s'exerçait que par les boucles externes et l'extrémité supérieure de ces feuilletts, il est intéressant ici de noter que l'activité de reconnaissance s'opère plus profondément dans le paratope du mAb. Les trois peptides restants semblent quant à eux assez éloignés du site d'interaction attendu. Les séquences

⁵⁶G-G⁶⁵ (C), ⁹⁷F-A¹¹⁰ (D), et ⁵⁹S-T⁶⁹ (F) se situent en effet sur les parties latérales extérieures du Fab (Figure 72B). En augmentant le seuil à 50% (2^{ème} trait pointillé, Figure 71), plusieurs SPOTs correspondant à ces régions C, D, et F disparaissent, ce qui montre que leur participation à la reconnaissance est moindre ou que ces résultats sont le fruit d'interactions aléatoires. Puisque la méthode SPOT consiste à centraliser une grande quantité de peptides dans un très faible volume, il est concevable que l'effet de concentration locale engendrée induise des faux positifs.

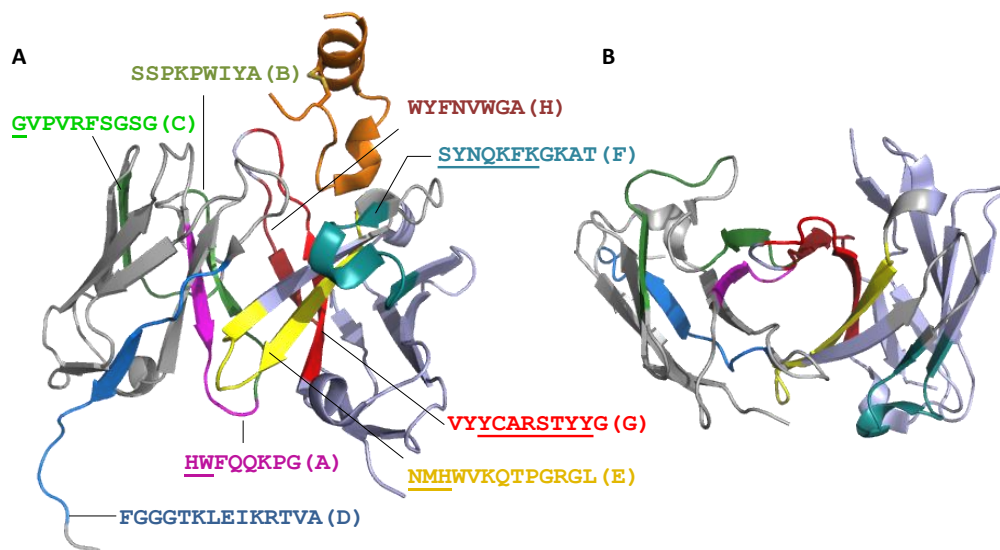


Figure 72 : Localisation des séquences peptidiques susceptibles d'interagir avec l'épitope d'après la méthode SPOT (régions A à E). A : vue de profil ; B : vue du dessus. Les acides aminés soulignés appartiennent aux CDR d'après la numérotation de Kabat.

Afin d'identifier plus finement les séquences peptidiques impliquées dans l'interaction et opérant dans ces régions, chaque acide aminé appartenant aux séquences d'intérêt a été substitué par une alanine (*Ala-Scan*). L'alanine, qui possède une chaîne latérale aliphatique, est chimiquement inerte et ne change ni la conformation, ni la flexibilité du peptide. C'est pourquoi elle est choisie en mutagenèse dans le but d'étudier l'importance de chaque résidu dans une interaction. Si la substitution induit une diminution du signal, cela signifie que le résidu ôté est actif dans l'interaction. Si aucun changement n'est observé, ce résidu n'est que spectateur. Enfin, si le signal obtenu lors de la substitution est supérieur au signal engendré pour le peptide original (nommé « *wildtype* », = *wt*), il est possible que le résidu freine d'une manière ou d'une autre l'interaction.

La séquence ⁴⁴KPWIYA⁴⁹, proche du CDR L2, et dont le SPOT a fourni l'une des plus fortes intensités de fluorescence, a par exemple été étudiée par *Ala-Scan* (Figure 73).

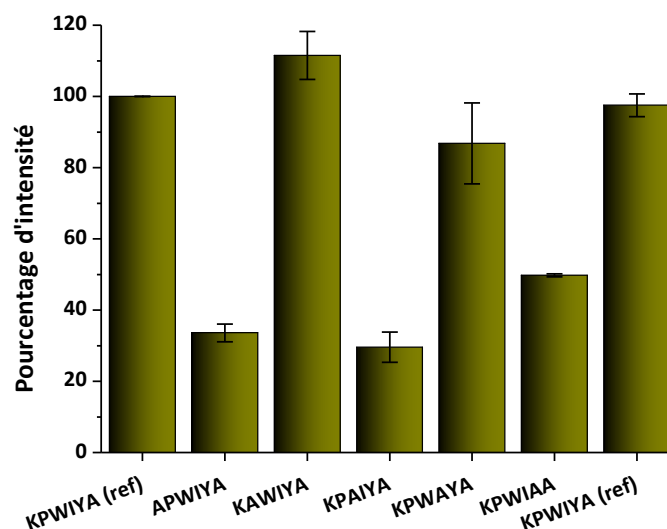


Figure 73 : *Ala-Scan* de la séquence KPWIYA. Les signaux sont normalisés par rapport à la séquence wt qui est à 100%.

La synthèse du peptide wt sur deux SPOTs permet ici de s'assurer de la bonne reproductibilité des résultats. Les intensités de fluorescence provenant de ces SPOTs sont en effet à 98 % similaires (première et dernière colonne). La substitution de la proline 45 et de l'isoleucine 47 (3^{ème} et 5^{ème} colonne) n'affectent pas la capacité de l'hexapeptide à reconnaître l'épitope CD20. Par contre, la perte de la lysine 44, du tryptophane 46, ou de la tyrosine 48 amoindrit l'affinité de 66, 70 et 50 % respectivement.

L'exploitation des résultats concernant les autres séquences peptidiques ont conduit à l'identification de l'ensemble des résidus du paratope critiques pour la reconnaissance, qui sont listés ci-dessous (Tableau 12). Ont été considérés critiques tous les acides aminés provoquant une baisse de signal d'au moins 50 %.

Boucle CDR	Région	Séquence	Acides aminés critiques
L1	A	HWFQQKP	W ³⁴ , F ³⁵ , K ³⁸
proche L2	B	SPKPWIYA	K ⁴⁴ , W ⁴⁶ , Y ⁴⁸
proche L2	C	GVPVRFSGS	R ⁶⁰ , F ⁶¹
proche L3	D	FGGGTKLEIKRTVA	non étudiés
H1	E	SYNMHWVKQTP	W ³⁶ , K ³⁸
H2	F	SYNQKFKGKA	-
H3	G	VYYCARSTYYG*	Y ⁹⁴ , Y ⁹⁵ , R ⁹⁸ , Y ¹⁰¹ , Y ¹⁰²
proche H3	H	WYFNVWGA	W ¹⁰⁶ , Y ¹⁰⁷ , F ¹⁰⁸ , W ¹¹¹

Tableau 12 : Liste des acides aminés importants pour la reconnaissance de l'épitope CD20. La perte d'un de ces résidus conduit à une baisse du signal de fluorescence d'au moins 50% (erreur comprise). La région D n'a pas été étudiée par *Ala-Scan*. Pour la région F, il semblerait que ce soit le regroupement des acides aminés qui induit l'interaction, sans qu'aucun résidu ne soit plus important qu'un autre. *La séquence a été étudiée avec une sérine à la place de la cystéine.

Au contraire des résidus listés dans le tableau, et dont l'absence engendre une diminution d'intensité de fluorescence, l'absence de certains autres en provoque l'élévation. Les acides aminés Q36, Q37 pour A, P43, P45 pour B, Q39 pour E, et N61, N62 pour F tendent donc à freiner l'interaction.

Les indications fournies par la diffraction aux rayons X et par la méthode SPOT étant divergentes, il est apparu nécessaire de recourir à une troisième technique d'étude d'interactions biomoléculaires, la SPR. Cette démarche donne également l'occasion d'observer les interactions dans un contexte où l'épitope CD20 est cette fois-ci fixé sur une surface tandis que les fragments de l'anticorps sont en solution, comme cela se ferait dans un système biologique.

III. Analyse de l'interaction Ag/Ac par SPR

III.1. Séquences analysées par SPR

La manière dont nous utilisons la SPR n'étant pas, dans le cas présent, une méthode de criblage à haut débit, seuls les 25 premiers hexapeptides cycliques, issus des séquences identifiées par la méthode SPOT ont été étudiés. Bien sûr, d'autres expériences pourraient à l'avenir être envisagées dans le but d'accroître la surface analysée. Les fragments qui ont été étudiés sont repérés par une étoile rouge sur les graphes de la figure 71, et sont listés dans le tableau 13. Les molécules, préparées par synthèse peptidique classique, possèdent d'une

part une cystéine à chaque extrémité pour la cyclisation, et d'autre part une sérine en N-term, permettant de fixer le peptide sur un châssis moléculaire (voir chapitre V). Les fragments étudiés sont donc en réalité des nonapeptides cycliques de la forme SC-XXXXXX-C.

Région	Séquence du Rituximab	Hexapeptides étudiés en SPR		
		nom	Séquence XXXXXX	Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)
A	HWFQQKP	A1	HWFQQK	1164,33
		A2	WFQQKP	1124,31
B	SSPKPWIYA	B1	SSPKPW	992,15
		B2	SPKPWI	1018,23
		B3	PKPWIY	1094,33
		B4	KPWIYA	1068,29
C	GVPVRFSGS	C1	PVRFSG	953,4
		C2	VRFSGS	943,07
		C3	RFSGSG	900,99
E	SYNMHWVKQTPGRGL	E1	NMHWVK	1105,32
		E2	MHWVKQ	1119,35
		E3	HWVKQT	1089,25
		E4	WVKQTP	1049,23
		E5	QTPGRG	906
		E6	TPGRGL	891,03
F	SYNQKFKGKA	F1	SYNQKF	1077,21
		F2	YNQKFK	1118,31
G	VYYCARSTYYG	G1	VYYSAR	1049,2
		G2	YYSARS	1037,15
		G3	YSARST	975,07
		G4	SARSTY	975,07
		G5	RSTYYG	1037,14
H	WYFNVWGA	H1	WYFNVW	1205,37
		H2	YFNVWG	1076,21
		H3	FNVWGA	984,11

Tableau 13 : Liste des 25 peptides étudiés par SPR, et issus des 8 zones d'interactions mises en évidence par SPOT (A à H). Les poids moléculaires indiqués correspondent au poids des nonapeptides cycliques SC-XXXXXX-C.

III.2. Conditions expérimentales d'analyse SPR

Les surfaces antigéniques optimisées dans le chapitre II ont été utilisées pour réaliser le criblage de ces 25 peptides. Les cinétiques d'interactions ont été analysées pour les pistes présentant l'épitope du CD20 et comparées à celle présentant le peptide de référence « CD20 scramble ».

Afin que les résultats soient de bonne qualité, il était nécessaire que tous les fragments soient étudiés dans des conditions similaires. Pour ce faire, des surfaces antigéniques caractérisées par des taux de greffage équivalents ont été utilisées. Chacune de ces surfaces a par ailleurs été employée le plus longtemps possible, afin qu'un maximum de peptides puissent interagir avec la même surface antigénique. Ainsi, seulement 2 surfaces par criblage étaient requises pour l'analyse des 25 peptides, qui a été réalisée en duplicat. Ces surfaces étaient régénérées après chaque injection par une solution d'acide chlorhydrique à pH = 2. Pour s'assurer que les surfaces conservaient leurs propriétés de reconnaissance au cours du temps, des injections de rituximab ont été effectuées toutes les 4 à 5 analyses de peptides. Un exemple de suivi de stabilité de la surface lors d'un criblage est montré en figure 74. La réponse induite par l'injection du rituximab à 1 μ M sur une surface fraîchement préparée est de 2550 RU. Après 76, puis 140 étapes de régénération, les amplitudes de signaux sont d'environ 2400 RU (94% du signal de départ), et 2265 RU (89% du signal de départ) respectivement. La perte d'activité est très faible par rapport au nombre de régénérations réalisées, confirmant le fait que la surface est bien stable au travers du temps.

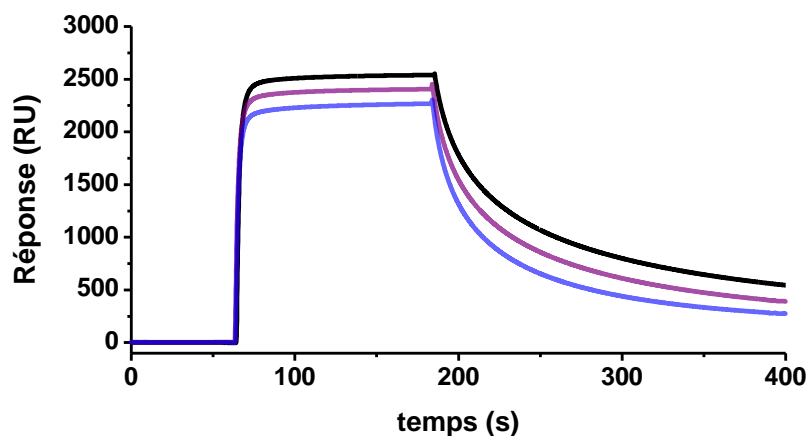


Figure 74 : Signaux SPR obtenus suite à l'injection de rituximab 1 μ M sur la même surface, à différents temps d'analyses : fraîche (noire), après 76 (violet) et 140 (bleu) étapes de régénération, consistant en une injection de Gly/HCl, pH2.

Les duplicats étant identiques, seuls les sensorgrammes du 1^{er} criblage vont être présentés ici. Les deux surfaces antigéniques utilisées pour celui-ci ont été fonctionnalisées avec 1575 et 1475 RU d'épitope CD20, ce qui équivaut à une densité surfacique de 53 et 50 pmol.cm⁻² respectivement. Les surfaces sont donc considérées comme similaires, la distance inter-ligand étant en moyenne égale à 2,0 nm. Chaque peptide, dilué dans le même tampon

ayant servi à l'étude de l'interaction CD20/rituximab (PBS 1X, citrate 3mM, P80 0.005%), a été injecté à des concentrations allant de 5 à 800 μM . Pour certains d'entre eux, les signaux engendrés sur la piste CD20 sont identiques à ceux engendrés sur la piste CD20 « scramble », et conduisent à l'obtention d'un sensorgramme plat après soustraction de la référence. Cela a par exemple été le cas pour le peptide C3, dont les sensorgrammes sont présentés en figure 75.

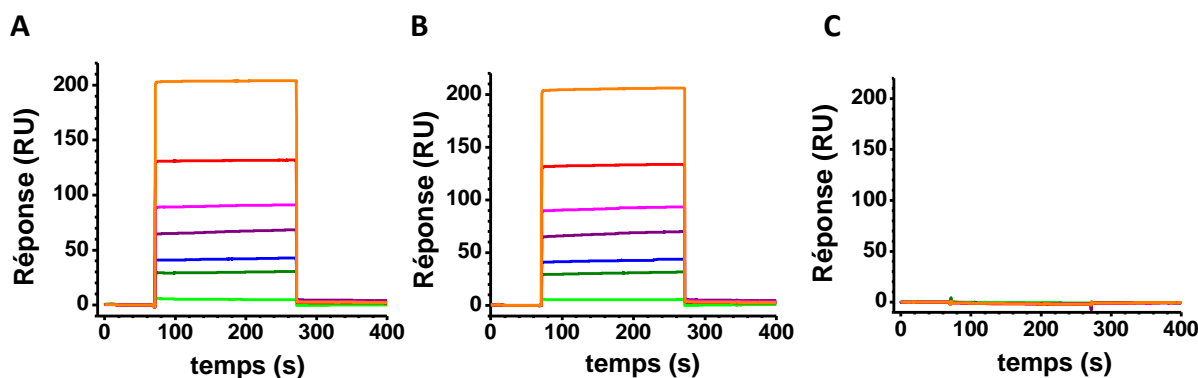


Figure 75 : Analyse cinétique de l'interaction CD20 / peptide C3 par SPR. Sur les sensorgrammes expérimentaux bruts, n'ont été représentées que les courbes correspondant aux concentrations de 25, 50, 90, 180, 300, 500, 800 μM de peptides C3. Celui-ci a été injecté sur une surface dont la densité surfacique en CD20 est de 53 pmol.cm^{-2} (obtenue par l'utilisation d'une solution de thiol- N_3 12,5% pour préparer la SAM- N_3). A : Signaux obtenus pour la piste fonctionnalisée avec le CD20 ; B : Signaux obtenus pour la piste fonctionnalisée avec le CD20 « scramble » ; C : Réponse déduite de la soustraction des signaux obtenus sur la piste « CD20 scramble » sur ceux obtenus sur la piste CD20.

L'obtention de signaux d'amplitude identique à partir de l'injection de la même solution sur les pistes fonctionnalisées avec le CD20 et le CD20 « scramble » signifie que l'analyte n'est pas spécifique d'un ligand particulier greffé sur la surface. La forme très angulaire qu'adoptent les courbes de cinétique sont par ailleurs représentatives d'une interaction non-spécifique.

Lorsque de nouveaux composés sont étudiés, une attention particulière doit être portée sur ce paramètre critique qu'est la spécificité. Ici, l'un des objectifs du criblage a donc été de repérer et d'éliminer dans un premier temps les composés non-spécifiques, dont les réponses sont similaires sur la piste de mesure fonctionnalisée par l'épitope du CD20 et sur la piste de référence fonctionnalisée par la séquence aléatoire (comme en Figure 75). Sur les 25 peptides criblés, 11 d'entre eux appartiennent à cette catégorie, 3 sont insolubles (même dans des tampons contenant 5% de DMSO v/v), et 11 montrent une réponse plus marquée pour l'épitope CD20 comparée à la réponse de la piste « CD20 scramble ».

III.3. Résultats du criblage

Les sensorgrammes résultant de la soustraction des signaux sont représentés en figure 76. Nous pouvons tout d'abord noter une très faible spécificité des régions C et F. Aucun signal n'est en effet observé pour les 3 peptides de la région C, et la très légère spécificité retrouvée pour le peptide F1 peut être considérée comme négligeable. Lors de l'étude réalisée par la méthode SPOT, il avait été montré que les signaux des régions C et F passaient en dessous du seuil des 50% d'intensité maximale. Les trop faibles affinités et spécificités de ces deux régions éloignées de la poche d'interaction font qu'elles ne sont pas assez pertinentes pour être retenues. Les trois peptides insolubles représentant la région H ont également été éliminés, car nous cherchons à développer des mimes de haute solubilité.

Quatre des feuillets β formant les contours de la poche donnent par contre des résultats particulièrement intéressants. Les régions A, B, E, et G semblent en effet être capables de discriminer l'épitope CD20 du « CD20 scramble (Figure 76). A l'exception de la région G, cette spécificité n'apparaît pas pour une séquence isolée mais évolue d'un hexapeptide à un autre avec une intensité maximale pour une séquence particulière. Ce phénomène est attendu puisque les résidus responsables de l'interaction se retrouvent dans plusieurs hexapeptides adjacents. Cela est particulièrement visualisable pour la région E, où une croissance puis une décroissance du signal sont observées au fur et à mesure de la lecture du feuillet β (Figure 76, encadré jaune). En ce qui concerne la région B, il aurait pu être intéressant d'analyser la spécificité de la séquence PWIYAT (appelée B5) en SPR, pour vérifier l'intensité des signaux. Cependant au vu des résultats de la méthode SPOT, qui indiquent que l'affinité du CD20 pour ce peptide est largement inférieure à celle pour B4, nous pouvons nous attendre à une diminution de l'amplitude des signaux et de la sélectivité.

L'analyse de la région G montre curieusement une unique, mais très forte réponse positive après soustraction, correspondant au peptide G1. L'instabilité du signal observée lors des deux criblages pour la dernière concentration (800 μ M) est causée par une augmentation linéaire du signal de SPR sur la piste CD20 scramble alors qu'un plateau est atteint sur la piste CD20. Peut-être est-ce dû à la solubilité du peptide, qui est limitée à 800 μ M.

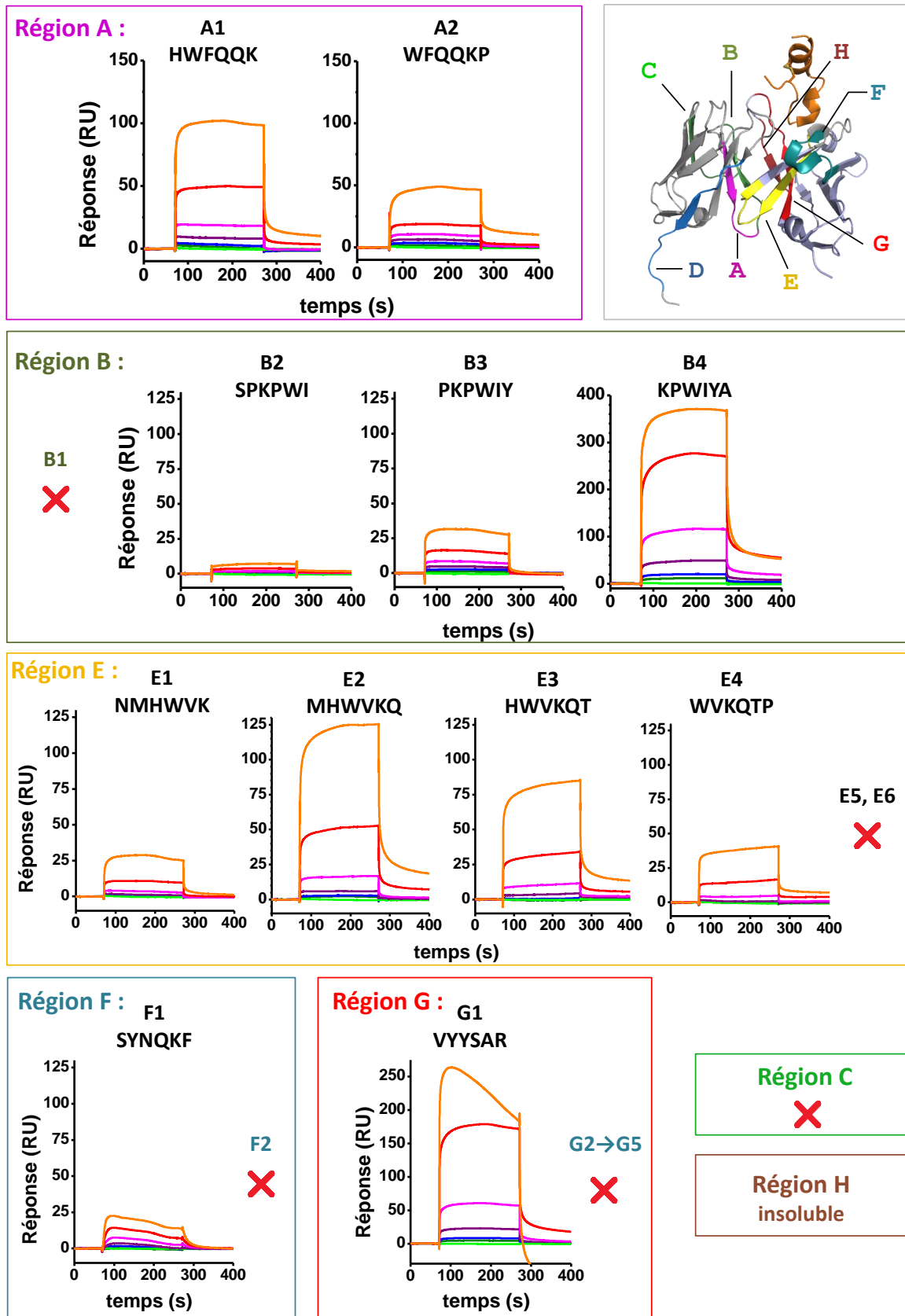


Figure 76 : Sensorgrammes caractéristiques de l'interaction CD20 / hexapeptides cycliques par SPR après double soustraction. La gamme de concentrations présentée ici est 0, 50, 90, 180, 300, 500, 800 μM . Les solutions ont été injectées sur des surfaces fonctionnalisées avec en moyenne $51.5 \text{ pmol.cm}^{-2}$ de CD20. Les croix rouges indiquent que des sensorgrammes plats ont été obtenus une fois la soustraction du signal de la piste « CD20 scramble ».

Les quatre séquences peptidiques présentant les plus fortes spécificités ont été sélectionnées pour la suite de l'étude : A1, B4, E2, et G1. Celles-ci sont réparties dans quatre feuillets β de la poche d'interaction (Figure 77 B et C).

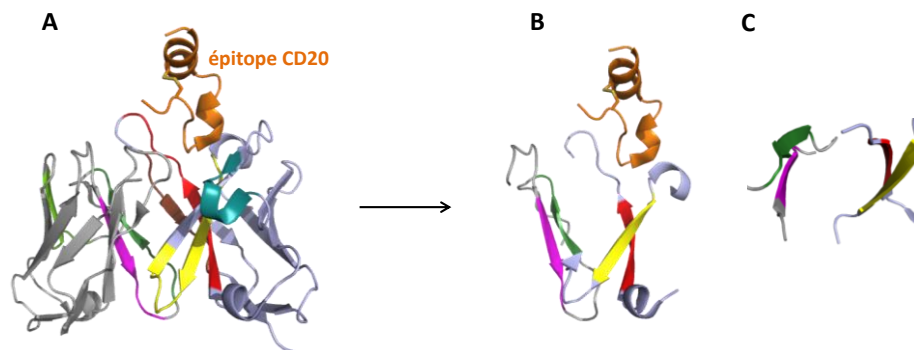


Figure 77 : Localisation des peptides criblés. A : Visualisation des 25 peptides avant criblage par SPR. B : Visualisation des 4 peptides sélectionnés après criblage par SPR. C : Visualisation des 4 peptides sélectionnés vus du dessus.

Les affinités de ces séquences sont malheureusement trop faibles pour être déterminées avec précision. Les valeurs de K_D fournies lors du traitement des analyses cinétiques (k_{off}/k_{on}) sont en effet de l'ordre de quelques millimolaires, supérieures à la gamme de concentrations injectées. Pour tout de même pouvoir comparer leurs affinités de manière qualitative, les sensorgrammes des quatre peptides ont été normalisés et superposés (Figure 78).

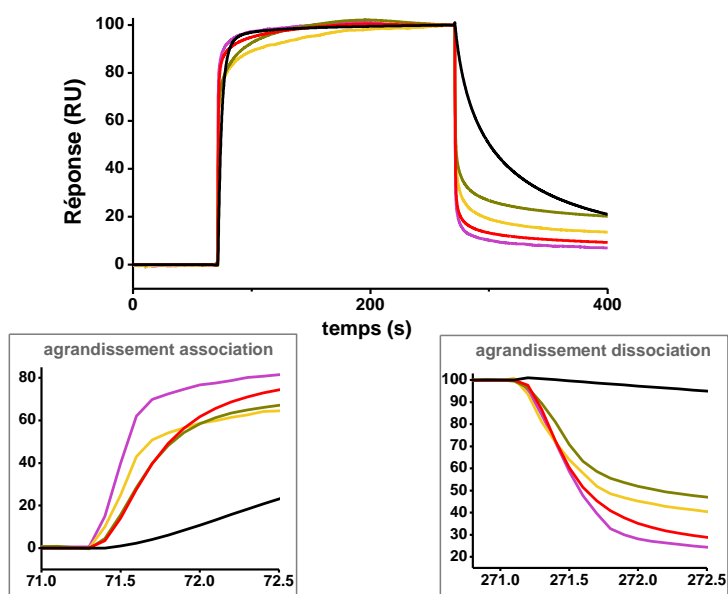


Figure 78 : Sensorgrammes caractéristiques de l'interaction CD20 / hexapeptides cycliques et CD20 / rituximab par SPR après double soustraction et normalisation à 100. Les signaux représentés correspondent à l'injection de solutions à 500 μ M des peptides A1 (mauve), B4 (kaki), E2 (jaune), G1 (rouge), et du rituximab (noir).

De manière générale, les fragments peptidiques s'associent plus rapidement au CD20 que le rituximab, ce qui est cohérent étant donné leur petite taille. Isolés, ils se dissocient également plus facilement. Le calcul des pentes à l'association et à la dissociation permettent de classer les hexapeptides cycliques en fonction de leur vitesse : $A1 > E2 > B4 = G1$ pour l'association, et $A1 > G1 > E2 > B4$ pour la dissociation. A1 est donc le peptide qui s'associe et se dissocie le plus rapidement. A l'inverse, B4, qui possède une cinétique d'association plus lente semble se dissocier plus faiblement.

III.4. Détermination des acides aminés critiques par *Ala-Scan*

Comme cela avait été fait avec la méthode SPOT, un *Ala-Scan* de ces quatre peptides a été réalisé pour connaître les acides aminés responsables de ces phénomènes. Les peptides ont été synthétisés au laboratoire selon la stratégie Fmoc/tBu. Les 23 séquences mutées ainsi que leurs peptides *wt* associés ont été séquentiellement injectés à des concentrations allant de 25 à 500 μM sur des surfaces fonctionnalisées avec 50 ± 4 $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ de CD20. Sur la figure ci-dessous, les réponses obtenues suite à l'injection des peptides dérivés de la séquence A1 ($^{33}\text{HWFQQK}^{38}$) à une concentration de 300 μM ont été superposées. Ces six composés portent le nom A1-X, où X représente le numéro du résidu substitué.

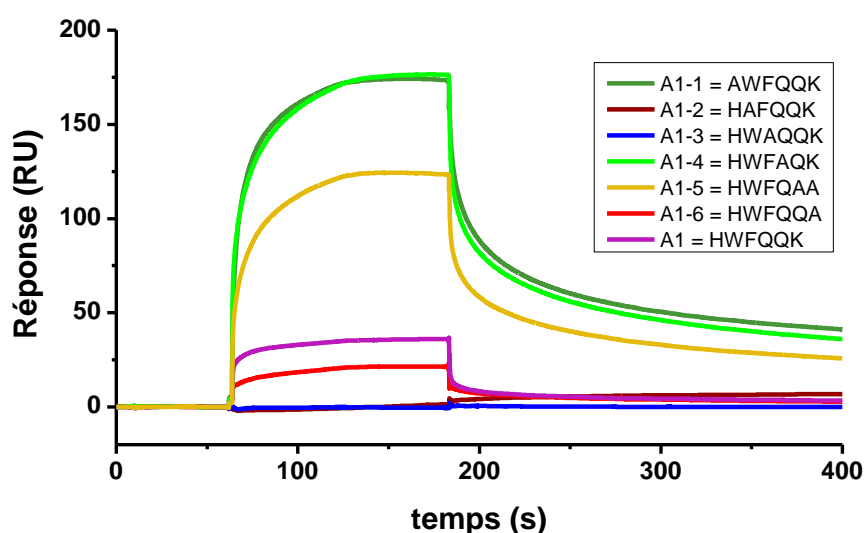


Figure 79 : *Ala-Scan* de la séquence A1 (HWFQQK) réalisé par SPR. Les signaux présentés ici sont issus de l'injection des peptides à $C = 300 \mu\text{M}$ sur une surface fonctionnalisée avec $48,5 \text{ pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$. Les peptides sont nommés A1-X où X représente le numéro du résidu substitué. L'*Ala-Scan* de la séquence A1 donne lieu à 6 composés : A1-1 (vert foncé), A1-2 (marron), A1-3 (bleu), A1-4 (vert clair), A1-5 (jaune), A1-6 (rouge).

Si l'on suppose que :

- la densité surfacique en CD20 n'est pas modifiée au cours du criblage,
- la modification d'un seul résidu ne fait pas varier l'incrément d'indice de réfraction (dn/dc) des peptides de façon significative,
- les incertitudes de mesures concernant la détermination des concentrations des peptides par spectroscopie UV sont faibles,

et sachant que les peptides ont des masses très similaires, alors nous pouvons, avec prudence, associer les amplitudes de signaux aux propriétés de reconnaissance des peptides envers le CD20.

Ici par exemple, les peptides A1-2 (HAFQQK) et A1-3 (HWAQQK) engendrent un signal à l'équilibre quasi nul, alors que celui-ci est de 35,8 RU pour la séquence originelle. Les deux substitutions qui conduisent à l'extinction de la réponse SPR suggèrent que le tryptophane 34 et la phénylalanine 35 jouent un rôle très important dans le processus de reconnaissance du CD20, et sont nécessaires pour l'interaction. La substitution de la lysine 38 avec le peptide A1-6 induit également une diminution de l'amplitude du signal, mais à moindre mesure. Puisqu'elle est en effet inférieure à la valeur seuil de 50%, nous ne qualifierons pas la lysine d'acide aminé crucial. Enfin, il est possible d'observer des élévations considérables de signaux lorsque l'histidine 33 et les glutamines 36 et 37 sont substituées par une alanine. Leur perte étant donc bénéfique à l'interaction, nous pouvons penser que ces résidus sont néfastes pour la reconnaissance de l'épitope. Les profils des sensorgrammes tendent à montrer que les peptides se dissocient beaucoup plus lentement lorsque ces acides aminés sont absents, ce qui renforce l'interaction peptide/CD20. Nous pouvons ainsi supposer un ordre d'affinité tel que $A1-1 = A1-4 > A1-5 > A1 > A1-6 > A1-2 = A1-3$.

La même procédure a été appliquée pour les trois autres fragments peptidiques. L'ensemble des résultats est reporté en figure 80. Pour chaque *Ala-Scan*, les réponses ont été normalisées par rapport aux signaux de la séquence *wt*, puis ont été directement traduites en histogrammes.

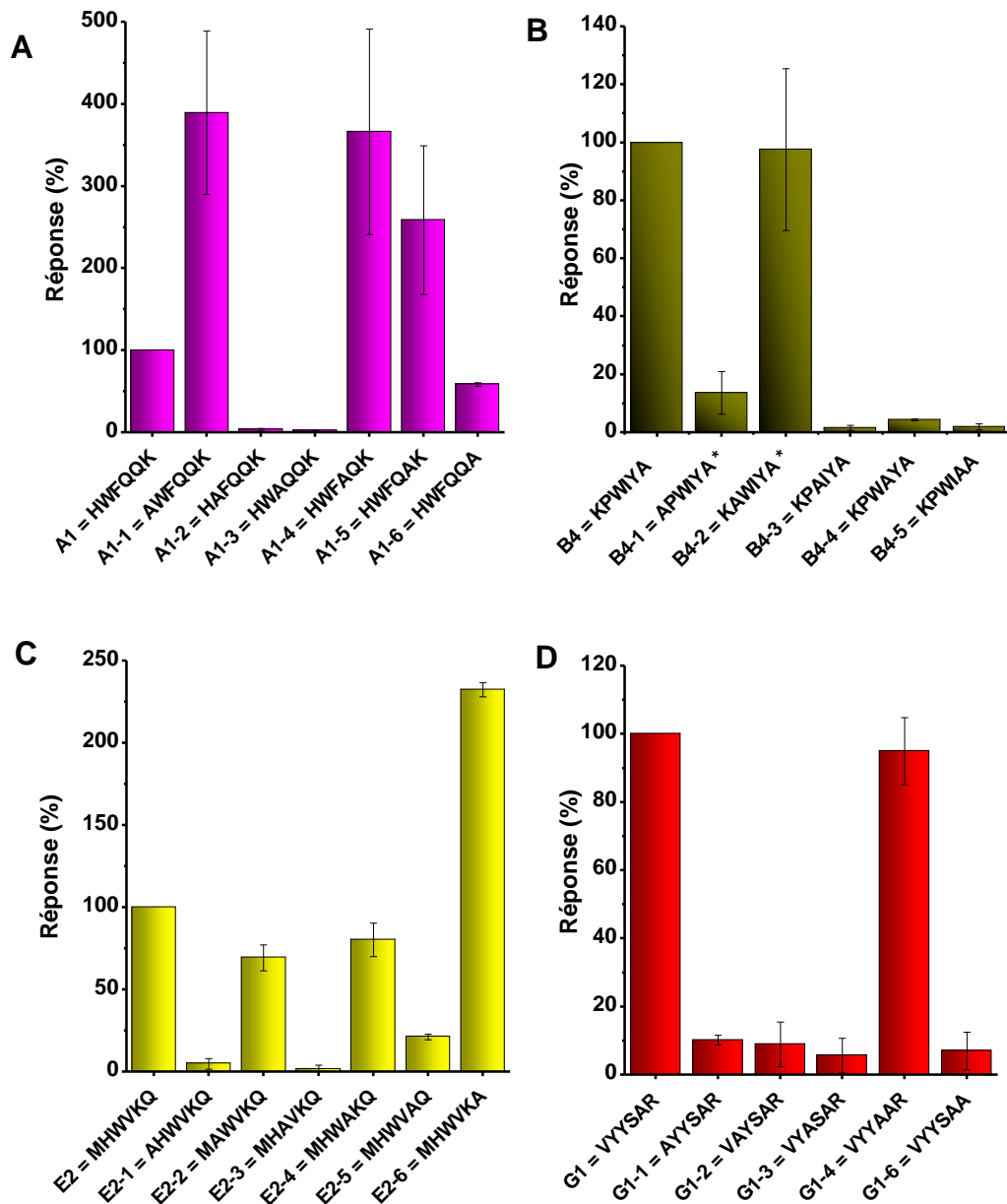


Figure 80 : *Ala-Scan* des séquences A1 (= HWFQQK - A), B4 (= KPWIYA - B), E2 (= MHVVKQ - C) et G1 (= VVYSAR - D) réalisé par SPR. Les valeurs des signaux à l'équilibre sont normalisées par rapport à la séquence wt qui est à 100%. *séquences testées dans 2% DMSO.

Il est à noter que les séquences B4-1 et B4-2 sont insolubles dans le tampon de course. L'*Ala-Scan* de la région B4 s'est donc fait en deux temps : l'étude des fragments solubles dans le tampon PBS, puis l'étude des fragments insolubles dans ce même tampon auquel du DMSO 2% (v/v) a été rajouté. La séquence wt a de ce fait été testée dans les deux cas, afin que les signaux des dérivés peptidiques soient normalisés par rapport à une référence testée dans les mêmes conditions. Le DMSO augmente en effet de 25% l'amplitude du signal de la séquence originelle.

Par ailleurs, il est bon de constater *via* l'histogramme D que la sérine (substituée dans le peptide G1-4) n'impacte en aucun cas les propriétés de reconnaissance de G1 envers l'antigène, la sérine étant en effet une cystéine dans le rituximab.

L'exploitation des histogrammes a conduit à l'identification de l'ensemble des résidus du paratope critiques pour la reconnaissance, et sont listés dans le tableau 14.

Boucle CDR	Région	Séquence	Acides aminés critiques
L1	A	HWFQQKP	W ³⁴ , F ³⁵
proche L2	B	SPKPWIYA	K ⁴⁴ , W ⁴⁶ , I ⁴⁷ , Y ⁴⁸
proche L2	C	GVPVRFSGS	-
proche L3	D	FGGGTKLEIKRTVA	non étudié
H1	E	SYNMHWVKQTP	M ³⁴ , W ³⁶ , K ³⁸
H2	F	SYNQKFKGKA	-
H3	G	VYYCARSTYYG*	V ⁹³ , Y ⁹⁴ , Y ⁹⁵ , R ⁹⁸
proche H3	H	WYFNVWGA	Problèmes d'insolubilité

Tableau 14 : Liste des acides aminés importants pour la reconnaissance de l'épitope CD20. La perte d'un de ces résidus conduit à une baisse du signal SPR d'au moins 50%. Les régions C, D et F n'ont pas été étudiées par *Ala-Scan* pour manque de reconnaissance), et la H ne l'a pas été pour cause d'insolubilité. *La séquence a été étudiée avec une sérine à la place de la cystéine.

En plus de déterminer les acides aminés essentiels à l'interaction, l'*Ala-Scan* a aussi permis de mettre en avant certains résidus dont la substitution par une alanine augmente la réponse SPR des peptides lors de leur interaction avec le CD20, et diminue visiblement la vitesse de dissociation du complexe. Ces acides aminés sont : H33, Q36, Q37 pour A1, P45 pour B4, et Q39 pour E2. Pour rappel, les affinités des séquences originelles A1, B4, E2, et G1 sont trop faibles pour que les K_D , de l'ordre de quelques millimolaires, soient évalués de manière précise. Mais si les phénomènes observés ici avec les peptides A1-1, A1-4, A1-5, B4-2, et E2-6 sont associés à une affinité plus forte, il est peut-être possible que des valeurs de K_D puissent être déterminées. Ici, des isothermes de Langmuir et des régressions non linéaires réalisées *via* le modèle *HL* ont donc été testées pour ces peptides dont les signaux sont exacerbés (Figure 81, tableau 15).

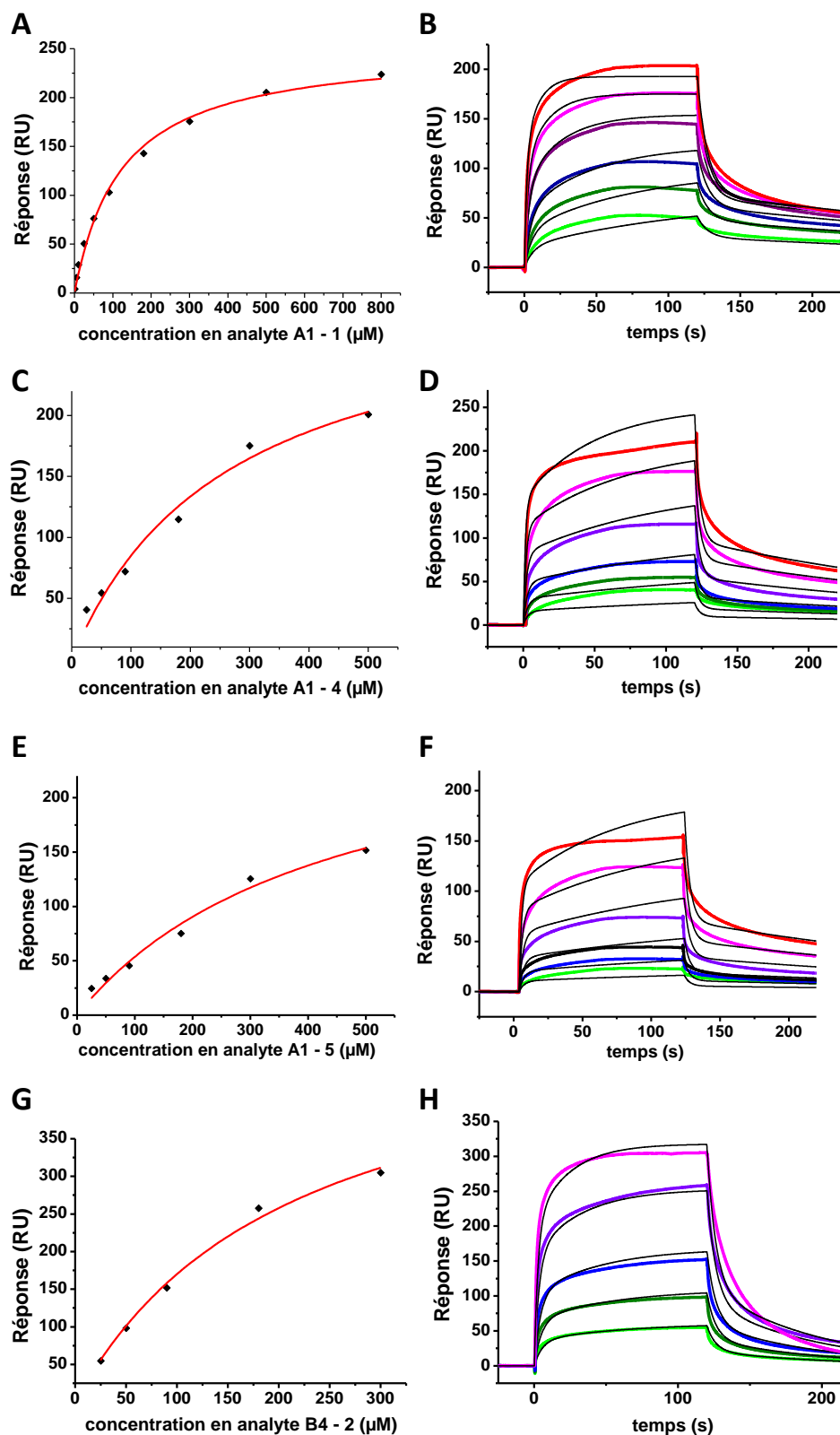


Figure 81 : Détermination par SPR du K_D des peptides A1-1, A1-4, A1-5, B4-2, et E2-6 *via* une isotherme de Langmuir (A, C, E, G), ou *via* une analyse cinétique par régression non linéaire issue du modèle *HL* (B, D, F, H), pour A1-1 (A,B), A1-4 (C,D), A1-5 (E,F), B4-2 (G,H). Les concentrations injectées sont 25, 50, 180, 300, et 500 μM (et 800 μM pour A1-1). Pour B4-2, les données concernant la concentration à 500 μM ne sont pas prises en compte, du fait d'une adsorption anormale sur la piste « CD20 scramble » au niveau du plateau. Les sensorgrammes présentés résultent d'une double soustraction.

peptide dérivé d' <i>Alascan</i>	<i>Steady state</i>		Modèle <i>HL</i>				
	K_D (μM)	R_{max} (RU)	k_{on} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	k_{off} ($\cdot 10^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	K_D (μM)	$R_{\text{max}} / (R_{\text{max}1} + R_{\text{max}2})$ (%)	Chi^2 (RU^2)
A1-1	114	245	884,8	1,4	158	67	22,1
A1-4	266	311	802,2	2,9	369	66	30,4
A1-5	436	288	566,2	2,6	464	68	18,7
B4-2	214	533,8	736,0	1,6	223	69	56,4

Tableau 15: Paramètres cinétiques et thermodynamiques déterminés à partir de l'analyse cinétique des sensorgrammes de la figure 81. La colonne « *Steady state* » résulte du tracé des isothermes de Langmuir. Pour le modèle *HL*, les paramètres cinétiques indiqués représentent l'interaction spécifique. La valeur de R_{max} associée à cette interaction est rapportée au R_{max} total (la somme des R_{max} des deux interactions).

Concernant A1-1, A1-4, A1-5 et B4-2, les affinités ($114 \leq K_D \leq 436 \mu\text{M}$) sont en effet meilleures que celles des séquences originelles (K_D estimés à quelques millimolaires), et les valeurs de K_D extraites des isothermes de Langmuir appartiennent à la gamme de concentrations explorée (de 0 à 500 ou 800 μM). Notons toutefois que quelques valeurs supplémentaires à de plus hautes concentrations auraient permis d'atteindre le plateau, et d'obtenir des données plus précises. Il est par contre plus difficile d'étudier les paramètres cinétiques et thermodynamiques *via* l'utilisation du modèle *HL*, les courbes théoriques ne se superposant pas idéalement aux courbes expérimentales. Malgré tout, les K_D évalués par les deux méthodes sont du même ordre de grandeur. Pour la séquence AWFQQK (A1-1) par exemple, l'isotherme de Langmuir fournit un K_D de 114,4 μM alors qu'à partir des données cinétiques, celui-ci est évalué à 158,2 μM (tableau 15). Bien que la qualité des régressions puisse être dans certains cas discutables, les constantes cinétiques obtenues ne semblent pas aberrantes. Pour la région A1, celles-ci sont en effet assez reproductibles d'un dérivé à un autre.

En considérant les surfaces fonctionnalisées avec en moyenne 1463 RU de CD20 (poids moléculaire = 2828 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$), les peptides, d'une masse d'environ 1100 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$, devraient engendrer une réponse maximale théorique de 570 RU. D'après le tableau, les valeurs obtenues sont un peu en dessous, mais restent cohérentes. Elles sont, de plus, assez semblables pour les trois peptides issus de la même région A1.

Malgré le fait que le dérivé E2-6 engendre des signaux d'amplitudes supérieures à celles observées pour E2, le K_D , d'environ 1 mM se situe toujours en dehors de la gamme de concentration étudiée. Pour E2-6, ainsi que pour tous les autres peptides d'*Ala-Scan*, les

tentatives de détermination des constantes de dissociation à l'équilibre, même en imposant les valeurs de R_{max} théoriques, sont restées infructueuses.

En résumé, les séquences A1-1, A1-4, A1-5, B4-2 sont les seules pour qui l'affinité peut être quantifiée. Les moyennes des valeurs de leur K_D , déterminées à partir des résultats de plusieurs isothermes de Langmuir, sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

peptide	séquence	K_D (μ M)
A1-1	AWFQQK	118 \pm 4
A1-4	HWFAQK	226 \pm 40
A1-5	HWFQAK	456 \pm 58
B4-2	KAWIYA	307 \pm 34

Tableau 16 : Constantes de dissociation à l'équilibre caractérisant l'interaction peptides / CD20, et déterminées par SPR au moyen d'isothermes de Langmuir.

Les peptides modifiés se classent dans l'ordre d'affinité suivant : A1-1 > A1-4 > B4-2 > A1-5. Grâce à la substitution d'un de leur acide aminé par une alanine, les affinités des composés ont été renforcées d'un facteur 10, et illustrent combien il a ici été intéressant de réaliser cet *Ala-Scan*. Bien sûr, ces résultats nous laissent penser que tester d'autres substitutions pourrait à l'avenir être bénéfique.

IV. Complémentarité des trois techniques

Pour ce projet, deux techniques d'étude d'interactions biomoléculaires ont été utilisées : la méthode SPOT et la SPR. La première a été réalisée sur membrane de cellulose contenant les fragments peptidiques, l'antigène CD20 étant en solution, et l'interaction a été détectée par fluorescence. La deuxième a quant à elle été réalisée sur une surface d'or présentant l'antigène CD20, les fragments peptidiques en solution, et l'interaction a été détectée *via* les changements des propriétés optiques du milieu. Bien que les modes opératoires et les conditions soient donc différents, une très bonne reproductibilité des résultats a été observée. Le tableau ci-dessous regroupe les fragments peptiques ayant montré une interaction avec le CD20 par l'une ou l'autre des techniques. Les 11 composés mis en évidence par SPR (qui ne peuvent être classés par ordre d'affinité) se situent

quasiment tous dans la première moitié des 25 composés étudiés par la méthode SPOT qui eux ont pu être classés grâce à l'amplitude de l'intensité de fluorescence.

Technique	Peptides à fort potentiel d'interaction avec le CD20
SPR	KPWIYA, VYYSAR MHWVKQ HWFQOK HWVKQT WFQOKP WVKQTP PKPWIY NMHWVK SYNQKF SPKPWI
SPOT	NMHWVK SPKPWI WFQOKP HWFQOK SSPKPW KPWIYA MHWVKQ PKPWIY TPGRGL HWVKQT WVKQTP VYYSAR YNQKFK YYSARS PVRFSG YSARST FNVWGA SARSTY RFSGSG QTPGRG WYFNWV SYNQKF YFNWVG VRFSGS RSTYYG

Tableau 17 : Comparaison des peptides les plus affins déterminés par SPR ou par la méthode SPOT. En orange, les peptides retrouvés via les deux techniques. Les composés associés à la méthode SPOT sont classés par ordre d'affinité.

La technique SPOT, beaucoup plus rapide, a permis de cartographier l'ensemble du paratope, et d'éliminer de nombreux peptides inintéressants. Les résultats ont donné l'occasion de diriger les études SPR vers les zones d'interaction de fort intérêt, et de confirmer leur importance dans la reconnaissance du CD20. De par les quelques problèmes d'auto-fluorescence ou de non spécificité parfois rencontrés avec les membranes utilisées en SPOT, la SPR a permis de réduire le nombre de peptides critiques, et de déterminer les quatre séquences les plus spécifiques pour l'antigène. Des *Ala-Scan* ont aussi été effectués pour identifier les résidus essentiels à l'interaction. Ces acides aminés peuvent être comparés à ceux déterminés par Du et al. *via* la cristallographie aux rayons X (tableau 18).

	Cristallographie aux rayons X	Méthode SPOT	SPR
Classement des CDR par capacités d'interaction	H2 > H3 > H1 > L3	Proche L2 > H3 > L1 > H1 > H2	Proche L2 > H3 > H1 > L1 > H2
Acides aminés de la chaîne lourde impliqués	N ³³ , H ³⁵ W ⁴⁷ , A ⁵⁰ -I ⁵¹ -Y ⁵² , N ⁵⁵ , D ⁵⁷ T ⁵⁸ -S ⁵⁹ S ⁹⁹ , Y ¹⁰² , W ¹⁰⁶	W ³⁶ , K ³⁸ , Y ⁹⁴ , Y ⁹⁵ , R ⁹⁸ , Y ¹⁰¹ , Y ¹⁰² , W ¹⁰⁶ , Y ¹⁰⁷ , F ¹⁰⁸ , W ¹¹¹	M ³⁴ , W ³⁶ , K ³⁸ V ⁹³ , Y ⁹⁴ , Y ⁹⁵ , R ⁹⁸
Acides aminés de la chaîne légère impliqués	W ⁹⁰ , N ⁹³ , P ⁹⁵	W ³⁴ , F ³⁵ , K ³⁸ K ⁴⁴ , W ⁴⁶ , Y ⁴⁸ , R ⁶⁰ , F ⁶¹	W ³⁴ , F ³⁵ , K ⁴⁴ , W ⁴⁶ , I ⁴⁷ , Y ⁴⁸

Tableau 18 : Acides aminés essentiels à l'interaction avec l'antigène CD20 déterminés par les techniques de cristallographie aux rayons X, la méthode SPOT, et la SPR. Les résidus trouvés conjointement par SPOT et SPR sont colorés en orange. Les résidus trouvés conjointement par SPOT et cristallographie aux rayons X sont colorés en bleu. Pour rappel, la séquence du CD20 = NIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQ.

Nous pouvons de nouveau constater de grandes similitudes entre les résultats d'*Ala-Scan* en SPR et en SPOT. La plupart des résidus considérés comme responsables de l'interaction en SPR se retrouvent en effet dans la liste constituée avec les données de la méthode SPOT. La grande majorité de ces acides aminés, colorés en orange, sont aromatiques (W, Y, F), ou à moindre mesure, chargés négativement (K, R), ce qui conduit les peptides à interagir avec le CD20 grâce à des interactions de Van der Waals ou des liaisons ioniques.

Ces constatations ne sont pas observées en diffraction aux rayons X, où les acides aminés aromatiques représentent une minorité. Parmi eux, seul le tryptophane 106 (en bleu) est retrouvé dans les résultats de la méthode SPOT. La séquence peptidique dans laquelle il est compris présente cependant une intensité de fluorescence inférieure au seuil des 50%, et n'a pas été étudiée en SPR par manque de solubilité. La divergence des données extraites par cristallographie et par les autres techniques engendre de grosses différences dans la classification des boucles CDR. Il est en effet souvent indiqué dans la littérature que la chaîne lourde est plus fréquemment impliquée dans la reconnaissance, notamment grâce à la boucle H3.^{73,74} Dans le tableau 8, la diffraction aux rayons X consistant à visualiser l'interaction CD20 / rituximab confirme cette tendance. La méthode SPOT et la SPR confirment aussi l'importance de la chaîne lourde mais démontre la participation non négligeable de la chaîne légère, qui n'était pas mise en évidence par les RX. En réalité, si l'on étend les boucles L vers l'intérieur du paratope, nous pouvons constater que les acides aminés de la chaîne légère forment les bordures de la poche d'interaction. En supposant, comme nous l'avons fait, que le CD20 a les capacités de pénétrer davantage à l'intérieur de cette poche (Figure 82), l'implication des séquences entourant L2 et L1 peuvent se justifier.

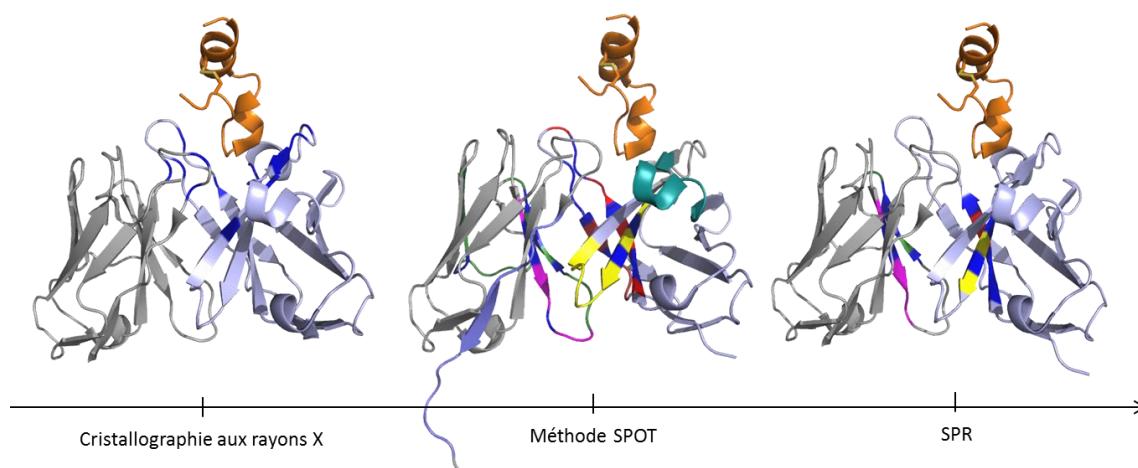


Figure 82: Cartographie des acides aminés (bleu) impliqués dans la reconnaissance de l'épitope (orange) via les trois techniques. Pour la méthode SPOT et la SPR, les acides aminés essentiels sont intégrés dans les fragments peptidiques donnant lieu à un signal de reconnaissance (couleur).

En figure 82, les acides aminés essentiels (en bleu) déterminés par diffraction aux rayons X sont inclus dans les boucles CDR extérieures, illustrant le fait que l'interaction se réalise en surface. Les images associées à la méthode SPOT et à la SPR montrent que les acides aminés essentiels se situent plus en profondeur, et forment le pourtour de la poche. Suite à cette observation, nous nous sommes demandés si la dynamique moléculaire pouvait confirmer ou infirmer la possibilité de réalisation d'une interaction plus enfouie dans le paratope.

V. Dynamique moléculaire

V.1. Principe général

La dynamique moléculaire est un outil informatique permettant d'étudier à l'échelle atomique les processus physiques associés aux systèmes (atomes ou particules) possédant un certain degré de liberté.²²⁶ Au cours du temps, ces systèmes évoluent, leur mouvement étant régi par les équations de la mécanique newtonienne.

Le but de la dynamique moléculaire est de simuler l'évolution des positions que prennent des atomes en interaction dans un intervalle de temps donné. Pour cela, le système est placé dans une boîte d'eau, servant à délimiter le volume dans lequel celui-ci

peut évoluer. L'intervalle de temps d'étude est divisé en plusieurs pas de temps. Pour chacun d'eux, les positions des atomes sont mises à jour, et les énergies du système sont recalculées. Les surfaces d'énergie potentielle (SEP) ainsi sondées sont composées de puits pour lesquels les configurations atomiques sont stables, ainsi que de barrières énergétiques qu'il faut réussir à franchir afin d'explorer d'autres puits, et de ce fait, d'autres configurations spatiales (Figure 83). Le franchissement de ces barrières n'est malheureusement pas simple dans une période de simulation raisonnable. Lorsqu'un complexe moléculaire se retrouve suffisamment stabilisé dans un puits d'énergie, il est difficile d'explorer d'autres configurations, qui, même si elles sont très différentes, pourraient être caractérisées par des énergies potentielles tout aussi faibles.

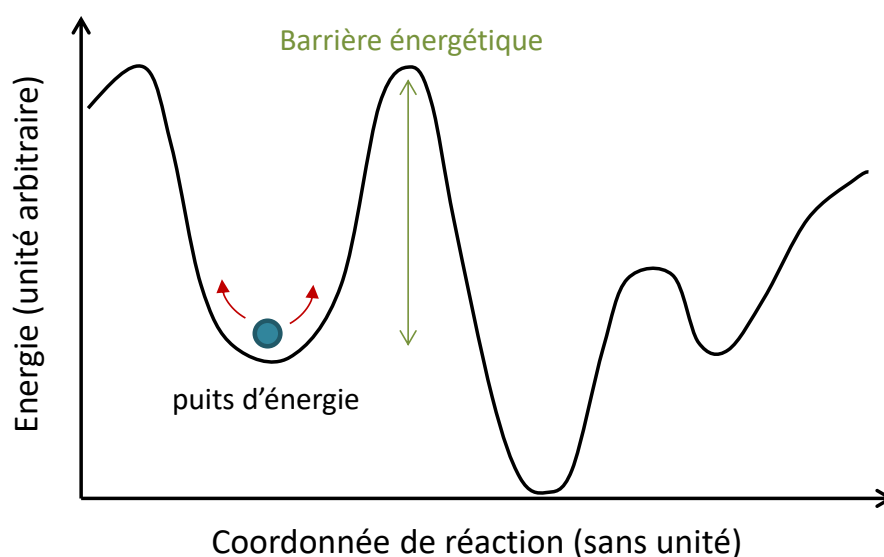


Figure 83 : Schématisation de la surface d'énergie potentielle.

Un des moyens permettant de franchir les barrières énergétiques est de chauffer le système lors de la simulation, et de réaliser un recuit simulé. Le recuit simulé est un algorithme itératif consistant à refroidir et réchauffer de manière très contrôlée le système afin que les atomes finissent par adopter les positions les plus stables. Malgré le fait que cette méthode non biaisée fonctionne généralement bien, elle ne permet pas de diriger l'exploration de la surface vers des conformations précises. D'autres approches peuvent alors être mises en place. Parmi elles, il existe des méthodes biaisées telles que la métadynamique, qui consiste à perturber le système par l'ajout d'une force extérieure directionnelle, forçant le complexe à se déplacer vers d'autres puits.

V.2. Application à l'interaction CD20 / rituximab

Le fichier PDB (2OSL) du complexe CD20 / Fab a été analysé par le logiciel de dynamique moléculaire Amber, afin d'étudier les différentes conformations adoptées par les deux partenaires en interaction. Une simple dynamique moléculaire a tout d'abord été réalisée sur une période de 10 ns divisées en 500 pas. Pour chaque cycle, le calcul itératif des positions permet de suivre l'évolution des énergies dans un puits. Cette expérience a démontré que l'épitope et le Fab bougent légèrement autour de leur position initiale, sans pour autant subir de grosses variations conformationnelles. Un recuit simulé a abouti à la même conformation. La structure du complexe obtenue en cristallographie reflète donc bien une configuration stable au cours du temps. Le CD20 ne semble pas, à l'intérieur de ce puits d'énergie, pouvoir pénétrer dans la poche d'interaction. Cela ne veut toutefois pas dire que l'hypothèse est fautive, mais qu'elle ne peut être confirmée par simple dynamique sur la structure RX initiale.

Une alternative serait alors de mettre en place une métadynamique dirigée.²²⁷ Ceci dit, cette approche étant relativement compliquée à mettre en œuvre, le CD20 a dans un premier temps été placé manuellement dans la poche et des dynamiques ont été réalisées afin d'étudier la stabilité de ces nouvelles conformations. En pratique, le fichier PDB du complexe a été scindé en deux parties de sorte à séparer les coordonnées des atomes du CD20 de celles des atomes du Fab. Ainsi, les coordonnées relatives au CD20 ont pu être translatées de manière à ce que l'épitope soit introduit dans la poche de reconnaissance (Figure 84).

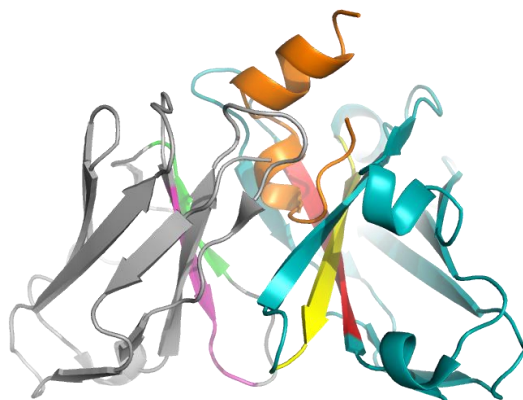


Figure 84 : Introduction du CD20 dans la poche d'interaction par modification manuelle des coordonnées des atomes de l'épitope.

Des dynamiques ont été réalisées sur la base de ces nouvelles coordonnées, le premier objectif étant d'évaluer s'il existe des « *clash* stériques » lorsque le complexe se situe dans cette configuration. En d'autres termes, cette simulation permet de voir si le CD20 est capable de rester dans la poche, où s'il en est directement éjecté. D'après les résultats, non seulement la taille de la poche est assez large pour accueillir le CD20, mais l'épitope est également stabilisé dans cet environnement, et reste spontanément dans l'excavation du Fab. Un problème est tout de même observé. Ne connaissant pas l'orientation que pourrait prendre le CD20 dans la poche, deux fichiers de coordonnées ont été créés, l'épitope étant placé dans deux directions opposées. Dans tous les cas, aucune gêne stérique n'est constatée, illustrant ici un manque de spécificité. Des traitements de données sont en cours afin de trouver l'orientation optimale du CD20. Pour cela, chaque image relevée lors de la dynamique est étudiée dans le but de recenser les liaisons qu'entretiennent les deux partenaires, ainsi que les acides aminés impliqués. L'objectif sera alors de trouver la configuration pour laquelle les acides aminés révélés par la méthode SPOT et la SPR soient aussi en interaction lors des dynamiques moléculaires. Une évaluation de l'énergie d'interaction notamment par des approches de type MM/PBSA²²⁸ pourra alors aussi être envisagée et comparée à la structure initiale RX.

Par ailleurs, même si l'antigène est capable de se stabiliser à l'intérieur de la poche du Fab, cela ne signifie pas qu'il s'y introduit spontanément. Des expériences de métadynamique devraient donc être réalisées.

VI. Conclusion

Dans ce chapitre, différentes méthodes ont été comparées dans le but de localiser au mieux le site d'interaction du rituximab. Les données extraites d'analyses par diffraction aux rayons X et par la méthode SPOT ont été étudiées, et ont permis de révéler certaines discordances au sujet du positionnement du CD20 en interaction avec l'anticorps. Tandis que les informations structurales issues de la diffraction aux rayons X démontrent une interaction tout en surface du Fab et impliquent les acides aminés des boucles CDR, les résultats de la méthode SPOT, eux, indiquent que la fonctionnalité de reconnaissance est davantage réalisée par les feuillets β situés à l'intérieur de la poche du rituximab.

Un criblage par SPR a donc été mené afin d'obtenir de plus amples informations sur l'interaction antigène / anticorps, et de départager les conclusions tirées des deux précédentes techniques. Tout comme en méthode SPOT, l'interaction opère plus en profondeur dans la cavité du rituximab. En donnant la possibilité de prendre davantage en compte la spécificité de l'interaction, la SPR a également permis de diminuer au minimum la taille des zones de reconnaissance. Pour les quatre peptides présentant les meilleures affinités et spécificités, un *Ala-Scan* a été effectué, révélant ainsi les résidus les plus impliqués dans l'interaction (Figure 85).

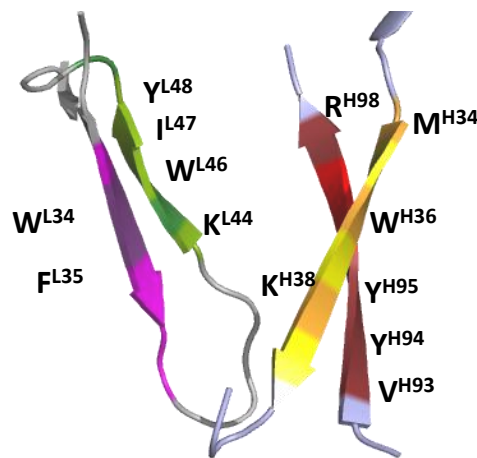


Figure 85 : Poche d'interaction illustrée ici par les quatre peptides les plus affins et spécifiques. Les acides aminés responsables de l'interaction y sont localisés.

La substitution de certains résidus par une alanine durant l'*Ala-Scan* a eu pour avantage de diminuer d'un facteur au moins égal à 10 les valeurs de K_D de quatre peptides, dont l'affinité a de ce fait pu être quantifiée. Ces peptides, caractérisés par des K_D de l'ordre de quelques centaines de micromolaires lorsqu'ils sont isolés, sont donc très intéressants pour la suite du projet. Nous pouvons en effet supposer qu'en rassemblant sur un châssis moléculaire plusieurs copies du même peptide ou plusieurs peptides de nature différente, l'affinité globale du complexe sera exacerbée.

Chapitre V

Conception de mimes du Rituximab

Le développement de composés synthétiques mimant les sites actifs d'anticorps requiert la sélection de fragments peptidiques contenus dans le paratope. Dans le chapitre IV, nous avons constaté que l'antigène CD20 interagit principalement avec 13 résidus d'acides aminés répartis dans quatre feuilletts β constituant le site d'interaction du rituximab. Néanmoins, les interactions entre l'antigène et les quatre séquences peptidiques sont caractérisées par de faibles affinités (les valeurs de K_D sembleraient de l'ordre du millimolaire). De plus, l'*Ala-Scan* nous a permis de découvrir quatre dérivés dont l'affinité est au minimum augmentée d'un facteur 10. Les valeurs des K_D restent toutefois trop élevées pour que les composés aient une activité *in vivo*. Des moyens doivent être donc mis en place afin d'améliorer leur affinité.

I. La multivalence

De nombreux processus biologiques sont gouvernés par des interactions multivalentes permettant d'accroître la reconnaissance de deux partenaires aux affinités faibles, tels que les couples carbohydrates / protéines.²²⁹ La multivalence des carbohydrates est en effet utilisée par la nature pour augmenter l'affinité et la sélectivité de leur interaction avec les protéines. Différents mécanismes tels que l'effet chélate ou la réassociation statistique peuvent expliquer ce gain d'affinité. Dans l'effet chélate par exemple, le ligand multivalent peut se fixer par plusieurs sites de liaison à un récepteur oligomérique. La dissociation est alors rendue plus difficile, ce qui renforce l'affinité entre les deux partenaires par un phénomène appelé avidité (Figure 86A). Pour des biomolécules multivalentes capables de n'interagir qu'avec une seule cible, le mécanisme de réassociation statistique, déjà discuté dans le chapitre III, participe activement à l'augmentation de l'interaction.²²⁹⁻²³¹ Si un système possède plusieurs sites de liaison proches les uns des autres, il peut, après qu'une de ses sous-unités se soit dissociée de sa cible, s'y réassocier par l'intermédiaire d'une sous-unité voisine (Figure 86B).

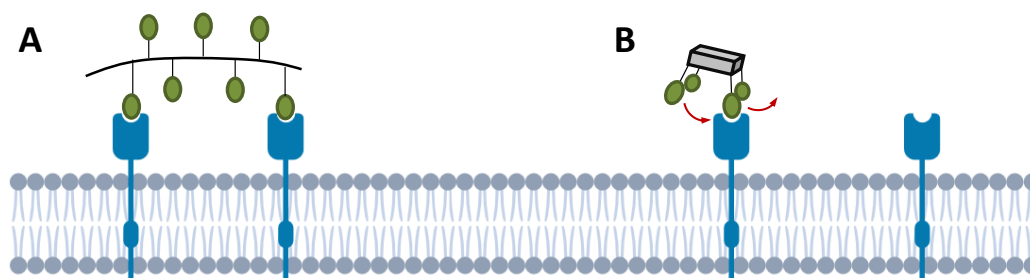


Figure 86 : Exemples de mécanismes mis en jeu lors d'interactions multivalentes. A : mécanisme de chélation créant un effet d'avidité. B : mécanisme de réassociation statistique.

En chimie de synthèse, des architectures multivalentes sont développées afin de reproduire ces phénomènes. Elles sont composées de châssis moléculaires portant plusieurs copies d'un même ligand. De nombreux châssis sont aujourd'hui utilisés : dendrimères, liposomes, polymères, albumine, cyclodextrines, calixarènes, ou encore peptides cycliques (Figure 87).²³¹⁻²³³

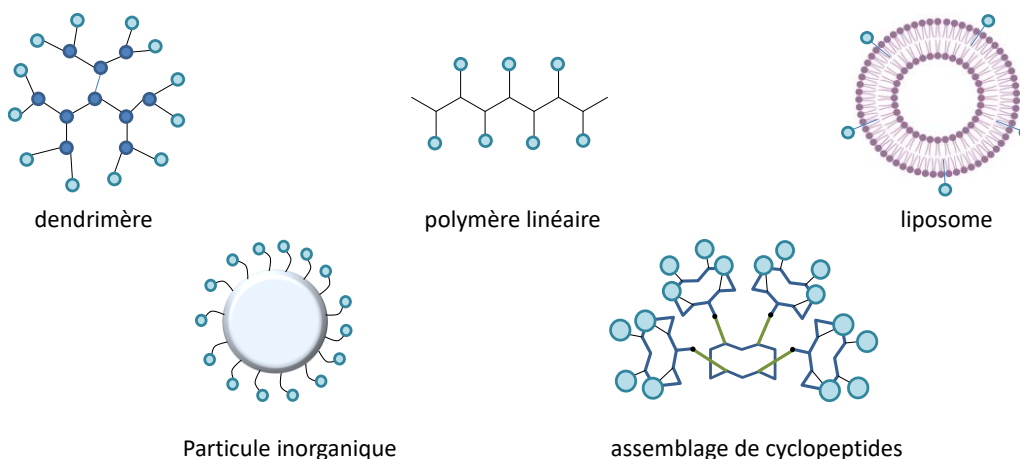


Figure 87 : exemples d'architectures multivalentes utilisées pour augmenter l'affinité

Au laboratoire, l'effet de multivalence a déjà été étudié, notamment avec un pentapeptide cyclique contenant la séquence -RGD- qui cible l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ surexprimée à la surface des cellules des vaisseaux néo-angiogéniques. Des études réalisées en spectroscopie de corrélation de fluorescence ont montré que l'agencement de quatre cyclo-RGD portés par un châssis cyclodécapeptidique améliore l'affinité d'un facteur 10 (4 nM vs 40 nM pour le cyclo-RGD monovalent).²³⁴ Ce cyclodécapeptide est un châssis moléculaire développé par Manfred Mutter sous le nom de TASP (Template Assembled Synthetic

Protein). Il est caractérisé par une structure très stable^{235,236} car ses deux coudes β -Gly-Pro- lui confère une conformation en feuillets β antiparallèle (Figure 88).

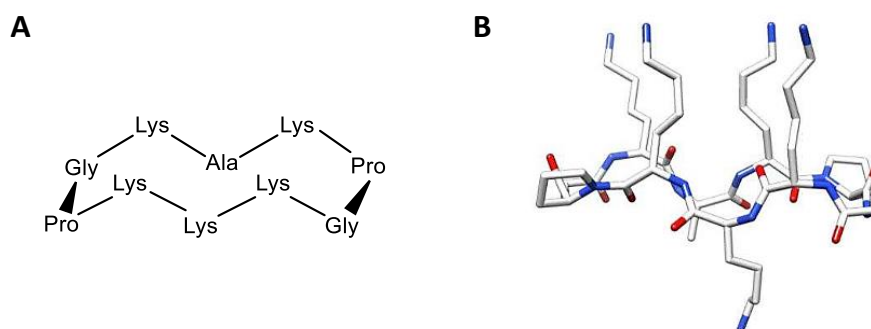


Figure 88 : Structure du châssis cyclodécapeptidique. A : en schématisation. B : en modélisation. R = groupement protecteur.

Le greffage de ligands est réalisable grâce à des fonctions amines de résidus de lysine introduits dans le châssis. Celles-ci étant protégées par des groupements protecteurs orthogonaux, il est possible de contrôler le nombre, ainsi que la position des composés à greffer d'où son acronyme RAFT (Regioselectively Addressable Functionalized Template).²³⁷ Enfin, ce support a l'avantage de présenter deux faces distinctes fonctionnalisables : une supérieure pour une activité de ciblage, et une inférieure pour une activité thérapeutique ou d'imagerie (si un agent cytotoxique ou un fluorophore sont greffés).

II. Présentation des mimes du rituximab

Grâce à la détermination des acides aminés critiques et à la mise en évidence de séquences optimisées, la synthèse de molécules multimériques mimant l'activité de reconnaissance du rituximab a pu débuter. Deux stratégies ont été testées pour ces expériences préliminaires : la synthèse de peptides linéaires construits sur l'enchaînement de séquences d'hexapeptides d'intérêt, et le développement de systèmes macromoléculaires où les séquences d'intérêt sont agencées sur un châssis moléculaire.

II.1. Les peptides linéaires

La figure 85 (p 156), réalisée à partir de la structure cristallographique du paratope du rituximab, démontre que les séquences A1 et B4 sont naturellement reliées au niveau du bas de la poche. La synthèse du fragment peptidique débutant en amont de la région A et se terminant en aval de la région B a donc été effectuée. Ce motif très simple, nommé lin-A1.B4, permettrait d'évaluer si les deux peptides sont capables d'agir en synergie afin d'augmenter leur affinité globale pour le CD20 (Figure 89). Par ailleurs, les séquences A1 et B4 sont justement celles dont les substitutions de certains acides aminés en alanine ont généré des peptides de plus haute affinité. Le fragment peptidique contenant les dérivés A1-1 (le plus affin des dérivés de la région A1 ; $K_D = 118 \mu\text{M}$) et B4-2 ($K_D = 307 \mu\text{M}$) constitue le deuxième mime linéaire appelé lin-A11.B42. Dans l'hypothèse de cycliser à l'avenir ce peptide, le coude -PGSSP- a été ajoutée à l'extrémité C-term (figure 89).

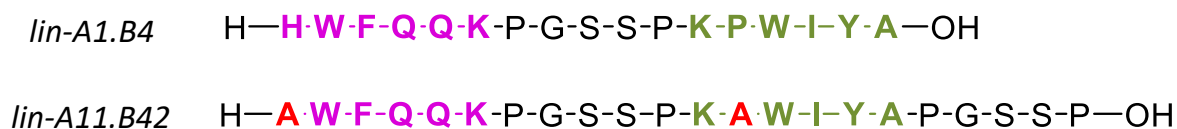


Figure 89 : Schéma des deux mimes linéaires : lin-A1.B4 et lin-A11.B42.

II.2. Le système macromoléculaire

Suite au criblage des séquences natives, le peptide B4 s'avérait présenter les signaux de plus forte amplitude, une bonne spécificité, et visiblement la vitesse de dissociation la plus faible. Ce peptide a donc été utilisé pour la création d'un système macromoléculaire. De par ses atouts, le RAFT a été choisi comme support de multimérisation. Dans le but d'évaluer la faisabilité du greffage de cyclooctapeptides sur ce RAFT, l'agencement de quatre peptides B4 a été suivi au cours du temps. La macromolécule qui en résulte a été nommée RAFT(c-B4)₄ (Figure 90).

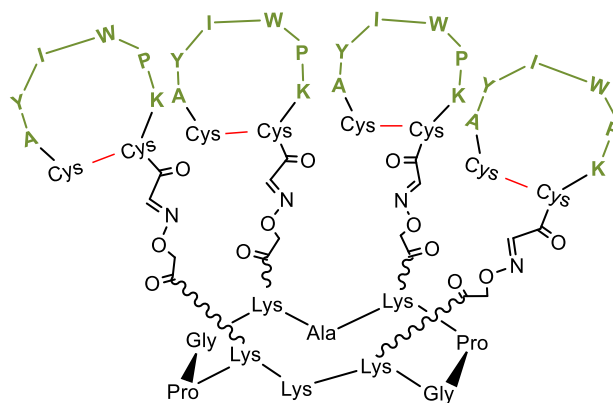


Figure 90 : Schéma du mème RAFT(c-B4)₄ supportant la séquence native B4.

III. Résultats

III.1. Les peptides linéaires

III.1.a. Synthèses

Les peptides lin-A1.B4 et lin-A11.B42 ont été synthétisés sur des billes de résine de chlorure de 2-Chlorotrityle selon la technique de SPPS, et suivant la stratégie Fmoc/tBu. Après décrochage de la résine, les composés ont été purifiés par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Leur masse ainsi que leur taux de pureté ont enfin été vérifiés *via* l'utilisation d'un chromatographe en phase liquide à ultra performance couplé à un spectromètre de masse (UPLC-MS). Cet instrument, utilisé en routine au laboratoire, permet de suivre l'avancement des réactions.

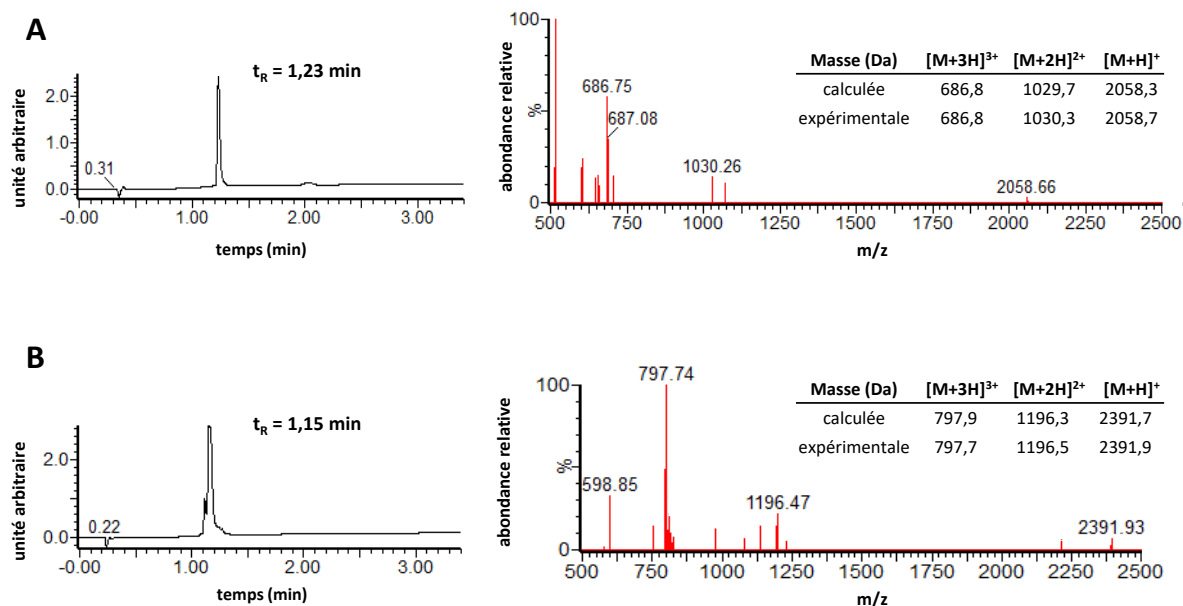


Figure 91 : Evaluation par UPLC-MS de la pureté des échantillons lin-A1.B4 (A) et lin-A11.B42 (B). A gauche : chromatogrammes obtenus pour une analyse de 3,5 min exécutée dans H₂O, 0,1% TFA avec un gradient d'acétonitrile allant de 5 à 100% sur un temps de 2,3 min. t_R = temps de rétention des peptides. A droite : Spectre de masse (source ESI).

La figure 91 démontre que les deux mimes linéaires ont un taux de pureté satisfaisant, et que les masses moléculaires expérimentales correspondent aux masses calculées. Pour préparer les expérimentations de SPR, un dosage des peptides a en dernier lieu été réalisé par spectroscopie UV-visible. Le coefficient d'extinction molaire ϵ d'un peptide est estimé à 280 nm à partir de la somme des coefficients des résidus tryptophane, tyrosine, et des ponts disulfure pouvant être présents (Eq 25) :

$$\epsilon = n_W \cdot \epsilon_W + n_Y \cdot \epsilon_Y + n_C \cdot \epsilon_C \quad (25)$$

avec n_W , n_Y , et n_C le nombre de tryptophane, de tyrosine ou de ponts disulfure dans la séquence. Leur coefficient d'extinction molaire associés sont $\epsilon_W = 5500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_Y = 1490 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_C = 125 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

III.1.b. Analyses SPR

Les mimes lin-A1.B4 et lin-A11.B42 ont été étudiés sur des surfaces fonctionnalisées comportant $56 \pm 1 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2}$ d'épitope CD20 (Figure 92 A et B). Pour comparaison, la séquence B4 a été injectée en parallèle (Figure 92C). Les isothermes de Langmuir construites à partir des réponses obtenues pour chaque concentration sont représentées ci-dessous.

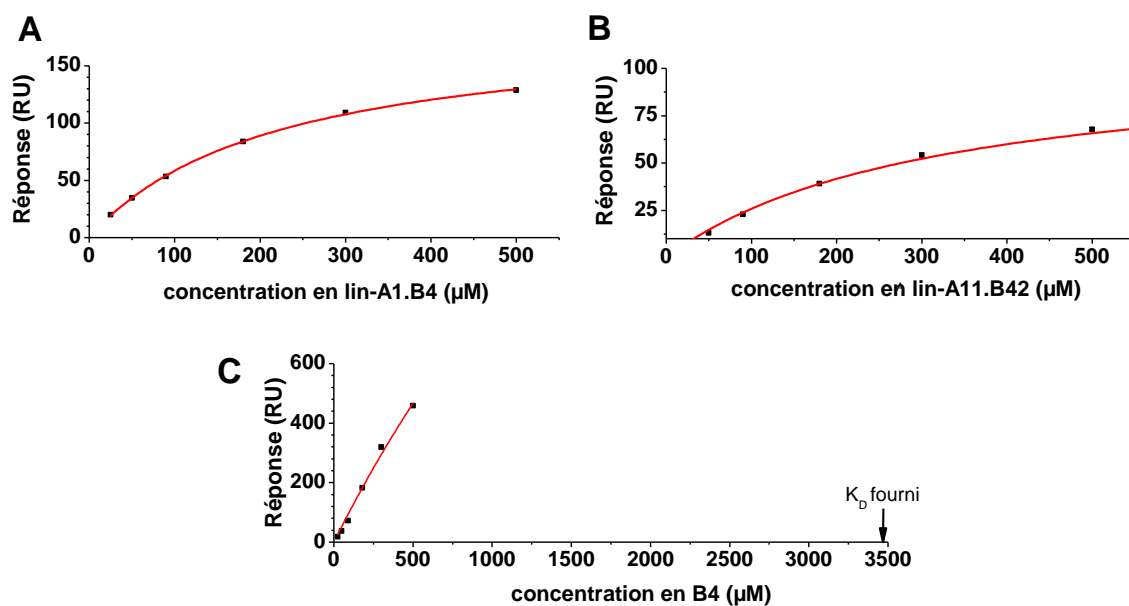


Figure 92 : Détermination par SPR du K_D des mimes linéaires lin-A1.B4 et lin-A11.B42 via une isotherme de Langmuir. Les résultats concernant le peptide B4 est également montré pour comparaison. Les concentrations injectées sont 25, 50, 180, 300, et 500 μM . Les isothermes de Langmuir sont obtenues suite à une double soustraction.

Comme il a été dit précédemment, le peptide B4 est la séquence native la plus affine pour la reconnaissance de l'épitope. Pourtant sa constante de dissociation à l'équilibre n'est pas assez faible pour être déterminée de manière précise. La valeur, estimée à 3.43 mM (Figure 92C), est en effet très loin des concentrations maximales pouvant être injectées. D'après l'isotherme en figure 92A, l'association de B4 à la séquence A1, elle aussi caractérisée par un K_D de l'ordre de quelques millimolaires, engendre une augmentation significative de l'affinité pour le CD20. Bien que le composé lin-A1.B4 soit linéaire, le K_D est évalué à $210,8 \pm 8,3 \mu\text{M}$, et prouve que l'assemblage des 2 séquences accentue les interactions effectuées avec l'épitope. D'après la structure RX du mime lin-A1.B4 inclus dans le paratope du rituximab, nous pouvons constater que les segments A1 et B4 se stabilisent entre eux *via* différents contacts polaires (Figure 93). Même s'il a ici été synthétisé linéairement et qu'il n'est pas contraint par le reste de la structure de l'anticorps, il est probable que le mime soit capable de se recourber pour effectuer ces mêmes points de contact et gagner en énergie. La conservation d'une structuration similaire à celle observée dans la poche de l'anticorps pourrait expliquer le gain d'affinité.

La même expérience a été réalisée avec le lin-A11.B42 afin de voir si un gain d'affinité peut aussi être observé avec les séquences substituées. Leur K_D étant déjà de l'ordre de

quelques centaines de micromolaires, une augmentation d'affinité serait particulièrement intéressante. Les premiers résultats illustrés par la figure 92B indiquent qu'il n'en est rien. Le K_D est en effet évalué à $288,1 \pm 27,8 \mu\text{M}$, alors que les deux séquences cyclisées le constituant (A1-1 et B4-2) ont pour affinité 118 et $307 \mu\text{M}$ respectivement. L'amélioration de l'affinité provoquée par la substitution de l'histidine en A1 et de la proline en B4 n'est donc observée que pour les séquences isolées et cyclisées. Ce phénomène ne peut être étendu dans le cas des mimes linéaires. Par ailleurs, la figure 93 indique que ces deux résidus ne sont pas impliqués dans la formation de liaisons hydrogène. Il se peut donc que leur substitution ne modifie pas beaucoup la configuration du peptide, même si la proline forme une légère torsion du squelette. L'adoption de structures similaires pourrait expliquer le fait que les deux mimes lin-A1.B4 et lin-A11.B42 soient caractérisés par des valeurs de K_D extrêmement proches (211 vs $288 \mu\text{M}$).

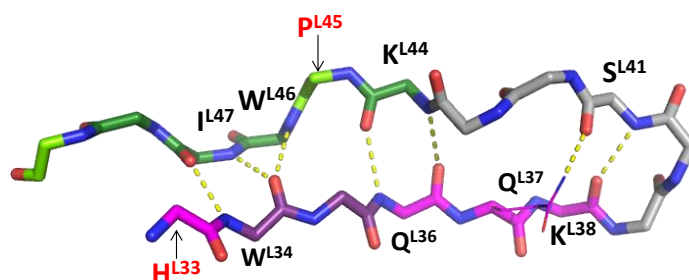


Figure 93 : Structure cristallographique du mime lin-A1.B4 lorsqu'il se trouve dans le paratope du rituximab. Les traits pointillés jaunes représentent les contacts polaires. Les acides aminés écrits en rouge sont substitués par des résidus d'alanine dans la séquence de lin-A11.B42.

A l'avenir, il serait intéressant de cycliser les deux mimes pour les soumettre aux mêmes analyses SPR. Les séquences A1 et B4 étant naturellement positionnées tête bêche dans le rituximab, s'assurer de la bonne conformation du fragment peptidique les reliant est essentiel.

III.2. Le système macromoléculaire

Le peptide B4 a été sélectionné pour tester la faisabilité du greffage de cyclooctapeptides sur un RAFT. La fixation des composés sur le châssis est réalisée par un lien éther d'oxime (Figure 94). La ligation oxime est une réaction chimiosélective entre une fonction oxyamine et un dérivé carbonyle cétone ou aldéhyde. Décrite pour la première fois

en 1959,²³⁸ cette réaction conduit à la formation d'un lien extrêmement stable, y compris dans les milieux biologiques. Dans le cadre d'assemblages moléculaires, les carbonyles utilisés sont généralement des aldéhydes, et conduisent à la formation d'aldoximes.²³⁹

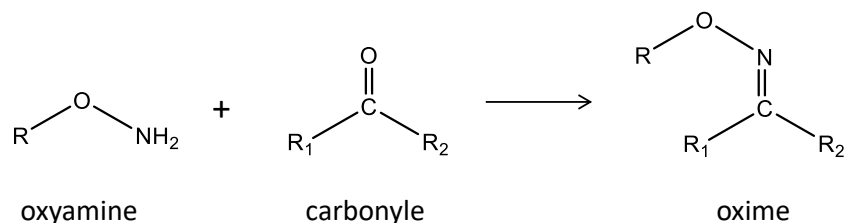


Figure 94 : Schéma de formation d'un lien oxime.

Pour être agencées sur un RAFT présentant des fonctions oxyamines, les séquences peptidiques cycliques doivent comporter un groupement aldéhydique. La méthode la plus fréquente pour introduire une fonction aldéhyde dans un peptide est la coupure oxydante de l' α -amino-alcool d'une sérine par le périodate de sodium (Figure 95). Comme pour les peptides synthétisés pour le criblage et l'*Ala-Scan*, le peptide B4 contient deux cystéines ainsi qu'une sérine en N-term. Après sa synthèse par SPPS et la formation du pont disulfure, l'oxydation de la sérine a pu être réalisée.

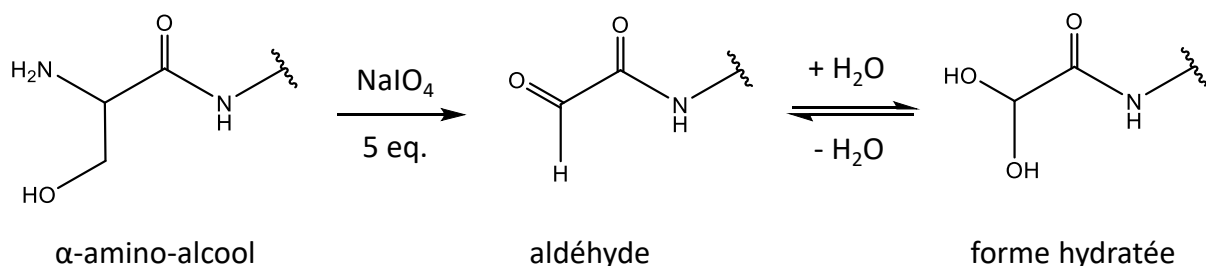


Figure 95 : Schéma d'introduction d'une fonction aldéhyde à l'extrémité N-term du peptide B4 via l'oxydation de la sérine. L'aldéhyde formé est en équilibre avec sa forme hydratée.

La réaction d'oxydation est assez rapide et doit être stoppée avant qu'une suroxydation ne transforme le céto-aldéhyde en acide carboxylique. La réaction a été suivie par UPLC-MS (Figure 96).

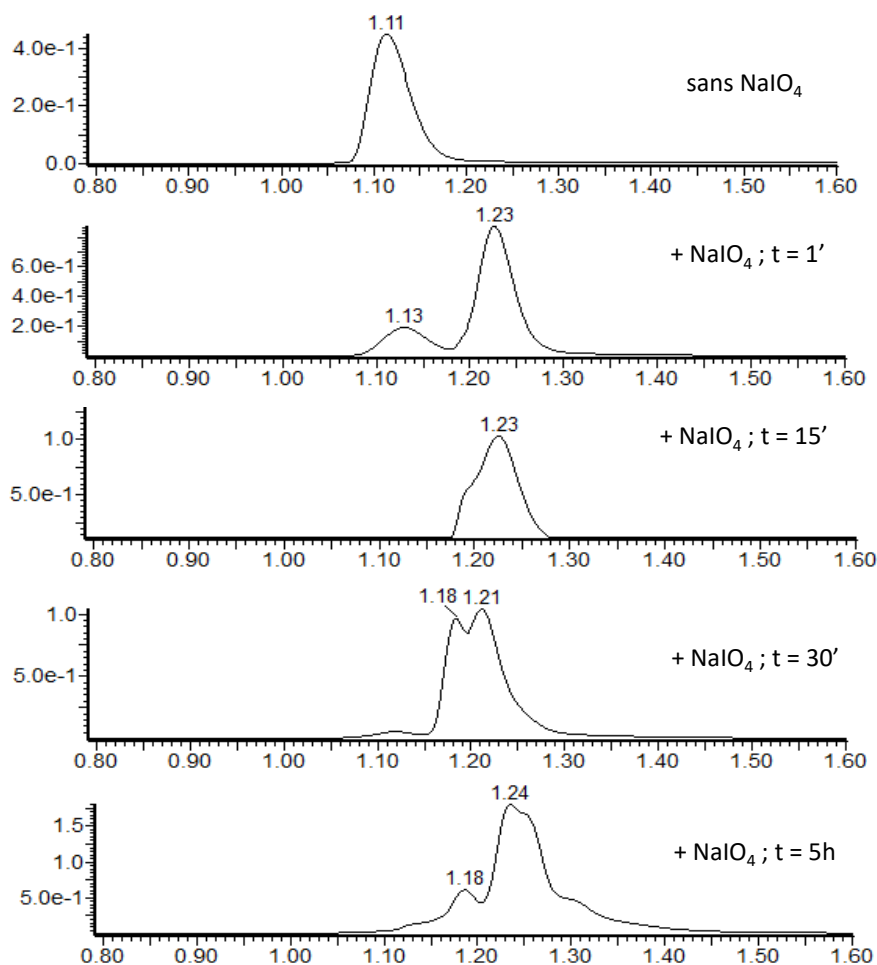


Figure 96: Suivi par UPLC-MS de la réaction d'oxydation de la sérine située à l'extrémité N-term du peptide B4. Une fois oxydé, le peptide est caractérisé par un temps de rétention plus long. Les chromatogrammes sont obtenus pour une analyse de 3,5 min exécutée dans H₂O/0,1% TFA avec un gradient d'acétonitrile allant de 5 à 100% sur un temps de 2,3 min. NaIO₄ = périodate de sodium.

D'après la figure 96, le peptide est initialement caractérisé par un temps de rétention d'environ 1,11 min. Lorsque le périodate de sodium est ajouté, l' α -amino-alcool est très vite oxydé. A t = 1min, une grande majorité du pic s'est décalée à un temps de rétention de 1,23 min. A cet instant, nous pouvons donc observer la présence du peptide d'origine, et celle du peptide oxydé (Figure 97). Après 15 min, l'absence de pic à t_R = 1,11 min indique que la réaction est totale. Par ailleurs, un épaulement semble se former. Celui-ci prend de plus en plus d'importance au fil du temps, jusqu'à l'obtention de deux pics distincts à t = 5h, probablement causés par la dégradation du peptide. Cette cinétique prouve donc qu'il est nécessaire d'arrêter très rapidement la réaction par purification HPLC.

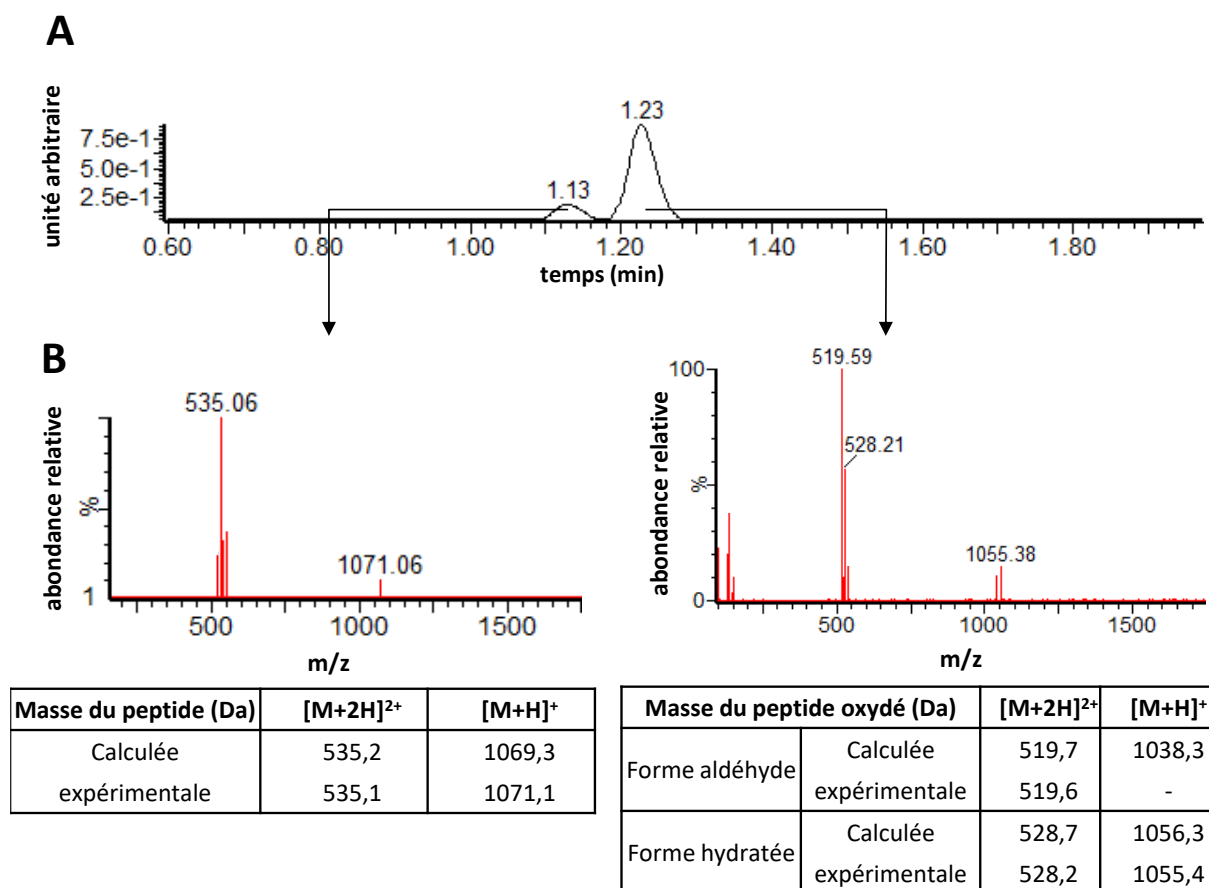


Figure 97 : Mise en évidence de la présence du peptide oxydé et non oxydé à $t = 1$ min par UPLC-MS. A : chromatogramme. B : spectres de masse des composés élués à $t_R = 1,13$ min, et $t_R = 1,23$ min. Les masses associées au premier pic correspondent au peptide dont la sérine est sous forme α -amino-alcool ; les masses associées aux deuxième pic correspondent au peptide-aldéhyde, qui peut être sous forme hydratée.

L'oxydation de la sérine du peptide B4 a par la suite été réalisée sur une plus grosse quantité (25 mg), avec une durée de réaction fixée à 10 min. 65% de la quantité de départ a été obtenue après purification. Le greffage du peptide B4-aldéhyde a été effectué sur un RAFT fonctionnalisé avec quatre groupements oxyamine libres (Figure 98). Ces fonctions oxyamine ont été préalablement introduites grâce au couplage de l'acide aminoxyacétique sur les fonctions amines des lysines. La ligation oxime s'effectue spontanément dans un mélange H_2O / acétonitrile (1:1, v:v), avec B4 en excès.

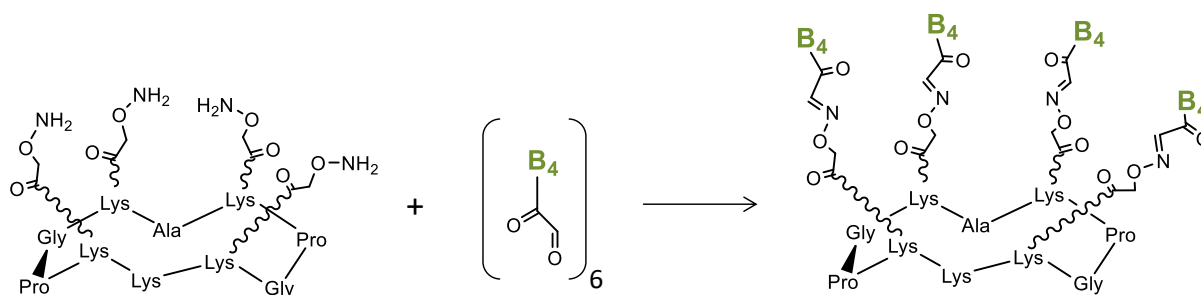


Figure 98 : Schéma d'assemblage du peptide B4-aldéhyde sur un châssis peptidique par ligation oxime. 6 équivalents de peptide B4 sont ajoutés au RAFT pour espérer une réaction totale.

Le nombre de cyclopeptides B4 assemblés sur le châssis est supposé augmenter au cours du temps, passant de 0 à 4 si l'encombrement stérique n'est pas trop élevé. Pour observer l'agencement successif de ces composés sur le support, une nouvelle cinétique a été réalisée en UPLC-MS (Figure 99), avec des quantités conduisant théoriquement à l'obtention de 8 mg de composés finaux.

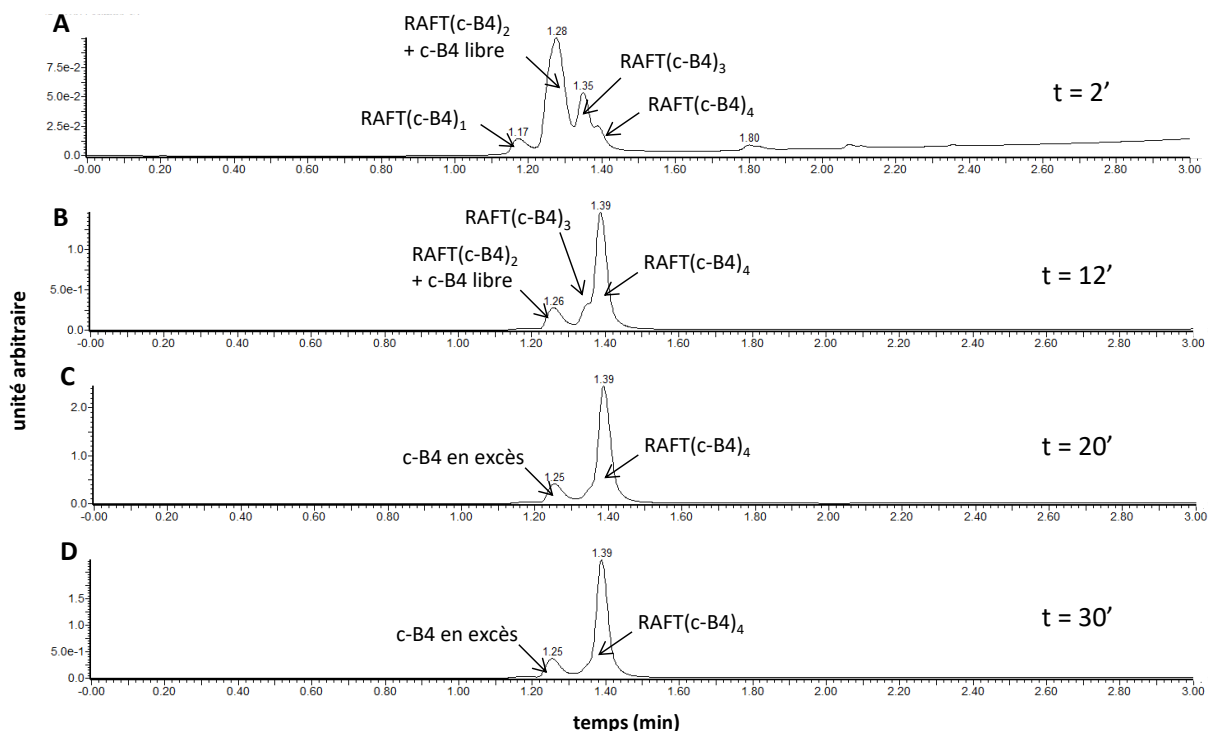


Figure 99 : Suivi de l'assemblage du peptide B4 sur le châssis peptidique par UPLC-MS. Les chromatogrammes sont obtenus pour une analyse de 3,5 min exécutée avec un gradient d'acétonitrile 20-100% dans H₂O 0,1% TFA sur un temps de 2,3 min. Les injections ont été effectuées à A : t = 2', B : t = 12', C : t = 20', D : t = 30'. Le raft seul possède un temps de rétention de 1,44 min.

Au bout de 2 min de réaction, 4 pics sont observés sur le chromatogramme (Figure 99A). Les analyses en spectrométrie de masse révèlent qu'ils correspondent au RAFT

fonctionnalisé avec 1, 2, 3, et 4 boucles respectivement. Le pic majoritaire ($t_R = 1,28'$) est en réalité la superposition de deux éluions : le RAFT(c-B4)₂ et le peptide B4 libre, caractérisé par un temps de rétention de 1,23 min. Après 12 min, nous observons une disparition du produit de mono-fonctionnalisation RAFT(c-B4)₁, et une augmentation du pic correspondant à l'éluion du RAFT(c-B4)₄ (Figure 99B). A $t = 20$ et 30 min, ne sont observés que les pics liés au cyclopeptide de départ mis en excès ($t_R = 1,25$) et au RAFT(c-B4)₄ ($t_R = 1,39$), ce qui montre que la réaction est totale. Les masses associées à ces pics correspondent bien au poids moléculaire des produits (Figure 99 C et D). Les deux composés ayant des temps d'éluion bien distincts, ils peuvent donc être individuellement récoltés lors d'une purification HPLC. Après que celle-ci ait été réalisée, le taux de pureté du RAFT(c-B4)₄ a été analysé par UPLC-MS (Figure 100).

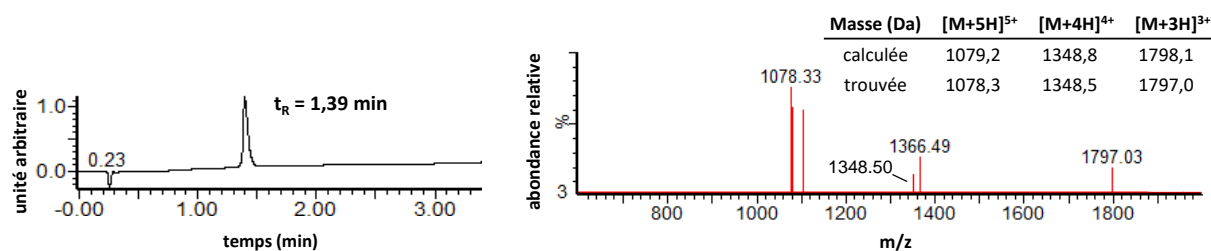


Figure 100 : Evaluation de la pureté du RAFT(c-B4)₄ par UPLC-MS. A gauche : chromatogramme obtenu pour une analyse de 3,5 min exécutée avec un gradient d'acétonitrile 20-100% dans H₂O 0,1% TFA sur un temps de 2,3 min. t_R = temps de rétention des peptides. A droite : Spectre de masse (source ESI). Le poids moléculaire du RAFT(c-B4)₄ (= 5391,2 Da) n'est pas détectable avec la gamme de masses pouvant être étudiée par l'UPLC-MS.

Le chromatogramme indique que le composé est pur, et le spectre de masse démontre que les masses calculées et expérimentales correspondent. Après purification, le rendement global a été estimé à environ 58%.

Lors du dosage du RAFT(c-B4)₄ dans l'eau, il est rapidement apparu que le composé n'était pas soluble. Une centrifugation de quelques minutes conduisait à la formation d'un culot. D'autres tests réalisés dans le tampon utilisé dans les analyses SPR ont donné les mêmes résultats. Pour tout de même réaliser une étude d'interaction avec le CD20, une partie du produit sec a été resolubilisée dans une faible quantité de DMSO, puis diluée dans le tampon pour atteindre un taux final de 2% en DMSO, comme le tampon de course. Après centrifugation, la concentration du surnageant a été estimée par spectroscopie UV-visible à 26,4 μ M. Une expérience effectuée sur la base de cette solution n'a pas permis d'obtenir des

résultats concluants. Une amélioration de la solubilité du composé devra être envisagée en incorporant par exemple des acides aminés cationiques.

IV. Conclusion

Pour améliorer l'affinité des mimes de rituximab, des séquences peptidiques contenues dans la poche de l'anticorps ont été assemblées. La multivalence des systèmes formés a été créée de deux manières différentes : la formation de peptides linéaires reliant plusieurs séquences, ou l'agencement de ces mêmes séquences cyclisées sur un châssis moléculaire.

Lorsqu'elles sont isolées et cyclisées, les deux séquences des feuilletts β A1 et B4 sont caractérisées par des K_D de l'ordre du millimolaire. Leur liaison a permis de diminuer leur affinité d'un facteur au moins égal à 10. Les premières études ont en effet permis d'évaluer une valeur du K_D du mime lin-A1.B4 à $210,8 \pm 8,3 \mu\text{M}$. L'interaction du CD20 avec un fragment similaire constitué des séquences modifiées A1-1 et B4-2, est quant à elle caractérisée par un K_D de $288,1 \pm 27,8 \mu\text{M}$. Quand les peptides sont sous forme linéaire, les substitutions des résidus par des alanines ne semblent donc pas spécialement favorables.

Une autre méthode consistant à assembler plusieurs cyclopeptides B4 sur un RAFT a été effectuée. L'introduction d'une fonction aldéhyde à l'extrémité des boucles et servant à greffer ces dernières sur le châssis a été suivie par UPLC-MS. La réaction s'avère totale et très rapide (moins de 10 min). Une étude cinétique a également été réalisée lors de l'assemblage des séquences sur le RAFT par ligation oxime. Bien que les cyclopeptides soient assez volumineux, et qu'aucun espaceur n'ait été ajouté entre eux et le support moléculaire, il est possible d'en greffer quatre. Le manque de solubilité du système macromoléculaire indique que de nouvelles stratégies doivent être mises en place pour augmenter la solubilité.

Conclusion et perspectives

Les objectifs de mes travaux de thèse ont concerné la conception d'une surface antigénique permettant d'étudier en détails les processus de reconnaissance anticorps / antigène aux interfaces. Le but était ensuite d'optimiser les caractéristiques de cette surface, et de l'utiliser pour des criblages peptidiques. Ces travaux de recherche se sont inscrits dans le cadre du développement de nouveaux ligands anti-tumoraux. Plus précisément, ils ont été réalisés dans le but de concevoir des mimes synthétiques d'anticorps de faibles poids moléculaires. Notre intérêt s'est porté sur l'anticorps rituximab, qui grâce à ses propriétés de reconnaissance pour l'antigène CD20, est utilisé depuis une vingtaine d'année dans le traitement de certains types de lymphomes.

Nous avons développé un protocole de fonctionnalisation de surface visant à greffer de manière covalente l'antigène CD20 sur une monocouche auto-assemblée d'alcanethiols. Notre stratégie d'immobilisation consiste en une cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre permettant de contrôler la quantité d'épitope CD20 sur la surface. Le suivi du greffage par des techniques de caractérisation de surface (QCM-D, SPR et ellipsométrie spectroscopique) ont permis d'extraire ces densités surfaciques en CD20 et de calculer les distances inter-antigènes associées.

Possédant de bonnes propriétés de reconnaissance et une grande spécificité pour l'anticorps rituximab, ces surfaces ont été employées pour étudier l'impact de la densité surfacique en CD20 sur l'interaction anticorps/antigène. Des cinétiques d'interaction effectuées avec le rituximab par QCM-D et SPR démontrèrent combien les affinités mesurées sont dépendantes de la concentration surfacique en CD20. En fonction du taux d'antigène greffé, plusieurs processus d'interaction, tels que des interactions monovalentes, bivalentes, de l'encombrement stérique, des effets d'avidité et des phénomènes de réassociation statistique, peuvent être mis en jeu. Le gain d'affinité causé par la bivalence de l'anticorps est maximal lorsque la distance inter-antigène moyenne est de 2,2 nm, correspondant à une densité surfacique en CD20 de 46 pmol.cm⁻². Dans ces conditions, les valeurs de K_D mesurées par SPR sont d'environ 35 nM, et sont proches de celles déterminées *in vitro*, faisant de cette surface un bon outil pour cribler des ligands de CD20.

Afin de déterminer plus finement les fragments peptidiques du Rituximab interagissant avec le CD20, les techniques SPOT et SPR ont été utilisées. Les résultats nous montrent que le site d'interaction se trouve dans une région plus enfouie du paratope que ce qui a été décrit par les données de diffraction aux rayons X. Par ailleurs, les études réalisées sur surface d'or en SPR ont permis de sélectionner quatre hexapeptides caractérisés par des K_D de l'ordre du millimolaire, et dont les acides aminés importants ont été mis en évidence par *Ala-Scan*. Il faut noter que la substitution de certains résidus par une alanine a donné lieu à des composés de meilleure affinité. Quatre de ces dérivés peptidiques interagissent en effet avec un K_D de quelques centaines de micromolaires. Ces derniers nous servent de base pour la conception de mimes du Rituximab. Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour augmenter l'affinité, telles que la conception d'un système multivalent présentant 2 à 4 motifs peptidiques, ou la préparation d'un mime composé de fragments différents. Pour l'un de ces mimes, l'assemblage linéaire de deux fragments a permis d'observer une certaine amélioration d'affinité. Mais les premiers essais réalisés avec des structures plus complexes (RAFT) ont été infructueux notamment en raison d'une très faible solubilité des composés.

De nouvelles stratégies devront être mises en place pour augmenter la solubilité des mimes. Les alanines du châssis pourraient par exemple être remplacées par des acides aminés non naturels chargés tels que l'acide 2,4-diaminobutyrique.

La conception d'assemblages moléculaires nécessitera de prendre en considération d'autres paramètres :

- **La valence** : un système trop encombré serait susceptible de perdre ses propriétés de reconnaissance pour l'antigène. A l'inverse, une valence trop faible limiterait le potentiel d'affinité des composés synthétisés. Le nombre de peptides greffés sur le support devra donc être modulé et optimisé pour chaque mime.
- **La présence d'espaceurs** : si les séquences sont trop proches du châssis moléculaire, les acides aminés constituant la partie inférieure du cycle peuvent être masqués et ne pas pouvoir interagir. Or, la détermination des acides aminés importants par *Ala-Scan* a montré que certains de ces résidus sont situés aux extrémités des séquences peptidiques, et se

retrouvent donc sur la face inférieure des cycles lorsqu'ils sont fixés. Des espaceurs pourraient alors être nécessaires pour éloigner les composés du RAFT. Dans des cas comme celui-ci, des PEG pourraient être utilisés.²⁴⁰

- **L'homo- ou l'hétéro-multimérisation** : selon les propriétés que nous voulons donner aux assemblages macromoléculaires, les composés seront homo- ou hétéro-multimériques. Si un système est composé de la meilleure séquence répétée plusieurs fois, un gain d'affinité sera provoqué par le phénomène de réassociation statistique. Si des séquences différentes sont agencées sur le châssis, une plus grande spécificité sera peut-être observée. Ici, l'assemblage des quatre séquences telles qu'elles sont disposées dans le rituximab permettrait de s'approcher de la structure de la poche de reconnaissance.

Dans ce contexte il faudra tenir compte des distances séparant chaque feuillet β afin d'évaluer l'espace dans lequel le CD20 peut être confiné (Figure 101A).

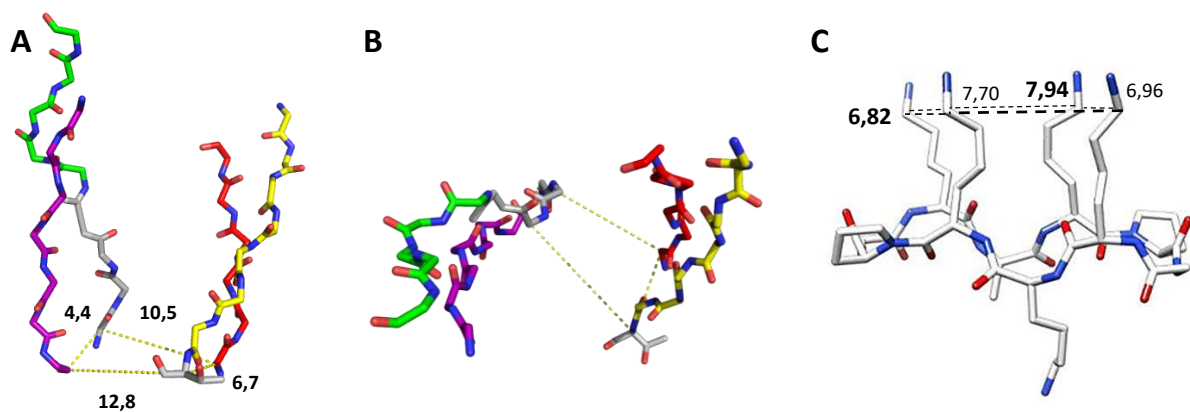


Figure 101 : Détermination de distances. A : distances séparant les quatre séquences peptidiques de la poche du rituximab calculées avec le logiciel Pymol à partir des coordonnées issues de la PDB (code 2OSL). B : en vue du dessus, la liaison des séquences forme un parallélogramme. C : distances calculées entre les chaînes latérales des lysines constituant le RAFT.²³⁶

La base des peptides forme un parallélogramme d'une longueur de l'ordre de la dizaine d'angström. Un RAFT de 8 Å de longueur paraît donc être un bon support. Les séquences étant moins contraintes que dans le rituximab, celles-ci pourront avoir la liberté de s'élargir à partir de la base, et laisser la place au CD20 pour qu'il interagisse avec l'intérieur des cyclopeptides. Ces études de distances montrent combien l'insertion de PEG peut être ici cruciale.

Si la modulation de tous ces paramètres mène à peu de résultats, d'autres châssis moléculaires, moins contraints, pourraient être envisagés afin d'améliorer les interactions avec le CD20. Il est à noter que lors de la conception de nouvelles molécules thérapeutiques, l'objectif premier n'est pas d'atteindre l'affinité d'origine, mais d'avoir une très bonne sélectivité et un rapport bénéfice/risque favorable. Dans l'éventualité d'étendre le développement à des macro-structures capables de cibler plusieurs CD20, les informations concernant les distances inter-antigènes obtenues grâce à ces travaux de thèse seront utiles.

En dernier lieu, de nouvelles perspectives seront aussi envisageables concernant la conception de surfaces antigéniques. Le développement de surfaces sur lesquelles sont déposées des couches lipidiques par exemple permettrait de mieux mimer l'environnement de l'antigène normalement ancré dans la membrane plasmique des cellules B.

Partie expérimentale

I. Résonance plasmonique de surface

I.1. Appareillage et réactifs

Les mesures SPR ont été effectuées avec un Biacore™ T200 (GE Healthcare, Suède). Les sensorchips Au correspondant à des surfaces d'or nu ont été confectionnés à l'institut FEMTO-ST (Université de Besançon). Les surfaces d'or sont préalablement activées par un traitement UV-Ozone au moyen d'un appareil UVO-Cleaner N°42-220 de chez Jelight Company, Inc. L'eau ultra pure est générée par le purificateur d'eau PureLab®flex (Elga LabWater, Wissous, France).

Les tablettes de tampon PBS, le (+)- L-ascorbate de sodium, le citrate de sodium tribasique, le sulfate de cuivre pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), le P80 (Tween®80 BioXtra), le P20 (Tween®20 BioXtra), le chlorure de sodium, l'HEPES, l'éthanol absolu $\geq 99,8\%$ (GC), le diméthylsulfoxyde BioUltra pour biologie moléculaire $\geq 99,5\%$ (GC), et le TBTA ont été achetés auprès de Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Les alcane-thiols fonctionnalisés ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{-EG}_6\text{-azoture}$ ($M_w = 493,7 \text{ g/mol}$), $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{-EG}_4\text{-OH}$ ($M_w = 380,58 \text{ g/mol}$), $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{-EG}_6\text{-biotin}$ ($M_w=694 \text{ g/mol}$)) ont été achetés auprès de ProChimia surfaces (Gdansk, Pologne). Le peptide « CD20 » alcyne, qui correspond à la boucle extracellulaire de la protéine CD20 (N163-Q187), ainsi que le peptide « CD20 » biotinylé ont été synthétisés et cyclisés au laboratoire par Rémy Lartia. Le peptide « CD20 scramble » alcyne, qui correspond à un assemblage aléatoire des résidus constituant le peptide « CD20 », ainsi que les nonapeptides correspondant aux séquences du rituximab ont été synthétisés et cyclisés par l'entreprise Smart Bioscience (Saint-Egrève, France). Le rituximab (MabThera®) a été fourni par l'entreprise Genentech (Groupe Roche, Etats-Unis). Le trastuzumab a été fourni par le centre de recherches en cancérologie de Toulouse (CRCT). Les nonapeptides utilisés pour l'*Ala-Scan* ont été synthétisés et cyclisés au laboratoire, et m'ont permis de m'initier à la synthèse peptidique.

I.2. Préparation de la solution de réactifs de chimie « click »

Le TBTA (0,5mg) est dissous dans une solution de DMSO (500 μl) conduisant à une solution à 1,89 mM, et le CuSO_4 (0,5mg) est dissous dans l'eau ultra pure (500 μl) par

sonication (5 min) (solution à 4,01 mM). 92,74 μl de solution de TBTA sont d'abord mélangés à 43,70 μl de solution CuSO_4 , puis 0,208 mg d'ascorbate de sodium et 82,26 μl de DMSO sont ajoutés. Cette solution contenant 0,8 mM en TBTA, 0,8 mM en CuSO_4 et 4,8 mM en ascorbate de sodium) est alors soniquée 10 min. En parallèle, les aliquots de peptides secs de 10 nmoles (un par piste) sont repris dans 18,76 μl d'eau ultra pure dont le pH a été élevé à 8 par de l'hydroxyde de sodium. Ces solutions contenant 0,533 mM en peptide sont soniquées 10 min. Enfin, 31,24 μl de solution de réactifs sont ajoutés à chaque aliquot de peptide resolubilisé pour obtenir des échantillons de 50 μl composés de peptides 200 μM , CuSO_4 500 μM , TBTA 500 μM , ascorbate de sodium 3 mM dans DMSO/ H_2O (1:1, v:v). Ces solutions sont dégazées 2 min en faisant barboter de l'argon avant d'être introduites dans l'appareil Biacore et d'être injectées dans les minutes qui suivent.

I.3. Etudes cinétiques CD20/rituximab suite à une capture streptavidine/biotine

I.3.a. Préparation des surfaces

Après les avoir sorties de leur conditionnement, les surfaces d'or ont été rincées avec de l'eau ultra pure, séchées à l'azote, puis exposées à une lampe UV/ozone durant 10 min. Dans les 5 min suivant le traitement à l'UV-ozone, les surfaces ont été immergées dans une solution éthanolique de thiols fonctionnalisés : $\text{HS-C}_{11}\text{-(EG)}_6\text{-biotine}$ et $\text{HS-C}_{11}\text{-(EG)}_4\text{-OH}$ (ratio molaire 1:9) avec une concentration totale de 1 mM. Après une incubation d'une nuit réalisée à température ambiante, à l'abri de la lumière et dans un environnement saturé en vapeur d'éthanol, les surfaces ont été rincées à l'éthanol, puis séchées à l'azote avant d'être installées sur les supports en plastique de Biacore™ (Figure 102). Ces supports ont ensuite été introduits dans l'appareil thermostaté à 25°C.

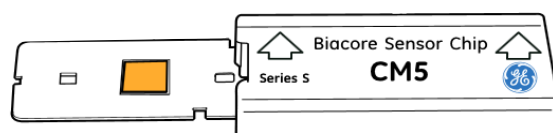


Figure 102 : Support plastique dans lequel est insérée la surface fonctionnalisée.¹²²

Pour chaque expérience, un cycle manuel a été opéré à $10 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ pour rincer les surfaces avec un tampon de course Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, et P20 0,05% pH 7,4 jusqu'à la stabilisation du signal. La streptavidine ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a ensuite été injectée sur 2 pistes de la surface biotinylée jusqu'à observer une saturation du signal, apparaissant après une immobilisation d'environ 2000 RU. Les surfaces ont alors été rincées plusieurs minutes afin d'ôter les molécules de streptavidine en excès ou adsorbées de manière non spécifique. Le peptide CD20 biotinylé a par la suite été injecté à une concentration de 10 nM sur la piste 2 durant 300 s (la piste 1 restant uniquement couverte de streptavidine) (Figure 103).

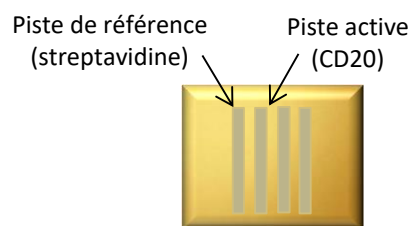


Figure 103 : surface d'or présentant une piste de référence fonctionnalisée avec la streptavidine (piste 1), et une piste active sur laquelle le CD20 est immobilisé sur la couche de streptavidine (piste 2).

1.3.b. Etudes d'interactions avec le rituximab

Toutes les mesures ont été réalisées à 25°C et avec le tampon de course Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, et P20 0,05% pH 7,4. Les études d'interactions ont été effectuées en injectant sur les deux pistes le rituximab à différentes concentrations : 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 20 ; et $30 \mu\text{M}$. Les expériences ont été conduites à $30 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, avec un temps d'injection de 180 s, un temps de dissociation de 300s, et un temps de stabilisation de 600 s. Les signaux obtenus sur la piste de référence ont été déduits de ceux obtenus avec la piste active afin d'éliminer les changements d'indice de réfraction dus à l'effet tampon, et la part d'interactions non spécifiques. Les données ont été traitées avec le logiciel d'évaluation Biacore™ T200 version 2.0.1. Une isotherme de Langmuir a été tracée à partir des réponses à l'équilibre obtenues pour chaque concentration. Les K_D ont été déterminés en fixant la correction d'indice de réfraction RI à 0.

I.4. Greffage des peptides « CD20 » et « CD20 scramble » par CuAAC

I.4.a. Fonctionnalisation « ex situ »

Les surfaces d'or ont été activées, et les SAM ont été formées selon la même procédure expliquée au paragraphe I.3.a., en utilisant les composés HS-C₁₁-(EG)₆-azoture et HS-C₁₁-(EG)₄-OH avec un ratio thiols-azoture/thiols-OH de 20%. Les biopuces fonctionnalisées ont été immergées dans 350 µl de solutions de réactifs de chimie « click » contenant le peptide CD20 pendant 1h30.

I.4.b. Fonctionnalisation « in situ »

Les surfaces d'or ont été activées, et les SAM ont été formées selon la même procédure expliquée au paragraphe I.3.a., en utilisant les composés HS-C₁₁-(EG)₆-azoture et HS-C₁₁-(EG)₄-OH avec un ratio thiols-azoture/thiols-OH : 0,1 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 12,5, 20, 50, et 100%. Pour chaque expérience, les surfaces ont été insérées dans l'instrument, puis un cycle manuel a été opéré à 2 µl.min⁻¹ pour rincer ces dernières avec de l'eau ultra pure jusqu'à la stabilisation du signal. Alors que l'appareil est maintenu sous un flux continu d'eau, les solutions de réactifs de chimie « click » (50 µl) ont été indépendamment injectées durant 8 min sur chaque piste. Entre chaque injection, 8 min de rinçage était opéré dans l'eau ultra pure, afin d'éliminer le DMSO qui ne peut être injecté plus de 10 min pour un mélange à 50 % DMSO/H₂O. Selon les soustractions désirées pour les études cinétiques, deux types de surfaces étaient préparées : l'une fonctionnalisée avec le peptide « CD20 scramble » sur la piste 1, et avec le peptide « CD20 » sur les pistes 2, 3, 4, ou l'autre fonctionnalisée avec le peptide « CD20 scramble » sur la piste 1, avec le peptide « CD20 » sur les pistes 2 et 4, et sans aucun greffage sur la piste 3. (Figure 104).

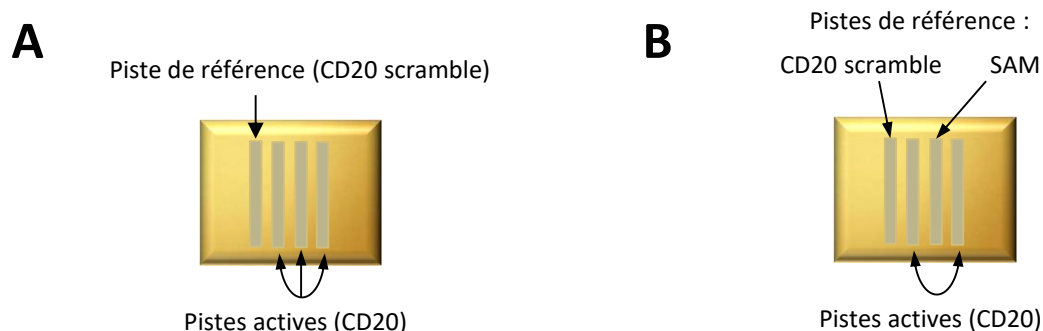


Figure 104 : Fonctionnalisation des surfaces SPR. A : une surface fonctionnalisée avec le peptide « CD20 scramble » sur la piste 1 va permettre lors des études cinétiques d'observer la spécificité de l'analyte pour le CD20 par rapport au « CD20 scramble » en réalisant les soustractions 2-1, 3-1, et 4-1. B : une surface fonctionnalisée avec le peptide « CD20 scramble » sur la piste 1, et non fonctionnalisée sur la piste 3 va permettre lors des études cinétiques d'observer la spécificité de l'analyte pour le CD20 par rapport au « CD20 scramble » en réalisant la soustraction 2-1, et d'observer la spécificité de l'analyte pour le CD20 par rapport à la SAM en réalisant la soustraction 4-3.

Pour chaque expérience, la quantification du greffage (en RU) a été réalisée à partir de la différence d'amplitude observée entre la ligne de base avant et après l'injection des réactifs de click.

I.5. Etudes cinétiques CD20/rituximab suite à la CuAAC

Pour ces études, les surfaces ont été fonctionnalisées selon la procédure indiquée en paragraphe I.3.a. Les expériences ont été menées à 25°C. Excepté pour l'étape d'optimisation du tampon, où les tampons « MabThera® » (NaCl 154 mM, citrate 25 mM, P80 0,066%), et « HEPES » (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, citrate 3mM, P80 0,005%) ont été testés, toutes les expériences ont été réalisées avec le tampon « PBS » (PBS 1X, citrate 3mM, P80 0,005%). Le rituximab, dissous dans le tampon de course, a été injecté à plusieurs concentrations : 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 nM. Les expériences ont été conduites à 30 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, avec un temps d'injection de 200 s, un temps de dissociation de 300s, et un temps de stabilisation de 600 s. Une étape de régénération a été effectuée entre chaque concentration par l'injection d'une solution de glycine/HCl 10 mM pH2 sur toutes les pistes durant 10 s. Une double soustraction a été réalisée avec les sensorgrammes obtenus pour la piste « CD20 » : d'une part les blancs (les signaux provenant des injections de tampon sur cette même piste) et d'autre part les signaux provenant de la piste « CD20 scramble ». Les modèles utilisés par la suite sont expliqués dans le chapitre III. Chaque pourcentage de fonctionnalisation a été réalisé au moins trois fois. Les erreurs fournies dans les tableaux représentent l'écart à la moyenne des résultats.

Dans le cadre de l'étude de la spécificité de la surface, le trastuzumab a été injecté à 1 μM selon la procédure employée pour le rituximab.

I.6. Etudes cinétiques CD20/fragments de rituximab

Avant toute expérience, les hexapeptides ont tous été dosés à 280 nm dans l'eau. Les études d'interaction se sont déroulées de la même manière que pour l'étude CD20/rituximab, mis à part que la gamme de concentrations a été 50, 90, 180, 300, 500, 800 μM pour les peptides dont la séquence n'a pas été modifiée, et 25, 50, 90, 180, 300, 500 μM pour les peptides dont la séquence a été modifiée par une alanine (excepté pour A1-1, où la concentration maximale a été de 800 μM). Le temps de stabilisation a également été raccourci à 300 s.

II. BioLayer interférométrie

II.1. Appareillage et réactifs

Les mesures d'interférométrie ont été effectuées avec l'Octet RED96 (Forté Bio, Etats-Unis). Les biocapteurs « SA » correspondant à des biocapteurs dont l'extrémité de la fibre optique est recouverte d'une couche de streptavidine en 2D ont été achetés auprès de Forté Bio. Les plaques 96 puits Greiner Bio-One™ (Allemagne) composées de polypropylène ont été achetées *via* Forté Bio. Les réactifs utilisés proviennent des mêmes fournisseurs que pour la résonance plasmonique de surface.

II.2. Etudes cinétiques par capture streptavidine / biotine

II.2.a. Préparation des biocapteurs

Avant utilisation, les biocapteurs ont été plongés 10 min dans le tampon de course PBS, citrate 3mM, P80 0,005% pour dissoudre la couche protectrice de sucrose. Ils ont ensuite été plongés durant 900 s dans des puits contenant le peptide CD20 biotinylé (200 nM) ou des puits ne contenant que le tampon. Cette étape de fonctionnalisation a été suivie d'une

phase de rinçage de 900 s en plongeant les deux types de biocapteurs (CD20 ou SA) dans des puits de tampon.

II.2.b. Etudes d'interactions avec le rituximab

Les capteurs fonctionnalisés ont été successivement plongés dans les différents puits contenant le rituximab concentré à 20, 50, 100, 200, 500, 1000 nM (Figure 105). Chaque cycle composant les cinétiques ont été programmés pour suivre plusieurs étapes : l'équilibration (60 s), l'association (240 s), la dissociation (240 s), et l'étape de régénération/rinçage de régénération (10 s + 10 s). Les signaux obtenus avec le biocapteur de référence (SA) ont été déduits de ceux obtenus avec le « biocapteur CD20 » afin d'éliminer la part d'interactions non spécifiques. Les données ont été traitées avec le logiciel d'analyse Forté Bio 9.0. Une régression non linéaire des sensorgrammes a été réalisée via l'utilisation du modèle hétérogène.

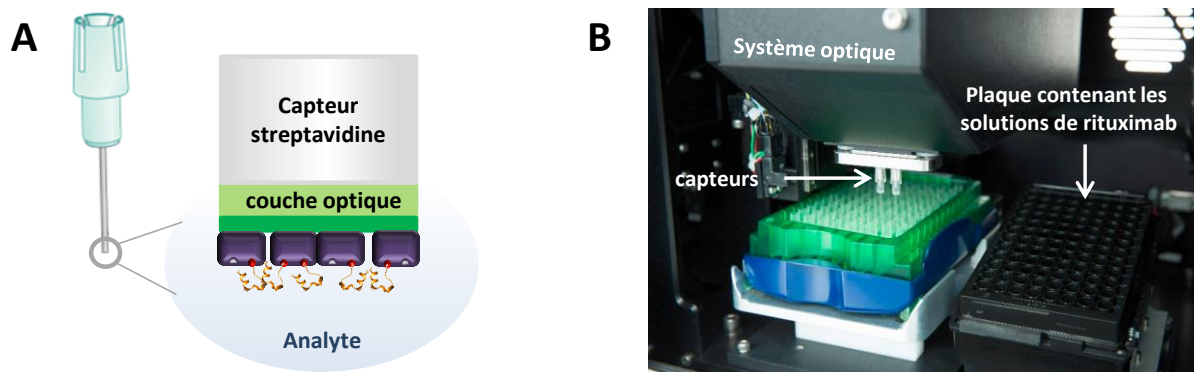


Figure 105 : Instrumentation du BLI. A : Schéma représentant un capteur « SA » 2D fonctionnalisé avec l'épitope CD20. B : Les capteurs reposant au-dessus d'une plaque remplie de tampon sont successivement transportés par le robot vers la deuxième plaque dont les puits contiennent les solutions d'analytes.

III. Angles de contact

III.1. Appareillage et réactifs

Les cristaux de quartz recouverts d'or (QSX 301), utilisés pour caractériser les propriétés hydrophile/hydrophobe de SAM de différentes compositions, ont été achetés auprès de Q-Sense (Biolin Scientific, Suède). Les mesures d'angles de contact ont été effectuées avec un

appareil OCA35 (DataPhysics®, Allemagne). Les réactifs utilisés proviennent des mêmes fournisseurs que pour la résonance plasmonique de surface.

III.2. Etudes d'angles de contact

Les cristaux de quartz ont d'abord été rincés avec de l'eau ultra pure, séchés sous flux d'azote, puis exposés à une lampe UV/ozone durant 10 min. Dans les 5 min suivant le traitement à l'UV-ozone, ils ont été immergés dans des solutions éthanoliques de thiols fonctionnalisés : HS-C₁₁-(EG)₆-azoture et HS-C₁₁-(EG)₄-OH (ratio thiols-azoture/thiols-OH : 0, 20, 50, 75, et 100%) avec une concentration totale de 1 mM. Après une incubation d'une nuit réalisée à température ambiante, à l'abri de la lumière et dans un environnement saturé en vapeur d'éthanol, les surfaces ont été rincées à l'éthanol, puis à l'eau avant d'être séchées. Elles ont ensuite été placées sous le distributeur de gouttes, en face de la caméra. Les gouttes de 5 µl ont été déposées à une vitesse de 1 µl.s⁻¹, et les angles de contact ont été mesurés par le logiciel SCA20 développé par DataPhysics®. Pour chaque pourcentage en azoture, plusieurs surfaces ont été étudiées, et pour chacune d'elles, plusieurs mesures ont été faites à des localisations différentes (centre ou extrémités du cristal de quartz).

IV. Microbalance à quartz

IV.1. Appareillage et réactifs

Les expériences de microbalance à quartz avec suivi de dissipation d'énergie ont été réalisées avec l'appareil QSense® Analyzer (anciennement nommé QSense® E4, Biolin Scientific, Suède). Les cristaux de quartz recouverts d'or (QSX 301) ont été achetés auprès de QSense. Les modules standards de flux QSense ont été utilisés. Pour assurer la résistance des systèmes lors de l'injection de DMSO, les joints et tapis Viton® ont été remplacés par des joints et tapis Kalrez® de DuPont™, achetés auprès de James Walker (Champagne-au-Mont-d'Or, France). Les solutions ont été injectées grâce à une pompe péristaltique (ISM935C, Ismatec, Suisse).

Les réactifs communs à la SPR proviennent des mêmes fournisseurs. A eux s'ajoutent l'éthynylferrocène (EFc), le bromure de cuivre (CuBr), le THPTA, et l'eau lourde (D₂O) qui ont également été achetés auprès de Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

IV.2. Préparation de la solution de réactifs de chimie « click »

La première solution composée de TBTA, de CuSO₄ et d'ascorbate est préparée de la même manière que pour la SPR (paragraphe I.3.a.). En parallèle, l'aliquot de peptide sec de 70 nmoles est repris dans 131,3 µl d'eau ultra pure dont le pH a été élevé à 8 par de l'hydroxyde de sodium, puis est soniqué 10 min. Les deux solutions sont rassemblées pour obtenir un échantillon de 350 µl composé de peptide 200 µM, CuSO₄ 500 µM, TBTA 500 µM, ascorbate de sodium 3 mM dans DMSO/H₂O (1:1, v:v). Cette solution est dégazée 2 min via le barbotage d'argon avant d'être immédiatement utilisée. Ce protocole a également été utilisé en SPR pour la fonctionnalisation *ex situ*.

IV.3. Suivi du greffage du ferrocène-alcyne par CuAAC

IV.3.a. Préparation des surfaces

Les cristaux de quartz ont été nettoyés, et les SAM ont été formées selon la même procédure qu'en SPR, en utilisant les composés HS-C₁₁-(EG)₆-azoture et HS-C₁₁-(EG)₄-OH avec un ratio de thiols-azoture/thiol-OH fixé à 50%.

IV.3.b. Greffage de l'éthynylferrocène

Les expériences ont toutes été réalisées à 25°C. Les variations de fréquence et de dissipation ont été observées pour la fréquence fondamentale (5 MHz) ainsi que pour les harmoniques n°3, 5, 7, 9, 11, et 13. Après avoir été dégazées par barbotage d'argon, les solutions ont été injectées à une vitesse de 10 µl.min⁻¹. Pour chaque expérience, un mélange DMSO/H₂O (1:1, v:v) a tout d'abord été injecté jusqu'à totale stabilisation du signal de base. La solution de réactifs de chimie « click » était ensuite injectée jusqu'à ce que la variation de fréquence ait atteint un plateau. Puis un rinçage avec la solution de départ (DMSO/H₂O) était effectué. Les valeurs de variations de fréquence et de dissipation ont été mesurées à

partir de la différence des signaux de début et de fin de l'expérience (valeurs prises dans les mêmes conditions, i.e. lors de l'injection du mélange DMSO/H₂O). Plusieurs solutions de réactifs de click ont été testées afin de sélectionner la source de cuivre (CuBr ou CuSO₄), le ligand complexant (THPTA ou TBTA), ou la concentration de l'éthynylferrocène (EFc) :

- EFc 1 mM, CuBr 1 mM, TBTA 1 mM dans DMSO/H₂O (1:1, v:v)
- EFc 200 µM, CuBr 1 mM, TBTA 1 mM dans DMSO/H₂O (1:1, v:v)
- EFc 200 µM, CuBr 1 mM, THPTA 1 mM dans DMSO/H₂O (1:1, v:v)
- EFc 150 µM, CuBr 1 mM, TBTA 1 mM dans DMSO/H₂O (1:1, v:v)
- EFc 100 µM, CuBr 1 mM, TBTA 1 mM dans DMSO/H₂O (1:1, v:v)
- EFc 200 µM, CuBr 500 µM, TBTA 500 µM dans DMSO/H₂O (1:1, v:v)
- EFc 200 µM, CuSO₄ 500 µM, TBTA 500 µM, ascorbate de sodium 3 mM dans DMSO/H₂O (1:1, v:v)

IV.4. Suivi du greffage du CD20 ou du « CD20 scramble » par CuAAC

IV.4.a. Préparation des surfaces

Les cristaux de quartz ont été nettoyés, et les SAM ont été formées selon la même procédure qu'en SPR, en utilisant les composés HS-C₁₁-(EG)₆-azoture et HS-C₁₁-(EG)₄-OH avec différents ratios thiols-azoture/thiol-OH : 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 12,5 ; 20 ; 50%.

IV.4.b. Greffage du CD20 ou du « CD20 scramble »

Toutes les expériences se sont déroulées de la même manière que pour le greffage de l'éthynylferrocène, excepté que la solution de réactifs de chimie « click » utilisée ici était composée de CD20-alcyne 200 µM, CuSO₄ 500 µM, TBTA 500 µM, et ascorbate 3 mM dans DMSO/H₂O (1:1, v:v). Les relevés des variations de fréquence et de dissipation ont été réalisés à partir de la différence des signaux entre le début et la fin de l'expérience, après rinçage et élimination des peptides adsorbés de manière non covalente.

IV.5. Echange de solvant H₂O/D₂O

Pour évaluer les pourcentages d'hydratation de la couche de CD20, des échanges de solvants ont été réalisés. Pour cela, deux surfaces ont été fonctionnalisées avec une SAM préparée à partir d'une solution de HS-C₁₁-(EG)₆-azoture et de HS-C₁₁-(EG)₄-OH avec un ratio de thiols-azoture/thiol-OH fixé à 12,5%. Sur l'une d'elle, la réaction de CuAAC a été réalisée et le greffage du CD20 a été suivi par QCM-D. Les deux surfaces Au/SAM et Au/SAM-CD20 (fraîches), ainsi qu'une surface d'or nu ont été installées dans l'appareil QSense® Analyzer. Les enregistrements de la variation de fréquence ont débuté dans l'eau ultra pure, injectée à une vitesse de 10 µl.min⁻¹. L'eau a ensuite été échangée quelques minutes avec l'oxyde de deutérium, avant d'être réinjectée.

IV.6. Etudes de l'interaction CD20/rituximab

Les études d'interaction CD20/rituximab ou « CD20 scramble »/rituximab ont été menées à 25°C dans le tampon de course « PBS » (PBS 1X, citrate 3mM, P80 0,005%). Les cristaux de quartz n'étaient ni séchés, ni extraits des modules entre la fonctionnalisation du CD20 et les études d'interactions. Lorsque la ligne de base était stabilisée, le rituximab était injecté à 10 µl.min⁻¹ jusqu'à la stabilisation du signal, puis l'étape de rinçage permettait de décrocher les anticorps de la surface. La dissociation n'étant pas totale, l'injection d'une solution de glycine/HCl 10 mM pH2 était réalisée durant 30 s.

Lors de l'étude de l'impact de la densité surfacique en antigène sur l'interaction CD20/rituximab, des expériences ont été menées en parallèle sur plusieurs surfaces. Pour la surface dont la SAM a été préparée avec 2,5 % de thiol-azoture, le rituximab a été injecté aux concentrations : 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 nM. Pour la surface dont la SAM a été préparée avec 12,5 % de thiols-azoture, le rituximab a été injecté aux concentrations : 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 nM. Pour la surface dont la SAM a été préparée avec 50 % de thiols-azoture, le rituximab a été injecté aux concentrations : 50, 100, 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 9000 nM. Pour ces expériences, le flux a été élevé à 30 µl.min⁻¹, et la dissociation trop longue était, pour chaque concentration, accélérée par une injection de solution de glycine/HCl 10 mM pH2 d'une durée de 30 s.

V. Voltamétrie cyclique

V.1. Appareillage et réactifs

Les expériences de voltamétrie cyclique ont été réalisées avec un potentiostat CHI 660 (CH Instruments, Etats-Unis), le cristal de quartz étant placé dans un module ouvert QSense (Biolin Scientific, Suède). L'électrode de référence est une électrode de la marque WPI fournie par la société Biolin Scientific. L'hexafluorophosphate de potassium (KPF_6) utilisé comme électrolyte support a été acheté auprès de Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

V.2. Etudes électrochimiques

Les mesures de voltamétrie cyclique ont été réalisées à température ambiante avec un système à trois électrodes : l'électrode de travail (cristal de quartz recouvert d'or), l'électrode auxiliaire constituée d'un fil de platine, et l'électrode de référence ($AgCl/Ag/Cl^-$). Après les suivis du greffage de l'éthynylferrocène par QCM-D, les cristaux de quartz ont immédiatement été récupérés, rincés à l'eau ultra pure, puis installés dans un module ouvert de QCM-D. Pour chaque expérience, la chambre de mesure a alors été remplie avec 1 ml d'une solution d'hexafluorophosphate de potassium 0,1 M et les électrodes auxiliaire et de référence placés dans les orifices du capot des modules ouverts. Grâce au logiciel CHI 660D de CH Instruments, un balayage de potentiels de 0,1 à 0,55 V avec une vitesse de 0,02 $V.s^{-1}$ a été appliqué à l'électrode d'or. La quantité électrique Q , relative à l'oxydation du groupe ferrocène greffé sur la SAM a été extraite du tracé des courbes de voltamétrie cyclique (surface du pic d'oxydation). En divisant cette valeur par la constante de Faraday ($F = 96500 C$), la quantité molaire d'éthynylferrocène greffé a pu être calculée pour chaque expérience et chaque condition de travail. En considérant la concentration maximale surfacique des thiols dans une SAM égale à $4,5 \times 10^{-10} mol.cm^{-2}$,²⁴¹ des rendements de réaction ont également été calculés.

VI. PM-IRRAS

Les expériences de PM-IRRAS ont été effectuées avec un appareil Vertex 70 de Bruker (Palaiseau, France) de la plate-forme technique de chimie de l'institut UTINAM de Besançon (prestation). Pour une utilisation en montage « PM-IRRAS », l'instrument est complété par le dispositif PMA 50 dont le détecteur MCT est refroidi à l'azote liquide. Les surfaces étudiées, identiques à celles utilisées pour la SPR, ont été préparées au laboratoire. Sur la première a été formée une SAM 100% azoture, et la deuxième, présentant également une SAM 100% azoture a été fonctionnalisée avec le peptide CD20 selon le protocole de fonctionnalisation *ex situ* (paragraphe IV.2).

VII. Ellipsométrie spectroscopique couplée à la QCM-D

VII.1. Appareillage et réactifs

Les expériences de SE ont été réalisées avec un ellipsomètre spectroscopique vertical M-2000® (J.A. Woollam, Etats-Unis) à l'université de Leeds (UK) dans le laboratoire du Dr. Ralf Richter. Le dispositif permettant de réaliser les mesures en milieu liquide *via* la création d'une cuvette montée sur un module ouvert de QCM-D a été développé par R. Richter et al.¹⁶⁸

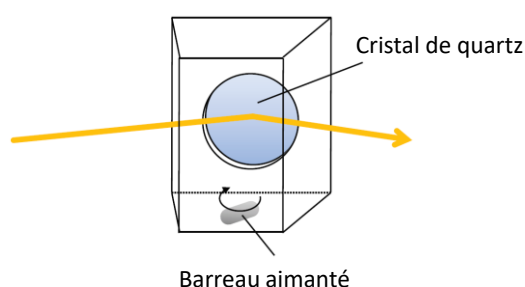


Figure 106 : Cuvette montée sur un module de quartz disposé verticalement. La flèche jaune représente le faisceau lumineux.¹⁶⁸

Le dispositif de SE a été couplé avec l'appareil QSense® Explorer (anciennement nommé QSense® E1, Biolin Scientific, Suède). Les cristaux de quartz recouverts d'or (QSX 301) ont été achetés auprès de QSense. Pour aspirer les liquides de la cuvette, une pompe

péristaltique (Ismatec, Suisse) était connectée à une seringue. Le logiciel CompleteEASE® 5.20 (Woollam) a été utilisé pour l'enregistrement et le traitement des données.

VII.2. Analyses par ellipsométrie couplée à la QCM-D

Les mesures ont été effectuées sur une gamme de longueur d'onde allant de 380 à 1000 nm, avec un angle incident de 65°. Avant chaque expérience, l'alignement du détecteur avec le laser était réalisé. La veille, le cristal de quartz recouvert d'une couche d'or nue était caractérisé à l'air libre. Après avoir formé les SAM durant la nuit (selon la même procédure qu'en QCM-D), la mesure des angles ellipsométriques Δ et Ψ était effectuée avec trois conditions différentes : à l'air sans la cuvette, à l'air avec le cristal de quartz installé dans la cuvette, et enfin dans la cuvette remplie d'eau à pH8. Ces étapes étaient nécessaires pour caractériser les propriétés de la SAM et vérifier que les « effets de fenêtre » étaient négligeables. Par ailleurs, avant le montage de la cuvette en verre, celle-ci était chaque matin passivée en la remplissant d'une solution de 10 mg.ml⁻¹ d'albumine sérique bovine durant 10 min, avant d'être abondamment rincée à l'eau.

Après s'être assuré que la fréquence de résonance du quartz était stable, un enregistrement des mesures d'angles ellipsométriques par le logiciel CompleteEASE® 5.20, et un enregistrement des variations de fréquence par le logiciel QSoft401 étaient déclenchés simultanément dans l'eau. Une dizaine de minutes plus tard, l'eau était remplacée par un mélange DMSO/H₂O (1:1, v:v). Une fois le signal stable dans cette solution, les réactifs de chimie « click » étaient injectés dans la cuvette à la concentration finale désirée. Durant tout l'enregistrement, les solutions étaient continuellement mélangées avec un barreau aimanté qui ne générait pas de turbulences. Pour l'étape de rinçage, le contenant de la cuvette était dilué par l'addition successive et répétée d'une solution de DMSO/H₂O, alors que le liquide en excès était aspiré par une seringue connectée à une pompe péristaltique. La même procédure a été réalisée pour finir l'enregistrement dans l'eau pH8.

L'épaisseur et l'indice de réfraction des couches (SAM et CD20) ont été déterminés par une régression non linéaire des variations d'angles ellipsométriques en fonction de la longueur d'onde. La couche d'or recouverte de la SAM a été traitée comme un substrat homogène. Ses propriétés optiques ont été déterminées à partir des données acquises en solution avant

le dépôt du biofilm de CD20, en établissant une régression non linéaire de l'indice de réfraction et du coefficient d'extinction basé sur un algorithme de B-spline. La couche de CD20 a ensuite été traitée comme un milieu transparent et homogène de Cauchy, avec un indice de réfraction $n_{(\lambda)}=A+B/\lambda^2$. Ici, A a été fixé à 1,322 et B à 0,00322 μm^2 . La couche est également caractérisée par une épaisseur d . d et A ont été traités comme des variables ajustables. Une déviation pondérée moyenne χ^2 inférieure à 2 indiquait une régression de bonne qualité.

VIII. Génération du Fab

VIII.1. Appareillage et réactifs

La génération du Fab du rituximab a été réalisée grâce au kit de préparation de Fab Pierce™ de Thermo Fisher Scientific (Bourgoin-Jallieu, France). Le kit comprend de la papaïne supportée sur résine d'agarose, trois tampons (de digestion et d'élution de l'anticorps, et PBS), et trois types de colonnes (de centrifugation, de dessalage, et de purification). La notice associée au kit (n°44985) a été suivie. Les étapes de centrifugation ont été réalisées avec une centrifugeuse Sigma Laborzentrifugen™ 2K15 et en utilisant les rotors à godets oscillants Sigma Laborzentrifugen™ n° 11180 (Thermo Fisher Scientific).

VIII.2. Génération des fragments

Avant de débiter, 10 ml de tampon de digestion ont été préparés en ajoutant 35 mg de cystéine/HCl. 250 μl de la solution de billes ont été placés dans une colonne de centrifugation. Une centrifugation de 5000 g x 1 min a été effectuée pour éliminer la solution de conservation. Les billes ont ensuite été lavées avec 0,5 ml de tampon de digestion, puis recentrifugées à 5000 g x 1 min.

En parallèle, la solution de stockage située dans la colonne de dessalage a été éliminée par une centrifugation de 1000 g x 2 min. Cette colonne a été lavée en réalisant par 4 fois, une addition de 1 ml de tampon de digestion suivie d'une centrifugation de 1000 g x 2

min. Une fois que la résine était bien compacte, 0,4 ml d'anticorps à 10 mg.ml⁻¹ y ont été déposés puis centrifugés à 1000 g x 2 min.

La solution collectée à laquelle ont été ajoutés 0,1 ml de tampon de digestion a ensuite été placée dans la colonne de centrifugation contenant la papaïne. Celle-ci a été incubée à 37°C sous agitation durant 6h afin que l'enzyme puisse cliver l'anticorps. Après la réaction, la colonne a été centrifugée à 5000 g x 1 min puis rincée avec 0,5 ml de tampon PBS, récupérés également par une centrifugation de 5000 g x 1 min pour obtenir une solution finale d'anticorps digéré de 1 ml. Dans celle-ci se trouvaient les parties Fab, Fc, et les anticorps non digérés.

VIII.3. Purification des Fab

La colonne de purification chargée en protéines A, ainsi que le tampon d'élution ont été équilibrés à température ambiante. La colonne a ensuite été centrifugée à 1000 g x 1 min, puis lavée en réalisant par 2 fois, une addition de 2 ml de tampon PBS suivie d'une centrifugation de 1000 g x 1 min. Après avoir ajouté la solution de Fab dans la colonne, celle-ci a été retournée plusieurs fois pour re-suspendre la résine. Ce mouvement de retournement a été effectué 10 min, afin que tous les anticorps et les parties Fc se fixent à la protéine A. La colonne a été par la suite centrifugée à 1000 g x 1 min puis rincée deux fois avec 1 ml de tampon PBS, récupérés également par une centrifugation de 1000 g x 1 min pour obtenir une solution finale de Fab purifié de 3 ml. Afin de récupérer la fraction Fc, 1ml de tampon d'élution a été ajouté dans la colonne qui a été centrifugée 1 min. Cette opération a été répétée 2 fois.

VIII.4. Dosage des Fab

La chaîne lourde du Fab contient 13 résidus de tyrosine, 5 résidus de tryptophane, 5 résidus de cystéine, et la chaîne légère du Fab contient 9 résidus de tyrosine, 4 résidus de tryptophane, et 5 résidus de cystéine. En considérant que le coefficient d'extinction molaire du tryptophane est de 5500 M⁻¹.cm⁻¹, celui de la tyrosine de 1490 M⁻¹.cm⁻¹, et celui de la cystéine de 125 M⁻¹.cm⁻¹ à 280 nm, le coefficient d'extinction molaire du Fab est de 83530

M⁻¹.cm⁻¹. A partir de 0,4 ml d'une solution de rituximab à 55,61 µM, nous avons obtenu 3 ml d'une solution de Fab à 18,5 µM. Le rendement de réaction était donc de 84%.

VIII.5. Vérification par gel d'électrophorèse

VIII.5.a. Appareillage et réactifs

Le système d'électrophorèse provient de chez Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). Les réactifs ont été achetés auprès de Bio-Rad ou Sigma Aldrich. Le marqueur de poids moléculaire est le « Opti-protein Marker » n° G252 (gamme de 10 à 175 kDa), et a été acheté auprès de abm® (Paris, France). L'image du gel a été prise par l'appareil Universal Hood II Gel Doc de Bio-Rad.

VIII.5.b. Composition des gels

Le gel SDS-PAGE a été composé de deux parties : un gel de « concentration » et un gel de « migration ». Le gel de migration (10% acrylamide, 10 ml) a été constitué d'eau ultra pure (4,825 ml), d'acrylamide 40% (2,48 ml), de tris pH 8,8 1,5 M (2,5 ml), de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 10% (50 µl), de persulfate d'ammonium 10% (0,1 ml), et de tétraméthyléthylènediamine (TEMED) qui n'a été ajouté qu'au dernier moment (4 µl). Le gel de « concentration » (4 ml) a été constitué d'eau ultra pure (2,9 ml), d'acrylamide 40% (0,5 ml), tris pH 6,8 1 M (0,5 ml), de SDS 20% (20 µl), de persulfate d'ammonium 10% (40 µl), et de TEMED qui n'a été ajouté qu'au dernier moment (4 µl).

VIII.5.c. Réalisation du gel SDS-PAGE natif

Le gel de migration a été coulé entre les plaques en verre préalablement nettoyées. De l'isopropanol a été versé par-dessus afin de linéariser l'extrémité supérieure du gel jusqu'à ce que celui-ci polymérise. Après élimination de l'isopropanol, le gel a ensuite été rincé à l'eau. Le TEMED a été ajouté à la solution de « concentration », puis celle-ci a été coulée par-dessus le gel de « migration ». Un peigne a été positionné dans l'attente de la polymérisation afin de créer des puits de 20 µl. La solution de rituximab a été préparée en mélangeant 15 µl d'une solution diluée d'anticorps et 15 µl d'un mélange bleu de

bromophénol/glycérol de sorte que le puits contienne 20µg de rituximab. Les solutions de Fab et de Fc purifiées, ainsi que la solution de digestion non purifiée (Fab + Fc) ont été préparées en mélangeant 10 µl des solutions mères avec 10 µl de bleu de bromophénol/glycérol.

Après avoir placé les solutions dans les puits, le gel a été plongé dans un tampon composé de tris, SDS, glycine (30,3-10-144 g pour un litre). Le générateur a appliqué une tension de 120 V pendant 80 min. Le gel a ensuite été plongé dans une solution de bleu de coomassie 10 min, afin de révéler les bandes de protéines. Une décoloration à l'acide acétique (75 ml), éthanol (25 ml), eau (400ml) a été réalisée toute une nuit dans un bain mouvant. Une image du gel a ensuite été prise le lendemain.

IX. Etude de l'interaction Ag/Ac par cristallographie

La structure cristallographique aux rayons X représentant l'épitope du CD20 en interaction avec le paratope du rituximab a été élucidée par Du et al.¹⁷¹. Le fichier regroupant les coordonnées des atomes (fichier PDB) a été récupéré via la banque de données des protéines (PDB).²⁴² Le code correspondant à cette structure est 2OSL. La structure des molécules a été remodelisée via le logiciel libre de visualisation PyMOL version 2.0 Schrödinger, créé par Warren DeLano.²⁴³ Tous les dessins réalisés par la suite dans ce manuscrit ont été effectués avec PyMOL.

X. Méthode SPOT

X.1. Préparation des membranes

X.1.a. Appareillage

Les peptides ont été synthétisés sur les membranes de manière automatique *via* l'utilisation d'un robot de synthèse MultiPep (Intavis, Allemagne). Les membranes de cellulose ont été achetées auprès de Intavis.

X.1.b. Préparation des membranes

Les acides aminés protégés ont été préactivés quotidiennement en mélangeant 300 µl d'une solution de Fmoc-amino-acides 0,6 M avec 150 µl de N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIC) 1,2 M, et 150 µl d'hydroxybenzotriazole (HOBt) 1,2 M, le solvant étant le N-méthylpyrrolidone (NMP). Chaque étape de couplage a été réalisée trois fois durant 15 min. Les membranes étaient ensuite rincées avec du N, N-diméthylformamide (DMF) (trois fois, 2 min), et les groupements amines n'ayant pas réagi étaient acétylés par un traitement de 10 min avec une solution d'anhydride acétique dans le DMF (10%, v/v). Les acides aminés nouvellement introduits étaient ensuite déprotégés avec une solution de pipéridine (20% dans le DMF, 5min), puis les membranes étaient traitées avec une solution de bleu de bromophénol (0,005% dans le DMF, deux fois, 2 min), lavées avec du méthanol (trois fois, 2min), et séchées à l'air. Pour le dernier cycle, la déprotection à la pipéridine a été effectuée avant l'acétylation.

Toutes les chaînes latérales ont été déprotégées par un traitement d'1h avec le mélange acide trifluoroacétique (TFA) / dichlorométhane (DCM) / triéthylsilane, (48,75/48,75/2,5, v:v:v). La membrane a ensuite été lavée trois fois 2 min au DCM, puis au DMF, puis à l'acide acétique 1%, et enfin à l'éthanol avant d'être séchée.

X.2. Révélation des membranes

X.2.a. Appareillage

La révélation a été réalisée avec un Typhoon 9400 Variable mode imager de Amersham (GE Healthcare Life Sciences, Royaume-Uni).

X.2.b. Révélation

Les membranes ont dans un premier temps été incubées dans l'éthanol durant 2 min, avant d'être rincées trois fois au tampon TBS (Tris.HCl 50 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, pH 7). Elles ont ensuite été plongées durant une nuit dans un tampon de blocage composé de TBS, de réactif bloquant commercialisé par Roche (« Western blocking reagent »), sucre 0,05 g.ml⁻¹, Tween20 0,1%. L'épitope CD20 fonctionnalisé à la cyanine 5 a été dilué dans le

tampon de blocage à une concentration de 10 nM puis incubé à 37°C avec la membrane durant 2h, et sous agitation. Les membranes ont été scannées à une longueur d'onde de 633 nm, et les intensités de fluorescence ont été quantifiées par le logiciel ImageQuant™ (GE Healthcare).

XI. Dynamique moléculaire

Les calculs ont été réalisés sur la base de la structure cristallographique aux rayons X représentant l'épitope du CD20 en interaction avec le paratope du rituximab (PDB code: 2OSL). Les simulations de mécanique moléculaire (MM) ont été faites en utilisant le logiciel AMBER12 dans des conditions périodiques. La préparation des fichiers (prmtop, crd) a été réalisée avec l'outil xleap d'AMBER. La structure du complexe a été solvatée avec une boîte d'eau rectangulaire TIP3P. Les dimensions de celle-ci ont été choisies de sorte qu'elle soit 10Å plus large que le soluté dans toutes les directions. Huit ions chlorure y ont été ajoutés.

Une minimisation de l'énergie du système a été effectuée par chauffage dans un ensemble NVT. La dynamique s'est ensuite déroulée sur une période de 10 ns, avec un pas de 20 ps. Elle a été conduite dans un ensemble NPT à 300K. Toutes les structures enregistrées sur les 500 cycles peuvent être suivies avec le logiciel libre VMD.

XII. Synthèse

XII.1. Appareillage et réactifs

Tous les Fmoc-amino-acides ont été achetés auprès de Activotec (Cambridge, United Kingdom), Bachem Biochimie SARL (Voisins-Les-Bretonneux, France) et France Biochem S.A. (Meudon, France). Les autres réactifs proviennent de Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) et Acros (Noisy-Le-Grand, France). La synthèse automatique sur robot a été effectuée avec un Syro II (Biotage®, Suède). Les groupements protecteurs des chaînes latérales étaient : Pbf (2,2,4,6,7-pentaméthylidihydrobenzofurane-5-sulfonyle) pour l'arginine, Trt (Trityle) pour l'asparagine, la glutamine, l'histidine et la cystéine), tBu (tert-

butyle éther) pour la thréonine, la tyrosine et la sérine, OtBu (tert-butyle ester) pour les acides aspartique et glutamique, et Boc (tert-butoxycarbonyl) pour la lysine et le tryptophane.

Les analyses par RP-UPLC (UPLC en phase inverse) ont été effectuées avec un équipement Waters® constitué d'un système UPLC « ACQUITY H-Class Bio System Acquity H-Class Bio » et d'un spectromètre de masse « SQ Detector 2 ». La colonne analytique utilisée était une Aeris Peptide XB Phenomenex, dont les caractéristiques sont 100 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm, qui opérait à un flux de 0,6 ml.min⁻¹ avec un gradient linéaire de 2.30 min pour passer de 5% à 100 % de solvant B. Le suivi d'absorbance en UV est réalisé à 214 nm. Le solvant A était composé d'eau ultra pure contenant 0,1% d'acide formique. Le solvant B était composé d'acétonitrile de qualité HPLC contenant 0,1% d'acide formique.

Les purifications par RP-HPLC (chromatographie liquide à haute performance en phase inverse) ont été effectuées avec un équipement Gilson GX-281 (Villiers-le-Bel, France). La colonne préparative utilisée, de marque Macherey-Nagel, était une NUCLEOSIL® C18 avec des particules de 7 µm, des pores de 100 Å, des dimensions de 250 x 21 mm, qui opérait à un flux de 20.84 ml.min⁻¹. Des gradients linéaires de 15 min étaient effectués avec les solvants A et B. Le solvant A était composé d'eau ultra pure contenant 0,1% de TFA. Le solvant B était composé d'acétonitrile de qualité HPLC contenant 0,1% de TFA.

XII.2. Synthèse des peptides linéaires par SPPS

La synthèse des peptides linéaires sur support solide (SPPS) a été réalisée de manière automatique sur résine de chlorure de 2-chlorotriptyle®, en utilisant la stratégie Fmoc/t-Bu (9-fluorenylméthoxycarbonyl / tertibutyle). Le greffage du 1^{er} acide aminé était toutefois réalisé de manière manuelle. Pour cela, un réacteur de verre comportant une plaque de filtration en verre fritté était utilisé pour éliminer les solvants sous air comprimé. La résine était tout d'abord regonflée dans le dichlorométhane (1x 15 min + 2x 1 min). Pendant ce temps, la solution du premier acide aminé (1 équivalent (eq) par rapport à la capacité de chargement de la résine = 1,52 mmol.g⁻¹) était activée par 3 eq de N,N-Diisopropyléthylamine (DIEA) dans le DCM. Cette solution était ajoutée à la résine durant 30 min sous agitation. Après trois lavages au DCM, les fonctions de la résine n'ayant pas réagi

étaient inactivées par une solution de méthanol/DIEA/DCM (2:1:17, v:v:v) (1x 5 min + 1 x 10 min). La résine chargée en acides aminés était par la suite rincée trois fois au DCM, puis trois fois au N,N-Diméthylformamide (DMF). Pour connaître le taux de fonctionnalisation de la résine, la partie N-term des acides aminés était déprotégée par une solution de pipéridine 20% dans le DMF (1x 5 min + 2 x 10 min). Le groupement protecteur Fmoc libéré dans cette solution était alors dosé ($\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à $\lambda = 299 \text{ nm}$). La résine chargée avec environ $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$, était rincée au DMF puis placée dans le robot de synthèse. La synthèse automatisée se déroulait de la même manière qu'en manuel. Les acides aminés (dilués à $500 \mu\text{M}$ dans le DMF, à l'exception de l'alanine ou la phénylalanine qui étaient dilués dans la N-Méthyl-2-pyrrolidone (NMP), étaient ajoutés à hauteur de 4 eq pour être couplés *via* l'utilisation de DIEA (8 eq) et de l'agent de couplage HBTU (O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate – 4 eq). Les groupements Fmoc étaient libérés par un premier mélange pipéridine/DMF (40%, v:v, 50 eq) puis par un deuxième mélange pipéridine/DMF (20%, v:v, 25 eq). Une fois les peptides synthétisés, les chaînes latérales étaient déprotégées en agitant la résine 1h avec une solution de TFA/H₂O/triisopropylsilane (Tis)/2,2'-(éthylènedioxy)diéthanethiol (92,5:2,5:2,5:2,5, v:v:v:v), de sorte que les peptides soient à une concentration située entre 1 et 10mM. Cette solution, qui engendre également le décrochage de la résine, et qui contenait donc le peptides libre, était évaporée avec un évaporateur rotatif. Les peptides étaient ensuite précipités à l'éther, puis séchés à l'azote.

XII.3. Modifications post-synthèse

XII.3.a. Formation des ponts disulfure

Les ponts disulfure ont été formés en resolubilisant les peptides à une concentration de $500 \mu\text{M}$ dans une solution oxydative composée de tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris base) 0,1 M, DMSO 5 % (v:v), guanidine 20 mM. Les solutions étaient agitées durant 24h à température ambiante, avant d'être purifiées.

XII.3.b. Ajout d'une fonction alcyne au CD20

Le peptide « CD20 », qui correspond à la boucle extracellulaire de la protéine CD20 (N163-Q187), et ayant pour séquence ${}_{\text{Nt}}\text{NIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQ}_{\text{Ct}}$, est greffé sur les

surface grâce à une fonction alcyne présente en N-term. Le CD20 a été synthétisé selon la procédure standard. Avant sa libération de la résine, un dernier couplage a été effectué avec l'acide 4-pentynoïque.

XII.3.c. Formation d'un groupement aldéhyde en N-term

Les peptides destinés à se greffer sur le RAFT possèdent une fonction aldéhyde en N-term. Celle-ci a été obtenue en mélangeant les peptides (25 mg) avec 5 eq de périodate de sodium (NaIO_4) durant 10 min dans l'eau ultra pure. Les deux composés ont ensuite été séparés par purification à l'HPLC. La masse totale du composé obtenu était de 16,2 mg. Le rendement massique est donc estimé à 65%.

XII.3.d. Cyclisation du RAFT par couplage peptidique

La synthèse du RAFT et l'ensemble de ses modifications ont été réalisées au laboratoire par Océane Thery Pirinen. Pour ne pas déprotéger les résidus de lysine, le RAFT a été libéré de la résine dans des conditions douces avec un mélange trifluoroéthanol (TFE) / acide acétique / DCM, 2:2:6, v:v:v). Le RAFT a été dissous dans le DMF à une concentration de 500 μM , et le pH a été ajusté à 8-9 par l'ajout de DIEA. L'agent de couplage PyBOP (benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate) a été ajouté (1,2 eq), puis la solution a été agitée durant 1h. Les solvants ont été éliminés par l'utilisation d'un évaporateur rotatif. Les peptides cyclisés ont ensuite été précipités à l'éther, puis séchés à l'azote.

XII.3.e. Ajout de fonctions oxyamine sur le RAFT

Le RAFT cyclisé possédait 4 résidus de lysine protégés par des groupements Boc sur sa face supérieure, et 1 résidu de lysine protégé par un groupement allyloxycarbonyle (Alloc) sur sa face inférieure. Les groupements Boc ont dans un premier temps été éliminés en solubilisant le peptide cyclique à 500 μM dans une solution $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (50:50, v:v), laissée sous agitation durant 2h. Les solvants ont été éliminés par l'utilisation d'un évaporateur rotatif. Le peptide a ensuite été précipité à l'éther, puis séché à l'azote.

Les fonctions amines des résidus de lysine libres ont été couplées avec l'acide aminooxyacétique-N-hydroxysuccinimide, dont la fonction oxyamine est protégée par un groupement Boc (Boc-AoA-NHS). Le couplage entre le peptide (10 mM) et le Boc-AoA-NHS (1,5 éq par rapport aux résidus de lysine) a été réalisé dans le DMF dont le pH a été élevé à 8-9 par la DIEA, durant 1h à température ambiante et sous agitation. Les solvants ont été éliminés par l'utilisation d'un évaporateur rotatif. Le peptide a ensuite été précipité à l'éther, puis séché à l'azote.

Une fois les fonctions oxyamines introduites, la dernière lysine présente sur la face inférieure du RAFT a été libérée de son groupement Alloc. Cette déprotection se réalise sous atmosphère inerte (argon). Le peptide a été resolubilisé à une concentration de 10 mM dans du DCM anhydre, puis 100 éq de phénylsilane et 0,2 éq de Tetrakis(triphénylphosphine)palladium⁰ (Pd (PPh₃)) ont été ajoutés à la solution. La réaction s'est déroulée sous argon durant 30 min, à température ambiante. Lorsque le peptide est devenu orangé, quelques millilitres de méthanol ont été ajoutés à la solution pour éliminer le dioxyde de carbone. Les solvants ont ensuite été évaporés à l'évaporateur rotatif. Enfin, le peptide a été lavé par trois précipitation successives réalisées avec du diéthyléther froid avant d'être séché.

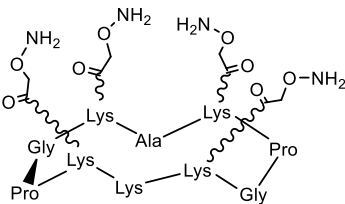
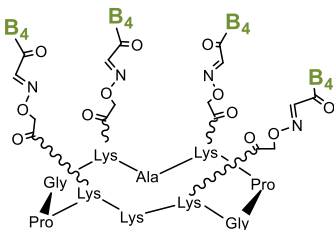
XII.3.f. Couplage oxime

La ligation oxime s'effectue spontanément dans un mélange H₂O / acétonitrile (1:1, v:v), le RAFT étant à 10 mM, et les boucles B4 en excès. Le RAFT-oxyamine (1,39 mg) a donc été mélangé au peptide B4-aldéhyde (6 éq par rapport au RAFT = 6,69 mg) dans un volume final de 105 µl. Après purification, la masse totale du composé obtenu était de 4,64 mg. Le rendement massique est donc estimé à 58%.

XII.4. Peptides formés

E2-1	E2-2
$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{A}-\text{H}-\text{W}-\text{V}-\text{K}-\text{Q}-\text{C}-\text{OH}$	$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{M}-\text{A}-\text{W}-\text{V}-\text{K}-\text{Q}-\text{C}-\text{OH}$
RP-UPLC : $t_R = 0,78'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20') MS (ESI, mode positif) : MM calculée = 1060,26 g.mol ⁻¹ MM trouvée = 1060,20 g.mol ⁻¹ $\epsilon = 5725 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 280 nm	RP-UPLC : $t_R = 1,08'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20') MS (ESI, mode positif) : MM calculée = 1054,31 g.mol ⁻¹ MM trouvée = 1054,63 g.mol ⁻¹ $\epsilon = 5725 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 280 nm
E2-3	E2-4
$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{M}-\text{H}-\text{A}-\text{V}-\text{K}-\text{Q}-\text{C}-\text{OH}$	$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{M}-\text{H}-\text{W}-\text{A}-\text{K}-\text{Q}-\text{C}-\text{OH}$
RP-UPLC : $t_R = 0,39'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20') MS (ESI, mode positif) : MM calculée = 1005,24 g.mol ⁻¹ MM trouvée = 1005,34 g.mol ⁻¹ $\epsilon = 125 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 280 nm	RP-UPLC : $t_R = 0,55'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20') MS (ESI, mode positif) : MM calculée = 1092,32 g.mol ⁻¹ MM trouvée = 1091,09 g.mol ⁻¹ $\epsilon = 5725 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 280 nm
E2-5	E2-6
$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{M}-\text{H}-\text{W}-\text{V}-\text{A}-\text{Q}-\text{C}-\text{OH}$	$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{M}-\text{H}-\text{W}-\text{V}-\text{K}-\text{A}-\text{C}-\text{OH}$
RP-UPLC : $t_R = 1,06'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20') MS (ESI, mode positif) : MM calculée = 1062,28 g.mol ⁻¹ MM trouvée = 1062,44 g.mol ⁻¹ $\epsilon = 5725 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 280 nm	RP-UPLC : $t_R = 1,02'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20') MS (ESI, mode positif) : MM calculée = 1063,32 g.mol ⁻¹ MM trouvée = 1064,02 g.mol ⁻¹ $\epsilon = 5725 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 280 nm
A1-1	A1-2
$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{A}-\text{W}-\text{F}-\text{Q}-\text{Q}-\text{K}-\text{C}-\text{OH}$	$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{H}-\text{A}-\text{F}-\text{Q}-\text{Q}-\text{K}-\text{C}-\text{OH}$
RP-UPLC : $t_R = 1,15'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20') MS (ESI, mode positif) : MM calculée = 1098,28 g.mol ⁻¹ MM trouvée = 1098,12 g.mol ⁻¹ $\epsilon = 5725 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 280 nm	RP-UPLC : $t_R = 0,69'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20') MS (ESI, mode positif) : MM calculée = 1050,21 g.mol ⁻¹ MM trouvée = 1049,81 g.mol ⁻¹ $\epsilon = 200 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 257 nm
A1-3	A1-4
$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{H}-\text{W}-\text{A}-\text{Q}-\text{Q}-\text{K}-\text{C}-\text{OH}$	$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{H}-\text{W}-\text{F}-\text{A}-\text{Q}-\text{K}-\text{C}-\text{OH}$
RP-UPLC : $t_R = 0,67'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20') MS (ESI, mode positif) : MM calculée = 1089,24 g.mol ⁻¹ MM trouvée = 1089,64 g.mol ⁻¹ $\epsilon = 5725 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 280 nm	RP-UPLC : $t_R = 1,08'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20') MS (ESI, mode positif) : MM calculée = 1108,29 g.mol ⁻¹ MM trouvée = 1108,34 g.mol ⁻¹ $\epsilon = 5725 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 280 nm

A1-5	A1-6
$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{H}-\text{W}-\text{F}-\text{Q}-\text{A}-\text{K}-\text{C}-\text{OH}$	$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{H}-\text{W}-\text{F}-\text{Q}-\text{Q}-\text{A}-\text{C}-\text{OH}$
<p>RP-UPLC : $t_R = 1,11'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 1108,29 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 1108,63 g.mol⁻¹</p> <p>$\epsilon = 5725 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 280 nm</p>	<p>RP-UPLC : $t_R = 1,18'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 1108,24 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 1109,97 g.mol⁻¹</p> <p>$\epsilon = 5725 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 280 nm</p>
B4-1	B4-2
$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{A}-\text{P}-\text{W}-\text{I}-\text{Y}-\text{A}-\text{C}-\text{OH}$	$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{K}-\text{A}-\text{W}-\text{I}-\text{Y}-\text{A}-\text{C}-\text{OH}$
<p>RP-UPLC : $t_R = 1,42'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 1011,19 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 1011,45 g.mol⁻¹</p> <p>$\epsilon = 7125 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 278 nm</p>	<p>RP-UPLC : $t_R = 1,41'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 1042,25 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 1041,10 g.mol⁻¹</p> <p>$\epsilon = 7125 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 278 nm</p>
B4-3	B4-4
$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{K}-\text{P}-\text{A}-\text{I}-\text{Y}-\text{A}-\text{C}-\text{OH}$	$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{K}-\text{P}-\text{W}-\text{A}-\text{Y}-\text{A}-\text{C}-\text{OH}$
<p>RP-UPLC : $t_R = 1,04'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 954,16 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 954,62 g.mol⁻¹</p> <p>$\epsilon = 1525 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 274 nm</p>	<p>RP-UPLC : $t_R = 1,13'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 1027,21 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 1026,93 g.mol⁻¹</p> <p>$\epsilon = 7125 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 278 nm</p>
B4-5	G1-1
$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{K}-\text{P}-\text{W}-\text{I}-\text{A}-\text{A}-\text{C}-\text{OH}$	$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{A}-\text{Y}-\text{Y}-\text{S}-\text{A}-\text{R}-\text{C}-\text{OH}$
<p>RP-UPLC : $t_R = 1,14'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 977,19 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 978,75 g.mol⁻¹</p> <p>$\epsilon = 5725 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 280 nm</p>	<p>RP-UPLC : $t_R = 0,99'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 1022,15 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 1021,95 g.mol⁻¹</p> <p>$\epsilon = 2925 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 274 nm</p>
G1-2	G1-3
$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{V}-\text{A}-\text{Y}-\text{S}-\text{A}-\text{R}-\text{C}-\text{OH}$	$\text{H}-\text{S}-\text{C}-\text{V}-\text{Y}-\text{A}-\text{S}-\text{A}-\text{R}-\text{C}-\text{OH}$
<p>RP-UPLC : $t_R = 0,90'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 958,11 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 959,24 g.mol⁻¹</p> <p>$\epsilon = 1525 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 274 nm</p>	<p>RP-UPLC : $t_R = 0,91'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 958,11 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 958,09 g.mol⁻¹</p> <p>$\epsilon = 1525 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 274 nm</p>

G1-4	G1-6
$\text{H-S-C-V-Y-Y-A-A-R-C-OH}$	$\text{H-S-C-V-Y-Y-S-A-A-C-OH}$
<p>RP-UPLC : $t_R = 1,06'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 1034,2 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 1035,71 g.mol⁻¹</p> <p>$\epsilon = 2925 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 274 nm</p>	<p>RP-UPLC : $t_R = 1,12'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 964,09 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 964,90 g.mol⁻¹</p> <p>$\epsilon = 2925 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 274 nm</p>
lin-A1.B4	lin-A11.B42
$\text{H-HWFQQKPGSSPKPW-I-Y-A-OH}$	$\text{H-AWFQQKPGSSPKAW-I-YAPGSSP-OH}$
<p>RP-UPLC : $t_R = 1,23'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 2058,3 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 2058,7 g.mol⁻¹</p> <p>$\epsilon = 12600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 278 nm</p>	<p>RP-UPLC : $t_R = 1,15'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 2391,7 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 2391,9 g.mol⁻¹</p> <p>$\epsilon = 12600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 278 nm</p>
RAFT-(oxyamine) ₄	B4-aldéhyde
	$\text{O=CH-C-S-C-K-P-W-I-Y-A-C-OH}$
<p>RP-UPLC : $t_R = 0,89'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 1314,0 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 1313,5 g.mol⁻¹</p>	<p>RP-UPLC : $t_R = 1,23'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 1056,3 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 1055,4 g.mol⁻¹</p>
RAFT(c-B4) ₄	CD20-alcyne
	$\text{N I Y N C E P A N P S E K N S P S T Q Y C Y S I Q}$
<p>RP-UPLC : $t_R = 1,39'$ (214nm, 20-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 5391,2 g.mol⁻¹</p> <p>[M+3H]³⁺ calculée = 1798,1</p> <p>[M+3H]³⁺ trouvée = 1797,0 g.mol⁻¹</p> <p>$\epsilon = 28500 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 278 nm</p>	<p>RP-UPLC : $t_R = 2,31'$ (214 nm, 5-100% B en 2,20')</p> <p>MS (ESI, mode positif) :</p> <p>MM calculée = 2928,3 g.mol⁻¹</p> <p>MM trouvée = 2928,2 g.mol⁻¹</p> <p>$\epsilon = 4325 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 274 nm</p>

Annexes

Annexe I

Présentation du modèle utilisé pour la détermination de la fraction en antigènes accessibles

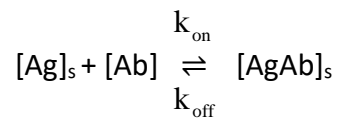
Ce modèle a été développé par Cremer et al.¹⁷⁸

1) Détermination du K_D apparent d'une interaction bivalente

a. Cas d'une interaction monovalente :

- Antigène surfacique CD20 = $[Ag]_s$
- Anticorps rituximab = $[Ab]$
- complexe antigène/ anticorps = $[AgAb]_s$

La réaction est la suivante :



A l'équilibre, $k_{on} \cdot [Ag]_s \cdot [Ab] = k_{off} \cdot [AgAb]_s$

La constante d'association à l'équilibre est $K_A = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[AgAb]_s}{[Ag]_s \cdot [Ab]}$

La constante de dissociation à l'équilibre est $K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[Ag]_s \cdot [Ab]}{[AgAb]_s}$

La concentration surfacique totale en antigènes $[Ag]_T = [Ag]_s + [AgAb]_s$

La réponse (RU) de l'anticorps est

$$\frac{R([Ab])}{R_{max}} = \frac{[AgAb]_s}{[Ag]_T} = \frac{[AgAb]_s}{[Ag]_s + [AgAb]_s} = \frac{K_A \cdot [Ab]}{1 + K_A \cdot [Ab]} = \frac{[Ab]}{K_D + [Ab]}$$

b. Cas d'une interaction bivalente :

- Antigène surfacique CD20 = $[Ag]_s$
- Anticorps rituximab = $[Ab]$
- complexe "1 antigène / 1 Fab de l'anticorps" = $[AgAb]_s$
- complexe "2 antigènes / 2 Fabs de l'anticorps" = $[Ag_2Ab]_s$

La réaction est la suivante :



Les constants d'association et de dissociation à l'équilibre sont :

$$K_{D1} = \frac{k_{off_1}}{k_{on_1}} = \frac{[Ag]_s \cdot [Ab]}{[AgAb]_s} \quad (\text{en M}) \quad K_{D2} = \frac{k_{off_2}}{k_{on_2}} = \frac{[Ag]_s \cdot [AgAb]_s}{[Ag_2Ab]_s} \quad (\text{en mol.m}^{-2})$$

$$K_{A1} = \frac{k_{on_1}}{k_{off_1}} = \frac{[AgAb]_s}{[Ag]_s \cdot [Ab]} \quad (\text{en M}^{-1}) \quad K_{A2} = \frac{k_{on_2}}{k_{off_2}} = \frac{[Ag_2Ab]_s}{[Ag]_s \cdot [AgAb]_s} \quad (\text{en mol}^{-1} \cdot \text{m}^2)$$

La concentration surfacique totale en antigènes $[Ag]_T = [Ag]_s + [AgAb]_s + [Ag_2Ab]_s$

La réponse (RU) de l'anticorps est :

$$\frac{R([Ab])}{R_{\max}} = \frac{[AgAb]_s + [Ag_2Ab]_s}{[Ag]_T} = \boxed{\frac{\alpha K_A \cdot [Ab]}{1 + K_A \cdot [Ab]}}$$

$$\text{avec } \alpha = \left(\frac{1 + K_{A2} \cdot [Ag]_s}{1 + 2K_{A2} \cdot [Ag]_s} \right) \quad \text{et} \quad K_A = K_{A1} + 2K_{A2} \cdot K_{A1} \cdot [Ag]_s$$

Nous pouvons noter que la réponse observée en SPR pour l'interaction bivalente est égale à la réponse observée pour l'interaction monovalente multipliée par α (équations encadrées).

Si la constant d'association à l'équilibre globale $K_A = K_{A1} + 2K_{A2} \cdot K_{A1} \cdot [Ag]_s$,

$$\text{Le } K_D \text{ global mesuré} = K_{Dapp}^m = \frac{1}{K_A} = \boxed{\frac{K_{D1} \cdot K_{D2}}{K_{D2} + 2[Ag]_s}} = \frac{[Ag]_s \cdot [Ab]}{[AgAb]_s + 2[Ag_2Ab]_s}$$

2) Calcul de la densité en CD20 surfacique accessible

Ce calcul repose sur l'adaptation du modèle de Hlavacek, W.S. and al, BioPhys. J., 1999.

Soit P_i = la probabilité d'un ligand d'être accessible pour une interaction quand i sites sont déjà liés. La fraction des sites liés est $\frac{i}{n}$, où n est le nombre total de sites.

P_i peut être exprimé comme le produit de trois termes séparés :

- Q , la probabilité pour qu'un ligand ne soit pas déjà lié à un analyte : $Q = 1 - (i/n)$
- R , la probabilité pour qu'un ligand non lié ne soit pas recouvert par un analyte en interaction avec un ligand adjacent : $R = 1 - (0.5ia/A)$, où a est l'aire couverte par un IgG (60nm^2),¹⁷⁸ et A l'unité d'aire surfacique.
- S , la probabilité pour qu'un ligand non lié et non couvert soit assez éloigné des molécules adjacentes en interaction pour être encore accessible. Ici les sites de liaison des antigènes sont très proches du bord de l'anticorps, et de ce fait, nous assumons que $S = 1$.

$$P_i = Q \times R \times S$$

Le nombre d'antigènes accessibles est $[Ag]_s = n \times P_i = n(1 - \frac{i}{n})(1 - \frac{0.5ia}{A})$.

A l'équilibre, la constante de dissociation apparente *calculée* K_{Dapp}^c , pour l'interaction globale, est :

$$K_{Dapp}^c = \frac{[Ag]_s \cdot [Ab]}{[AgAb]_s + 2[Ag_2Ab]_s}, \text{ la moitié des sites de liaison sont occupés.}$$

A cette valeur,

- Nombre de sites liés = $[AgAb]_s + 2[Ag_2Ab]_s = i$
- $[Ab] = K_{Dapp}^m$, la constante de dissociation apparente *mesurée* pour une courbe d'association.

Nous avons obtenu K_{Dapp}^c en cherchant la valeur de i pour laquelle $K_{Dapp}^c = K_{Dapp}^m$ (voir §). i est alors substitué dans les expressions de Q et R pour trouver P_i au K_{Dapp} (que nous

appelons P^*_i). Il représente la probabilité qu'un ligand soit non lié et non couvert lorsque la moitié de la surface est couverte. La densité surfacique en ligand accessible pour une interaction est :

$$\Gamma_{\text{CD20 disponible}} = n \cdot 2P^*_i$$

Où $\Gamma_{\text{CD20 disponible}}$ est la densité en ligand surfacique totale qui est disponible pour une interaction lorsque le taux de recouvrement est de 0%.

§ Développement :

Avec $K_{\text{Dapp}}^c = K_{\text{Dapp}}^m$

Nous obtenons un polynôme du second degré en i : $(\frac{0.5a}{A})i^2 - (2 + \frac{0.5na}{A})i + n = 0$

$$\Delta = \left[-\left(2 + \frac{0.5na}{A}\right) \right]^2 - 4n\left(\frac{0.5a}{A}\right)$$

$$i = \frac{\left(2 + \frac{0.5na}{A}\right) \pm \sqrt{4 + \left(\frac{0.5na}{A}\right)^2}}{a/A}$$

Or, $A = 1\text{m}^2$, et $a = 60\text{nm}^2 = 6 \cdot 10^{-17} \text{m}^2$,

$$\text{Donc : } i = \frac{\left(2 + \frac{0.5na}{A}\right) - \sqrt{4 + (9 \cdot 10^{-34}) \cdot n^2}}{6 \cdot 10^{-17}}$$

$$\Gamma_{\text{CD20 disponible}} = n \cdot 2P^*_i = 2n \cdot Q \cdot R \cdot S = \boxed{2(n - i) + \frac{ia(-n + i)}{A}}$$

Annexe II

Purification des Fab suite à la digestion d'anticorps

Après digestion de l'anticorps par la papaïne, les résidus d'anticorps non digérés, ainsi que les fragments Fc sont éliminés sur colonnes de protéines A. La protéine A est capable de retenir les parties Fc contenues dans la solution de digestion. Pour vérifier que la fraction de Fab contient peu d'éléments parasites, un gel SDS-PAGE est réalisé dans des conditions non réductrices et sans chauffage (Figure 107).

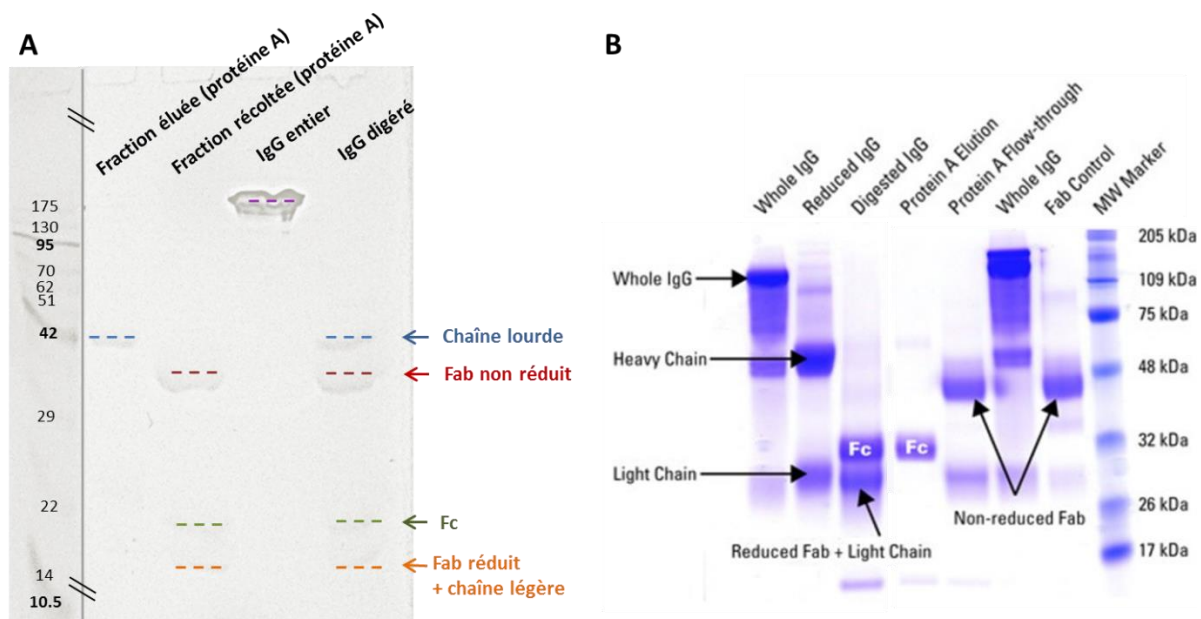


Figure 107 : Evaluation de la qualité de purification des fragments Fab par SDS-PAGE. A : gel obtenu suite à la digestion du rituximab. B : gel de référence livré par le fournisseur du kit de préparation des Fab (ThermoFisher scientifique).

Le principal problème rencontré lors de notre expérimentation a été l'effet de bord apparu au niveau du marqueur de taille, ne nous permettant pas de suivre les poids moléculaires des constituants de manière très précise (le marqueur s'est avéré par la suite de mauvaise qualité et ne fonctionnait pas non plus pour d'autres expériences). Nous avons donc déterminé la nature des bandes grâce à une comparaison qualitative du gel de référence.

- **Piste IgG entier / « whole IgG »** : le rituximab est bien visible sur le gel. D'un poids moléculaire d'environ 150 kDa, celui-ci n'a pas beaucoup migré et n'a pas diffusé, donnant lieu à une bande bien délimitée.

- **Piste IgG digéré / « digested IgG »** : Cette piste correspond à la solution d'anticorps digéré non purifiée. Elle doit normalement comprendre les parties Fab, les parties Fc, d'éventuels IgG non digérés, ou des parties réduites. Nous observons dans notre cas quatre bandes. La bande de plus faible migration correspondrait à la chaîne lourde, ce qui sous-entend l'existence d'une bande correspondant à la chaîne légère, que nous retrouvons à l'extrémité de la piste. Celle-ci est toutefois peu visible, du fait du bruit et de la faible qualité de l'image. Comme nous le souhaitons, les parties Fab et Fc sont également présentes. Il est à noter que la bande caractéristique de la partie Fc est, comme attendu, moins intense que pour le Fab car la digestion du rituximab produit un Fc pour 2 Fab.

- **Piste fraction récoltée / « prot A flow through »** : Cette piste correspond à la fraction sortante de la colonne de protéine A servant à la purification de la solution. Nous avons constaté que la bande correspondant à la chaîne lourde de l'IgG a disparu, et réapparaît sur la piste correspondant à la **fraction éluee / « protein A elution »**, ce qui montre que la purification a bien eu lieu. Il est plus difficile de se prononcer quant à la séparation de la partie Fc, étant donné les faibles intensités des bandes d'origine.

Annexe III

Comparaison des modèles 1:1 et HL pour l'étude du Fab

Tous les résultats présentés dans la partie II.2 du chapitre III proviennent de régressions non-linéaires faites avec le modèle HL, qui a été choisi pour traiter les données de la même façon qu'avec le rituximab. Avec le Fab pourtant, il est certain que l'interaction est monovalente, ce qui admet que nous pourrions utiliser le modèle d'interaction 1/1. Le tableau ci-dessous permet de comparer les valeurs des paramètres obtenues avec les modèles *heterogeneous ligand*, *1/1*, et *steady state*.

Γ CD20 (pmol.cm ⁻²)	modèle						
	heterogeneous ligand			1/1			steady state
	k_{on} (10 ⁺⁵ M ⁻¹ .s ⁻¹)	k_{off} (10 ⁻¹ .s ⁻¹)	K_{Dapp} (μ M)	k_{on} (10 ⁺⁵ M ⁻¹ .s ⁻¹)	k_{off} (10 ⁻¹ .s ⁻¹)	K_{Dapp} (nM)	K_{Dapp} (μ M)
2,1 \pm 0,4	0,5 \pm 0,4	6,0 \pm 2,4	14,13 \pm 3,83	0,7 \pm 0,4	6,9 \pm 2,6	11,32 \pm 2,94	8,67 \pm 0,94
2,8 \pm 0,8	0,6 \pm 0,2	6,4 \pm 1,2	10,15 \pm 1,86	0,6 \pm 0,1	5,4 \pm 1,0	9,65 \pm 0,70	8,57 \pm 1,07
46,1 \pm 10,5	3,8 \pm 0,8	2,0 \pm 0,2	0,62 \pm 0,08	n.d	n.d	n.d	0.72 \pm 0.01

Tableau 19 : Comparaison des valeurs des paramètres cinétiques et thermodynamiques de l'interaction CD20/Fab obtenues via trois modèles différents : *heterogeneous ligand*, *1/1*, et *steady state*. Les expériences ont été réalisées au moins trois fois pour chaque pourcentage.

Pour les surfaces fonctionnalisées avec 2,1 et 2,8 pmol.cm⁻², les données fournissent des constantes cinétiques k_{on} , k_{off} , et des constantes d'équilibre K_{Dapp} semblables qu'elles soient traitées avec le modèle HL ou le modèle d'interaction 1/1. L'incertitude assez élevée observée précédemment pour la vitesse d'association quand le taux de greffage est de 2 pmol.cm⁻² est d'ailleurs retrouvée avec le modèle 1/1. Bien qu'elles soient légèrement plus faibles, les valeurs de K_D basées sur les mesures à l'équilibre restent proches de la dizaine du micromolaire. Si nous réunissions les résultats obtenus grâce aux trois modèles, les valeurs moyennes de K_D de l'interaction Fab/CD20 seraient de 11,4 \pm 1,8 et 9,5 \pm 0,6 μ M pour des distances inter-antigène de 10,3 (2 pmol.cm⁻²) et 8,4 nm (3 pmol.cm⁻²) respectivement. Ces valeurs sont hors de la gamme de concentration des solutions injectées ($C_{max} = 2\mu$ M). Leur précision peut donc être discutée mais cela nous permet toutefois d'évaluer l'affinité approximative.

Pour 46 pmol.cm^{-2} , les sensorgrammes théoriques du modèle 1/1 sont très éloignés des sensorgrammes expérimentaux, et ne nous permettent donc pas d'extraire les paramètres de l'interaction (Figure 108B). Au vu de l'aspect « biphasique » de la réponse, il est en effet évident que le modèle 1/1 ne peut être utilisé : une première interaction semble s'effectuer de manière très rapide, puis un coude nous mène ensuite vers une deuxième interaction plus lente.

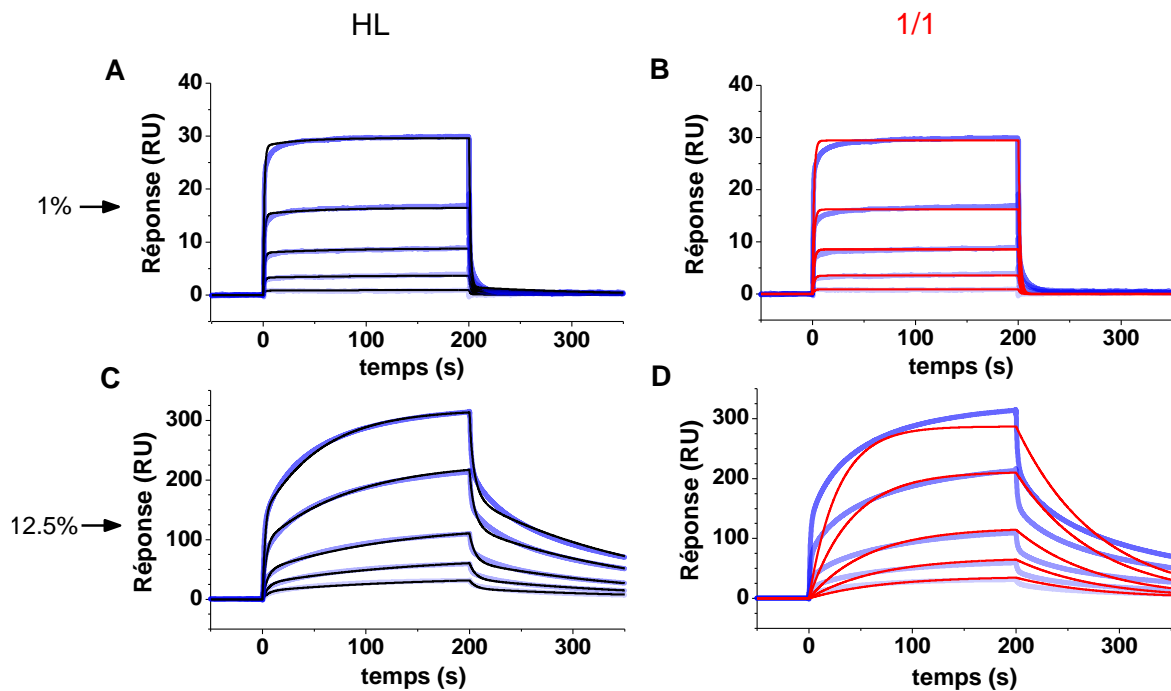


Figure 108 : Comparaison des sensorgrammes théoriques des modèles HL et 1/1 et expérimentaux pour caractériser l'interaction CD20 / Fab du rituximab. A+B : sensorgrammes obtenus avec $2,8 \text{ pmol.cm}^{-2}$ de CD20 (1%), C+D : sensorgrammes obtenus avec 46 pmol.cm^{-2} de CD20 (12,5%). Sur chaque sensorgramme ont été superposées les courbes générées par le modèle HL (noire) ou 1/1 (rouge) (correction d'indice RI = 0). Pour les surfaces à 1%, les courbes noires et rouge se superposent bien au sensorgramme expérimental. Pour les surfaces à 12,5%, seules les courbes noires (HL) sont capables de s'approcher des courbes expérimentales. Le Fab a été injecté selon une gamme de concentration allant de 50 à 2000 nM pour les surfaces à 1% (A+B), et de 50 à 1000 nM pour les surfaces à 12,5% (C+D).

Annexe IV

Communications

I. Communications orales

- L. Bar, J. Dejeu, L. Coche-Guérente, D. Boturyn. « *In-situ* click chemistry for studying biomolecular interactions in SPR and BLI » Journée scientifique Plateau Caractérisation des Interactions – Grenoble – 5 septembre 2017

- L. Bar, J. Dejeu, R. Richter, L. Guérente, D. Boturyn, Study of antigen-antibody interactions by using surface sensitive techniques, Journée annuelle des doctorants de l'Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant de Grenoble, 14 juin 2018 (anglais)

- L. Bar, J. Dejeu, R. Lartia, R. Richter, L. Coche-Guérente, D. Boturyn. *Development of new antibody mimics : peptide screening on an home-made antigenic surface with optical techniques*, 21^{ème} congrès du Groupe Français des Peptides et Protéines (GFPP), Amboise, France, 12-16 mai 2019

- L. Bar, J. Dejeu, R. Lartia, R. Richter, L. Coche-Guérente, D. Boturyn. *Development of new antibody mimics : peptide screening on an home-made antigenic surface with optical techniques*, Journée de printemps de la SCF-RA 2019, Grenoble, France, 13 juin 2019 ([Prix de la meilleure communication orale](#))

II. Communications par poster

- L. Bar, M. Degardin, R. Lartia, C. Nguyen, O. Lanvin, J. Dejeu, L. Guérente, J. Fournié, F. Molina, D. Boturyn. « Design and characterization of antibody mimics as new anti-tumor ligands » GFPP – Arcachon, France, 26-30 mars 2017

- L. Bar, R. Lartia, C. Nguyen, O. Lanvin, J. Dejeu, L. Guérente, J. Fournié, F. Molina, D. Boturyn. Characterization of antibody mimics for the development of new antitumor ligands - Journée de printemps de la SCF-RA 2017, Bourget du Lac, France, 15 juin 2017

- L. Bar, R. Lartia, C. Nguyen, O. Lanvin, J. Dejeu, L. Guérente, J. Fournié, F. Molina, D. Boturyn. Development of new antitumor ligands : Synthesis and characterization of antibody mimics. GDR Bio-Ingénierie des interfaces, 2^{èmes} journées plénières, Bordeaux, France, 28-29 juin 2017

- L. Bar, J. Dejeu, R. Lartia, R. Richter, L. Coche-Guérente, D. Boturyn. *Study of antigen-antibody interactions by using surface sensitive techniques for the design of mAb mimics*, EMBO practical course “Biomolecular interaction analysis 2018 : From molecules to cells”, Porto - Portugal, 29 octobre - 3 novembre 2018 (Prix du meilleur poster)
- L. Bar, J. Dejeu, R. Lartia, R. Richter, L. Coche-Guérente, D. Boturyn. *Study of antigen-antibody interactions by using surface sensitive techniques for the design of mAb mimics*, Journée scientifique de la Division de Chimie Physique (DCP) de la SCF et SFP, Paris, 20 novembre 2018
- L. Bar, J. Dejeu, R. Lartia, R. Richter, L. Coche-Guérente, D. Boturyn. *Peptide screening using surface sensitive techniques: a way for the development of new antibody mimics*, COST-sponsored ARBRE-MOBIEU plenary meeting “Molecular Biophysics – ABC of the puzzle of life, Zagreb, Croatie, 18-20 mars 2019 (Prix du meilleur poster)
- L. Bar, J. Dejeu, R. Lartia, R. Richter, L. Coche-Guérente, D. Boturyn. *Development of new antibody mimics : peptide screening on an home-made antigenic surface with optical techniques*, 21^{ème} congrès du Groupe Français des Peptides et Protéines (GFPP), Amboise, France, 12-16 mai 2019

III. Publication

- L. Bar, J. Dejeu, R. Lartia, F. Bano, R. P. Richter, L. Coche-Guérente, D. Boturyn. Impact of antigen density on monoclonal antibody recognition. Manuscrit en préparation.

Références bibliographiques

1. Sanchez, C. *et al.* Grasping at molecular interactions and genetic networks in *Drosophila melanogaster* using FlyNets, an Internet database. *Nucleic Acids Res.* **27**, 89–94 (1999).
2. Arnal, I. & Wade, R. H. How does taxol stabilize microtubules? *Curr. Biol.* **5**, 900–908 (1995).
3. Cancers : les chiffres clés - Qu'est-ce qu'un cancer ? Available at: <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Qu-est-ce-qu-un-cancer/Chiffres-cles>. (Accessed: 10th March 2019)
4. Lee, Y. T., Tan, Y. J. & Oon, C. E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur. J. Pharmacol.* **834**, 188–196 (2018).
5. Dreyer, C., Raymond, E. & Faivre, S. Les thérapies ciblées et leurs indications dans les tumeurs solides. *Rev. Médecine Interne* **30**, 416–424 (2009).
6. Faure, S. Thérapies ciblées anticancéreuses (1/2). *Actual. Pharm.* **54**, 57–61 (2015).
7. Ferrara, N., Hillan, K. J. & Novotny, W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**, 328–335 (2005).
8. Keating, G. M. Bevacizumab: A Review of Its Use in Advanced Cancer. *Drugs* **74**, 1891–1925 (2014).
9. Nguyen, T.-L. *et al.* mTOR Inhibition via Displacement of Phosphatidic Acid Induces Enhanced Cytotoxicity Specifically in Cancer Cells. *Cancer Res.* **78**, 5384–5397 (2018).
10. Camacho, L. H. CTLA-4 blockade with ipilimumab: biology, safety, efficacy, and future considerations. *Cancer Med.* **4**, 661–672 (2015).
11. Maude, S. L. *et al.* Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **378**, 439–448 (2018).
12. Klebanoff, C. A., Yamamoto, T. N. & Restifo, N. P. Treatment of aggressive lymphomas with anti-CD19 CAR T cells. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **11**, 685–686 (2014).
13. Thérapie génique : accès précoce aux premiers médicaments innovants 'CAR T-Cells'. Available at: <https://ansm.sante.fr>. (Accessed: 21st April 2019)
14. Lobo, E. D., Hansen, R. J. & Balthasar, J. P. Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J. Pharm. Sci.* **93**, 2645–2668 (2004).
15. Coley, W. B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* **105**, 487–511 (1893).
16. Parish, C. R. Cancer immunotherapy: The past, the present and the future. *Immunol. Cell Biol.* **81**, 106–113 (2003).
17. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495 (1975).

18. Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. & Baty, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 220–233 (2009).
19. Reichert, J. M., Rosensweig, C. J., Faden, L. B. & Dewitz, M. C. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1073–1078 (2005).
20. Scott, A. M., Wolchok, J. D. & Old, L. J. Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 278–287 (2012).
21. Baty, D. & Chames, P. Le point sur les anticorps autorisés en imagerie et en immunothérapie. *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* **21**, 255–263 (2006).
22. Adams, G. P. & Weiner, L. M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1147–1157 (2005).
23. Weiner, G. J. Rituximab: mechanism of action. *Semin. Hematol.* **47**, 115–123 (2010).
24. Johnson, P. & Glennie, M. The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells. *Semin. Oncol.* **30**, 3–8 (2003).
25. Cartron, G. *et al.* Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* **99**, 754–758 (2002).
26. Weng, W.-K. & Levy, R. Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response to Rituximab in Patients With Follicular Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **21**, 3940–3947 (2003).
27. Bang, Y.-J. *et al.* Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet* **376**, 687–697 (2010).
28. Dotan, E., Aggarwal, C. & Smith, M. R. Impact of Rituximab (Rituxan) on the Treatment of B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Pharm. Ther.* **35**, 148–157 (2010).
29. Ecker, D. M., Jones, S. D. & Levine, H. L. The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs* **7**, 9–14 (2015).
30. Knowledge Sourcing Intelligence LLP. *Monoclonal Antibodies Market - Forecasts from 2018 to 2023, Industry Report*. ID : 4618236 (2018).
31. Market Data Forecast. *Europe Monoclonal Antibodies Market - Industry Report*. ID 1186 (2018).
32. Holliger, P. & Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1126–1136 (2005).
33. Tamura, K. *et al.* FcγR2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. *Ann. Oncol.* **22**, 1302–1307 (2011).

34. Chadd, H. E. & Chamow, S. M. Therapeutic antibody expression technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 188–194 (2001).
35. Pescovitz, M. D. Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **6**, 859–866 (2006).
36. Wang, W., Wang, E. Q. & Balthasar, J. P. Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clin. Pharmacol. Ther.* **84**, 548–558 (2008).
37. Beckman, R. A., Weiner, L. M. & Davis, H. M. Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer* **109**, 170–179 (2007).
38. Wang, W., Nema, S. & Teagarden, D. Protein aggregation—Pathways and influencing factors. *Int. J. Pharm.* **390**, 89–99 (2010).
39. Roberts, C. J. Therapeutic Protein Aggregation: Mechanisms, Design, and Control. *Trends Biotechnol.* **32**, 372 (2014).
40. Ferrara, C. *et al.* Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous beta1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi alpha-mannosidase II. *Biotechnol. Bioeng.* **93**, 851–861 (2006).
41. Alley, S. C., Okeley, N. M. & Senter, P. D. Antibody–drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 529–537 (2010).
42. Norsworthy, K. J. *et al.* FDA Approval Summary: Mylotarg for Treatment of Patients with Relapsed or Refractory CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia. *The Oncologist* **23**, 1103–1108 (2018).
43. Kawashima, H. Radioimmunotherapy: A Specific Treatment Protocol for Cancer by Cytotoxic Radioisotopes Conjugated to Antibodies. *Sci. World J.* **2014**, (2014).
44. Holliger, P. & Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1126–1136 (2005).
45. Wesolowski, J. *et al.* Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **198**, 157–174 (2009).
46. Nuttall, S. D. *et al.* Selection and affinity maturation of IgNAR variable domains targeting Plasmodium falciparum AMA1. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **55**, 187–197 (2004).
47. Xenaki, K. T., Oliveira, S. & van Bergen en Henegouwen, P. M. P. Antibody or Antibody Fragments: Implications for Molecular Imaging and Targeted Therapy of Solid Tumors. *Front. Immunol.* **8**, (2017).

48. Deyev, S. M. & Lebedenko, E. N. Modern Technologies for Creating Synthetic Antibodies for Clinical application. *Acta Naturae* **1**, 32–50 (2009).
49. Robinson, M. K. *et al.* Effective treatment of established human breast tumor xenografts in immunodeficient mice with a single dose of the alpha-emitting radioisotope astatine-211 conjugated to anti-HER2/neu diabodies. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 875–882 (2008).
50. Reddy, S. *et al.* Evaluation of the anti-HER2 C6.5 diabody as a PET radiotracer to monitor HER2 status and predict response to trastuzumab treatment. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 1509–1520 (2011).
51. Santos, M. L. dos, Quintilio, W., Manieri, T. M., Tsuruta, L. R. & Moro, A. M. Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. *Braz. J. Pharm. Sci.* **54**, (2018).
52. Przepiorka, D. *et al.* FDA Approval: Blinatumomab. *Clin. Cancer Res.* **21**, 4035–4039 (2015).
53. Nagorsen, D. & Baeuerle, P. A. Immunomodulatory therapy of cancer with T cell-engaging BiTE antibody blinatumomab. *Exp. Cell Res.* **317**, 1255–1260 (2011).
54. Goel, N. & Stephens, S. Certolizumab Pegol. *mAbs* **2**, 137–147 (2010).
55. Tun, G. S. & Lobo, A. J. Evaluation of pharmacokinetics and pharmacodynamics and clinical efficacy of certolizumab pegol for Crohn's disease. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **11**, 317–327 (2015).
56. Levi, M. *et al.* A complementarity-determining region synthetic peptide acts as a miniantibody and neutralizes human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 4374–4378 (1993).
57. Park, B.-W. *et al.* Rationally designed anti-HER2/neu peptide mimetic disables P185^{HER2/neu} tyrosine kinases in vitro and in vivo. *Nat. Biotechnol.* **18**, 194–198 (2000).
58. Longin, O., Hezwani, M., Langemheen, H. van de & Liskamp, R. M. J. Synthetic antibody protein mimics of infliximab by molecular scaffolding on novel CycloTriVeratrilene (CTV) derivatives. *Org. Biomol. Chem.* (2018). doi:10.1039/C8OB01104D
59. Haußner, C., Lach, J. & Eichler, J. Synthetic antibody mimics for the inhibition of protein–ligand interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **40**, 72–77 (2017).
60. Kadam, R. U. *et al.* Potent Peptidic Fusion Inhibitors of Influenza Virus. *Science* **358**, 496–502 (2017).
61. Ding, H. *et al.* HER2-positive breast cancer targeting and treatment by a peptide-conjugated mini nanodrug. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **13**, 631–639 (2017).
62. Reff, M. E. *et al.* Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* **83**, 435–445 (1994).

63. Golay, J. *et al.* Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* **95**, 3900–3908 (2000).
64. Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G. & Ravetch, J. V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* **6**, 443 (2000).
65. Smith, M. R. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* **22**, 7359–7368 (2003).
66. Binder, M., Otto, F., Mertelsmann, R., Veelken, H. & Trepel, M. The epitope recognized by rituximab. *Blood* **108**, 1975 (2006).
67. Klein, C. *et al.* Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *mAbs* **5**, 22–33 (2013).
68. Marcus, R. *et al.* Phase III Study of R-CVP Compared With Cyclophosphamide, Vincristine, and Prednisone Alone in Patients With Previously Untreated Advanced Follicular Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **26**, 4579–4586 (2008).
69. Salles, G. *et al.* Rituximab combined with chemotherapy and interferon in follicular lymphoma patients: results of the GELA-GOELAMS FL2000 study. *Blood* **112**, 4824–4831 (2008).
70. Oers, M. H. J. van *et al.* Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction: results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial. *Blood* **108**, 3295–3301 (2006).
71. Edwards, J. C. W. *et al.* Efficacy of B-Cell-Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa032534> (2009). doi:10.1056/NEJMoa032534
72. Antonucci, A., Negosanti, M., Tabanelli, M. & Varotti, C. Treatment of refractory pemphigus vulgaris with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab): Five cases. *J. Dermatol. Treat.* **18**, 178–183 (2007).
73. Tsuchiya, Y. & Mizuguchi, K. The diversity of H3 loops determines the antigen-binding tendencies of antibody CDR loops. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **25**, 815–825 (2016).
74. Sela-Culang, I., Alon, S. & Ofran, Y. A Systematic Comparison of Free and Bound Antibodies Reveals Binding-Related Conformational Changes. *J. Immunol.* **189**, 4890–4899 (2012).
75. Cooper, A. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 557–563 (1999).
76. Núñez, S., Venhorst, J. & Kruse, C. G. Target–drug interactions: first principles and their application to drug discovery. *Drug Discov. Today* **17**, 10–22 (2012).

77. Tarcsay, Á. & Keserű, G. M. Is there a link between selectivity and binding thermodynamics profiles? *Drug Discov. Today* **20**, 86–94 (2015).
78. Chalet, L. & Wolf, F. J. THE PROPERTIES OF STREPTAVIDIN, A BIOTIN-BINDING PROTEIN PRODUCED BY STREPTOMYCETES. *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 1–5 (1964).
79. Freire, E. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. *Drug Discov. Today Technol.* **1**, 295–299 (2004).
80. Current Experimental Methods for Characterizing Protein–Protein Interactions - Zhou - 2016 - ChemMedChem - Wiley Online Library. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cmdc.201500495>. (Accessed: 24th May 2019)
81. Podobnik, M. *et al.* How to Study Protein-protein Interactions. *Acta Chim. Slov.* **63**, 424–439 (2016).
82. Biophysics in drug discovery: impact, challenges and opportunities | Nature Reviews Drug Discovery. Available at: <https://www-nature-com.inc.bib.cnrs.fr/articles/nrd.2016.123>. (Accessed: 24th May 2019)
83. Gaborit, N. *et al.* Time-resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET) to Analyze the Disruption of EGFR/HER2 Dimers. A new method to evaluate the efficiency of targeted therapy using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **286**, 11337–11345 (2011).
84. Breuer, S. *et al.* A Biochemical/Biophysical Assay Dyad for HTS-Compatible Triaging of Inhibitors of the HIV-1 Nef/Hck SH3 Interaction. *Curr. Chem. Genomics Transl. Med.* **7**, 16–20 (2013).
85. Jares-Erijman, E. A. & Jovin, T. M. FRET imaging. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1387 (2003).
86. Hoppe, A. D., Scott, B. L., Welliver, T. P., Straight, S. W. & Swanson, J. A. N-Way FRET Microscopy of Multiple Protein-Protein Interactions in Live Cells. *PLOS ONE* **8**, e64760 (2013).
87. Weng, Z. & Zhao, Q. Utilizing ELISA to monitor protein-protein interaction. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1278**, 341–352 (2015).
88. Zhang, S., Garcia-D'Angeli, A., Brennan, J. P. & Huo, Q. Predicting detection limits of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and bioanalytical techniques in general. *Analyst* **139**, 439–445 (2013).
89. Aydin, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* **72**, 4–15 (2015).
90. Jelesarov, I. & Bosshard, H. R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.* **12**, 3–18 (1999).

91. Chaires, J. B. Calorimetry and Thermodynamics in Drug Design. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 135–151 (2008).
92. Jerabek-Willemsen, M. *et al.* MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J. Mol. Struct.* **1077**, 101–113 (2014).
93. Wienken, C. J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D. & Duhr, S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat. Commun.* **1**, 100 (2010).
94. Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P. & Duhr, S. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. *ASSAY Drug Dev. Technol.* **9**, 342–353 (2011).
95. Kamat, V. & Rafique, A. Designing binding kinetic assay on the bio-layer interferometry (BLI) biosensor to characterize antibody-antigen interactions. *Anal. Biochem.* **536**, 16–31 (2017).
96. Wartchow, C. A. *et al.* Biosensor-based small molecule fragment screening with biolayer interferometry. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **25**, 669 (2011).
97. Turnbull, A. P. & Emsley, P. Studying Protein–Ligand Interactions Using X-Ray Crystallography. in *Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications* (eds. Williams, M. A. & Daviter, T.) 457–477 (Humana Press, 2013). doi:10.1007/978-1-62703-398-5_17
98. Fielding, L. NMR methods for the determination of protein–ligand dissociation constants. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **51**, 219–242 (2007).
99. Sidhu, S. S., Fairbrother, W. J. & Deshayes, K. Exploring Protein ± Protein Interactions with Phage Display. *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.* **4**, 14–25 (2003).
100. Cooper, M. A. & Singleton, V. T. A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions. *J. Mol. Recognit.* **20**, 154–184 (2007).
101. Bernoux, F. *et al.* Ellipsométrie - Instrumentation et applications. *Tech. Ing.* (2003).
102. Bernoux, F. *et al.* Ellipsométrie - Théorie. *Tech. Ing.* (2003).
103. Hilfiker, J. N. *et al.* Survey of methods to characterize thin absorbing films with Spectroscopic Ellipsometry. *Thin Solid Films* **516**, 7979–7989 (2008).
104. Feijter, J. A. D., Benjamins, J. & Veer, F. A. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air–water interface. *Biopolymers* **17**, 1759–1772 (1978).
105. Arwin, H. Spectroscopic ellipsometry and biology: recent developments and challenges. *Thin Solid Films* **313–314**, 764–774 (1998).
106. Arwin, H. Application of ellipsometry techniques to biological materials. *Thin Solid Films* **519**, 2589–2592 (2011).

107. Mora, M. F., Wehmeyer, J. L., Synowicki, R. & Garcia, C. D. Investigating Protein Adsorption via Spectroscopic Ellipsometry. in *Biological Interactions on Materials Surfaces: Understanding and Controlling Protein, Cell, and Tissue Responses* (eds. Puleo, D. A. & Bizios, R.) 19–41 (Springer US, 2009).
108. Sousa, S. R., Brás, M. M., Moradas-Ferreira, P. & Barbosa, M. A. Dynamics of Fibronectin Adsorption on TiO₂ Surfaces. *Langmuir* **23**, 7046–7054 (2007).
109. Nemeth, A. *et al.* In Situ Spectroscopic Ellipsometry Study of Protein Immobilization on Different Substrates Using Liquid Cells. *Sens. Lett.* **8**, 730–735 (2010).
110. Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Z. Für Phys.* **155**, 206–222 (1959).
111. Reviakine, I., Johannsmann, D. & Richter, R. P. Hearing What You Cannot See and Visualizing What You Hear: Interpreting Quartz Crystal Microbalance Data from Solvated Interfaces. *Anal. Chem.* **83**, 8838–8848 (2011).
112. Voinova, M. V., Rodahl, M., Jonson, M. & Kasemo, B. Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach. *Phys. Scr.* **59**, 391 (1999).
113. Dixon, M. C. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: Enabling Real-Time Characterization of Biological Materials and Their Interactions. *J. Biomol. Tech. JBT* **19**, 151–158 (2008).
114. Ferreira, G. N. M., da-Silva, A.-C. & Tomé, B. Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance. *Trends Biotechnol.* **27**, 689–697 (2009).
115. Höök, F. & Kasemo, B. The QCM-D Technique for Probing Biomacromolecular Recognition Reactions. in *Piezoelectric Sensors* (eds. Janshoff, A. & Steinem, C.) 425–447 (Springer Berlin Heidelberg, 2007). doi:10.1007/978-3-540-36568-6_12
116. Richter, R. P. & Brisson, A. R. Following the Formation of Supported Lipid Bilayers on Mica: A Study Combining AFM, QCM-D, and Ellipsometry. *Biophys. J.* **88**, 3422–3433 (2005).
117. MacDonald, H. *et al.* Influence of Aptamer Surface Coverage on Small Target Recognition: A SPR and QCM-D Comparative Study. *J. Phys. Chem. C* **123**, 13561–13568 (2019).
118. Motomiya, Y. *et al.* Circulating level of α 2-macroglobulin- β 2-microglobulin complex in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **64**, 2244–2252 (2003).
119. Minunni, M. *et al.* Detection of β -thalassemia by a DNA piezoelectric biosensor coupled with polymerase chain reaction. *Anal. Chim. Acta* **481**, 55–64 (2003).

120. Osypova, A. *et al.* Sensor Based on Aptamer Folding to Detect Low-Molecular Weight Analytes. *Anal. Chem.* **87**, 7566–7574 (2015).
121. Cooper, M. A. Optical biosensors in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 515 (2002).
122. Biacore sensor surface handbook. *GE Healthc. Bio-Sci.* (2008).
123. Brogioni, B. & Berti, F. Surface plasmon resonance for the characterization of bacterial polysaccharide antigens: a review. *MedChemComm* **5**, 1058–1066 (2014).
124. Huber, W. & Mueller, F. Biomolecular interaction analysis in drug discovery using surface plasmon resonance technology. *Curr. Pharm. Des.* **12**, 3999–4021 (2006).
125. Visentin, J. *et al.* Overcoming non-specific binding to measure the active concentration and kinetics of serum anti-HLA antibodies by surface plasmon resonance. *Biosens. Bioelectron.* **117**, 191–200 (2018).
126. Sahu, O. & Singh, N. 13 - Significance of bioadsorption process on textile industry wastewater. in *The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology* (eds. Shahid-ul-Islam & Butola, B. S.) 367–416 (Woodhead Publishing, 2019). doi:10.1016/B978-0-08-102491-1.00013-7
127. Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660–672 (1949).
128. Cheng, C. I., Chang, Y.-P. & Chu, Y.-H. Biomolecular interactions and tools for their recognition: focus on the quartz crystal microbalance and its diverse surface chemistries and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1947–1971 (2012).
129. Mammen, M., Choi, S.-K. & Whitesides, G. M. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 2754–2794 (1998).
130. Pensa, E. *et al.* The Chemistry of the Sulfur–Gold Interface: In Search of a Unified Model. *Acc. Chem. Res.* **45**, 1183–1192 (2012).
131. Samanta, D. & Sarkar, A. Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: methods and sensor applications. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 2567–2592 (2011).
132. Vericat, C., Vela, M. E., Benitez, G., Carro, P. & Salvarezza, R. C. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1805–1834 (2010).
133. Prime, K. L. & Whitesides, G. M. Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self-assembled monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 10714–10721 (1993).

134. Leo, N., Shang, Y., Yu, J. & Zeng, X. Characterization of Self-Assembled Monolayers of Peptide Mimotopes of CD20 Antigen and Their Binding with Rituximab. *Langmuir* **31**, 13764–13772 (2015).
135. Leo, N., Liu, J., Archbold, I., Tang, Y. & Zeng, X. Ionic Strength, Surface Charge, and Packing Density Effects on the Properties of Peptide Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **33**, 2050–2058 (2017).
136. Migliorini, E., Weidenhaupt, M. & Picart, C. Practical guide to characterize biomolecule adsorption on solid surfaces (Review). *Biointerphases* **13**, 06D303 (2018).
137. Jonkheijm, P., Weinrich, D., Schröder, H., Niemeyer, C. M. & Waldmann, H. Chemical Strategies for Generating Protein Biochips. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 9618–9647 (2008).
138. Löfås, S. & Mcwhirter, A. The Art of Immobilization for SPR Sensors. in *Surface Plasmon Resonance Based Sensors* (ed. Homola, J.) 117–151 (Springer Berlin Heidelberg, 2006). doi:10.1007/5346_017
139. Blasco, H. *et al.* Evaluation of a peptide ELISA for the detection of rituximab in serum. *J. Immunol. Methods* **325**, 127–139 (2007).
140. Liu, J. L., Zabetakis, D., Goldman, E. R. & Anderson, G. P. Selection and characterization of single domain antibodies against human CD20. *Mol. Immunol.* **78**, 146–154 (2016).
141. Ernst, J. A. *et al.* Isolation and Characterization of the B-Cell Marker CD20. *Biochemistry (Mosc.)* **44**, 15150–15158 (2005).
142. Baker, E. N., Baker, H. M., Anderson, B. F. & Reeves, R. D. Chelation of nickel(II) by citrate. The crystal structure of a nickel–citrate complex, $K_2[Ni(C_6H_5O_7)(H_2O)_2] \cdot 4H_2O$. *Inorganica Chim. Acta* **78**, 281–285 (1983).
143. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 2004–2021 (2001).
144. Liang, L. & Astruc, D. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview. *Coord. Chem. Rev.* **255**, 2933–2945 (2011).
145. Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2**, 565–598 (1963).
146. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 2596–2599 (2002).
147. Tornøe, C. W. & Meldal, M. Peptidotriazoles: Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions on Solid-Phase. in *Peptides: The Wave of the Future: Proceedings of the Second International and the Seventeenth American Peptide Symposium, June 9–14,*

- 2001, *San Diego, California, U.S.A.* (eds. Lebl, M. & Houghten, R. A.) 263–264 (Springer Netherlands, 2001). doi:10.1007/978-94-010-0464-0_119
148. Tornøe, C. W., Christensen, C. & Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **67**, 3057–3064 (2002).
149. Worrell, B. T., Malik, J. A. & Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **340**, 457–460 (2013).
150. Chan, T. R., Hilgraf, R., Sharpless, K. B. & Fokin, V. V. Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis. *Org. Lett.* **6**, 2853–2855 (2004).
151. Collman, J. P., Devaraj, N. K. & Chidsey, C. E. D. “Clicking” Functionality onto Electrode Surfaces. *Langmuir* **20**, 1051–1053 (2004).
152. Collman, J. P., Devaraj, N. K., Eberspacher, T. P. A. & Chidsey, C. E. D. Mixed Azide-Terminated Monolayers: A Platform for Modifying Electrode Surfaces. *Langmuir* **22**, 2457–2464 (2006).
153. Hudalla, G. A. & Murphy, W. L. Using “click” chemistry to prepare SAM substrates to study stem cell adhesion. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **25**, 5737–5746 (2009).
154. Gerasimov, J. Y. & Lai, R. Y. Design and characterization of an electrochemical peptide-based sensor fabricated via “click” chemistry. *Chem. Commun.* **47**, 8688–8690 (2011).
155. Gori, A. *et al.* Multiple epitope presentation and surface density control enabled by chemoselective immobilization lead to enhanced performance in IgE-binding fingerprinting on peptide microarrays. *Anal. Chim. Acta* **983**, 189–197 (2017).
156. Raigoza, A. F., Onyirioha, K. & Webb, L. J. Controlling noncovalent interactions between a lysine-rich α -helical peptide and self-assembled monolayers of alkanethiols on Au through functional group diversity. *Appl. Surf. Sci.* **396**, 1831–1839 (2017).
157. Prime, K. L. & Whitesides, G. M. Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self-assembled monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 10714–10721 (1993).
158. Vanderah, D. J., Meuse, C. W., Silin, V. & Plant, A. L. Synthesis and Characterization of Self-Assembled Monolayers of Alkylated 1-Thiahexa(ethylene oxide) Compounds on Gold. *Langmuir* **14**, 6916–6923 (1998).
159. Bain, C. D. *et al.* Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 321–335 (1989).
160. He, L. *et al.* Tethered Bilayer Lipid Membranes Based on Monolayers of Thiolipids Mixed with a Complementary Dilution Molecule. 1. Incorporation of Channel Peptides. *Langmuir* **21**, 11666–11672 (2005).

161. Trilling, A. K. *et al.* Orientation of llama antibodies strongly increases sensitivity of biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **60**, 130–136 (2014).
162. Carbohydrate–Protein Interactions by “Clicked” Carbohydrate Self-Assembled Monolayers. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac051919%2B>. (Accessed: 23rd January 2019)
163. Dolci, M. *et al.* Robust clicked assembly based on iron oxide nanoparticles for a new type of SPR biosensor. *J. Mater. Chem. C* **6**, 9102–9110 (2018).
164. Li, M. *et al.* Nanoscale distribution of CD20 on B-cell lymphoma tumour cells and its potential role in the clinical efficacy of rituximab. *J. Microsc.* **254**, 19–30 (2014).
165. Singh, V. *et al.* Surface Levels of CD20 Determine Anti-CD20 Antibodies Mediated Cell Death In Vitro. *PLOS ONE* **9**, e111113 (2014).
166. Meerten, T. van, Rijn, R. S. van, Hol, S., Hagenbeek, A. & Ebeling, S. B. Complement-Induced Cell Death by Rituximab Depends on CD20 Expression Level and Acts Complementary to Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *Clin. Cancer Res.* **12**, 4027–4035 (2006).
167. Carton, I., Brisson, A. R. & Richter, R. P. Label-Free Detection of Clustering of Membrane-Bound Proteins. *Anal. Chem.* **82**, 9275–9281 (2010).
168. Richter, R. P., Rodenhausen, K. B., Eisele, N. B. & Schubert, M. Coupling Spectroscopic Ellipsometry and Quartz Crystal Microbalance to Study Organic Films at the Solid-Liquid Interface. in *Ellipsometry of Functional Organic Surfaces and Films* (eds. Hinrichs, K. & Eichhorn, K.-J.) 223–248 (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-40128-2_11
169. Solano, I. *et al.* Spectroscopic ellipsometry meets AFM nanolithography: about hydration of bio-inert oligo(ethylene glycol)-terminated self assembled monolayers on gold. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 28774–28781 (2015).
170. Zhao, H., Brown, P. H. & Schuck, P. On the Distribution of Protein Refractive Index Increments. *Biophys. J.* **100**, 2309–2317 (2011).
171. Du, J. *et al.* Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab. *J. Biol. Chem.* **282**, 15073–15080 (2007).
172. Jung, L. S., Campbell, C. T., Chinowsky, T. M., Mar, M. N. & Yee, S. S. Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance Sensors to Adsorbed Films. *Langmuir* **14**, 5636–5648 (1998).
173. Schoch, R. L., Kapinos, L. E. & Lim, R. Y. H. Nuclear transport receptor binding avidity triggers a self-healing collapse transition in FG-nucleoporin molecular brushes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 16911–16916 (2012).

174. Larsson, C., Rodahl, M. & Höök, F. Characterization of DNA Immobilization and Subsequent Hybridization on a 2D Arrangement of Streptavidin on a Biotin-Modified Lipid Bilayer Supported on SiO₂. *Anal. Chem.* **75**, 5080–5087 (2003).
175. Bingen, P., Wang, G., Steinmetz, N. F., Rodahl, M. & Richter, R. P. Solvation Effects in the Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring Response to Biomolecular Adsorption. A Phenomenological Approach. *Anal. Chem.* **80**, 8880–8890 (2008).
176. Kittle, J. D. *et al.* Equilibrium Water Contents of Cellulose Films Determined via Solvent Exchange and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. *Biomacromolecules* **12**, 2881–2887 (2011).
177. Hlavacek, W. S., Posner, R. G. & Perelson, A. S. Steric effects on multivalent ligand-receptor binding: exclusion of ligand sites by bound cell surface receptors. *Biophys. J.* **76**, 3031–3043 (1999).
178. Yang, T., Baryshnikova, O. K., Mao, H., Holden, M. A. & Cremer, P. S. Investigations of Bivalent Antibody Binding on Fluid-Supported Phospholipid Membranes: The Effect of Hapten Density. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4779–4784 (2003).
179. Mack, E. T., Snyder, P. W., Perez-Castillejos, R. & Whitesides, G. M. Using Covalent Dimers of Human Carbonic Anhydrase II To Model Bivalency in Immunoglobulins. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 11701–11715 (2011).
180. Murthy, B. N., Voelcker, N. H. & Jayaraman, N. Evaluation of alpha-D-mannopyranoside glycolipid micelles-lectin interactions by surface plasmon resonance method. *Glycobiology* **16**, 822–832 (2006).
181. Pabbisetty, K. B. *et al.* Kinetic analysis of the binding of monomeric and dimeric ephrins to Eph receptors: Correlation to function in a growth cone collapse assay. *Protein Sci.* **16**, 355–361 (2007).
182. Gutiérrez-Aguirre, I. *et al.* Surface plasmon resonance for monitoring the interaction of Potato virus Y with monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* **447**, 74–81 (2014).
183. Hadzhieva, M. *et al.* Impact of Antigen Density on the Binding Mechanism of IgG Antibodies. *Sci. Rep.* **7**, 3767 (2017).
184. Adamczyk, M., Gebler, J. C., Gunasekera, A. H., Mattingly, P. G. & Pan, Y. Immunoassay Reagents for Thyroid Testing. 2. Binding Properties and Energetic Parameters of a T4 Monoclonal Antibody and Its Fab Fragment with a Library of Thyroxine Analog Biosensors Using Surface Plasmon Resonance. *Bioconjug. Chem.* **8**, 133–145 (1997).
185. Lin, S., Shih-Yuan Lee, A., Lin, C.-C. & Lee, C.-K. Determination of Binding Constant and Stoichiometry for Antibody-Antigen Interaction with Surface Plasmon Resonance. (2006). doi:info:doi/10.2174/157016406780655586

186. Svitel, J., Balbo, A., Mariuzza, R. A., Gonzales, N. R. & Schuck, P. Combined Affinity and Rate Constant Distributions of Ligand Populations from Experimental Surface Binding Kinetics and Equilibria. *Biophys. J.* **84**, 4062–4077 (2003).
187. Schuck, P. & Zhao, H. The Role of Mass Transport Limitation and Surface Heterogeneity in the Biophysical Characterization of Macromolecular Binding Processes by SPR Biosensing. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **627**, 15–54 (2010).
188. Karush, F. The Affinity of Antibody: Range, Variability, and the Role of Multivalence. in *Immunoglobulins* (eds. Litman, G. W. & Good, R. A.) 85–116 (Springer US, 1978). doi:10.1007/978-1-4684-0805-8_3
189. Melhus, K. B. *et al.* Evaluation of the binding of radiolabeled rituximab to CD20-positive lymphoma cells: an in vitro feasibility study concerning low-dose-rate radioimmunotherapy with the alpha-emitter 227Th. *Cancer Biother. Radiopharm.* **22**, 469–479 (2007).
190. Bongini, L. *et al.* Freezing immunoglobulins to see them move. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 6466–6471 (2004).
191. Stingaciu, L. R., Ivanova, O., Ohl, M., Biehl, R. & Richter, D. Fast antibody fragment motion: flexible linkers act as entropic spring. *Sci. Rep.* **6**, 22148 (2016).
192. Galanti, M., Fanelli, D. & Piazza, F. Conformation-controlled binding kinetics of antibodies. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
193. Klein, J. S. & Bjorkman, P. J. Few and Far Between: How HIV May Be Evading Antibody Avidity. *PLOS Pathog.* **6**, e1000908 (2010).
194. Saphire, E. O. *et al.* Contrasting IgG Structures Reveal Extreme Asymmetry and Flexibility. *J. Mol. Biol.* **319**, 9–18 (2002).
195. Preiner, J. *et al.* IgGs are made for walking on bacterial and viral surfaces. *Nat. Commun.* **5**, 4394 (2014).
196. Jung, H., Robison, A. D. & Cremer, P. S. Multivalent ligand-receptor binding on supported lipid bilayers. *J. Struct. Biol.* **168**, 90–94 (2009).
197. Ward, E. *et al.* A glycoengineered anti-CD19 antibody with potent antibody-dependent cellular cytotoxicity activity in vitro and lymphoma growth inhibition in vivo. *Br. J. Haematol.* **155**, 426–437 (2011).
198. Singh, V. *et al.* Surface Levels of CD20 Determine Anti-CD20 Antibodies Mediated Cell Death In Vitro. *PLoS ONE* **9**, (2014).
199. Kloboves Prevodnik, V., Lavrenčak, J., Horvat, M. & Jezeršek Novakovič, B. The predictive significance of CD20 expression in B-cell lymphomas. *Diagn. Pathol.* **6**, (2011).

200. Philippé, J. *et al.* Quantification of apoptosis in lymphocyte subsets and effect of apoptosis on apparent expression of membrane antigens. *Cytometry* **29**, 242–249 (1997).
201. Brito, J. A. & Archer, M. Chapter 9 - X-ray Crystallography. in *Practical Approaches to Biological Inorganic Chemistry* (eds. Crichton, R. R. & Louro, R. O.) 217–255 (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-0-444-56351-4.00009-9
202. Kabat, E. A., Wu, T. T. & Bilofsky, H. Sequences of Immunoglobulin Chains. *Natl. Inst. Health NIH Publ.* 80–2008 (1979).
203. Johnson, G. & Wu, T. T. Kabat Database and its applications: 30 years after the first variability plot. *Nucleic Acids Res.* **28**, 214–218 (2000).
204. Luo, J., Liu, Z., Guo, Y. & Li, M. A structural dissection of large protein-protein crystal packing contacts. *Sci. Rep.* **5**, 14214 (2015).
205. Kobe, B. *et al.* Crystallography and protein–protein interactions: biological interfaces and crystal contacts. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1438–1441 (2008).
206. Kooijman, H. *Interpretation of crystal structure determinations.* (Bijvoet Center for Biomolecular Research Crystal and Structural Chemistry, Utrecht University, 2005).
207. Frank, R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **48**, 9217–9232 (1992).
208. Frank, R. The SPOT-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. *J. Immunol. Methods* **267**, 13–26 (2002).
209. López-Pérez, P. M., Grimsey, E., Bourne, L., Mikut, R. & Hilpert, K. Screening and Optimizing Antimicrobial Peptides by Using SPOT-Synthesis. *Front. Chem.* **5**, (2017).
210. Hilpert, K., Winkler, D. F. & Hancock, R. E. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nat. Protoc.* **2**, 1333–1349 (2007).
211. Hilpert, K., Winkler, D. F. & Hancock, R. E. Cellulose-bound Peptide Arrays: Preparation and Applications. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **24**, 31–106 (2007).
212. Frank, R. & Overwin, H. SPOT Synthesis. in *Epitope Mapping Protocols* (ed. Morris, G. E.) 149–169 (Humana Press, 1996). doi:10.1385/0-89603-375-9:149
213. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149–2154 (1963).
214. Chan, W. & White, P. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach.* (Oxford University Press, 1999).
215. Laune, D. *et al.* Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *J. Immunol. Methods* **267**, 53–70 (2002).

216. Otte, L., Knaute, T., Schneider-Mergener, J. & Kramer, A. Molecular basis for the binding polyspecificity of an anti-cholera toxin peptide 3 monoclonal antibody. *J. Mol. Recognit.* **19**, 49–59 (2006).
217. Identification of a linear B-cell epitope in the catalytic domain of bothropasin, a metalloproteinase from Bothrops jararaca snake venom. *Mol. Immunol.* **104**, 20–26 (2018).
218. Robotham, J. M., Teuber, S. S., Sathe, S. K. & Roux, K. H. Linear IgE epitope mapping of the English walnut (*Juglans regia*) major food allergen, Jug r 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* **109**, 143–149 (2002).
219. Molina, F., Pau, B. & Granier, C. The PGK epitope of human thyroglobulin: A molecular marker of alternatively spliced thyroglobulin molecules? *Lett. Pept. Sci.* **4**, 201–205 (1997).
220. Hoffmüller, U. *et al.* Evolutionary transition pathways for changing peptide ligand specificity and structure. *EMBO J.* **19**, 4866–4874 (2000).
221. Lacy, M. *et al.* Identification of an Arg-Leu-Arg tripeptide that contributes to the binding interface between the cytokine MIF and the chemokine receptor CXCR4. *Sci. Rep.* **8**, 1–17 (2018).
222. Espanel, X. & Sudol, M. Yes-associated Protein and p53-binding Protein-2 Interact through Their WW and SH3 Domains. *J. Biol. Chem.* **276**, 14514–14523 (2001).
223. Bès, C. *et al.* Mapping the Paratope of Anti-CD4 Recombinant Fab 13B8.2 by Combining Parallel Peptide Synthesis and Site-directed Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 14265–14273 (2003).
224. Ngambenjawong, C., Pineda, J. M. B. & Pun, S. H. Engineering an Affinity-Enhanced Peptide through Optimization of Cyclization Chemistry. *Bioconjug. Chem.* **27**, 2854–2862 (2016).
225. Roxin, Á. & Zheng, G. Flexible or fixed: a comparative review of linear and cyclic cancer-targeting peptides. *Future Med. Chem.* **4**, 1601–1618 (2012).
226. Derreumaux, P. & Lavery, R. Les simulations numériques - Ouvrir une fenêtre sur le monde moléculaire pour mieux comprendre et agir sur les systèmes biologiques. *L'actualité Chim.* février-mars 2014, 109–112 (2014).
227. Laio, A. & Parrinello, M. Escaping free-energy minima. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12562–12566 (2002).
228. Kollman, P. A. *et al.* Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. *Acc. Chem. Res.* **33**, 889–897 (2000).

229. Huskens, J., Prins, L. J., Haag, R. & Ravoo, B. J. *Multivalency: Concepts, Research and Applications*. (John Wiley & Sons, 2018).
230. Wittmann, V. & Pieters, R. J. Bridging lectin binding sites by multivalent carbohydrates. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 4492–4503 (2013).
231. Pieters, R. J. Maximising multivalency effects in protein–carbohydrate interactions. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 2013–2025 (2009).
232. Kiessling, L. L., Gestwicki, J. E. & Strong, L. E. Synthetic Multivalent Ligands as Probes of Signal Transduction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 2348–2368 (2006).
233. Sinha, R., Kim, G. J., Nie, S. & Shin, D. M. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 1909–1917 (2006).
234. Lucie, S. *et al.* Clustering and Internalization of Integrin $\alpha\beta 3$ With a Tetrameric RGD-synthetic Peptide. *Mol. Ther.* **17**, 837–843 (2009).
235. Mutter, M. & Vuilleumier, S. A Chemical Approach to Protein Design—Template-Assembled Synthetic Proteins (TASP). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **28**, 535–554 (1989).
236. Mutter, M. *et al.* Template Assembled Synthetic Proteins (TASP) as Functional Mimetics of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **35**, 1482–1485 (1996).
237. Dumy, P. *et al.* A convenient synthesis of cyclic peptides as regioselectively addressable functionalized templates (RAFT). *Tetrahedron Lett.* **36**, 1255–1258 (1995).
238. Jencks, W. P. Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarbazone Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 475–481 (1959).
239. Ulrich, S., Boturyn, D., Marra, A., Renaudet, O. & Dumy, P. Oxime Ligation: A Chemoselective Click-Type Reaction for Accessing Multifunctional Biomolecular Constructs. *Chem. – Eur. J.* **20**, 34–41 (2014).
240. Stefanick, J. F., Ashley, J. D., Kiziltepe, T. & Bilgicer, B. A Systematic Analysis of Peptide Linker Length and Liposomal Polyethylene Glycol Coating on Cellular Uptake of Peptide-Targeted Liposomes. *ACS Nano* **7**, 2935–2947 (2013).
241. Dubacheva, G. V. *et al.* Electrochemically Controlled Adsorption of Fc-Functionalized Polymers on β -CD-Modified Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **26**, 13976–13986 (2010).
242. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
243. DeLano, W. *The PyMOL Molecular Graphics System*. (Schrödinger, LLC, 2010).

Résumé

Les anticorps monoclonaux (mAb) sont devenus un outil majeur pour le traitement de nombreux cancers. Afin de concevoir des mimes synthétiques d'anticorps, de petite taille, de grande efficacité et de haute spécificité, nous avons développé une surface antigénique basée sur le système rituximab/CD20 utilisé dans le traitement de certains lymphomes. La caractérisation de cette surface fonctionnelle a été réalisée par les techniques de microbalance à quartz (QCM-D), ellipsométrie spectroscopique (SE), et résonance plasmonique de surface (SPR), qui nous ont permis d'optimiser la densité surfacique en antigène CD20. Des études effectuées entre l'anticorps et des surfaces antigéniques ont montré combien la distance inter-CD20 influence la reconnaissance du mAb. Des séquences peptidiques appartenant aux zones d'interaction du paratope, et qui avaient préalablement été identifiées comme ayant des propriétés de reconnaissance pour le CD20 (méthode SPOT) ont été synthétisées puis criblées par SPR. Il s'est avéré que plusieurs candidats ont présenté une forte affinité pour l'antigène. Cette étude montre que le site de l'interaction avec l'épitope est plus enfoui que ce qui a été déterminé par cristallographie. Ces séquences peptidiques pourront être agencées pour former ultérieurement des édifices macromoléculaires mimant le site de reconnaissance du mAb.

Mots clés : Fonctionnalisation et caractérisation de surface, interactions biomoléculaires, mimes d'anticorps, chimie peptidique, ciblage tumoral

Abstract

Monoclonal antibodies (mAb) became a major tool for the treatment of many cancers. In order to design synthetic antibody mimics of small size, high efficacy and high specificity, we developed an antigenic surface based on the rituximab/CD20 system involved in the treatment of some lymphomas. The characterization of these functional surfaces was performed by Quartz Crystal Microbalance (QCM-D), Spectroscopic Ellipsometry (SE), and Surface Plasmon Resonance (SPR) techniques that allowed us to optimize the surface density in CD20 antigen. Studies between the antibody and antigenic surfaces have shown how the inter-CD20 distance influences mAb recognition. Peptide sequences belonging to the interaction zones of the paratope, previously identified as having recognition properties for CD20 (SPOT method), were synthesized and then screened by SPR. It was found that several candidates exhibit strong affinity for the antigen. This study also showed that the interaction site is more buried than what has been determined by crystallography. Later on, these peptide sequences will be combined on a macromolecular scaffold mimicking the mAb recognition site.

Key words : Surface functionalization and characterization, biomolecular Interactions, antibody mimics, peptide chemistry, tumor targeting