



HAL
open science

Conception, synthèse et caractérisation de mimes d'anticorps monoclonaux

Jordan Cossu

► **To cite this version:**

Jordan Cossu. Conception, synthèse et caractérisation de mimes d'anticorps monoclonaux. Autre. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV081 . tel-04529000

HAL Id: tel-04529000

<https://theses.hal.science/tel-04529000>

Submitted on 2 Apr 2024

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Chimie Biologie

Unité de recherche : Département de Chimie Moléculaire

Conception, synthèse et caractérisation de mimes d'anticorps monoclonaux

Design, synthesis and characterization of monoclonal antibody mimics

Présentée par :

Jordan COSSU

Direction de thèse :

Didier BOTURYN

DIRECTEUR DE RECHERCHE, Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Eric PEYRIN

Université Grenoble Alpes

Co-directeur de thèse

Rapporteurs :

Frédéric DUCONGE

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CEA centre de Paris-Saclay

Sonia CANTEL

MAITRESSE DE CONFERENCES HDR, Université de Montpellier

Thèse soutenue publiquement le **30 novembre 2023**, devant le jury composé de :

Didier BOTURYN

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes

Directeur de thèse

Frédéric DUCONGE

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CEA centre de Paris-Saclay

Rapporteur

Sonia CANTEL

MAITRESSE DE CONFERENCES HDR, Université de Montpellier

Rapporteuse

Nicolas SPINELLI

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Président

Sébastien PAPOT

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Poitiers

Examineur

Eric PEYRIN

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Co-directeur de thèse

Invités :

Corinne Ravelet

PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes - Département de Pharmacochimie Moléculaire

Véronique Frachet

MAITRESSE DE CONFERENCES, Ecole Pratique des Hautes Etudes / Institut pour l'Avancée des Biosciences



Remerciements


Ce projet est le fruit de trois années passées en collaboration au sein des équipes Ingénierie et Interactions Biomoléculaires (I2BM) du Département de Chimie Moléculaire et Nouveaux Outils de Vectorisation et d'Analyse (NOVA) du Département de Pharmacochimie Moléculaire de Grenoble. Cette thèse n'aurait pas été réalisable sans le soutien du laboratoire d'excellence Arcane de l'Université Grenoble-Alpes. Ces allocations de recherches m'ont permis de me consacrer pleinement à ces travaux et leur diffusion.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer ces travaux de thèse : le Dr **Frédéric Ducongé**, le Dr **Sonia Cantel**, le Dr **Sébastien Papot** ainsi que le Pr **Nicolas Spinelli**.

Je tiens à remercier sincèrement mes encadrants de thèse : Le Dr **Didier Boturyn** et le Pr **Éric Peyrin**. Didier, merci pour la confiance et le soutien que tu me témoignes depuis ce stage de Master 1 il y a plus de quatre ans déjà. Merci également de m'avoir permis d'exploiter au maximum ces trois années de thèse que ce soit par de l'enseignement, de l'encadrement de nombreuses étudiant(e)s en stage, des congrès et conférences ou encore des collaborations. Je n'aurais pu espérer meilleur directeur de thèse. Éric, merci pour les nombreux conseils et leçons que tu m'as prodigués que ce soit au labo ou sur un terrain de tennis. J'espère toujours avoir l'occasion de te montrer mes progrès un jour.

Je tiens également à remercier la Pr **Corinne Ravelet**, ma troisième encadrante. Merci pour ta présence quotidienne au laboratoire à mes débuts, me permettant de me former dans les meilleures conditions à la manipulation d'aptamères. Faute d'être devenu aussi rigoureux qu'un chimiste « analytique », j'ose croire que j'ai beaucoup progressé à ton contact. Je vous remercie également tous les trois pour votre implication dans les relectures et corrections de ce manuscrit. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Je remercie également les Dr **Véronique Frachet** et Dr **Liliane Coche-Guérante** pour m'avoir régulièrement accueilli et initié aux méthodes de Cytométrie en Flux et Résonance Plasmonique de Surface.

Au cours de cette thèse, j'ai eu l'occasion de rencontrer et me lier d'amitié avec de nombreuses personnes au sein des laboratoires. Merci tout d'abord aux anciens collègues devenus des amis : **Pierre, Brayan, Eugénie, Claire, Yoann, Gilles et Christopher**. Je n'ai aucun doute que l'on continuera de se croiser comme on le fait depuis votre départ quand l'occasion se présente. Vous serez toujours les bienvenus à la maison ! Merci également à **Laure** pour ton incroyable gentillesse et ta bienveillance lors mon arrivée en stage. Maintenant que je suis en Belgique aussi, j'espère pouvoir recroiser ta route un de ces jours. Merci aussi à ceux qui ont commencé après moi et qui ont à leur tour occupé une place importante au quotidien dans les deux laboratoires : **Rim, Juliette, Pauline, Océane, Cyril, Jawad et Pierrick**. Votre bonne humeur autant au labo que lors des sorties restau ou des soirées jeux ont été une vraie bouffée d'air frais pour cette dernière année. Pour finir avec les non permanents, je souhaite remercier du fond du cœur mes compagnons de galère tout au long de cette thèse : **Auriane et Blandine**, les moments passés à répéter nos présentations à 3 en pyjama, la nuit avant les conférences vont me manquer.  Ce snowboarder en est devenu le symbole. Ainsi que **Sean** et **Théo** mes « tennis mates » (avec Pierre bien sûr). Vous êtes des amours, Je regrette de ne pas avoir eu plus de temps pour profiter de votre présence sur un court de tennis ou autour d'une bonne bière. Je vous remercie également de m'avoir porté sur les derniers mois lors de ces nombreuses sessions rédaction à la BU.

Je remercie également l'intégralité de mes étudiantes en stage : **Léa, Claire, Candice, Christine, Salomé, Lucie et Amira**. Vous encadrer a été un réel plaisir doublé d'une expérience très enrichissante.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des équipes I2BM et NOVA pour leurs accueils et pour nos échanges. Je remercie particulièrement le Dr. **Farid Oukacine** pour sa patience et le temps passé à faire de la TDA, ainsi que **Régine Rozand, Pascale Battistoni** et **Angèle Nicole** pour leur disponibilité et leur efficacité.

Je remercie l'ICMG de Grenoble pour m'avoir chaque jour donné accès à son plateau Caractérisation des Interactions.

Je souhaite ensuite remercier les membres de ma famille et de ma belle-famille qui ne cessent de me soutenir dans mes projets professionnels comme personnels. Tout d'abord je tiens à remercier mes parents : **Gisèle et François**, pour les valeurs et la détermination qui m'ont été transmises. Sans votre amour et votre soutien autant moral que financier depuis toujours, je n'aurais jamais pu réaliser de si beaux projets. Je remercie également **Kevin** et **Kilian**. On ne se le dit pas assez souvent mais je suis fière de ce qu'on est tous les trois devenus et de vous avoir pour frères. A tous les quatre, je vous aime ! Merci également à **Frédéric** et **Lydie** de m'avoir accueilli comme un prince au sein de votre famille. Vous me donnez souvent cette agréable impression de plus croire en moi que moi-même.

Enfin, je ne saurais conclure sans remercier **Marine** qui partage ma vie depuis plus de dix ans et me porte un amour inconditionnel depuis toutes ces années. Nos rythmes respectifs font souvent de notre quotidien un enfer, mais il n'y a personne avec qui je souhaiterais vivre un telle galère plus qu'avec toi. Parmi tous les modèles qui m'ont inspirés ces dernières années, tu es de loin la figure la plus importante de par ton courage et ta détermination à toute épreuve. Je suis si fier de toi ! Je n'ai aucun doute que cette nouvelle aventure à deux, ne fera que renforcer notre complicité. Je t'aime.

Il est souvent d'usage de terminer les remerciements par une citation. Mes proches sauront sans même la lire celle que j'ai choisie, mais à mes yeux aucune ne saurait plus représenter les belles rencontres effectuées dans le cadre de cette thèse que celle-ci :

“Happiness is only real when shared”

- Into the Wild -

Sommaire

LISTE DES ACIDES AMINES.....	1
ABREVIATIONS.....	2
AVANT-PROPOS.....	3

Chapitre I : Introduction générale

I. L'IMMUNOTHERAPIE CONTRE LE CANCER : LES ANTICORPS MONOCLONAUX (MABS)	10
I. 1. LES MABS : DECOUVERTE ET GENERALITES	10
I. 2. MECANISMES D'ACTION DES MABS	13
I.2.1 <i>Les anticorps neutralisants/antagonistes</i>	13
I.2.2 <i>Cytotoxicité dépendante du complément (CDC)</i>	14
I.2.3 <i>Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC)</i>	14
I. 3. CAS DU RITUXIMAB ET SA CIBLE L'ANTIGENE CD20	15
I. 4. LIMITES ET CHALLENGES DU DEVELOPPEMENT D'ANTICORPS POUR LA THERAPIE.....	17
II. DERIVES ISSUS DES ANTICORPS.....	19
II. 1. FRAGMENTATION	19
- « <i>Fragment antigen-binding</i> » : <i>Fab</i> et <i>F(ab')₂</i>	20
- « <i>Single-Chain Variable Fragments</i> » (<i>scFv</i>).....	20
- « <i>Single-Domain Antibodies</i> » (<i>sdAbs</i>)	21
- « <i>Fragment crystallizable (Fc) region</i> ».....	21
II. 2. MULTIMERISATION.....	21
II. 3. CONJUGAISON	22
III. DERIVES PROTEIQUES / PEPTIDIQUES NON ISSUS DES IMMUNOGLOBULINES.....	25
IV. DERIVES NON PROTEIQUES : LES APTAMERES.....	26
IV. 1. STRUCTURE D'UN APTAMERE.....	26
IV.1.1 <i>Rappel de la structure des oligonucléotides</i>	26
IV.1.2 <i>Structures secondaires et tertiaires des oligonucléotides.</i>	28
IV. 2. APTAMERES VS ANTICORPS	30
IV. 3. METHODOLOGIE DE SELECTION DES APTAMERES	31
IV.3.1 <i>Principe général de la méthode de SELEX</i>	31
IV.3.2 <i>Création de Banques d'aptamères</i>	33
IV.3.3 <i>Les variantes de la méthode SELEX</i>	37
IV. 4. STRATEGIES D'OPTIMISATION DE LA SEQUENCE DES APTAMERES.	41
IV. 5. STRATEGIES DE CARACTERISATION DES INTERACTIONS	45
IV. 6. APPLICATIONS DES APTAMERES EN THERAPIE.....	47
V. PRESENTATION DES TRAVAUX DE THESE	49

Chapitre II : Sélection d'aptamères dirigés contre un fragment peptidique de l'antigène CD20

I. CHOIX ET SYNTHÈSE DE LA CIBLE ISSUE DE L'ANTIGÈNE CD20.	54
I. 1. INTRODUCTION	54
I. 2. SYNTHÈSES DES PEPTIDES FCD20 ET FCD20 SCBL	55
II. CHOIX DE LA CE COMME MÉTHODE SEPARATIVE ASSOCIÉE AU PROCESSUS DE SELEX.....	58
II. 1. INTRODUCTION	58
II. 2. PRINCIPE DE LA CE	59
II.2.1 <i>Injection au sein du capillaire</i>	59
II.2.2 <i>Transport et séparation au sein du capillaire</i>	59
II.2.3 <i>Détection au sein du capillaire</i>	61
II. 3. PRINCIPE ET AVANTAGES DE LA CE-SELEX	62
III. OPTIMISATION DES PARAMÈTRES INHÉRENTS À LA CE ET À LA FORMATION DE COMPLEXE ENTRE LA CIBLE ET LA BANQUE D'ADN.	64
III. 1. CHOIX DE LA BANQUE D'ADN	64
III. 2. CHOIX DU TAMPON ET DU PH	64
III. 3. TEST DE STABILITÉ DU PEPTIDE DANS LE TAMPON	65
IV. HYPOTHÈSES SUR LES CAUSES DU PROFIL ELECTROPHORETIQUE DU PEPTIDE FCD20	66
IV. 1. HYPOTHÈSE 1 : PRÉSENCE D'UN PRODUIT SECONDAIRE ISSU DE LA SYNTHÈSE ?.....	66
IV. 2. HYPOTHÈSE 2 : RÉSIDUS DE PEPTIDE LINEAIRE ?.....	67
IV. 3. HYPOTHÈSE 3 : PRÉSENCE D'AGREGATS ?	69
IV. 4. HYPOTHÈSE FINALE : FORMATION DE 2 « FOLDAMÈRES » LORS DE L'OXYDATION DES THIOLS.	71
V. MISE EN PLACE DE LA MÉTHODE DE CE-SELEX.....	72
V. 1. EFFICACITÉ DE L'AMPLIFICATION PAR PCR	72
V. 2. MISE EN PLACE DU PROTOCOLE DE DIGESTION ENZYMATIQUE DES BRINS D'ADN COMPLÉMENTAIRES EN SORTIE DE PCR.	73
V. 3. IDENTIFICATION DE LA FENÊTRE DE COLLECTION.	76
VI. PROCESSUS DE SÉLECTION EN 4 CYCLES	78
VI.1.1 <i>Sélection en 4 rounds</i>	78
VI.1.2 <i>Séquençage illumina et alignement de séquences</i>	81
VII. CONCLUSION	83

Chapitre III : Caractérisation des interactions fCD20-aptamères

I.	CARACTERISATION PAR CE DES 5 CANDIDATS RETENUS LORS DU SEQUENÇAGE.....	86
II.	CARACTERISATION VIA DES METHODES D'IMMOBILISATION SUR SURFACE.....	88
II. 1.	PRINCIPE DE LA RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE.....	89
II. 2.	CARACTERISATION PAR SPR.....	91
II.2.1	<i>Choix de la surface.....</i>	91
II.2.2	<i>Choix du modèle utilisé pour l'exploitation des données expérimentales.....</i>	91
II.2.3	<i>Contrôle de la surface via des injections de RTX.....</i>	93
II.2.4	<i>Modélisation de la réponse théorique attendue.....</i>	94
II.2.5	<i>Résumé des analyses effectuées.....</i>	94
III.	CARACTERISATION EN SOLUTION VIA LE TITRAGE CALORIMETRIQUE ISOTHERME.....	97
III. 1.	PRINCIPE DE L'ITC.....	97
III.1.1	<i>Principe général.....</i>	97
III.1.2	<i>Importance de la concentration des partenaires ainsi que de la valeur de « c ».....</i>	99
III. 2.	CARACTERISATION DANS LES CONDITIONS DE SELECTION.....	99
III.2.1	<i>Principe général des analyses effectuées.....</i>	99
III.2.2	<i>Caractérisation dans des conditions identiques à celles de l'électrophorèse capillaire.....</i>	100
III. 3.	OPTIMISATION DES CONDITIONS ET CARACTERISATION EN CONDITIONS DE PH PHYSIOLOGIQUES.....	101
III.3.1	<i>Caractérisations dans le tampon TGK à pH = 7,3.....</i>	101
III.3.2	<i>Caractérisations dans des tampons compatibles avec les tests cellulaires.....</i>	103
III. 4.	DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS <i>IN VITRO</i>	105
IV.	CARACTERISATION <i>IN CELLULO</i> VIA CYTOMETRIE EN FLUX.....	109
IV. 1.	PRINCIPE DE LA METHODE.....	109
IV. 2.	CHOIX DES LIGNEES CELLULAIRES.....	110
IV. 3.	TEST D'UN CONTROLE ANTICORPS POUR VALIDER LES CELLULES CHOISIES.....	110
IV. 4.	OPTIMISATION DES CONDITIONS.....	111
IV.4.1	<i>Comparaison des tampons RPMI 1640 et PBS.....</i>	112
IV.4.2	<i>Impact de la concentration en aptamères ainsi que des temps d'incubations et de centrifugation.....</i>	113
IV.4.3	<i>Impact de la concentration en cellules.....</i>	115
IV.4.4	<i>Impact de la température sur l'interaction aptamères-cellules.....</i>	116
IV.4.5	<i>Résumé des conditions retenues.....</i>	116
IV.4.6	<i>Comparaison en présence de version scramble des aptamères.....</i>	117
V.	CONCLUSION.....	118

Chapitre IV : Optimisation des séquences et formation de systèmes divalents

I.	CONCEPTION DE FRAGMENTS A PARTIR DES APTA°1 ET APTA°2	120
I.1.1	<i>Principe général de la simulation in silico effectuée via le logiciel « mfold ».....</i>	<i>121</i>
I.1.2	<i>Simulation des structures 2D théoriques de l'Apta°1 et identification de fragments</i>	<i>121</i>
I.1.3	<i>Simulation des structures 2D théoriques de l'Apta°2 et identification de fragments.</i>	<i>122</i>
I.1.4	<i>Simulation des structures 2D théoriques des Apta°1 et Apta°2 scrambles.....</i>	<i>124</i>
II.	CARACTERISATIONS IN VITRO DES INTERACTIONS FRAGMENTS-FCD20.....	125
II.1.1	<i>Caractérisation in vitro des interactions fragments-fCD20 par CE</i>	<i>125</i>
II.1.2	<i>Caractérisation in vitro des interactions fragments-fCD20 par ITC</i>	<i>127</i>
III.	CARACTERISATION IN CELLULO VIA CMF DES INTERACTIONS FRAGMENTS-CD20	129
IV.	SYNTHESE DE CYCLO-PEPTIDES EN TANT QUE CHASSIS MOLECULAIRES	132
IV. 1.	CHOIX DES LIGATIONS CHIMIOSELECTIVES	132
IV. 2.	SYNTHESE DES CHASSIS CYCLO-PEPTIDIQUES.....	133
IV.2.1	<i>Protocole de synthèse général.....</i>	<i>133</i>
IV.2.2	<i>Châssis cyclo-peptidique contenant deux fonctions oxyamines.....</i>	<i>135</i>
IV.2.3	<i>Châssis cyclo-peptidique contenant trois fonctions oxyamines</i>	<i>136</i>
IV.2.4	<i>Châssis cyclo-peptidique contenant quatre fonctions oxyamines.....</i>	<i>137</i>
IV.2.5	<i>Châssis cyclo-peptidique contenant une fonction oxyamine et une fonction alcyne ..</i>	<i>138</i>
IV.2.6	<i>Bilan de la synthèse peptidique</i>	<i>139</i>
V.	SYNTHESE DES FRAGMENTS A1-F1 ET A2-F1 MODIFIE EN 3'	140
V. 1.	PRINCIPE DE LA SYNTHESE D'OLIGONUCLEOTIDES EN PHASE SOLIDE (SPOS).....	140
V. 2.	SYNTHESE DES APTAMERES 3'-ALDEHYDE.....	141
V. 3.	BILAN DE LA SYNTHESE D'APTAMERES	144
VI.	SYNTHESE DU PREMIER COMPOSE BIVALENT.....	144
VI. 1.	FORMATION DE LA LIGATION OXIME.....	145
VI. 2.	PURIFICATION PAR GEL D'ELECTROPHORESE	146
VI. 3.	CONCLUSION DES PREMIERS ESSAIS DE SYNTHESE D'UN DIMERE D'APTA°1-F1	148
VII.	CONCLUSIONS	148

Conclusion Générale

Partie expérimentale

I.	DNA APTAMER SELECTION PROCESS.....	157
I. 1.	APTAMER SELECTION AGAINST THE CD20 ANTIGEN USING THE CE-SELEX APPROACH.....	157
I. 2.	USE OF THE QPCR TO CONTROL AND OPTIMIZE THE DNA AMPLIFICATION STEP USING PCR.	158
I. 3.	USE OF THE QPCR COMBINED TO THE CE DETERMINE THE BEST COLLECTION WINDOW AFTER MIGRATION INTO THE CAPILLARY.....	158
I. 4.	PCR AMPLIFICATION AND SINGLE-STRANDED DNA PRODUCTION	159
I. 5.	FLUORESCENT ANISOTROPY TO CONFIRM THE SELECTIVE DIGESTION OF DNA.....	159
I. 6.	BINDING AFFINITY, CLONING AND SEQUENCING	161
II.	SURFACE PLASMON RESONANCE	162
II. 1.	MATERIALS AND EQUIPMENT	162
II. 2.	GENERAL PROCEDURE FOR THE SENSOR CHIPS FUNCTIONALIZATION USING CUAAC CLICK CHEMISTRY. ...	162
II.2.1	<i>Reaction Mixture for the click chemistry:</i>	162
II.2.2	<i>Sensor chips pre-treatment:</i>	163
II.2.3	<i>« In situ » covalent peptide grafting by CuAAC.....</i>	163
II. 3.	KINETICS STUDIES WITH THE RITUXIMAB AS A POSITIVE CONTROL	163
II. 4.	KINETICS STUDIES WITH THE APTAMERS.....	164
III.	ITC MEASUREMENTS	165
IV.	FLOW CYTOMETRY	166
V.	PEPTIDE SYNTHESIS	167
V. 1.	MATERIALS AND EQUIPMENT	167
V. 2.	GENERAL PROCEDURE FOR LINEAR PROTECTED PEPTIDES SYNTHESIS BY SPPS.....	168
V.2.1	<i>First coupling on 2-Chlorotrityl resin.....</i>	168
V.2.2	<i>First coupling on Gly-SasrinTM resin.....</i>	168
V.2.3	<i>Elongation steps following the Fmoc/tBu strategy.....</i>	169
V. 3.	GENERAL PROCEDURE FOR HEAD-TO-TAIL CYCLISATION REACTION	169
V. 4.	GENERAL PROCEDURE FOR SIDE-CHAIN-TO-SIDE-CHAIN CYCLISATION REACTION.	169
V. 5.	GENERAL PROCEDURE FOR BOC, TBU AND TRT PROTECTING GROUPS REMOVAL.	170
V. 6.	GENERAL PROCEDURE FOR THE COUPLING OF ETHOXYETHYLIDENEAMINOXY LINKER ON PEPTIDES.	170
V. 7.	GENERAL PROCEDURE FOR ALLOC PROTECTING GROUP REMOVAL.	170
V. 8.	GENERAL PROCEDURE FOR OXYAMINE DEPROTECTION.	170
VI.	OLIGONUCLEOTIDES SYNTHESIS.....	181
VI. 1.	GENERAL PROCEDURE FOR DNA SYNTHESIS	181
VI. 2.	GENERAL PROCEDURE FOR 3'-DIOL DNA OXIDATION	182
VII.	CONJUGATE SYNTHESIS	185
VII. 1.	GENERAL PROCEDURE FOR THE OXIME BOUND FORMATION	185
VII. 2.	GEL ELECTROPHORESIS	185

Table des Figures

Figure 1 : Structure d'une immunoglobuline G.	11
Figure 2 : Évolution de la nature des anticorps à visée thérapeutique.	12
Figure 3 : Mécanismes d'action des anticorps, exemple du rituximab.....	14
Figure 4 : Représentation de l'antigène CD20 inséré dans la membrane plasmique.	16
Figure 5 : Différenciation des lymphocytes B et expression de l'antigène CD20.	17
Figure 6 : Représentation des fragments de mAbs ainsi que d'une estimation de leurs poids moléculaires.	20
Figure 7 : Structures et interactions des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN.....	27
Figure 8 : Représentation des conformations adoptées, exemple d'une guanine.	28
Figure 9 : Représentation des repliements intramoléculaires pouvant être adoptés par les acides nucléiques.....	29
Figure 10 : Illustration de la conception d'une séquence permettant la création de banques d'aptamères.	31
Figure 11 : Principe général de la sélection d'aptamères <i>via</i> la méthode de SELEX.....	32
Figure 12 : Illustrations de divers exemples de modifications chimiques des nucléotides, au niveau du pentose, des groupements phosphate ou de la nucléobase, dans l'optique d'augmenter leur stabilité.	36
Figure 13 : Structures de constructions multimériques de RGD.	44
Figure 14 : Structure secondaire supposée du pegaptinib.	47
Figure 15 : Illustration schématique de la première étape du projet visant à sélectionner des aptamères spécifiques d'un fragment de l'antigène CD20.....	50
Figure 16 : Illustration schématique de la modélisation 2D des aptamères et de leurs fragments.	51
Figure 17 : Schématisation de la formation de constructions multivalentes.	51
Figure 18 : Représentation de la cible choisie pour la sélection par CE-SELEX et de son contrôle négatif.	55
Figure 19 : Cycle d'élongation d'un peptide par SPPS.	56
Figure 20 : Synthèse du peptide 1 : fCD20.....	57
Figure 21 : Caractérisation du peptide fCD20.....	58
Figure 22 : Principe de la séparation d'un mélange d'espèces par la méthode d'électrophorèse capillaire.	61
Figure 23 : Représentation schématique de la méthode de CE-SELEX développée dans le cadre du projet.	63
Figure 24 : Étude de stabilité sur trois jours du peptide fCD20 dans le tampon TGK à pH = 8,3.	66
Figure 25 : Analyse de masse effectuée en MALDI du peptide 1 fCD20.....	67

Figure 26 : Chromatogrammes UV ($\lambda = 214\text{nm}$) comparatifs des peptides fCD20 ponté et linéaire. ..	68
Figure 27 : Exemple d'addition de Michael entre un groupement thiol et un composé carbonyle α,β -insaturé.....	68
Figure 28 : Analyses en LC-MS de l'interaction entre l'oxyde de mésityle et les thiols libres du fCD20 linéaire.	69
Figure 29 : Somme des deux espèce (UV $\lambda = 210\text{ nm}$).....	70
Figure 30 : Electrophérogramme UV ($\lambda = 210\text{ nm}$) d'un échantillon de CD20 obtenu <i>via</i> le protocole (b) dans un tampon compatible avec la méthode de CE-MS.....	71
Figure 31 : Gamme d'étalonnage permettant le calcul de l'efficacité réactionnelle par la méthode de qPCR.	73
Figure 32 : Digestion du brin complémentaire par l'exonucléase Lambda.....	74
Figure 33 : Différences de taux de polarisation de fluorescence entre de l'ADN simple brin ou double brin.	75
Figure 34 : Electrophérogramme des conditions retenues pour la sélection par mesure de l'intensité de fluorescence ($\lambda = 480\text{ nm}$).	78
Figure 35 : Évolution de l'affinité apparente de la matrice d'ADN pour le fCD20 déterminée entre chaque cycle par CE.	80
Figure 36: Superposition des électrophérogrammes obtenus à l'issue du cycle 4.....	80
Figure 37 : Schématisation du processus de séquençage.....	82
Figure 38 : Alignement séquentiel effectué sur les 5 aptamères les plus représentés après séquençage.	83
Figure 39 : Electrophérogrammes obtenus en détection par fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 480\text{nm}$).....	87
Figure 40 : Propagation de l'onde évanescente en conditions de réflexion totale interne.....	89
Figure 41 : Principe de la SPR.	90
Figure 42 : Surface antigénique fonctionnalisée en fCD20 obtenue <i>via</i> CUAAC in situ.....	91
Figure 43 : Représentation schématique de l'étude d'un K_D <i>via</i> une isotherme de Langmuir.	93
Figure 44 : Contrôle de l'interaction entre la surface fonctionnalisée en fCD20 et le RTX.	93
Figure 45 : Simulations des interactions aptamères-surface.....	94
Figure 46 : Sensorgramme obtenu initialement par injection d'une gamme de concentration (25 à 400 μM pour l'aptamère 1 sur une surface fonctionnalisée en fCD20 (densité calculée de 27 $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$).95	95
Figure 47 : Sensorgramme obtenu après lavage sur Nanosep 10K, par injection d'une gamme de concentration (25 à 400 μM) pour l'aptamère 1 sur une surface fonctionnalisée en fCD20 (densité calculée de 27 $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$).	96
Figure 48 : Appareillage et principe d'une analyse par titrage calorimétrique isotherme.....	98
Figure 49 : Résultats bruts obtenus <i>via</i> les caractérisations par ITC dans le tampon TGK à pH = 8,3. 101	101
Figure 50 : Résultats bruts obtenus <i>via</i> les caractérisations par ITC dans le tampon TGK à pH = 7,3. 102	102
Figure 51 : Résultats bruts obtenus <i>via</i> les caractérisations par ITC dans le tampon RPMI 1640.	103

Figure 52 : Résultat brut obtenu pour le blanc <i>via</i> une caractérisation par ITC dans le tampon PBS.	104
Figure 53 : Résultat brut obtenu pour l'apta°1 + fCD20 <i>via</i> une caractérisation par ITC dans le tampon PBS.....	105
Figure 54 : Schéma illustrant le principe de la cytométrie en flux.....	109
Figure 55 : Tests préliminaires réalisés en CMF entre un anticorps anti CD20 marqué par de l'Alexa 488 et les lignées cellulaires Raji et Jurkat.	111
Figure 56 : Résultats obtenus à l'issue d'une analyse de CMF des aptamères 1 et 2 dans le tampon RPMI 1640.....	112
Figure 57 : Résultats obtenus à l'issue d'une analyse de CMF des aptamères 1 et 2 dans le tampon PBS.	112
Figure 58 : Comparaison de la stabilité des cellules Raji sans marquage dans le tampon RPMI 1640 (à gauche) et PBS (à droite).	113
Figure 59 : Analyse de la stabilité des cellules Raji (à gauche) et Jurkat (à droite) dans les nouvelles conditions.	114
Figure 60 : Résultats obtenus à l'issue d'une analyse de CMF à partir d'une gamme de concentration de l' aptamère°1 dans le tampon PBS.	114
Figure 61 : Résultats obtenus à l'issue d'une analyse de CMF des aptamères 1 et 2 dans le tampon PBS en présence de 250 000 cellules par tube à 25°C.....	115
Figure 62 : Résultats obtenus à l'issue d'une analyse de CMF des aptamères 1 et 2 dans le tampon PBS. Comparaison entre à gauche : Incubation à 4°C et à droite : Incubation à 25°C.....	116
Figure 63 : Résultats obtenus à l'issue d'une analyse de CMF des aptamères 1 et 2 en comparaison avec leurs versions scrambles (0,5 µM) dans le tampon PBS en présence de 500 000 cellules par tube à 25°C.	117
Figure 64 : Prédiction des structures 2D adoptées préférentiellement par l'Apta°1 <i>via</i> le logiciel mfold.	121
Figure 65 : Prédiction des structures 2D adoptées préférentiellement par les fragments issus de l'Apta°1 <i>via</i> le logiciel mfold.	122
Figure 66 : Prédiction des structures 2D adoptées préférentiellement par l'Apta°2 <i>via</i> le logiciel mfold.	123
Figure 67 : Prédiction des structures 2D adoptées préférentiellement par les fragments issus de l'Apta°2 <i>via</i> le logiciel mfold.	123
Figure 68 : Prédiction des structures 2D adoptées préférentiellement par l'Apta°1 scbl (à gauche) et l'Apta°2 scbl (à droite) <i>via</i> le logiciel mfold.	124
Figure 69 : Superposition des électrophérogrammes obtenus lors de la caractérisation du fragment Apta°1-F1.....	125
Figure 70 : Superposition des électrophérogrammes obtenus lors de la caractérisation du fragment Apta°1-F2.....	126
Figure 71 : Superposition des électrophérogrammes obtenus lors de la caractérisation du fragment Apta°2-F1.....	126

Figure 72 : Résultats bruts obtenus <i>via</i> les caractérisations par ITC pour le fragment Apta°1-F1, dans le tampon TGK à pH = 7,3.	128
Figure 73 : Résultats bruts obtenus <i>via</i> les caractérisations par ITC pour le fragment Apta°1-F2, dans le tampon TGK à pH = 7,3.	128
Figure 74 : Résultats bruts obtenus <i>via</i> les caractérisations par ITC pour le fragment Apta°2-F1, dans le tampon TGK à pH = 7,3.	129
Figure 75 : Résultats obtenus à l'issue d'une analyse de CMF de l'Apta°1 en comparaison avec les fragments Apta°1-F1 et Apta°1-F2 (0,5 µM) dans le tampon PBS en présence de 500 000 cellules par tube à 25°C ; n= 1.	130
Figure 76 : Résultats obtenus à l'issue d'une analyse de CMF de l'Apta°2 en comparaison avec les fragments Apta°2-F1 (0,5 µM) dans le tampon PBS en présence de 500 000 cellules par tube à 25°C; n= 1.	130
Figure 77 : Représentation schématique des 4 cyclo-peptides.	134
Figure 78 : A) Synthèse du châssis peptidique 3.	135
Figure 79 : A) Synthèse du châssis peptidique 4.	136
Figure 80 : A) Synthèse du châssis peptidique 5.	137
Figure 81 : A) Synthèse du châssis peptidique 6.	138
Figure 82 : Cycle d'élongation d'un peptide par SPOS.	141
Figure 83 : Synthèse et caractérisation de l'oligonucléotide 7 (Apta°1-F1) modifié en 3' aldéhyde..	142
Figure 84 : Synthèse et caractérisation de l'oligonucléotide 8 (Apta°2-F1) modifié en 3' aldéhyde..	143
Figure 85 : Synthèse du dimère 9.	145
Figure 86 : Électrophorèse sur gel effectuée après un test de greffage par ligation oxime.	146
Figure 87 : Spectre de masse source MALDI sur une matrice 3HPA/DAC.	147
Figure 88 : Experimental setup for the fluorescence anisotropy measurements.	160

Une partie des Figures présentées ci-dessus a été réalisée à l'aide du logiciel BioRender
(app.biorender.com)

Table des Tableaux

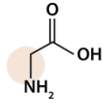
Tableau 1 : Caractéristiques des ADC disponibles sur le marché (tiré du rapport : Immunowatch - Antibody-drug conjugate 2023 Edition n°6).....	23
Tableau 2 : Caractéristiques des autres anticorps conjugués disponibles sur le marché (tiré du rapport : Immunowatch - Antibody-drug conjugate 2023 Edition n°6).	24
Tableau 3 : Aptamères vs. Anticorps, résumé des principaux avantages liés à l'utilisation d'aptamères.	30
Tableau 4 : Caractéristiques, avantages et inconvénients des principales méthodes permettant de caractériser les interactions aptamère-cible.	46
Tableau 5 : Récapitulatif des différentes conditions testées pour favoriser la formation de complexe.	65
Tableau 6 : Dh expérimentaux des espèces confondues.....	70
Tableau 7 : Dh exp. de l'espèce majoritaire.	76
Tableau 8 : Dh exp. de l'espèce minoritaire	70
Tableau 9 : Comparaison du comportement du digestat par rapport au double brin et à la banque initiale, en présence d'une amorce anti sens 5'-TR , par la méthode de polarisation de fluorescence.	76
Tableau 10 : Comparaison des CT obtenus après amplification par qPCR de différentes fractions collectées en CE afin de déterminer la fenêtre de collection optimale.....	77
Tableau 11 : Conditions retenues pour le processus de CE-SELEX effectué en 4 cycles.....	79
Tableau 12 : Récapitulatif des analyses préliminaires effectuées en CE pour les Apta°1 à 5.....	87
Tableau 13 : Conditions des études théoriques.	94
Tableau 14 : Liste des conditions utilisées dans le cadre des caractérisations par SPR.	96
Tableau 15 : Récapitulatif des données obtenues <i>via</i> caractérisation par ITC dans le tampon TGK à pH 8,3.....	100
Tableau 16 : Récapitulatif des données obtenues <i>via</i> caractérisation par ITC dans le tampon TGK à pH 7,3.....	103
Tableau 17 : Liste non exhaustive de sélections effectuées par CE-SELEX sur des cibles protéiques de poids moléculaire supérieur à 10 kDa.	106
Tableau 18 : Liste non exhaustive de sélections effectuées par CE-SELEX sur des cibles poids moléculaire inférieur à 10 kDa.	107
Tableau 19 : Récapitulatif des caractérisations par ITC pour les fragments d'aptamères dans le TGK (pH= 7,3).	129
Tableau 20 : Récapitulatif des synthèses de cyclo-peptides.....	139
Tableau 21 : Récapitulatif des synthèses d'oligonucléotides	144
Table 22: Experimental conditions for the ITC measurements.	165

Table des Équations

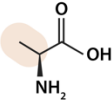
Équation 1 : Calcul de la mobilité électrophorétique d'une espèce chargée au sein d'un capillaire. ...	60
Équation 2 : Efficacité réactionnelle d'un processus de qPCR.....	72
Équation 3 : Calcul de la concentration massique (Loi de Beer-Lambert adaptée).....	74
Équations 4 : Calculs des taux de polarisation (a) et anisotropie de fluorescence (b).	74
Équation 5 : Calcul du facteur à appliquer pour une collection en sortie du capillaire, basée sur la fluorescence.	76
Équation 6 : Calcul expérimental de l'affinité entre la banque et la cible après chaque cycle de sélection.	79
Équations 7 : Formation du complexe (LA) entre le ligand (L) et l'analyte (A), avec k_{on} la constante d'association et k_{off} la constante de dissociation.	92
Équation 8 : Relation entre les constantes cinétiques k_{on} , k_{off} et la constante thermodynamique K_D	92
Équation 9 : Relation entre la réponse à l'équilibre (R_{eq}), la réponse maximale (R_{max}), la concentration en analyte ($[A]$) et la constante d'affinité (K_D).	92
Équation 10 : Relation entre la quantité de chaleur mesurée (Q), Le volume de la cellule (V_{cell}), l'enthalpie de l'interaction (ΔH_r), la concentration totale en partenaire dans la cellule ($[M]_t$), la constante d'association (K_a) et la concentration en Ligand $[L]$	98
Équation 11 : Relation entre la valeur de c , la stœchiométrie (n), K_a et $[M]_t$	99

Liste des acides aminés

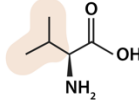
Chaines latérales non polaires



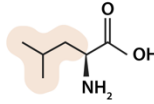
Glycine
Gly, G



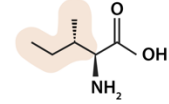
Alanine
Ala, A



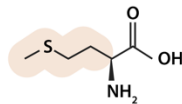
Valine
Val, V



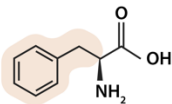
Leucine
Leu, L



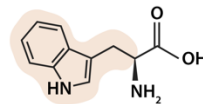
Isoleucine
Ile, I



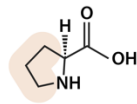
Méthionine
Met, M



Phénylalanine
Phe, F

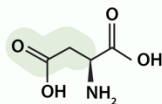


Tryptophane
Trp, W

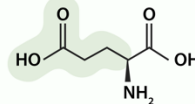


Proline
Pro, P

Chaines latérales chargées

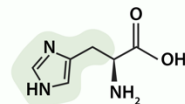


Aspartate
Asp, D

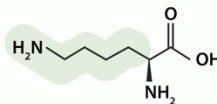


Glutamate
Glu, E

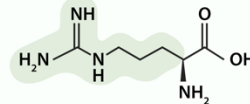
Charge négative



Histidine
His, H



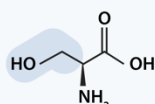
Lysine
Lys, K



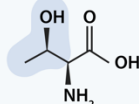
Arginine
Arg, R

Charge positive

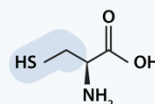
Chaines latérales polaires non chargées



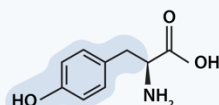
Sérine
Ser, S



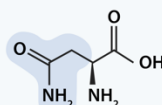
Thréonine
Thr, T



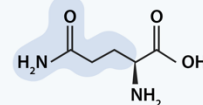
Cystéine
Cys, C



Tyrosine
Tyr, Y



Asparagine
Asn, N



Glutamine
Gln, Q

Abréviations

Dans certains cas, les acronymes anglophones ne seront pas traduits pour rester fidèle à la signification anglaise.

A

A	Adénosine
ADC	Antibody Drug Conjugate
ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
ADCP	Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Alk	Alcyne
Alloc	Allyloxycarbonyle
AoA	Acide aminoxyacétique
ARC	Antibody-Radionuclide Conjugates
ARN	Acide ribonucléique
ASO	Oligonucléotide Antisens

B

BCR	B-cell receptor
BLI	Bi-layer interferometry
Boc	tert-Butoxycarbonyle

C

C	Cytidine
CDC	Complement Dependent Cytotoxicity
CDR	Complementarity Determining Region
CE	Électrophorèse Capillaire
CmF	Cytométrie en Flux
CT	Cycle Threshold
CuAAC	Copper Catalyzed Alkyne-Azide
Cy5	Cyanine 5
CZE	Capillary Zone Electrophoresis

D

db	double brin
DCM	Dichlorométhane
Dh	Diamètre hydrodynamique
DIPEA	N,N-Diisopropyléthylamine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMTr	Diméthoxytrityle
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
DP	Puissance délivrée
ds	double strand

E

Eei	Ethoxyethylidène
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELAA	Enzyme-linked aptamer assay
ePCR	emulsion Polymerase Chain Reaction
ESI	Electrospray Ionization

F

Fab	Fragment of antigen binding
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FAM	6-Carboxyfluorescein
Fc	Fragment Crystallizable
FcR	Récepteur Fc
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fmoc	9-fluorenylméthoxycarbonyle

G

G	Guanosine
GO	Graphene Oxide

H

HC	Heavy Chain
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

I

Ig	Immunoglobuline
INCa	Institut National du Cancer
ITC	Isothermal Titration Calorimetry

K

KAT	Potassium AcylTrifluoroborate
------------	-------------------------------

K_d Constante d'équilibre de dissociation

L

LC Light Chain

LH Lymphomes Hodgkiniens

LNA Locked Nucleic Acids

LNH Lymphomes non-Hodgkiniens

M

mAb Anticrops monoclonaux

MALDI Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation

mRNA ARN messenger

MS Spectrométrie de masse

N

NH₄OAc Acétate d'ammonium

NHS N-Hydroxysuccinimidyl

NK Natural Killer

Nt Nucléotides

P

PBS Phosphate Buffered Saline

PCR Polymerase Chain Reaction

PDB Protein Data Bank

PEG Polyéthylène glycol

PyBop Benzotriazol-1-yl-oxytrypyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate

Q

qPCR quantitative PCR

R

RAFT Regioselectively Addressable Functionalized Template

RP Reverse Phase

S

SAM Self-Assembled-Monolayer

sb simple brin

scbl scramble

scFv Single-chain Variable Fragment

sdAbs Single-Domain Antibodies

SEC Size Exclusion Chromatography

SELEX Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment

siRNA ARN interférent

SPOS Synthèse d'Oligonucléotides en Phase solide

SPPS Synthèse Peptidique en Phase solide

SPR Surface Plasmon Resonance

ss single strand

SSO Splice-switching Oligonucleotides

T

T Thymidine

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

tBu Tertiobutyle

TFA Acide Trifluoroacétique

TIS Triisopropylsilane

TNF Facteur de Nécrose Tumorale

t_r temps de rétention

Trt Trityle

U

U Uridine

UPLC Ultra Performance Liquid-Mass Spectrometry

UV Ultraviolet

V

VEGFR Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Avant-propos

Depuis quelques décennies, les progrès biotechnologiques ont permis le développement de nouveaux outils thérapeutiques de plus en plus performants. Parmi eux, on retrouve les biomédicaments dont la production requiert une source biologique, telle que des cellules ou des bactéries. Par la production de ces composés, l'industrie a pu s'affranchir progressivement des matières premières d'origines humaines et animales. C'est notamment le cas de l'insuline utilisée en France actuellement, obtenue par recombinaison génétique.¹ Cette catégorie de médicament inclut entre autres les vaccins, visant à provoquer une réponse immunitaire de l'organisme, ou les anticorps monoclonaux. Ces derniers sont au cœur du développement de nouvelles thérapies depuis une vingtaine d'année puisqu'ils permettent de cibler des mécanismes pathologiques extrêmement précis. Leur utilisation en immunothérapie en tant que traitement complémentaire permet ainsi de limiter les effets secondaires, inhérents aux traitements existant tels que la chimiothérapie.

Toutefois, bien que leur nombre évolue chaque année avec plus de 170 commercialisés en Avril 2023, dans divers traitement tels que les maladies inflammatoires chroniques et les cancers,² certaines limites entravent toujours leur utilisation en thérapie. Parmi les principales, on retrouve les phénomènes de polymorphismes, les coûts de production, les poids moléculaires élevés ainsi qu'une faible stabilité.³ Il y a donc un réel intérêt dans le développement de systèmes permettant de contourner ces limites tout en conservant cette spécificité pour une cible. Différentes stratégies ont été développées dans cet optique, que ce soit des composés issus des anticorps, issus d'autres sources biologiques ou encore totalement synthétiques.

C'est dans cette dernière catégorie que s'inscrit notre projet, avec pour objectif le développement de constructions à base d'oligonucléotides et de peptides mimant l'anticorps rituximab (MabThera®). Cette immunoglobuline de 150 kDA environ, cible spécifiquement l'antigène CD20, protéine transmembranaire exprimée par les lymphocytes B. Pour se faire, nous proposons une la réalisation de composés totalement synthétiques basés sur la sélection d'aptamères spécifiques de l'antigène CD20. Les travaux effectués seront développé selon le plan suivant :

Le chapitre I s'articule autour du contexte dans lequel s'inscrivent les thérapies ciblées à base notamment d'anticorps et de leurs dérivés protéiques et non protéiques. L'accent sera mis ensuite sur le développement, la sélection et la caractérisation d'aptamères comme éléments de reconnaissance. Dans le chapitre II, nous verrons la synthèse du peptide choisi comme cible ainsi que l'élaboration d'un processus de CE-SELEX, visant à sélectionner des aptamères spécifiques de l'antigène CD20. Le chapitre III s'articule autour de la caractérisation *via* différentes méthodes de l'interaction entre le CD20 et les aptamères sélectionnés. Enfin, le chapitre IV relate les étapes visant à optimiser les caractéristiques des oligonucléotides sélectionnés, ainsi que les étapes de synthèse de macromolécules peptidiques. Ces résultats ont conduit à la formation de composés divalents dans l'optique de tester les effets de multivalences sur l'interaction avec la cible. L'évolution du projet sera enfin discutée dans la partie conclusions et perspectives.

Chapitre I

Introduction générale

L'institut National du cancer (INCa) estime en 2023 le nombre de cancers en France à 433 000, soit une augmentation de 14% par rapport à 2018 et 98% par rapport à 1990.⁴ Bien que cette croissance soit essentiellement liée à l'augmentation et au vieillissement de la population, la part attribuable aux risques de cancers sur la période 1990-2023 avoisine les 20%. Cependant, une étude menée en 2018 montre une diminution globale du taux d'incidence standardisé de mortalité* : -2% par an chez les hommes et -0,7% par an chez les femmes.⁵ Cela peut s'expliquer par plusieurs facteurs, à commencer par des diagnostics plus précoces, résultats des campagnes de sensibilisation, par des programmes de dépistage ou encore par la spécialisation des infrastructures hospitalières. Enfin, les avancées thérapeutiques importantes, conséquences de la mobilisation et des efforts alloués à la recherche en oncologie, jouent un rôle primordial dans cette baisse d'incidence.

Il existe 3 types de traitements dits « classiques » dans la prise en charge des cancers⁶ : la chirurgie, la radiothérapie et les traitements médicaux. Le premier vise à retirer la tumeur, nécessitant généralement de retirer la totalité de l'organe, à l'instar des mastectomies (cas du cancer du sein). Le second permet la destruction de la tumeur par une irradiation à distance conduisant également à l'irradiation des tissus environnants. Cette altération des cellules saines résulte généralement en l'apparition d'effets secondaires. Enfin les traitements médicaux, dont la chimiothérapie cytotoxique et l'hormonothérapie sont les plus classiques, ont une action systémique. Au contraire des deux précédents, ils permettent de traiter une tumeur métastasée ou en cours de dissémination. La plupart du temps, ces traitements conduisent à des effets secondaires pouvant affaiblir d'avantage les patients.

C'est pourquoi, grâce aux récents progrès scientifiques et technologiques, la recherche s'est tournée depuis quelques années vers la médecine de précision à l'instar de l'immunothérapie spécifique et des thérapies ciblées. Toutes deux reposent sur la compréhension des caractéristiques et mécanismes génétiques des cellules tumorales. [L'immunothérapie spécifique](#) vise à restaurer l'efficacité du système immunitaire quand la [thérapie ciblée](#) vise à

* L'indice standardisé de mortalité est calculé, pour un groupe donné, comme le rapport entre le nombre de décès effectivement observés sur une période donnée et le nombre de décès qui seraient survenus au cours de cette même période si ce groupe avait été soumis à la mortalité par âge de l'ensemble de la population. Un rapport supérieur à 1 s'interprète comme une surmortalité dans le groupe (INSEE).

bloquer la croissance ou la propagation de la tumeur en reconnaissant un récepteur particulier sur la cellule cancéreuse.

La première catégorie englobe les composés activateurs du système immunitaire permettant d'induire une réponse immunologique contre les tumeurs. Ces traitements ont donc une approche indirecte, ne ciblant pas la cellule tumorale directement. Dans cette optique, deux approches ont été développées : une visant à stimuler certaines cellules immunitaires et la seconde visant à marquer les cellules tumorales pour les rendre plus reconnaissables par le système immunitaire. Parmi ces thérapies, on retrouve le concept d'inhibiteur de point de contrôle immunitaire permettant de renverser l'immunosuppression induite par la tumeur.⁷ Ces traitements innovants, maintenant utilisés dans plusieurs cas de cancers, ont pour fonction l'inhibition de protéines surexprimées par les tumeurs et qui suppriment ou inhibent l'action du système immunitaire. C'est le cas notamment de l'ipilimumab (Yervoy), premier inhibiteur de point de contrôle immunitaire accepté par la FDA (Food and Drug Administration), basé sur les travaux de James P. Allison et Tasuku Honjo, prix Nobel de médecine en 2018.⁸

A l'inverse les thérapies ciblées vont avoir une action directe par ciblage de la cellule tumorale. Le terme « ciblées » implique une volonté de ne détruire que les cellules cibles sans altérer (ou le moins possible) les tissus sains environnants ce qui est un enjeu majeur de la thérapie moderne depuis les années 1990. D'après l'INCa, 107 molécules répondant à ces critères sont décrites à ce jour pour le traitement de cancers.⁹ Dans la littérature scientifique, les classements sont multiples, parfois basés sur leur mode d'action, parfois sur le type de cibles visées.¹⁰⁻¹² On compte majoritairement 3 niveaux de cibles visant à inhiber les voies de transduction suractivées lors de la prolifération des cellules tumorales : Les facteurs de croissance, les récepteurs membranaires ou encore des éléments présents à l'intérieur des cellules. Un exemple représentatif de ces molécules inhibitrices est le bevacizumab (Avastin®) qui en se fixant sur un récepteur VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor) tyrosine kinase, inhibe l'interaction entre ce récepteur et le facteur de croissance VEGF, responsable de l'angiogénèse.¹³ La combinaison de cet anticorps avec le traitement plus classique de chimiothérapie permet une augmentation significative du taux de survie chez des patients atteints de différents types de cancers métastasés.¹⁴

Enfin, un troisième type d'immunothérapie dite passive (car indirecte) englobe certains anticorps se liant directement aux cellules tumorales *via* la reconnaissance spécifique d'antigènes surfaciques. Ces interactions induisent des effets cytolytiques par le recrutement de cellules du système immunitaire.¹⁵ Ce rôle de vecteur spécifique d'un antigène sera détaillé dans la suite de ce manuscrit.

I. L'Immunothérapie contre le cancer : les anticorps monoclonaux (mAbs)

I. 1. Les mAbs : découverte et généralités

Le premier succès clinique associé aux anticorps revient à Emil von Behring et à Shibasaburo Kitasato qui démontrèrent en 1890, qu'une dose non létale de toxine diphtérique ou tétanique induit un gain d'immunité lors de l'administration ultérieure d'une dose létale de ces toxines. Ils ont observé que cette substance, qu'ils nommèrent antitoxine, est contenue dans le sérum des animaux infectés puisque l'immunité qu'elle procure peut être transférée par le sérum. Cette découverte valut à Mr Behring le 1er prix Nobel de médecine en 1901. Depuis cette période, les anticorps sont au cœur de nombreuses études notamment pour le développement de nouveaux traitements.¹⁶

Aussi nommées Immunoglobulines (Ig), les anticorps sont des glycoprotéines présentes sous forme soluble dans le plasma et sous forme membranaire en tant que récepteurs localisés à la surface de la membrane plasmique des lymphocytes B (B-cell receptor : BCR).¹⁷ Ils sont répartis en 5 classes : les IgA, IgD, IgE, IgG et IgM qui diffèrent par la composition des chaînes lourdes (HC : Heavy Chain). Les IgG sont les anticorps les plus abondants dans le sang humain (entre 70 et 85% des Ig)¹⁸ et également les seuls utilisés en thérapie.

Structurellement, un anticorps est une molécule polypeptidique d'environ 150kDa composée de 2 HC identiques et 2 chaînes légères (LC : Light Chain) reliées entre elles par des ponts disulfures (Figure 1). Au total, une IgG se décompose en trois fragments,^{19,20} séparables par digestion enzymatique à la papaine :

- **Les deux fragments Fabs** (Fragment antigen-binding) sont eux même composés d'une partie constante et d'une région variable, constituée de boucles dites CDR (Complementary

determining region). Cette extrémité N-terminale nommée paratope reconnaît spécifiquement une fraction de l'antigène nommée épitope.

- Le fragment constant Fc (Fragment crystallizable) permet la reconnaissance par le système immunitaire *via* les récepteurs Fc (FcR) présents sur certaines cellules immunitaires et induisant une réponse biologique.

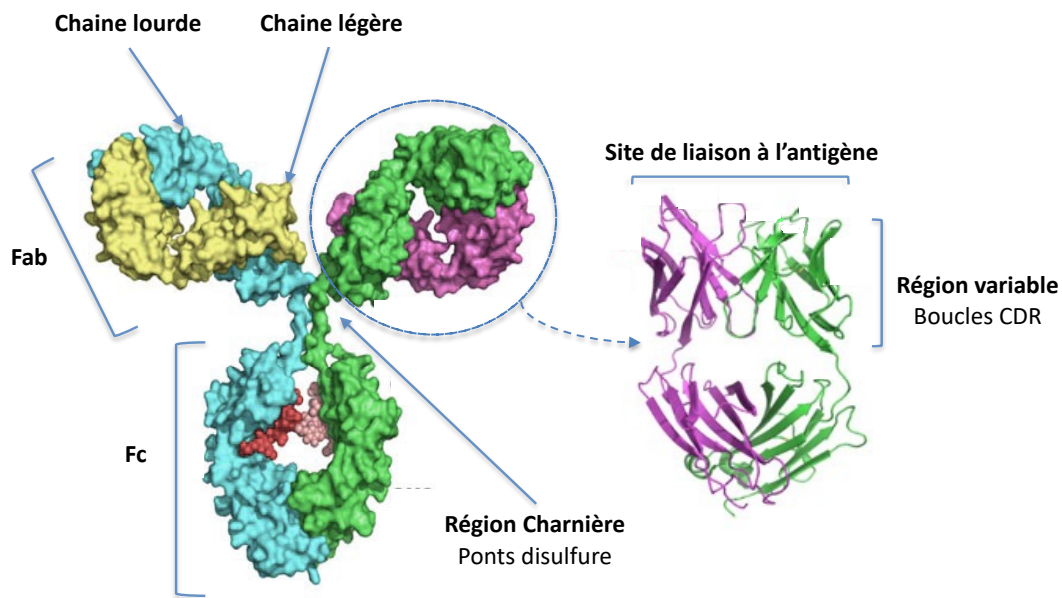


Figure 1 : Structure d'une immunoglobuline G.

A la fin du 19^{ème} siècle, divers cas de guérisons temporaires ou définitives ont été mentionnés chez des patients atteints de sarcomes ou carcinomes, suite à une infection bactérienne de la peau nommée érysipèle.²¹ Ces constatations conduisirent à la même période, un jeune chirurgien New-yorkais du nom de William B. Coley, à s'interroger sur le rôle de cette infection dans la rémission d'un patient dont les pronostics de guérison étaient considérés comme nuls.²² Dans l'optique de valider sa théorie, il injecta la bactérie à dix autres patients. Les résultats furent mitigés de par la difficulté à contrôler l'infection, parfois trop faible et sans effet, parfois trop forte et conduisant au décès du patient. Toutefois dans les cas où l'infection était virulente, une régression de la maladie était observée. Coley continua ses travaux sur le sujet et conçut un vaccin connu sous le nom de « Coley's toxins » permettant de simuler une infection et résultant en un traitement efficace.²³ Ce fut la 1^{ère} démonstration empirique du rôle joué par le système immunitaire dans le traitement de tumeur. Toutefois, au cours du 20^{ème} siècle, la question du rôle du système immunitaire dans le traitement de tumeur a fait grandement débat chez les immunologistes.²⁴

C'est dans les années 1980 qu'un consensus est finalement adopté suite aux travaux de George J. F. Köhler et César Milstein, lauréats du prix Nobel de médecine. La méthode développée permet la production d'anticorps monoclonaux *via* une lignée cellulaire hybride (hybridomes) obtenue par la fusion de plasmocytes murins avec des cellules myélomes immortalisées.²⁵ C'est ainsi que l'idée que les anticorps puissent être utilisés à des fins thérapeutiques prit de l'ampleur.

Les premiers anticorps à visée thérapeutique étant murins, leur injection induit une forte réponse immunitaire de l'organisme hôte. Cette immunogénicité accompagnée de symptômes tels que de la fièvre, se traduit par la production d'anticorps anti-murin (« HAMA » pour « Human anti-murin antibodies ») et résulte en une élimination rapide et une efficacité moindre du traitement.²⁶ Le développement de mAbs a donc naturellement évolué avec pour objectif de réduire ce rejet par une humanisation progressive.^{3,27} Tout d'abord par la production d'anticorps dit chimériques dont seul le domaine variable est murin (environ 70% de la protéine est humaine). La partie Fc humaine permet une meilleure reconnaissance par le système immunitaire. Ensuite des mAbs dits humanisés ont vu le jour avec seules les boucles CDR d'origine murine (environ 85% de la protéine est humaine). Enfin des Ig totalement humaines ont également été développées, même si la proportion reste faible aujourd'hui. Cette évolution est illustrée en Figure 2.

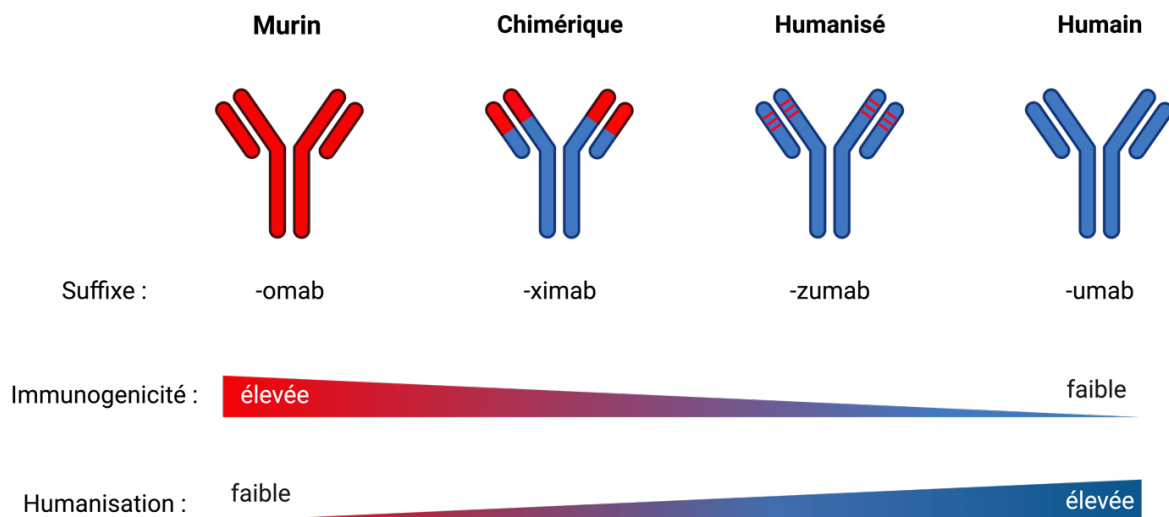


Figure 2 : Évolution de la nature des anticorps à visée thérapeutique. L'Humanisation progressive permet une forte diminution de l'immunogénicité. Un fragment Fc d'origine humaine permet également une meilleure reconnaissance par le système immunitaire. Adapté de la revue de A.Baldo.²⁸

I. 2. Mécanismes d'action des mAbs

Les anticorps peuvent agir selon différents mécanismes (Figure 3) qui peuvent être dépendants soit de la région Fc soit de la région Fab :^{20,29}

I.2.1 Les anticorps neutralisants/antagonistes

Les anticorps neutralisants ont la faculté de bloquer, par effet direct, l'activité biologique d'antigènes en se liant spécifiquement à des épitopes reconnus comme des sites critiques dans la fonction de la cible.¹⁹ Cette interaction va permettre de bloquer le site de fixation des ligands naturels, limitant ainsi la transduction de signaux, souvent déréglés lors de la prolifération des tumeurs. Les cibles peuvent être des antigènes exogènes (tels que des virus), ou des auto antigènes (tels que des facteurs de croissance ou des cytokines). Les applications au même titre que les cibles sont très diverses, incluant entre autres la neutralisation de cytokines, intégrines et facteurs de croissance :

- Action anti-cytokine :

Exemple de l'**infiximab**, un mAb chimérique ayant une affinité et une spécificité élevées pour le Facteur de Nécrose Tumorale alpha (TNF α).³⁰

- Action anti-intégrine :

Exemple du **natalizumab**, un mAb humanisé inhibiteur sélectif de la molécule d'adhésion intégrine $\alpha 4\beta 1$, utilisé dans le traitement de la sclérose en plaques.³¹

- Action anti facteur de croissance :

Exemple du **bévacizumab**, un mAb anti-VEGF permettant d'inhiber l'angiogenèse et la vasculogenèse.¹⁴

En opposition, certains anticorps sont capables d'induire des effets cytotoxiques sur la cellule à laquelle ils se lient, par l'action de cellules cytotoxiques/phagocytaires ou protéines interagissant avec la partie constante. Il existe ainsi deux types de mécanismes indirects liés à la reconnaissance de la portion Fc de l'anticorps :^{32,33}

1.2.2 Cytotoxicité dépendante du complément (CDC)

Ce mécanisme de lyse cellulaire intervient lorsqu'un mAb se fixe à la surface des cellules cibles. La protéine C1q va ensuite reconnaître la partie Fc de l'immunoglobuline, ce qui va enclencher une cascade réactionnelle impliquant des protéines du système du complément. Cette cascade enzymatique résulte en la formation de pores dans la membrane cellulaire conduisant à sa lyse.

1.2.3 Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC)

L'ADCC ou ADCP (Phagocytose à médiation Cellulaire dépendante de l'anticorps) est un processus au cours duquel la cellule opsonisée par l'anticorps est lysée par l'intervention de cellules effectrices du système immunitaire. Il existe différents types de cellules permettant ce processus : les cellules « Natural Killer » (NK), neutrophiles, éosinophiles et macrophages, qui expriment des récepteurs FcγR permettant la reconnaissance de la région Fc. Dans le cas de l'ADCC, la stimulation de ces récepteurs entraîne la libération de cytokines, perforines et granzymes résultant en une lyse cellulaire. Dans le cas de l'ADCP, cette interaction conduit à une phagocytose de la cellule opsonisée.

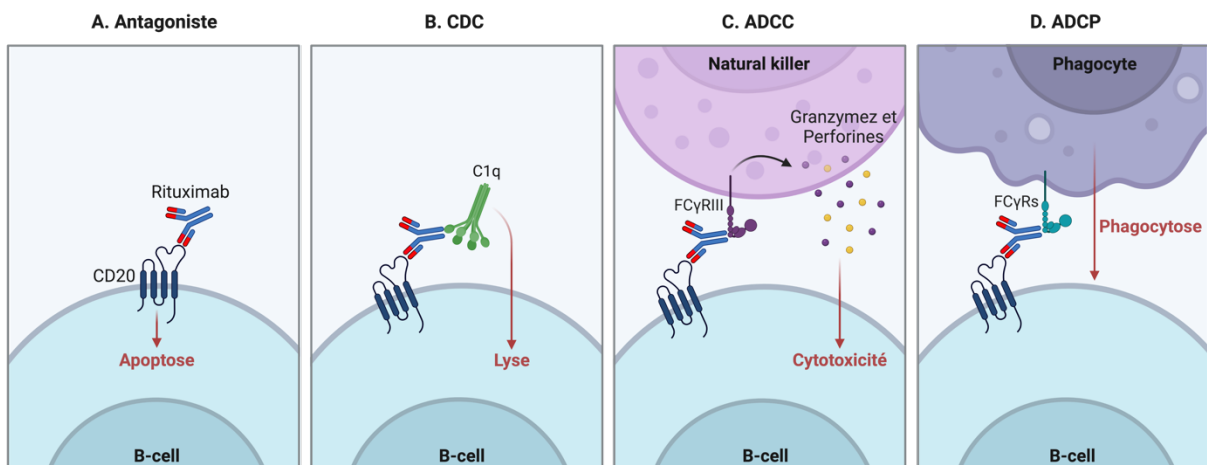


Figure 3 : Mécanismes d'action des anticorps, exemple du rituximab. Adapté de la revue de J. Weiner.³⁴

Comme illustré en Figure 3 avec l'exemple du rituximab (RTX), l'action des anticorps ne se limite généralement pas à un unique mécanisme. Le RTX en est un bon exemple puisqu'il a

été démontré que lors d'une interaction avec sa cible, tous les types de mécanismes sont enclenchés, bien que les voies Fc-dépendantes soient majoritairement impliquées.^{34,35}

I. 3. Cas du Rituximab et sa cible l'antigène CD20

Dans le cadre de ce projet, l'anticorps choisi comme modèle est le RTX, premier mAb approuvé par la FDA américaine en 1997, puis en 1998 en Europe. Commercialisé sous le nom de Rituxan® aux Etats-Unis, Japon et Canada et MabThéra® en Europe, cet mAb chimérique de 145 kDa est utilisé en tant que médicament pour le traitement de certains lymphomes et maladies auto-immunes. D'après un rapport paru en 2018 édité par l'INCa, les lymphomes représentent 6% des nouveaux cas de cancer, occupant la 5^{ème} place des cancers les plus fréquents chez l'adulte.³⁶ Il en existe deux types principaux : les Lymphomes Hodgkiniens (LH) et les Lymphomes Non-Hodgkiniens (LNH) qui correspondent à plus de 80 types de lymphomes (90 % des cas diagnostiqués). Les cellules B étant en constante circulation dans le système lymphatique, il est malheureusement commun que la dissémination soit déjà bien avancée lors du diagnostic. Il est alors nécessaire de mettre en place un traitement systémique correspondant à l'association de chimiothérapies avec le RTX.

A partir des années 2000, des études ont montré l'implication, dans l'interaction avec le rituximab, d'un motif localisé sur une large boucle extracellulaire de la protéine CD20 humaine, exprimée sur les lymphocytes B matures.³⁷ Différents antigènes sont exprimés sur la membrane des cellules B : CD19, CD22, et CD20, mais c'est ce dernier qui fut considéré comme la cible optimale, car son interaction avec l'anticorps ne résulte pas en une internalisation.³⁸

Cet antigène est une phosphoprotéine d'un poids moléculaire d'approximativement 35 kDa, possédant 4 domaines transmembranaires, et deux boucles extracellulaires (Figure 4). La plus longue des boucles contient 43 acides aminés, dont l'épitope reconnu par le RTX, et est contrainte par un pont disulfure. En effet, il a été démontré que l'anticorps interagissait particulièrement avec deux fragments de la séquence : ¹⁷⁰ANPS1⁷³ et ¹⁸²YCYSI¹⁸⁶, extrêmement proches dans l'espace du fait du pont disulfure ¹⁶⁷C-¹⁸³C. Cette interaction est caractérisée par un K_D d'environ 5nM.³⁹

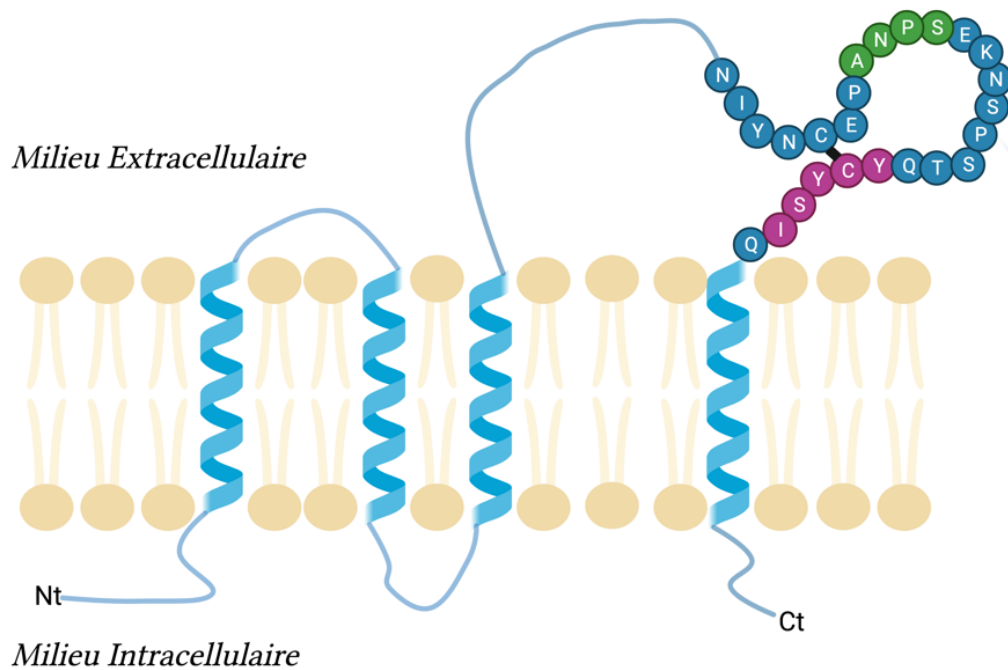


Figure 4 : Représentation de l'antigène CD20 inséré dans la membrane plasmique, avec en vert et rose les séquences interagissant particulièrement avec le rituximab. Adapté de C. Klein et al. ⁴⁰

Toutefois, le CD20 n'est pas un antigène reconnu uniquement par le RTX⁴¹, mais est également impliqué dans des interactions avec d'autres mAbs tels que l'ibritumomab (Zevalin®, Spectrum)⁴², le tositumomab (Bexxar®)⁴³, l'ocrelizumab (Ocrevus®)⁴⁴, ofatumumab (Arzerra®)⁴⁵, et obinutuzumab (Gazyvaro).⁴⁶

Pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la reconnaissance de la protéine CD20 par le RTX chez l'Homme, l'étude du complexe formé entre la région Fab de l'anticorps et son épitope a été réalisée par diffraction aux rayons X.⁴⁷ Ces travaux ont permis d'obtenir des informations importantes sur les interactions entre l'épitope et le Fab., notamment en ce qui concerne les boucles CDR. Celles-ci forment une poche dans laquelle s'effectue la liaison de l'anticorps, *via* un réseau de liaisons hydrogène et d'interactions de Van der Waals. L'analyse de cette structure cristalline a ensuite été complétée au sein du Département de Chimie Moléculaire par une étude menée en associant la méthode SPOT et une caractérisation par résonance plasmonique de Surface (SPR). Ces travaux ont permis de déterminer avec précision les fragments peptidiques du RTX interagissant avec le CD20.⁴⁸

Toutefois, il est important de noter que le CD20 n'est pas exprimé uniquement sur les lymphomes, mais également sur les cellules saines. Le traitement conduit donc à une

disparition de l'ensemble des cellules B. Cependant, l'antigène CD20 n'est exprimé qu'entre les stades de pré-lymphocytes B et lymphocytes B matures (Figure 5).⁴⁹ Les cellules souches hématopoïétiques ainsi que les pro-lymphocytes B ne sont pas impactés par un traitement par le RTX. L'immunodéficience résultant du traitement est donc temporaire, l'ensemble des globules blancs étant progressivement restauré. La récupération débute 6 mois après le traitement et est complète au bout d'environ 12 mois.

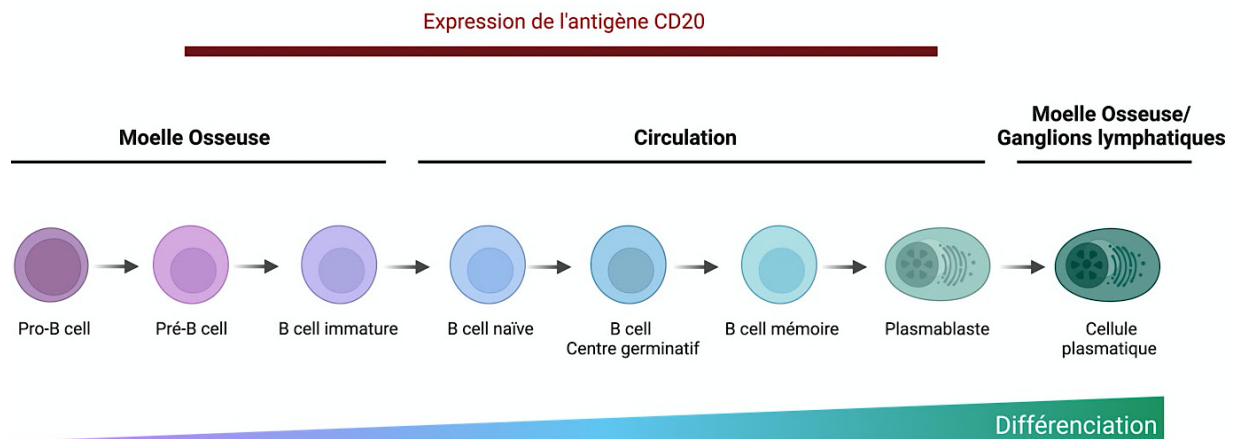


Figure 5 : Différenciation des lymphocytes B et expression de l'antigène CD20.

Malgré cette contrepartie, qui augmente sur cette période le risque d'infections chez le patient, le rituximab a démontré de fortes améliorations dans le traitement des LNH, permettant une augmentation de l'espérance de vie des patients.⁵⁰ Ensuite, d'autres applications ont été attribuées au RTX telles que le traitement de maladies auto-immunes à l'instar de l'arthrose rhumatoïde.⁵¹

I. 4. Limites et challenges du développement d'anticorps pour la thérapie.

Il n'est donc plus à prouver que les anticorps sont des outils très efficaces permettant une amélioration significative de la rémission des patients lorsqu'ils complètent les traitements classiquement utilisés en oncologie.^{20,27} A ce jour, d'après le rapport Immunowatch – 6^{ème} édition publié en Avril 2023 par MabDesign, 176 anticorps sont commercialisés dont 17 composés conjugués.⁵²

Bien que le marché des anticorps ait explosé ces dernières années, leur introduction pour la thérapie a été longuement limitée par leur nature, d'autant plus pour les anticorps de 1^{ère} génération (murins et chimériques). Les progrès dans le développement de mAbs et de dérivés ont permis une évolution nette ces dernières années avec pour objectif de surmonter les principales limites :^{3,53}

- **Le polymorphisme** : Pour reprendre l'exemple du rituximab, des études ont montré une moindre efficacité des traitements chez certaines populations présentant un polymorphisme des récepteurs FcR. En comparant les polymorphismes des récepteurs FcγRIII pouvant être ¹⁵⁸Val/¹⁵⁸Val (le plus affiné pour le domaine Fc), ¹⁵⁸Val/¹⁵⁸Phe ou ¹⁵⁸Phe/¹⁵⁸Phe, l'espérance de vie sans évolution de la maladie est plus importante chez les patients présentant la forme la plus affiné ¹⁵⁸Val/¹⁵⁸Val.^{54,55} Certains traitements s'avèrent donc moins efficaces pour des populations entières, montrant l'intérêt du développement d'alternatives.

- **Les coûts et questions d'éthiques liés à la production** : La production de mAbs exige une procédure biotechnologique très coûteuse impliquant l'utilisation de systèmes vivants (cellules eucaryotes, bactéries, animaux) ce qui soulève des problèmes aussi bien de contamination inter-lots que d'éthique.⁵⁶ Le RTX par exemple est produit à partir de cellules ovariennes d'hamster chinois. De plus, les mAbs thérapeutiques étant majoritairement des IgG1, il y a un phénomène de compétition avec les IgG1 endogènes présentes dans le sérum. Il est donc nécessaire d'en injecter des quantités importantes.⁵⁷ Il est cependant à noter que, grâce à leur utilisation croissante ainsi qu'au développement de composés génériques, ce coût tend à diminuer.

- **Le poids moléculaire** : Les mAbs sont des protéines polaires de poids moléculaire important (en moyenne 150kDa), ce qui permet une demi-vie d'une vingtaine de jours *in vivo*.^{18,58} Cependant, différentes causes peuvent être à l'origine d'une moindre efficacité des mAbs lors d'une injection.²⁹ Cela englobe les propriétés physiques et pharmacocinétiques, qui limitent par exemple leur pénétration dans les tumeurs solides.⁵⁹ Des études physiologiques chez la souris ont permis de mettre en évidence une distribution d'un IgG très majoritairement (> 98%) par un mécanisme de convection.⁶⁰ Dans le cas de tumeurs solides, l'environnement très vascularisé est caractérisé par une pression interstitielle accrue, résultant en une faible

distribution des anticorps par ce mécanisme.⁶¹ Cela explique le fait qu'une grande partie des anticorps utilisés en oncologie le soit pour des cancers hématologiques, limite très importante sachant que la majorité des cancers sont des tumeurs solides.

- **Stabilité, agrégation et dégradation** : La structure tridimensionnelle adoptée par les anticorps, à l'instar des boucles CDR, est indispensable à l'activité biologique des anticorps. Sous cette forme les anticorps sont dits « natifs ». Toutefois, cette structure est sensible aux variations de température et de pH conduisant à une dénaturation irréversible.⁶² En fonction des conditions de stockage et du degré de dénaturation, les mAbs comme toutes protéines, sont également sensibles au phénomène d'agrégation.⁶³ Enfin les dégradations chimiques sont un élément supplémentaire de dénaturation possible des mAbs que ce soit par hydrolyse, déamination ou oxydation.⁶⁴ Il y a donc un réel besoin en systèmes permettant de contourner ces limites. Différentes stratégies ont été initiées dans cette optique à commencer par l'optimisation de composés issus des Immunoglobulines.

II. Dérivés issus des anticorps

II. 1. Fragmentation

Le poids moléculaire des anticorps complets étant un frein à leur utilisation dans de nombreux cas, la communauté scientifique s'est intéressée au développement de fragments tels que les domaines individuels permettant de passer de 150 kDa à 50 kDa. Ces fragments illustrés en Figure 6 ont démontré une meilleure capacité de pénétration au sein des tumeurs solides.⁶⁵ De plus leur production est possible *via* l'utilisation de cellules procaryotes, réduisant les temps et coûts.⁶⁶ Une autre approche nécessitant la production de l'anticorps natif, permet l'obtention de fragments par protéolyse enzymatique.⁶⁷ La papaïne par exemple permet l'obtention de deux fragments Fab et d'un fragment Fc, quand la pepsine permet d'isoler un fragment dimérique F(ab')₂.

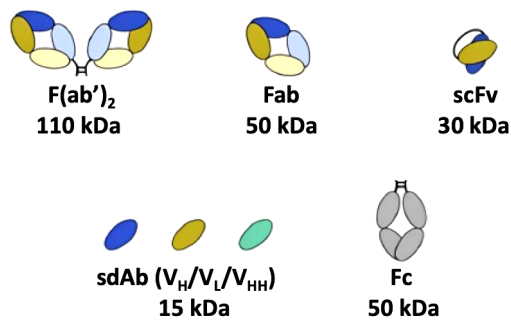


Figure 6 : Représentation des fragments de mAbs ainsi que d'une estimation de leurs poids moléculaires.

Toutefois, les protéines d'un poids moléculaire inférieur à 60 kDa ont une demi-vie raccourcie à quelques heures car leur élimination est majoritairement effectuée par clairance rénale.^{65,68} Ces nouvelles propriétés pharmacocinétiques en font de très bons candidats pour de l'imagerie telle que du radiomarquage.⁶⁹ On compte 4 catégories principales de fragments :

- « Fragment antigen-binding » : Fab et F(ab')₂

La perte de la partie constante (Fc) peut être un avantage dans le cas où le mécanisme ne requiert pas l'implication du système immunitaire (action indirecte) et inversement un désavantage notamment en oncologie où les mécanismes d'ADCC/ADCP ou CDC sont importants. La taille réduite permet une meilleure pénétration tissulaire que les anticorps natifs, mais implique une clairance plus rapide. Toutefois, la conjugaison de ces fragments avec de l'albumine ou du polyéthylène glycol (PEG) permet de limiter ce phénomène.⁷⁰ C'est notamment le cas du certolizumab pegol (Cimzia®), un fragment Fab-PEG anti-TNF α utilisé dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde.⁷¹ A ce jour, 4 fragments Fab humanisés ont été approuvés par la FDA.⁷²

- « Single-Chain Variable Fragments » (scFv)

Une des plus petites protéines issue d'un anticorps est le fragment scFv avec un poids moléculaire d'en moyenne 30 kDa.⁷³ Ce fragment comporte les parties variables des chaînes lourdes et légères (V_H et V_L) reliées entre elles par une chaîne peptidique hydrophile de 10 à 20 acides aminés. Ce fragment est le plus petit composé issu d'un anticorps et contenant l'ensemble de la région variable. Ce type de fragments présente les mêmes avantages et inconvénients que les fragments Fab, proportionnellement à leur taille.

- « Single-Domain Antibodies » (sdAbs)

Plus petits encore que les scFvs, les sdAbs, ont un poids moléculaire d'environ 15-kDa. Ils se composent d'un fragment du domaine variable de l'anticorps (V_H , V_L ou V_{HH}) et sont parfois nommés «nanobodies». ⁷⁴ Le domaine V_{HH} est dérivé des chaînes lourdes d'anticorps produits par les camélidés et sont les plus utilisés parmi les sdAbs. Ils présentent généralement une meilleure solubilité et une sensibilité moins importante à l'agrégation. ⁷⁵

- « Fragment crystallizable (Fc) region »

Les domaines Fc seuls peuvent aussi être utilisés, pour un effet antagoniste dans la liaison avec les récepteurs de Fc (FcRs) présents à la surface de certaines cellules. C'est le cas notamment des molécules Abdegs, fragments Fc d'IgG1 qui, en se liant de manière antagoniste aux FcRn, eux mêmes impliqués dans un mécanisme de recyclage des Ig, permettent une dégradation accélérée des anticorps endogènes. ⁷⁶

II. 2. Multimérisation

La formation d'oligomères d'anticorps ou de leurs fragments permet d'accroître leurs propriétés naturelles par le phénomène de multimérisation. Ce phénomène existe naturellement, bien que plus rare, à l'instar des hexamères de région Fc d'IgG, formés par certains anticorps à la surface cellulaire et permettant un recrutement accru de la protéine C1q. ⁷⁷ Différents multimères ont donc été développés à partir de fragments ou d'anticorps identiques comme des dimères, trimères ou tétramères de scFv nommés diabody, triabody ou tetrabody. ⁷³ Un composé type diabody contenant cette fois-ci des domaines issus de deux anticorps différents a été accepté en 2014 par la FDA sous le nom de blinatumomab (BLINCYTO®) dans le traitement des leucémies lymphoblastiques aiguës. ⁷⁸ Ce composé bispécifique permet de cibler conjointement l'antigène CD19 des cellules tumorales et l'antigène CD3 des lymphocytes T. Cette juxtaposition des cellules favorise ainsi l'apoptose de la tumeur par ADCC.

II. 3. Conjugaison

Les Anticorps conjugués à des médicaments (ADC pour Antibody-Drug Conjugates) forment une nouvelle classe de médicaments à haut potentiel thérapeutique. Ils permettent une combinaison de la chimiothérapie et de l'immunothérapie. L'intérêt de cette combinaison réside dans la capacité d'un ADC à délivrer un composé hautement actif à une cible tumorale, en épargnant les tissus sains alentours. Cela permet donc de s'affranchir d'un des obstacles principaux de la chimiothérapie en augmentant la fenêtre thérapeutique.^{79,80} Pour que l'usage d'un ADC soit viable, il faut que l'antigène ciblé soit exprimé exclusivement ou très majoritairement par les cellules tumorales. Enfin, l'antigène ciblé peut dans certains cas privilégier des propriétés d'internalisation pour permettre une meilleure efficacité du composé actif conjugué. Les liens chimiques ou « linkers » jouent également un rôle clé dans le bon fonctionnement des ADCs.⁸¹ Il en existe 2 types qui doivent être stables dans le plasma sanguin pour éviter de relâcher l'agent cytotoxique hors des tissus cibles :

- **Les linkers non clivables** sont des liaisons stables et résistantes à la dégradation protéolytique. Leur mécanisme repose sur l'internalisation par la cellule suivie d'une dégradation par le lysosome. Ce qui permet la libération de la charge cytotoxique.

- **Les linkers clivables** sont les plus représentés parmi les ADCs. Ils sont dégradés en fonction des modifications d'environnements chimiques (différence de pH, réaction redox, etc.) ou par des enzymes spécifiques.

Au même titre que les ADCs, il existe d'autres types d'anticorps conjugués sur le même principe à l'instar des ARCs (antibody-radionuclide conjugates).⁸² A ce jour, 17 anticorps conjugués sont sur le marché et illustrés en Tableau 1 et Tableau 2. Parmi eux, 14 sont des ADCs, dont la majorité possède un linker clivable. Deux autres sont conjugués à des composés radioactifs et le dernier à un fluorophore.²

Tableau 1 : Caractéristiques des ADC disponibles sur le marché (tiré du rapport : Immunowatch - Antibody-drug conjugate | 2023 | Edition n°6).

Nom déposé	Nom du médicament	Cible de l'anticorps	Charge	Linker clivable ou non
Adcetris	Brentuximab vedotin	CD30	Monomethyl Auristatin E	oui
Aidexi	Disitamab vedotin	HER2	Monomethyl Auristatin E	oui
Bespona	Inotuzumab ozogamicin	CD22	N-acetyl-gamma-calicheamicin dimethylhydrazide	oui
Blenrep	Belantamab mafodotin	CD38	Monomethyl Auristatin F	non
Elahere	Miretuximab soravtansine	FOLR1	Maytasinoid DM4	oui
Enhertu	Transtuzumab deruxtecan	HER2	DXd	oui
Kadcyla	Transtuzumab emtansine	HER2	Maytansinoid DM1	non
Mylotarg	Gemtuzumab ozogamicin	CD33	Calicheamicin	oui
Padcev	Enfortumab vedotin	Nectin4	Monomethyl Auristatin E	oui
Polivy	Polatuzumab vedotin-piiq	CD79b	Monomethyl Auristatin E	oui
Tivdak	Tisotumab vedotin	CD142	Monomethyl Auristatin E	Oui

Trodelvy	Sacituzumab govitecan-hziy	Trop-2	Drug SN-38	oui
Ujvira	Transtuzumab emtansine biosimilar	HER2	Myatansinoid DM1	non
Zylonita	Lonstuximab tesirine	CD19	Pyrrolobenzodiazepines	oui

Tableau 2 : Caractéristiques des autres anticorps conjugués disponibles sur le marché (tiré du rapport : Immunowatch - Antibody-drug conjugate | 2023 | Edition n°6)⁵²

Nom déposé	Nom du médicament	Cible de l'anticorps	Charge	Linker clivable ou non
Akalux	Cetuximab sarotalocan	EGFR	Phthalocyanine dye IRDye 700DX	non
Licartin	Iodine 131 Meruximab	CD147	Iodine 131	non
Zevalin	Ibritumomab tiuxetan	CD20	Yttrium-90	non

III. Dérivés protéiques / peptidiques non issus des immunoglobulines

Toujours dans l'optique de s'affranchir des limites inhérentes à la taille et production des anticorps, une approche différente est née. Celle-ci s'intéresse à la large diversité de protéines possédant naturellement certaines propriétés désirées, telles qu'une stabilité sous diverses conditions et des modes de production économiques et plus éthiques.^{83,84} La protéine initialement choisie doit être très stable et permettre de multiples substitutions ou insertions, permettant la synthèse de banques de protéines mutantes.⁸⁵ Ces technologies combinant la mutagénèse et la production de protéines recombinantes *via* par exemple les méthodes de « Phage Display » ou « Ribosome Display » ont connu un essor important et ont permis à ce jour la création d'une vingtaine de types de dérivés protéiques aux anticorps.⁸⁶ Ceux-ci se décomposent en deux parties à l'image des anticorps. La première est une structure rigide composée d'hélices α ou feuillets β permettant une stabilité structurelle du châssis protéique. La seconde est une partie variable formée d'une ou plusieurs boucles. En général, 10 à 20 acides aminés sont randomisés permettant une variation des caractéristiques et de l'affinité des composés pour une cible spécifique. Ces composés peuvent également être fonctionnalisés, permettant une conjugaison pour des usages diagnostiques ou thérapeutiques. Parmi les plus utilisés, on retrouve les affibodies, adnectins, ANTICALIN®, DARPins, and knottins dont les poids moléculaires sont compris entre 4 et 20 kDa avec des affinités pour leurs cibles allant du μM au pM. Mais, malgré leurs nombreux avantages, leur utilisation semble majoritairement viable en imagerie et limitée en thérapie. Cela s'explique une fois encore par trois principaux facteurs, à commencer par leur faible demi-vie, des phénomènes d'immunogénicité ou encore une biodistribution parfois problématique avec des cas d'accumulation conduisant à une cytotoxicité.

Comme explicité précédemment, bien que permettant de contourner bon nombre des limites inhérentes aux mAbs, ces composés d'origine protéique sont similaires aux anticorps de par leur nature. D'autres composés, d'une nature tout à fait différente mais dont la fonction pourrait mimer celle des anticorps, sont également fortement étudiés depuis les deux dernières décennies. Ces composés d'origine synthétique des oligonucléotides nommés aptamères et feront l'objet d'une description détaillée dans la suite de ce manuscrit.

IV. Dérivés non protéiques : Les aptamères

Le nom aptamère, proposé en 1990 par Andrew D. Ellington et Jack W. Szostak,⁸⁷ dérive du latin « aptus » et du suffixe -mères issu du grec « μέρος (meros) » signifiant respectivement « adapté à » et « portion de ». Ce sont de courts oligonucléotides simple brin (généralement entre 20 et 100 nucléotides pour un poids moléculaire allant de 6 à 35 kDa) pouvant prendre d'uniques conformations 3D.^{88,89} Ces molécules d'ADN ou d'ARN synthétiques sont générées dans des banques contenant jusqu'à 10^{14} séquences différentes puis sélectionnées *via* une méthode d'évolution moléculaire dirigée *in vitro* nommée SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment). Leur structure particulière permet la coexistence de nombreuses interactions telles que des interactions électrostatiques, des effets hydrophobes ou encore des liaisons hydrogène.^{90,91} Ils sont en général caractérisés par de fortes affinités et spécificités (constante de dissociation de l'ordre du pico- au micromolaire) pour des cibles de natures très diverses.⁹²⁻⁹⁵ C'est pourquoi les aptamères sont souvent comparés aux anticorps, étant même qualifiés « d'anticorps chimiques ».

IV. 1. Structure d'un aptamère

IV.1.1 Rappel de la structure des oligonucléotides

Les brins d'ADN ou d'ARN sont tous deux formés d'un enchainement de nucléotides, unité de base elle-même composée d'un groupement phosphate, un sucre (ribose ou désoxyribose), et une nucléobase. On retrouve deux motifs hétérocycliques permettant de classer ces bases, de type purine incluant l'adénine (A) et la guanine (G), ou pyrimidique avec la cytosine (C) et la thymine (T) pour l'ADN ainsi que l'uracile (U) pour l'ARN. Ces bases possèdent différents sites accepteurs et donneurs de liaisons hydrogène permettant leurs appariements A-T (ou A-U) et C-G comme illustré en Figure 7. Les sites accepteurs représentés en rouge sont des amines tertiaires et de carbonyles et les sites donneurs des amines secondaires et primaires représentés en vert. Dans le cadre de ce projet, nous avons uniquement utilisé des brins d'ADN.

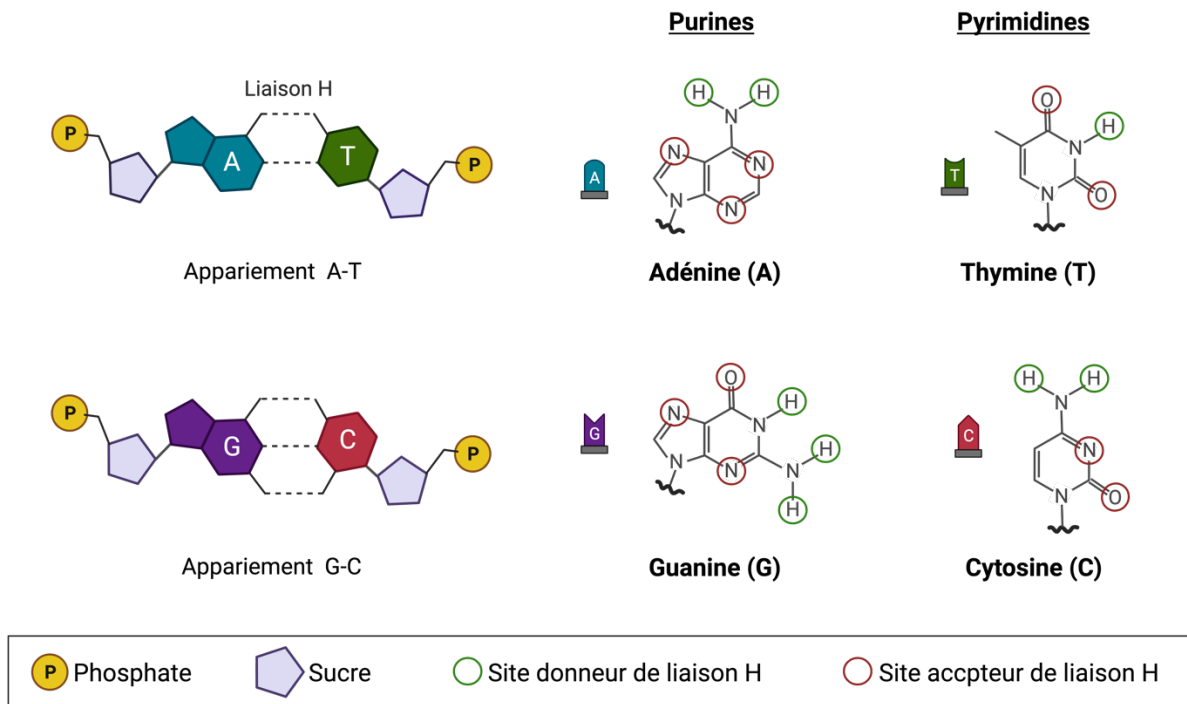


Figure 7 : Structures et interactions des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN.

Le sucre est un pentose de type 2'-désoxy-D-ribose dans l'ADN ou D-ribose dans l'ARN et est lié à la nucléobase par une liaison de type N-glycosidique. Le groupement (poly)phosphate en 5' des nucléotides est impliqué dans la formation d'une liaison phosphodiester permettant l'enchaînement des unités nucléotidiques. Cette synthèse est réalisée à l'aide d'enzyme type polymérase par l'ajout d'un nucléotide entre la position 5'-phosphate et la position 3'-hydroxyle du second, extrémités servant à définir l'orientation des brins.

Toutefois, les nucléotides ne sont pas des éléments statiques et peuvent adopter différentes conformations *via* la liaison osidique et le pentose. La liaison glycosidique peut orienter la nucléobase soit vers l'intérieur du pentose en conformation dite « syn » soit vers l'extérieur en conformation « anti », prédominante car permettant de limiter l'encombrement stérique (Figure 8a). Le pentose permet également deux conformations tridimensionnelles : la forme « C2'-endo » et la forme « C3'-endo » définies selon le plan C1'-O-C4' (Figure 8b). Cette flexibilité est un paramètre important pour expliquer la diversité de structures adoptées par les acides nucléiques.

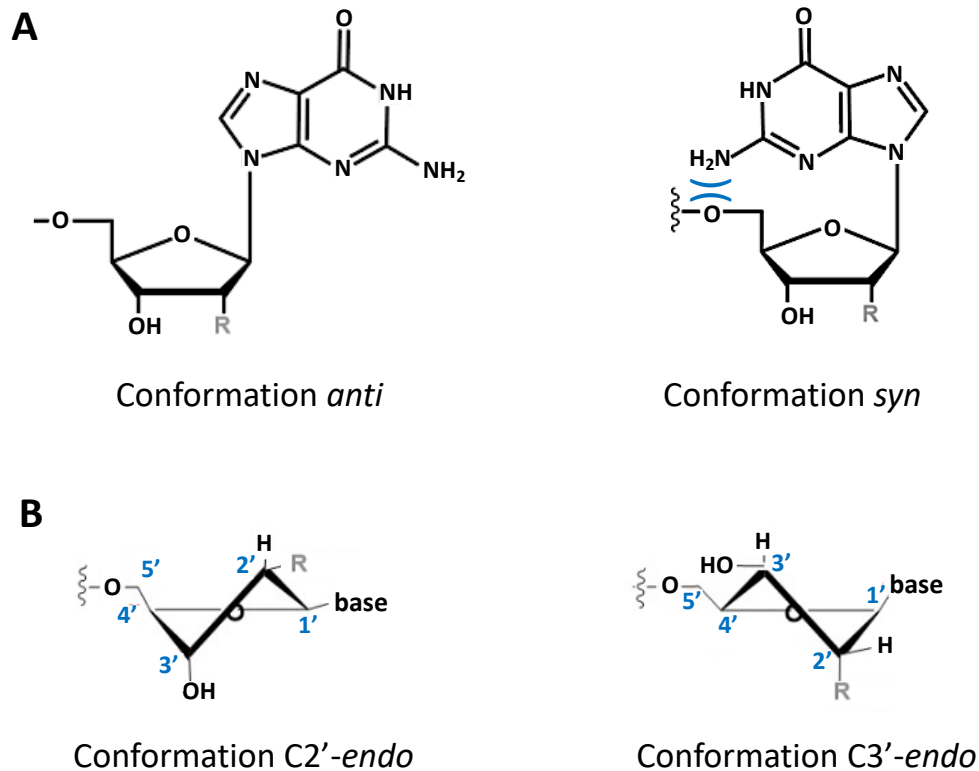


Figure 8 : Représentation des conformations adoptées, exemple d'une guanine : A : les conformation « anti » et « syn » via la liaison osidique. B : les conformations « C2'-endo » et « C3'-endo » via le pentose.

IV.1.2 Structures secondaires et tertiaires des oligonucléotides.

Il existe une multitude de structures adoptées par les oligonucléotides telle que la structure bicaténaire décrite en 1953 par J. Watson et F. Crick sous forme de double hélice d'ADN.⁹⁶ D'autres structures qualifiées de non-usuelles ont ensuite été décrites faisant cette fois intervenir 3 à 4 brins : les jonctions à 3 voies (« Three-Way Junctions ») ou à 4 voies (« Four-Way Junctions »).^{97,98}

Toutefois, dans le cadre de ce projet et de l'utilisation d'aptamères, les structures secondaires et tertiaires d'intérêt ne sont le résultat que des repliements d'un brin unique (Figure 9). Les structures les plus communes sont les motifs dit de « tige-boucle », obtenus suite à un appariement entre deux régions complémentaires par interaction de type « Watson-Crick ». Cet appariement va conduire à la formation d'une tige sur une portion du brin suivie à une extrémité du brin par une boucle formée de bases n'ayant pas d'appariement possible. Ce type de motif peut également être retrouvé au cœur du brin sous forme de boucles internes, de mésappariements ou encore de jonctions. Ces boucles permettent l'adoption de structures

tridimensionnelles favorisant les interactions avec une cible.⁹⁹ D'autres structures plus complexes sont également rencontrées chez les acides nucléiques à l'instar des G-quadruplex.¹⁰⁰ Ils consistent en un arrangement cyclique formé par une tétrade de guanines placées dans un même plan, formé de 8 liaisons hydrogène. Plusieurs plans peuvent se superposer, stabilisés par des interactions dites π -stacking, formant ainsi des structures nommées G-quadruplex. Ceux-ci peuvent être formés entre plusieurs brins mais également être intramoléculaires comme dans le cas des aptamères. On retrouve également une structure assez similaire, faisant cette fois intervenir des séquences riches en cytosines et pouvant former des complexes nommés i-motif fortement dépendants du pH.¹⁰¹

Au sein d'une même séquence, une combinaison de ces différentes structures peut être observée à l'instar de l'aptamère « Spinach » et de ses dérivés, composés d'un motif G-quadruplex entouré de deux motifs : tige et tige-boucle.¹⁰²

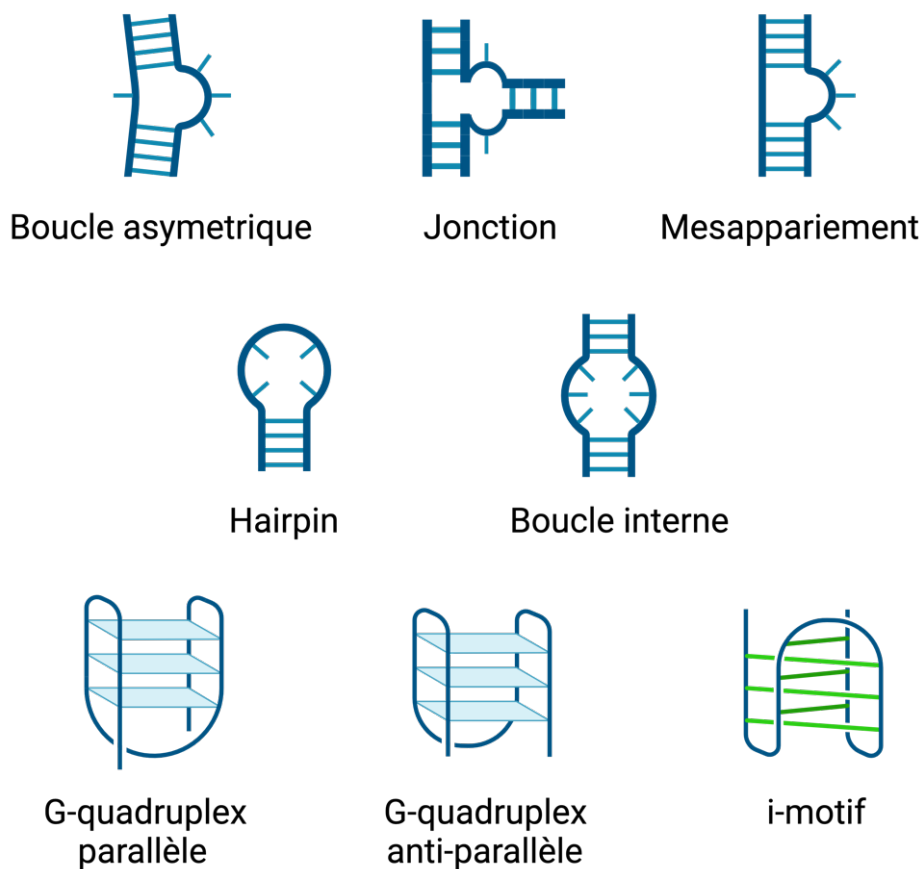


Figure 9 : Représentation des repliements intramoléculaires pouvant être adoptés par les acides nucléiques.

IV. 2. Aptamères vs Anticorps

L'utilisation d'anticorps pour des applications thérapeutiques et diagnostiques se confronte donc à un certain nombre de limites. De par leur nature, les aptamères offrent bien des avantages permettant de contourner ces barrières^{103,104} : (i) Les aptamères sont non immunogènes et non toxiques *in vivo*, (ii) Ils sont également très stables dans des gammes de pH et de température variés et possèdent une stabilité importante, ce qui facilite le transport et leur conservation. (iii) Leur petite taille permet une bonne pénétration dans les tissus/tumeurs ainsi que l'internalisation cellulaire. (iv) Enfin, leur synthèse ainsi que leur modification reposent sur des principes chimiques simples, ce qui permet une production à grande échelle, sans variation importante entre les lots et en quelques heures. Les coûts de production ainsi que les questions liées à l'éthique sont donc bien moins importants que pour les anticorps. Un résumé des principaux avantages des aptamères est illustré en Tableau 3.

Tableau 3 : Aptamères vs. Anticorps, résumé des principaux avantages liés à l'utilisation d'aptamères.

	Anticorps	Aptamères
Production	Culture cellulaire et production <i>in vivo</i> Nécessite quelques mois	Synthèse chimique à faibles coûts Nécessite quelques semaines
Poids moléculaire	≈ 10 ⁵ Da	≈ 10 ⁴ Da
Développement	Production nécessitant l'induction d'une réaction immunitaire chez l'animal	Sélection <i>in vitro</i> par SELEX sur une grande diversité de séquence et ne nécessitant que quelques nanomoles
Modifications / greffage	Modifications difficilement contrôlées et effectuées post-synthèse	Modifiables chimiquement au cours de la synthèse
Activité	Variable selon les populations et les lots Plus ou moins immunogéniques	Aucune variation inter-lots Non immunogéniques ¹⁰⁵
Stabilité	Sensibles aux variations de pH et aux températures élevées, la dénaturation est irréversible	Stables à haute température et peu sensibles aux variations de pH, ¹⁰⁶ la dénaturation est réversible

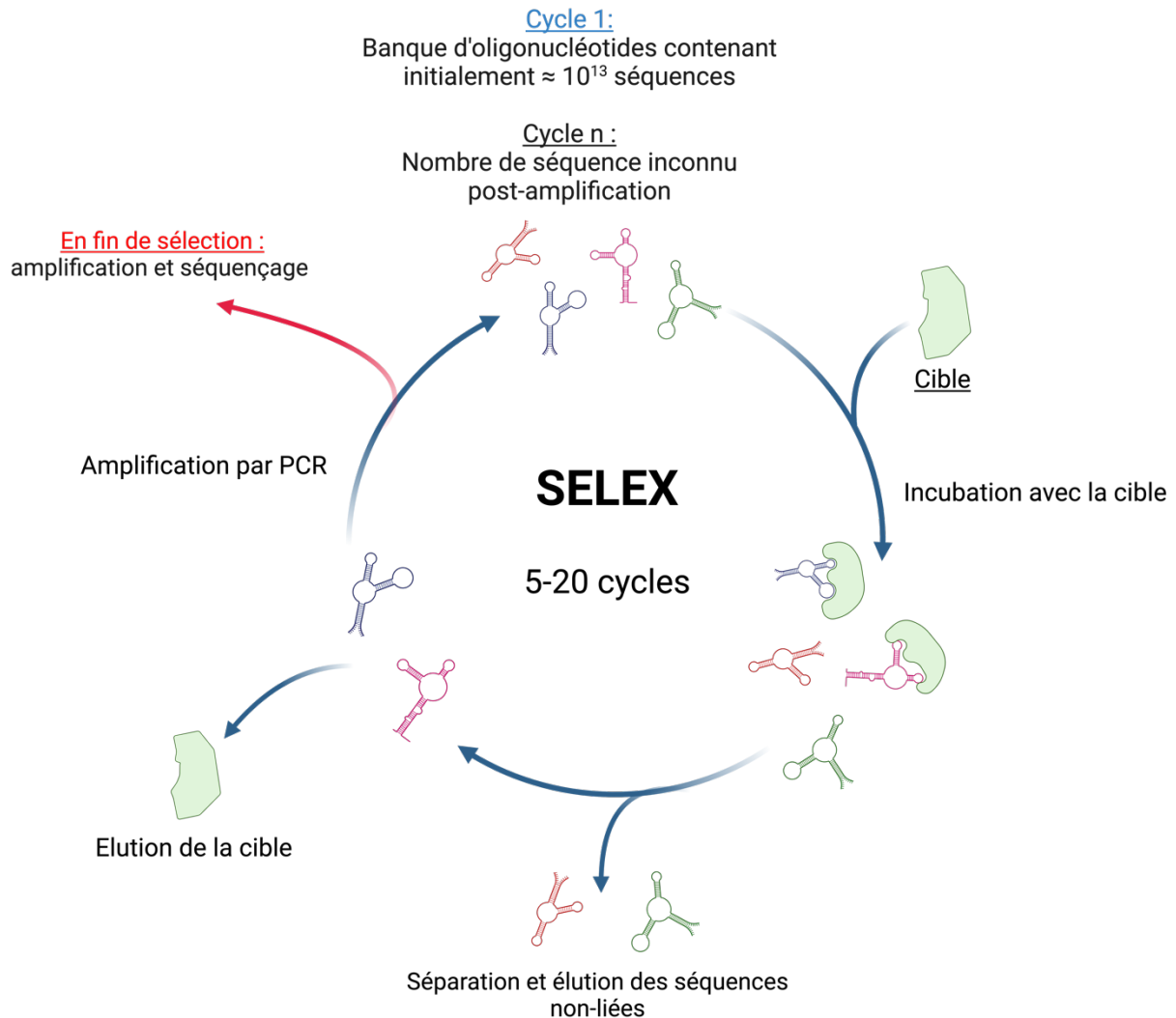


Figure 11 : Principe général de la sélection d'aptamères via la méthode de SELEX. La banque d'oligonucléotides est incubée avec la cible. Une étape de séparation vise ensuite à séparer les brins affins, liés à la cible de ceux moins affins non liés. Les séquences d'intérêt sont extraites puis amplifiées par PCR. Les brins complémentaires non représentatifs de la banque initiale sont retirés puis les séquences amplifiées sont réincubées en présence de cible. Le processus est répété autant de fois que nécessaire. Ensuite, l'échantillon final est amplifié une dernière fois puis caractérisé par séquençage.

Différents contrôles de l'évolution du processus sont possibles entre les cycles, en fonction de la méthode choisie. Par exemple, dans le cas de banques d'aptamères modifiées par un fluorophore, il est possible de recourir à des méthodes telle que l'anisotropie de fluorescence. Des méthode sans marquage sont également utilisées telles que la qPCR ou encore des méthodes UV, permettant de déterminer une constante d'affinité moyenne.¹¹⁰

Enfin, à l'issue de la sélection, l'échantillon est séquençé *via* différentes méthodes telles que la méthode Sanger¹¹³ ou le séquençage haut débit type illumina.¹¹⁴ Il est possible d'observer

un enrichissement des séquences les plus affines dans le cas où les SELEX sont effectuées sur un nombre suffisant de cycles et que des étapes de séquençage sont effectuées régulièrement au cours du processus.¹¹⁵

Le processus de SELEX présente ainsi une flexibilité qui permet l'élaboration de nombreuses stratégies, visant à améliorer la sélection en fonction des cibles. En contrepartie, cette diversité de méthodes et d'applications rend nécessaire l'optimisation de nombreux facteurs clés permettant le succès de la sélection.

Dans cette partie, différents paramètres seront discutés comme la création de la banque d'aptamères, le choix de la méthode de séparation ainsi que celui du type de cible.^{116,117}

IV.3.2 Création de Banques d'aptamères

La composition de la banque est une étape primordiale, réalisée en amont du processus de SELEX. Sa conception peut être très variable et s'appuie sur les types d'applications ou de cibles visées. Différents paramètres doivent ainsi être pris en compte en amont de sa synthèse :

- **Nature ARN ou ADN des oligonucléotides :** Au contraire de l'ADN et de sa structure majoritaire en double hélice, les ARN natifs adoptent de très nombreuses structures dépendantes de leurs fonctions.¹¹⁸ Cette diversité structurale importante confirme leur viabilité et l'intérêt de leur utilisation en tant qu'aptamères. Toutefois, l'utilisation de banque ARN nécessite une étape supplémentaire de rétrotranscription à chaque cycle du processus de SELEX.¹¹⁹ Il a été démontré que cette étape favorise des erreurs de transcription plus importantes notamment lorsque la longueur du brin augmente. Les brins ARN semblent aussi souffrir parfois d'anomalies de repliement conduisant à des conformations inactives comme c'est le cas par exemple lors de l'utilisation de ribozymes.¹²⁰ L'ADN, en plus de s'affranchir de cette étape de rétrotranscription, démontre également une stabilité chimique et biologique plus importante que l'ARN,¹²¹ bien que dans les deux cas des modifications chimiques puissent grandement améliorer ce paramètre.¹²² Grâce à ces avantages, les aptamères ADN ont gagné en popularité, toutefois le choix de la nature de la banque dépend en grande partie de l'application souhaitée de l'aptamère.

- **Longueur de la région variable** : Comme décrit précédemment, les brins composants une banque d'oligonucléotides contiennent deux extrémités connues entourant une région variable. En fonction de la longueur de cette région variable, la diversité statistique de séquences peut évoluer drastiquement. Par exemple une région variable de 20 nucléotides conduirait à une diversité de 4^{20} soit 10^{12} séquences différentes, là où 40 nucléotides randomisés donneraient 4^{40} soit 10^{24} séquences. En pratique, l'échantillon utilisé contient généralement 1 mole d'oligonucléotides soit environ 10^{14} séquences. Bien que la variabilité structurelle d'une banque augmente avec le nombre de séquences, une diversité trop importante, ne permettrait pas d'effectuer une sélection sur la totalité de celle-ci. Le choix de cette longueur va donc être dépendant de l'application recherchée. Dans le cadre d'une cible de petite taille, il peut être intéressant de déterminer l'enrichissement d'un motif favorable à l'interaction après le séquençage. A l'inverse dans le cas d'une sélection effectuée sur cellule, une diversité structurelle plus importante pourrait être avantageuse.¹²³ Une étude publiée en 2015 et basée sur près de 500 aptamères situe leur longueur moyenne entre 50 et 70 nucléotides.¹²⁴

- **Impact des régions constantes** : Bien que la région variable soit des plus importantes pour la reconnaissance de la cible, la région constante doit également être conçue pour favoriser un repliement permettant une interaction avec la cible sans au contraire limiter celle-ci. Il est difficile de prédire le rôle de cette région dans la structure finale de l'aptamère, toutefois l'impact des régions constantes sur la structure de l'aptamère est plus important lorsque la séquence randomisée contient moins de 30 nucléotides.¹²⁵ De plus, une forte structuration de ces extrémités peut limiter celle de la partie variable ainsi que l'ancrage des amorces lors des cycles de PCR. Il est donc important de choisir des régions constantes plus petites que la région randomisée et peu impliquées dans la structuration de l'aptamère.¹²⁶ Il est également possible d'effectuer les étapes de sélection en s'affranchissant des régions constantes par l'utilisation d'enzymes de restriction.¹²⁷ Les régions servant à l'ancrage des amorces sont ensuite réintégrées aux brins avant l'amplification par PCR, puis retirées de nouveau à chaque cycle de sélection. L'ajout de ces étapes de ligation et de clivage des régions constantes n'est pas optimal et peut impacter le processus de sélection.

- **Modifications chimiques et nucléotides modifiés** : Un dernier exemple de paramètres clés liés à la création de la banque est l'utilisation de nucléotides modifiés, présentant deux avantages majeurs. Différents exemples de ces modifications, présentés dans la suite de ce paragraphe, sont illustrés en Figure 12.

Tout d'abord dans le cas où une sélection ne fonctionne pas en présence d'une banque contenant les nucléotides traditionnels (A, T ou U, C et G), la diversité de la banque peut être fortement augmentée par l'intégration de modifications chimiques ou de nucléotides particuliers.^{128,129} Il est possible de modifier la nucléobase comme cela a été le cas dans les études menées par Latham *et al.* permettant la sélection d'aptamères plus stables¹³⁰ ou encore Vaught *et al.* permettant la sélection d'aptamères ADN ayant de nouvelles propriétés proches de celles d'un aptamère ARN.¹³¹

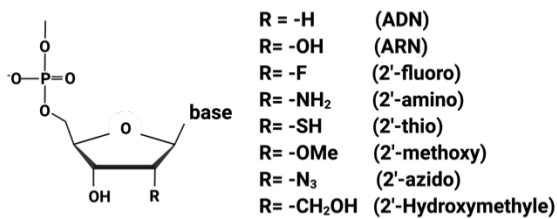
D'autre part, les aptamères ont une demi-vie relativement faible dans le plasma humain allant généralement de quelques minutes à une heure pour l'ADN et de quelques secondes pour l'ARN, ce qui s'explique à la fois par la digestion enzymatique opérée par les nucléases ainsi que par une clairance rénale importante.^{132,133} Cette élimination rapide peut être limitée *via* différentes modifications sur le sucre, la base ou encore le groupement phosphate.¹³⁴

Les modifications au niveau du ribose sont nombreuses avec notamment une substitution au niveau du carbone C2', par ajout de groupements Fluor (-F), méthoxy (-OMe), amine (-NH₂), thiol (-SH), azide (-N₃), hydroxyméthyle (-CH₃OH). Une étude menée par Adler *et al.*, portant sur un aptamère ARN anti-trypanosomes a montré qu'une modification de cette position sur les C et U par un groupement -fluoro a augmenté la durée de vie initialement < 1s jusqu'à environ 81h tout en conservant l'activité.¹³⁵ Une modification plus importante *via* un groupement -amino sur ces mêmes positions a permis d'augmenter cette demi-vie jusqu'à 367h, impactant toutefois fortement la reconnaissance de l'aptamère pour sa cible.

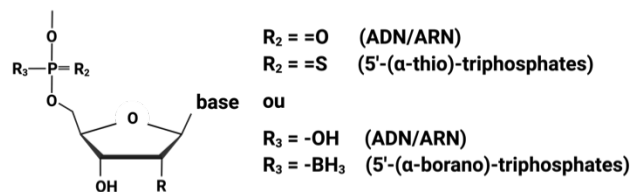
D'autres modifications impliquant toujours le carbone C2' visent à augmenter cette résistance aux nucléases par la formation d'un pont entre le C2' et le C4' ou inversement en absence de liaison entre les C2' et C3'. Ces dérivés sont respectivement nommés LNA^{136,137} (« Locked Nucleic Acids ») figeant la structure du sucre et UNA¹³⁸ (« Unlocked Nucleic Acids») permettant une grande flexibilité du sucre.

Enfin, une autre stratégie implique l'utilisation d'énantiomères et donc de composés en série L au lieu d'oligonucléotides en série D: D-ADN ou D-ARN (forme naturelle). Ces oligonucléotides ont été renommés « spiegelmers », nom issu de l'allemand « spiegel » signifiant miroir. Cette stéréochimie non naturelle confère à ces composés une meilleure stabilité face aux différentes nucléases présentes chez l'Homme.¹³⁹

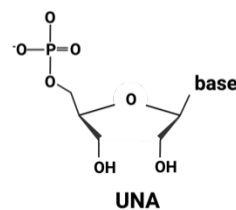
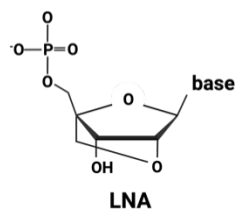
Modifications en position C2' :



Modifications du phosphate α :



Modifications de la flexibilité du pentose :



Modifications des nucléobases :

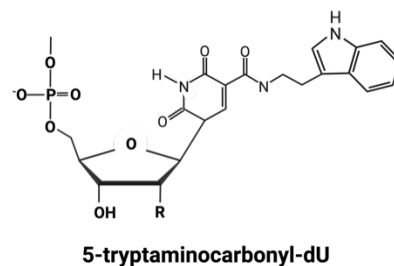
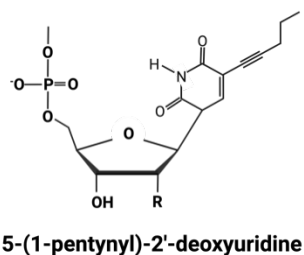


Figure 12 : Illustrations de divers exemples de modifications chimiques des nucléotides, au niveau du pentose, des groupements phosphate ou de la nucléobase, dans l'optique d'augmenter leur stabilité. Adapté des revues de Kong et al.¹³⁴ et Röthlisberger et al.¹²⁹

Bien que présentant un net avantage de stabilité, la sélection de tels composés que ce soit des nucléotides modifiés ou des énantiomères reste plus complexe et onéreuse qu'une sélection standard. De plus, dans le cas où ces modifications sont introduites au cours de la sélection et

non en post-sélection, la difficulté réside dans le choix et le développement de polymérasés permettant l'intégration de ces nucléotides modifiés.¹⁴⁰

IV.3.3 Les variantes de la méthode SELEX

La méthode SELEX a été adaptée sous de nombreuses formes en fonction de la nature de la cible ainsi que des méthodes de séparation utilisées¹¹⁹. Tout d'abord, la SELEX peut être divisée en deux classes principales non exhaustives, dépendantes de la nature de sa cible : la « Cell-SELEX » et la « Protein-SELEX ». La première fait intervenir une cellule entière pour la sélection. Cela permet de cibler des parties de la cellule dans leur forme native et donc d'optimiser l'accès à ces cibles ainsi que l'internalisation dans la cellule. Cette méthode est privilégiée dans le cas d'une faible connaissance des marqueurs présents à la surface cellulaire.¹⁴¹

En revanche, dans le cas où la cible est bien connue, la méthode de « Protein-SELEX » sera envisagée, avec comme cible, la protéine purifiée. Le contrôle des conditions de la SELEX ainsi que les différents cycles sont ainsi plus faciles à réaliser. Cependant, la conformation de cette cible *in vivo* est parfois différente de celle *in vitro* ce qui peut être une cause de perte d'efficacité. Il est donc important de bien connaître la cible dans son environnement physiologique.

De nombreuses variantes ont donc vu le jour pour permettre, dans chaque cas, une sélection optimale.^{117,142} Dans ce chapitre, quatre catégories ont été établies permettant un classement regroupant les principales méthodes : cas où la cible est immobilisée, cas où l'aptamère est immobilisé, cible et aptamère en solution et les variantes impliquant des cellules ou une sélection *in vivo*.

- **Cas où la cible est immobilisée** : Les SELEX les plus classiques impliquent l'immobilisation de la cible suivie de l'ajout d'oligonucléotides en solution. Une des matrices les plus utilisées est la membrane de nitrocellulose développée en 1968 par Pristoupil *et al.* dans l'optique de séparer des protéines d'oligonucléotides en série ARN.¹⁴³ Dès lors, ce type de membrane a été largement utilisé dans le cadre de sélections d'aptamères, donnant lieu à la méthode de « Nitrocellulose Membrane Filtration-based SELEX »,¹⁴⁴ méthode utilisée lors

de la description de la méthode SELEX par Gold et Tuerk en 1990.¹⁰⁷ Cette variante est toutefois limitée aux cibles protéiques de poids moléculaires élevés, du fait du diamètre des pores et de l'affinité de la membrane pour les protéines.¹⁴⁵

Une seconde méthode, plus versatile dans le choix de la cible, consiste en l'utilisation de résines ou billes de différentes tailles ou de matériaux permettant le greffage de cibles plus petites, pouvant également être conditionnés sous forme de micro-colonnes.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ Différentes méthodes peuvent ensuite être utilisées pour séparer les billes de la solution d'oligonucléotides non liés, en fonction du matériau utilisé, par exemple par centrifugation, filtration ou utilisation d'un aimant.¹⁴⁹

Les recherches effectuées dans le domaine de la SELEX basée sur l'utilisation de billes magnétiques a conduit au développement de systèmes associés à des technologies de microfluidique (« Microfluidic-SELEX » ou « M-SELEX ») permettant une sélection très stringente.¹⁵⁰

Dans certains cas, le couplage de la cible a toutefois quelques conséquences sur la viabilité de la sélection à commencer par une influence du couplage entre la cible et la matrice sur la structure de celle-ci. Des interactions non-spécifiques entre les aptamères et cette matrice sont également communément observées et peuvent être réduites par l'utilisation de produits tensioactifs ou étapes de contre-sélection.¹⁵¹

- **Cas ou l'aptamère est immobilisé :** Pour contourner les limites évoquées précédemment, différentes méthodes permettent à l'inverse une immobilisation de l'aptamère suivie de l'ajout de la cible en solution. Une méthode développée en 2005 par Nutiu *et al.* connue aujourd'hui sous le nom de Capture-SELEX permet une sélection d'aptamères pour des cibles de petites taille.¹⁵² Son principe repose sur la capacité de certains aptamères à changer de conformation lors de l'interaction avec la cible. Pour se faire, une banque particulière est développée avec aux extrémités deux régions constantes, entourant une région variable elle-même comprenant en son centre une région constante propre à cette méthode. Cette région particulière est conçue pour être complémentaire à un nucléotide antisens biotinylé en 5' ou 3'. Lors de l'hybridation, les brins complémentaires antisens vont opérer une liaison non-covalente avec des billes de streptavidine permettant l'immobilisation de la banque. La cible est ensuite injectée en solution. Dans le cas ou des candidats aptamères

interagissent avec celle-ci, le changement de structure engendré va permettre une libération du complexe aptamère-cible.^{153,154}

Une seconde méthode développée en 2014 par Wang et al. utilise également des billes magnétiques sur lesquelles sont immobilisées de nombreuses copies d'un même aptamère nommées « single aptamer particles ».¹⁵⁵ Cette technologie s'inspire directement des techniques de « surface display » utilisées dans l'ingénierie de protéines.¹⁵⁶ La séparation des différents brins permettant la synthèse de ces particules uniques, repose sur une méthode dérivée de la PCR « emulsion Polymerase Chain Reaction » (ePCR).¹⁵² Cette variante nommée « Particle Display SELEX » permet, suite à l'incubation avec une cible marquée par un fluorophore, une séparation par cytométrie en flux, type FACS (« Fluorescence-Activated Cell Sorting »), en fonction de l'intensité de fluorescence de chaque particule.¹⁵⁷ Cette méthode, bien que permettant une sélection rapide d'aptamères très affins pour tout type de cibles, nécessite l'accès à des équipements très coûteux.

- **Cas où l'aptamère et la cible sont en solution** : Dans l'optique de simplifier la mise en place des processus de sélection, des méthodes ne nécessitant aucun greffage ni de la cible ni de l'aptamère ont été développées. Une des principales méthodes est la SELEX couplée à l'électrophorèse capillaire (CE pour « Capillary electrophoresis »). Cette méthode développée en 2004 par Mendosa et Bowser permet une sélection en quelques cycles seulement grâce à la résolution très élevée de la CE, tout en utilisant de très faibles quantités de cibles.¹⁵⁸ Une étude comparative menée par Tang et al., entre cette méthode et la SELEX associée à la chromatographie d'affinité, a montré les avantages de la CE-SELEX.¹⁵⁹ Cette technique, a permis d'éliminer les biais liés au greffage de la cible bloquant de potentiels sites d'interaction et de diminuer également le nombre de cycles. La CE-SELEX ayant été choisie pour ce projet, son principe fera l'objet d'un développement plus détaillé au chapitre 2.

Une variante de la méthode proposée en 2006 par Berezovski *et al.* permet de minimiser les biais liés à la PCR tout en accélérant plus encore la sélection.¹⁶⁰ Cette méthode nommée Non-SELEX consiste en une répétition de cycles de sélection sans étapes d'amplification intermédiaires : Les séquences sélectionnées au cycle n sont directement remises en interaction avec la cible au cycle $n+1$.

D'autres méthodes en solution ont également été développées ne nécessitant pas d'appareillage onéreux comme l'électrophorèse capillaire. Un exemple, est une méthode utilisant des feuilles de graphène permettant une adsorption non-sélective des aptamères. Cette méthode de « Graphene Oxide » (GO)-SELEX permet, selon un principe similaire à celui de la Capture-SELEX, une libération des aptamères liés à la cible.¹⁶¹

- **Cas où la cible est une cellule ou un tissu** : Comme décrit précédemment, les sélections effectuées sur des cibles synthétiques ou purifiées, telles que des protéines recombinantes, n'assurent pas de retrouver une interaction similaire lorsque la cible est dans sa conformation native. C'est le cas notamment des récepteurs exprimés à la surface des cellules. C'est là qu'interviennent les méthodes de Cell-SELEX effectuées directement sur les cellules dans leur ensemble.^{162,163} Différentes variantes permettent une séparation des oligonucléotides liés et non liés, que ce soit une simple centrifugation¹⁶⁴ ou un marquage par fluorescence et une séparation par FACS.^{165,166} La Cell-SELEX, décrite pour la première fois par Blank *et al.* en 2001,¹⁶² est depuis très utilisée notamment dans le cas de cellules cancéreuses.^{167,168} Elle nécessite cependant l'utilisation de contre-sélections permettant de s'assurer de la reconnaissance spécifique des cellules tumorales. En ciblant l'intégralité des cellules, elle présente l'avantage d'être effective même lorsque les connaissances sur la cible sont limitées.

Des exemples de sélections effectuées directement *in vivo* ont également été reportés ces dernières décennies.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Le principe est relativement similaire à celui d'un SELEX Classique à l'exception que les aptamères marqués par un fluorophore sont au préalable injectés dans un animal ou une plante. Après exposition et distribution dans l'organisme, certains aptamères vont se lier à la cible d'intérêt, d'autres seront éliminés par clairance rénale. L'organe ou le tissu cible est ensuite extrait avant amplification des aptamères, réinjectés plus tard dans un autre animal et ainsi de suite avant séquençage. D'autres tissus peuvent également être retirés et étudiés pour identifier des aptamères non-spécifiques, toutefois la contre sélection est intrinsèque à la méthode. Les difficultés inhérentes à la sélection *in vivo* sont tout d'abord, l'élimination par l'organisme des aptamères, ainsi que leur bio-distribution qui montre un pourcentage plus élevé dans le rein et le foie que dans les autres organes.¹⁶⁷ En fonction de la structure adoptée par chaque aptamère, l'élimination peut être favorisée ou non, induisant un biais. Enfin cette méthode nécessitant l'utilisation d'un certain nombre de

sujets, soulève d'évidentes questions d'éthique par rapport aux SELEX plus classiques. Il apparaît donc clairement que le processus de SELEX permet une flexibilité tant au niveau de la conception de la banque que de la méthode de séparation. L'intérêt des aptamères et de leur sélection réside ainsi dans cette large palette de variantes permettant une reconnaissance de tout type de cibles allant d'une petite molécule ou une cellule *in vitro* à un organe directement *in vivo*.

IV. 4. Stratégies d'optimisation de la séquence des aptamères.

Dès lors que les candidats les plus affins ont été sélectionnés puis séquencés, diverses modifications peuvent encore être effectuées pour permettre de s'adapter au mieux à l'usage désiré *in fine*. En effet, les aptamères permettent une large diversité d'applications, que ce soit thérapeutiques, diagnostiques ou en tant que biocapteurs, présentant chacune des spécificités. Outre l'ajout de diverses fonctions telles que des chromo- ou fluorophore ou encore les modifications chimiques appliquées en post-sélection, il est primordial de s'intéresser directement à la séquence des aptamères. L'aptamère peut ainsi être utilisé entier, tronqué ou scindé mais également sous forme de constructions bivalentes ou multivalentes.¹⁷² Ce sont ces différentes modifications post-sélection qui seront traitées dans ce chapitre.

- **Aptamères tronqués** : En moyenne, les aptamères sélectionnés contiennent entre 80 et 100 nucléotides pour des composés d'un poids moléculaire avoisinant les 30 kDa. Toutefois, l'intégralité des nucléotides n'est pas impliquée dans l'interaction avec la cible ou dans la structuration de l'aptamère. Pour schématiser, la séquence peut se diviser en trois régions : la région impliquée dans l'interaction avec la cible, une seconde région indirectement impliquée puisque nécessaire à la structuration de la séquence et enfin une dernière portion n'étant pas ou peu impliquée comme discuté en partie IV.3.2 : impact des régions constantes. Des analyses bio-informatiques menées en 2008 par Cowperthwaite *et al.* ont notamment participé à la validation de cette théorie.¹²⁶ De nombreuses études ont depuis montré que le raccourcissement de certaines séquences permet dans certain cas de conserver voire même d'améliorer l'affinité des aptamères pour la cible.¹⁷³ Le cas de l'aptamère anti-VEGF₁₆₅ en est un bel exemple puisqu'après passage de 53 à 26 nucléotides, l'affinité pour la cible a

augmenté d'un facteur 200.¹⁷⁴ L'élaboration de la séquence tronquée se base généralement sur des études computationnelles visant à prédire les structures les plus probables. En plus d'améliorer les propriétés de reconnaissance des aptamères, cette réduction de la longueur des séquences a également un impact sur les rendements et donc les coûts de production ainsi que sur le poids moléculaire final du composé. Ces paramètres sont d'autant plus importants dans le cadre de la formation de constructions bi- ou multivalentes.

- **Aptamères scindés** : Cette seconde méthode consiste en un découpage de l'aptamère en plusieurs fragments qui s'assemblent en présence de la cible. Chaque brin peut être modifié pour présenter à son extrémité une molécule d'intérêt, qui lors de l'assemblage des brins, interagira avec une molécule complémentaire présente sur le second brin, permettant la formation du complexe désiré.¹⁷⁷ Cette double reconnaissance de la cible permet l'utilisation de ces « Split-aptamers » en tant que biocapteurs tout en réduisant l'encombrement stérique limitant généralement les interactions avec les cibles de petite taille.¹⁷³

- **Constructions multivalentes** : La multivalence ou l'interaction simultanée entre plusieurs unités fonctionnelles complémentaires ou identiques, est depuis quelques années un axe d'optimisation important dans la conception de biomolécules. Cette stratégie s'inspire des nombreux phénomènes biologiques gouvernés par ces interactions multiples,¹⁷³ à l'instar des anticorps.

Les conjugaisons de nombreux composés, majoritairement de petites tailles, ont déjà démontré l'amélioration des réponses biologiques, à l'instar du motif peptidique RGD, au cœur de nombreuses études.¹⁷⁸ Comme illustré en Figure 13, de nombreux liens ont été exploités pour permettre cette multimérisation dont des PEG ou encore des châssis de nature peptidique.

Bien que majoritairement utilisée dans le cadre de petites molécules, la construction de systèmes multivalents s'applique également aux aptamères.^{174,175} Dans le cas où plusieurs sites permettent la reconnaissance et donc diverses interactions entre le ligand et la cible, la liaison est renforcée. Cela s'explique notamment car la dissociation du complexe, nécessite l'interruption de l'interaction sur chacun des sites simultanément. En biochimie, ce

phénomène est traduit par le principe d'avidité. De plus, de telles structures permettent une meilleure stabilité dans l'organisme. Un exemple d'aptamère ciblant les cellules B a été décrit par Tang et al. en 2007,¹⁷⁹ puis comparé avec ses oligomères par Mallikaratchy *et al.* en 2010.¹⁷⁴ Cette étude a montré que des constructions bivalentes, trivalentes et tétravalentes reliées par des PEG augmentent l'affinité pour la cible par rapport au composé monovalent. Toutefois, il est intéressant de remarquer que le composé tétravalent semble moins efficace que le trivalent. Des constructions plus importantes sont également possibles, notamment *via* l'utilisation de nanoparticules,¹⁸⁰ mais ne seront pas traitées dans ce manuscrit.

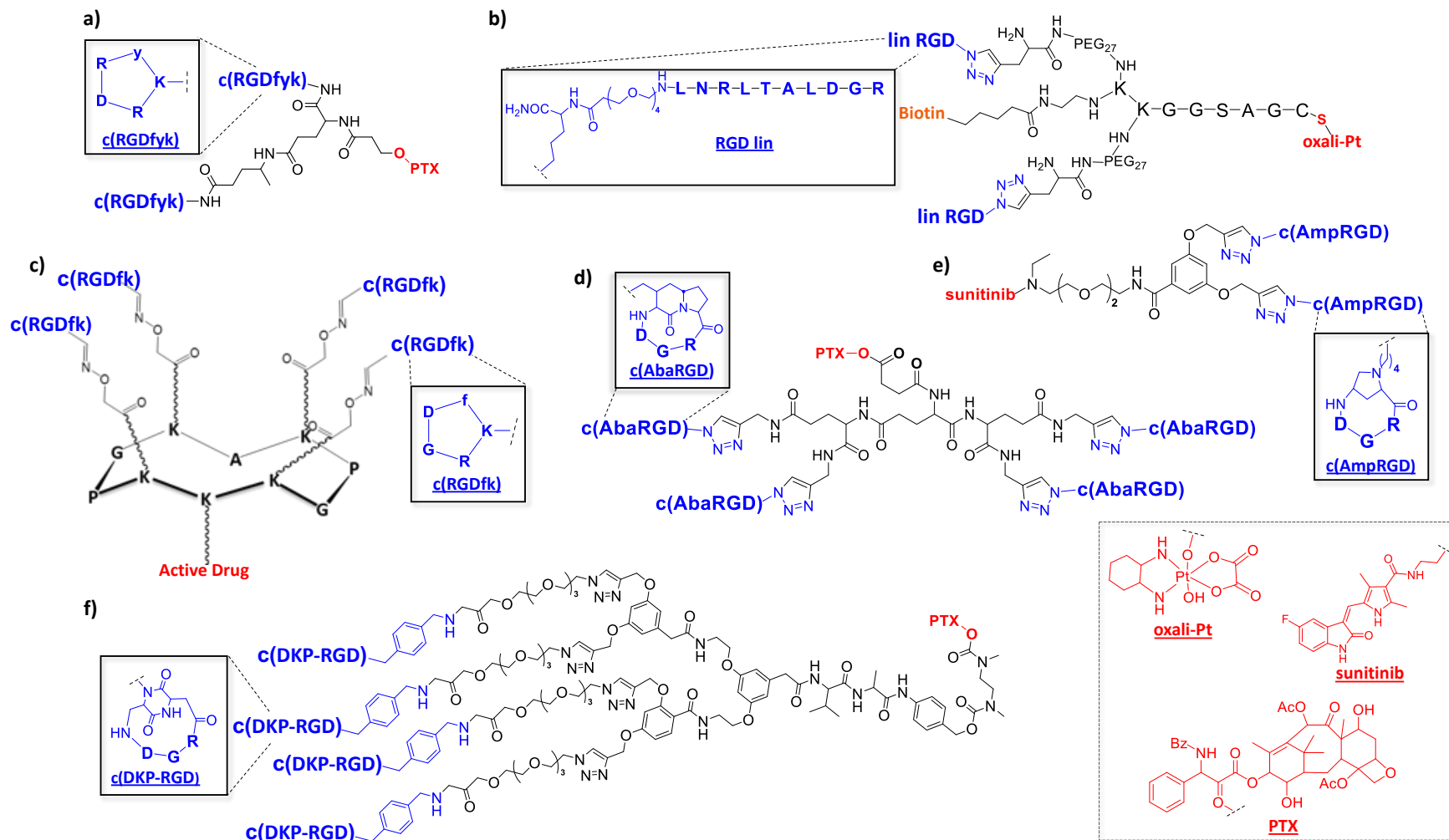


Figure 13 : Structures de constructions multimériques de RGD. a) c(RGD)-paclitaxel; b) «c(RGD)-Y-shaped peptide core»; c) «tetrameric c(RGD)-containing cyclodecapeptide»; d) «c(AbaRGD)-glutamique acide dendrons»; e) ligation c(AmpRGD)-triazole/ether/amide. Adapté de la revue de Cossu et al.¹⁷⁸

IV. 5. Stratégies de caractérisation des interactions

Une fois le processus de sélection complété, il est nécessaire de soumettre les candidats aptamères à des tests biophysiques, permettant de mieux caractériser les interactions avec la cible. Les méthodes utilisées souvent complémentaires permettent d'établir des constantes cinétiques ou thermodynamiques, paramètres critiques du développement de biomolécules à visées thérapeutiques et/ou diagnostiques.

Dans ce chapitre, les principales méthodes, généralement utilisées à cette fin, seront présentées dans le Tableau 4 résumant les caractéristiques et avantages de chacune. Les différents paramètres étudiés ainsi que le principe de chacune des méthodes ayant été utilisées au cours de cette thèse seront décrits plus en détails aux Chapitres 2 et 3.

Tableau 4 : Caractéristiques, avantages et inconvénients des principales méthodes permettant de caractériser les interactions aptamère-cible.

Technique	Phénomène observé	Informations obtenues	Avantages	Désavantages	Ref.
SPR	Changement d'indice de réfraction	K_D : sub nm - mM, k_{on} , k_{off} Paramètres thermodynamiques*	Grande sensibilité faibles quantités (μ g)	Pas de détection < 100 Da Immobilisation	181,182
BLI	Modification d'interférence d'un signal lumineux	K_D : nm - mM, k_{on} , k_{off} Paramètres thermodynamiques*	Pas de micro fluide Rapide et peu coûteux	Immobilisation Risque d'évaporation du solvant	183,184
ITC	Chaleur libérée au cours d'une interaction	K_D : nm – sub mM ΔG , ΔH , ΔC , ΔS Stœchiométrie	Paramètres thermodynamiques Pas de marquage ni de poids moléculaire minimum.	Quantités importantes Nécessite une variation d'enthalpie	185,186
MST	Détection du mouvement thermophorétique de molécules fluorescentes.	K_D : pm - mM Mécanisme et stœchiométrie Paramètres thermodynamiques*	Petites molécules détectables Utilisation d'échantillons complexes	Marquage parfois délétère à l'interaction	187
Polarisation de fluorescence	Variation de la polarisation d'un faisceau lumineux	K_D : nm - mM	Rapide et faibles quantités Convient aux cibles de faible poids moléculaire	Interférences dues à l'auto fluorescence et « quenching » Stabilité du fluorophore	110,188
Cytométrie en Flux	Variation de l'intensité de fluorescence	K_D : nm - mM	Interaction aptamères/cellules Possibilité d'obtenir plusieurs paramètres en parallèle	Équipements onéreux Stabilité des cellules au cours de l'analyse	189,190

*si l'analyse est réalisée à différentes températures.

IV. 6. Applications des aptamères en thérapie.

Les aptamères présentent de nombreuses applications que ce soit pour de l'imagerie¹⁹¹ de la détection de biomarqueurs et petites molécules,^{192,193} ou encore en thérapie.¹⁹⁴ C'est dans cette dernière catégorie que s'inscrivent les travaux présentés dans ce manuscrit.

A ce jour, on recense 18 acides nucléiques approuvés à des fins thérapeutiques, parmi lesquels on retrouve des oligonucléotides antisens (ASO), des « Splice-switching Oligonucleotides » (SSO), des ARN interférents (siRNA), des ARN messagers (mRNA) et enfin un unique aptamère ARN.¹⁹⁵

Cet aptamère du nom de MACUGEN[®] (pegaptanib) (Figure 14) est le premier composé ARN à visée thérapeutique approuvé par la FDA en 2004. Composé de 27 nucléotides dont 25 modifiés par des fonctions C2'-F ou C2'-OMe, cet aptamère était utilisé dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge de forme humide, en ciblant le récepteur VEGF₁₆₅ avec un constante d'affinité de l'ordre de 50 pM.¹⁹⁶

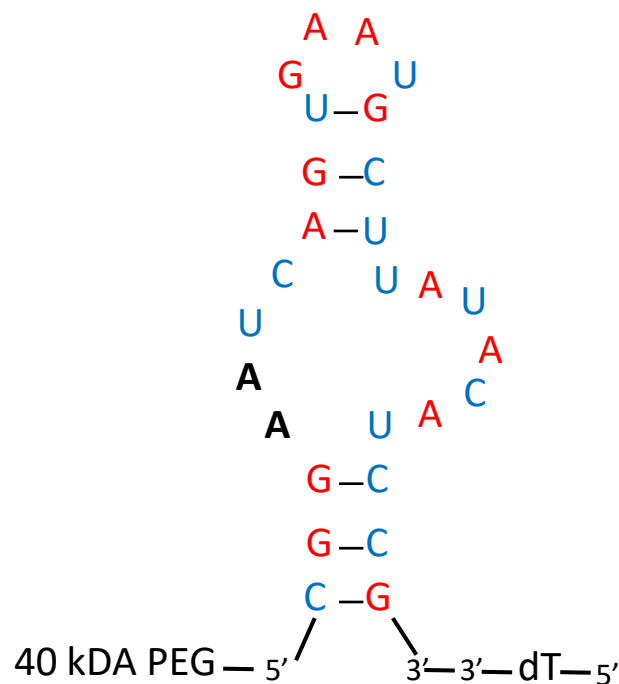


Figure 14 : Structure secondaire supposée du pegaptanib. Les bases puriques A et G représentées en rouge indiquent une modification en C2'-OMe. Les bases pyrimidiques C et U représentées en bleu indiquent une modification en C2'-F. L'aptamère est conjugué à un PEG de 40 kDa en position 5'. Adapté de Ng et al.¹⁹⁷

Cet exemple, unique représentant des aptamères en thérapie près de 20 ans après sa commercialisation, illustre bien les challenges importants auxquels se confrontent le développement d'oligonucléotides pour des applications *in vivo* : dégradation par les nucléases, clairance rénale, une distribution rapide dans les tissus comme le foie ou la rate, des réponses immunitaires non spécifiques ou encore de potentiels effets poly-anioniques.¹⁹⁸ Toutefois, comme décrit plus tôt dans ce manuscrit, le développement ces dernières années de modifications chimiques ou de composés conjugués permettent une nette amélioration des propriétés pharmacocinétiques des aptamères. Grâce aux efforts importants de la communauté scientifique pour le développement de ces composés, plus d'une dizaine d'aptamères sont entrés en phases cliniques et de nombreux autres sont en phase de développement pré-clinique.^{199,200}

De même que pour les anticorps, la conjugaison d'aptamères utilisés en tant que vecteurs spécifiques permet la délivrance de composés hautement actifs à une cible tumorale, en épargnant les tissus sains alentours. La plupart de ces traitements reposent notamment sur la capacité d'internalisation des aptamères.¹⁹⁶ On retrouve une large variété d'objets organiques comme inorganiques pouvant être classés en deux catégories. La première englobe les nanomédecines pouvant aller de quelques nanomètres à plus d'une centaine et permettant une vectorisation importante de la charge thérapeutique. Cette catégorie inclut de nombreux types de « nanocarriers » tels que les liposomes, les nanoparticules métalliques ou non-métalliques (exemple de la silice), les micelles, les polymères etc.²⁰¹ Par exemple, une étude visant à comparer l'internalisation de liposomes par des cellules cancéreuses, surexprimant le récepteur cellulaire CD44, a été menée par Alasher *et al.* en 2013. Les résultats montrent que lorsque les liposomes sont couplés à un aptamère nommé Apt1 ciblant le récepteur CD44, l'adsorption cellulaire des composés d'intérêt augmente significativement.²⁰²

La seconde catégorie inclut les objets de plus faibles poids moléculaires tels que les molécules cytotoxiques, les inhibiteurs de tyrosine kinase, ou encore les siRNA par exemple.¹⁹⁹ Une cible d'intérêt en thérapie du cancer est le récepteur HER2 surexprimé par exemple dans le cas de cancer du sein. En 2012, Thiel *et al.* ont décrit un aptamère anti-HER2 permettant l'internalisation dans la cellule en cas de liaison.²⁰³ Cet aptamère en série ARN a été conjugué à une séquence de siRNA ciblant le gène BCL2, impliqué dans la régulation de l'apoptose. Une fois internalisé, le siRNA vectorisé a eu pour effet l'extinction génique de BCL2, permettant

une meilleure réponse du traitement classique à la cisplatine. Plus récemment, la multimérisation d'aptamères anti-HER2 / HER3 et EGFR a démontré l'intérêt d'une dualité entre la vectorisation et l'inhibition de l'aptamère hybride nommé H2EH3 couplé au siRNA.²⁰⁴

En conclusion, malgré le succès limité des aptamères en thérapie à ce jour, l'expérience acquise ainsi que les nombreuses avancées technologiques et preuves de concepts développées font des aptamères une classe de composés à haut potentiel. Ces acides nucléiques simple brin ont prouvé leur capacité d'interactions spécifiques avec une grande variété de cibles, pouvant être internalisés ou non et permettant à la fois un rôle d'inhibiteur et de vecteur. Cette double fonction rappelle les anticorps monoclonaux avec lesquels ils sont souvent comparés. La demande grandissante du marché pour développer des composés moins onéreux, plus stables et modulables que les mAbs, explique la démocratisation des oligonucléotides à visée thérapeutique ces dernières années. L'expansion des connaissances sur le sujet s'illustre notamment par un nombre grandissant d'aptamères en phases clinique ou pré-clinique, ce qui laisse espérer de futures percées dans le domaine, presque 20 ans après la mise sur le marché du pegaptinib.

V. Présentation des travaux de thèse

Ce projet s'inscrit donc dans cette nécessité de développement de nouveaux systèmes qui intègreraient les propriétés des mAbs tout en s'affranchissant des obstacles cités précédemment. Dans cette optique, nous proposons sous forme de preuve de concept, la formation de constructions multivalentes à base d'oligonucléotides et de peptides.

L'objectif principal du projet est premièrement l'obtention d'éléments de reconnaissance permettant à terme le développement de mimes de RTX. Pour ce faire, nous avons sélectionné des aptamères sélectifs de l'épitope CD20 en utilisant l'électrophorèse capillaire (méthode de CE-SELEX). Les aptamères obtenus sont alors greffés sur des châssis cyclopeptidiques sous une forme multimérique. Ces systèmes totalement synthétiques, peu coûteux et de faibles poids moléculaires (< 50 kDa), s'affranchiraient des obstacles exposés précédemment tout en intégrant les propriétés des mAbs.

Les travaux de thèse ont donc été divisés en cinq objectifs :

1 : La sélection d'aptamères via la méthode CE-SELEX. Dans cet optique un fragment de l'antigène CD20 a été synthétisé puis incubé en présence d'une banque d'ADN contenant statistiquement 10^{18} séquences différentes (Figure 15). Le mix a ensuite été injecté en électrophorèse capillaire permettant une séparation entre l'excès de cible, la banque d'ADN non-liés et le complexe formé entre ces deux espèces. Un second peptide a également été synthétisé en tant que contrôle négatif, puis injecté en présence de la matrice d'oligonucléotides en fin de processus de sélection. Cette étape a pour but de contrôler la spécificité de l'échantillon obtenu après la SELEX, pour la cible afin d'effectuer au besoin une étape de contre sélection. La matrice d'ADN obtenue à l'issue de la sélection a ensuite été séquencée et caractérisée. Au total 5 séquences ont été sélectionnées pour les étapes de caractérisations.

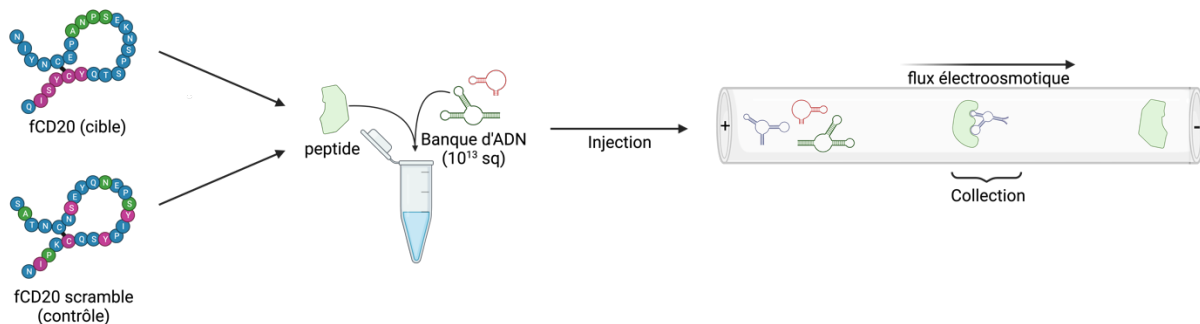


Figure 15 : Illustration schématique de la première étape du projet visant à sélectionner des aptamères spécifiques d'un fragment de l'antigène CD20.

2 : Caractérisation *in vitro* des interactions fCD20 – Aptamères. Des études d'interaction entre les aptamères et le fragment antigénique ont été menées en solution et sur surface dans le but d'évaluer la spécificité et l'affinité des différentes séquences pour la cible. A l'issue de cette étape, 2 aptamères ont été retenus.

3 : Modélisation 2 D et Optimisation du ratio longueur des séquences / interactions avec la cible. Les séquences retenues ont été modélisées en 2D *in silico* pour permettre de mieux appréhender les structures secondaires potentiellement impliquées dans l'interaction. Différents fragments ont ensuite été conçus en se basant sur ces modèles puis caractérisés en accord avec les méthodes utilisées précédemment (Figure 16).

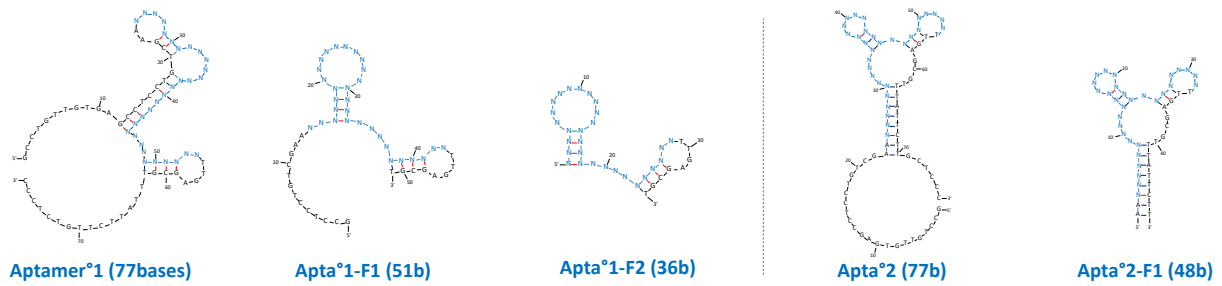


Figure 16 : Illustration schématique de la modélisation 2D des aptamères et de leurs fragments.

4 : Caractérisation *in cellulo* des aptamères et des fragments. Les meilleurs aptamères natifs ainsi que les fragments ont ensuite été caractérisés *in cellulo* sur des lignées cellulaires exprimant ou non l'antigène CD20.

5 : Conjugaison et formation de composés multivalents. Les meilleurs fragments, identifiés lors des étapes précédentes, ont été synthétisés sur support solide, méthode compatible avec l'incorporation de modifications chimiques. En parallèle, des cyclo-peptides fonctionnalisés ont également été synthétisés pour permettre un greffage de multiples oligonucléotides. Enfin, des premiers essais de conjugaison ont été effectués (Figure 17).

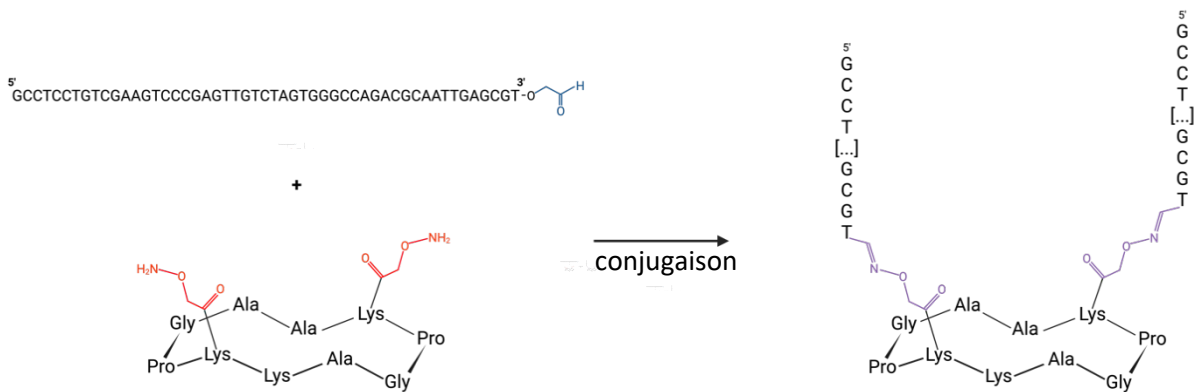


Figure 17 : Schématisation de la formation de constructions multivalentes.

Chapitre II

Sélection d'aptamères dirigés contre un fragment peptidique de l'antigène CD20

La première étape de ce projet a consisté en une sélection d'aptamères ciblant spécifiquement l'antigène CD20. Pour ce faire, notre choix s'est porté sur une technique « *in vitro* » en solution, consommant peu de produits, peu coûteuse, rapide à mettre en place et ne nécessitant pas d'étapes de greffage ou d'étapes de contre sélection vis-à-vis d'un support. C'est ainsi qu'a été choisie la méthode de CE-SELEX qui permet de limiter le processus de sélection à quelques cycles seulement¹¹⁰ (2 à 4 en moyenne) grâce à la résolution très élevée de l'électrophorèse capillaire. Pour simplifier le processus de sélection, un fragment de 25 acides aminés, issu de l'épitope de l'antigène CD20, a été choisi comme cible puis synthétisé par Synthèse Peptidique en Phase Solide (SPPS).²⁰⁵ Un second peptide dérivé du premier a également été synthétisé pour utilisation en tant que contrôle négatif. Le processus de SELEX nécessitant des étapes d'amplification, de digestion et de purification d'ADN, différents contrôles ont été nécessaires au bon déroulement de la sélection et ont été effectués en amont de celle-ci. Ce chapitre s'articule ainsi autour des différentes étapes de mise en place et de réalisation de ce processus de CE-SELEX.

I. Choix et synthèse de la cible issue de l'antigène CD20.

I. 1. Introduction

Du fait de l'impossibilité d'effectuer la sélection *in vitro* sur l'ensemble de la protéine CD20, un fragment a été sélectionné. Le peptide choisi en tant que cible pour la sélection d'aptamères dirigés contre l'antigène CD20 sera nommé fCD20 dans la suite de ce manuscrit. Il est issu de la boucle transmembranaire la plus importante de l'antigène natif et se compose de 25 acides aminés (H-NIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQ-OH) comme illustré en Figure 18-A. Ce fragment peptidique de 2848 Da contient notamment les deux régions impliquées dans l'interaction avec l'anticorps RTX, proches dans l'espace par la présence d'un pont disulfure entre les deux cystéines. Des fragments issus de CD20 ont déjà été utilisés pour des caractérisations sur surface à l'instar du travail effectué par Liu et al. qui ont développé une surface antigénique en greffant un fragment de CD20 (H-MGKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQ-OH) couplé à une protéine de bactériophage.²⁰⁶ L'interaction CD20/RTX a ainsi été caractérisée par un K_D de 380 nM *via* une isotherme de Langmuir. Plus récemment, le fCD20 a été utilisé au sein du laboratoire en tant

que cible pour des études d'interaction CD20/RTX *via* SPR, mesurant cette fois une constante d'affinité de l'ordre de 35 nM.²⁰⁷

Dans le cadre de ce projet, deux peptides cibles ont été synthétisés : le fCD20 et une version dite « scramble » (H-SATNCNSEYQNEPSYIPYSQCKPIN-OH), composée des mêmes acides aminés que la cible mais dans un ordre différent (Figure 18-B). Ce peptide nommé fCD20 scbl sera utilisé en tant que contrôle négatif lors de la sélection d'aptamères. Une contre sélection, visant à éliminer les aptamères reconnaissant ce peptide scramble est également possible pour limiter les interactions non spécifiques de la banque d'aptamères avec sa cible.

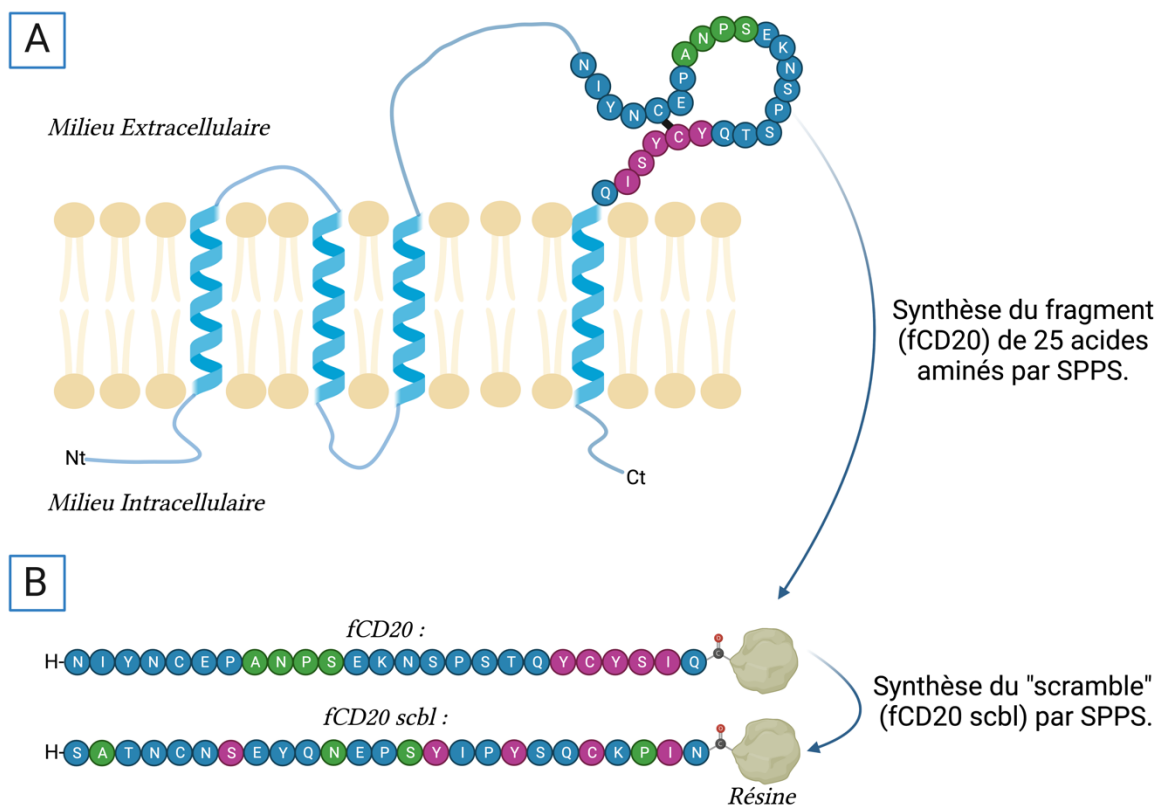


Figure 18 : Représentation de la cible choisie pour la sélection par CE-SELEX et de son contrôle négatif. A : Schématisation de l'antigène CD20 sous forme transmembranaire. Mise en avant des séquences majoritairement impliquées dans l'interaction avec le rituximab en vert et violet. **B :** Choix d'une séquence de 25 acides aminés issus du CD20 (fCD20) en tant que cible (en haut), ainsi que d'une séquence de même composition mais dont l'ordre diffère (fCD20 scbl) en tant que contrôle négatif (en bas).

I. 2. Synthèses des peptides fCD20 et fCD20 scbl

Les peptides fCD20 et fCD20 scbl ont ainsi été synthétisés *via* la SPPS selon la méthode standard de protection fluorénylméthoxycarbone (Fmoc) / tert-butyle (tBu).²⁰⁸ Cette

technique développée dans les années 60 par Merrifield,²⁰⁹ consiste à coupler successivement des acides aminés protégés à la fois sur leur fonction amine en position N-terminale (N-term) et si besoin sur leur chaîne latérale, le tout sur support solide (Figure 19). Le couplage s'effectue entre la fonction acide carboxylique en C-term du nouvel acide aminé et la position N-term déprotégée au préalable de l'acide aminé précédent. L'élongation du peptide se fait donc de la position C-term vers le N-term selon le cycle suivant :

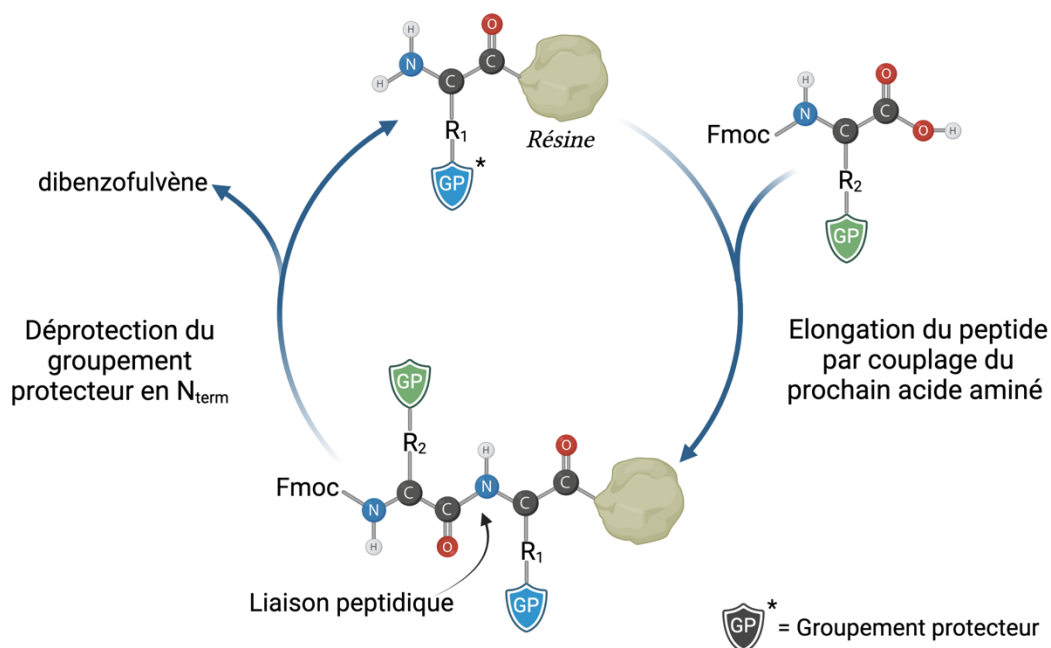


Figure 19 : Cycle d'élongation d'un peptide par SPPS.

Cette méthode, au contraire de la synthèse peptidique en phase homogène, ne nécessite pas de purification entre chaque étape de couplage étant donné que les différentes espèces réactionnelles peuvent être facilement éliminées par filtration. De plus, différents solvants, agents activateurs, ainsi que de nombreux groupements protecteurs sont compatibles avec la SPPS.

La synthèse a été effectuée sur une résine 2-chlorotriptyl comme illustré en Figure 20. Le premier acide aminé est ajouté en présence de Dichlorométhane (DCM) anhydre et N,N-Diisopropyléthylamine (DIPEA). Ensuite, la chaîne peptidique est allongée suivant la stratégie Fmoc/tBu. En fin de SPPS, le peptide linéaire **1a** est clivé de la résine en milieu acide à l'aide d'une solution contenant le mélange acide trifluoroacétique (TFA) / Triisopropylsilane (TIS) / H₂O miliQ (95/2,5/2,5 v/v/v). Ces conditions acides fortes permettent d'éliminer les

groupements protecteurs des chaînes latérales en parallèle du détachement de la résine. Ensuite, le peptide linéaire **1b** est cyclisé par oxydation et formation d'un pont disulfure donnant le peptide cyclique **1**. Deux protocoles ont été utilisés au court de ce projet. Les premières cyclisations ont été effectuées en présence de bicarbonate de triéthylammonium (1M), d'acétonitrile et d'eau miliQ (1/1 v/v) durant 72h. Toutefois, lors des passages en CE, deux pics ont été visualisés (cf Chapitre 2 IV). Un second protocole a donc été mis en place en se basant sur les travaux de Tam²¹⁰ en présence de Tris (0,1 M), de chlorure de guanidinium (20 mM) et de diméthylsulfoxyde (DMSO) (5% du volume total) pH = 8,5 dans H₂O durant 24h. Il est important de spécifier que la cyclisation s'effectue en milieu dilué (0,3 mM), dans le but de favoriser la cyclisation intramoléculaire et ainsi éviter une réaction de pontage entre peptides. Les réactions ont été suivies par HPLC et UPLC-MS.

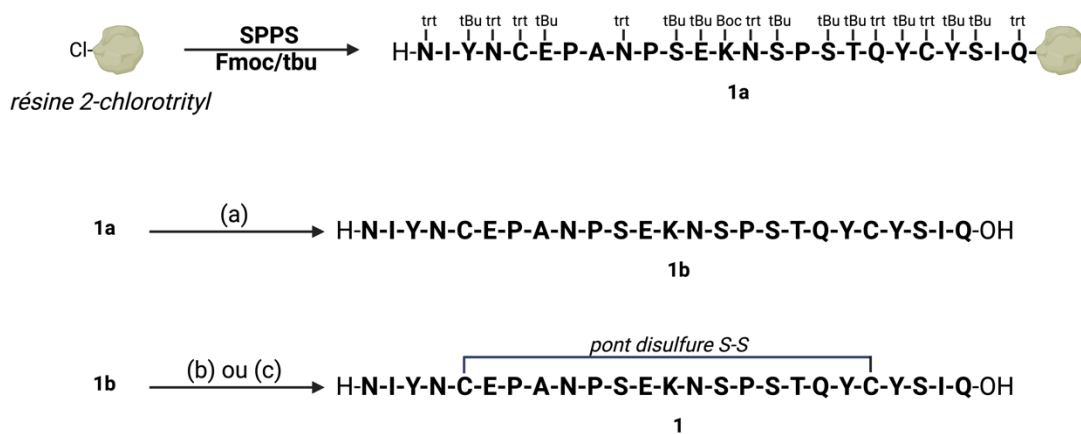
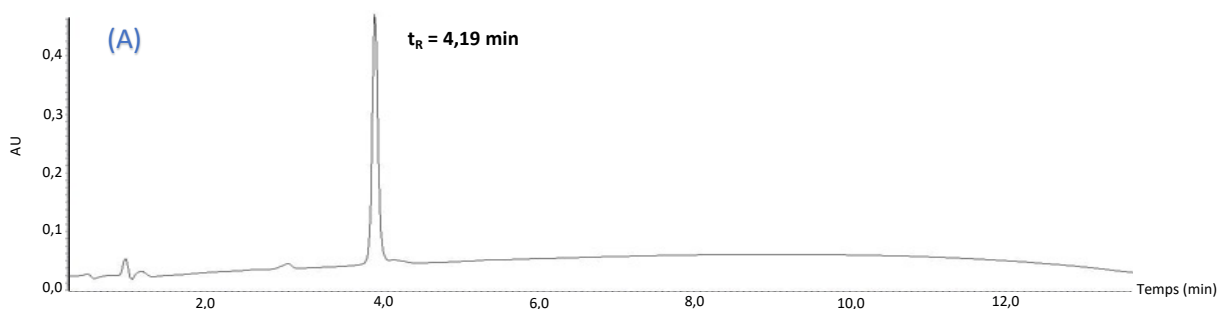


Figure 20 : Synthèse du peptide 1 : fCD20. (a) TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5 v/v/v), t.a.; (b) bicarbonate de triéthylammonium (1M) dans Acétonitrile/ H₂O (1/1 v/v) t.a. ; (c) Tris (0.1 M), chlorure de guanidinium (20 mM) et DMSO (5% volume total) dans H₂O, t.a..

Le même protocole a été appliqué au peptide fCD20 scbl **2**. Les peptides ont ensuite été purifiés par HPLC préparative puis caractérisés par UPLC-MS (Figure 21).



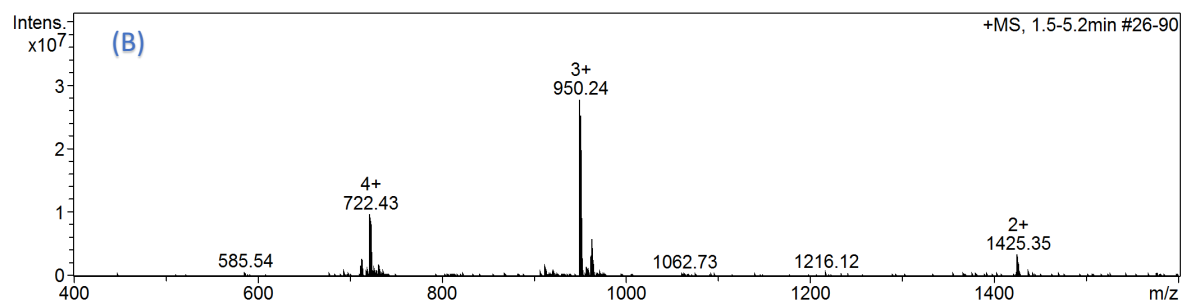


Figure 21 : Caractérisation du peptide fCD20 : (A) Chromatogramme UV ($\lambda = 214\text{nm}$) du peptide CD20 obtenu pour une analyse de 27 min exécutée dans H_2O , 0,1% TFA avec un gradient d'acétonitrile allant de 5 à 100% sur un temps de 19 min (zoom sur la fenêtre 0-15 minutes). (B) Spectre de masse (source ESI+). Cf Partie Expérimentale pour les conditions.

II. Choix de la CE comme méthode séparative associée au processus de SELEX.

II. 1. Introduction

Basée sur les travaux effectués par Arne W. K. Tiselius, lauréat du Prix Nobel de Chimie en 1948 sur le principe de l'électrophorèse, l'électrophorèse capillaire moderne fut introduite par J. W. Jorgenson et K. D. Lukacs.²¹¹ Ils ont ainsi pu mettre en lumière les avantages de cette variante par rapport aux méthodes chromatographiques ainsi qu'à l'électrophorèse sur gel principalement utilisées jusqu'alors. La possibilité d'utiliser des systèmes miniaturisés sous haute tension permettant une analyse rapide et à résolution importante, le fait de pouvoir réutiliser les capillaires ainsi que la possibilité d'automatiser le processus en font une méthode d'intérêt pour la chimie analytique.^{212,213,214} Dans les années 2000, les premières générations de CE automatisées ont vu le jour permettant des analyses telles que le séquençage de Sanger²¹⁵ avec une capacité de détection d'environ 115 kbp / 24h. Dans les domaines de la protéomique, peptidomique ou métabolomique, la CE couplée à la spectrométrie de masse (CE-MS) s'est imposée comme un outil parmi les plus performants.^{216,217} Cette approche est même citée comme méthode de référence dans l'analyse de certains composés par les grands référentiels tels que la Pharmacopée Européenne ou la Pharmacopée Américaine, à l'instar des glycoprotéines ou encore des anticorps recombinants.²¹⁸ De plus, l'utilisation de la CE s'est développée pour des applications variées telles que la séparation chirale^{219,220} ou encore la sélection d'aptamères.^{221,110,222}

II. 2. Principe de la CE

De nos jours, la CE apparaît comme une méthode séparative très performante et peu coûteuse, utilisée comme alternative aux techniques chromatographiques en se basant sur la migration d'espèces sous l'action d'un champ électrique. En fonction de la nature de l'électrolyte ainsi que du capillaire utilisé, la CE peut se décliner en différents modes (électrophorèse de zone, électrophorèse en phase micellaire, électrophorèse en gel etc.) qui peuvent être couplés à un large choix de techniques de détection (absorption UV-visible, fluorimétrie, conductimétrie, spectrométrie de masse etc.).

II.2.1 Injection au sein du capillaire

Il existe principalement deux modes d'injection au sein d'un capillaire :

- L'injection hydrodynamique : Une pression est appliquée à une extrémité du capillaire (ou un vide à l'autre extrémité) permettant une injection dont la quantité est dépendante du temps d'injection, de la viscosité de l'échantillon, de la longueur et du diamètre du capillaire ainsi que de la pression appliquée. Ce mode d'injection permet une migration au sein du capillaire indépendante des caractéristiques intrinsèques à chaque composé.
- L'injection électrocinétique : Une tension est appliquée à chaque extrémité du capillaire permettant une migration des espèces, qui dépend de la section du capillaire, du flux électroosmotique, de la mobilité électrophorétique de chaque composé, du temps d'injection ainsi que de la tension appliquée.

II.2.2 Transport et séparation au sein du capillaire

Le transport et la séparation des différents composés au sein d'un capillaire vont résulter de deux mécanismes, l'un inhérent au composé, l'autre au capillaire ainsi qu'à l'électrolyte (Figure 22).

Tout d'abord, sous l'action d'un champ électrique, les espèces chargées vont se déplacer selon le principe de migration électrophorétique.

La vitesse électrophorétique de migration de chaque espèce (v_{ep}) peut être exprimée selon l'équation suivante, en supposant que les espèces sont sphériques (de rayon r). La mobilité électrophorétique de chaque espèce (μ_{ep}) est définie en divisant sa vitesse de migration par la valeur du champ électrique imposé E :

$$(a) \quad V_{ep} = \frac{qE}{6\pi\eta r}$$

$$(b) \quad \mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

V_{ep} = vitesse électrophorétique

μ_{ep} = mobilité électrophorétique

q = charge de l'ion E = champs électrique

η = viscosité du milieu r : rayon ionique

Équation 1 : Calcul de la mobilité électrophorétique d'une espèce chargée au sein d'un capillaire.

La mobilité électrophorétique est caractéristique d'une espèce donnée dans un système électrophorétique. La mobilité et la vitesse de migration sont donc fonction du rapport charge(q) / rayon solvaté(r). Cette migration s'effectue vers l'électrode de charge opposée. Seules les espèces chargées sont donc concernées par ce phénomène.

Dans la plupart des cas, le capillaire de silice utilisé possède un excès de charges négatives résultant de l'ionisation des groupements silanols (SI-OH) en silanoates (SI-O⁻). En présence de l'électrolyte, des contre-ions (cations solvatés présents dans le tampon) vont alors s'adsorber de sorte à former une double couche permettant de maintenir une neutralité de surface. Ces cations se mettent en mouvement sous l'application du champ électrique, entraînant ainsi les autres molécules. Ce phénomène se nomme le flux électroosmotique. En milieux utilisés (généralement neutres ou basiques), la densité en charges négatives de surface est élevée donnant lieu à un flux électroosmotique important. Il est possible de modifier ou d'inverser ce flux de façon dynamique par l'ajout dans l'électrolyte de tensioactifs ou de surfactants impactant la charge de surface par interaction avec les groupements silanols. La migration de chacun des composés étudiés est donc la résultante de la combinaison de ces deux phénomènes :

mobilité = vitesse électrophorétique + vitesse électroosmotique.

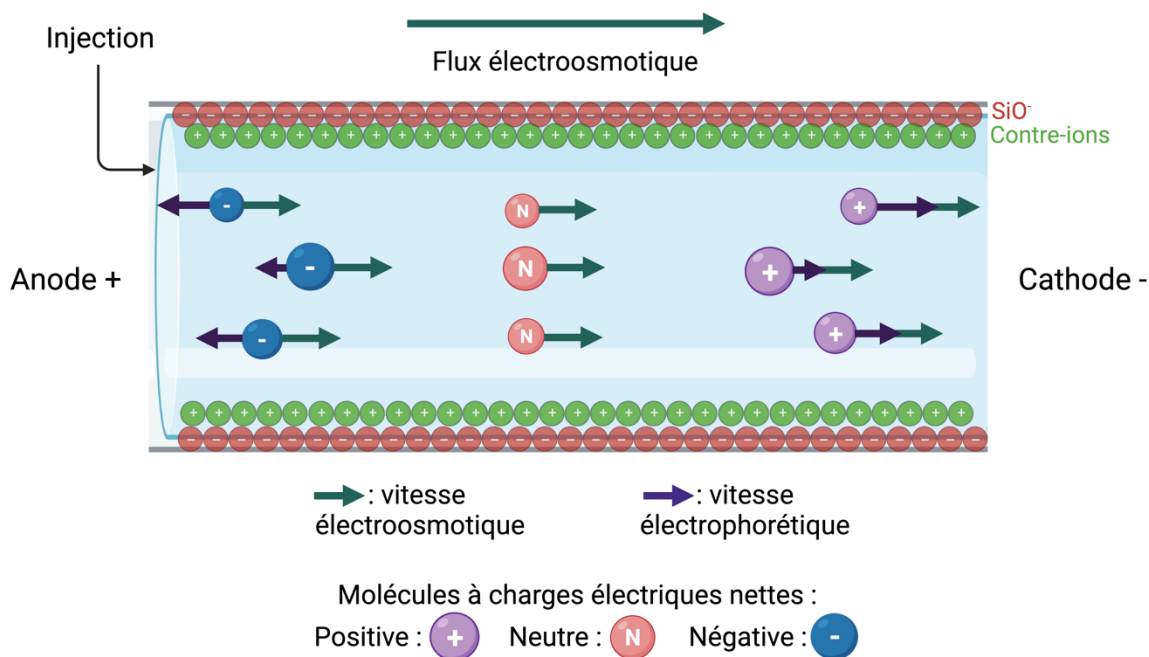


Figure 22 : Principe de la séparation d'un mélange d'espèces par la méthode d'électrophorèse capillaire.

Il existe de nombreux modes de séparation utilisés en fonction de la nature des composés. Dans le cadre de ce projet, la variante utilisée est l'électrophorèse capillaire de zone (CZE) qui permet la séparation de composés ionisés ou ionisables en fonction de leur rapport charge / rayon solvaté. Ce mode est le plus répandu et également le plus simple à mettre en place, bien qu'il ne soit pas applicable dans le cadre de composés ayant une charge électrique nette neutre. Pour favoriser la séparation des différentes espèces, le pH du tampon de migration est le paramètre le plus déterminant, puisqu'il influe sur l'état d'ionisation des molécules ainsi que sur le flux électroosmotique. La force ionique du tampon modifie également le flux électroosmotique ainsi que la mobilité électrophorétique des ions analysés. D'autres paramètres tels que la température et la tension appliquée aux bornes sont mis en jeu afin d'optimiser la séparation électrophorétique.

II.2.3 Détection au sein du capillaire

Du fait des faibles volumes injectés (quelques nL) ainsi que des dimensions du capillaire, la détection en CE peut être complexe. Pourtant de nombreux modes de détection ont été adaptés à l'utilisation de la CE par la communauté scientifique. La plus classique est la détection par absorption dans l'UV-visible qui nécessite la création d'une fenêtre de détection d'environ 1 cm de longueur. Sur le même principe, un détecteur par fluorescence peut être

associé à la CE, à la place ou en complément de l'UV-visible. D'autres méthodes telles que la spectrométrie de masse ou des méthodes conductimétriques peuvent également être employées. Toutefois, dans le cadre de la CE-MS, il est parfois difficile d'obtenir des conditions permettant à la fois une bonne séparation lors de la migration, le maintien d'un courant électrique stable, ainsi qu'une bonne ionisation des composés pour la masse.

II. 3. Principe et avantages de la CE-SELEX

En 2004, Mendonsa et Bowser ont démontré la possibilité d'effectuer une sélection d'aptamères ayant une forte affinité pour l'immunoglobuline E (K_D inférieurs à 30 nM) en seulement quatre cycles,¹⁵⁸ grâce à la combinaison de la CE et de la SELEX. Ces travaux ont pu mettre en avant les avantages que la CE apporte au processus de sélection : 1) la sélection se fait en solution homogène, ce qui permet de réduire grandement les interactions non spécifiques avec la surface. Cela permet également une meilleure accessibilité de la cible et améliore de fait le taux d'enrichissement par cycle. 2) A l'inverse des méthodes de SELEX traditionnelles, il n'est pas nécessaire d'effectuer une étape d'immobilisation pour la cible, ce qui simplifie grandement sa mise en place. 3) Le pouvoir résolutif de la CE permet une très bonne séparation de l'ADN libre par rapport à l'ADN lié à la cible, favorisant la sélection d'aptamères très affins et spécifiques en seulement quelques cycles de sélection 4) Un cycle de CE-SELEX ne nécessite généralement qu'une journée, la totalité des itérations jusqu'à une semaine. A l'inverse un cycle de SELEX conventionnel peut nécessiter quelques jours. Le nombre de cycles étant plus important, la sélection peut durer jusqu'à deux mois sans inclure le séquençage. 5) L'injection ne nécessitant que quelques nanolitres, les quantités d'échantillons sont également fortement réduites.²²³ Au cours des deux dernières décennies, des améliorations n'ont cessé d'être apportées à chaque aspect du processus de CE-SELEX, en optimisant entre autres, les conditions de sélections, la conception des banques d'oligonucléotides, l'amplification ou non par PCR, la collection du complexe ou encore les techniques de séquençage.²¹⁸ D'autres avantages ont également été mis en avant tels que la possibilité d'effectuer facilement un contrôle négatif sur une cible similaire au composé d'intérêt ou encore l'utilisation de la CE en tant que méthode analytique pour caractériser les collections des candidats obtenus. L'enrichissement de chaque cycle de sélection peut ainsi être déterminé par le calcul de constantes d'affinité apparentes (K_D).

En se basant sur l'expertise du laboratoire ainsi que sur la très bonne connaissance de la cible, c'est la méthode de CE-SELEX qui a été retenue pour ce projet. Le processus global se décompose en 5 étapes de sélection illustrées en Figure 23 ainsi que, par la suite, d'une 6^{ème} étape de caractérisation. Les modes de détection choisis sont la détection UV ainsi que la détection par fluorescence. Les capillaires utilisés ne sont pas modifiés et sont composés de silice fondue.

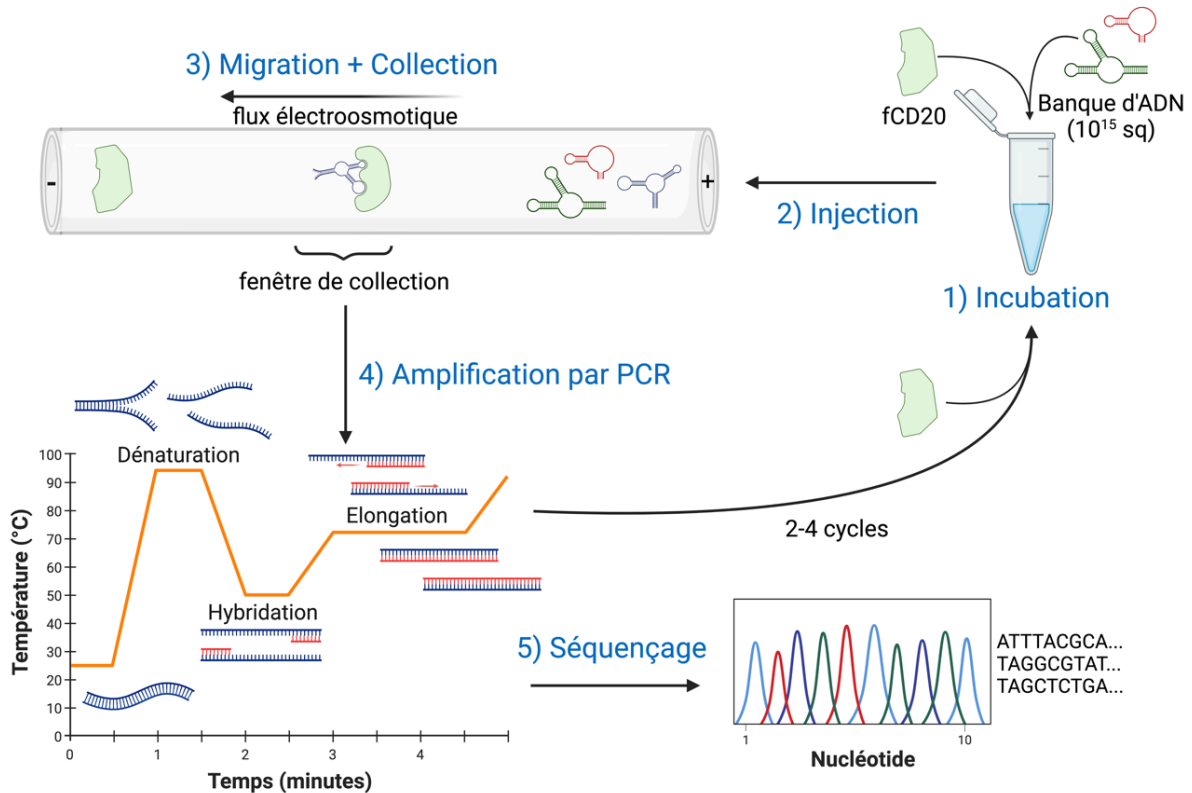


Figure 23 : Représentation schématique de la méthode de CE-SELEX développée dans le cadre du projet.

Différents paramètres ont dû être vérifiés et/ou optimisés en amont pour s'assurer du bon déroulement du processus de sélection :

- Choisir un tampon de migration permettant une bonne séparation entre le fCD20, la banque d'ADN et le complexe formé entre les deux
- Tester la solubilité ainsi que la stabilité des peptides dans le tampon.
- Déterminer la fenêtre de collection du complexe
- Mise en place du protocole de PCR
- Mise en place du protocole de digestion des brins complémentaires et de purification des aptamères.

III. Optimisation des paramètres inhérents à la CE et à la formation de complexe entre la cible et la banque d'ADN.

III. 1. Choix de la Banque d'ADN

Lors de la mise en place d'un processus de CE-SELEX, il est nécessaire de s'assurer que les paramètres cités précédemment soient optimaux. Il est tout d'abord possible de jouer sur le choix de la banque d'oligonucléotides par une conception effectuée par l'utilisateur. De plus, certaines sociétés proposent l'utilisation de banque d'ADN ou ARN pré structurées en fonction du type de cible. Dans le cadre d'une cible telle qu'un peptide, la banque utilisée n'est généralement pas optimisée, avec pour objectif d'être la plus diversifiée possible et de permettre un maximum d'interactions. Dans cet optique, une banque d'aptamères en série ADN associée à un fluorophore carboxyfluorescéine (FAM) en position 5' a été conçue (elle est généralement utilisée au sein du laboratoire).¹¹⁰ Elle se compose de 77 nucléotides dont les extrémités permettent l'hybridation des amorces nécessaires à l'amplification par PCR. Ces fragments de respectivement 24 (5'-FAM-GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTCGAA) et 23 bases (TTGAGCGTTTATTCTTGTCTCCC-3') sont connus à l'inverse des 30 nucléotides randomisés au centre permettant la diversité des candidats. Le nombre théorique de séquences différentes est donc de 4^{30} soit environ 10^{18} . En réalité lors d'une injection en CE-SELEX, environ 10^{12} séquences sont injectées.

III. 2. Choix du tampon et du pH

Deux tampons distincts peuvent être utilisés au cours d'une sélection : le tampon d'incubation et l'électrolyte de séparation. L'ajout de certains composés, tels que du $MgCl_2$ ou du $NaCl$ dans le tampon d'incubation peut impacter directement la structure des aptamères en stabilisant certaines structures tertiaires²²⁴ et ainsi l'interaction avec leur cible.

En se basant sur les compositions de tampons généralement utilisées dans la littérature pour ce type de sélection, différentes conditions ont été testées et sont résumées dans le Tableau 5. Pour chaque injection, un étalon interne type isothiocyanate de fluorescéine (FITC) a été ajouté pour comparer les temps de migrations, ainsi que l'intensité de fluorescence.

Tableau 5 : Récapitulatif des différentes conditions testées pour favoriser la formation de complexe.

Tampon migration	Tampon incubation	pH	Observations
<u>Tampon TGK</u>			
Tris 25 mM	Tris 25 mM	8,3	Peu de complexe à pH 8,3. Baisser le pH n'améliore pas la formation de complexe mais augmente très fortement les temps de migration (> 1h pour la banque).
Glycine 192 mM	Glycine 192 mM		
KH ₂ PO ₄ 5 mM	KH ₂ PO ₄ 5 mM	7,3	
<u>Tampon Tris</u>			
Tris 25 mM	Tris 10 mM	8,3	Le tampon d'incubation influe sur le profil du peptide qui n'a plus la forme d'un pic homogène. La formation de complexe est plus faible. Le pH à 8,3 est également préférable pour la migration.
	NaCl 20 mM		
	MgCl ₂ 1 mM	7,3	

En conclusion, bien que la formation de complexe entre la banque et la cible semble faible quelques soient les conditions, la migration semble être favorisée à un pH plus basique. Lors de l'incubation dans le tampon TNM, il semblerait que le peptide ne soit pas stable puisque le profil obtenu n'est pas homogène et très déformé.

Les conditions retenues pour un premier test en CE-SELEX sont le tampon TGK pH= 8,3 pour l'incubation et pour la migration. Ces conditions avaient déjà été utilisées au laboratoire pour une sélection par CE-SELEX sur une cible similaire¹⁰⁸ : l'αC-conotoxine PrXA qui est un peptide de 32 acides aminés contenant également un pont disulfure.

III. 3. Test de stabilité du peptide dans le tampon

Dans un premier temps, une étude de stabilité sur 68h a été menée, en incubant le peptide fCD20 à température ambiante dans le tampon TGK (Figure 24). Aucune évolution significative du profil électrophorétique (détection UV) n'a été observée.

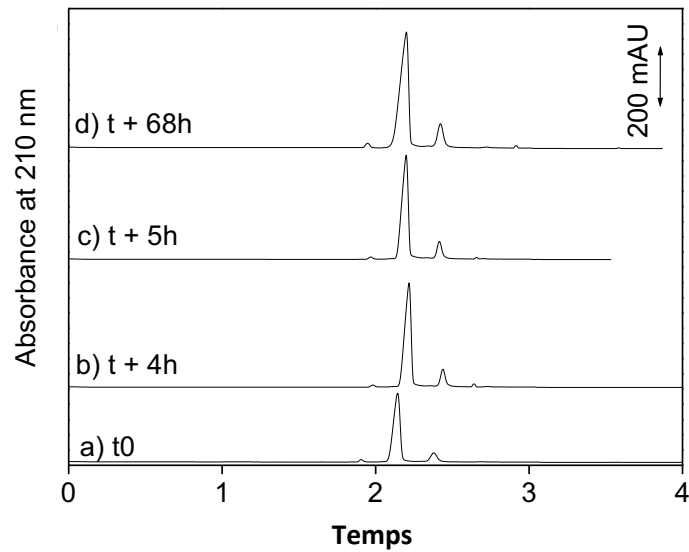


Figure 24 : Étude de stabilité sur trois jours du peptide fCD20 dans le tampon TGK à pH = 8,3. Conditions : Capillaire de silice vierge 40 cm × 31.5 cm jusqu'au détecteur (50 μm). Injection hydrodynamique : 20 mbar, 8 s. Tension de mobilisation : +20 kV

Toutefois, les électrophérogrammes ont montré la présence de deux pics, dont un majoritaire estimé quantitativement à 88 % et un second à 12%. Le peptide **1** injecté à ce stade avait été synthétisé selon les conditions de la voie (b) (Figure 20). La sélection n'étant pas réalisable au vu de la proportion du pic minoritaire, il a été décidé de comprendre au mieux l'origine de ce profil électrophorétique.

IV. Hypothèses sur les causes du profil électrophorétique du peptide fCD20

IV. 1. Hypothèse 1 : Présence d'un produit secondaire issu de la synthèse ?

La première hypothèse, et également la plus simple, a été de vérifier la présence ou non d'une impureté issue de la synthèse. Le peptide a ainsi été caractérisé par désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI), comme illustré en Figure 25. Cette technique a été choisie car elle permet la désorption et l'ionisation de molécules entières alors que l'utilisation de méthodes plus conventionnelles de spectrométrie de masse conduisent généralement à une fragmentation substantielle des espèces analysées.

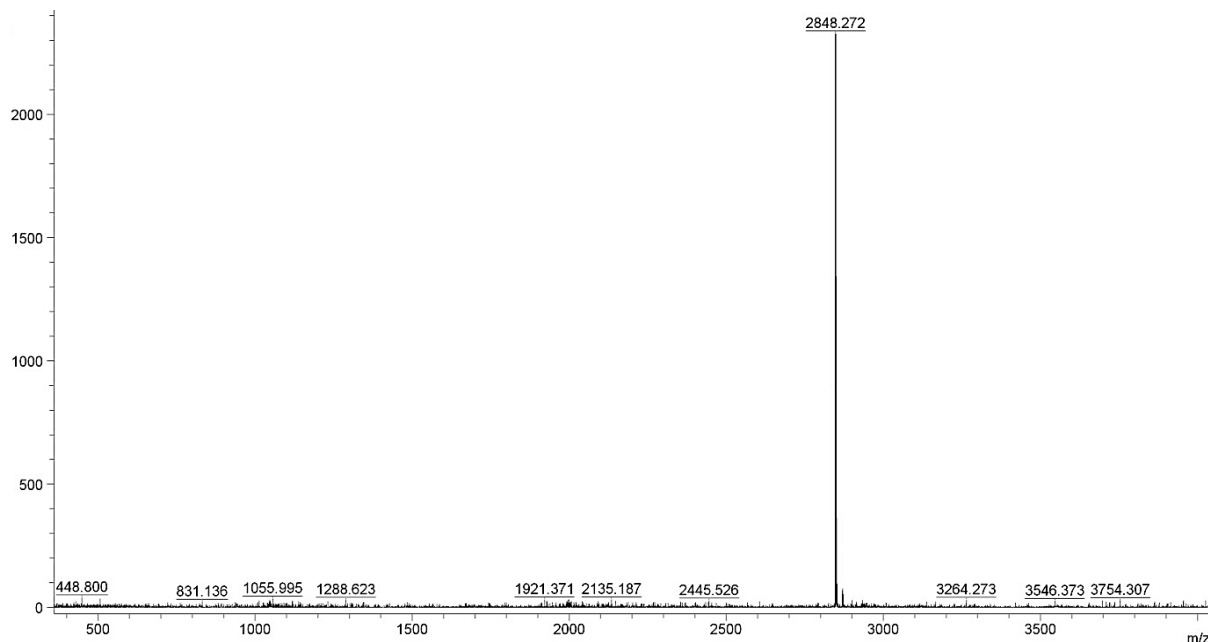


Figure 25 : Analyse de masse effectuée en MALDI du peptide 1 fCD20.

Un produit secondaire obtenu au cours de la synthèse aurait présenté des propriétés de migration et une masse molaire différentes du peptide synthétisé, les analyses de spectrométrie de masse ainsi que de chromatographie UV ont donc permis de réfuter cette hypothèse. De plus, l'injection en CE du peptide linéaire avant pontage n'a montré qu'une seule espèce.

IV. 2. Hypothèse 2 : Résidus de peptide linéaire ?

La seconde hypothèse formulée supposait la présence de peptide linéaire résiduel dont la différence de masse serait trop faible (2 atomes d'hydrogène de différence) pour être détectée. Pour confirmer cette hypothèse, les peptides linéaires et pontés ont été co-injectés en CE. L'électrophérogramme obtenu a montré que les profils de migration des deux composés sont superposables. Toutefois, une co-injection de fCD20 et fCD20 linéaire en HPLC analytique a permis de mettre en avant deux espèces lors de l'ajout de peptide linéaire et ainsi de confirmer que la séparation est possible (Figure 26). L'injection a été effectuée dans le même rapport que les deux espèces retrouvées en CE (environ 9/1). Au vu du profil obtenu sans optimiser la séparation en modifiant le gradient, on peut affirmer que la majeure partie du peptide linéaire aurait été éliminée au cours des étapes de purification par HPLC.

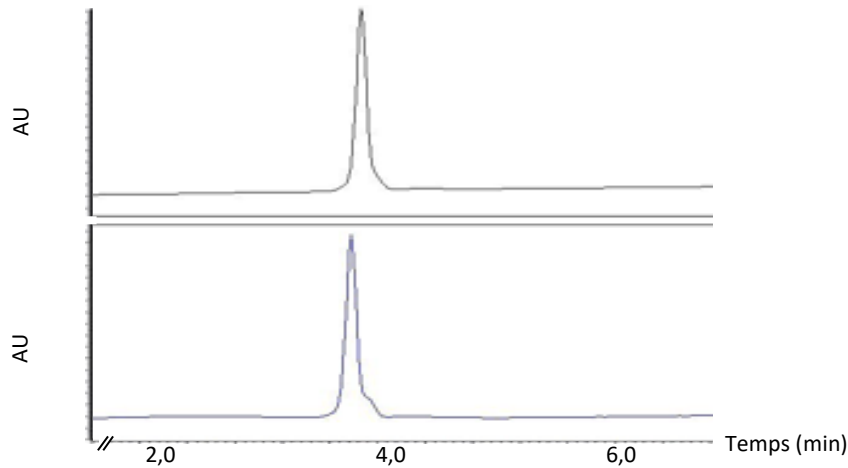


Figure 26 : Chromatogrammes UV ($\lambda = 214\text{nm}$) comparatifs des peptides fCD20 ponté et linéaire. *En noir : CD20 ponté seul. En bleu : co-injection CD20 / CD20 linéaire (9:1). Conditions : analyse de 27 min exécutée dans H_2O , 0,1% TFA avec un gradient d'acétonitrile allant de 5 à 100% sur un temps de 19 min (zoom sur la fenêtre 6-11 minutes).*

De plus, un test chimique a permis de confirmer la présence ou non de peptide linéaire dans l'échantillon de fCD20 utilisé en CE. En effet l'ajout d'oxyde de mésityle à du fCD20 linéaire a permis de mettre en évidence le mécanisme de l'addition de Michael, qui consiste en une addition nucléophile entre le thiol des cystéines et un composé carbonyle α,β -insaturé.²²⁵

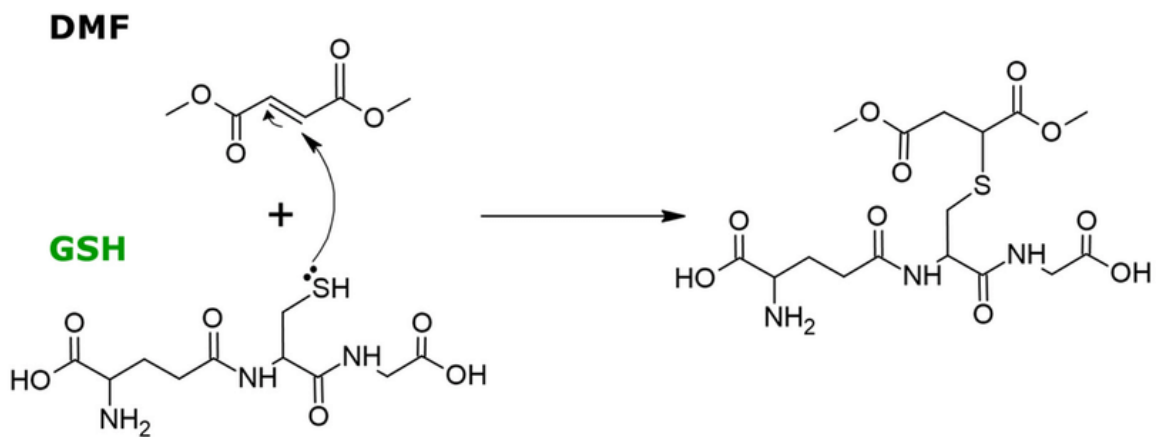


Figure 27 : Exemple d'addition de Michael entre un groupement thiol et un composé carbonyle α,β -insaturé.²²⁵

Cette réaction a été confirmée en LC-MS où trois espèces étaient visibles (Figure 28), ayant les masses molaires suivantes : celle du peptide initial ($M + H$) pour le premier, $M + 1$ oxyde de mésityle pour le second et enfin $M + 2$ oxydes de mésityle pour le dernier.

De l'oxyde de mésityle a donc été ajouté en présence du peptide ponté seul (2 espèces en CE) et aucune évolution de profil n'a été constatée. La présence de peptide linéaire dans l'échantillon a donc été infirmée après l'étape de pontage.

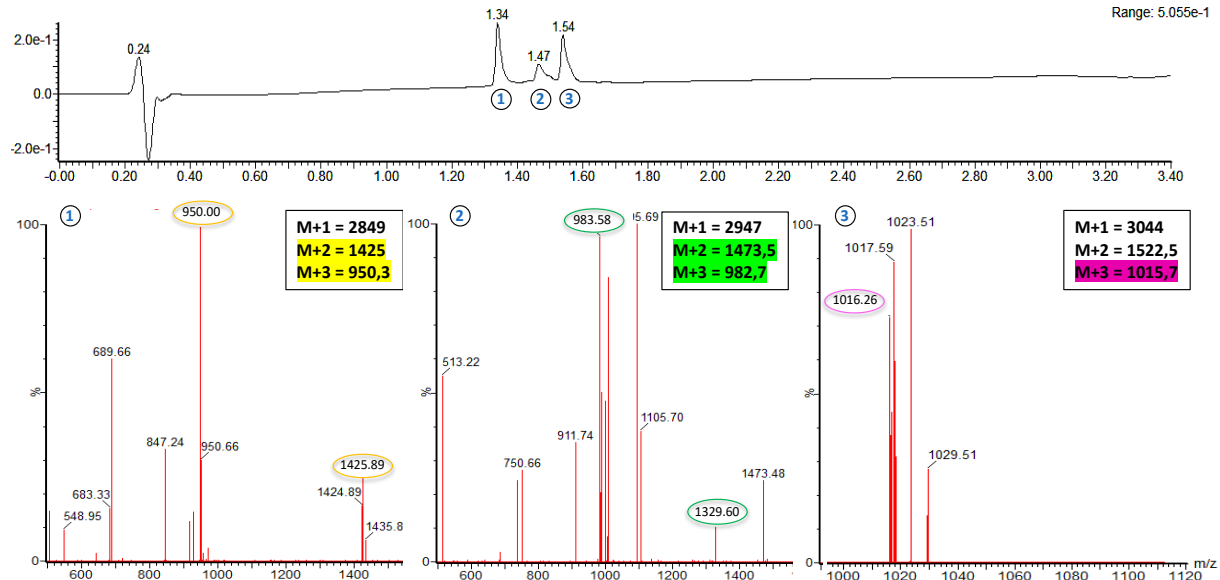


Figure 28 : Analyses en LC-MS de l'interaction entre l'oxyde de mésityle et les thiols libres du fCD20 linéaire. En haut : Chromatogramme UV ($\lambda = 214\text{nm}$) du mix fCD20 lin et oxyde de mésityle obtenu pour une analyse de 2,3 minutes exécutée dans H₂O, 0,1% AF avec un gradient d'acétonitrile allant de 5 à 100% sur un temps de 2,3 min. En bas : Spectres de masses (source ESI+).

IV. 3. Hypothèse 3 : Présence d'agrégats ?

Bien que l'analyse MALDI n'ait montré aucune masse plus élevée que celle attendue pour le fCD20, les méthodes d'analyses utilisées jusque-là ne permettaient pas réellement de déterminer si cette seconde espèce résulte de la formation d'agrégats. La difficulté a été de trouver une méthode permettant d'obtenir des informations sur la taille de ces composés avec une résolution de l'ordre du nanomètre, tout en permettant une séparation de ces deux espèces. Une technique récemment développée au laboratoire pour déterminer la taille des nanoparticules²²⁶ a ainsi été adaptée à ce projet. Cette méthode combine l'électrophorèse capillaire et la dispersion de Taylor (TDA) qui se base sur la dispersion en flux laminaire. Dans cette expérience, les différents composés sont assimilés à des sphères. Après injection, une pression est appliquée à une extrémité du capillaire. Les différentes espèces vont se disperser et diffuser à différentes vitesses en fonction de leur rayon. En se basant sur différentes équations que sont les équations de Taylor-Aris ainsi que sur un modèle demi-Gaussien

(préférée car la séparation des espèces est trop faible pour obtenir des pics symétriques et gaussien), un coefficient de diffusion a été expérimentalement déterminé. A partir de ce coefficient, le diamètre hydrodynamique (Dh) des composés a pu être calculé. Pour que ces équations soient valides, deux paramètres doivent être respectés. La valeur du nombre de Péclet ($Pe > 40$) correspondant à un rapport entre la dispersion des composés et leur diffusion axiale, ainsi que le temps de résidence ($\tau > 1,5$) signifiant que le temps d'observation est largement supérieur au temps nécessaire pour observer une diffusion au sein du capillaire.

Dans un premier temps, le Dh moyen des deux espèces confondues a été déterminé (Figure 29 et Tableau 6). Pour cette première analyse, seule une pression a été appliquée sans séparation électrophorétique au préalable.

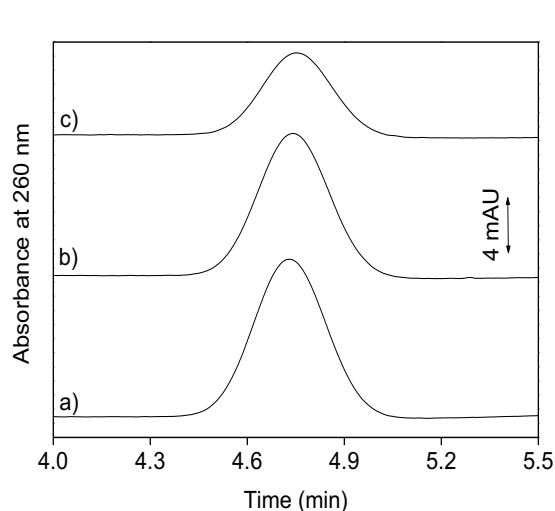


Figure 29 : Somme des deux espèces (UV $\lambda = 210$ nm).

Conditions :

- Capillaire de silice vierge, l : 40 cm / 31.5 cm jusqu'au détecteur ($\varnothing = 50 \mu\text{m}$).
- Electrolyte : tampon TKG pH 8.3. (Tris/Glycine/ KH_2PO_4 25/192/5 mM),
- Injection hydrodynamique : 20 mbar, 8 s,
- Pression de mobilisation : 50 mbar.
- CD20 à 5 mM dans le tampon.

Tableau 6 : Dh expérimentaux des espèces confondues.

Run	Dh (nm)	$Pe > 40$	$\tau > 1.5$
1	2,47	140	90
2	2,38	135	94
3	2,25	127	100

Les deux espèces ont ensuite été caractérisées indépendamment suite à une séparation électrophorétique : l'analyse du composé majoritaire (Tableau 7) a été effectuée dans des conditions identiques aux précédentes, le composé minoritaire (Tableau 4) dans un capillaire de silice vierge 33.2 cm \times 24.8 cm de longueur effective (25 μm).

Tableau 7 : Dh exp. de l'espèce majoritaire

Run	Dh (nm)	$Pe > 40$	$\tau > 1.5$
1	2,26	127	60,03
2	2,40	135	54,11
3	2,37	133	55,53

Tableau 8 : Dh exp. de l'espèce minoritaire

Run	Dh (nm)	$Pe > 40$	$\tau > 1.5$
1	2,14	35.94	617,60
2	1,87	31.41	603,06
3	2,08	34.94	607,47

Le D_h moyen des deux espèces est donc de : 2.37 ± 0.11 nm. Le D_h de l'espèce majoritaire est similaire puisque de 2.34 ± 0.07 nm. L'espèce minoritaire n'est pas une petite molécule, ni un agrégat. C'est une entité dont le diamètre hydrodynamique est du même ordre de grandeur que le peptide (2.03 ± 0.14 nm). Cette valeur est sûrement sous-estimée car les conditions de validité de la TDA n'ont pas été pleinement satisfaites (valeur de $Pe < 40$).

IV. 4. Hypothèse finale : formation de 2 « foldamères » lors de l'oxydation des thiols.

Finalement, l'hypothèse retenue comme la plus probable est la présence d'un « isomère » formé par le repliement du peptide lors de la formation du pont disulfure. Des analyses en CE-MS permettraient de confirmer ou non cette hypothèse. Dans cet optique, différents tampons compatibles avec la CE-MS ont été préparés afin de déterminer lequel permettrait de combiner la séparation des deux espèces à l'analyse de masse. Au final, un tampon composé de 50 mM d'acétate d'ammonium dans H₂O à un pH = 4 a été retenu (Figure 30). Un échantillon de peptide linéaire ainsi que deux échantillons de peptides pontés *via* chacun des protocoles (Figure 20 (b) ou (c)) ont été envoyés à l'équipe « Sciences analytiques » de l'IBMM (Université de Montpellier).

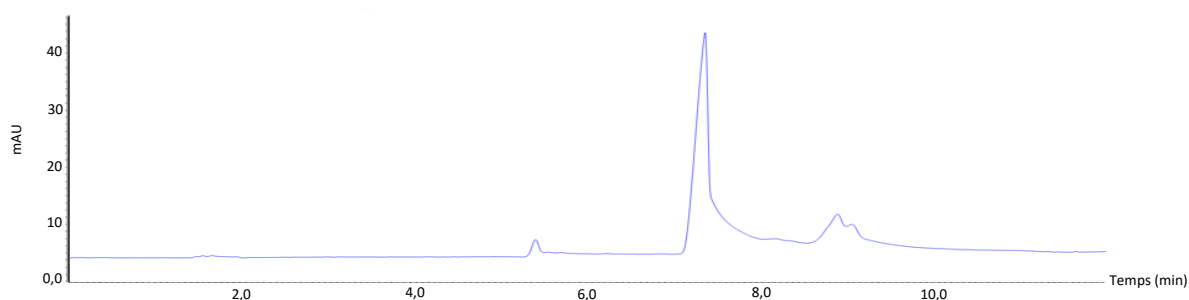


Figure 30 : Electrophérogramme UV ($\lambda = 210$ nm) d'un échantillon de CD20 obtenu via le protocole (b) dans un tampon compatible avec la méthode de CE-MS.

Dans l'attente des résultats de CE-MS et faute de pouvoir débiter la sélection du fait de la présence de ces deux espèces, un autre protocole pour la formation des ponts disulfures²²⁷ a ensuite été testé. Ce protocole décrit par la voie de synthèse (c) (Figure 20) en présence de guanidine 20 mM et DMSO 5% (v/v), a permis de limiter la présence de la seconde espèce à

environ 3 %. Cette proportion semblait suffisamment faible pour débiter la sélection avec ce nouvel échantillon de fCD20.

V. Mise en place de la méthode de CE-SELEX

Le processus de SELEX repose sur des cycles de collection, amplification et purification des aptamères collectés. Il est ainsi nécessaire de contrôler le bon déroulement du processus d'amplification par PCR à l'aide d'une méthode dérivée : la réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR). Cette méthode basée sur une collection en temps réel, permet de déterminer un marqueur temporel, nommé CT (seuil de cycle) à partir duquel l'amplification est détectée. Plus la quantité initiale d'ADN simple brin est élevée, plus tôt une augmentation significative sera observée et donc plus la valeur de CT sera faible. L'accumulation d'ADN double brin produit au cours de la PCR est détectée par fluorescence à l'aide de sondes type SYBR Green I qui se lient spécifiquement à l'ADN double brin.

V. 1. Efficacité de l'amplification par PCR

L'efficacité réactionnelle d'un processus de qPCR représenté par l'équation 1, dépend du dosage, de l'efficacité du mix réactionnel (Master Mix) et de la qualité de l'échantillon. En général, une efficacité calculée entre 90 et 110 % est considérée comme étant acceptable.²²⁸ Pour l'évaluer, une courbe d'étalonnage basée sur un minimum de 5 logs de la concentration de matrice est nécessaire. Ainsi d'après l'Équation 2a, pour une efficacité de 100 % ($E=1$), la quantité d'ADN double à chaque cycle. D'après l'équation 1b, une efficacité de 100% donnerait une pente de -3,32 pour la courbe standard. Une efficacité acceptable serait alors comprise entre -3,10 et -3,58.

$$(a) \quad [ADN] = [ADN]_0 * (1 + E)^c$$

$$(b) \quad E = (10^{\frac{-1}{m}} - 1) * 100$$

Équation 2 : Efficacité réactionnelle d'un processus de qPCR. a) Calcul de l'amplification de l'ADN où c est le nombre de cycles de PCR, E est l'efficacité d'amplification et $[ADN]_0$ est la concentration d'ADN présente initialement. b) Calcul de l'efficacité ou m correspond à la pente de la courbe d'étalonnage.

Pour obtenir la courbe d'étalonnage nécessaire au calcul de l'efficacité, une gamme de la banque d'ADN allant de 10^{-14} à 10^{-10} M a été préparée puis amplifiée en 34 cycles (Figure 31). La pente a ensuite été déterminée graphiquement à une valeur de -3,26. La valeur de E ainsi calculée est de 102,7 %. La méthode de qPCR a donc permis de valider l'amplification par PCR.

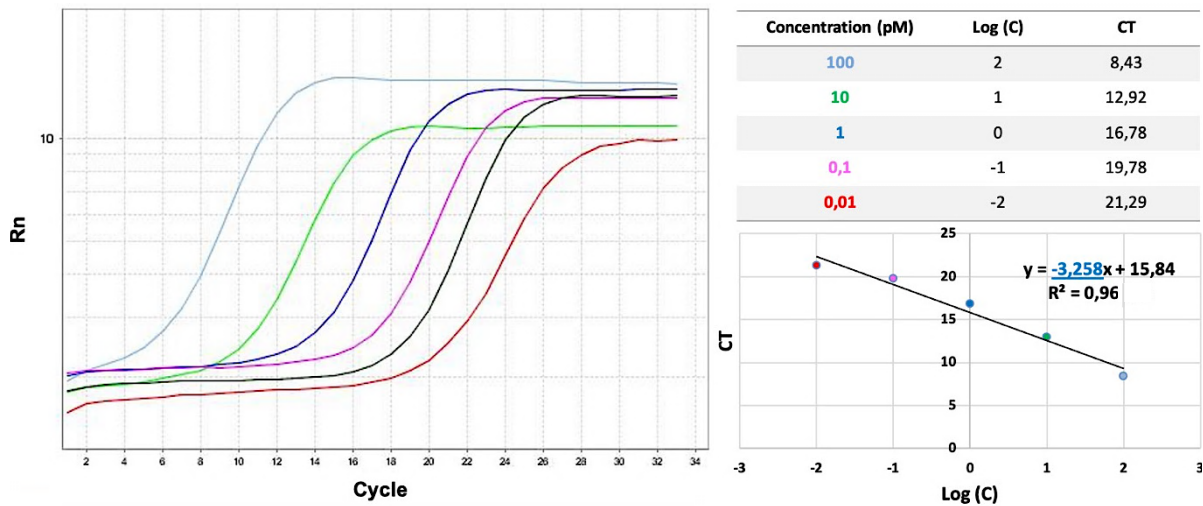


Figure 31 : Gamme d'étalonnage permettant le calcul de l'efficacité réactionnelle par la méthode de qPCR (Conditions en partie Expérimentale).

V. 2. Mise en place du protocole de digestion enzymatique des brins d'ADN complémentaires en sortie de PCR.

Une fois la matrice d'ADN amplifiée, il est nécessaire de s'affranchir des brins complémentaires générés par le processus de PCR. Pour ce faire, différentes méthodes sont possibles telles que de l'électrophorèse sur gel dénaturant, nécessitant l'utilisation d'amorces modifiées (alourdies) et permettant une séparation entre les deux brins ou encore la digestion enzymatique. C'est cette seconde méthode qui a été sélectionnée avec l'utilisation de l'exodésoxyribonucléase Lambda, qui catalyse l'hydrolyse séquentielle des nucléotides d'un ADN double brin présentant un phosphate à son extrémité 5'. Les aptamères collectés et amplifiés contiennent un fluorophore en 5' (utilisation d'amorces modifiés) permettant une digestion sélective des brins complémentaires. La digestion s'effectue donc dans le sens 5' à 3' en libérant les nucléosides 5'-P (Figure 32).

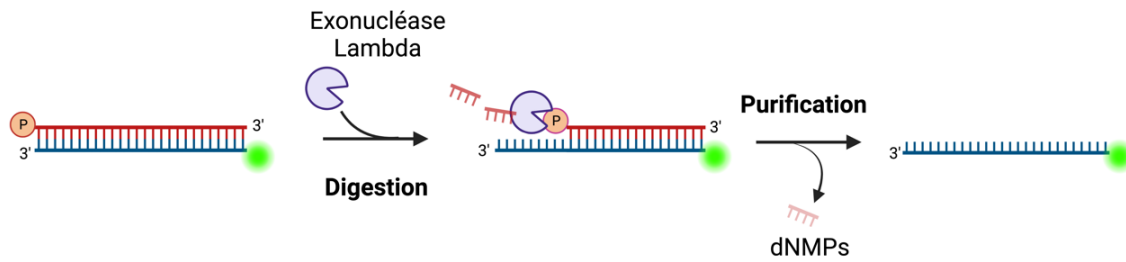


Figure 32 : Digestion du brin complémentaire par l'exonucléase Lambda.

Cette étape de digestion se déroule en 4 étapes : 1) Lavage de la matrice d'ADN en sortie de PCR *via* l'utilisation de filtres centrifuges Nanosep[®] pour retirer le Master mix de PCR incompatible avec la digestion. 2) Dosage de l'ADN double brins par UV *via* un spectrophotomètre à micro-volume (cf Équation 3). 3) Digestion des brins présentant un phosphate à l'extrémité 5'. 4) Purification par le kit de lavage « Monarch PCR & DNA Cleanup Kit ». 5) Dosage de l'ADN simple brin par UV *via* un spectrophotomètre à micro-volume.

$$C_m = (A \cdot e) / l$$

C_m = concentration massique en acides nucléiques (ng/ μ l)

e = coefficient d'extinction massique (ng.cm/ μ l)

$e = 37$ pour ADN sb et 50 pour ADN double brins

l = trajet optique (cm)

Équation 3 : Calcul de la concentration massique (Loi de Beer-Lambert adaptée)

Pour confirmer le bon déroulement du processus, des analyses de polarisation / anisotropie de fluorescence ont été effectuées. L'anisotropie de fluorescence est une méthode qui mesure « la liberté de mouvement » d'une molécule fluorescente. Cette valeur peut se traduire par la facilité avec laquelle une molécule fluorescente peut s'orienter dans toutes les directions de l'espace, entraînant la dépolarisation d'un signal lumineux. Le degré de polarisation peut se définir soit par le taux de polarisation (p) soit par l'anisotropie (r), définies respectivement par les Équations 4a et b.

$$(a) \quad p = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

I_{\parallel} = l'intensité de fluorescence émise parallèlement au rayon incident.

$$(b) \quad r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

I_{\perp} = l'intensité de fluorescence émise perpendiculairement au rayon incident.

Équations 4 : Calculs des taux de polarisation (a) et anisotropie de fluorescence (b).

Les molécules de petite taille se réorientent rapidement et émettent ainsi une lumière fortement dépolarisée. Au contraire, les molécules plus grosses ont une rotation plus lente et, par conséquent, émettent de la lumière moins dépolarisée. Dans le cas d'ADN marqué, la polarisation de fluorescence évoluera comme illustré en Figure 33. Le simple brin d'ADN aurait une mobilité plus importante et donc un taux de polarisation de fluorescence plus faible. Au contraire l'ADN double brin, plus encombré, émettrait une lumière très polarisée.

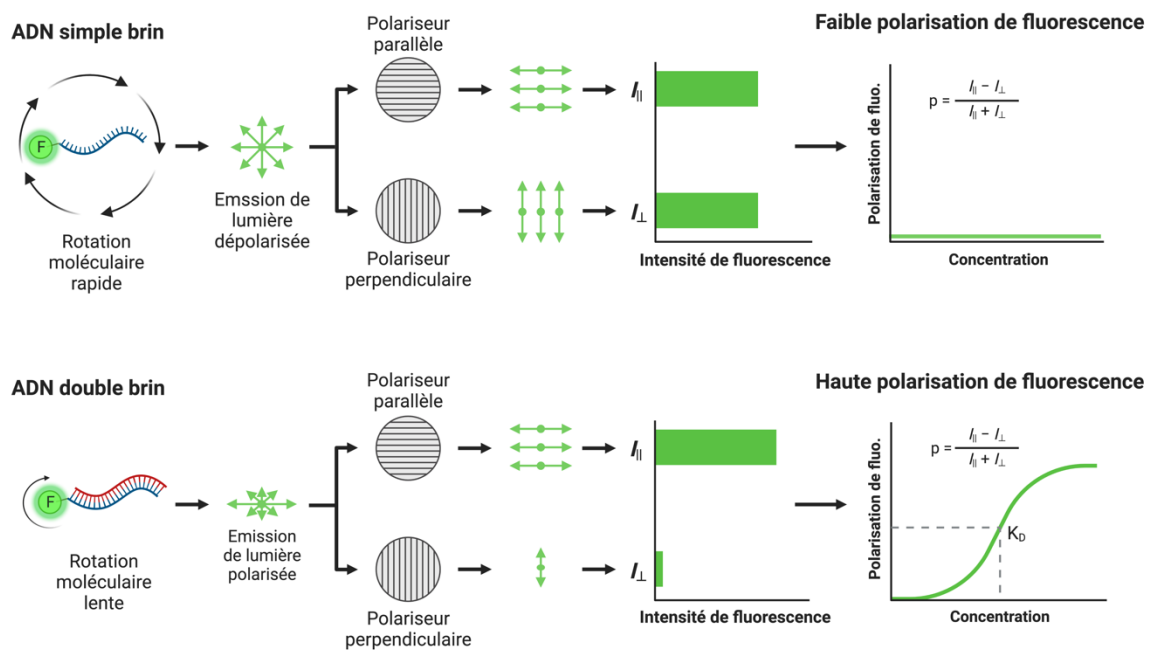


Figure 33 : Différences de taux de polarisation de fluorescence entre de l'ADN simple brin ou double brin.

Toutefois, pour vérifier que le brin digéré est bien le brin complémentaire, l'analyse n'a pas été effectuée à la longueur d'onde d'émission du FAM associé aux brins d'ADN, mais en ajoutant une amorce anti sens 5'-Texas Red (TR). Le but étant de vérifier que le produit de PCR digéré est identique à la banque d'aptamère, trois échantillons ont été comparés : La banque initiale (simple brin (sb)), le produit digéré (supposé simple brin) et la banque amplifiée par PCR et non digérée (double brin (db)). Les résultats obtenus lors de cette analyse (effectuée en duplicat) sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Comparaison du comportement du digestat par rapport au double brin et à la banque initiale, en présence d'une amorce anti sens 5'-TR, par la méthode de polarisation de fluorescence. (Conditions en partie Expérimentale).

Échantillon	Anisotropie de fluorescence
Tampon (blanc)	-
Amorce TR	0.103 ± 0.001
Amorce TR + banque	0.135 ± 0.003
Amorce TR + digestat	0.128 ± 0.002
Amorce TR + db	0.88 ± 0.002

Lors de cette analyse, on observe un comportement très similaire entre le digestat et la banque d'ADN, en effet la polarisation de fluorescence augmente lorsque l'amorce anti sens 5'-TR se fixe sur l'ADN simple brin. Au contraire en présence d'ADN double brin, la polarisation de fluorescence semble diminuer par rapport à la référence ce qui indique une absence d'interaction. Le processus de digestion enzymatique semble donc fonctionnel. Plus simple à mettre en place, ce protocole a permis une digestion et purification du produit de PCR avec des rendements molaires > 90 %. Il a donc été intégré au processus de SELEX.

V. 3. Identification de la fenêtre de collection.

Initialement, lors des premiers tests de sélection (décrits dans le chapitre 2-VI.1), la formation de complexe était très faible, et non visible *via* le détecteur de fluorescence couplé à la CE. La méthode de qPCR a ainsi été utilisée pour déterminer la fenêtre de collection en CE. Celle-ci correspond à la plage de temps au cours de laquelle les aptamères liés à la cible migreront. Un facteur est à calculer pour déterminer la différence (en minutes) entre la détection par le détecteur de fluorescence et la sortie du capillaire. Ce facteur nommé f est dépendant de la longueur effective du capillaire (longueur entre le point d'injection et le point de détection) et de la longueur totale du capillaire comme illustré par l'équation X.

$$f = \frac{l_{totale}}{l_{effective}}$$

Équation 5 : Calcul du facteur à appliquer pour une collection en sortie du capillaire, basée sur la fluorescence.

Une fois l'injection hydrodynamique effectuée, une tension est appliquée, permettant la migration des composés. Les temps indiqués dans le Tableau 10 correspondent à des plages de collections d'une minute et demi à partir de l'application de la tension entre les bornes. Dans les conditions de sélection (décrites en partie expérimentale), la fraction de candidats non liés est éluée aux alentours de 12 minutes et les peptides aux alentours de 3,5 minutes. L'étude a donc été effectuée sur des temps allant de 4,5 à 10,5 minutes après application de la tension. Plusieurs injections (10) ont été collectées puis amplifiées afin d'augmenter la concentration d'ADN récupérée contenant la banque d'ADN seule comme référence (100 nM) ou contenant la banque plus le fCD20 (mix) (100 nM et 50 μ M respectivement). Les valeurs de CT ont ensuite été étudiées pour déterminer la fraction contenant le plus d'ADN et ainsi probablement l'ADN lié. Pour s'assurer de la répétabilité de la méthode, cette analyse a été effectuée en triplicat. On observe ainsi que la différence de CT entre les injections « banque seule » et « mix » est plus importante pour les deux premières fractions (4,5 - 6 minutes et 6 - 7,5 minutes), ce qui suggère la présence de complexe en présence de cible. La première fraction a été préférée du fait de l'écart de migration plus important avec la fraction d'ADN non liée.

Tableau 10 : Comparaison des CT obtenus après amplification par qPCR de différentes fractions collectées en CE afin de déterminer la fenêtre de collection optimale.

Fenêtre de collection	4,5 - 6 min	6 - 7,5 min	7,5 - 9 min	9 - 10,5 min
CT Banque	14,9 \pm 0.2	13,6 \pm 0.2	12,9 \pm 0.4	11,7 \pm 0.4
CT Mix	13,4 \pm 0.2	12,3 \pm 0.3	11,9 \pm 0.3	10,8 \pm 0.3

Toutefois, les premiers essais de CE-SELEX ayant été infructueux dans ces conditions, des concentrations plus importantes en Banque (30 μ M) ont été injectées par la suite, permettant d'observer, *via* le détecteur de fluorescence couplé à la CE, l'apparition d'un pic correspondant au complexe à un temps d'environ 6,5 minutes (

Figure 34). Le mix injecté à ce stade contenait du FITC en tant qu'étalon interne permettant de comparer les différentes conditions (cf Chapitre 2-III.2).

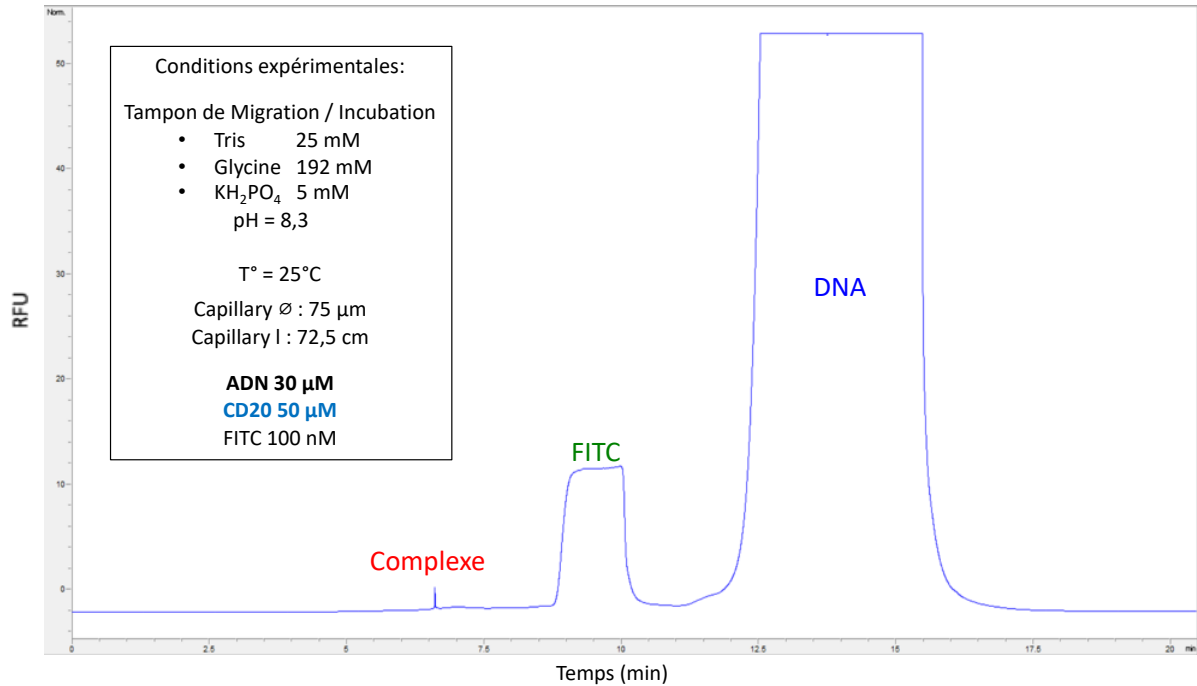


Figure 34 : Electrophérogramme des conditions retenues pour la sélection par mesure de l'intensité de fluorescence ($\lambda = 480 \text{ nm}$).

VI. Processus de sélection en 4 cycles

Comme présenté précédemment, de nombreux ajustements ont été nécessaires permettant le succès de ce processus de CE-SELEX ciblant le fCD20. Différentes conditions ont été testées en variant les tampons, les temps d'incubation, les concentrations en ADN ou en cible sans pour autant permettre une sélection. Finalement, les conditions présentées en Figure 34 ont été les plus favorables en termes de séparation entre la cible et la banque, de formation de complexe et surtout de collection de ce complexe.

VI.1.1 Sélection en 4 rounds

Au total deux essais de SELEX ainsi qu'un essai de non-SELEX ont été effectués. Seule la méthode de SELEX a finalement permis d'observer une évolution de l'affinité apparente au fil des différents cycles de sélection. Les différences entre les premiers essais non fructueux et le dernier résident dans les conditions d'incubation. Les concentrations en fCD20 ont été fortement augmentées lors du premier cycle (de 50 μM pour les premiers essais à 1 mM pour

les conditions retenues). Le temps d'incubation a également été drastiquement augmenté au fil des essais (de quelques minutes à T° ambiante à 40 minutes dont 20 min à 4°C puis 20 min à T° ambiante). Cela a permis de favoriser la formation de complexe et ainsi d'optimiser la fenêtre de collection lors du premier cycle. Cette sélection a été effectuée en 4 cycles en diminuant chaque fois le rapport [Cible] / [Banque] dans le but d'augmenter la stringence de la sélection.

Tableau 11 : Conditions retenues pour le processus de CE-SELEX effectué en 4 cycles.

Conditions retenues	Cycle	[fCD20] (μM)	[ADN] (μM)	[fCD20] / [DNA]
Tampon TGK Tris 25 mM Glycine 192 mM KH ₂ PO ₄ 5 mM pH= 8.3 Incubation : 40 min	1	1000	30	33.3
	2	0.5	0.166	3.3
	3	0.3	1	0.3
	4	0.03	1	0.03

Entre chaque cycle, des injections en CE d'un mélange contenant 80 μM de cible et 10 nM de matrice d'ADN ont permis de déterminer l'évolution du SELEX par le calcul d'un K_D moyen. Cette valeur a été obtenue en comparant la diminution de la fraction de brins d'ADN non liés sans et avec ajout de cible. Cette valeur indicative a simplement permis de déterminer la tendance positive ou négative de la sélection. Des essais ont également été effectués en polarisation de fluorescence pour déterminer des constantes d'affinité entre les rounds mais sans succès. Les constantes d'affinité ont donc été obtenues *via* l'équation suivante :

$$K_A = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[Complexe]}{[Banque] * [fCD20]} \quad \text{et} \quad K_D = \frac{1}{K_A}$$

Équation 6 : Calcul expérimental de l'affinité entre la banque et la cible après chaque cycle de sélection.

L'évolution de l'affinité entre les différents cycles est représentée par la Figure 35. Les calculs ont été effectués sur 3 injections distinctes.

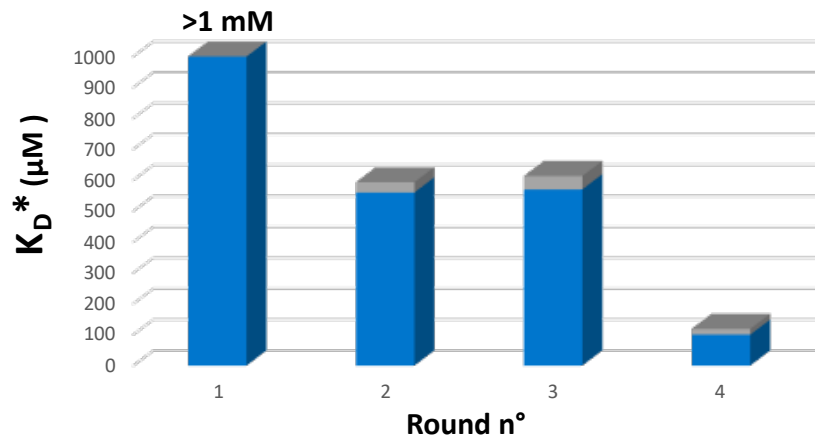


Figure 35 : Évolution de l'affinité apparente de la matrice d'ADN pour le fCD20 déterminée entre chaque cycle par CE (les écarts types ont été calculés à partir de triplicats et sont représentés en gris).

A l'issue du 4ème cycle, afin de contrôler la nécessité d'une contre sélection vis-à-vis du peptide fCD20 scbl afin de limiter les interactions non spécifiques de la banque, trois injections ont été réalisées en CE (Figure 36) :

- (1) Les candidats aptamères seuls après le cycle 4 (10 nM).
- (2) Les candidats aptamères après le cycle 4 (10 nM) + l'antigène CD20 (80 μM)
- (3) Les candidats aptamères après le cycle 4 (10 nM) + l'antigène CD20 scramble (80 μM)

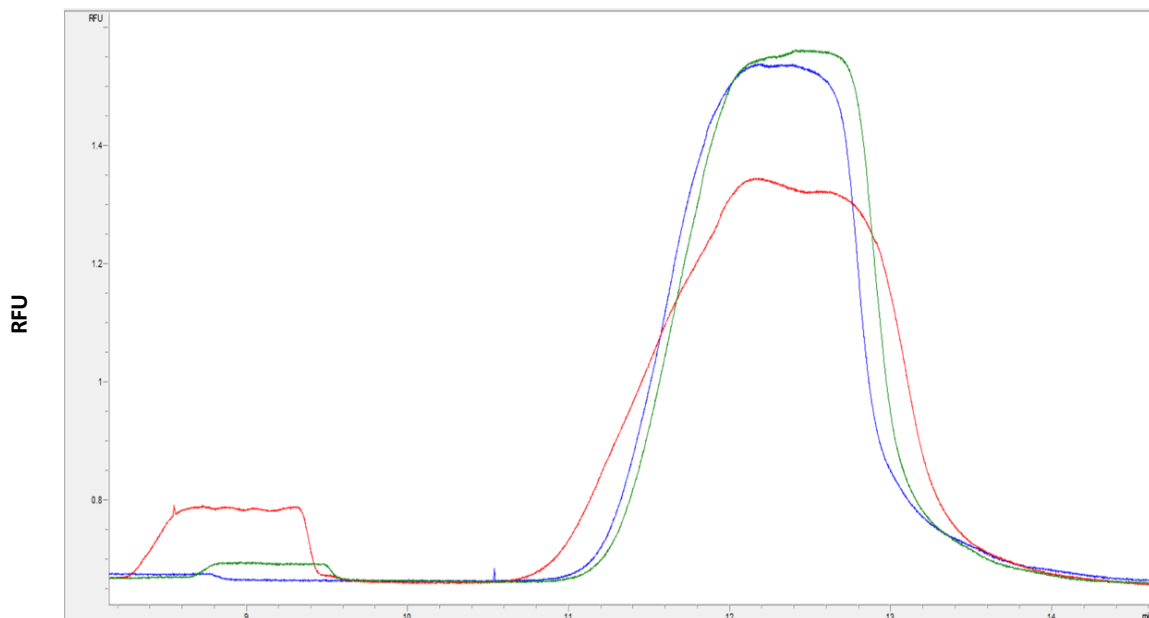


Figure 36: Superposition des électrophérogrammes obtenus à l'issue du cycle 4 : (1) en bleu, (2) en rouge et (3) en vert. Les massifs de droite correspondent à la fraction d'ADN non liées, les massifs de gauche à un complexe entre la matrice et le peptide fCD20.

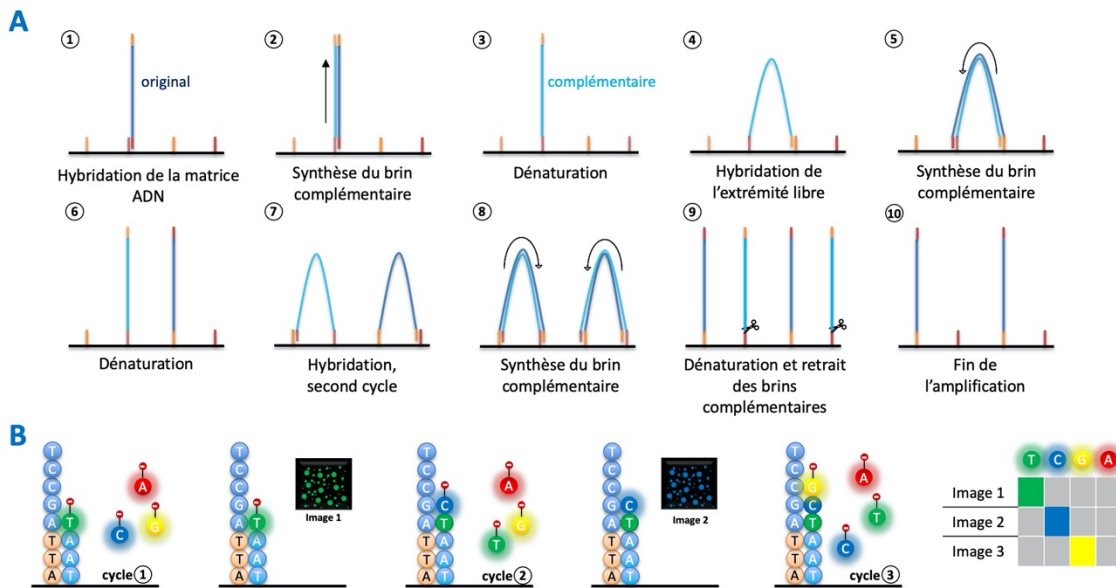
La fraction d'aptamères non liés diminue de façon importante lors de l'injection (2). De plus, un second massif apparaît au niveau de la fenêtre de collection correspondant à la formation de complexe. Cela illustre l'affinité beaucoup plus importante de la matrice d'ADN pour le peptide cible fCD20 après le cycle 4. Au contraire, lors de l'injection (3), la fraction d'aptamères non liés ne diminue pas ou très peu, signifiant que l'interaction avec le peptide contrôle fCD20 scramble est relativement faible. Les candidats aptamères obtenus après les 4 cycles de sélection semblent donc avoir une interaction relativement sélective pour le fCD20 par rapport à son scramble. Par conséquent, un cycle supplémentaire permettant une étape de contre sélection n'a pas été jugé nécessaire. La matrice a donc été préparée et envoyée au séquençage.

Un processus de CE-SELEX se limite généralement à 4 cycles voire moins du fait de la haute résolution de la méthode. Toutefois, dans ce cas précis, l'affinité initiale de la banque pour le fCD20 étant très faible, un cycle supplémentaire aurait pu être considéré. Que l'affinité en soit améliorée ou non, ce résultat aurait permis soit de justifier l'arrêt après 4 cycles soit de la pertinence d'un cinquième cycle. Sur le moment, les résultats obtenus ayant été jugés satisfaisants malgré les difficultés rencontrées, ce cinquième cycle n'a pas été réalisé.

VI.1.2 Séquençage illumina et alignement de séquences.

A l'issue de ce 4ème cycle, la matrice d'ADN a été amplifiée par PCR en présence d'amorces spécifiques pour le séquençage illumina, effectué ensuite par la compagnie Biofidal située à Vaulx-en-Velin (France). Ce processus de séquençage nouvelle génération repose sur quatre étapes. 1) En amont : Quantification des acides nucléiques ainsi que l'ajout d'amorces spécifiques permettant l'hybridation sur la surface illumina. 2) Étapes successives d'amplification illustrée en Figure 37-A. 3) Séquençage par synthèse à quatre canaux : Chaque base est associée à un marqueur fluorescent distinct permettant une identification par émission de fluorescence ainsi qu'un groupement protecteur limitant. Lors de chaque cycle, une seule base est liée à chaque brin. L'instrument prend ensuite 4 images qui correspondent aux différentes intensités de fluorescence. L'amplificat n'apparaîtra donc que sur une seule des images. Le groupement protecteur est ensuite retiré et le cycle réitéré (Figure 37-B). 4)

Des analyses sont ensuite effectuées permettant l'édition d'un rapport résumant le contenu de la matrice d'ADN.



Séquençage par incorporation de nucléotides fluorescents en 4 étapes : 1) Incorporation, 2) Détection, 3) retrait du groupement protecteur et 4) retrait du fluorophore.

Figure 37 : Schématisation du processus de séquençage. (A) : Hybridation et amplification de la matrice d'ADN. (B) : Séquençage par synthèse à quatre canaux.

Au total, 161 758 séquences ont été identifiées, parmi lesquelles, 1324 représentées 2 fois, et 5 représentées 3 fois. Ce nombre peut paraître important pour un processus de SELEX classique qui se déroule généralement en un nombre plus important de cycles (10-20) mais est cohérent en seulement 4 cycles dans le cadre de la CE-SELEX. Cependant, le faible enrichissement des 1329 séquences les plus représentées, non significatif puisque présentes au mieux 2 ou 3 fois, n'a pas permis, ni par alignement séquentiel (exemple illustré en Figure 38 sur les 5 séquences les plus représentées), ni par calcul de matrices de distances (puis formation d'arbre guide de type MAUVE), de déterminer des motifs significativement récurrents. En revanche, cette diversité de séquence pourrait présenter un intérêt pour la formation de composés multivalents, puisque différentes régions de la structure antigénique pourraient être ciblées en fonction des aptamères.

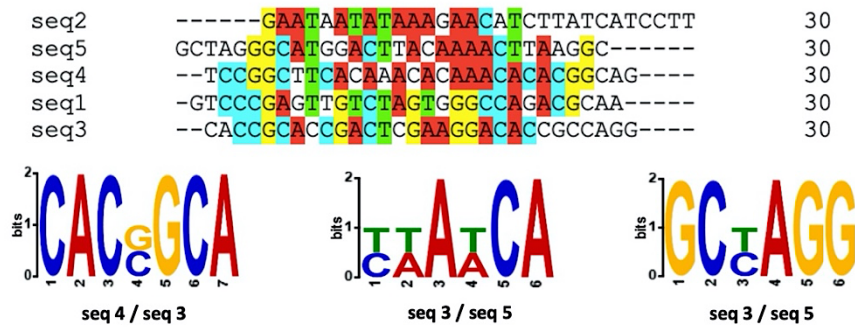


Figure 38 : Alignement séquentiel effectué sur les 5 aptamères les plus représentés après séquençage.

Pour la suite de ce projet et n'ayant identifié aucun motif récurrent, il a été décidé de caractériser tout d'abord les 5 séquences les plus représentées (région variable en bleu) :

1. 5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTCGAA-GTCCCGAGTTGTCTAGTGGGCCAGACGCAA-TTGAGCGTTTATTCTTGTCTCCC-3'
2. 5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTCGAA-GAATAATATAAAGAACATCTTATCATCCTT-TTGAGCGTTTATTCTTGTCTCCC-3'
3. 5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTCGAA-CACCGCACCGACTCGAAGGACACCGCCAGG-TTGAGCGTTTATTCTTGTCTCCC-3'
4. 5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTCGAA-TCCGGCTTCACAAACACAAACACACGGCAG-TTGAGCGTTTATTCTTGTCTCCC-3'
5. 5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTCGAA-GCTAGGGCATGGACTTACAAAACCTTAAGGC-TTGAGCGTTTATTCTTGTCTCCC-3'

VII. Conclusion

Cette première partie du projet a permis la mise en place des paramètres nécessaires au bon fonctionnement de la sélection par CE-SELEX. Différentes conditions ont été comparées et optimisées permettant à terme une sélection (en 4 cycles) d'aptamères dirigés contre le peptide fCD20. Au total, à partir d'une injection contenant environ 10^{14} séquences d'ADN statistiquement différentes, 10^5 séquences ont été identifiées par le séquençage à l'issue du processus. Après des premières analyses comparatives des séquences, aucun motif récurrent n'a été identifié, signifiant une grande variété des éléments de reconnaissance sélectionnés. Cette diversité n'a cependant pas simplifié le traitement des données ni le choix des candidats à analyser. Malgré tout, les 5 séquences les plus représentées ont été choisies pour des premiers tests d'interaction avec la cible présentée au chapitre 3.

Chapitre III

Caractérisation des interactions fCD20-aptamères

Parmi la grande diversité des candidats séquencés, 5 aptamères se sont démarqués par leur récurrence lors du séquençage. Bien que le nombre de copies soit faible (3), ces candidats ont été choisis comme point de départ de notre étude. Ceux-ci, présentés au chapitre 2, seront nommés Apta°1 à Apta°5 pour la suite de ce manuscrit.

Dans un premier temps, des caractérisations par CE ont été effectuées en présence de fCD20 ou fCD20 scbl, dans les mêmes conditions que lors des contrôles effectués au cours du processus de CE-SELEX. Les meilleurs candidats seront ensuite caractérisés *in vitro via* des méthodes de surface telle que la résonance plasmonique de surface (SPR), ainsi qu'en solution en utilisant la titration calorimétrique isotherme (ITC). Enfin, des analyses *in cellulo* ont été menées pour conclure quant aux interactions aptamères-CD20 natif.

I. Caractérisation par CE des 5 candidats retenus lors du séquençage

Comme décrit dans le chapitre 2, l'électrophorèse capillaire permet une première analyse de l'interaction entre le fCD20 et des aptamères, basée sur l'évolution de la fraction d'ADN (marqué par un fluorophore) non liée. Le choix de cette méthode comme premier contrôle se base sur la possibilité de ne consommer que quelques nanomoles de chaque composé, les différentes analyses ayant pu être effectuées à moindre coût. Ces premiers essais ont eu pour but de contrôler la sélectivité des différents aptamères avec le peptide fCD20 dans les conditions de la sélection.

Dans un premier temps, les aptamères ont été injectés seuls (référence), puis en présence de cible ou du scramble, dans des conditions identiques à celles de la sélection par CE-SELEX. Chaque analyse a été effectuée en triplicat, à T°= 25°C, avec des temps d'incubation (t) de 40 min dans l'électrolyte (Tgk) à pH= 8,3. Les analyses de référence correspondent à différentes injections, à une concentration en ADN de 10 nM, à t= 10, 40, 60 et 120 min. L'objectif de cette seconde injection étant de s'assurer de la stabilité de la fluorescence dans le temps et ainsi, si nécessaire, de pouvoir faire un suivi cinétique des interactions. Des mélanges cible-aptamère ou scramble-aptamère ont ensuite été injectés avec la même concentration en ADN et 50 µM de peptide. Les interactions ont été déterminées au travers de la diminution d'intensité de fluorescence de la fraction libre d'ADN, par comparaison avec la référence.

Les Apta°3 et Apta°5 n'ont montré aucune interaction avec la cible. Les Apta°1, 2 et 4 ont, à l'inverse, interagi avec la cible. Cependant l'Apta°4 a également montré une interaction avec le CD20 scramble et semble donc peu spécifique, contrairement aux Apta°1 et 2 dont l'évolution des profils obtenus par CE-LIF est illustrée en Figure 39.

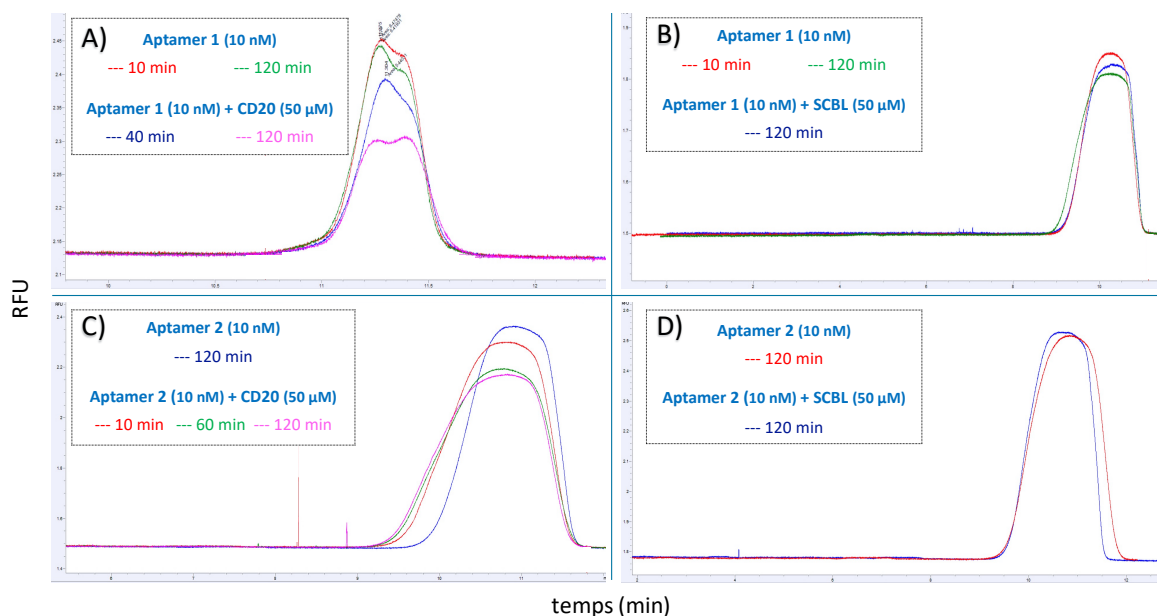


Figure 39 : Electrophérogrammes obtenus en détection par fluorescence ($\lambda_{exc} = 480nm$) : A) Apt°1 + CD20 ; B) Apt°1 + CD20 scramble ; C) Apt°2 + CD20 et D) Apt°2 + CD20 scramble.

Des valeurs de K_D apparent ont ainsi pu être estimées expérimentalement à environ 100 μM , dans les conditions utilisées en CE. Les résultats obtenus pour les 5 aptamères en présence de cible ou de la référence sont résumés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Récapitulatif des analyses préliminaires effectuées en CE pour les Apta°1 à 5.

Aptamères	Interaction fCD20	K_D apparent (pH= 8,3)	Interaction fCD20 scbl
Apta° 1	✓	$55 \pm 4 \mu M$	✗
Apta° 2	✓	$95 \pm 6 \mu M$	✗
Apta° 3	✗	-	✗
Apta° 4	~	$120 \pm 11 \mu M$	~
Apta° 5	✗	-	✗

Au vu des résultats obtenus, seuls les Apta°1 et Apta°2 ont été retenus pour la suite de ce projet. L'Apta°4 est également conservé et pourra être utilisé en tant que contrôle supposé

non spécifique. Dans l'optique de confirmer les résultats obtenus, une seconde caractérisation est nécessaire. En se basant sur l'expertise du DCM en matière de caractérisations biophysiques au moyen de techniques de surface, nous avons opté pour l'utilisation de la SPR et du BLI.

II. Caractérisation *via* des méthodes d'immobilisation sur surface

Pour la suite de ce chapitre, 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 l'analyte (A).

Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes initialement orientés vers les techniques de surface pour plusieurs raisons :

- L'absence de marquage par des fluorophores permet de limiter les coûts de production et de s'affranchir d'un possible effet inhibiteur du fluorophore sur l'interaction, dans le cas où celui-ci est fixé à proximité du site d'interaction.
- Pour l'étude de biomolécules non marquées, les quantités requises pour une analyse sont beaucoup plus faibles (quelques nanomoles) que pour celles nécessaires pour des techniques en solution.
- Dans le cadre de ce projet, divers analytes (aptamères, fragments ...) sont caractérisés en présence d'une même molécule cible, permettant une caractérisation en série.
- Le ligand fCD20 utilisé étant un fragment d'un épitope issu d'une protéine transmembranaire, une analyse sur une surface antigénique pourrait s'approcher d'une interaction entre les analytes et le récepteur extracellulaire.

Parmi les différentes méthodes à notre disposition, c'est la SPR qui a été choisie, notamment car elle permet la mise en œuvre d'une surface antigénique fonctionnalisée par du fCD20 développée au DCM quelques années plus tôt (cf Chapitre 3 II.2.1). Ces surfaces ont démontré

une bonne affinité (K_D d'environ environ 20 nM) ainsi qu'une spécificité élevée pour le RTX. Ces propriétés de reconnaissance avoisinent celles décrites dans la littérature, initialement déterminées par cytométrie en flux ($K_D = 5-19$ nM).^{39,229}

II. 1. Principe de la résonance plasmonique de surface.

La SPR est une technique optique permettant une étude en temps réel de l'interaction entre une espèce immobilisée sur surface et un analyte en solution²³⁰⁻²³³. Cette méthode repose sur le phénomène d'onde évanescente, produite à l'interface entre un matériau diélectrique (tel que le verre) et un matériau conducteur (tel que du métal). Un faisceau monochromatique, généralement rouge pour une meilleure sensibilité, est réfléchi à travers un prisme adjacent à une lame de verre recouverte d'une fine couche d'or (Figure 40). L'angle d'incidence étant supérieur à un angle limite, une réflexion totale interne du rayon lumineux est observée. Cette surface d'or forme la face interne d'une cellule de micro fluidique sur laquelle l'un des deux partenaires est immobilisé. Lorsque la lumière rencontre cette interface, une partie de celle-ci est réfléchiée et une partie peut induire l'excitation du nuage électronique de la couche métallique (les plasmons). L'onde formée 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 à la surface métallique.

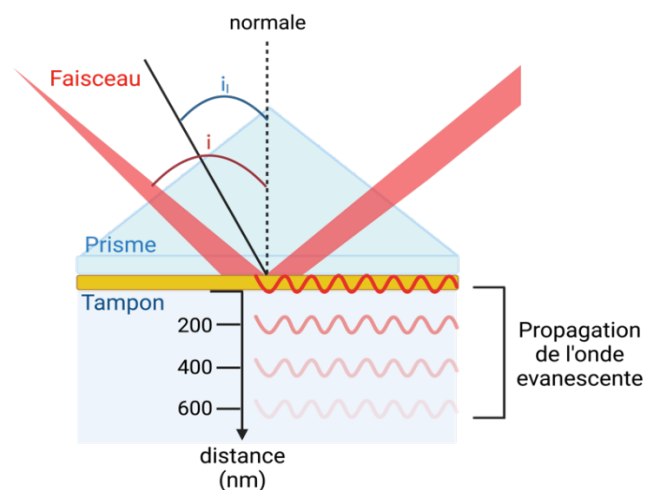


Figure 40 : Propagation de l'onde évanescente en conditions de réflexion totale interne. L'onde se diffuse dans le tampon selon une exponentielle décroissante sur environ 750 nm. La réflexion totale interne se produit si l'angle incident est supérieur à l'angle limite (i_l).

Les plasmons de surface absorbent donc une partie de l'énergie lumineuse en fonction de l'angle incident du faisceau, occasionnant une chute de l'intensité du rayon réfléchi. L'angle pour lequel l'intensité est minimale est appelé angle de résonance, et dépend de la permittivité et donc de l'indice optique à l'interface.

Lors de l'injection d'analytes dans le système microfluidique (Figure 41A), les variations de masses provoquées par les interactions entraînent un changement d'indice de réfraction du milieu qui se traduit par un décalage de l'angle de résonance (Figure 41B). Cette variation d'indice étant proportionnelle à la densité massique, les biocapteurs SPR peuvent être assimilés à des microbalances optiques de très haute sensibilité ($\text{pg} \cdot \text{mm}^{-2}$).²³⁴ Dans les conditions utilisées lors de ce projet (puce commercialisée Biacore dite CM5), un changement de concentration de $1 \text{ ng} \cdot \text{mm}^{-2}$ équivaut à un changement de 0.1° soit 1000 RU.

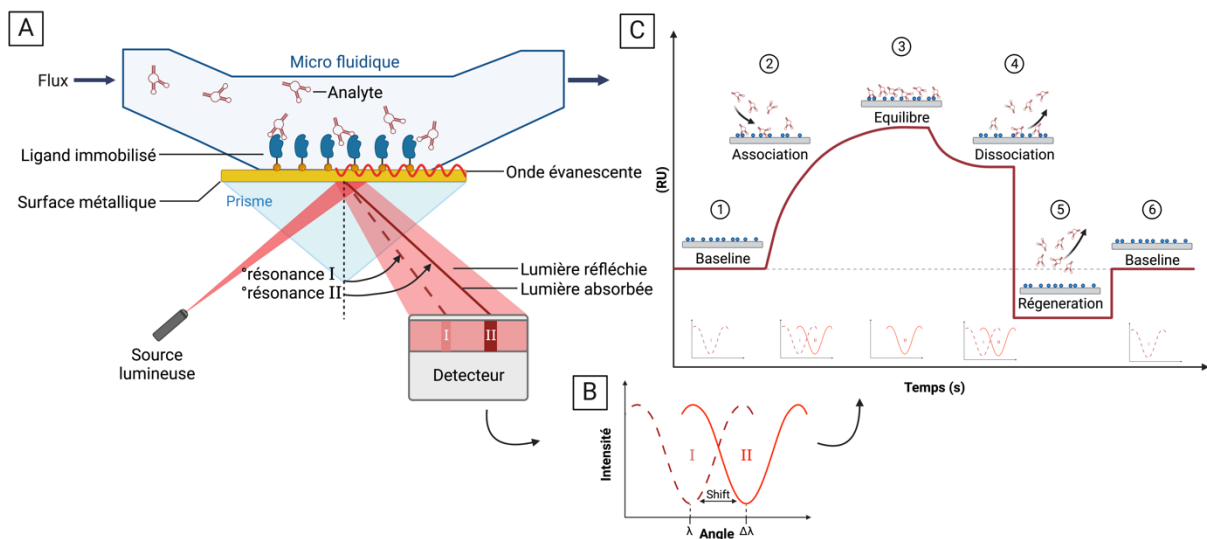


Figure 41 : Principe de la SPR : A) Schéma d'un dispositif de SPR. B) Traduction du changement d'indice de réfraction d'un milieu lors d'une interaction en variation de l'angle de résonance. C) Modèle de sensorgramme obtenu au cours d'une interaction.

La représentation graphique de cette variation en fonction du temps est appelée sensorgramme (Figure 41C) et se décompose en 6 phases : 1) l'injection du tampon (ligne de base), 2) l'injection de l'analyte qui se traduit par une augmentation de signal, 3) une phase d'équilibre thermodynamique qui tend graphiquement vers un plateau, 4) la dissociation par une nouvelle injection de tampon conduisant à une décroissance du signal, 5) la régénération

de la surface par l'injection d'une solution à pH ou concentration saline extrême, 6) la stabilisation du signal et retour à la ligne de base.

II. 2. Caractérisation par Résonance Plasmonique de Surface (SPR)

II.2.1 Choix de la surface

Basé sur les travaux effectués par Laure Bar au sein du DCM,²⁰⁷ notre choix s'est porté sur l'utilisation d'une surface antigénique qui permet de greffer sélectivement le peptide fCD20 sur la surface d'or du capteur tout en contrôlant la densité surfacique. Ce couplage peut être effectué *in situ* en parallèle pour le fCD20 et le fCD20 scbl, *via* la micro-fluidique de l'appareil, par une cycloaddition azoture-alcyne (Figure 42). La densité de surface en fCD20 optimale pour l'interaction avec le Rituximab ayant été déterminée à environ 40 pmol.cm⁻², des conditions similaires ont été utilisées initialement pour caractériser l'interaction CD20-aptamère ou scramble-aptamère.

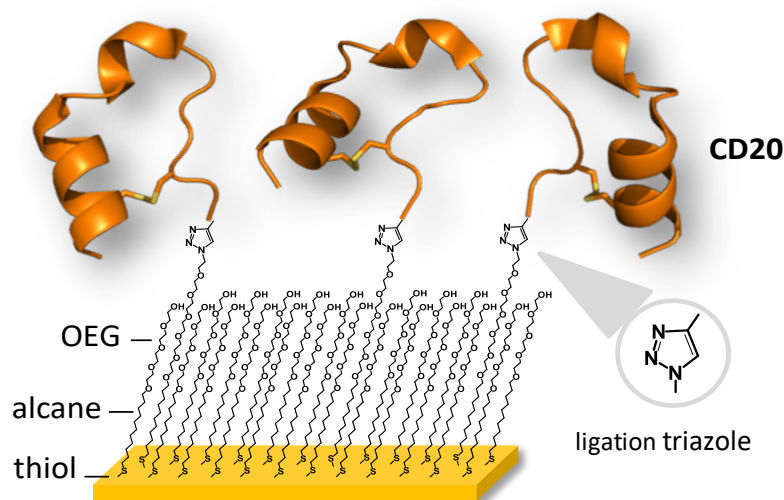
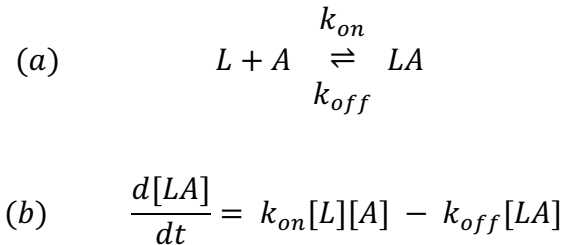


Figure 42 : Surface antigénique fonctionnalisée en fCD20 obtenue *via* CUAAC *in situ*.

II.2.2 Choix du modèle utilisé pour l'exploitation des données expérimentales

Différents modèles mathématiques peuvent être utilisés pour l'exploitation de données expérimentales. Toutefois, dans le cadre d'une interaction entre un ligand immobilisé et un analyte en solution, la cinétique de réaction est généralement considérée comme étant de

pseudo premier ordre.^{233,235} La formation de complexe entre L et A suivra ainsi l'Équation 7(a). Le taux de formation du produit LA, a un temps t donné peut ainsi être exprimé via l'Équation 7(b) :



Équation 7 : Formation du complexe (LA) entre le ligand (L) et l'analyte (A), avec k_{on} la constante d'association et k_{off} la constante de dissociation.

Lorsque l'on utilise des techniques de surface telles que la SPR, en se basant sur le sensorgramme obtenu, les constantes cinétiques k_{on} et k_{off} d'une interaction peuvent ainsi être déterminées et conduisent au calcul d'une constante d'affinité via l'Équation 8.

$$\frac{[LA]_{eq}}{[L]_{eq}[A]_{eq}} = K_A = \frac{1}{K_D} = \frac{k_{on}}{k_{off}}$$

Équation 8 : Relation entre les constantes cinétiques k_{on} , k_{off} et la constante thermodynamique K_D .

Dans le cadre d'une interaction supposée simple, où une molécule d'analyte n'interagit qu'avec une molécule Ligand (modèle 1:1), le K_D peut également être déterminé via une isotherme de Langmuir. Développé en 1916 par Irvin Langmuir²³⁶, ce modèle permet l'étude de l'adsorption d'un analyte sur une surface. A partir de l'étude à l'équilibre de l'adsorption, à différentes concentrations en analyte, on obtient une courbe des réponses obtenues à l'équilibre (R_{eq}) en fonction de la concentration en analyte (Figure 43). Le plateau de la courbe obtenue correspond au maximum d'analyte pouvant s'adsorber sur la surface et est noté R_{max} . La valeur du K_D est ainsi calculée selon l'équation suivante :

$$R_{eq} = \frac{R_{max} \cdot [A]}{K_D + [A]}$$

Équation 9 : Relation entre la réponse à l'équilibre (R_{eq}), la réponse maximale (R_{max}), la concentration en analyte ($[A]$) et la constante d'affinité (K_D).

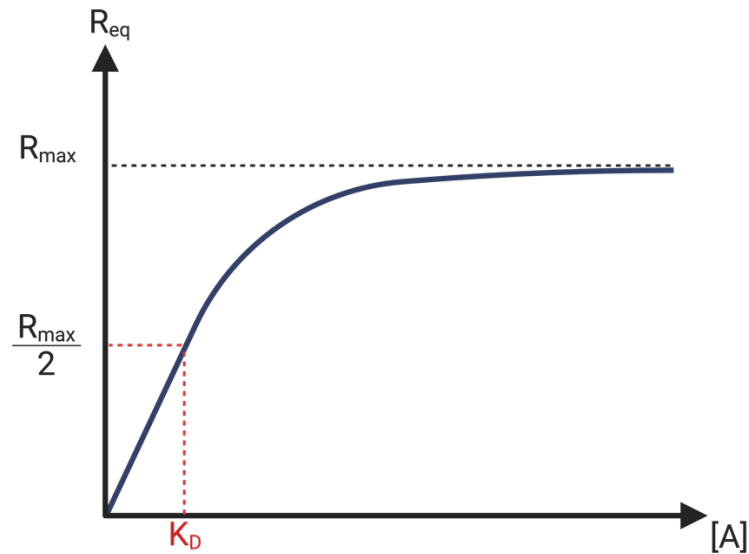


Figure 43 : Représentation schématique de l'étude d'un K_D via une isotherme de Langmuir.

II.2.3 Contrôle de la surface *via* des injections de RTX

Une fois la surface préparée et intégrée au système microfluidique, un test de reconnaissance du rituximab a été effectué dans du tampon PBS filtré. Cette étude de l'interaction entre l'anticorps et la surface vise tout d'abord à vérifier si celle-ci est exploitable pour contrôler une interaction avec le fragment antigénique. Un second contrôle par le RTX est effectué à l'issue des analyses, pour s'assurer de la stabilité de la surface sur le temps de l'étude. Dans cette optique, différentes concentrations en RTX ont été injectées. Le sensorgramme montré en Figure 44A correspond à la réponse obtenue au cours de l'interaction RTX/fCD20 à laquelle a été soustraite la réponse RTX/fCD20 scramble. Ces données ont ensuite été traitées *via* un isotherme de Langmuir selon un modèle (1:1) Figure 44B.

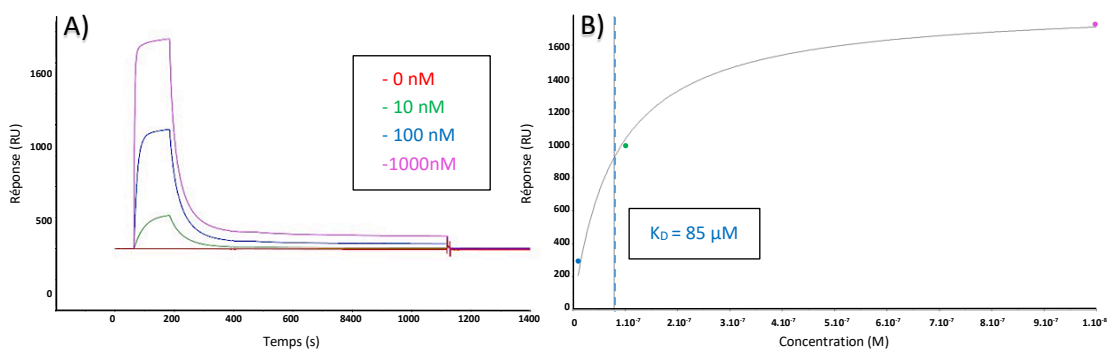


Figure 44 : Contrôle de l'interaction entre la surface fonctionnalisée en fCD20 et le RTX. A : Sensorgramme obtenu *via* injections de différentes concentrations en RTX. B : Isotherme de Langmuir issue du sensorgramme.

II.2.4 Modélisation de la réponse théorique attendue

En amont de l'injection des analytes, une simulation a pu être effectuée *via* le logiciel Biacor™ Simul8 (Figure 45). Celle-ci, basée sur les conditions de l'étude (temps de contact, K_D estimés, k_{on} , k_{off} et concentrations injectées), a permis de déterminer théoriquement l'intensité des signaux attendus lors de l'injections des aptamères sur la surface (Figure 45). Différentes simulations ont ainsi été générées en variant les valeurs de k_{on} ou k_{off} (mais à valeur de K_D fixe, déterminée par CE précédemment).

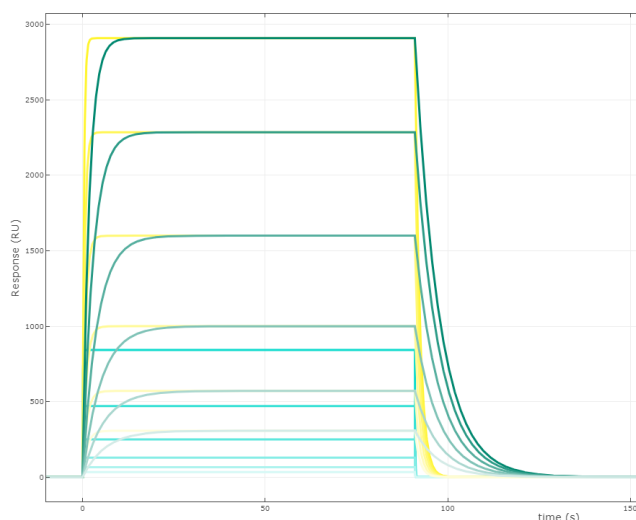


Tableau 13 : Conditions des études théoriques.

	Simulation°1 (jaune)	Simulation°2 (verte)
$k_a (M^{-1}.s^{-1})$	5.10^3	10^3
$k_d (s^{-1})$	0,75	0,15
$K_D (\mu M)$	150	150
[Conc]	0 – 400 μM	0 – 400 μM

Figure 45 : Simulations des interactions aptamères-surface.

Selon cette simulation, pour la concentration maximale de 400 μM , l'intensité attendue serait d'approximativement 2800 RU.

II.2.5 Résumé des analyses effectuées

Pour ces analyses, 3 aptamères ont été sélectionnés : les aptamères 1 et 2 qui semblent être les candidats les plus prometteurs, ainsi que l'aptamère 4 qui a montré une interaction moins importante pour le fCD20 en CE mais qui interagissait également avec le fCD20 scramble.

Pour ces expériences, nous avons utilisé des aptamères non modifiés. Les premiers essais effectués sur une surface fonctionnalisée en fCD20, à une densité surfacique calculée de 27 $pmol.cm^{-2}$, dans du PBS, ont conduit pour chaque aptamère à des sensorgrammes d'une intensité très importante ($> 10\ 000$ RU pour une concentration en aptamère de 400 μM). La

forme de créneaux observée est typique d'un changement d'indice de réfraction du milieu, non lié à une quelconque interaction (Figure 46).

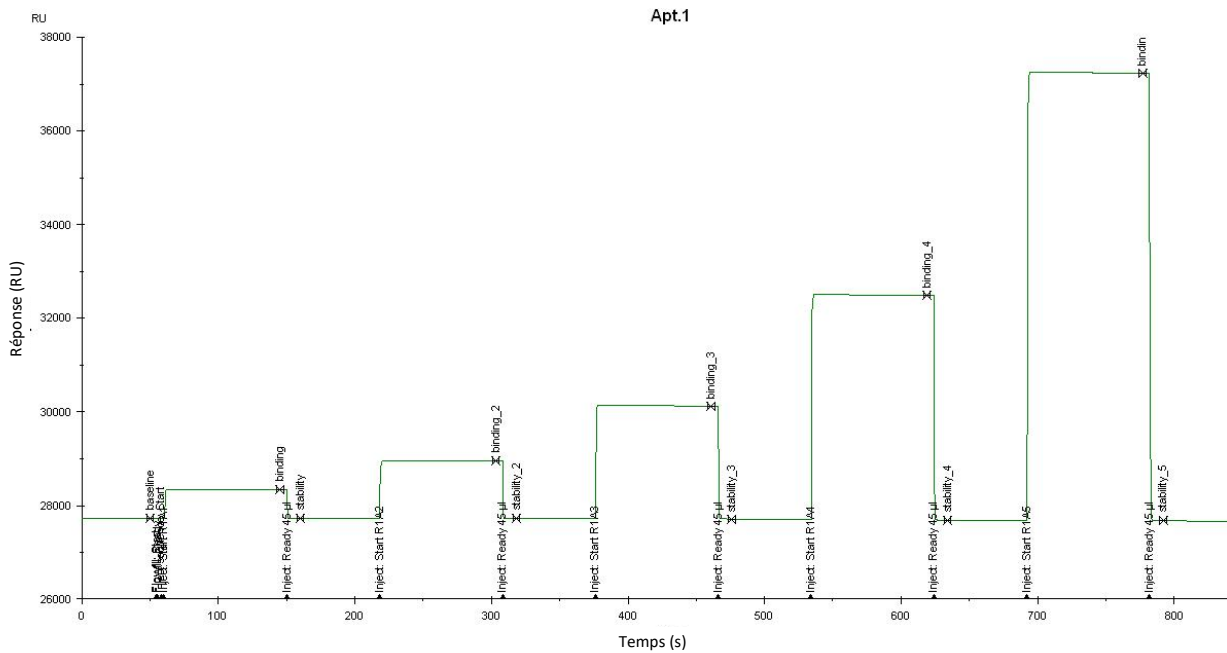


Figure 46 : Sensorgramme obtenu initialement par injection d'une gamme de concentration (25 à 400 μM pour l'aptamère 1 sur une surface fonctionnalisée en fCD20 (densité calculée de 27 $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$).

La même injection a été effectuée sur une surface fonctionnalisée par du fCD20 scbl ainsi que sur une surface non fonctionnalisée (groupements hydroxyles ou azotures libres). Les résultats obtenus ont été identiques, allant dans le sens d'une impureté impactant l'indice de réfraction du milieu lors de l'injection. Différentes étapes de lavages des aptamères ont ensuite été réalisées, à commencer par des étapes d'ultracentrifugation sur membrane Nanosep 3K, puis plus tard sur Nanosep 10K. C'est seulement après ce second lavage qu'un changement a été observé. Expérimentalement les signaux obtenus pour des concentrations de 400 μM sont d'environ 2700 RU, soit proches des valeurs simulées précédemment (Figure 47). Cependant, cette fois encore, les analyses effectuées sur une surface fonctionnalisée par du fCD20 scbl ainsi que sur une surface non fonctionnalisée ont donné des résultats similaires. Le fait que l'interaction soit aussi intense sur une surface ne contenant ni antigène ni contrôle, laisse penser que les aptamères interagissent de manière non spécifique avec la couche d'alcane-thiols fonctionnalisant la surface d'or.

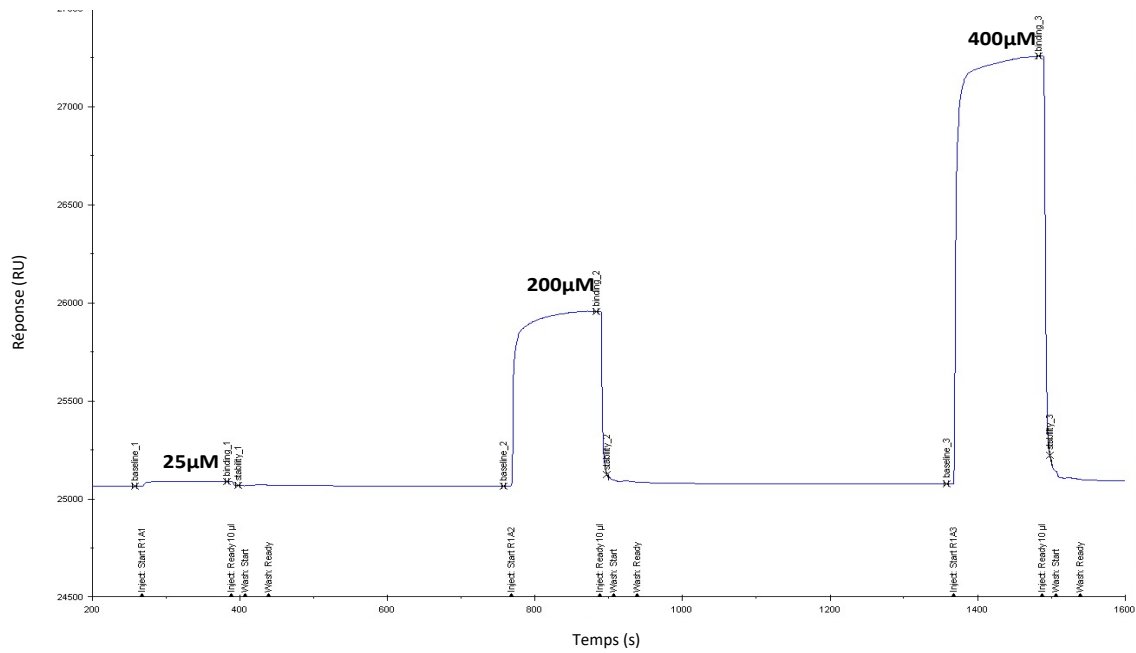


Figure 47 : Sensorgramme obtenu après lavage sur Nanosep 10K, par injection d'une gamme de concentration (25 à 400 µM) pour l'aptamère 1 sur une surface fonctionnalisée en fCD20 (densité calculée de 27 pmol.cm⁻²).

Pour tenter de limiter ce phénomène, différentes injections ont été réalisées, pour chaque aptamère et sur chacune des pistes de l'appareil, fonctionnalisées soit par du fCD20, soit par du fCD20 scramble, soit non fonctionnalisées. Les différentes conditions testées par la suite sont résumées dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Liste des conditions utilisées dans le cadre des caractérisations par SPR.

Conditions
Densité surfacique de 35 pmol.cm ⁻² dans du PBS
Densité surfacique de 27 pmol.cm ⁻² dans du PBS
Densité surfacique de 21 pmol.cm ⁻² dans du PBS
Densité surfacique de 17 pmol.cm ⁻² dans du PBS
Densité surfacique de 7,5 pmol.cm ⁻² dans du PBS
Densité surfacique de 2,3 pmol.cm ⁻² dans du PBS
Densité surfacique de 35 pmol.cm ⁻² dans du TGK
Densité surfacique de 17 pmol.cm ⁻² dans du TGK

Quelles que soient les densités surfaciques ou les tampons utilisés, aucune spécificité n'a pu être observée, les possibles interactions entre les aptamères et les peptides étant

probablement masquées par des interactions des aptamères avec la surface. Des tests complémentaires effectués *via* la technologie BLI (Bio-layer Interferometry), une seconde technique de caractérisation de surfaces, ont permis de confirmer des interactions non spécifiques entre les aptamères et la surface non fonctionnalisée en CD20.

Compte tenu de ces observations ainsi que de la complexité de mise en place des techniques de surfaces, il a été décidé de confirmer en priorité les résultats obtenus en CE *via* une autre méthode en solution et plus simple à optimiser. Notre choix s'est porté sur la méthode de titrage calorimétrique isotherme (ITC).

III. Caractérisation en solution *via* le titrage calorimétrique isotherme.

Contrairement aux méthodes de surface qui nécessitent le greffage d'un des partenaires, aucune immobilisation n'est nécessaire pour une analyse par ITC. Cette méthode ne nécessite pas non plus de marquage et n'est pas destructive.

III. 1. Principe de l'ITC

Par convention, en calorimétrie le ligand (L) correspond au composé dans la seringue.

III.1.1 Principe général

L'ITC repose sur les bases de la thermodynamique par des mesures de dégagement de chaleur lors d'une réaction exothermique, ou à l'inverse d'une consommation si la réaction est endothermique.^{237,238} Cette méthode en solution consiste en des injections successives d'un ligand dans une cuve contenant le second partenaire, sous agitation mécanique.²³⁹ L'appareillage utilisé, illustré en Figure 48, se compose de deux cellules : une au sein de laquelle aura lieu l'interaction sous agitation mécanique, l'autre ne contenant que du tampon ou de l'eau et servant de référence. Les deux cellules sont maintenues à température et pression constantes et égales tout au long de l'analyse.

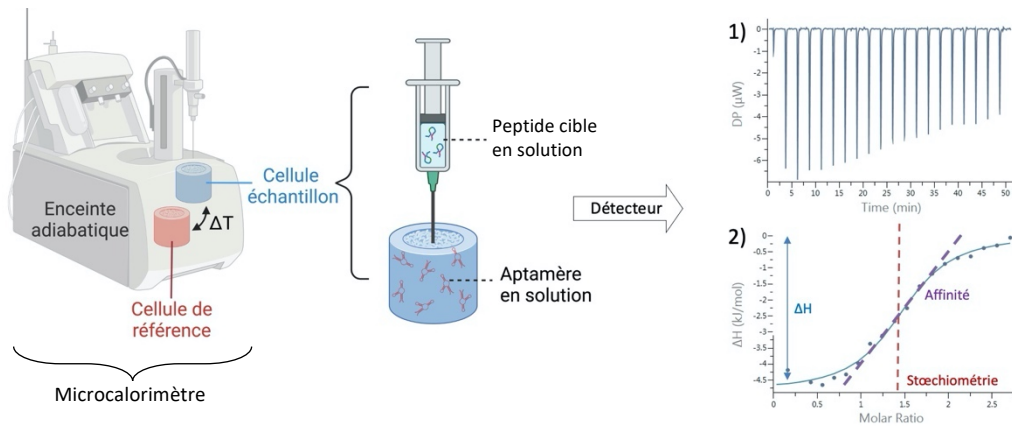


Figure 48 : Appareillage et principe d'une analyse par titrage calorimétrique isotherme.

Une solution contenant le ligand est injectée dans la cellule d'analyse par l'intermédiaire d'une seringue, automatiquement à un volume et un temps prédéfini par l'utilisateur. Lors de chaque injection, le ligand (dans notre cas le peptide) interagit avec le partenaire (l'aptamère) produisant une variation de la quantité de chaleur Q impactant la température de la cellule. Pour maintenir la température constante, l'appareil va utiliser plus ou moins de puissance et compenser cette variation de température. La variation de quantité de chaleur est ainsi simplement calculée en intégrant la puissance utilisée par seconde, permettant de déterminer l'enthalpie de réaction selon l'Équation 10.²⁴⁰ La quantité de chaleur est ainsi dépendante de la proportion de ligand qui interagit et va donc diminuer au fur et à mesure du fait de la saturation en partenaire.

$$Q = V_{cell} \Delta H_r [M]_{tot} \left(\frac{K_a [L]}{1 + K_a [L]} \right)$$

Équation 10 : Relation entre la quantité de chaleur mesurée (Q), Le volume de la cellule (V_{cell}), l'enthalpie de l'interaction (ΔH_r), la concentration totale en partenaire dans la cellule ($[M]_t$), la constante d'association (K_a) et la concentration en Ligand $[L]$.

Cette analyse permet ainsi de déterminer la constante d'affinité (K_a), l'enthalpie (ΔH), l'entropie (ΔS) ainsi que la stœchiométrie de réaction (n).

III.1.2 Importance de la concentration des partenaires ainsi que de la valeur de « c ».

En 1989, Wiseman et al. montrèrent que l'isotherme issue d'une interaction simple pour un modèle (1:1) varie en fonction du produit entre le K_a et la concentration en macromolécule partenaire $[M]_t$.²⁴¹ Ce ratio a été nommé « c value » et est déterminé *via* l'Équation 11.

$$c = nK_a[M]_t$$

Équation 11 : Relation entre la valeur de c, la stœchiométrie (n), K_a et $[M]_t$.

Pour une valeur de $c > 5$, l'isotherme obtenue est sigmoïdale. Plus cette valeur augmente et plus le profil tend vers un plateau en début et fin de titration. Dans la littérature^{239,242,243}, il est très souvent admis que les conditions sont optimales lorsque la valeur de c est comprise entre 5 et 500. Dans le cas contraire ($c < 5$), la courbe obtenue n'est plus exploitable et les résultats s ne sont plus considérés comme fiables.

III. 2. Caractérisation dans les conditions de sélection.

III.2.1 Principe général des analyses effectuées

Pour chaque caractérisation effectuée par ITC par la suite, le processus a été le suivant : en se basant sur les résultats obtenus précédemment en CE (K_D apparent), les concentrations nécessaires en aptamères ont été calculées de sorte que la valeur de c soit, si possible, comprise entre 5 et 500. A partir de cette base, différents essais ont été effectués en variant les concentrations en aptamère et en cible pour obtenir un signal brut sans trop de bruit de fond au niveau de la ligne de base, ainsi qu'une amplitude de puissance délivrée correcte pour l'analyse ($0,5 < DP < 10$). Un blanc a ensuite été effectué en injectant le peptide cible dans le tampon sans ajout d'aptamère. Cette étape permet de déterminer quel est l'impact de la dilution du peptide dans le tampon au cours de l'injection, sur le signal brut. Ce signal, correspondant au bruit de fond de la mesure, sera ensuite soustrait lors de l'étape d'ajustement des courbes (« fit »). Enfin l'interaction entre l'aptamère (dans la cuve) et le peptide fCD20 est caractérisée en duplicats. La même opération est ensuite effectuée en

présence de fCD20 scramble. L'ITC est une technique nécessitant une quantité de produit importante. La réalisation de triplicats n'a pas été réalisable au vu des faibles quantités disponibles en aptamères (< 1 μmol).

III.2.2 Caractérisation dans des conditions identiques à celles de l'électrophorèse capillaire

Pour confirmer les résultats obtenus en CE, des conditions identiques ont été utilisées (tampon TGK à pH = 8,3). La concentration en aptamère a été fixée à 0,2 mM et la concentration en peptide à 2 mM. Les interactions observées précédemment étant assez faibles (> 100 μM) dans ces conditions, il n'a pas été possible d'obtenir des valeurs de c supérieures au seuil de 5, permettant l'obtention d'une sigmoïde. Des premières valeurs d'affinité (Figure 49 et Tableau 15) ont tout de même pu être établies, dans le domaine variant de 100 à 140 μM . Ces valeurs sont légèrement plus élevées que celles obtenues *via* la CE mais permettent de confirmer une spécificité nette par rapport au contrôle négatif. Toutefois, ces conditions ont été optimisées pour permettre une bonne séparation au sein du capillaire pour l'étape de sélection, mais pourraient ne pas être optimales pour les études d'interactions. Différents paramètres peuvent donc être modifiés, tels que la température, la composition du tampon ou le pH. Ce dernier a été choisi comme point de départ pour se rapprocher des conditions physiologiques.

Tableau 15 : Récapitulatif des données obtenues via caractérisation par ITC dans le tampon TGK à pH 8,3.

Analyte	+ fCD20			+ fCD20 scbl		
	K_D (μM)	N (sites)	c	K_D (μM)	N (sites)	c
Apta° 1	104 ± 21	0.76 ± 0.08	1,5	> 10 mM	N/D	N/D
Apta° 2	144 ± 37	$1,01 \pm 0.11$	1,4	N/D	N/D	N/D

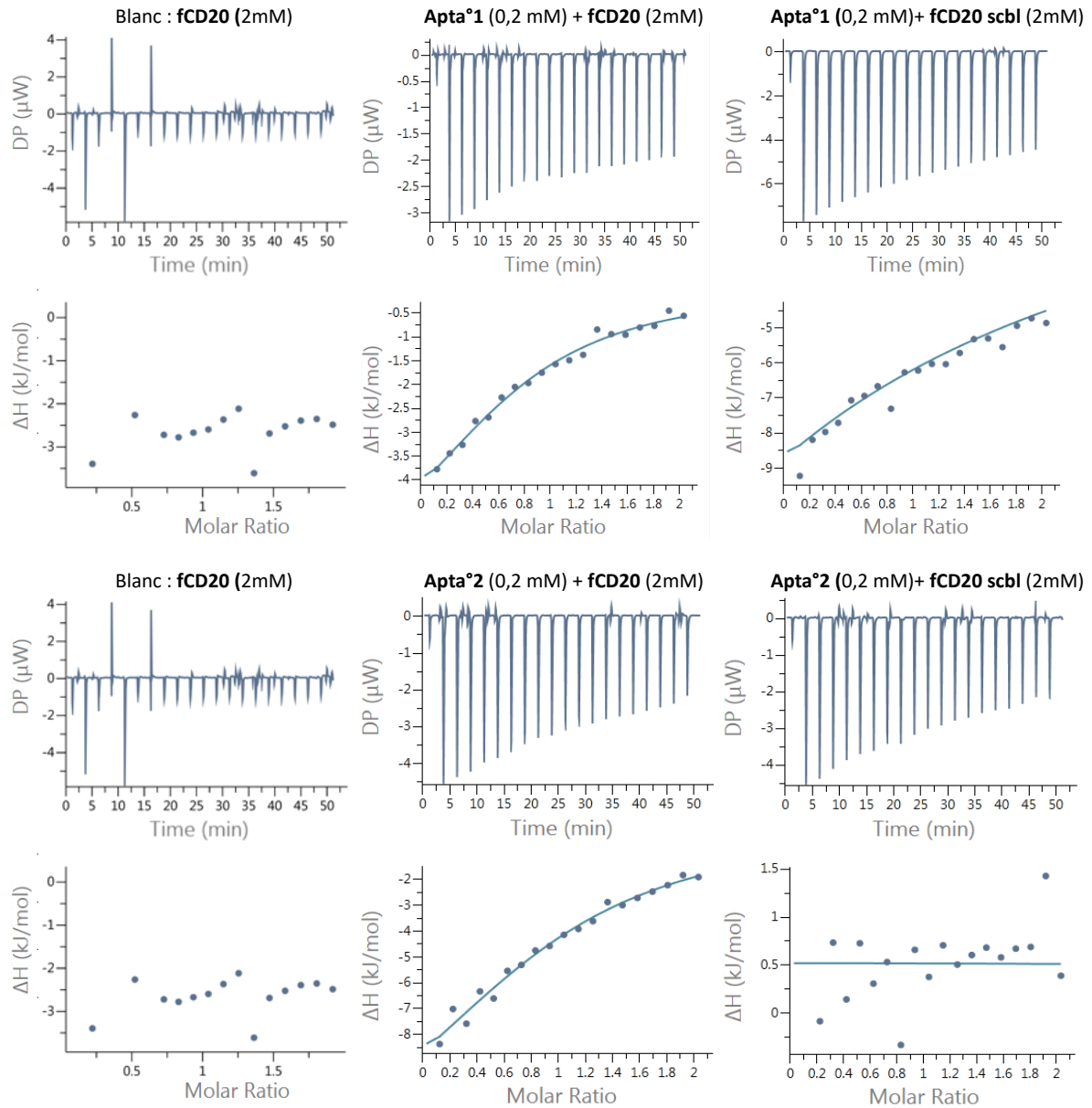


Figure 49 : Résultats bruts obtenus via les caractérisations par ITC dans le tampon TBGK à pH = 8,3. Pour chaque analyse : En haut : thermogrammes bruts sans soustraction du blanc (non réalisable sur le logiciel). En bas : « fit » obtenus selon un modèle d'interaction simple (1 :1).

III. 3. Optimisation des conditions et caractérisation en conditions de pH physiologiques

III.3.1 Caractérisations dans le tampon TBGK à pH = 7,3.

Dans l'optique de favoriser l'interaction, des conditions proches ont été utilisées (tampon TBGK, 25°C) à la différence que le pH a été ajusté à 7,3 et la concentration en aptamères diminuée au fil des essais de 200 à 150 μM. Les résultats sont illustrés sur la Figure 50 et résumés dans

le Tableau 16. Il en ressort qu'en diminuant le pH d'un log, les valeurs d'affinité obtenues pour l'interaction avec le fCD20 sont améliorées d'un facteur 17 pour l'aptamère°1 et 120 pour l'aptamère°2 soit des K_D de respectivement 6 et 1 μM . Comme attendu, lors de l'injection en présence de fCD20 scramble, aucune interaction spécifique n'est observée.

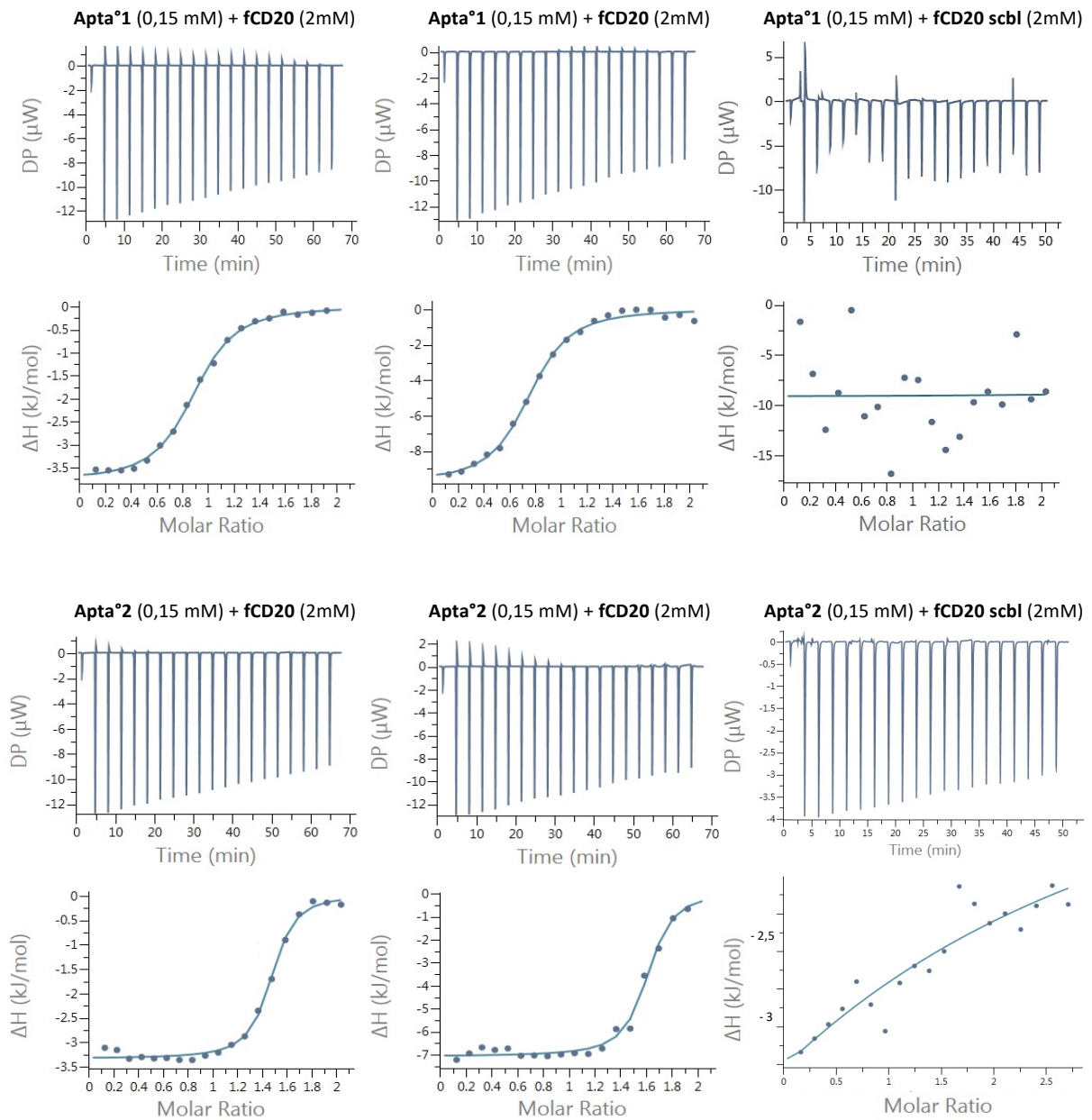


Figure 50 : Résultats bruts obtenus via les caractérisations par ITC dans le tampon TKG à pH = 7,3. Pour chaque analyse : En haut : thermogrammes bruts sans soustraction du blanc (non réalisable sur le logiciel). En bas : « fit » obtenus selon un modèle d'interaction simple (1 :1).

Tableau 16 : Récapitulatif des données obtenues via caractérisation par ITC dans le tampon TGK à pH 7,3.

Analyte	+ fCD20			+ fCD20 scbl		
	K_D (μ M)	N (sites)	c	K_D (μ M)	N (sites)	c
Apta° 1	$6,4 \pm 1.0$	0.86 ± 0.01	20,1	N/D	N/D	N/D
Apta° 2	$1,2 \pm 0,2$	$1,49 \pm 0.01$	194	> mM	N/D	N/D

III.3.2 Caractérisations dans des tampons compatibles avec les tests cellulaires

En parallèle à ces étapes de caractérisation par ITC, de premiers essais en présence de cellules exprimant ou pas l'épitope CD20 ont été effectués (Chapitre 3 partie IV). Le TGK n'étant pas initialement un tampon compatible pour incuber les cellules, le tampon initialement prévu fut le RPMI 1640. Ce tampon développé spécifiquement pour la culture de lymphocytes est un milieu assez complexe puisqu'il contient, entre autres, les 20 acides aminés naturels, 11 types de vitamines, des sels inorganiques ainsi que d'autres composants tels que le glutathion ou le D-glucose. Pour contrôler l'interaction aptamères-fCD20 dans ce tampon, des essais en ITC ont donc été effectués (Figure 51). Il est apparu que, dans ces conditions, aucune interaction n'a été observée. Il semblerait donc que le tampon RPMI 1640 ne permette pas la caractérisation des interactions entre nos aptamères et le peptide CD20.

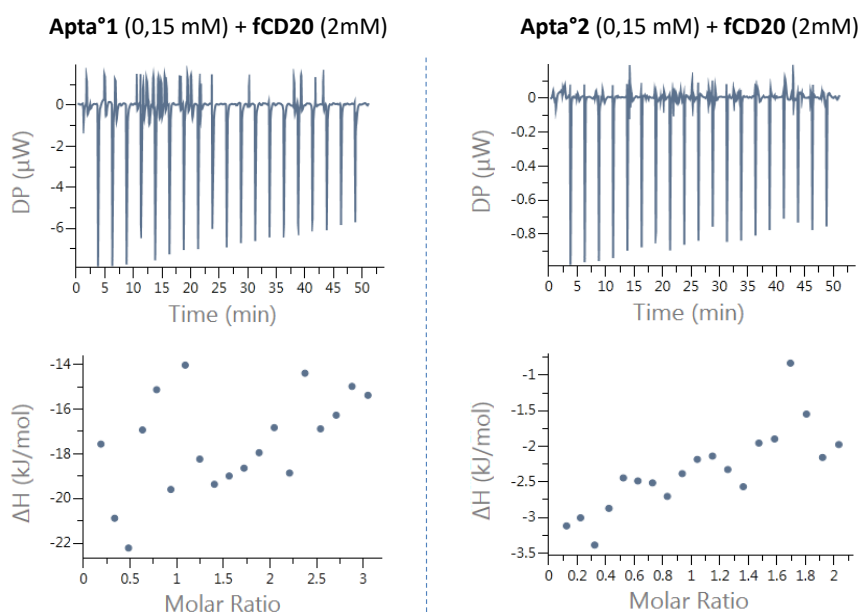


Figure 51 : Résultats bruts obtenus via les caractérisations par ITC dans le tampon RPMI 1640. Pour chaque analyse : En haut : thermogrammes bruts sans soustraction du blanc (non réalisable sur le logiciel). En bas : « fit » obtenus selon un modèle d'interaction simple (1 :1).

Un second tampon, le PBS (pH 7,4), compatible avec les tests cellulaires,²⁴⁴ a ainsi été sélectionné. Il est composé de NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM,) Na₂HPO₄ (8 mM) et KH₂PO₄ (2 mM). Faute de pouvoir tester la totalité des échantillons du fait de la consommation importante en produit, l'aptamère 1 a été choisi puis comparé avec les résultats obtenus dans le tampon TGK (pH 7,3). Tout d'abord, un blanc ne contenant que la cible fCD20 a été effectué et est présenté en Figure 52. Il a été observé que, dans les concentrations d'études en peptide (1,5 mM), la dilution du peptide dans la cuve, en présence de tampon PBS, est une réaction endothermique ($\Delta H > 0$).

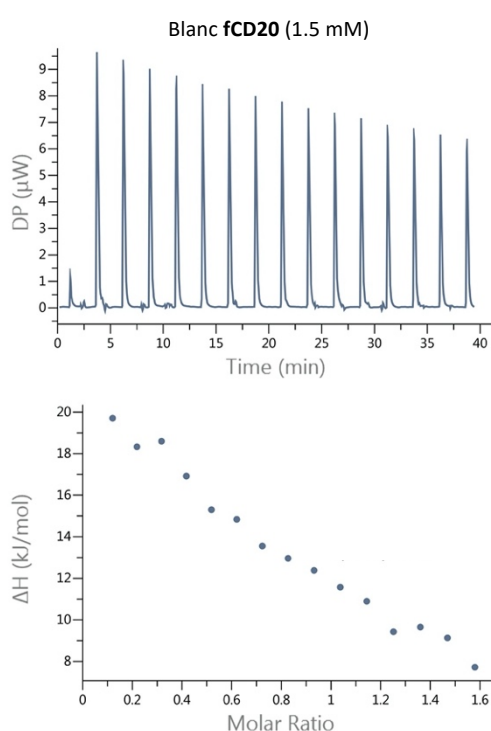


Figure 52 : Résultat brut obtenu pour le blanc via une caractérisation par ITC dans le tampon PBS.

Ce signal a donc été, par la suite, soustrait lors de l'étape d'ajustement des courbes pour l'interaction avec l'aptamère^o1. En effet le signal brut obtenu et illustré en Figure 53 montre bien une interaction exothermique ($\Delta H < 0$) comme attendu mais avec une puissance délivrée (DP (μ W)) positive. Toutefois, indépendamment du signal brut, les valeurs obtenues pour la stœchiométrie et l'affinité sont relativement similaires à celle observée précédemment dans le tampon TGK : Respectivement $n = 0.88 \pm 0.01$ et $K_D = 8,9 \pm 2,8 \mu M$. Le tampon PBS est donc utilisable pour la caractérisation de nos composés.

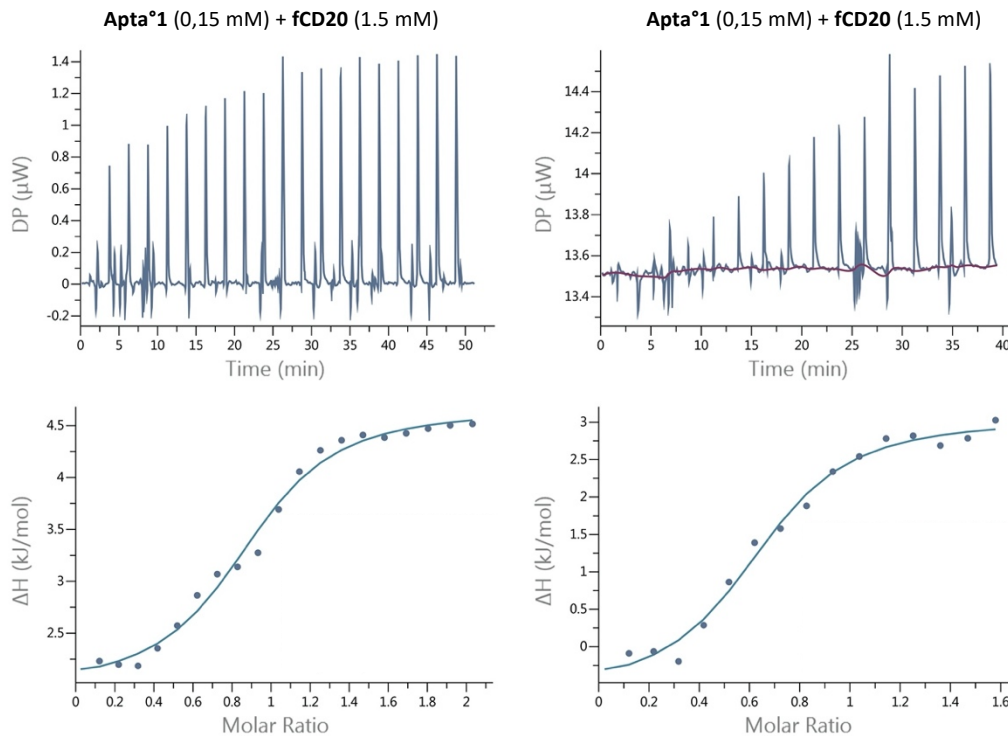


Figure 53 : Résultat brut obtenu pour l'apta°1 + fCD20 via une caractérisation par ITC dans le tampon PBS.

III. 4. Discussion des résultats obtenus *in vitro*

Parmi les différents aptamères décrits dans la littérature à ce jour, relativement peu ont été sélectionnés *via* le processus de CE-SELEX. Bien que cette méthode très performante permette de limiter la sélection à quelques cycles, une bonne connaissance de la cible est requise, notamment pour sélectionner la fenêtre de collection d'intérêt. Toutefois, au cours des dernières années, la variété de cibles s'est accrue, allant de protéines de poids moléculaires importants (jusqu'à 200kDa) à de plus petits composés tels que des peptides de poids moléculaires plus faibles (< 5kDa).

Dans l'optique d'évaluer les résultats obtenus pour nos deux aptamères, une courte étude comparative des différentes sélections d'aptamères par CE-SELEX décrites dans la littérature, a été menée. Une liste non exhaustive des cas étudiés a été reportée dans les Tableau 17 et Tableau 18 en fonction du poids moléculaire de la cible. Les paramètres comparés sont la nature de la cible et des aptamères, la longueur des séquences incluant la partie variable, le nombre de cycles de sélection ainsi que les caractérisations *in vitro*.

Tableau 17 : Liste non exhaustive de sélections effectuées par CE-SELEX sur des cibles protéiques de poids moléculaire supérieur à 10 kDa.

Nom et nature de la cible	Nature des aptamères	Longueur des séquences	Nombre de cycles de sélection	Méthode de caractérisation	K _D (μM)
Human myeloma IgE ²⁴⁵ Immunoglobuline : 200 kDa	ADN	80 bases dont 40 randomisées	3	CE d'affinité (ACE)	0.1 à 0.3
Low-density lipoprotein receptor-related protein 6 ²⁴⁶ Protéine : 180 kDa	ADN	80 bases dont 40 randomisées	4	SPR	0.1 à 1,3
Fibroblast activation protein ²⁴⁷ Protéine : 97 kDa	ADN	80 bases dont 40 randomisées	4	ACE	0.6 à 2.2
Haemagglutinin protein ²⁴⁸ Protéine : 83 kDa	ADN	80 bases dont 40 randomisées	4	ELAA	Proche micro-molaire
Proprotein convertase subtilisin/kexin 9 ²⁴⁹ Protéine de 692 aa : 73 kDa	ADN	88 bases dont 52 randomisées.	3	Test ELISA	0,3
Human Epididymis Protein 4 ¹⁹² Protéine : environ 25 kDa	ADN	65 bases dont 25 randomisées	7 (dont 2 contre-sélections)	ACE et Anisotropie de fluo.	0,3 - 9,0 (grosse variabilité selon la méthode)
Leptin protein ²⁵⁰ Protéine : 16 kDa	ADN	81 bases dont 40 randomisées	3	ACE et Intensité de fluorescence	Proche micro-molaire

Tableau 18 : Liste non exhaustive de sélections effectuées par CE-SELEX sur des cibles de poids moléculaire inférieur à 10 kDa.

Nom et nature de la cible	Nature des aptamères	Longueur des séquences	Nombre de cycles de sélection	Méthode de caractérisation	K _D (μM)
Neuropeptide Y (NPY) ²⁵¹ Protéine de 36 aa : 4272 Da	ADN	80 bases dont 40 randomisées	4 à 6	ACE	0,5 à 0,8
αC-conotoxin PrXA ¹⁰⁸ Peptide : 3541 Da	ADN	77 bases dont 30 randomisées	4	SPR et Anisotropie de fluo.	0,1 à 0,3
N-methyl mesoporphyrin IX ²⁵² Petite molécule : 580 Da	ADN	80 bases dont 40 randomisées	3 à 6	Intensité de fluorescence	Proche micro-molaire

Les paramètres utilisés pour ces différentes études sont relativement similaires en termes de nombre de cycles, nature de la banque d'aptamères (série ADN) ainsi que la longueur des séquences (environ 80 bases). Les méthodes de caractérisation utilisées sont toutefois différentes et ont parfois donné des résultats assez variables (facteurs allant de $\times 2$ à $> \times 10$) au sein de la même étude. Cependant, quelle que soit la nature de la cible, les constantes d'affinités observées sont comprises entre 100 nM et quelques μM . Il semblerait donc que, bien qu'étant dans la fourchette haute, nos composés soient comparables à ceux décrits.

Il est tout de même important de constater que la majorité des études décrites ont ciblé des protéines de plusieurs dizaines de kDa. Cela peut en partie s'expliquer par le fait qu'un des challenges majeurs pour une sélection par CE-SELEX est d'obtenir une bonne séparation entre les aptamères liés à la cible et la fraction libre. Une cible de faible poids moléculaire aura un impact bien plus faible sur la mobilité des aptamères liés, en regard d'une cible de taille plus importante²⁵¹

Une dernière observation est que, dans la totalité des cas pour lesquels les études ont été menées sur plus de 4 cycles de sélection positive (sans inclure les contre-sélections), l'affinité globale de la banque pour la cible a diminué à partir du 5^{ème} cycle, sans exception.

En ce qui concerne les aptamères anti-CD20, à ce jour deux ont été décrits et sélectionnés par Cell-SELEX. Le 1^{er}, en 2017, en 15 cycles de sélection à partir d'une banque d'aptamères en série ADN composée de 100 bases dont 60 variables²⁵³. Le 2nd, en 2018, en 10 cycles de sélection à partir d'une banque d'aptamères en série ADN composée de 88 bases dont 52 variables. Les K_D ont été respectivement évalués par FACS à 69.1 ± 7.6 nM et 96.91 ± 4.5 nM.

Ces affinités ayant été obtenues *in cellulo*, une comparaison avec les datas obtenues *in vitro* par ITC ne serait pas réellement pertinente notamment car les caractérisations *in vitro* ont été effectuées en solution et sur un fragment de l'antigène. Des tests *in cellulo* par FACS sur nos composés ainsi que des fragments présentés dans la suite de ce manuscrit, permettront à terme de comparer au mieux ces différentes études. Toutefois, les deux aptamères décrits présentent des poids moléculaires importants (29 et 33kDa environ) du fait de leur longueur. En l'état, ils sont donc peu compatibles avec notre objectif visant à obtenir des composés multivalents de poids moléculaire de préférence inférieur à 50 kDa.

IV. Caractérisation *in cellulo* via cytométrie en flux.

IV. 1. Principe de la méthode

La cytométrie en flux, (CmF) dont le principe est illustré en Figure 54, est une méthode permettant de caractériser plusieurs milliers de cellules ou de particules en solution par seconde.^{254,255} Les lignées étudiées sont mises en suspension en présence de molécules marquées par un fluorophore (type anticorps monoclonaux ou dans notre cas d'aptamères), puis injectées au sein du cytomètre. La fluidique permet de canaliser les cellules une par une au travers d'un faisceau d'un laser. Les signaux captés par différents détecteurs permettent de caractériser les cellules en étudiant simultanément différents critères tels que la taille (paramètre FSC : lumière diffractée mesurée en face du rayon) et la granularité (paramètre SSC : lumière diffractée mesurée sur le côté) ou dans le cas d'un marquage, l'intensité de fluorescence.

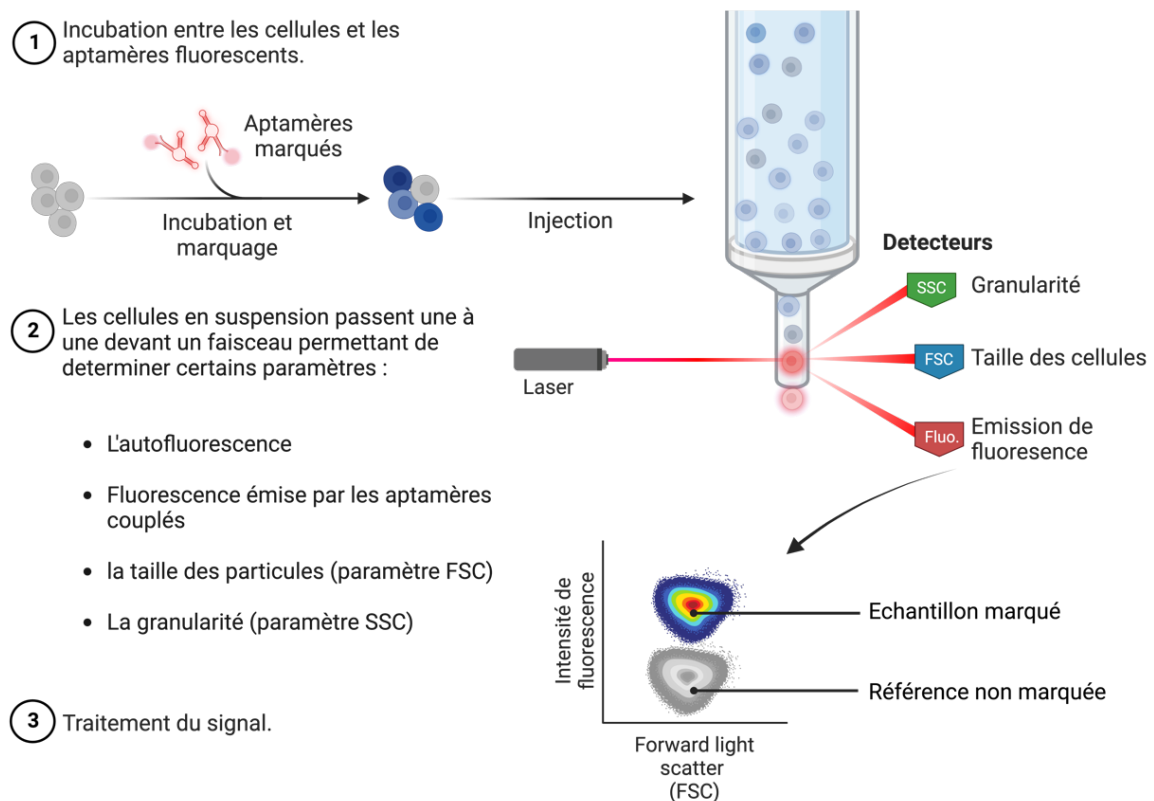


Figure 54 : Schéma illustrant le principe de la cytométrie en flux.

IV. 2. Choix des lignées cellulaires

Pour étudier la sélectivité de nos composés, nous avons utilisé deux lignées cellulaires : la lignée Raji exprimant l'antigène CD20, et la lignée Jurkat dépourvue de cet antigène. Ces cellules sont régulièrement utilisées ensemble dans le cadre de tests biologiques et notamment pour les études de ciblage de l'antigène CD20.²⁵⁶⁻²⁵⁹

La lignée Raji se compose de cellules lymphoblastoïdes humaines dérivées, au début des années 60, de lymphomes prélevés chez un patient atteint de lymphomes de Burkitt.²⁶⁰ La densité surfacique en CD20 à la surface des cellules Raji a pu être déterminée à 300/ μm^2 par une étude datant de 2012 réalisée par Tsai and al. *via* la méthode d'imagerie : ImageStream Technology (Amnis Inc.).²⁶¹ La lignée Jurkat, quant à elle, est dérivée de lymphocytes T immortalisés provenant initialement d'un patient atteint de lymphome / leucémie à cellules T.²⁶²

IV. 3. Test d'un contrôle anticorps pour valider les cellules choisies

Les expériences biologiques ainsi que la préparation et conservation des cellules ont été menées au sein de l'Institut for Advanced Bioscience (IAB) de Grenoble sous la supervision du Dr. Veronique Frachet.

Pour confirmer la viabilité des cellules ainsi que la présence de l'antigène CD20 spécifiquement par les cellules Raji, un anticorps anti-CD20 marqué par de l'Alexa 488 a été utilisé. Des premières analyses par CmF ont ainsi été menées et ont permis de valider l'utilisation de ces deux lignées. Les résultats illustrés en Figure 55 montrent que la fluorescence augmente significativement pour la lignée Raji en présence de l'anticorps marqué. Au contraire, aucune variation de la fluorescence n'est observée pour la lignée Jurkat en présence ou absence de l'anticorps.

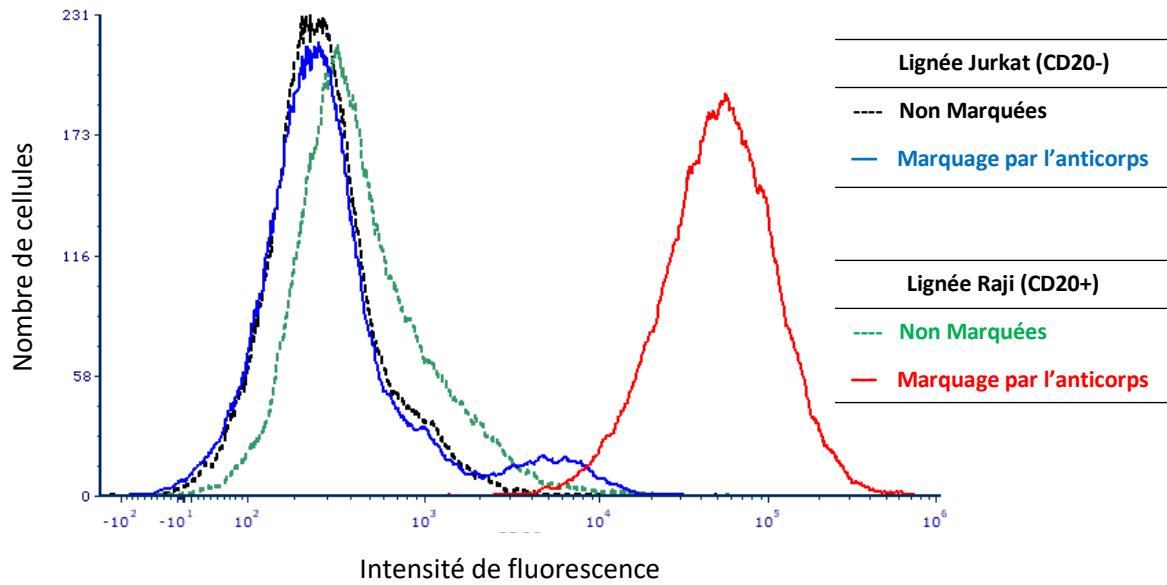


Figure 55 : Tests préliminaires réalisés en CmF entre un anticorps anti CD20 marqué par de l'Alexa 488 et les lignées cellulaires Raji et Jurkat. . En noir : Signal observé pour les cellules Jurkat non marquées. En bleu : Signal observé pour les cellules Jurkat après marquage par l'anticorps anti CD20 couplé à l'Alexa 488. En vert : Signal observé pour les cellules Raji non marquées. En rouge : Signal observé pour les cellules Raji après marquage par l'anticorps anti CD20 couplé à l'Alexa 488.

IV. 4. Optimisation des conditions

Pour la suite des travaux, les aptamères utilisés comportent le fluorophore Cy5 (Cyanine 5). Ce choix s'est porté en raison du coût excessif des aptamères modifiés par un Alexa 488. Des études préliminaires effectuées en CmF nous ont permis de mettre en évidence des paramètres cruciaux pour l'étude de l'interaction entre nos aptamères et les cellules.

Dans ce chapitre, ne seront décrits que les résultats obtenus en comparant chaque paramètre et résumés sous forme d'histogrammes. Par manque de temps, les différents résultats présentés n'ont pas toujours pu être dupliqués ou tripliqués. De plus, les expérimentations n'ont pas toujours été très comparables en termes d'intensité de fluorescence, viabilité des cellules etc. Toutefois une tendance significative a pu être observée pour chaque paramètre modifié. Les histogrammes présentés par la suite ne correspondent donc à chaque fois qu'à une unique analyse (absence de paramètres statistiques). Les résultats obtenus dans les conditions retenues au final devront par ailleurs être tripliqués avant une éventuelle publication des résultats.

IV.4.1 Comparaison des tampons RPMI 1640 et PBS

La première analyse a eu pour but de comparer les effets des tampons RPMI 1640 et PBS sur la viabilité des cellules ainsi que les interactions aptamères-cellules sur un temps d'incubation de 40 min à 25°C, avec des concentrations en aptamères de 2 µM pour 500 000 cellules.

Après marquage dans le tampon RPMI (Figure 56), le signal de fluorescence obtenu ainsi que le nombre de cellules positives sont aussi élevés pour les lignées Jurkat et Raji.

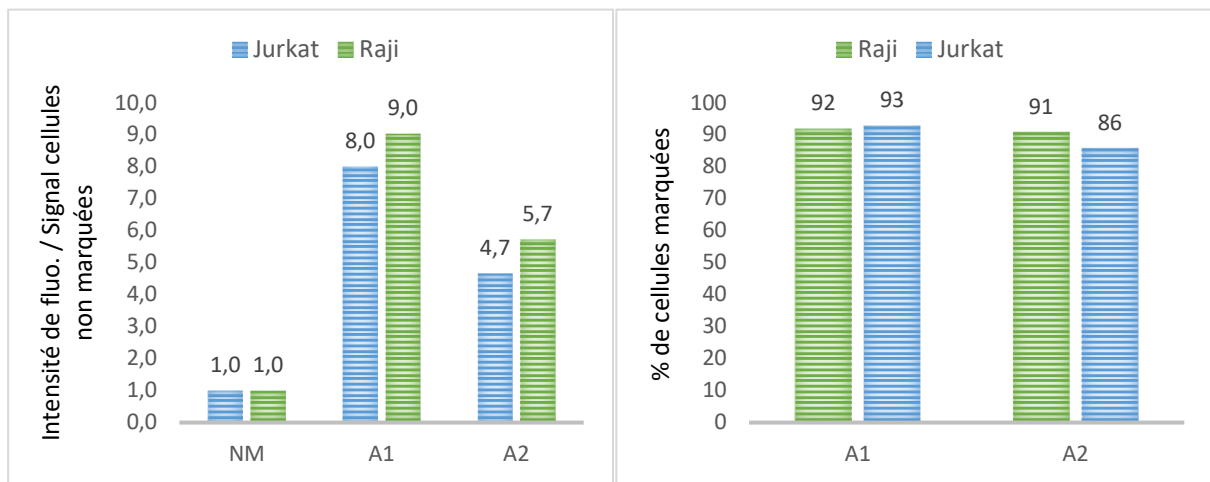


Figure 56 : Résultats obtenus à l'issue d'une analyse de CmF des aptamères 1 et 2 dans le tampon RPMI 1640.

Au contraire, les expériences menées dans le tampon PBS (Figure 57) montrent que le signal de fluorescence ainsi que le nombre de cellules positives sont significativement supérieurs (facteur 3) pour les deux aptamères pour la lignée Raji. Le tampon PBS est donc plus adapté pour réaliser les expériences cellulaires. Cela confirme aussi les résultats obtenus par ITC.

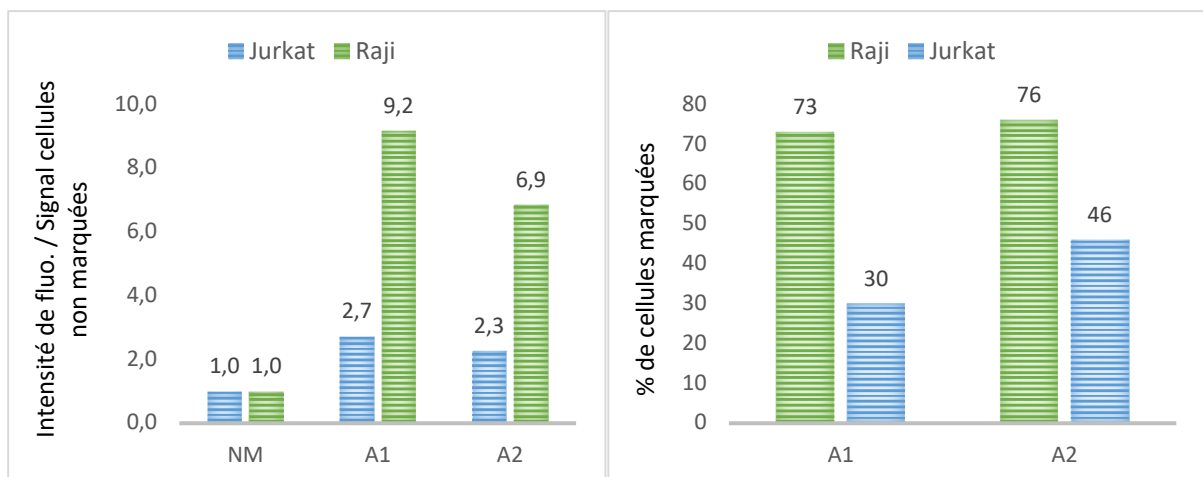


Figure 57 : Résultats obtenus à l'issue d'une analyse de CmF des aptamères 1 et 2 dans le tampon PBS.

Cependant, un autre paramètre est à prendre en compte : la viabilité des cellules sur le temps de l'étude. Le milieu de culture des deux lignées se compose en partie de RPMI 1640 qui permet de conserver les cellules. Cependant, le PBS n'étant pas adapté à la culture cellulaire, il peut présenter des limites pour ce type d'études. En effet, comme illustré en Figure 58, après 40 minutes d'incubation, plus de 80% des cellules Raji étaient viables dans le tampon RPMI contre seulement 13% dans le tampon PBS (la population encadrée en rouge correspond à des cellules non viables). Les analyses menées sur la lignée Jurkat bien que plus stable, ont montré que la viabilité est également plus faible dans le tampon PBS. D'autres paramètres tels que le nombre de lavages suivis de centrifugations peuvent également impacter ce phénomène et doivent être pris en compte dans la mise en place des conditions expérimentales.

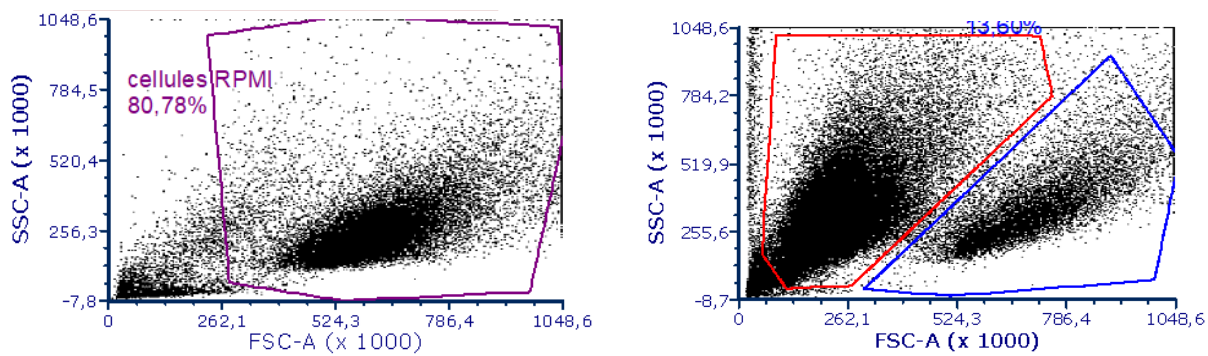


Figure 58 : Comparaison de la stabilité des cellules Raji sans marquage dans le tampon RPMI 1640 (à gauche) et PBS (à droite).

IV.4.2 Impact de la concentration en aptamères ainsi que des temps d'incubations et de centrifugation.

En se basant sur les résultats obtenus précédemment, il a été décidé de réduire le nombre de lavage / centrifugation. Initialement, deux lavages étaient effectués pour s'affranchir du milieu de culture, puis deux de plus après incubation avec les aptamères. Pour limiter l'impact de cette étape, les lavages ont été réduits à un après culture et un après incubation et la vitesse de centrifugation ralentie de 2500 rpm à 2000 rpm. Enfin, les temps d'incubation ont été diminués drastiquement : de 40 minutes précédemment à 15 minutes dans les nouvelles conditions. Les résultats obtenus ainsi ont été plutôt encourageants puisque l'on observe (Figure 59) une viabilité des cellules Raji > 65 % (contre 13% précédemment).

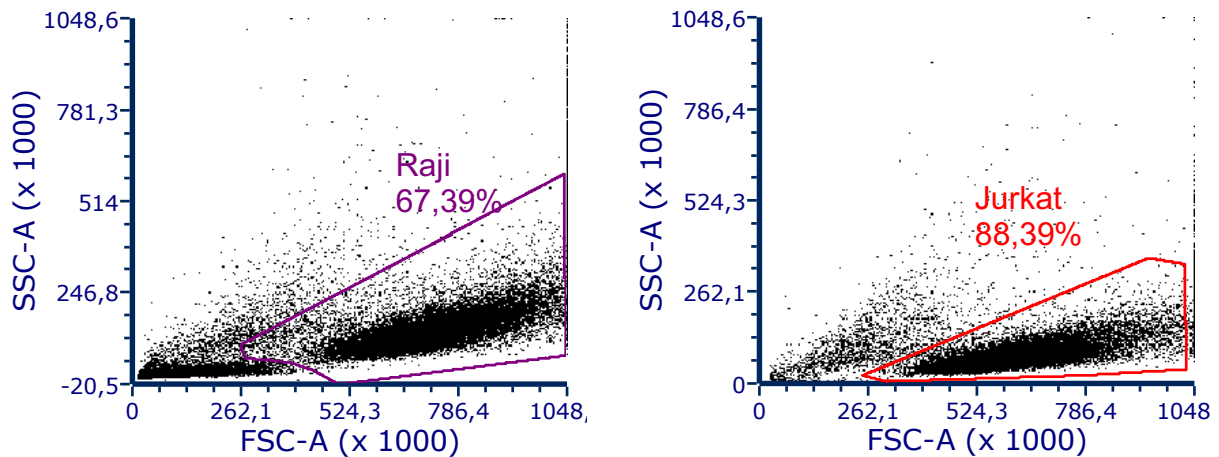


Figure 59 : Analyse de la stabilité des cellules Raji (à gauche) et Jurkat (à droite) dans les nouvelles conditions.

En parallèle, une gamme de concentration en aptamère 1 (de 0.5 μM à 10 μM) a été testée pour étudier l'impact de la concentration sur les interactions non-spécifiques. L'étude a été effectuée en présence de 500 000 cellules par tube à 25°C. Le profil obtenu pour les deux lignées (Figure 60) montre bien que la concentration en aptamère a un impact sur l'intensité de fluorescence après marquage. Les concentrations supérieures à 1 μM montrent une interaction aussi importante pour les deux lignées et est donc non spécifique. Au contraire, pour 0,5 et 1 μM , la spécificité de l'interaction semble augmenter proportionnellement à la diminution de la concentration. Il semble donc que l'utilisation de plus faibles concentrations limite les interactions non spécifiques. Les concentrations à 0.5 μM et 1 μM ont donc été sélectionnées pour la suite de l'étude.

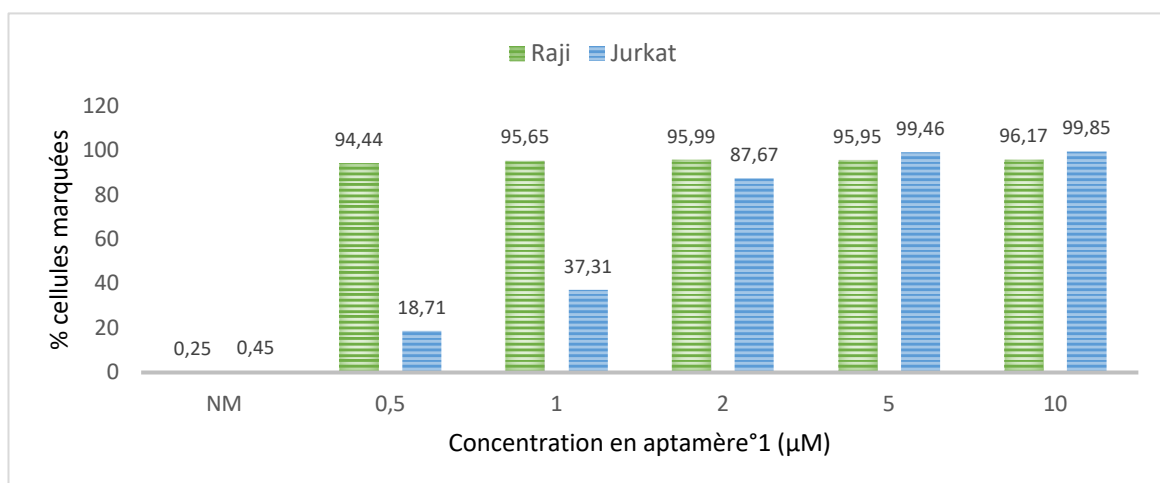


Figure 60 : Résultats obtenus à l'issue d'une analyse de CmF à partir d'une gamme de concentration de l'aptamère¹ dans le tampon PBS. En haut : Signaux bruts observés pour les cellules Raji en fonction de la concentration en aptamère¹. Au milieu : Signaux bruts observés pour les cellules Jurkat en fonction de la concentration en aptamère¹. En bas : Histogrammes comparatifs des deux lignées.

IV.4.3 Impact de la concentration en cellules

Le troisième paramètre qui a été étudié est le nombre de cellules par tube. Au vu des résultats précédents, il est attendu qu'une diminution de celui-ci conduise également à une saturation en aptamère. Initialement fixé à 500 000, il a été réduit de moitié pour cette analyse, effectuée dans les mêmes conditions que la précédente : concentration en Apta°1 et Apta°2 = 0,5 μ M et 1 μ M, T°=25°C. Les résultats illustrés en Figure 61 montrent en effet que le nombre de cellules par tube, comme la concentration en aptamère, influe sur la spécificité de la réaction. Le pourcentage de cellules positives sur la lignée Jurkat était d'environ 20 % pour 0,5 μ M en aptamère°1 et 500 000 cellules et monte à 90 % lorsque le nombre de cellules est réduit de moitié. Pour la suite de l'étude, le nombre de cellules a ainsi été fixé à 500 000 par tube.

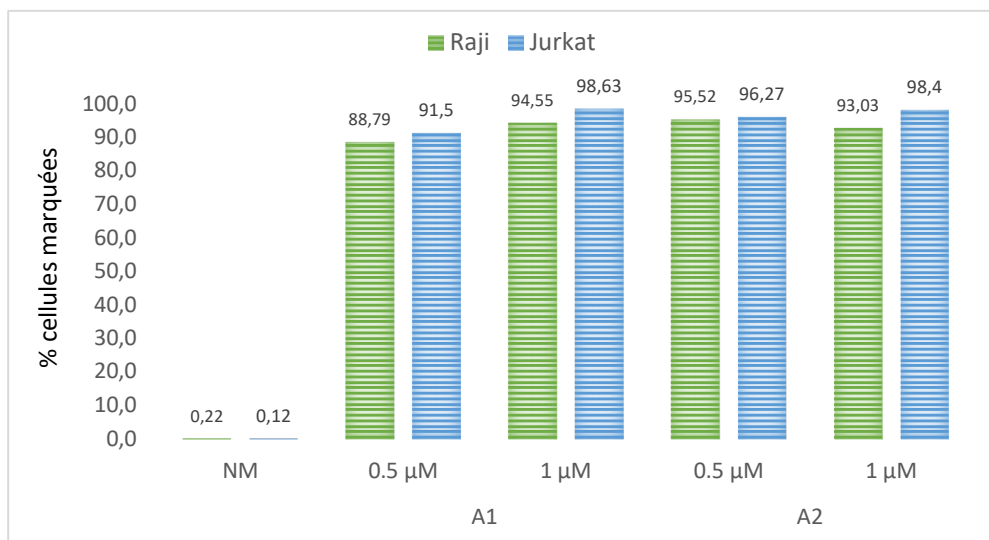


Figure 61 : Résultats obtenus à l'issue d'une analyse de CmF des aptamères 1 et 2 dans le tampon PBS en présence de 250 000 cellules par tube à 25°C.

La densité en CD20 sur les cellules Raji étant de 300/ μ m² le nombre de copie de CD20 a été estimé à environ 40 000 par cellule soit un total de $2 \cdot 10^{10}$ pour 500 000 cellules. Le nombre de molécules d'aptamères à une concentration de 0,5 μ M pour un volume de 50 μ l lors de l'incubation est de $1,5 \cdot 10^{13}$. Il n'est donc pas surprenant d'observer une saturation des sites d'interaction et ainsi une augmentation de la non-spécificité lorsque le nombre de cellules diminue ou que la concentration en aptamères augmente.

IV.4.4 Impact de la température sur l'interaction aptamères-cellules.

Le dernier paramètre qui a été étudié est la température. Dans le cadre d'utilisation de cellules, certains mécanismes cellulaires ainsi que le processus d'internalisation peuvent être inactivés en fonction de la température.²⁶³ Une étude à 4°C permet d'inhiber la plupart de ces mécanismes mais peut également avoir un impact sur la viabilité des cellules. L'impact de la température se ressent également sur les paramètres thermodynamiques.^{258,264}

Les résultats obtenus (Figure 62 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) ne mettent pas en évidence un quelconque intérêt à diminuer la température à une concentration en aptamères de 0,5 µM, ni en terme d'intensité de fluorescence, ni en terme de pourcentage de cellules marquées. On observe une meilleure spécificité à 25°C pour l'Apt°1 et peu de différence pour l'Apt°2.

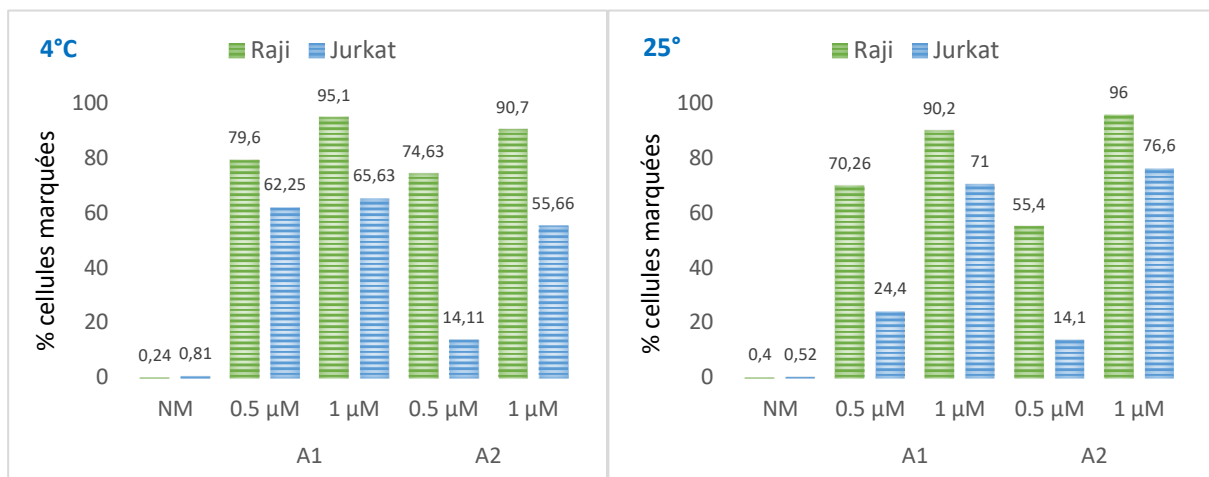


Figure 62 : Résultats obtenus à l'issue d'une analyse de CmF des aptamères 1 et 2 dans le tampon PBS. Comparaison entre à gauche : Incubation à 4°C et à droite : Incubation à 25°C

IV.4.5 Résumé des conditions retenues.

Au final, les différents paramètres choisis sont résumés ci-dessous :

- Tampon PBS (pH 7,4) et T° = 25°C ,
- Concentration en aptamères = 0,5 µM
- 500 000 cellules par tube,
- Un seul lavage post culture cellulaire et un second lavage post incubation,
- Une vitesse de centrifugation réduite à 2000 rpm

IV.4.6 Comparaison en présence de version scramble des aptamères

Pour confirmer les résultats obtenus, deux aptamères scrambles (un pour chaque aptamère) ont été conçus puis testés dans les mêmes conditions afin de confirmer la spécificité des séquences dans l'interaction. Les séquences et structures des aptamères natifs et scramble seront discutés et comparés au Chapitre IV (faire un renvoi après fusion des docs). Dans le cadre de cette analyse, l'étape de préparation des cellules consistant en une décongélation des souches suivie de quelques cycles de réplication n'a pu être effectuée que peu de temps avant l'analyse, conduisant à un pourcentage important de cellules non viables. Cette observation peut être reliée à la spécificité plus faible de nos aptamères pour la lignée Raji obtenue lors de cette analyse. Toutefois, les résultats observés en Figure 63 démontrent une différence significative d'interaction entre les aptamères et les différentes lignées, permettant de conclure sur la comparaison aptamères / aptamères scrambles. L'aptamère 1 se démarque de son scramble par une intensité de fluorescence trois fois supérieure ainsi qu'une spécificité plus importante. Au contraire l'aptamère 2 et sa version scramble donnent des résultats similaires, signifiant que la séquence 2 n'est peut-être pas spécifique. Il sera toutefois nécessaire de réitérer l'analyse pour confirmer cette tendance.

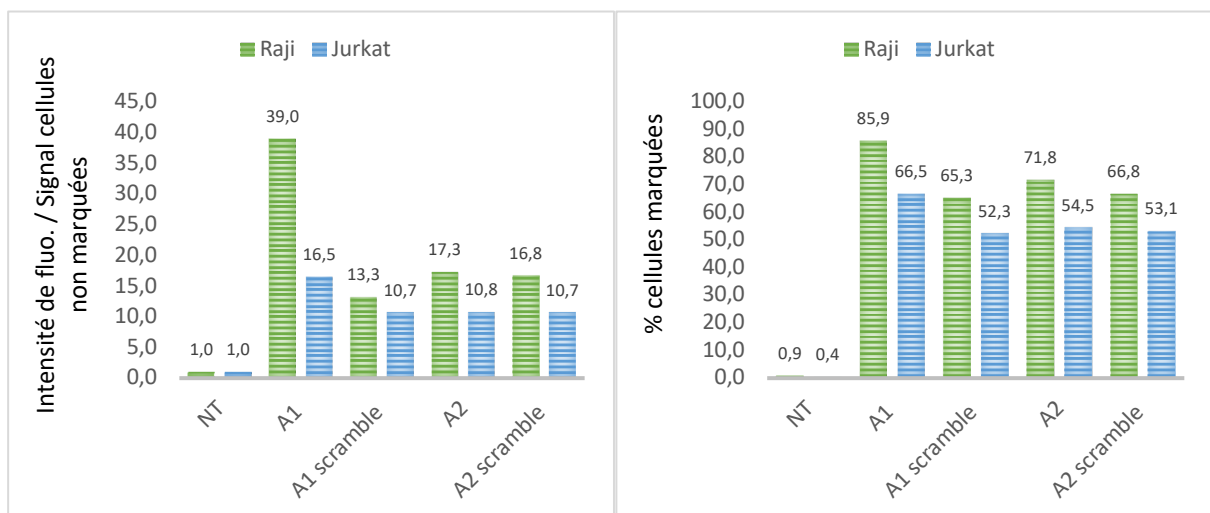


Figure 63 : Résultats obtenus à l'issue d'une analyse de CmF des aptamères 1 et 2 en comparaison avec leurs versions scrambles (0,5 µM) dans le tampon PBS en présence de 500 000 cellules par tube à 25°C.

IV.4.6.1 Conclusion des tests CmF

D'après les expériences menées dans ces conditions, on observe une spécificité de nos aptamères pour la lignée Raji (70 et 90 % de cellules marquées) par rapport à la lignée Jurkat (15-30%) et une intensité de fluorescence globale 2 ou 3 fois supérieure pour la lignée Raji. Toutefois, nous observons, ce qui est souvent le cas pour les manipulations avec des cellules vivantes, une variabilité au niveau des résultats. Ces expériences nécessiteraient d'être renouvelées. Enfin, la dernière analyse effectuée semble montrer que seul l'aptamère 1 est spécifique par rapport à sa version scramble. Les scrambles n'ayant été injectés qu'une seule fois en CmF, il sera également nécessaire de reconduire l'analyse pour confirmer cette observation.

V. Conclusion

A partir du processus de séquençage, 5 candidats ont pu être isolés et caractérisés dans un premier temps par électrophorèse capillaire. Parmi ces 5 candidats, deux ont montré une affinité pour le fragment fC20 ainsi qu'une spécificité significative par rapport au fCD20 scramble. Dans l'optique de confirmer ces résultats, des analyses *via* des méthodes de surface ont été initiées. Une caractérisation en solution par titration calorimétrique isotherme a permis de confirmer les résultats obtenus en CE ainsi que d'obtenir des premières constantes d'affinité de l'ordre du μM . Des tests *in cellulo* ont permis dans un deuxième temps de caractériser l'affinité aptamère-CD20 directement à la surface de la cellule. De nombreuses étapes d'optimisation ont été nécessaires et permettront dans un futur proche une meilleure caractérisation. Toutefois, il convient encore de reproduire les dernières analyses effectuées pour confirmer ces résultats.

En parallèle de ces étapes de caractérisation, nous nous sommes intéressés à la structure secondaire de nos aptamères dans l'optique de réduire la longueur des séquences. L'objectif étant à terme de limiter les coûts de production ainsi que de réduire le poids moléculaire total, notamment dans notre démarche de développement de composés multivalents.

Chapitre IV

Optimisation des séquences et formation de systèmes divalents

La dernière partie de ce projet s'articule autour de la formation de systèmes multivalents, comportant d'une part une molécule fluorescente ou un composé cytotoxique et de l'autre les éléments de reconnaissance anti-CD20. Pour arriver à cet objectif, il est préférable d'utiliser des aptamères tronqués. En effet, l'utilisation et donc l'association d'aptamères de 77 bases (poids moléculaire > 20 kDa) conduirait au développement de composés de masses molaires trop importantes. De plus, la production d'oligonucléotides de cette longueur souffre de faibles rendements de synthèse. Le développement de séquences plus courtes a donc été initié. Les structures secondaires des aptamères 1 et 2 ont donc été simulées *in silico*, dans l'optique d'identifier les principales structures 2D formées au sein d'un brin, généralement plus impliquées dans la reconnaissance de la cible. Ces séquences, fragments issus des aptamères natifs, ont ensuite été caractérisés *in vitro* par CE puis par ITC. Les résultats obtenus sont résumés dans la première partie de ce chapitre.

Par la suite, la synthèse des différents éléments nécessaires à l'assemblage de systèmes multivalents a été initiée. Ces éléments constitutifs sont des aptamères et des peptides fonctionnalisés. Des premiers essais de formation de complexes bivalents ont ensuite été menés. Ces synthèses serviront de résultats préliminaires pour la continuité du projet.

I. Conception de fragments à partir des Apta°1 et Apta°2

En parallèle des caractérisations effectuées pour les Apta°1 et Apta°2, nous nous sommes intéressés aux potentiels repliements adoptés par ces deux oligonucléotides, dans des conditions proches de celles utilisées lors de ce projet. L'objectif a été de déterminer *via* la structure 2D de chacun, les motifs potentiellement impliqués dans l'interaction avec la cible. Dans le cadre de la formation de systèmes multivalents à terme, un raccourcissement des séquences pourrait avoir une forte incidence sur les coûts de production ainsi que le poids moléculaire du composé final. La formation de mimes en serait probablement simplifiée également du fait d'un encombrement stérique moins important.

Comme décrit précédemment, au cours de la sélection, les 10¹⁸ séquences composant statistiquement notre banque d'oligonucléotides possèdent des régions constantes de 23 et 24 nucléotides, aux deux extrémités. Comme expliqué au Chapitre 1 partie IV. 4, Les extrémités des parties constantes de l'aptamère sont supposées moins structurées et ainsi

moins impliquées dans l'interaction avec la cible. Cette hypothèse s'est vérifiée lors d'études computationnelles décrite dans la suite de ce manuscrit. Ces régions sont donc généralement le point de départ du raccourcissement d'un aptamère.

I.1.1 Principe général de la simulation *in silico* effectuée *via* le logiciel « mfold »

La simulation a été effectuée *via* le serveur web « UNAFold » qui regroupe diverses applications permettant la prédiction de structures 2D des acides nucléiques.^{265,266} Le logiciel « mfold » qui a été utilisé pour ce projet, se base sur les travaux effectués par SantaLucia *et al.* autour des paramètres thermodynamiques des oligonucléotides,²⁶⁷ tels que les variations d'enthalpie libre (ΔG). Lors d'une simulation, différents repliements « préférentiels » sont calculés et proposés. Bien que cela ne soit que des modèles théoriques, la récurrence ou au contraire la variabilité de certains motifs entre les prédictions permet d'identifier des structurations prédominantes et donc plus probables. Les calculs dépendent de différents paramètres modulables tels que la température ou la concentration en sels du milieu.

I.1.2 Simulation des structures 2D théoriques de l'Apta°1 et identification de fragments

Pour débiter les prédictions, la structure secondaire de l'Apta°1 (Figure 64) a été calculée dans les conditions suivantes : Concentration en $[Na^+] = 0,1 M$, $[Mg^{2+}] = 0,01 M$; $T^\circ = 25^\circ C$.

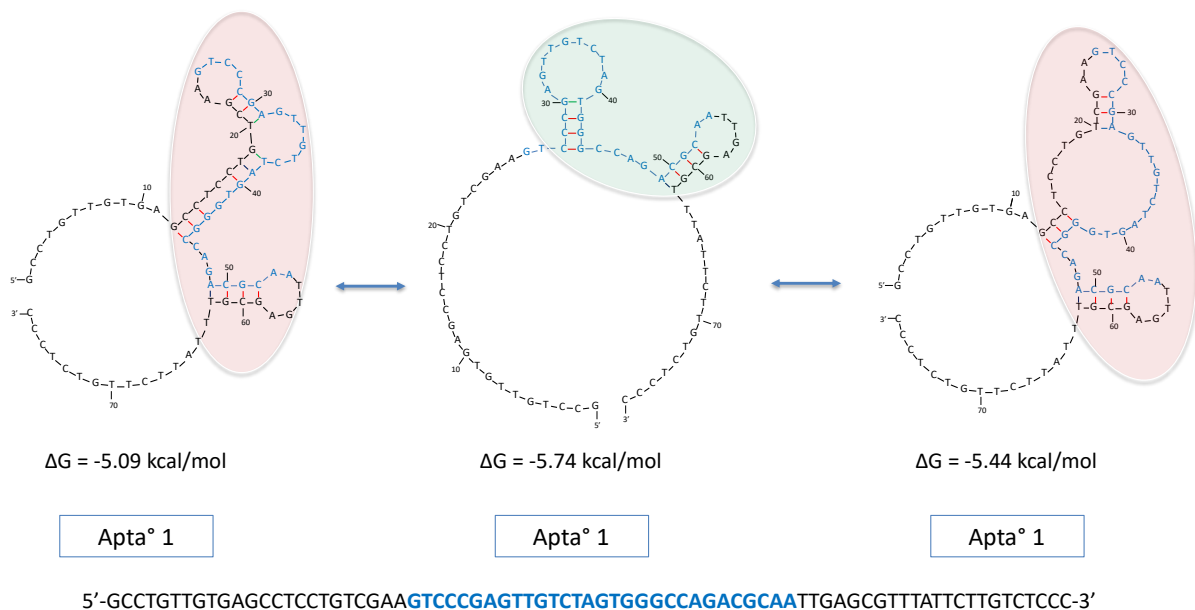


Figure 64 : Prédiction des structures 2D adoptées préférentiellement par l'Apta°1 via le logiciel mfold. En bleu est représentée la partie variable de la séquence par rapport à la banque initiale.

Au total, trois structures possibles ont été identifiées. Comme supposé, les extrémités 3' et 5' ne semblent pas totalement impliquées dans le repliement et pourraient donc faire l'objet de troncatures. Parmi ces trois modèles, nous avons pu déterminer 2 fragments de respectivement 51 et 36 nucléotides. Ces séquences sont cerclées de rouge (51b) pour les deux modèles aux extrémités, et de vert (36b) pour le modèle central (Figure 64).

Ces fragments potentiels ont donc à leur tour fait l'objet de simulations (Figure 65) dans les mêmes conditions, permettant d'identifier la récurrence de structurations au niveau de la séquence de 36 bases, pour chacun des modèles ci-dessous. Les Fragments ont ainsi été nommé **Apta°1-F1** et **Apta°1-F2**.

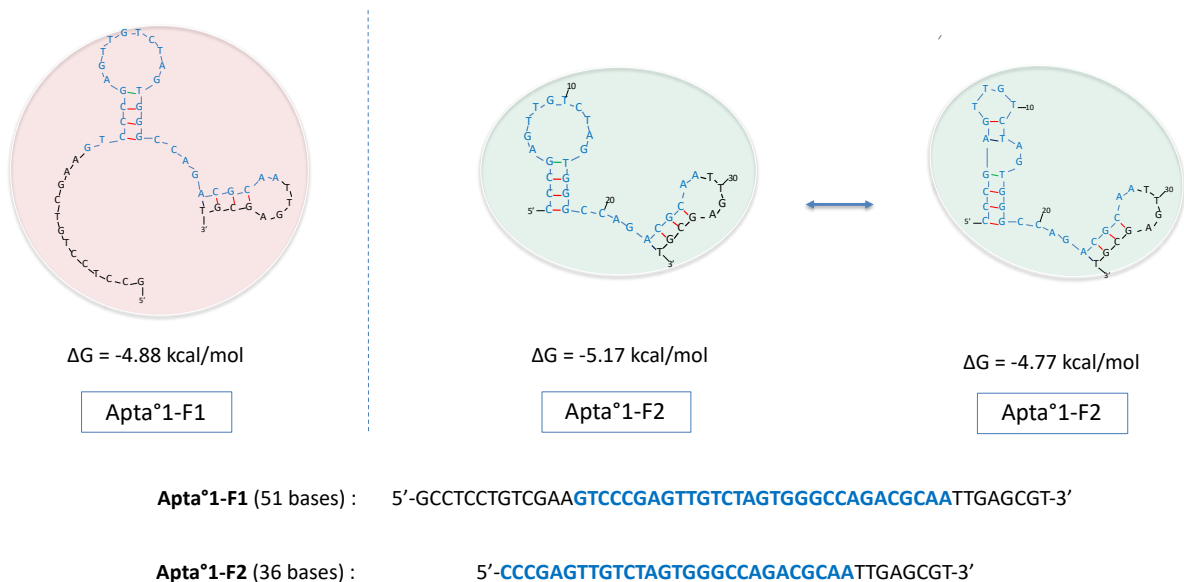


Figure 65 : Prédiction des structures 2D adoptées préférentiellement par les fragments issus de l'Apta°1 via le logiciel mfold. En bleu est représentée la partie variable de la séquence par rapport à la banque initiale.

I.1.3 Simulation des structures 2D théoriques de l'Apta°2 et identification de fragments.

La même étude a ensuite été menée, cette fois-ci sur la structure secondaire de l'Apta°2 (Figure 66) dans des conditions identiques. Au total, une fois encore, trois structures possibles ont été identifiées. Les conclusions tirées de cette prédiction sont similaires : les extrémités 3' et 5' ne semblent pas totalement impliquées dans le repliement et pourraient donc faire l'objet de troncatures. Parmi ces trois modèles, on peut isoler une séquence de 48 nucléotides (représentée en jaune), qui semble majoritairement structurée.

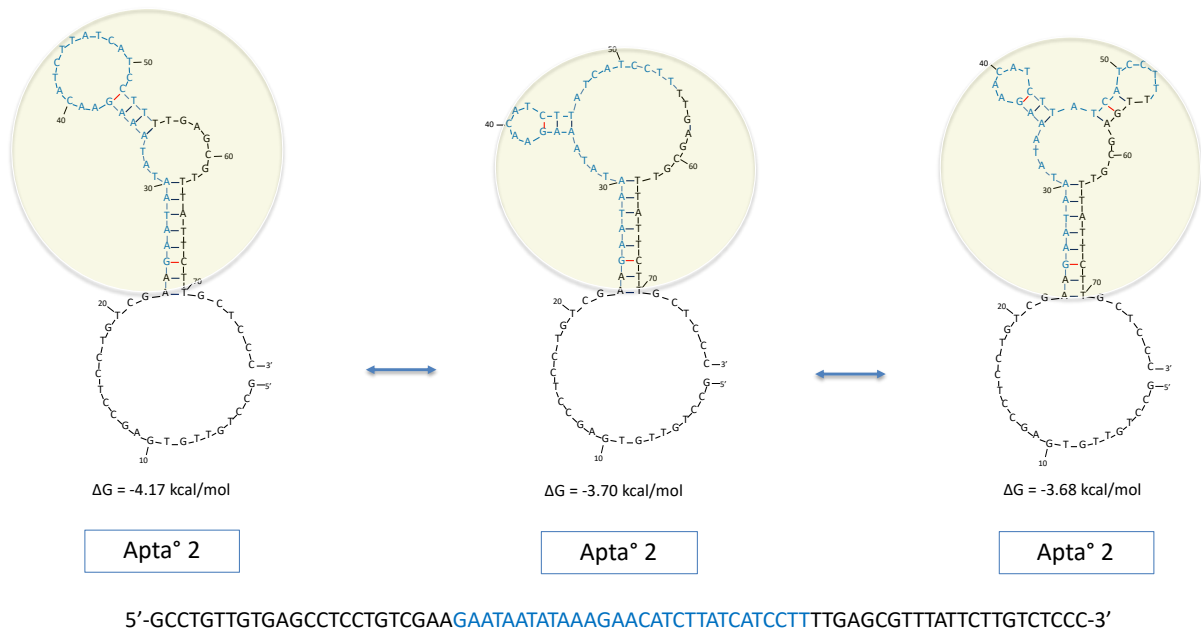


Figure 66 : Prédiction des structures 2D adoptées préférentiellement par l'Apta°2 via le logiciel mfold. En bleu est représentée la partie variable de la séquence par rapport à la banque initiale.

Ce fragment potentiel a donc ensuite fait l'objet d'une simulation (Figure 67) dans les mêmes conditions. On observe les trois mêmes motifs que pour la séquence de 77 nucléotides. Ce fragment a ainsi été sélectionné et nommé **Apta°2-F1**.

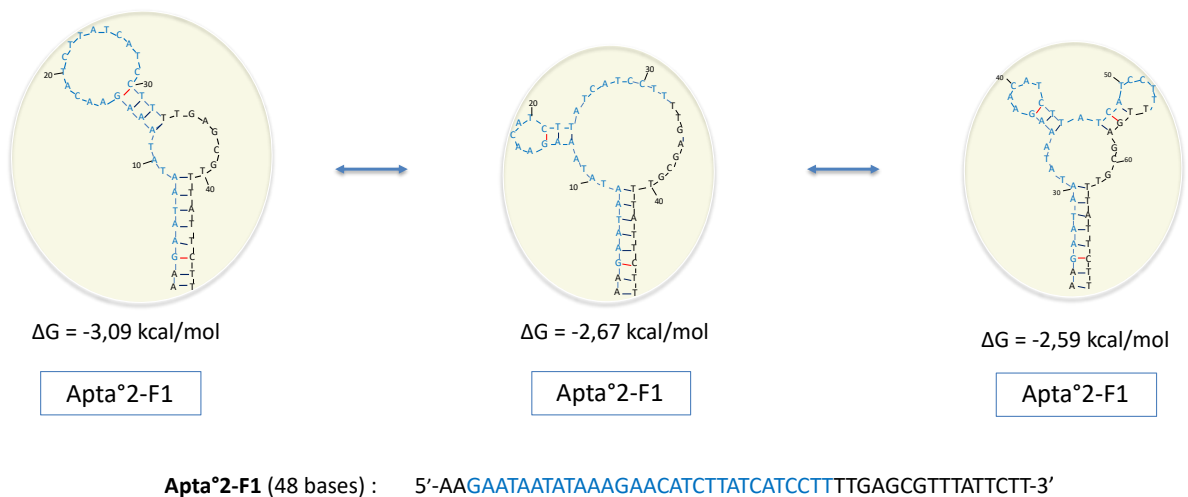
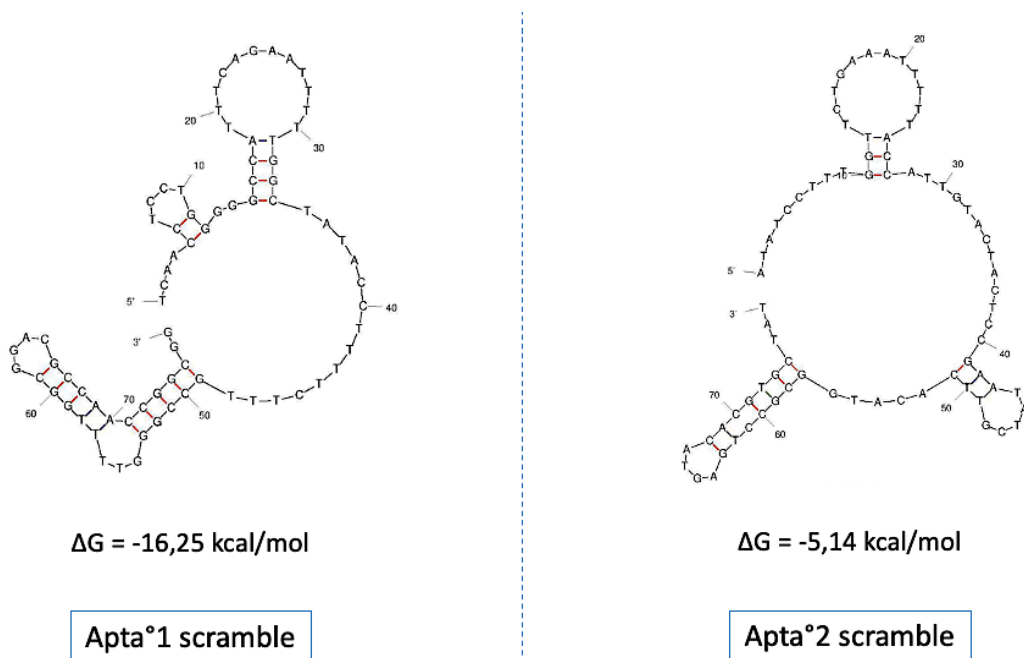


Figure 67 : Prédiction des structures 2D adoptées préférentiellement par les fragments issus de l'Apta°2 via le logiciel mfold. En bleu est représentée la partie variable de la séquence par rapport à la banque initiale.

I.1.4 Simulation des structures 2D théoriques des Apta°1 et Apta°2 scrambles

Comme décrit précédemment, dans le cadre des tests *in cellulo*, des versions scrambles (bases identiques dans un ordre différent) ont été conçues pour les Apta°1 et Apta°2. Ces contrôles ont été pensés pour ne pas contenir de motifs similaires à ceux de la partie variable des Apta°1 et 2. Leurs structures secondaires ont donc également été étudiées pour identifier les possibles repliements et les comparer avec les aptamères natifs. Les conditions utilisées sont identiques à celles décrites précédemment. Au final, une seule structure a été identifiée pour chaque scramble (

Figure 68).



Apta°1 scbl : 5'-TCAACCTCTGGGGGCCATTTAGAAATTTTTGGCTATACCTTTTCTTTGCCGGGTTTTGGCGGACGCCAACCGCGG-3'

Apta°2 scbl : 5'-ATATCCTTTGGTTCTGAAATTTTTACCATTGTACTACTCCGAATATCGTTCACATGGCGCCTGAGTACACGTGCTAT-3'

Figure 68 : Prédiction des structures 2D adoptées préférentiellement par l'Apta°1 scbl (à gauche) et l'Apta°2 scbl (à droite) via le logiciel mfold.

Ces simulations, bien qu'assez structurées, ne sont pas similaires à celles adoptées pour les aptamères natifs, notamment par le fait que les extrémités forment plusieurs motifs tige-boucles ou boucles internes. Leur utilisation en tant que contrôle négatif, lors des tests sur cellules, permet donc de contrôler l'implication dans la reconnaissance des motifs observés pour les Apta°1 et Apta°2 ainsi que leurs fragments.

II. Caractérisations *in vitro* des interactions fragments-fCD20

Une fois les trois fragments identifiés, ceux-ci ont été caractérisés *in vitro* selon le même processus que les aptamères natifs, à savoir une première caractérisation par fluorescence en CE suivie d'une caractérisation plus sensible par ITC.

II.1.1 Caractérisation *in vitro* des interactions fragments-fCD20 par CE

Les fragments ont donc tout d'abord été injectés seuls, puis en présence de cible ou du scramble, dans des conditions identiques à celles de la sélection par CE. Pour chaque fragment, des injections successives ont été effectuées à $t = 30, 40, 60$ et 120 minutes après préparation du mix. L'ADN a donc tout d'abord été injecté à une concentration de 10 nM , sans ajout de cible, en tant que référence. Ensuite des mélanges cible-fragment ou scramble-fragment ont été injectés avec la même concentration en ADN et $50 \mu\text{M}$ en peptide. Les interactions ont été déterminées par la diminution de l'intensité de fluorescence de la fraction libre d'ADN en comparaison avec la référence. Les résultats obtenus sont illustrés en Figure 69 Figure 70 et Figure 71 pour les fragments **Apta°1-F1**, **Apta°1-F2** et **Apta°2-F1** respectivement.

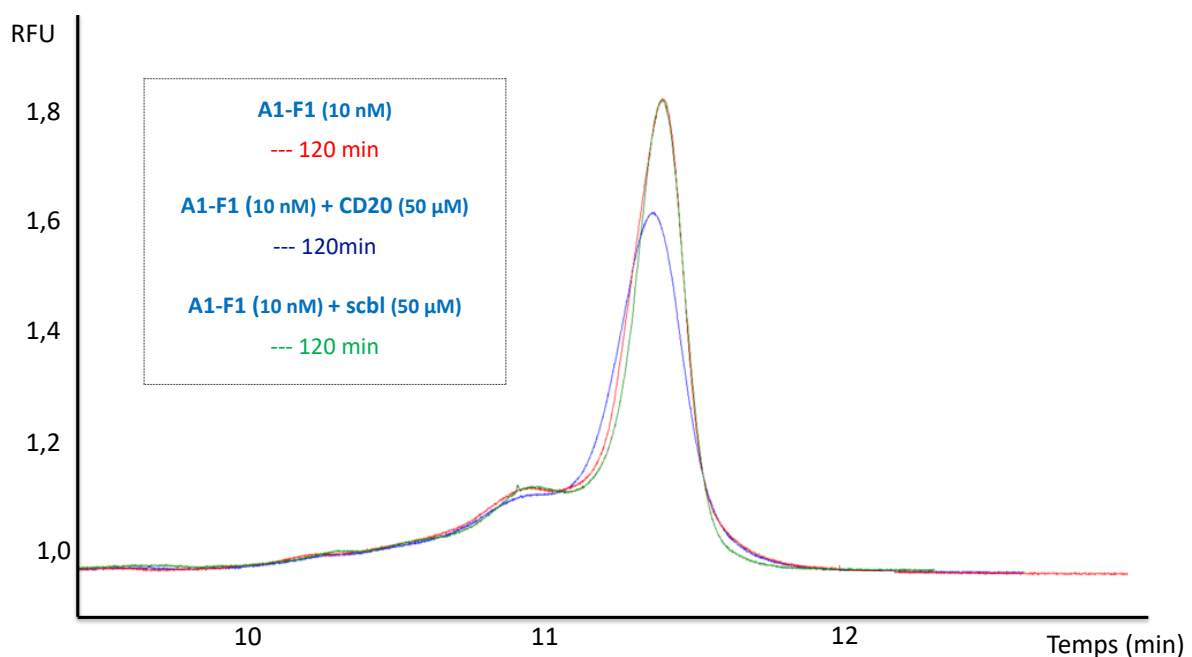


Figure 69 : Superposition des électrophérogrammes obtenus lors de la caractérisation du fragment Apta°1-F1. Conditions : cf partie expérimentale I. 1.

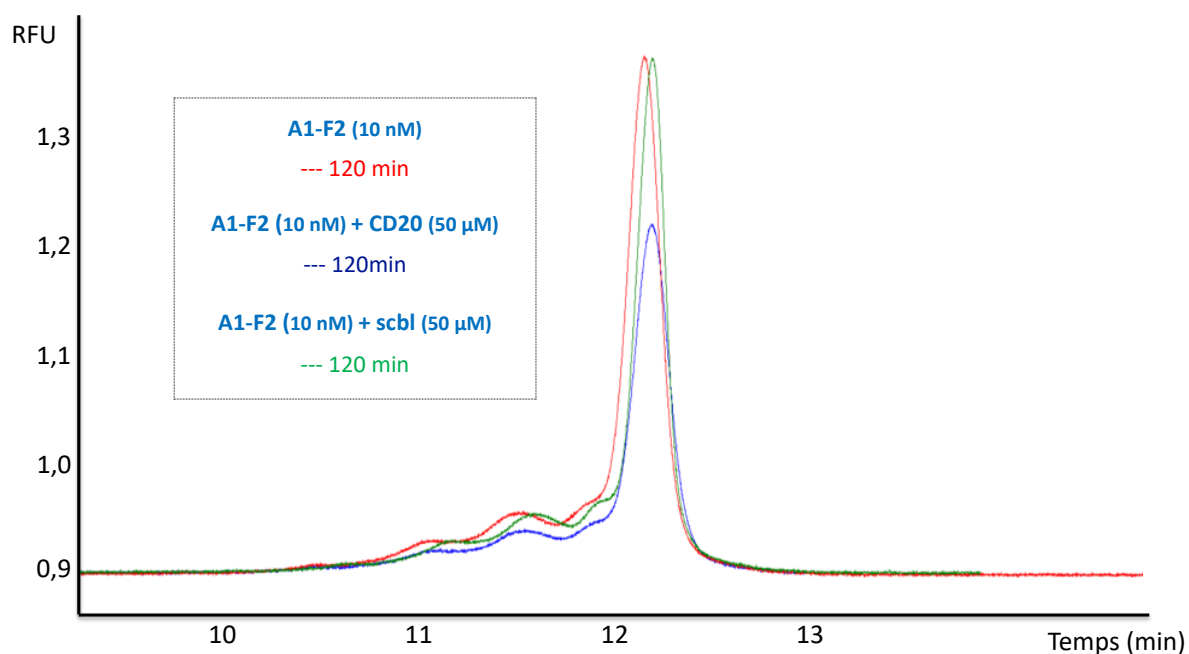


Figure 70 : Superposition des électrophérogrammes obtenus lors de la caractérisation du fragment Apta°1-F2. Conditions : cf partie expérimentale I. 1.

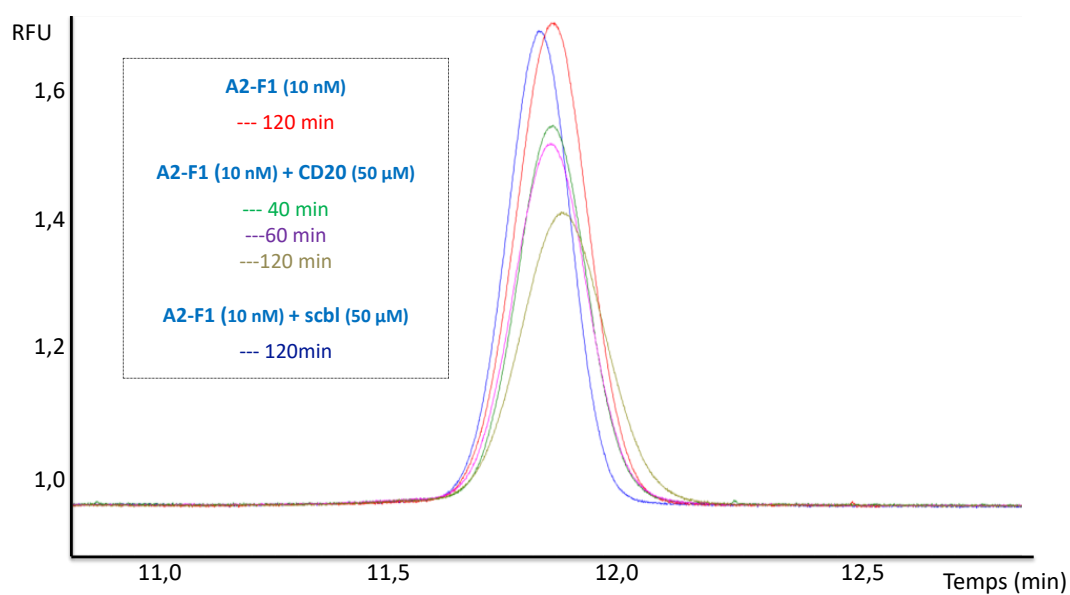


Figure 71 : Superposition des électrophérogrammes obtenus lors de la caractérisation du fragment Apta°2-F1. Conditions : cf partie expérimentale I. 1.

Les trois fragments ont démontré une interaction avec le fCD20. Pour les fragments issus de l'Apta°1, la diminution de la fraction libre a été observée dès la première injection effectuée 30 minutes après l'incubation et n'a plus évolué ensuite. Pour le fragment Apta°2-F1, une cinétique plus lente a pu être observée dans les conditions de l'analyse. Toutefois, pour les 3 fragments en présence de scramble, aucune interaction n'a pu être observée. Néanmoins, comme précisé précédemment, bien que les conditions utilisées (TGK à pH = 8,3) aient été optimales pour la sélection en CE, des analyses effectuées à pH physiologique présentent un plus grand intérêt pour de futures applications *in cellulo*. Ces premières analyses par CE ont donc un rôle d'indicateur des interactions ligand-cible sans pour autant permettre de déterminer précisément des constantes cinétiques ou thermodynamiques. Des tests par ITC ont donc été menés en parallèle.

II.1.2 Caractérisation *in vitro* des interactions fragments-fCD20 par ITC

Les caractérisations par ITC ont été effectuées dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre 3 partie III.3.1. Les résultats sont illustrés par les Figure 72, Figure 73 Figure 74 (pour les fragments Apta°1-F1, Apta°1-F2 et Apta°2-F1 respectivement) et résumés dans le Tableau 19. Les mêmes résultats ont été observés pour les fragments issus de l'Apta°1 et Apta°2 : Les affinités avec le fCD20 sont plus faibles lorsque la longueur des séquences diminue. On observe cependant une variation de la stœchiométrie qui semble augmenter au fur et à mesure que les séquences sont raccourcies, allant de 0,76 à 1,10 pour l'Apta°1 et ses fragments et de 1,01 à 1,46 pour l'Apta°2 et son fragment. Cela peut probablement s'expliquer par un encombrement stérique plus faible. Toutefois, la spécificité reste élevée par rapport au fCD20 scramble. Ces aptamères tronqués présentent donc un intérêt pour la formation de composés multivalents.

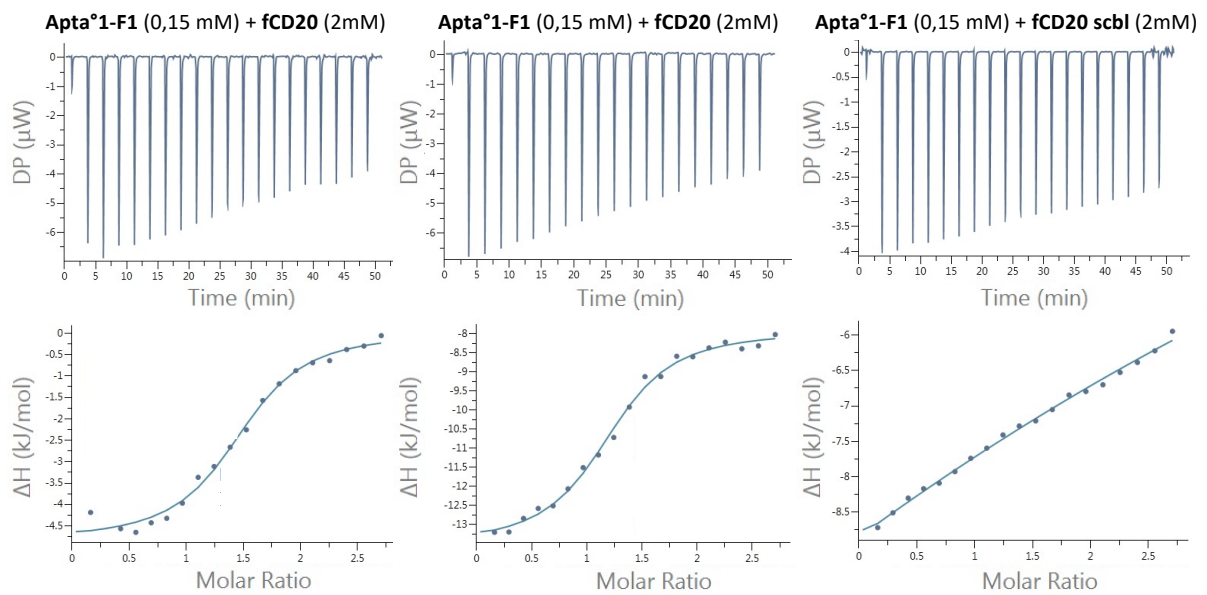


Figure 72 : Résultats bruts obtenus via les caractérisations par ITC pour le fragment Apt α 1-F1, dans le tampon TKG à pH = 7,3. Pour chaque analyse : En haut : thermogrammes bruts sans soustraction du blanc (non réalisable sur le logiciel). En bas : « fit » obtenus selon un modèle d'interaction simple (1 :1).

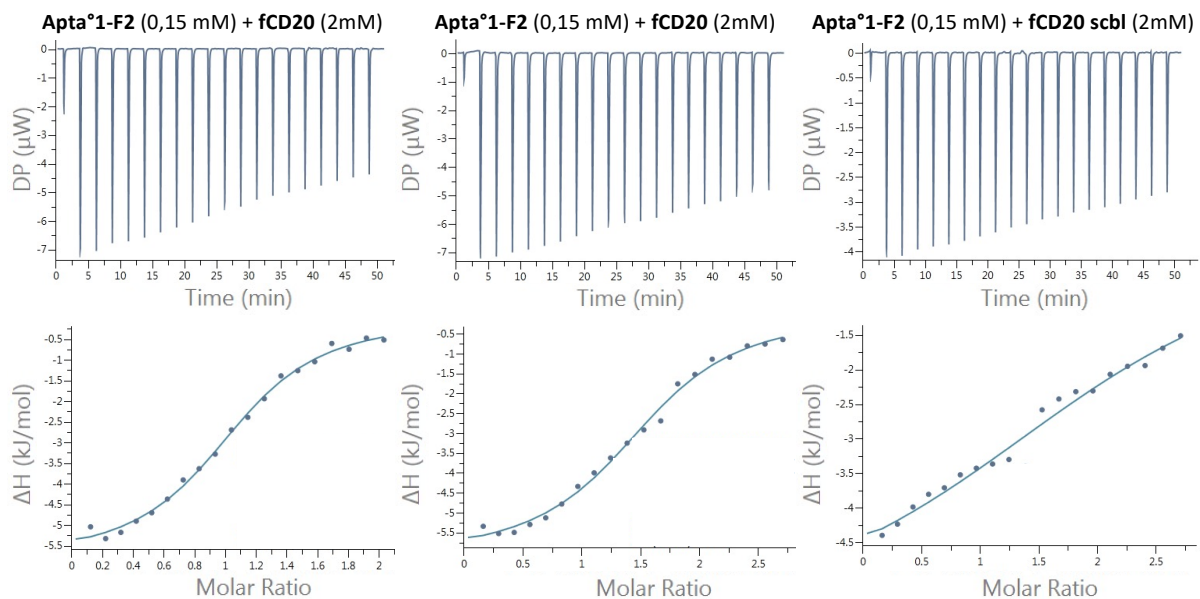


Figure 73 : Résultats bruts obtenus via les caractérisations par ITC pour le fragment Apt α 1-F2, dans le tampon TKG à pH = 7,3. Pour chaque analyse : En haut : thermogrammes bruts sans soustraction du blanc (non réalisable sur le logiciel). En bas : « fit » obtenus selon un modèle d'interaction simple (1 :1).

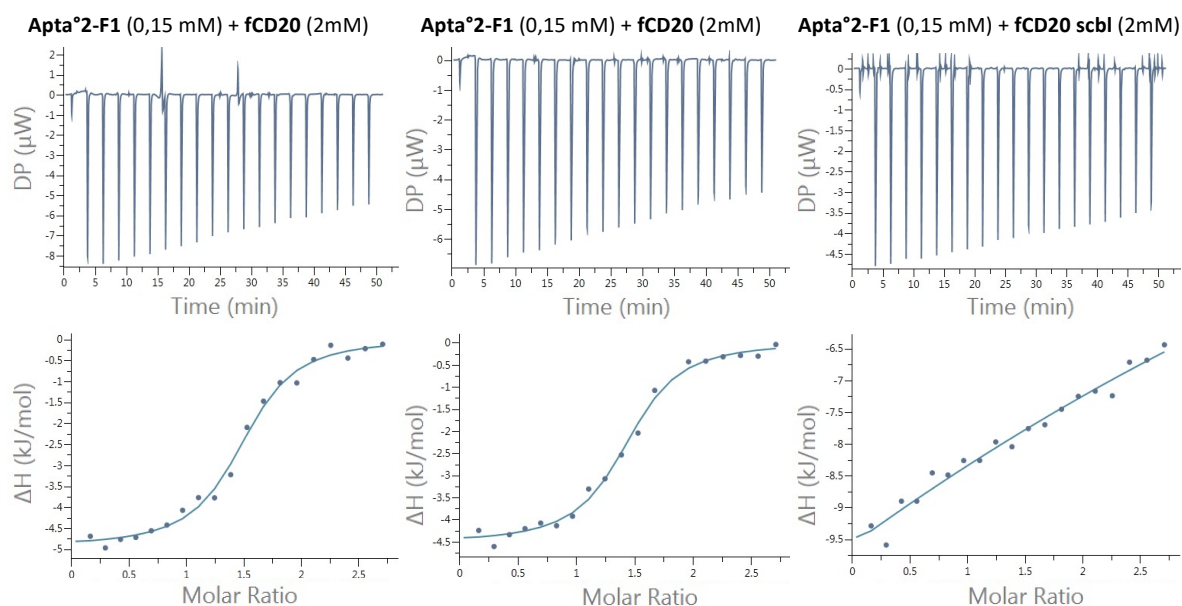


Figure 74 : Résultats bruts obtenus via les caractérisations par ITC pour le fragment Aptamers 2-F1, dans le tampon TGK à pH = 7,3. Pour chaque analyse : En haut : thermogrammes bruts sans soustraction du blanc (non réalisable sur le logiciel). En bas : « fit » obtenus selon un modèle d'interaction simple (1 :1).

Tableau 19 : Récapitulatif des caractérisations par ITC pour les fragments d'aptamères dans le TGK (pH= 7,3).

Analyte	+ fCD20			+ fCD20 scbl		
	K_D (μ M)	N (sites)	c	K_D (μ M)	N (sites)	c
Aptamers 1-F1 (51b)	$9,0 \pm 2,4$	$0,88 \pm 0,02$	14,7	> mM	N/D	N/D
Aptamers 1-F2 (36b)	$18,9 \pm 3,3$	$1,07 \pm 0,03$	8,5	> mM	N/D	N/D
Aptamers 2-F1 (48b)	$5,5 \pm 1,3$	$1,46 \pm 0,03$	39,8	> mM	N/D	N/D

Ces premiers tests *in vitro* ont eu pour objectif principal de contrôler la bonne spécificité de nos fragments pour le fCD20. Des tests *in cellulo* par CmF ont ensuite été nécessaires pour évaluer pleinement l'impact de la longueur de la séquence sur l'affinité et la spécificité.

III. Caractérisation *in cellulo* via CmF des interactions fragments-CD20

Dans l'optique de confirmer les observations précédentes, des études comparatives entre les aptamères et leurs fragments ont été menées dans des conditions similaires à celles déterminées dans le Chapitre 3 partie IV. Ces analyses ont été effectuées en parallèle de celles

décrites en partie IV.4.6. Les résultats sont illustrés en Figure 75 pour l'Apta°1 et ses fragments et Figure 76 pour l'Apta°2 et son fragment.

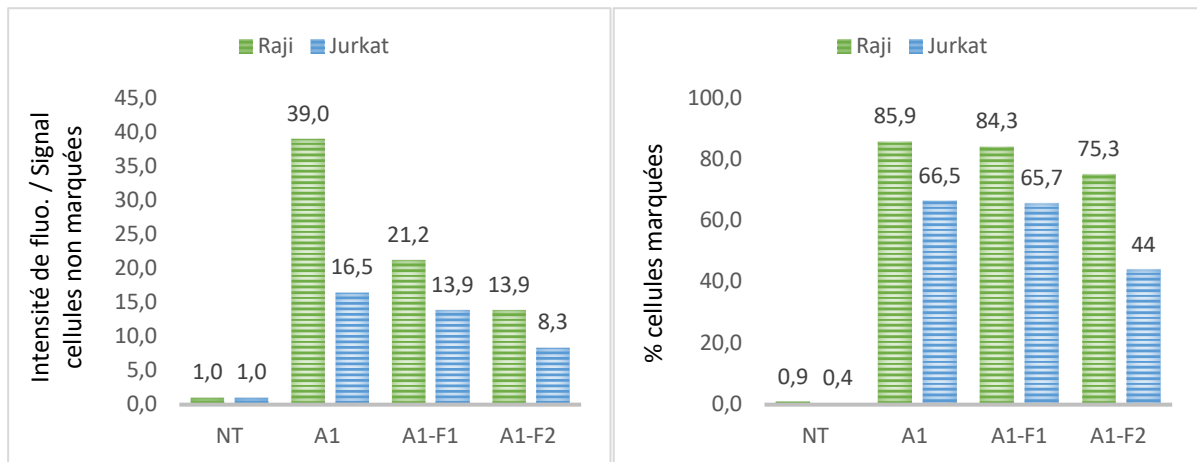


Figure 75 : Résultats obtenus à l'issue d'une analyse de CmF de l'Apta°1 en comparaison avec les fragments Apta°1-F1 et Apta°1-F2 (0,5 µM) dans le tampon PBS en présence de 500 000 cellules par tube à 25°C ; n= 1.

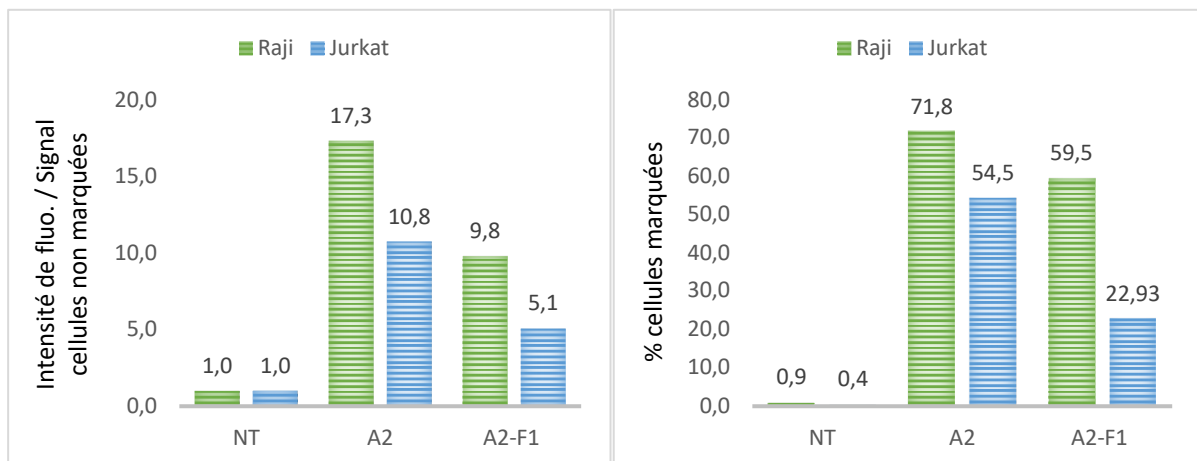


Figure 76 : Résultats obtenus à l'issue d'une analyse de CmF de l'Apta°2 en comparaison avec les fragments Apta°2-F1 (0,5 µM) dans le tampon PBS en présence de 500 000 cellules par tube à 25°C ; n= 1..

Dans le cas des fragments Apta°1-F1 et Apta°1-F2, on observe une diminution de l'intensité de fluorescence par rapport à l'Apta°1, qui semble proportionnelle à la diminution de la longueur des séquences. Pourtant, le pourcentage de cellules positives ne semble que peu affecté sur la lignée Raji. La spécificité par rapport à la lignée Jurkat semble même plus importante sur le fragment le plus court.

Des résultats similaires sont observés en comparant le fragment Apta°2-F1 et l'Apta°2. La spécificité semble plus importante pour le fragment, le nombre de cellules marquées diminue légèrement mais l'intensité de fluorescence diminue de moitié.

Le fait que l'intensité de fluorescence diminue significativement lorsque la longueur des aptamères est réduite sans que ce soit proportionnel au nombre de cellules marquées donne lieu à plusieurs hypothèses :

Une première hypothèse serait que les cellules considérées comme marquées car ayant une intensité de fluorescence plus importante que la population non-traitée, interagiraient avec un nombre plus faible de fragments que d'aptamères. Les résultats de stœchiométries obtenus *in vitro* par ITC ne semble pas aller dans le sens de cette possibilité.

Une seconde hypothèse serait que la diminution de la longueur du brin, conduisant à une proximité plus importante entre les fluorophores et la membrane cellulaire, induise une extinction de fluorescence (« quenching »). Lors du développement de sondes fluorescentes, la longueur du ligand est un paramètre primordial pour limiter ou favoriser ce phénomène de quenching.²⁶⁸ Dans notre cas, lors de l'élaboration des structures 2D présentées précédemment pour les fragments, nous avons privilégié la troncature de régions plutôt linéaires des aptamères natifs, limitant ainsi probablement la distance entre le fluorophore et la cellule. Bien que nous ne puissions pas affirmer avec certitude quels composants de la membrane cellulaire pourraient être impliqués dans ce phénomène, une extinction de fluorescence reste probable au vue de la complexité des cellules. Enfin, la structure des fragments étant plus contrainte, il est possible qu'un phénomène de quenching directement par l'ADN soit observé, de part une possible encapsulation du fluorophore au sein de la structure 3D.

Conclusion : L'étude des structures secondaires de nos deux aptamères a permis de mettre en évidence 3 fragments **Apta°1-F1**, **Apta°1-F2** et **Apta°2-F1**. Ces fragments caractérisés *in vitro* par CE et ITC, ont montré une interaction plutôt spécifique pour le peptide cible par rapport à son scramble malgré une affinité plus faible. Les premiers tests *in cellulo* sont encourageants car malgré une baisse d'intensité de fluorescence globale, la spécificité par rapport à la lignée cellulaire n'exprimant pas le CD20 semble augmenter lorsque la séquence est raccourcie. Ces fragments présentent donc un intérêt pour de futures expérimentations, notamment un premier essai de synthèse de composés multivalents.

IV. Synthèse de cyclo-peptides en tant que châssis moléculaires

Comme décrit dans le chapitre 1, que ce soit pour des fragments issus des anticorps, des peptides ou des aptamères, la multimérisation permet généralement une meilleure affinité et spécificité avec la cible ainsi qu'une amélioration de la demi-vie des composés dans l'organisme. Pour permettre l'assemblage de tels systèmes macromoléculaires, le choix des ligations est primordial.

IV. 1. Choix des ligations chimioselectives

Le développement de ligations chimioselectives est actuellement un des enjeux majeurs de la chimie bio-organique, puisqu'elles permettent l'assemblage de macromolécules complexes, notamment pour l'utilisation de peptides et protéines.^{269,270} Parmi ces ligations, on retrouve le concept de chimie « click », introduit par Sharpless et al. dès 2001.²⁷¹ Une réaction qualifiée ainsi doit répondre à plusieurs critères : (1) La réaction doit être chimioselective, rapide et associée à des rendements élevés, (2) La réaction doit être effectuée dans des conditions simples, dans des solvants non toxiques ou facilement éliminables. L'eau est idéalement utilisée comme solvant, (3) La transformation chimique ne doit donc être sensible ni à l'oxygène, ni à l'eau, (4) Le produit formé doit être stéréospécifique et stable en conditions physiologiques, (5) La réaction ne doit pas conduire à la formation de sous-produits qui ne pourraient être éliminés sans usage de méthodes chromatographiques.

L'ensemble de ces critères permet ainsi une parfaite compatibilité avec l'utilisation de biomolécules.

Des ligations peptides-oligonucléotides ont déjà été étudiées au laboratoire, permettant de combiner jusqu'à quatre ligations sélectives orthogonales : La CuAAC (les cycloadditions 1,3 dipolaires avec catalyse au cuivre (I)), la ligation oxime, le couplage thiol-chloroacétamide et la ligation KAT (Potassium AcylTrifluoroborate). La combinaison de ces différentes ligations a permis l'assemblage de mimes stables de G4 et d'i-motif à topologies contrôlées.²⁷² Dans le cadre de ce projet, seuls deux types de ligation ont été envisagés : La CuAAC et la ligation oxime.

IV. 2. Synthèse des châssis cyclo-peptidiques

IV.2.1 Protocole de synthèse général

Les schémas de synthèse de chaque peptide sont détaillés en Figure 78-A, Figure 79-A, Figure 80-A et Figure 81-A.

Pour permettre la synthèse de composés multivalents, quatre châssis peptidiques ont été conçus. Leurs différences résident dans le nombre et la nature des ligations souhaitées et sont donc liées aux modifications effectuées sur certains acides aminés les composant. Le principe général reste cependant similaire pour chacun. Ces synthèses ont été effectuées par la méthode de SPPS sur une résine Sasrin pré-fonctionnalisée par une Fmoc-Glycine. Ensuite, la chaîne peptidique est allongée suivant la stratégie Fmoc/tBu. En fin de SPPS, les peptides linéaire **°b** (où « ° » représente les peptides **3**, **4**, **5** et **6**) sont détachés de la résine en milieu acide à l'aide d'une solution contenant le mélange acide trifluoroacétique (TFA) / DCM (1/99 v/v). Ces conditions permettent de récupérer les peptides sans éliminer les groupements protecteurs Boc (Tertio-butyloxycarbonyle) et Alloc (Allyloxycarbonyle). Ensuite, le peptide linéaire **°b** est cyclisé en milieu basique (pH 8-9) en présence de PyBOP comme agent de couplage. La cyclisation est effectuée en milieu dilué (10^{-3} M) dans le but d'éviter toute formation de liaisons peptidiques intermoléculaires et donc de favoriser une cyclisation intramoléculaire (formation de dimères et polymères indésirables). Lorsque cela est possible, la cyclisation s'effectue en C-terminal sur une Glycine, permettant d'éviter toute racémisation. Les groupements protecteurs Boc sont ensuite retirés du peptide cyclique **°c** en milieu acide à l'aide d'une solution contenant le mélange TFA / triisopropylsilane (TIS) / H₂O miliQ (95/2,5/2,5 v/v/v) donnant les composés **°d**. Les fonctions amine ε de chaque Lys-OH sont ensuite fonctionnalisées en Lys(éthoxyéthylidène-acide aminoxyacétique (Eei-Aoa)) par ajout de N-Hydroxysuccinimidyl (NHS) 2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetate (décrit en partie expérimentale) donnant les composés **°e**. Ce groupement protecteur Eei permet une meilleure conservation des oxyamines très réactives et présente l'avantage de s'éliminer en condition acides douces. Il est toutefois à noter que dans le cadre d'étapes de purification intermédiaires, un acide moins fort, l'acide formique (AF), substitue le TFA pour éviter la perte de ce groupement Eei. Le groupement protecteur Alloc est ensuite éliminé, permettant de

conserver une fonction amine ε libre sur la chaîne latérale d'une des lysines qui pourra par la suite être également fonctionnalisée par un fluorophore par exemple. Cette déprotection s'effectue en présence de $\text{Pd}^0(\text{PPh}_3)_4$ et d'un excès de Phénylsilane (PhSiH_3) donnant le composé **°f**. Une faible fraction (>1 mg) de chaque peptide a finalement été déprotégée en condition acide à l'aide d'une solution contenant le mélange acide trifluoroacétique (TFA) / triisopropylsilane (TIS) / H_2O miliQ (95/2,5/2,5 v/v/v) pour donner les composés finaux **3**, **4**, **5** et **6**. Les profils UV et spectres de masse ont été obtenus *via* UPLC-MS (ESI+) et sont présentés en Figure 78-B, Figure 79-B,

Figure 80-B et Figure 81-B, pour chacun des peptides. Ces châssis macromoléculaires seront par la suite fonctionnalisés par ajout d'ester activés Cy5 (Cy5 NHS ester) permettant la mise en place d'études *in vitro* (CE) et *in cellulo* (CmF), puis purifiés par HPLC préparative.

Ce sont donc quatre cyclo-peptides différents qui ont été conçus (Figure 77) visant à la synthèse de dimères (**3**), trimères (**4**) ou tétramères (**5**) permettant le greffage d'une seule séquence, ainsi qu'un dimère hybride (**6**), élaboré pour le greffage orthogonal de deux fragments différents :

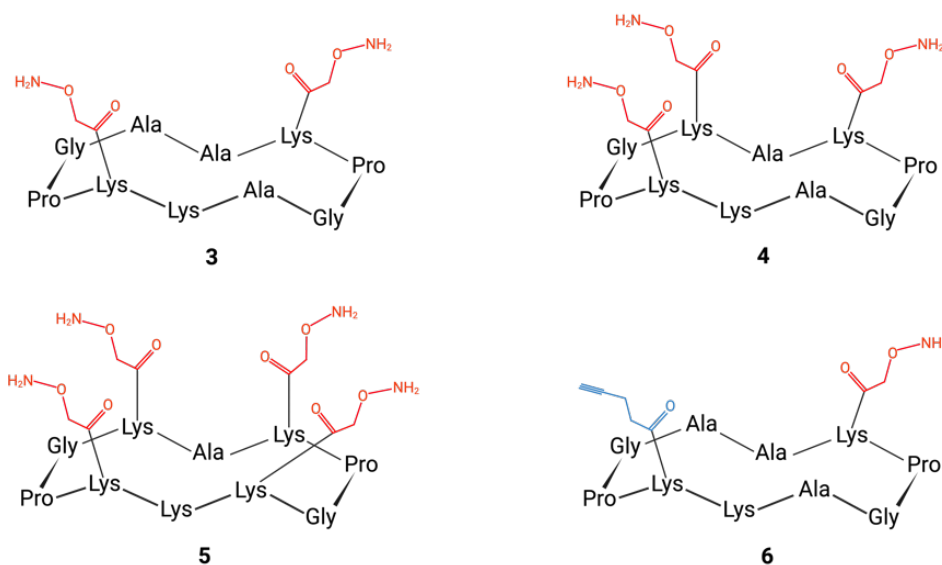


Figure 77 : Représentation schématique des 4 cyclo-peptides.

Les schémas de synthèses, profils UV et profils masse de chaque cyclo-peptides sont présentés et discutés ci-après.

IV.2.2 Châssis cyclo-peptidique contenant deux fonctions oxyamines

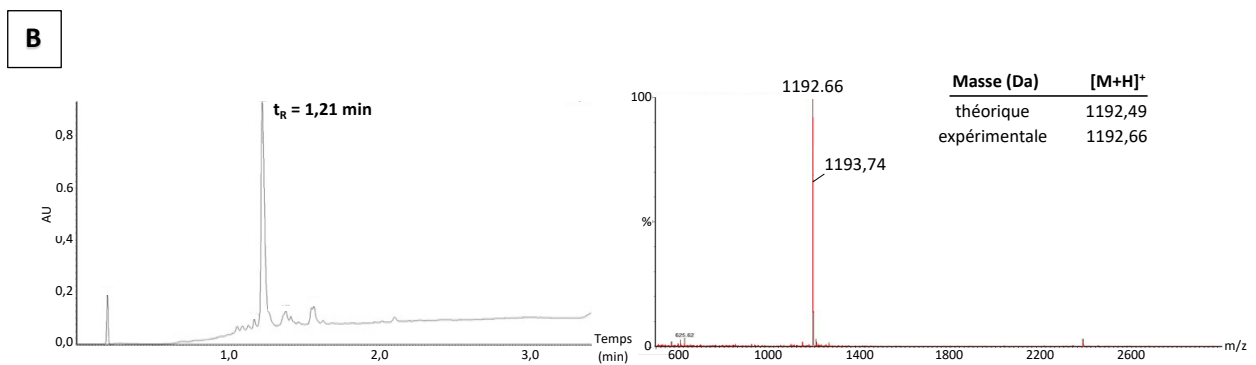
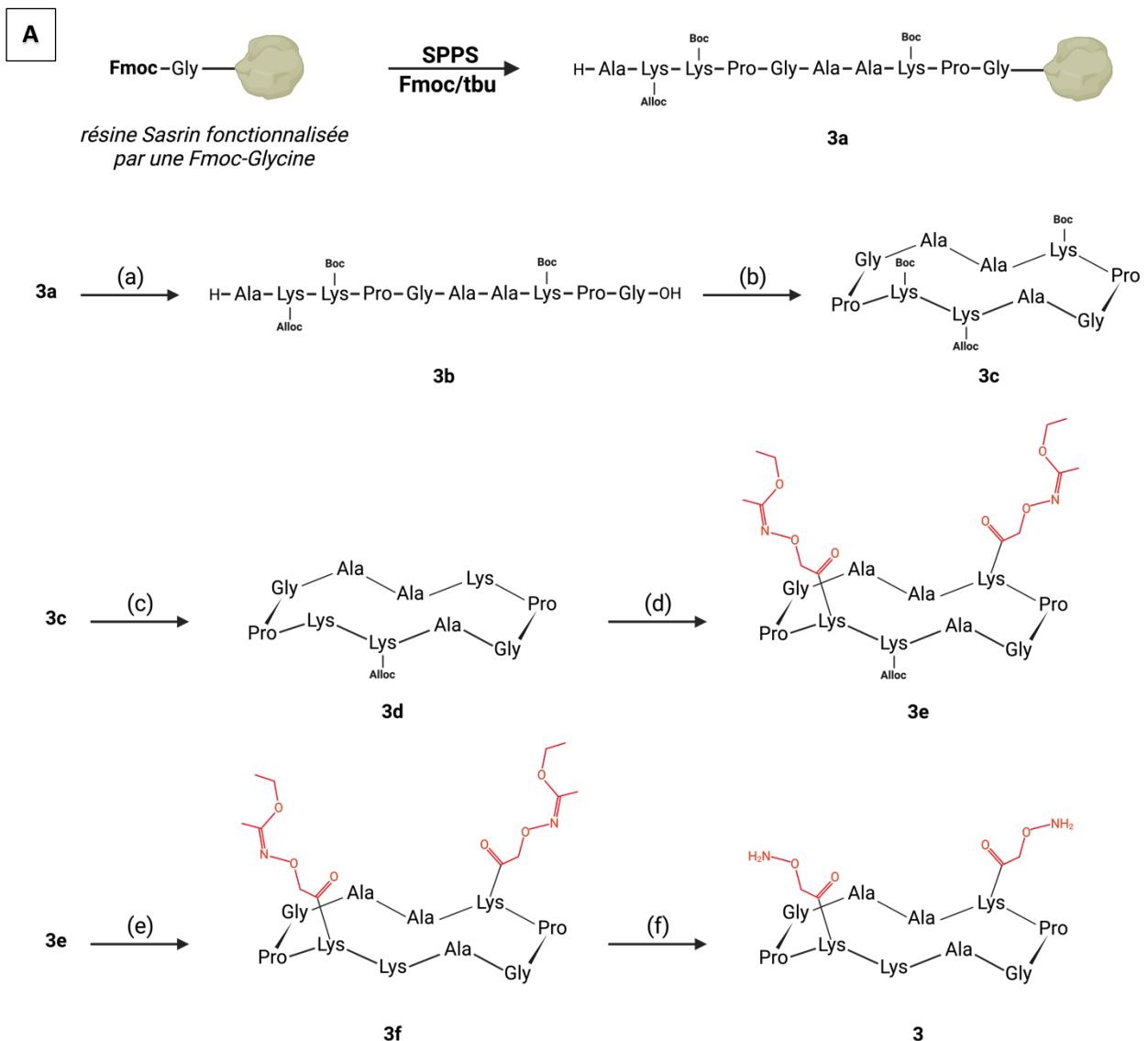


Figure 78 : A) Synthèse du châssis peptidique 3 : (a) TFA/DCM (1/99 v/v), t.a.; (b) PyBOP (1,2eq), DIEA, DMF, t.a.; (c) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v), t.a.; (d) N-Hydroxysuccinimidyl 2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetate (1,5eq. / lysine), DIEPA, DMF, t.a.; (e) Pd(PPh₃)₄ (0,2eq), PhSiH₃ (100eq), DCM/DMF anhydre (3/1, v/v), t.a.; (f) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v), t.a.. **B) Évaluation de la pureté du cyclo peptide 3 par UPLC-MS sans purification préalable.** A gauche : chromatogramme obtenu pour une analyse de 3,5 min exécutée avec un gradient d'acétonitrile 5-100% dans H₂O 0,1% TFA sur un temps de 2,3 min. t_R = temps de rétention. A droite : Spectre de masse (source ESI+). Conditions : cf Partie Experimentale.

IV.2.3 Châssis cyclo-peptidique contenant trois fonctions oxyamines

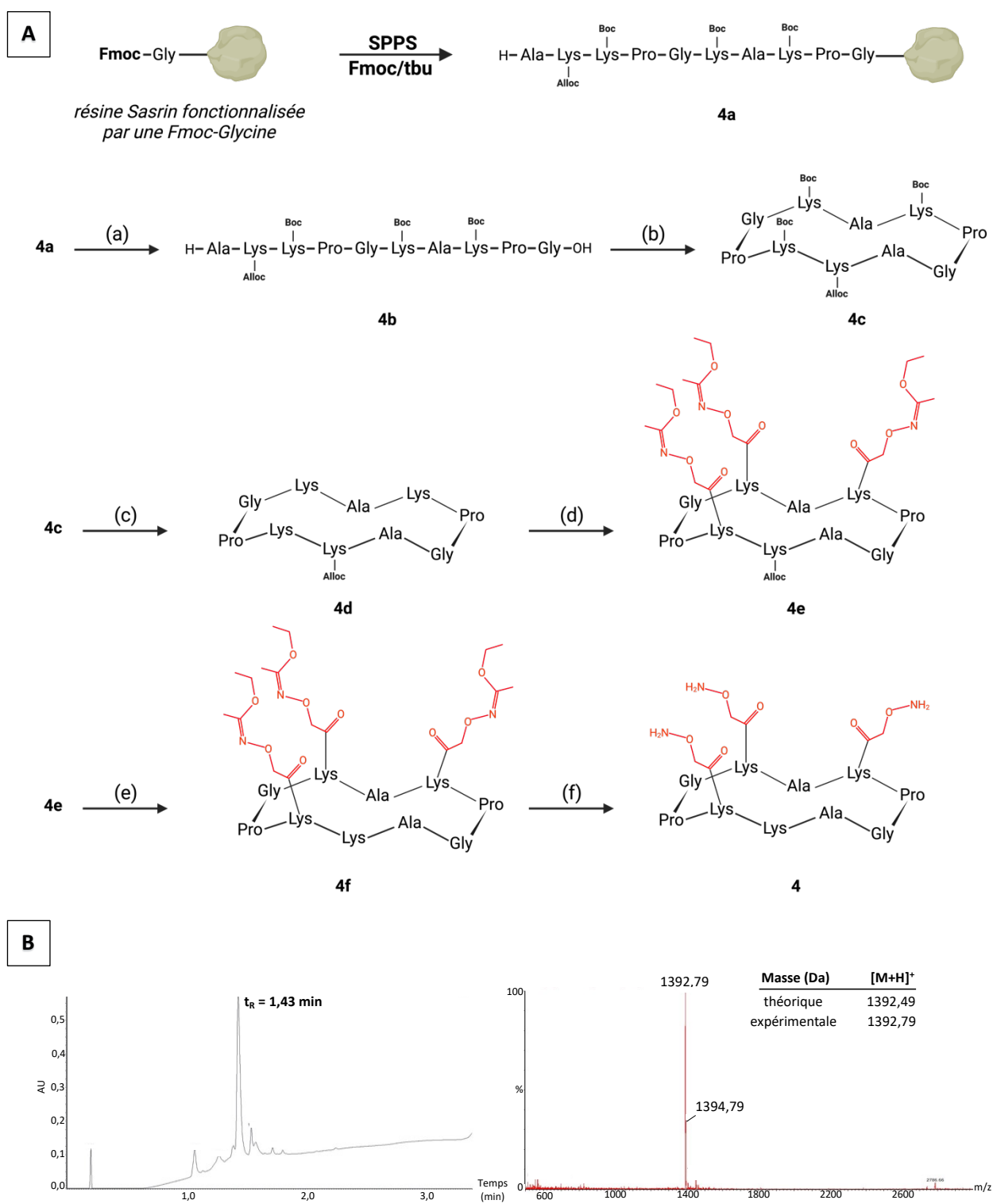


Figure 79 : A) Synthèse du châssis peptidique 4 : (a) TFA/DCM (1/99 v/v), t.a.; (b) PyBOP (1,2eq), DIEA, DMF, t.a.; (c) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v), t.a.; (d) N-Hydroxysuccinimidyl 2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetate (1,5eq. / lysine), DIEPA, DMF, t.a.; (e) Pd(PPh₃)₄ (0,2eq), PhSiH₃ (100eq), DCM/DMF anhydre (3/1, v/v), t.a.; (f) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v), t.a.. **B) Évaluation de la pureté du cyclo peptide 4 par UPLC-MS sans purification préalable.** A gauche : chromatogramme obtenu pour une analyse de 3,5 min exécutée avec un gradient d'acétonitrile 5-100% dans H₂O 0,1% TFA sur un temps de 2,3 min. t_R = temps de rétention. A droite : Spectre de masse (source ESI+). Conditions : cf Partie Expérimentale.

IV.2.4 Châssis cyclo-peptidique contenant quatre fonctions oxyamines

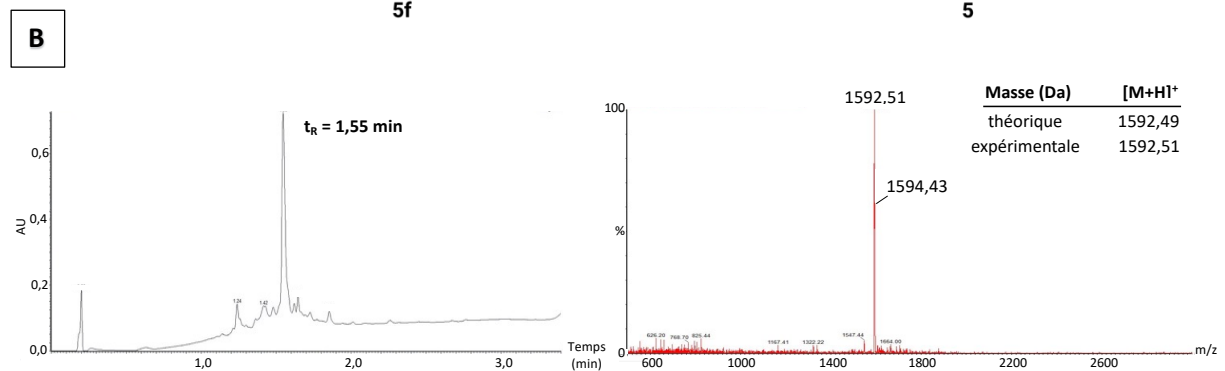
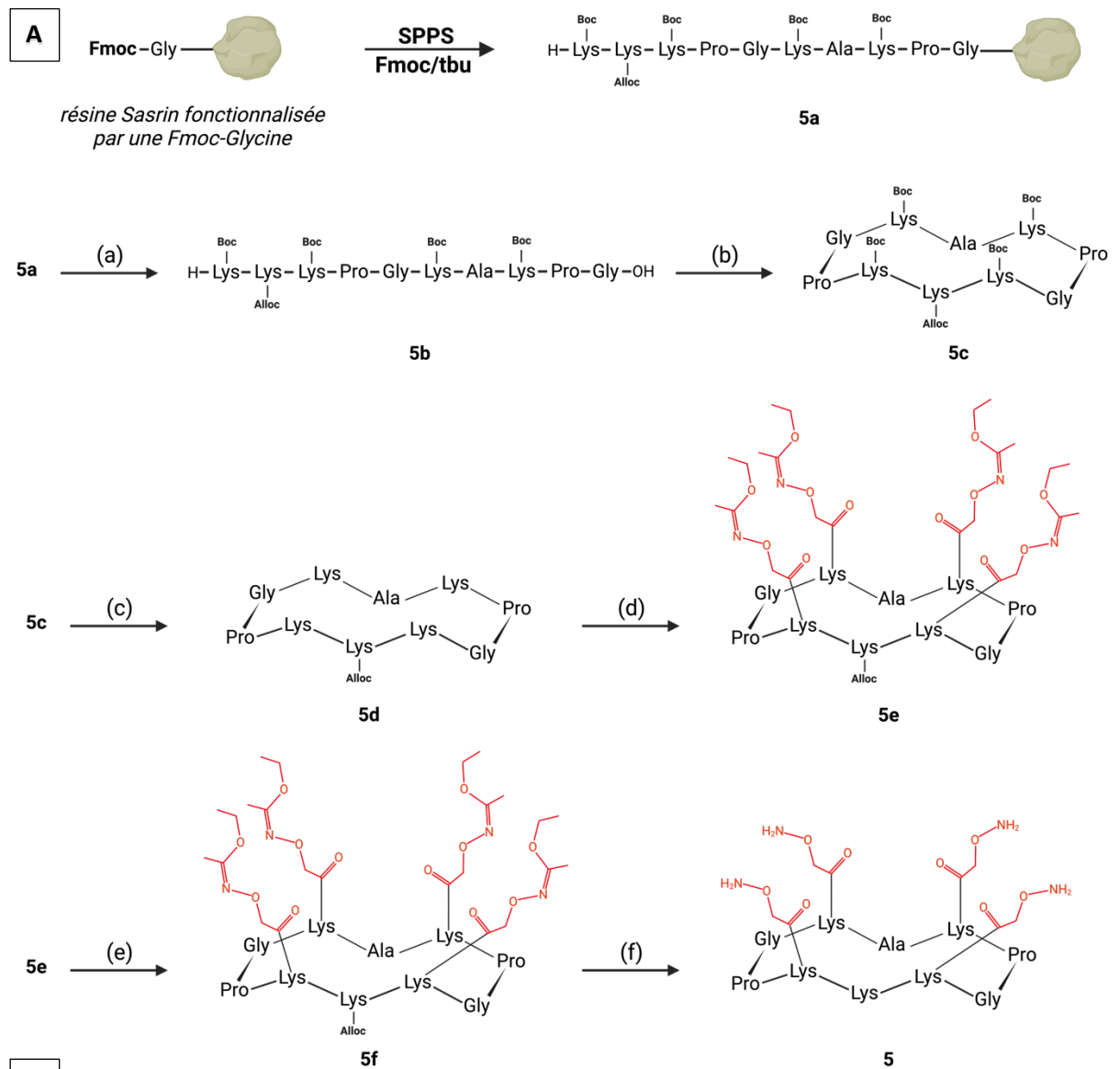


Figure 80 : A) Synthèse du châssis peptidique 5 : (a) TFA/DCM (1/99 v/v), t.a.; (b) PyBOP (1,2eq), DIEA, DMF, t.a.; (c) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v), t.a ; (d) N-Hydroxysuccinimidyl 2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetate (1,5eq. / lysine), DIEPA, DMF, t.a. ; (e) Pd(PPh₃)₄ (0,2eq), PhSiH₃ (100eq), DCM/DMF anhydre (3/1, v/v), t.a. ; (f) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) , t.a.. **B) Évaluation de la pureté du cyclo peptide 5 par UPLC-MS sans purification préalable.** A gauche : chromatogramme obtenu pour une analyse de 3,5 min exécutée avec un gradient d'acétonitrile 5-100% dans H₂O 0,1% TFA sur un temps de 2,3 min. t_R = temps de rétention. A droite : Spectre de masse (source ESI+). Conditions : cf Partie Experimentale.

IV.2.5 Châssis cyclo-peptidique contenant une fonction oxyamine et une fonction alcyne

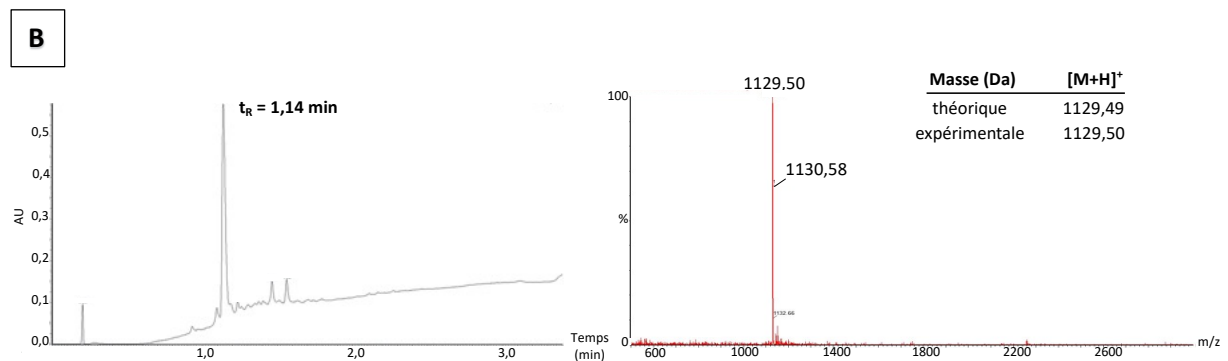
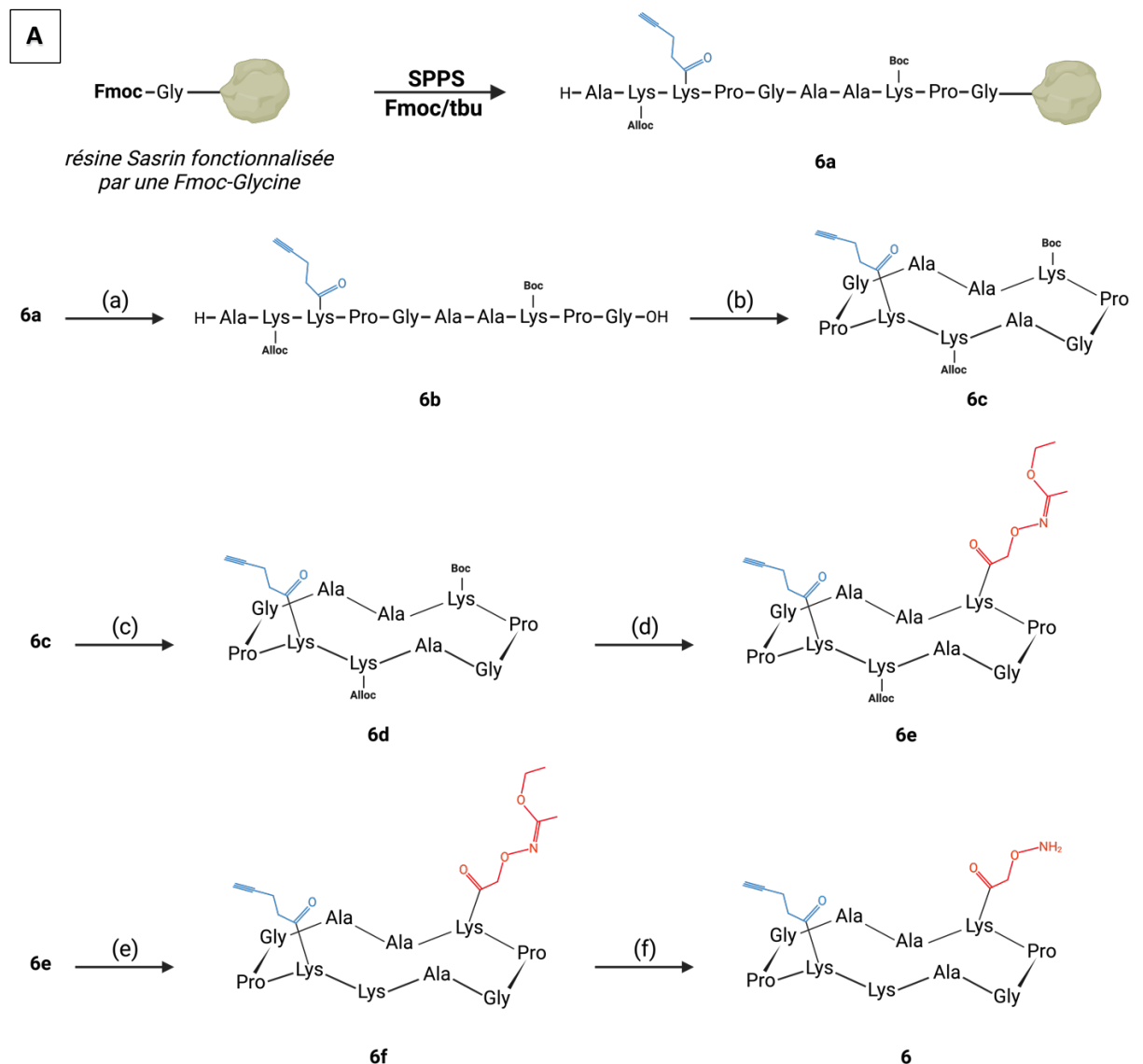


Figure 81 : A) Synthèse du châssis peptidique 6 : (a) TFA/DCM (1/99 v/v), t.a.; (b) PyBOP (1,2eq), DIEA, DMF, t.a.; (c) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v), t.a.; (d) N-Hydroxysuccinimidyl 2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetate (1,5eq. / lysine), DIEPA, DMF, t.a.; (e) Pd(PPh₃)₄ (0,2eq), PhSiH₃ (100eq), DCM/DMF anhydre (3/1, v/v), t.a.; (f) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v), t.a.. **B) Évaluation de la pureté du cyclo peptide 6 par UPLC-MS sans purification préalable.** A gauche : chromatogramme obtenu pour une analyse de 3,5 min exécutée avec un gradient d'acétonitrile 5-100% dans H₂O 0,1% TFA sur un temps de 2,3 min. t_R = temps de rétention. A droite : Spectre de masse (source ESI+). Conditions : cf Partie Experimentale.

IV.2.6 Bilan de la synthèse peptidique

Au total, avant purification plusieurs dizaines de micromoles (de 50 à 90 μmoles) de chaque peptide ont été synthétisées comme décrit en Tableau 20. Les rendements molaires totaux des synthèses en 7 étapes varient de 30 à 40 %.

Les profils UV montrent clairement une espèce majoritaire qui correspond à chaque fois à la masse attendue pour chaque cyclo-peptide. Toutefois, une fois les dernières étapes de synthèses réalisées (greffage de Cy5 sur l'amine libre), ces composés devront être purifiés par RP-HPLC.

Les quantités obtenues avant purification sont bien supérieures à celles nécessaires dans le cadre d'un greffage d'oligonucléotides, puisque notre capacité de production d'aptamères ne pourra pas dépasser une échelle de synthèse de quelques μmoles .

Tableau 20 : Récapitulatif des synthèses de cyclo-peptides.

Composé (ox. = oxyamine)	Masse post synthèse (+ nombre de moles)	Rendement Molaire total
Raft 3 (2 ox.)	76 μmoles (91 mg)	35 %
Raft 4 (3 ox.)	89 μmoles (124 mg)	41 %
Raft 5 (4 ox.)	69 μmoles (110 mg)	32 %
Raft 6 (1 ox. + 1 alcyne)	53 μmoles (60 mg)	28 %

V. Synthèse des fragments A1-F1 et A2-F1 modifié en 3'

V. 1. Principe de la Synthèse d'Oligonucléotides en Phase solide (SPOS).

La synthèse des oligonucléotides, s'effectue comme pour les peptides en phase solide et consiste en une élongation du brin d'ADN de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5'. Au sein du laboratoire, les nucléotides sont introduits par la chimie des phosphoramidites²⁷³ *via* un processus automatisé illustré en Figure 82. Cette synthèse repose sur un cycle en quatre étapes :

(1) Le groupement protecteur diméthoxytrytile présent en 5' de l'oligonucléotide est retiré en présence d'acide trichloracétique dans du dichlorométhane. Cette détrytillation conduit à la formation d'un cation de couleur rouge/orange (le diméthoxytrytylium (DMTr⁺)), permettant à l'appareil de réaliser un dosage pour évaluer l'efficacité de chaque cycle de synthèse.

(2) La fonction hydroxyle libre en 5' va ensuite permettre le couplage d'un second nucléotide par une liaison phosphite triester en présence d'un acide faible ayant un rôle d'activateur : le tétrazole.

(3) Les groupements hydroxyles n'ayant pas réagi vont ensuite être acétylés par ajout d'anhydride acétique permettant de bloquer ces sites et éviter la formation d'avortons de synthèse.

(4) Enfin, la liaison phosphite formée lors de la seconde étape est oxydée en liaison phosphate triester, bien plus stable, par ajout d'une solution d'iode et d'eau.

A l'issue de la synthèse, la séquence est libérée de la résine par ajout d'une solution ammoniacale/méthylamine (1/1, v/v). Dans notre cas, le dernier groupement protecteur diméthoxytrytile présent en 5' lors du dernier cycle n'est pas retiré avant cette étape. Ainsi, seule la séquence contenant le dernier nucléotide en sera pourvue. Cela permet d'augmenter fortement l'hydrophobicité de la séquence d'intérêt et d'en faciliter sa purification. Cette méthode de synthèse permet également d'obtenir des oligonucléotides modifiés au sein de la séquence, en 5' par l'incorporation de nucléotides modifiés ou par l'usage de résines fonctionnalisées permettant après clivage d'obtenir une modification en 3'.

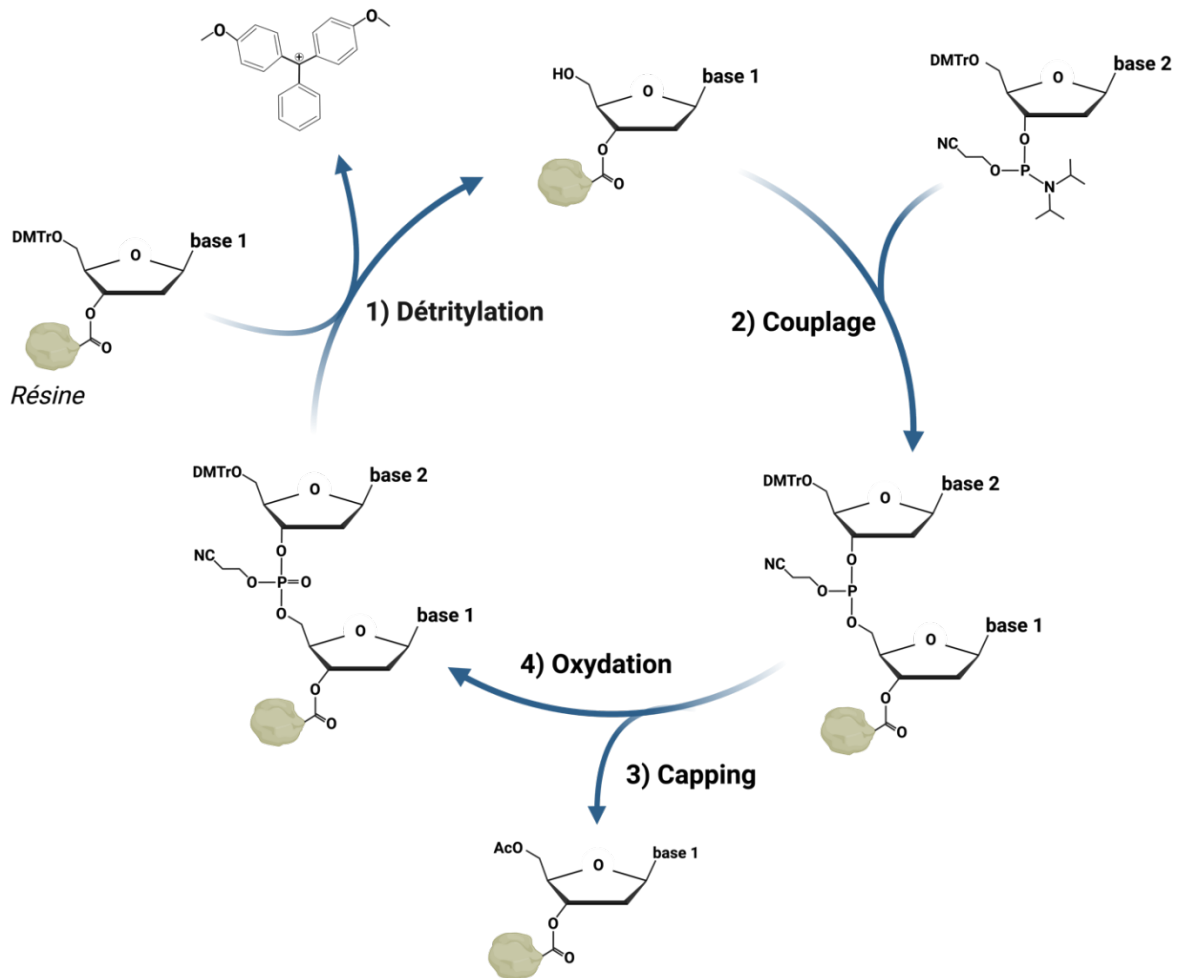


Figure 82 : Cycle d'élongation d'un peptide par SPOS.

Dans le cadre de ce projet, les aptamères synthétisés sont les fragments Apta°1-F1 et Apta°2-F1 de 51 et 48 bases respectivement. Dans l'optique de greffer ces fragments sur le peptide **3** *via* des ligations oximes, nous avons opté pour une modification en position 3' de ces séquences afin d'obtenir une fonction aldéhyde.

V. 2. Synthèse des aptamères 3'-aldéhyde

Les synthèses des deux fragments illustrées en Figure 83-A et Figure 84-A ont donc été réalisées par la méthode SPOS à partir d'une résine 3' glyceryl CPG, permettant après clivage d'obtenir les oligonucléotides **7a** et **8a** modifiés par une fonction 1,2 diol en position 3' et contenant toujours le groupement protecteur en 5'. Après une première étape de purification par HPLC en phase inverse, ce groupement protecteur est retiré par ajout d'une solution

d'acide acétique 80% dans l'eau puis retiré par extraction liquide-liquide par ajout d'éther diéthylique (composé **7b** et **8b**). La fonction 3' aldéhyde est ensuite obtenue par coupure oxydative provoquée par l'ajout de périodate de sodium. Les sels de périodate ainsi que le formaldéhyde formé au cours de cette réaction sont ensuite éliminés par ultracentrifugation sur colonne Nanosep 10K. Les oligonucléotides **7** et **8** ont ensuite été caractérisés (Figure 83-B et Figure 84-B) par RP-HPLC analytique et par spectrométrie de masse (ESI⁻).

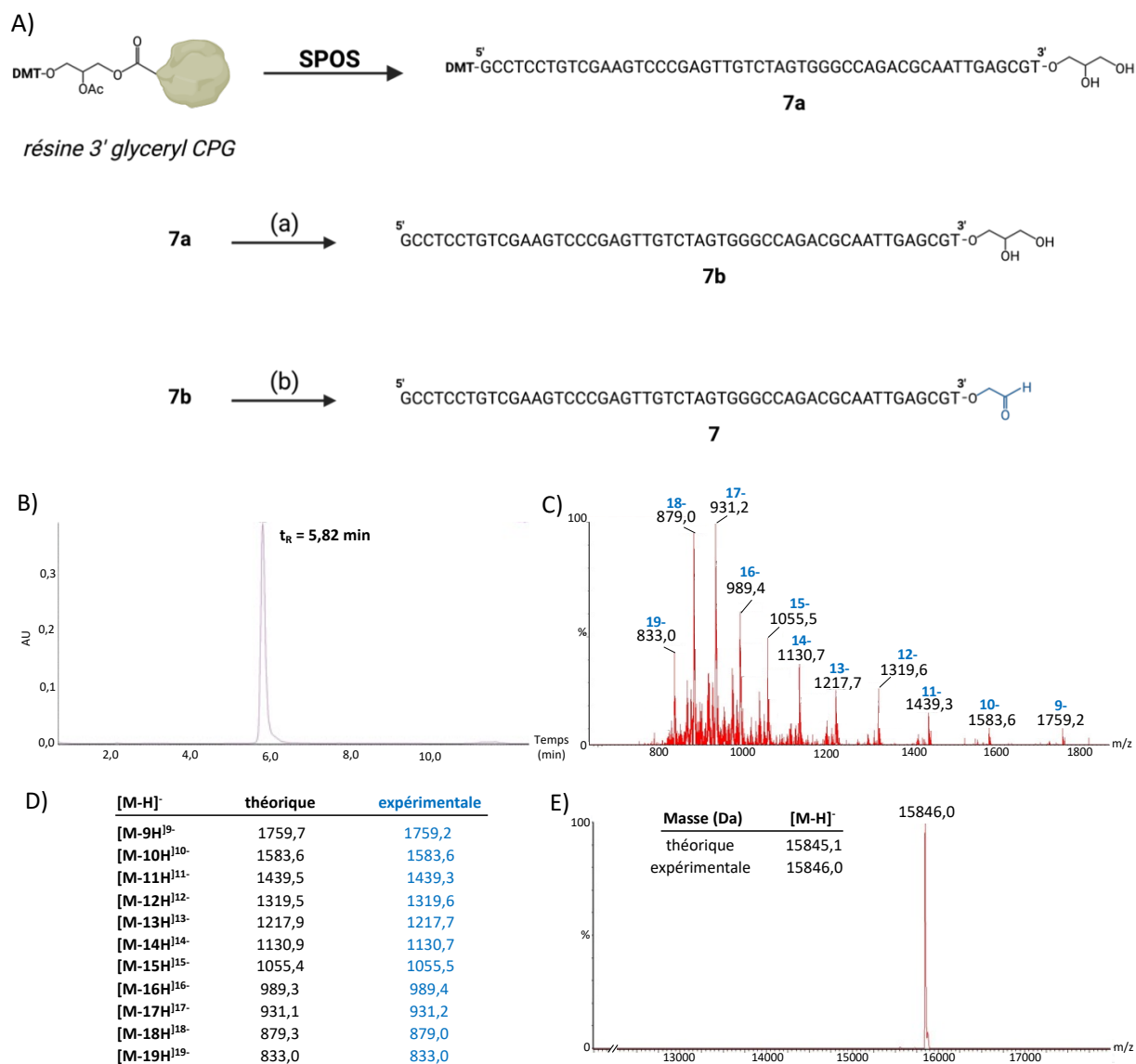


Figure 83 : Synthèse et caractérisation de l'oligonucléotide 7 (Apta^o1-F1) modifié en 3' aldéhyde. A) : Mécanisme de synthèse. (a) acide acétique / H₂O (80/20 v/v), t.a.; (b) NaIO₄ (30eq) dans H₂O t.a.. **Évaluation de la pureté de l'oligonucléotide par UPLC-MS : B) :** chromatogramme obtenu pour une analyse de 12 min exécutée avec un gradient linéaire de 0 à 30 % de solvant C (triéthylamine (15mM) et hexafluoro-2- propanol (50mM) dans l'eau) et solvant D (triéthylamine (15mM) et hexafluoro-2-propanol (50mM) dans du méthanol). **C) :** Spectre de masse (source ESI⁻). **D) :** Table des masses théoriques et expérimentales attendues. **E) :** Déconvolution du spectre de masse. **Conditions :** cf Partie Expérimentale.

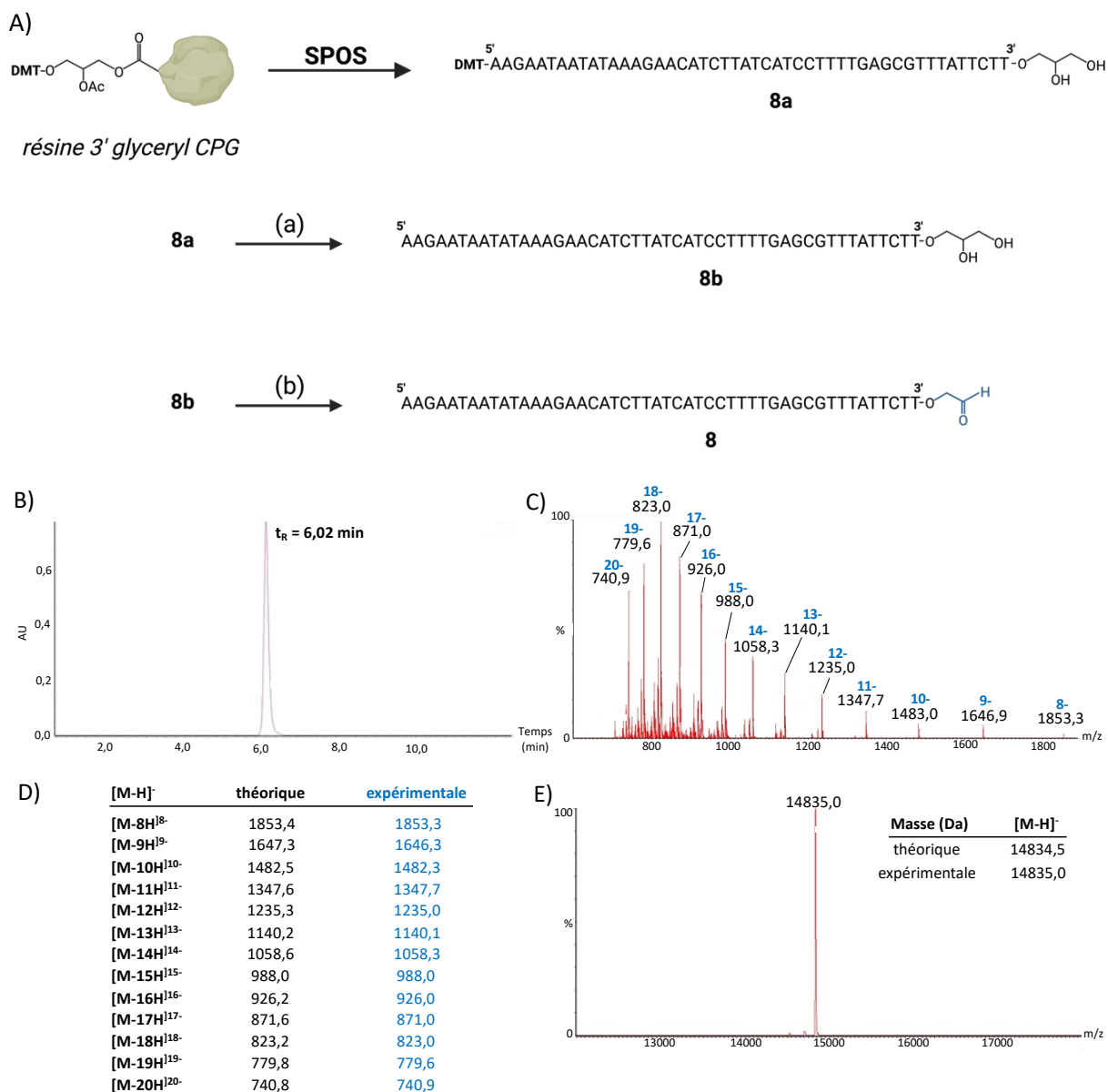


Figure 84 : Synthèse et caractérisation de l'oligonucléotide 8 (Apta²-F1) modifié en 3' aldéhyde. A) : Mécanisme de synthèse. (a) acide acétique / H₂O (80/20 v/v), t.a.; (b) NaIO₄ (30eq) dans H₂O t.a.. **Évaluation de la pureté de l'oligonucléotide par UPLC-MS : B) :** chromatogramme obtenu pour une analyse de 12 min exécutée avec un gradient linéaire de 0 à 30 % de solvant C (triéthylamine (15mM) et hexafluoro-2-propanol (50mM) dans l'eau) et solvant D (triéthylamine (15mM) et hexafluoro-2-propanol (50mM) dans du méthanol). **C) :** Spectre de masse (source ESI-). **D) :** Table des masses théoriques et expérimentales attendues. **E) :** Déconvolution du spectre de masse. **Conditions :** cf Partie Expérimentale.

V. 3. Bilan de la synthèse d'aptamères

Au total, après synthèse et purification des oligonucléotides, plusieurs centaines de nanomoles de chaque fragment ont été obtenues. Les rendements de synthèse sont supérieurs à 40% ce qui est assez satisfaisant pour des séquences d'environ 50 nucléotides (Tableau 21).

Tableau 21 : Récapitulatif des synthèses d'oligonucléotides

Composé (nombre de bases)	Nombre de moles post synthèse	Rendement Molaire total
7 : Apta°1-F1 (51b)	885 nmoles	44 %
8 : Apta°2-F1 (48b)	652 nmoles	43 %

Les profils UV montrent clairement une espèce majoritaire, confirmée comme étant le produit attendu par spectrométrie de masse. Les quantités obtenues après purification ont été jugées suffisantes pour permettre des premiers tests de greffage par ligation oxime dans l'optique de former un homodimère.

VI. Synthèse du premier composé bivalent

En se basant sur le profil UV du composé **3** illustré en Figure 78, un premier essai visant à greffer deux aptamères Apta°1-F1 au cyclo-peptide a été effectué Figure 85, sans étape de purification préalable. Ce test préliminaire a pour objectif d'identifier les meilleures conditions pour permettre de réaliser ce greffage.

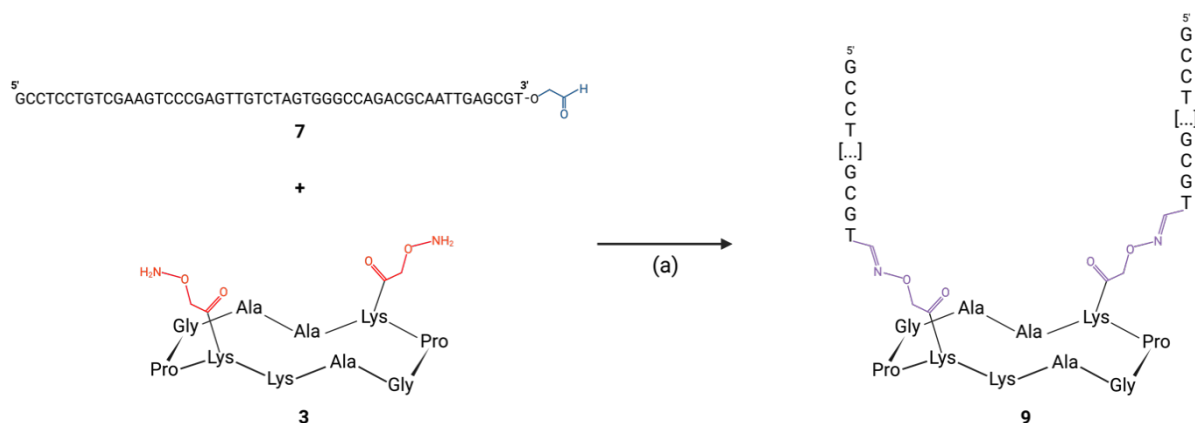


Figure 85 : Synthèse du dimère 9 : (a) oligonucléotide **7** (4 eq), peptide **3** (1eq), tampon NH_4OAc pH= 4,5, t.a..

VI. 1. Formation de la ligation oxime

Pour réaliser la ligation oxime, un premier test a été effectué dans des conditions utilisées au préalable pour le couplage d'oligonucléotides courts (environ 10 bases) sur des châssis cyclo-peptidiques similaires. La réaction s'effectue dans un mélange tampon NH_4OAc 0,4M pH= 4,5 et à température ambiante sous agitation magnétique. Un contrôle heure par heure de la réaction a été effectué initialement par UPLC-MS, toutefois au bout de 4h de réaction, aucune évolution du profil UV n'a été observée et seule l'apparition d'un faible signal difficile à distinguer du bruit de fond a pu être obtenu en masse. Une première tentative de purification par gel d'électrophorèse a toutefois permis de séparer puis purifier une très faible quantité de dimère (1 nmole). Ce premier essai a été caractérisé par un rendement d'environ 1,2%.

Un second essai a ensuite été effectué sur 24h et en concentrant le mix réactionnel pour favoriser l'interaction. Une seconde purification par gel illustrée en Figure 86 a permis d'identifier au moins 2 bandes bien distinctes. Une quantité plus importante de dimère a été obtenue (17 nmoles). Le rendement de ce second essai est d'environ 10%.

Le greffage de deux aptamères de 51 bases s'avère peu efficace *via* la ligation oxime dans les conditions testées. Il reste cependant intéressant de voir l'augmentation du rendement entre ces deux premiers essais, laissant penser qu'une optimisation de la méthode pourrait permettre d'obtenir une quantité de dimère suffisante pour des premiers tests *in vitro via*

électrophorèse capillaire ou *in cellulo*. Les tests par ITC semblent exclus à ce stade car ils nécessiteraient l'utilisation de plusieurs dizaines de nanomoles de dimère.

VI. 2. Purification par gel d'électrophorèse

N'ayant pas possibilité de suivre l'évolution de la réaction par UPLC-MS (comme décrit précédemment), ni de l'analyser par HPLC analytique, une séparation par gel d'électrophorèse a été menée (voir condition en partie expérimentale). Cette séparation illustrée en Figure 86 a été effectuée en présence d'un aptamère contrôle de 77 bases, injecté sur deux puits (à gauche sur la figure).

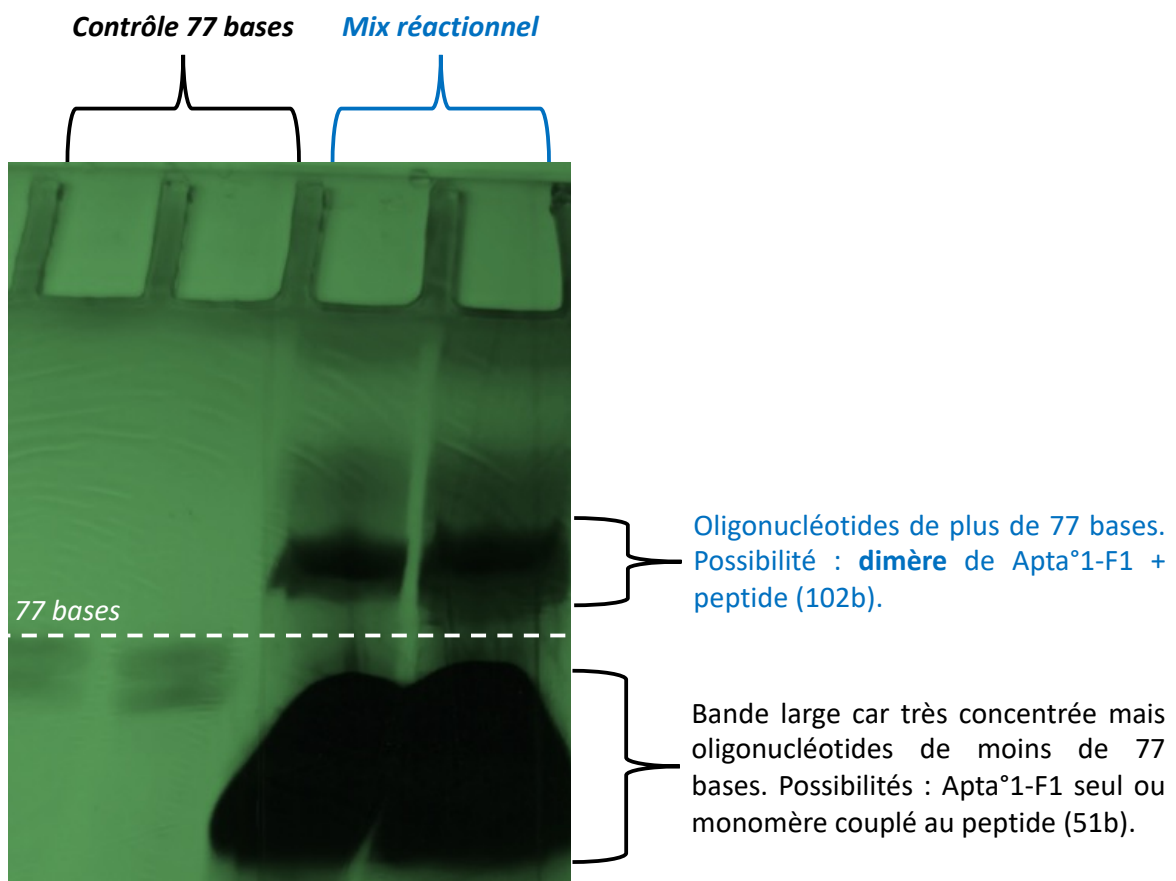


Figure 86 : Électrophorèse sur gel effectuée après un test de greffage par ligation oxime. Dans les deux puits de gauche, des brins d'ADN de 77 bases ont été injectés comme référence. Pour faciliter la lecture, une ligne blanche a été ajoutée pour délimiter la migration de cette référence. Dans les deux puits de droite, le mix réactionnel a été injecté à une concentration > 1 mM. Conditions : cf Partie Expérimentale.

Le mix réactionnel a également été injecté sur deux puits, dans des concentrations bien plus importantes. Après migration et révélation sous lampe UV ($\lambda = 254$ nm), on observe la

séparation d'au moins deux bandes dans le mix réactionnel. La bande majoritaire, trop concentrée pour être bien résolue, semble contenir plusieurs espèces ayant une séquence plus courte que le contrôle et migrant donc plus rapidement à travers le gel. La majeure partie des aptamères semble donc ne pas avoir réagi ou n'avoir formé qu'un monomère avec le peptide, ce qui expliquerait l'absence de variation de signal en UV ou la difficulté d'observer une évolution en masse. On observe cependant une seconde bande, de concentration plus faible et de séquence plus longue que 77 bases puisque la migration est plus lente. La bande supposée comme correspondant au dimère a été collectée puis transférée du gel à une solution aqueuse à l'aide d'un électro-éluteur. Ensuite le filtrat récupéré a été lavé par ultracentrifugation sur Nanosep 10K, puis dosé par spectrométrie UV à 260 nm. Cette fraction a finalement été caractérisée en MALDI, (illustré en Figure 87). Sur ce spectre de masse, on observe tout d'abord un bruit de fond important, résultant probablement d'une injection du dimère à une faible concentration. De plus, on observe un massif relativement large entre 32 000 et 35 000 Da dû notamment à la présence de sels. Les masses attendues étaient 32 847 Da pour le dimère, 17 019 Da pour un monomère couplé au raft ou encore 15 845 Da pour notre fragment de départ. Cette analyse de masse semble donc confirmer la formation du dimère sur cette bande isolée en électrophorèse capillaire.

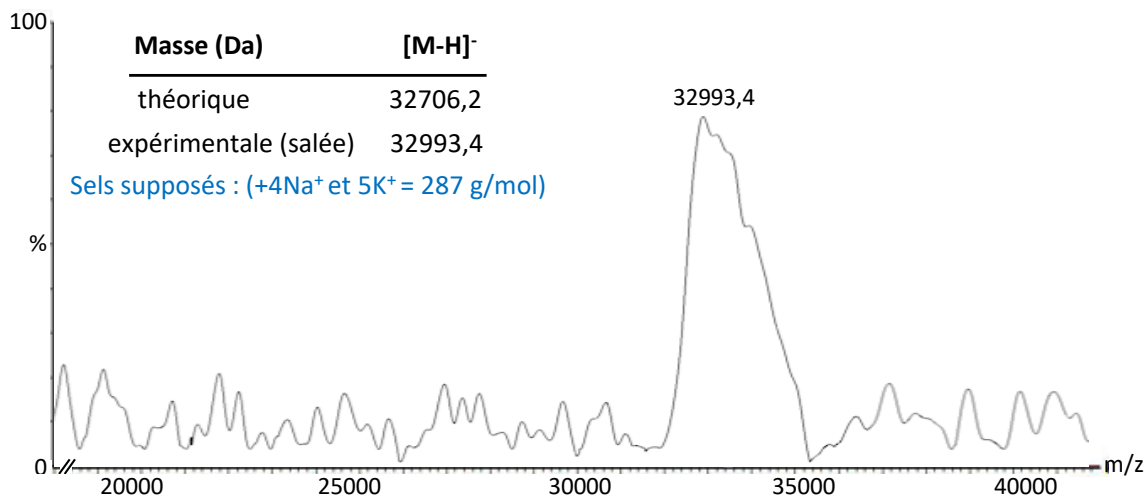


Figure 87 : Spectre de masse source MALDI sur une matrice 3HPA/DAC.

Ce qui n'a pas été fait à ce stade mais qui pourrait confirmer ces observations, serait une collection également de la seconde bande majoritaire en électrophorèse selon le même

protocole, puis une analyse en MALDI de celle-ci. La présence de masses aux alentours de 15 à 17 kDa serait ainsi attendue.

VI. 3. Conclusion des premiers essais de synthèse d'un dimère d'Apta°1-F1

Le premier essai de greffage de deux fragments **7** sur le cyclo-peptide **3** *via* ligation oxime s'est avéré peu efficace. Toutefois, un second essai en augmentant drastiquement le temps de réaction et la concentration a permis d'augmenter le rendement d'un facteur 8, bien que celui-ci reste faible (<10%). Considérant la taille des aptamères ainsi que leur charge nette fortement négative, il est probable que ce couplage soit limité à la fois par un encombrement stérique important ainsi que par un phénomène de répulsion électrostatique. Pour confirmer cette théorie, il serait intéressant d'effectuer le greffage de ces mêmes composés par formation d'une liaison triazole par CuAAC et de comparer les rendements obtenus. L'ajout d'espaceur type PEG entre le cyclo-peptide et la fonction oxyamine pourrait également permettre une plus grande flexibilité et limiter l'encombrement stérique au niveau du site de ligation. Toutefois, bien que les rendements soient faibles, les quantités de dimère obtenues permettraient d'effectuer des premiers tests de caractérisations *in vitro* par CE ou *in cellulo* dans le cas où le fluorophore Cy5 aurait été au préalable greffé sur le peptide. De plus, les aptamères n'ayant pas réagi ou n'ayant réagi que pour former un monomère avec le peptide pourraient être récoltés (à contrôler) suite à l'électrophorèse sur gel puis réutilisés pour relancer la réaction. Quoi qu'il en soit, ces essais préalables ont démontré qu'il est possible de former le dimère en utilisant ce type de cyclo-peptide comme support.

VII. Conclusions

A partir des structures 2D des aptamères, trois fragments ont été identifiés. Deux à partir de l'Apta°1 nommés fragments **Apta°1-F1**, **Apta°1-F2** 2 composé de 51 et 36 bases respectivement, ainsi que le fragment **Apta°2-F1** issu de l'Apta°2 et composé de 48 bases. Une première caractérisation *in vitro* par électrophorèse capillaire a permis d'observer une interaction spécifique des fragments pour le peptide fCD20 en regard du fCD20 scramble. Une étude plus poussée par ITC a ensuite permis de déterminer des constantes d'association allant

de 5 à 20 μM selon le fragment. Il a été observé que plus la longueur de la séquence diminuait, plus faible était l'affinité pour la cible, toutefois la spécificité reste élevée. Un premier test *in cellulo* a finalement confirmé la spécificité des fragments pour les cellules exprimant l'antigène CD20. Par contre, l'intensité de fluorescence globale observée a diminué presque linéairement en fonction de la longueur des séquences. Un phénomène de quenching de fluorescence a été avancé comme cause possible de cette observation.

Dans le cadre de l'objectif du projet visant à synthétiser des composés multivalents à partir d'un châssis macromoléculaire, quatre cyclo-peptides fonctionnalisés ont été synthétisés par SPPS. En parallèle, deux fragments ont été produits par SPOS avec une modification par une fonction aldéhyde en 3'. Les rendements de synthèse de ces différents éléments sont satisfaisants et ont permis d'initier des premiers tests visant à la formation d'un dimère. Ces essais préalables ont été caractérisés par des rendements assez faibles (< 10%) et nécessiteront une optimisation des conditions de greffage.

Conclusions et Perspectives

Depuis quelques décennies, les efforts de la communauté scientifique se sont orientés vers le développement de nouvelles thérapies, dites « ciblées ». De par leur spécificité élevée pour une cible, ces traitements impliquent une volonté de ne détruire que les cellules cibles, sans altérer (ou le moins possible) les tissus sains environnants à l'instar des anticorps monoclonaux dont le nombre d'autorisation de mise sur le marché ne cesse croître. Toutefois, le développement de ces immunoglobulines se confronte à un certain nombre de barrières telles que des phénomènes de polymorphismes et d'immunogénicité, des coûts de production élevés, des poids moléculaires importants limitant la biodistribution, ou encore une faible stabilité et une possible variabilité inter-lots.

Différentes stratégies sont ainsi développées pour pallier à ces limites. C'est dans cette optique que s'inscrivent les travaux effectués lors de cette thèse avec pour objectif, la conception des mimes synthétiques d'anticorps, de poids moléculaires inférieurs à 50 kDa. Notre intérêt s'est porté sur l'anticorps rituximab, utilisé notamment dans le traitement de certains types de lymphomes. Sa cible, l'antigène CD20 est une protéine transmembranaire exprimée à la surface des cellules B. Pour former ces mimes synthétiques, nous proposons la synthèse de composés multifonctionnelles, permettant d'une part une reconnaissance spécifique de la cible, mais également une fonctionnalisation par une molécules fluorescente ou un agent cytotoxique.

Résumé des résultats

Parmi les différentes stratégies utilisées à l'heure actuelle en thérapie, nous avons opté pour la sélection d'aptamères en tant qu'éléments de reconnaissances, ensuite greffés sur un châssis peptidique servant de support. Une bonne connaissance de la cible nous a permis d'identifier un fragment d'intérêt de l'antigène (nommé fCD20), qui a été synthétisé par SPPS.

La première partie du projet s'est donc articulée autour de la sélection d'aptamères spécifique du fragment peptidique, à commencer par la mise en place des paramètres liés à la méthode de CE-SELEX. A l'issue de ce processus effectué à partir d'une banque

d'oligonucléotides contenant environ 10^{14} séquences d'ADN statistiquement différentes, 5 séquences ont été choisies pour des premiers tests d'interaction avec la cible.

Différentes méthodes de caractérisation *in vitro* ont ensuite été utilisées telles que la CE, la SPR ou encore l'ITC. La combinaison de ces méthodes a permis d'identifier, deux aptamères (Apta°1 et Apta°2) ayant une affinité de l'ordre du micro-molaire pour le fragment fCD20, ainsi qu'une spécificité significative par rapport au fCD20 scramble. Des tests *in cellulo* ont ensuite été initiés sur deux lignées cellulaires pour caractériser l'affinité aptamère-CD20, directement à la surface des cellules. De nombreuses étapes d'optimisation ont été nécessaires permettant à terme d'observer une tendance qui semble confirmer les résultats obtenus *in vitro*.

Afin de limiter les coûts de production ainsi que de réduire le poids moléculaire final, nous nous sommes intéressés à la structure secondaire de nos aptamères dans l'optique de raccourcir les séquences. A partir des repliements 2D théorique des aptamères, trois fragments ont été identifiés. Deux à partir de l'Apta°1 nommés fragments Apta°1-F1, Apta°1-F2 2 composé de 51 et 36 bases respectivement, ainsi que le fragment Apta°2-F1 issu de l'Apta°2 et composé de 48 bases. Les mêmes étapes de caractérisation *in vitro* ont permis de déterminer des constantes d'association allant de 5 à 20 μM selon le fragment, ainsi qu'une spécificité toujours élevée. Un premier test *in cellulo* a finalement confirmé la spécificité des fragments pour les cellules exprimant l'antigène CD20, bien que la fluorescence globale diminue proportionnellement à la longueur du fragment.

Pour permettre la construction de composés multivalents à partir de ces aptamères, quatre cyclo-peptides fonctionnalisés ont été synthétisés par SPPS. En parallèle, les fragment d'aptamères Apta°1-F1 et Apta°2-F1 ont été produits par SPOS avec une modification par une fonction aldéhyde en 3'. Un premier test de conjugaison a été effectués par ligation oxime entre deux fragments Apta°1-F1 et un peptide contenant deux groupements oxiamines. Ces essais préalables ont été caractérisés par des rendements assez faibles (< 10%) et nécessiteront une optimisation des conditions de greffage.

Conclusion et perspectives :

A l'issue du processus de CE-SELEX et de caractérisation *in vitro*, nous avons identifiés deux séquences ayant une bonne spécificité pour la cible. L'affinité initiale de la banque pour le fCD20 étant très faible, un cycle supplémentaire aurait pu être considéré. Que l'affinité en soit améliorée ou non, ce résultat aurait permis soit de justifier de l'arrêt du processus après 4 cycles, soit de la pertinence d'un cinquième cycle.

Bien que n'ayant pu tripler les analyses *in cellulo* par manque de temps, les nombreuses étapes d'optimisation effectuées, montrent une tendance positive qui semble confirmer les résultats obtenus *in vitro*. Il sera toutefois nécessaire d'effectuer de nouveaux ces caractérisations pour s'assurer de leur reproductibilité.

Les premiers essais de synthèse de composés divalents, ont montré qu'il est possible de réaliser ces mimes synthétiques. Malgré les faibles rendements, un gain très net a été observé entre les premier et second essais, en ne modifiant que la concentration et la durée de réaction. Ces résultats laissent supposer qu'il sera possible d'optimiser les conditions pour favoriser la formation du produit attendu. Ces composés divalents devront ensuite être caractérisés *in vitro* et *in cellulo*, pour comparer les gains ou pertes d'affinité et spécificité par rapport aux aptamères seuls.

Les sélections et synthèses effectuées au cours de ces travaux, permettent pour la suite du projet, l'élaboration de différents composés : les dimères d'Apta°1-F1, les dimères d'Apta°2-F1, ainsi qu'un dimère hydride. Au vu des faibles rendements obtenus lors de la formation du premier dimère, il semble à ce jour peu envisageable d'effectuer la synthèse de trimères et tétramères, dans ces mêmes conditions. La conception de constructions multivalentes devra donc prendre en compte différents paramètres :

La valence est un facteur important pour les caractéristiques du mime synthétique mais ne doit pas conduire à un encombrement stérique trop important et limitant la synthèse. Le poids moléculaire final doit également être contrôlé pour ne pas rencontrer les mêmes limites que les anticorps à terme.

La présence d'espaceurs entre le RAFT et les oligonucléotides pourrait conduire à une augmentation de la flexibilité et de l'écartement entre les aptamères, permettant peut être d'en faciliter le greffage.

La formation de composés hybrides. Un projet parallèle, initié au DCM vise au développement d'hexapeptides cycliques comme éléments de reconnaissance du CD20. Des premiers essais de conjugaison ont été limités par une très faible solubilité de la construction après assemblage. La conception de composés hybrides avec des peptides et aptamères comme éléments de reconnaissance, pourrait permettre de pallier à cette limite tout en augmentant la variété des interactions avec l'antigène.

Partie expérimentale

I. DNA Aptamer selection process

I. 1. Aptamer selection against the CD20 antigen using the CE-SELEX approach

CE-SELEX was performed using a 77-nucleotides (nt) single-stranded DNA (ssDNA) library purchased from Eurogentec (Liege, Belgium). The library was design containing a randomized region of 30-nt central region flanked by two conserved primer hybridization regions (24-nt at 5' end position (5'-FAM-GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTCGAA)) and 23-nt at 3' end position (TTGAGCGTTTATTCTTGTCTCCC-3')). Selection was performed on an Agilent 7100 Capillary Electrophoresis system (Santa Clara, California, USA) with exchangeable UV absorbance ($\lambda=210$ nm) and Picometrics ZETALIFTM LED ($\lambda=480$ nm) Detector. The capillary was 72,5 cm in length (51,5 cm from inlet to fluorescent detection window, 64cm from inlet to UV detection window) with an inner diameter of 75 μm and an outer diameter of 360 μm (Polymicro Technologies Inc., Phoenix, Arizona, USA).

The fused-silica capillaries were conditioned by performing the following washes at 1 bar: 1 M NaOH for 10 min, water for 5 min and TGK buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 5 mM KH_2PO_4 (pH 8.3)) for 30 min. The washing process between runs was performed at 1 bar with 1 M NaOH (5 min), water (2 min) and TGK buffer (5 min). DNA library was heated at 80°C for 10 min and left at room temperature for 20 min. For each selection round, DNA sequences, target peptide and TGK buffer were combined in 50 μL total volume. The mixture was incubated at room temperature for 40 min. For the first round of selection, the library was used with 30 μM concentration in the incubated sample. Subsequent rounds of selection used collected DNA, amplified and purified from the previous round as the input DNA. Input DNA concentrations were 166 nM, 1 μM and 1 μM for rounds 2, 3 and 4 respectively. Approximately 10^{13} sequences were introduced into the capillary in the first round of selection. Peptide concentrations were 1 μM for the first round and 500 nM, 300 nM and 30 nM for rounds 2, 3 and 4, respectively. The equilibrated sample was injected at 50 mbar for 40 sec and separated under a 28 kV voltage. UV and fluorescence detections were used to monitor the separation. During a selection round, the eluate corresponding to the bound DNA peak was collected into 100 μL TGK buffer. The injection, separation and collection process were repeated 10 times for each round. Input DNA concentration was determined by absorbance at 260 nm on a

Shimadzu UV mini-1240 spectrophotometer with a Tray Cell from Hellma Analytics (Müllheim, Germany).

I. 2. Use of the qPCR to control and optimize the DNA amplification step using PCR.

The quantitative PCR (qPCR) technology was first used to set up and control the optimal conditions for the DNA amplification step using PCR. To assess the efficiency, a standard curve was obtained by the amplification of the DNA library using a concentration range from 10^{-10} to 10^{-15} M. First DNA library was heated at 80°C for 10 min and left at room temperature for 20 min. Then Analyses were performed using a Experiments were carried out on Applied Biosystem StepOne™ qPCR instrument (Applied Biosystem, Foster city, California, USA). Master mix was made by combining 3 μL nuclease-free water, 1,6 μL dNTPs (6,25mM of each) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 2 μL each of 5'-FAM-forward (GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTGCGAA) and reverse primers (TTGAGCGTTTATTCTTGTCTCCC) (10^{-5} M), 1,6 μL MgCl_2 (25 mM), 2 μL of GeneAmp 10X PCR buffer II (500 mM potassium chloride and 100 mM Tris-HCl, pH 8.3), 4 μL of SYBR Green (10X), 0.4 μL of Rox passive reference and 5% (v/v) of DMSO. After mixing, 0.2 μL of AmpliTaq Diamond DNA polymerase (5 U/ μL) and 0.2 μL of Amperase (1 U/ μL) were added. To finish, 2 μL of 77-nt ssDNA library from the concentration range were added. The thermal cycling regime was: initial denaturation for 3 min at 95°C , and then cycling for 60 sec at 95°C , 60 sec at 60°C and 90 sec at 72°C for 33 cycles.

I. 3. Use of the qPCR combined to the CE determine the best collection window after migration into the capillary.

In a second time, qPCR was used to assess the best collection window for the aptamers selection process using CE. DNA library was heated at 80°C for 10 min and left at room temperature for 20 min. Then DNA sequences, target peptide and TGK buffer were combined in 50 μL total volume with final concentrations of respectively 30 μM and 50 μM . The mixture was incubated at room temperature for 40 min. The injection, collection and detections were performed as stated previously (I. 1). Different fractions were collected at different time ranges during the migration: from 3 to 4.5 min, from 4.5 to 6 min, from 6 to 7.5 min, from 7.5 to 9 min, from 9 to 10.5 min and from 10.5 to 12 min after migration start. The collection was then stopped to avoid the collection of the unbound DNA fraction. The injection, separation

and collection process were repeated 5 times. Finally, 2 μL of each sample were added to the qPCR mixture prepared as stated previously (I.2). The CT values obtained were then used to determine the best collection window.

I. 4. PCR amplification and single-stranded DNA Production

Single-stranded DNA candidates were generated using a reverse primer and a 5'-FAM-labeled forward primer during each round of the selection procedure. Subsequently, the PCR product was purified on a Nanosep[®] Centrifugal Devices with Omega[™] (modified polyethersulfone) 10K Membrane (Pall, Washington, New York, USA), and then decomposed into single-stranded DNA by lambda-exonuclease catalysis (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). PCR were performed using a Biometra cycler from Labgene (Archamps, France). Master mix was made by combining 668,8 μL nuclease-free water, 35,2 μL dNTPs (6,25 mM of each) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 11 μL each of 5'-FAM-forward (5'-FAM-GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTCGAA) and reverse primers (TTGAGCGTTTATTCTTGTCTCCC-3') (10^{-4} M), 88 μL MgCl_2 (25 mM), 110 μL of GeneAmp 10X PCR buffer II (500 mM potassium chloride and 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) and 5% (v/v) of DMSO. After mixing, 11 μL (5 U/ μL) of AmpliTaq Diamond DNA polymerase was added. To finish, 110 μL of DNA collected during selection were added. This mixed solution was divided equally over thin-walled tubes (100 μL) that were subjected to PCR. The thermal cycling regime was: initial denaturation for 3 min at 95°C, and then cycling for 60 sec at 95°C, 60 sec at 60°C and 90 sec at 72°C for 20 cycles. After a Nanosep 10K purification, the samples, which contained different amounts of amplified products, were combined and then decomposed into single-stranded DNA by lambda-exonuclease (5 U/ μL) catalysis. Filtrate was removed using the Monarch[®] PCR clean up kit (New England Biolabs T1030S) according to the manufacturer's protocol and quantified by Nanodrop at 260 nm.

I. 5. Fluorescent Anisotropy to confirm the selective digestion of DNA.

To assess the enzymatic digestion of the complementary strand, fluorescence intensity and anisotropy readings were taken on a Tecan Infinite F500 microplate reader (Mannedorf, Switzerland) using black, 96-well Greiner Bio-One microplates (Courtaboeuf, France). Excitation was set at 485 ± 20 or 585 ± 20 nm, and emission was collected with 535 ± 25 or

635 ± 30 nm bandpass filters for the fluorescein- and Texas Red-tagged oligonucleotides, respectively. Each well was filled with a final volume of 100 µl. The buffer was composed of Tris (10mM), NaCl (50mM) and MgCl₂ (20 mM). DNA oligonucleotides were synthesized and HPLC-purified by Eurogentec (Angers, France). Tris and Texas red were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France). DNA library was heated at 80°C for 10 min and left at room temperature for 20 min. The fluorescence anisotropy was calculated by the instrument software following the previously described equation:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

where I_{\parallel} and I_{\perp} are the vertically and horizontally polarized components of the emission after excitation by vertically polarized light. Each plate was filled with a mixture of Buffer, Texas Red labelled complementary primers, the digested supposed single stranded DNA, the non-digested double stranded DNA and the single stranded DNA library which is supposed to be identical to the digested strands (Figure 88).

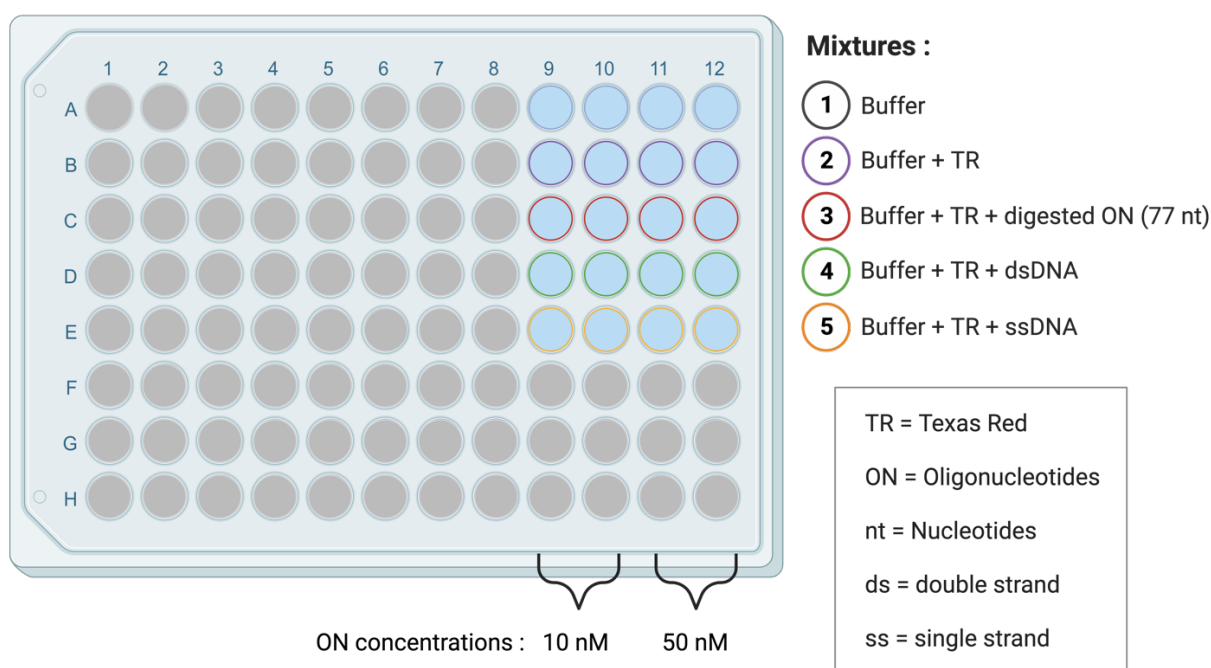


Figure 88 : Experimental setup for the fluorescence anisotropy measurements.

I. 6. Binding Affinity, cloning and sequencing

Four rounds of selection were performed and the progress of selection was monitored using non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures (NECEEM) to estimate the bulk affinity. Capillary conditions (length capillary, preconditioning, migration buffer, voltage, temperature) were identical to those used for the capillary electrophoresis aptamer selection (I.1), except for samples preparation. Each sample contained 10 nM of enriched DNA pools and fCD20 or fCD20 scramble was added to a concentration of 50 μ M. The enriched library from round 4 was chosen for cloning and illumina sequencing realized by Biofidal (Vaulx-en-Velin, France).

II. Surface Plasmon Resonance

II. 1. Materials and Equipment

SPR analyses were carried out on a Biacore T200 (GE Healthcare, Sweden). Gold sensorchips were obtained from the institut FEMTO-ST (Université de Besançon) and were cleaned by UV-ozone treatment using a UVO-Cleaner N°42-220 device (Jelight, Irvine, CA, USA). Ultrapure water is generated through a PureLab®flex (Elga LabWater, Wissous, France) water purification system.

The PBS tablets, (+)-sodium L-ascorbate, trisodium citrate, copper sulfate pentahydrate (CuSO₄, 5 H₂O), P80 (Tween®80 BioXtra), P20 (Tween®20 BioXtra), Sodium chloride, ethanol absolute ≥ 99,8% (GC), Dimethyl sulfoxide BioUltra ≥ 99,5% (GC), and the TBTA were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). The functionalized thiols (HS-(CH₂)₁₁-EG₆ azoture (MW = 493,7 g/mol), HS-(CH₂)₁₁-EG₄-OH (MW = 380,58 g/mol) were purchased from ProChimia surfaces (Gdansk, Pologne). The alkyne modified CD20 mimic (mCD20-alk) peptide, corresponding to the CD20 antigen major extracellular loop (N163-Q187) as well as its scramble version (mCD20-alk scbl) were synthesized by Smart Bioscience (Saint-Egrève, France). The rituximab (RTX) (MabThera) was obtained from Genentech (Groupe Roche, Etats-Unis).

II. 2. General procedure for the sensor chips functionalization using CUAAC click chemistry.

II.2.1 Reaction Mixture for the click chemistry:

TBTA (0.5mg) was dissolved in 500 µl of DMSO (1.89mM) and CuSO₄ (0,5mg) was dissolved in 500 µl (4,01 mM) of ultrapure water under sonication for 5 min. 92,74 µl of a TBTA solution were mixed with 43,70 µl of the CuSO₄ solution, and 0,208 mg of Sodium ascorbate was added and completed with 82,26 µl of DMSO. This solution A composed of TBTA (0,8 mM), CuSO₄ (0,8 mM) and sodium ascorbate (4,8 mM) was sonicated for 10 min. Simultaneously, 10 nmoles aliquots of mCD20-alk and mCD20-alk scbl were solubilized into 18,76 µl (0,533 mM) of ultrapure water with an adjusted pH (around 8) after addition of Sodium hydroxyde. Both solutions B and B' were sonicated for 10 mins. Finally, 31,24 µl of solution A was added to

each solutions B and B' (one per flow cell) with a final volume of 50 μl . Final composition of the mix is: peptides (200 μM), CuSO_4 (500 μM), TBTA (500 μM), sodium ascorbate (3 mM) into DMSO/ H_2O (1:1, v:v).

II.2.2 Sensor chips pre-treatment:

Sensor chips were cleaned by UV-ozone treatment during 10 min after being rinsed with ultra-pure water and ethanol. The cleaned gold surfaces were then functionalized according to the following procedure. Five minutes maximum after the UV-ozone treatment, the gold surfaces were immersed overnight at room temperature in a thiol mixture of varying percentages of HS-(CH₂)₁₁-EG6-N₃ and HS-(CH₂)₁₁-EG4-OH (1 mM total thiol concentration in ethanol). After the formation of this, mixed self-assembled monolayers (SAMs), sensor chips were rinsed with ethanol and blow-dried with nitrogen gas. The surfaces were then inserted in the Biacore T200 device with a manual flow of 2 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ of ultra-pure water as a rinsing step until the signal was stable.

II.2.3 « *In situ* » covalent peptide grafting by CuAAC

Maintaining the same manual flow, CuAAC reactants solutions as described in the chapter II.2. were injected on four different channels. Indeed, the azide-alkyne cycloaddition permitted the covalent grafting of fCD20 scramble on channel 1 and/or 3 as the references, and fCD20 on channel 2 and 4. Because the microfluidic system is sensitive to high concentrations of DMSO, the time of injection was controlled and ranging between 200 and 480s for each channel. The large changes of solution refractive index during the injections prevent monitoring of the grafting process in real-time. However, the quantity of immobilized antigen could be evaluated by comparing the shifts in resonance units before and after the injection.

II. 3. Kinetics studies with the rituximab as a positive control

Binding assays were conducted using a flow rate of 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ at 25 °C. RTX was dissolved into a running buffer (RB) composed of PBS 1X, citrate 3mM, P80 0,005%. 120 μl of each RTX concentrations: 10, 100 and 1000 nM were injected into each channel. A regeneration step was necessary between each RTX injection, and was performed by injecting a solution of

Glycine-HCl (10 mM, pH 2) for 10 s. Prior to curve fitting analysis, the binding sensorgrams were double-referenced using reference flow cell 1 or 3 and preceding buffer blank subtractions to remove the nonspecific adsorption of RTX and the change in refractive index, respectively. The binding rate constants of CD20/RTX interactions were calculated by a nonlinear analysis of the association and dissociation phases using the SPR kinetic evaluation software of Biacore T200 (evaluation Software 2.0.1). The data were fitted using a heterogeneous ligand model, which provides the best fitting. The stability of the fCD20-functionalized surfaces was checked by achieving regular RTX injections at 1 μ M, 100 nM and 10 nM at different times of the binding assays.

II. 4. Kinetics studies with the aptamers

Binding assays were conducted using the conditions described previously (II.3) except that two running buffers were used: the TGK buffer described previously (I.1) or the PBS buffer (II.3). 120 μ l of each aptamers concentrations: 25, 50, 100, 200 and 400 μ M were injected into each channel.

III. ITC measurements

ITC experiments were performed with a MicroCal PEAQ-ITC isothermal titration calorimeter from Malvern (Palaiseau, France) and the data were analyzed using the software Origin (Microcal Analysis Origin Launcher). Aptamers and targets were dissolved in TGK Buffer (see previous section for binding buffer composition) at pH 7.4. Experiments were carried out in a microcalorimeter cell (300 μL) containing the aptamers (150 μM) at 25°C. Conditions are presented in Table 22. A total of 19 injections of 2 μL of sCD20 or sCD20 scramble (2 mM) were performed. At least two independent titrations were run. The experimental data were fitted to a theoretical titration curve using the Microcal PEAQ-ITC analysis software, with ΔH (enthalpy change), K_a (association constant), and N (number of binding sites per monomer) as adjustable parameters. Dissociation constant (K_d), free energy change (ΔG), and entropy contributions ($T\Delta S$) were derived from the equation $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -R \cdot T \cdot \ln(K_a)$ (where T is the absolute temperature and $R = 8.314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ and $K_a = 1/K_d$). Two or three independent titrations were performed for each tested ligand.

Table 22: Experimental conditions for the ITC measurements.

Cell temperature:	25°C
Ref. Power:	10 $\mu\text{cal/s}$
Feedback:	High
Stir speed:	750 rpm
Initial delay:	60 s
Number of injections:	20
Volume per injection:	1 st : 0.2 μL 2 nd -20 th : 2 μL
Injection time:	1 st : 0.4 s 2 nd -20 th : 4 s
Spacing between two injections:	120 s
Equilibration time:	10 min
Acquisition time:	prox. 1h

IV. Flow cytometry

Cell lines, Raji (Burkitt's lymphoma) and Jurkat (T lymphocyte) were purchased from the American Type Culture Collection. All of the cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented 10% fetal bovine serum (heat-inactivated; Invitrogen). Flow cytometry experiments were conducted on an Attune NxT cytometer from ThermoFisher. Excitation was set at 488 or 640, and emission was collected with a BL1 530/30 or a RL1 670/14 bandpass filters for the Alexa 488- and Cy5-tagged oligonucleotides, respectively. The data were then treated using the FSC Express 6 software.

All the *in vitro* experiments were done using either RPMI 1640 or PBS buffers (ThermoFisher) as binding buffer and as washing buffer. The temperature was set at 4°C or 25°C. Affinity of each construct was evaluated by incubating Raji or Jurkat cells ($2 \cdot 10^5$) with a series of Cy5-labeled aptamers in a 50 μ l of binding buffer at 4°C or room temperature. Different incubation times were tested from 40 to 15 minutes. Cells were then washed with 200 μ l of wash buffer and resuspended in 200 μ l of wash buffer. The binding of the aptamer was analyzed using flow cytometry by counting 20 000 events. As a positive control, a similar assay was performed using an Alexa 488-labeled anti-CD20 antibody (Biolegend).

V. Peptide Synthesis

V. 1. Materials and Equipment

Protected amino acids were obtained from Activotec (Cambridge, UK), Bachem Biochimie SARL (Voisins-les-Bretonneux, France), France Biochem SA (Meudon, France), Merck Eurolab (Fontenay-sous-Bois, France) or Calbiochem-Novabiochem (Merck Biosciences - VWR, Limonest, France). PyBOP[®] was purchased from Calbiochem-Novabiochem. Trizma base (tris) and all the reagents for acrylamide gel preparation were from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Other reagents were obtained from Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), Acros (Noisy-le-Grand, France) and Eurogentec (Angers, France). All solvents and reagents used were of highest purity commercially available.

The course of reactions was monitored by using an Esquire 3000 spectrometer from Bruker or on an Acquity UPLC-MS system from Waters equipped with a SQ Detector 2. It includes reverse phase chromatography using Nucleosil C18 column (130 Å, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm) and detection by UV at 214 nm and 250 nm and by electron spray ionization mass spectrometry. A 0.6 mL/min flow linear gradient from 95% solvent A (0.1% formic acid in water) and 5% solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile) to 100% B for 2,3 minutes was applied.

RP-HPLC purifications were performed on a Gilson system with Nucleosil C18 column (100 Å, 250 x 21 mm, 7 µm) with UV monitoring at 214 nm and 250 nm. A 22 mL/min flow linear gradient was applied from 95% solvent A (0.1% TFA in water) and 5% solvent B (0.1% TFA in acetonitrile) to 100% B1 for 15 minutes.

MALDI-Tof mass spectra were performed on an Autoflex Bruker using hydropiccolinic acid (HPA, 45 mg; ammonium citrate 4 mg in 500 µL H₂O/CH₃CN) as matrix. Peptides were analyzed in positive mode and oligonucleotides and conjugates in negative mode. Water was of Milli-Q quality and was obtained after filtration of distilled water through a Milli-Q[®] cartridge system.

V. 2. General procedure for linear protected peptides synthesis by SPPS.

V.2.1 First coupling on 2-Chlorotrityl resin.

fCD20 and fCD20 scramble peptides were synthesized using commercially available 2-Chlorotrityl resin (theoretical loading of 1.52 mmol/g) The resin was weighed (up to 1 g) and added to the reactor, then gently stirred with an orbital laboratory agitator (IKA Vibrax VXR basic, USA). To promote the swelling of the resin, the latter was stirred in anhydrous DCM (10 mL per gram of resin) for 10 minutes. After the swelling phase, DCM was removed and the resin was stirred for 10 additional minutes in anhydrous DMF. Fmoc-Gly-OH (3 eq) was coupled on the 2-Chlorotrityl resin in anhydrous DCM in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass. pH 8 was adjusted using DIEA. The mixture was stirred for 40 min at room temperature. The resin was then washed using a DCM/MeOH/DIEA solution (17/2/1, v/v/v). Fmoc protecting group was removed using three washes with 20% piperidine in DMF.

The experimental loading was monitored by quantification of free dibenzofulvene using UV absorbance at 299 nm using the following equation:

$$\text{Loading} = \frac{\left(25 \cdot \frac{A}{\epsilon \cdot l}\right) \cdot 0.1}{m_{\text{resin}}}$$

with $l = 1\text{cm}$ (the length of the cuvette) and $\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Before proceeding the coupling phase, the resin was then washed 5 times for 10 minutes with DMF, in order to remove piperidine traces.

V.2.2 First coupling on Gly-Sasrin™ resin.

Cyclic peptidic scaffolds for conjugation were synthesized using commercially available pre-loaded Fmoc-Gly-Sasrin™ resin (theoretical loading of 0.5 to 0.8 mmol/g). The resin was weighed (up to 1 g) and added to the reactor, then gently stirred with an orbital laboratory agitator (IKA Vibrax VXR basic, USA). To promote the swelling of the resin, the latter was stirred in DCM (10 mL per gram of resin) for 10 minutes. After the swelling phase, DCM was removed and the resin was stirred for 10 additional minutes in DMF. The resin was then

treated 3 times for 10 min. with a 20% piperidine solution in DMF, to remove the -Fmoc protecting groups. The experimental loading was monitored as described previously (VI2.2).

V.2.3 Elongation steps following the Fmoc/tBu strategy.

Regardless of the resin, the elongation was performed using the Fmoc/tBu strategy on the above-prepared resins. Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Alloc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, and Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH and Fmoc-Tyr(tBu)-OH were commercially available. Fmoc-Lys(pentynoyl)-OH was obtained using reported protocol REF.

Supported peptides on 2-Chlorotrityl resin were cleaved from the resin using a TFA/H₂O/TIS solution (95/2.5/2.5, v/v/v) treated 3 times for 10 min to remove Trt, tBu and Boc protecting groups simultaneously. The solution was evaporated under vacuum and the peptides were precipitated in ether as a white powder.

Supported peptides on Gly-SasrinTM resin were cleaved from the resin using a DCM/TFA/ solution (99/1 v/v) treated 10 times for 4 min. The solution was evaporated under vacuum and the peptides were precipitated in ether as a white powder.

V. 3. General procedure for Head-to-tail cyclisation reaction

Linear peptides were dissolved in DMF to reach a $0.5 \cdot 10^{-3}$ M concentration and 1.2 eq of PyBOP was added. The pH was adjusted to 8-9 using DIEA and the solution was stirred at room temperature until the complete peptide cyclisation (UPLC monitoring). The solvent was evaporated under vacuum then the crude peptides were precipitated in ether. The crude products were purified on RP-HPLC and freeze-dried to obtain a white powder. The crude product was used without purification.

V. 4. General procedure for Side-chain-to-side-chain cyclisation reaction.

After cleavage and removal of protecting groups, disulfide bridge formation of peptides (500 μ M) was performed under mild oxidative conditions (0.1 M TrisBase, 5% DMSO, 20 mM guanidine) during 24 hours. Peptides were then purified by Reverse-Phased High-Pressure

Liquid Chromatography (RP-HPLC) using a Nucleosil® C18 column (, 7 μ m, 250 \times 21 mm) under a 10–60% ACN linear gradient containing 0.1% TFA. Correct oxidation of the peptides was checked by ESI+ or MALDI mass spectrometry.

V. 5. General procedure for Boc, tBu and Trt protecting groups removal.

Peptides were dissolved in TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v) solution and the mixture was stirred for 40h at room temperature. The solvent was then evaporated under vacuum and the crude peptides were precipitated in ether as a white powder. The crude product was used without purification.

V. 6. General procedure for the coupling of Ethoxyethylideneaminoxy linker on peptides.

The crude peptides were dissolved in 30 mL of DMF and the pH was adjusted to 8 using DIPEA. Then, 6 eq. of BocNH₂CH₂COOH and PyBOP were added to this solution. The reaction was stirred for 30 min at room temperature and then concentrated under diminished pressure. The crude product was triturated and washed with ether to yield peptide as a white powder.

V. 7. General procedure for Alloc protecting group removal.

The peptides were dissolved in anhydrous CH₂Cl₂/DMF (3/1) under argon for a final concentration of 10⁻² M. 100 equiv of Phenylsilane and 0.2 equiv. Of Pd(PPh₃)₄ were added under argon. The reaction was stirred under argon for 30 min at room temperature. The mixture was treated with 2 mL of methanol before evaporation of the solvents under reduced pressure. The residue was dissolved in a minimum of MeOH/ CH₂Cl₂ (1/1) then finally precipitated, triturated and washed with diethyl ether to obtain a white powder. This material was further used without additional purification.

V. 8. General procedure for oxyamine deprotection.

Peptides were dissolved in TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v) solution and the mixture was stirred for 40min at room temperature. The solvent was then evaporated under vacuum and the crude peptides were freeze-dried to obtain a white powder. The crude product was used without purification.

CD20:

Linear peptide **1b**

H-Asn-Ile-Tyr-Asn-Cys-Glu-Pro-Ala-Asn-Pro-Ser-Glu-Lys-Asn-Ser-Pro-Ser-Thr-Gln-Tyr-Cys-Tyr-Ser-Ile-Gln-OH

RP-UPLC: $t_R = 1.09$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{121}H_{181}N_{33}O_{43}S_2$: 2850.1 g/mol, m/z found: 2851.1 [M+H]⁺.

Cyclic peptide **1**

H-Asn-Ile-Tyr-Asn-Cys-Glu-Pro-Ala-Asn-Pro-Ser-Glu-Lys-Asn-Ser-Pro-Ser-Thr-Gln-Tyr-Cys-Tyr-Ser-Ile-Gln-OH

RP-UPLC: $t_R = 1.09$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{121}H_{179}N_{33}O_{43}S_2$: 2848.1 g/mol, m/z found: 2849.0 [M+H]⁺.

CD20 scramble:

Linear peptide **2b**

H-Ser-Ala-Thr-Asn-Cys-Asn-Ser-Glu-Tyr-Gln-Asn-Glu-Pro-Ser-Tyr-Ile-Pro-Tyr-Ser-Gln-Cys-Lys-Pro-Ile-Asn-OH

RP-UPLC: $t_R = 1.08$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{121}H_{181}N_{33}O_{43}S_2$: 2850.1 g/mol, m/z found: 2851.3 [M+H]⁺.

Cyclic peptide **2**

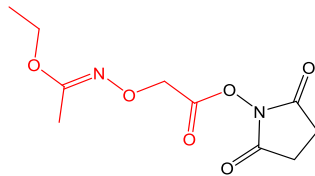
H-Ser-Ala-Thr-Asn-Cys-Asn-Ser-Glu-Tyr-Gln-Asn-Glu-Pro-Ser-Tyr-Ile-Pro-Tyr-Ser-Gln-Cys-Lys-Pro-Ile-Asn-OH

RP-UPLC: $t_R = 1.04$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

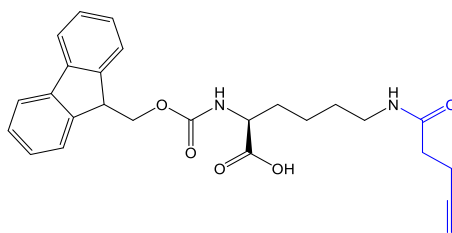
ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{121}H_{179}N_{33}O_{43}S_2$: 2848.1 g/mol, m/z found: 2849.4 [M+H]⁺.

Building Blocks :

N-Hydroxysuccinimidyl 2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetate



Fmoc-Lys(pentynoyl)-OH



Peptidic scaffolds: 2 oxyamine groups

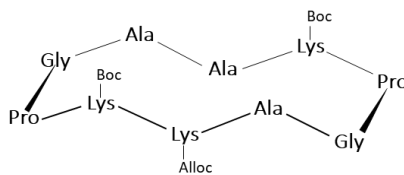
Linear peptide **3b**



RP-UPLC: $t_R = 1.3$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{55}H_{93}N_{13}O_{17}$: 1208.4 g/mol, m/z found: 1209.8 [M+H]⁺.

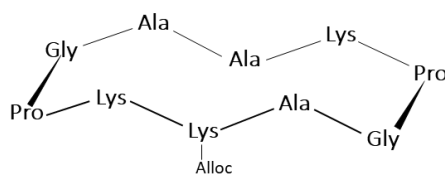
Cyclic peptide **3c**



RP-UPLC: $t_R = 1.6$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{55}H_{91}N_{13}O_{16}$: 1190.4 g/mol, m/z found: 1190.7 [M+H]⁺.

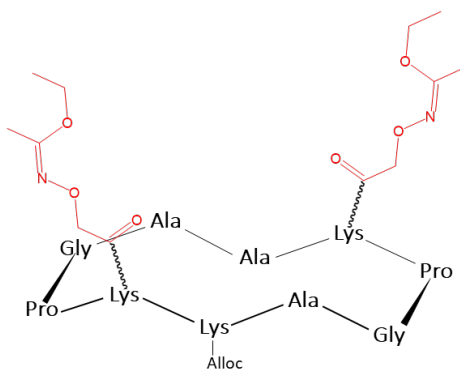
Cyclic peptide **3d**



RP-UPLC: $t_R = 0.9$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{45}H_{75}N_{13}O_{12}$: 990.2 g/mol, m/z found: 990.5 $[M+H]^+$.

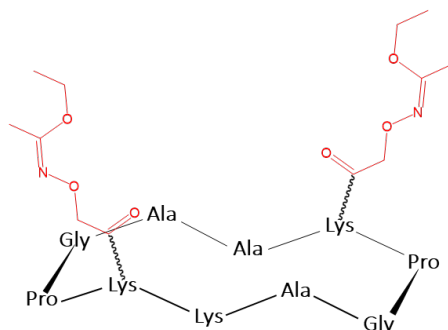
Cyclic peptide **3e**



RP-UPLC: $t_R = 1.5$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{57}H_{93}N_{15}O_{18}$: 1276.5 g/mol, m/z found: 1277.5 $[M+H]^+$.

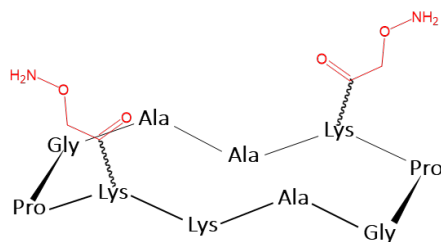
Cyclic peptide **3f**



RP-UPLC: $t_R = 1.2$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{53}H_{89}N_{15}O_{16}$: 1192.5 g/mol, m/z found: 1193,6 $[M+H]^+$.

Cyclic peptide **3**



RP-UPLC: $t_R = 0.9$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{45}H_{77}N_{15}O_{14}$: 1052.2 g/mol, m/z found: 1052,8 [M+H]⁺.

Peptidic scaffolds: 3 oxyamine groups

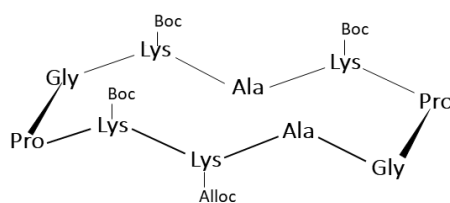
Linear peptide **4b**



RP-UPLC: $t_R = 1.4$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{63}H_{108}N_{14}O_{19}$: 1365.6 g/mol, m/z found: 1365.9 [M+H]⁺.

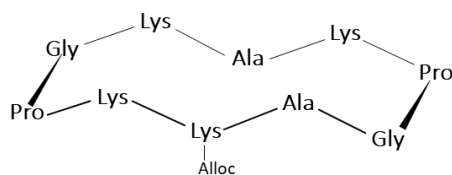
Cyclic peptide **4c**



RP-UPLC: $t_R = 1.8$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{63}H_{106}N_{14}O_{18}$: 1347.7 g/mol, m/z found: 1347.8 [M+H]⁺.

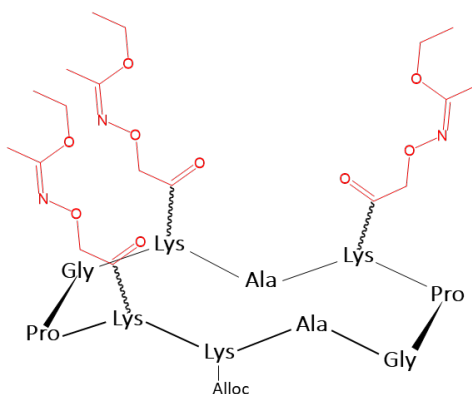
Cyclic peptide **4d**



RP-UPLC: $t_R = 1.0$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{48}H_{82}N_{14}O_{12}$: 1047.3 g/mol, m/z found: 1047.8 [M+H]⁺.

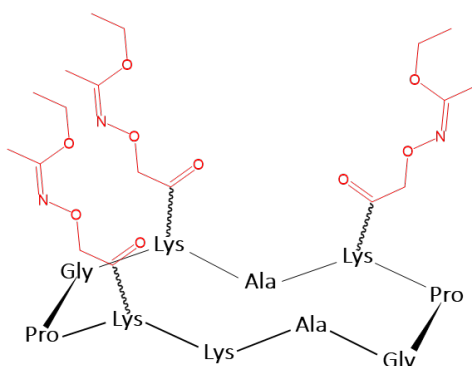
Cyclic peptide **4e**



RP-UPLC: $t_R = 1.7$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{66}H_{109}N_{17}O_{21}$: 1476.7 g/mol, m/z found: 1476.8 [M+H]⁺.

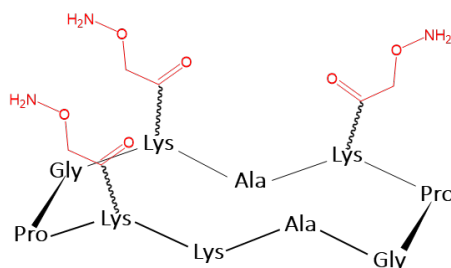
Cyclic peptide **4f**



RP-UPLC: $t_R = 1.4$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{62}H_{105}N_{17}O_{19}$: 1392.6 g/mol, m/z found: 1392,7 [M+H]⁺.

Cyclic peptide **4**

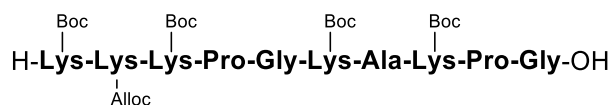


RP-UPLC: $t_R = 1.0$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{50}H_{87}N_{17}O_{16}$: 1182.4 g/mol, m/z found: 1183,2 [M+H]⁺.

Peptidic scaffolds: 4 oxyamine groups

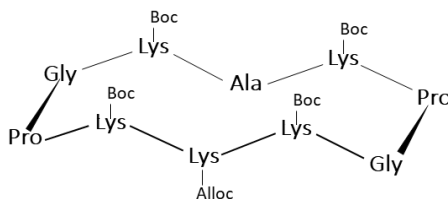
Linear peptide **5b**



RP-UPLC: $t_R = 1.6$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{71}H_{123}N_{15}O_{21}$: 1522.9 g/mol, m/z found: 1523.9 [M+H]⁺.

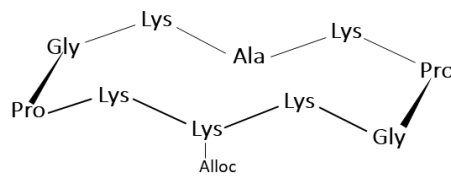
Cyclic peptide **5c**



RP-UPLC: $t_R = 2.0$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{71}H_{121}N_{15}O_{20}$: 1504.8 g/mol, m/z found: 1504.9 [M+H]⁺.

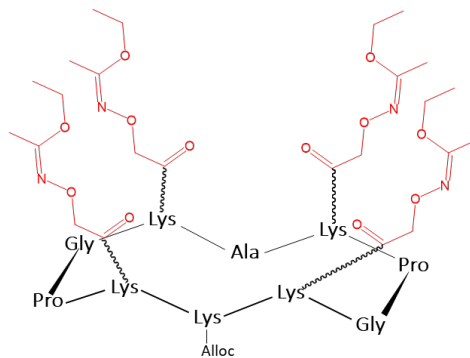
Cyclic peptide **5d**



RP-UPLC: $t_R = 0.9$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{51}H_{89}N_{15}O_{12}$: 1104.4 g/mol, m/z found: 1104.8 [M+H]⁺.

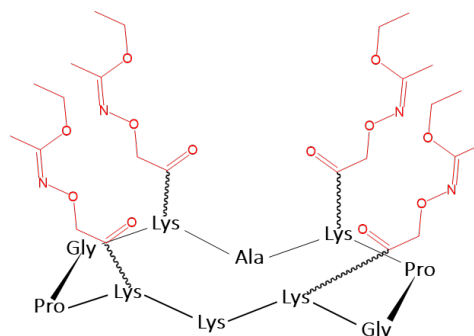
Cyclic peptide **5e**



RP-UPLC: $t_R = 1.8$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{75}H_{125}N_{19}O_{24}$: 1676.9 g/mol, m/z found: 1677.8 [M+H]⁺.

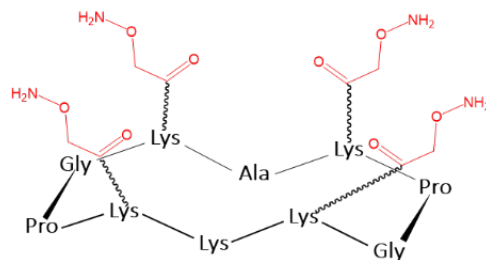
Cyclic peptide **5f**



RP-UPLC: $t_R = 1.6$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{71}H_{121}N_{19}O_{22}$: 1592.9 g/mol, m/z found: 1593,7 [M+H]⁺.

Cyclic peptide **5**



RP-UPLC: $t_R = 1.0$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{55}H_{97}N_{19}O_{18}$: 1312.5 g/mol, m/z found: 1312,8 [M+H]⁺.

Peptidic scaffolds: 1 alkyne and 1 oxyamine groups

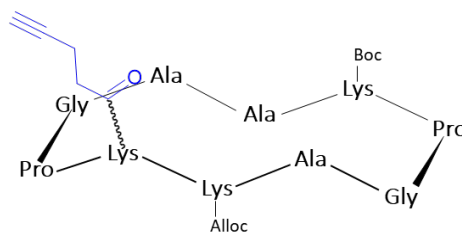
Linear peptide **6b**



RP-UPLC: $t_R = 1.2$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{54}H_{87}N_{13}O_{17}$: 1190.4 g/mol, m/z found: 1190.7 [M+H]⁺.

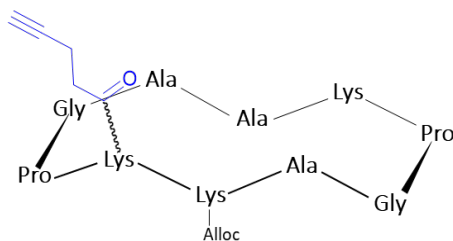
Cyclic peptide **6c**



RP-UPLC: $t_R = 1.4$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{54}H_{85}N_{13}O_{16}$: 1172.4 g/mol, m/z found: 1172.7 [M+H]⁺.

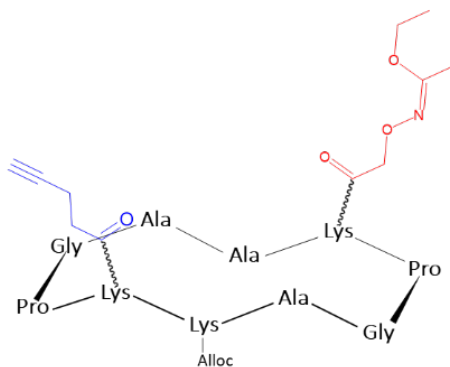
Cyclic peptide **6d**



RP-UPLC: $t_R = 1.1$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{49}H_{77}N_{13}O_{14}$: 1072.2 g/mol, m/z found: 1072.6 [M+H]⁺.

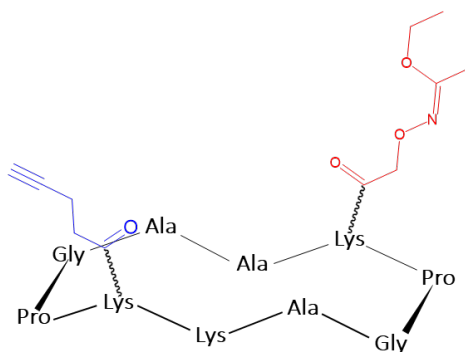
Cyclic peptide **6e**



RP-UPLC: $t_R = 1.4$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{55}H_{86}N_{14}O_{17}$: 1215.0 g/mol, m/z found: 1215.4 [M+H]⁺.

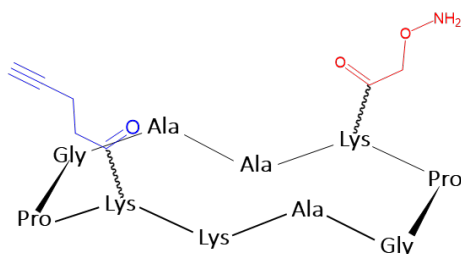
Cyclic peptide **6f**



RP-UPLC: $t_R = 1.1$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{51}H_{82}N_{14}O_{15}$: 1132.6 g/mol, m/z found: 1132,8 $[M+H]^+$.

Cyclic peptide **6**



RP-UPLC: $t_R = 0.9$ min (214 nm, 5-100% B 2.3 min)

ESI-MS (+): M_w calculated for $C_{47}H_{76}N_{14}O_{14}$: 1061.2 g/mol, m/z found: 1061,3 $[M+H]^+$.

VI. Oligonucleotides synthesis

DNA were prepared using β -cyanoethylphosphoramidite chemistry on a 3400 DNA synthesizer at 1 μ mol scale.

RP-UPLC-MS analyses were performed on a Waters UPLC system, it includes reverse phase chromatography using Nucleosil C18 column (130 Å, 2.1 x 50 mm, 1.7 μ m) with detection by UV at 260 nm and 280 nm, and by electron spray ionization mass spectrometry. A 0.3 mL/min flow linear gradient (0-30% D in 12.5 min) with solvent C (triethylamine (15mM) and hexafluoro-2-propanol (50mM) in water) and solvent D (triethylamine (15mM) and hexafluoro-2-propanol (50mM) in methanol) is used.

RP-HPLC analyses were performed on a Waters HPLC system using C18 Nucleosil column (Macherey-Nagel, 100 Å, 250 x 4.6 mm, 5 μ m) with UV-monitoring at 260 nm and 280 nm. A 1 mL/min flow linear gradient (0-30% F in 30 minutes) was applied. Solvent E (50 mM triethylammonium acetate buffer with 5% acetonitrile) and solvent F (acetonitrile with 5% water) were used.

The RP-HPLC purifications of oligonucleotides were performed on a Gilson system with Nucleosil C-18 column (Macherey-Nagel, 100 Å, 250 x 10 mm, 7 μ m) using 4 mL/min with UV-monitoring at 260 nm and 280 nm. Solvent E and F were used. Desalting of oligonucleotide was performed by Size Exclusion Chromatography (SEC) on Nanosep 10K using manufacturer's protocol. Quantification of oligonucleotides was performed at 260 nm using Nanodrop.

VI. 1. General procedure for DNA synthesis

After DMTr-ON synthesis, cleavage from the resin was performed in a methylamine 40% aqueous solution for 30 min at 60°C. The product was purified on RP-HPLC then desalted and freeze-dried. The DMT protecting groups was then removed using in 80% aqueous acetic acid solution for 30 min at room temperature. The removed DMT residues are then separated from the oligonucleotides *via* a liquid-liquid extraction step using diethyl ether and water. Quantification of oligonucleotides was performed at 260 nm using a Nanodrop device.

VI. 2. General procedure for 3'-diol DNA oxidation

To perform the oxidation of the 3'-diol into 3'-aldehyde, 30 eq of sodium periodate were added to an aqueous solution containing the DNA. The final concentration of oligonucleotides is 10^{-3} M. The mixture was stirred for 30 min at room temperature. Excess of NaIO_4 was then removed by SEC. The oxidation was considered quantitative and the crude oligonucleotide was used for oxime ligation without further purification.

Apta°1-F1:

5' DMT-3' diol-Apta°1-F1 **7a**



RP-UPLC: $t_R = 7.6$ min (214 nm, 5-100% D 12.5 min)

ESI-MS (-): M_w calculated for $C_{520}H_{650}N_{191}O_{314}P_{51}$: 16179.5 g/mol, m/z found: 16180,0 [M-H]⁻.

3' diol-Apta°1-F1 **7b**



RP-UPLC: $t_R = 5.8$ min (214 nm, 5-100% D 12.5 min)

ESI-MS (-): M_w calculated for $C_{499}H_{632}N_{191}O_{312}P_{51}$: 15877.1 g/mol, m/z found: 15877,2 [M-H]⁻.

3' aldehyde-Apta°1-F1 **7**



RP-UPLC: $t_R = 5.8$ min (214 nm, 5-100% D 12.5 min)

ESI-MS (-): M_w calculated for $C_{498}H_{628}N_{191}O_{311}P_{51}$: 15845.1 g/mol, m/z found: 15846,0 [M-H]⁻.

Apta°2-F1:

5' DMT-3' diol-Apta°2-F1 8a



RP-UPLC: t_R = 7.8 min (214 nm, 5-100% D 12.5 min)

ESI-MS (-): M_w calculated for $C_{497}H_{621}N_{169}O_{295}P_{48}$: 15169.0 g/mol, m/z found: 15169,3 [M-H].

3' diol-Apta°2-F1 8b



RP-UPLC: t_R = 6.1 min (214 nm, 5-100% D 12.5 min)

ESI-MS (-): M_w calculated for $C_{476}H_{603}N_{169}O_{293}P_{48}$: 14866.6 g/mol, m/z found: 14867,0 [M-H].

3' aldehyde-Apta°2-F1 8



RP-UPLC: t_R = 6.0 min (214 nm, 5-100% D 12.5 min)

ESI-MS (-): M_w calculated for $C_{475}H_{599}N_{169}O_{292}P_{48}$: 14834.5 g/mol, m/z found: 14835,0 [M-H].

VII. Conjugate synthesis

RP-UPLC-MS analyses were performed on a Waters UPLC system. It includes reverse phase chromatography using Nucleosil C18 column (130 Å, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm) with detection by UV at 260 nm and 280 nm, and by electron spray ionization mass spectrometry. A 0.3 mL/min flow linear gradient (0-30% D in 12.5 min) with solvent C (triethylamine (15mM) and hexafluoro-2-propanol (50mM) in water) and solvent D (triethylamine (15mM) and hexafluoro-2-propanol (50mM) in methanol) is used.

RP-HPLC analyses were performed on a Waters HPLC system using C18 Nucleosil column (Macherey-Nagel, 100 Å, 250 x 4.6 mm, 5 µm) with UV-monitoring at 260 nm and 280 nm. A 1 mL/min flow linear gradient (0-30% F in 30 minutes) was applied. Solvent E (50 mM triethylammonium acetate buffer with 5% acetonitrile) and solvent F (acetonitrile with 5% water) were used.

Quantification of oligonucleotides was performed at 260 nm using Nanodrop apparatus (molar extinction $\epsilon_{260\text{nm}}$ was estimated according to the nearest neighbor model).

VII. 1. General procedure for the oxime bound formation

Oligonucleotide Apta°1-F1 (180 nmoles) was dissolved in 0.4 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) and peptide **3** (in excess) was added. The solution was stirred at room temperature. The reaction is followed by UPLC-MS. The product was purified on RP-HPLC and freeze-dried.

VII. 2. Gel electrophoresis

All the reagents for acrylamide gel preparation were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

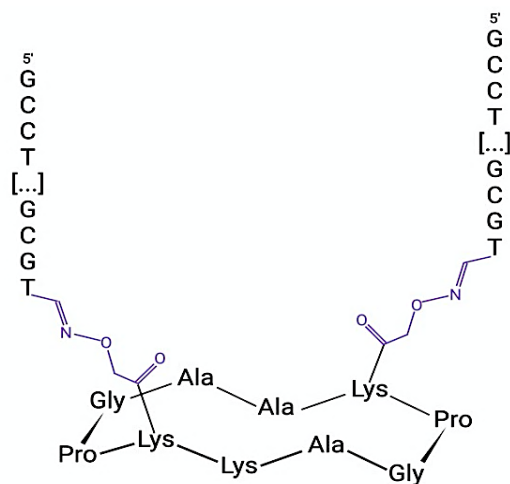
The samples were resolved on a 12% acrylamide gel at an applied voltage of 300 V. The band corresponding to the selected aptamers migrated with a slower velocity than the 77 bases oligonucleotides used as a witness, and was visualized by UV-shadow method at 254 nm. After that, it was cut and eluted for 25 minutes using an electro-eluting device. Elution was

performed using TBE Buffer (45 mM of Tris Borate and 1 mM of EDTA; pH= 8.3) under a 220 V (10 mA) voltage.

Desalting of oligonucleotide was performed by Size Exclusion Chromatography (SEC) on Nanosep 10K using manufacturer's protocol. Quantification of oligonucleotides was performed at 260 nm using Nanodrop apparatus (molar extinction $\epsilon_{260\text{nm}}$ was estimated according to the nearest neighbor model).

Dimeric Apta°1-F1 construct:

Conjugate 9



Gel electrophoresis (12% acrylamide gel; 300 V, 30 min)

ESI-MS (-): M_w calculated for $C_{1041}H_{329}N_{397}O_{634}P_{102}$: 32706.2 g/mol, m/z found: 32993.0 [M-H]⁻ (Mass + salts: 4Na⁺ and 5K⁺).

Annexes

A. Publications

1) Cossu, J.; Thoreau, F.; Boturyn, D. Multimeric RGD-Based Strategies for Selective Drug Delivery to Tumor Tissues. *Pharmaceutics* **2023**, *15* (2), 525. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020525>.

2) Cossu, J.; Ravelet, C.; Frachet, V.; Peyrin, E.; Boturyn D. Selection and characterization of aptamers for the selective recognition of CD20-expressing cells. *Chemistry - A European Journal*. **Manuscrit en préparation.**

B. Communications

a) Posters

Congrès Internationaux :

° **Aptamers 2022 - Oxford , UK (April, 2022)**

Selection and characterization of single-stranded DNA aptamers against the CD20 antigen.

Jordan Cossu, Corinne Ravelet, Eric Peyrin et Didier Boturyn

° **22nd GFPP/BPGM5 2022 - Port-Leucate , FR (June, 2022)**

Design, synthesis and characterization of monoclonal antibody mimics.

Jordan Cossu, Corinne Ravelet, Eric Peyrin et Didier Boturyn

° **International Oligonucleotides and Peptides Conference- Milan, IT (June, 2022)**

Selection and characterization of single stranded DNA aptamers against the CD20 antigen.

Jordan Cossu, Véronique Frachet, Corinne Ravelet, Eric Peyrin et Didier Boturyn

Congrès Nationaux:

° **EDCSV Ph.D. Day-Grenoble, FR (June, 2022)**

Design, synthesis and characterization of monoclonal antibody mimics.

Jordan Cossu, Corinne Ravelet, Eric Peyrin et Didier Boturyn

° **EUR CBS Poster Session-Grenoble, FR (July, 2022)**

Design, synthesis and characterization of monoclonal antibody mimics.

Jordan Cossu, Corinne Ravelet, Eric Peyrin et Didier Boturyn

b) **Communications orales**

Congrès Internationaux :

° **Aptamers 2022 - Oxford , UK (April, 2022)**

Selection and characterization of single-stranded DNA aptamers against the CD20 antigen.

Jordan Cossu, Corinne Ravelet, Eric Peyrin et Didier Boturyn

° **22nd GFPP/BPGM5 2022 - Port-Leucate , FR (June, 2022)**

Design, synthesis and characterization of monoclonal antibody mimics.

Jordan Cossu, Corinne Ravelet, Eric Peyrin et Didier Boturyn

° **eAdvances in Pharmaceutical Analysis 2022 - Nancy, FR (June, 2022)**

Selection and characterization of single-stranded DNA aptamers against the CD-20 antigen.

Jordan Cossu, Corinne Ravelet, Eric Peyrin et Didier Boturyn

(Prix de la meilleure communication orale)

° **International Oligonucleotides and Peptides Conference- Milan, IT (June, 2022)**

Selection and characterization of single stranded DNA aptamers against the CD20 antigen.

Jordan Cossu, Véronique Frachet, Corinne Ravelet, Eric Peyrin et Didier Boturyn

Congrès Nationaux :

° **Journées Scientifiques du GDR ChémoBio - Grenoble (October, 2021)**

Design, synthesis and characterization of monoclonal antibody mimics.

Jordan Cossu, Laure Bar, Liliane Coche-Guérente et Didier Boturyn

° Arcane Scientific Day 2023 - Grenoble, FR (May, 2023)

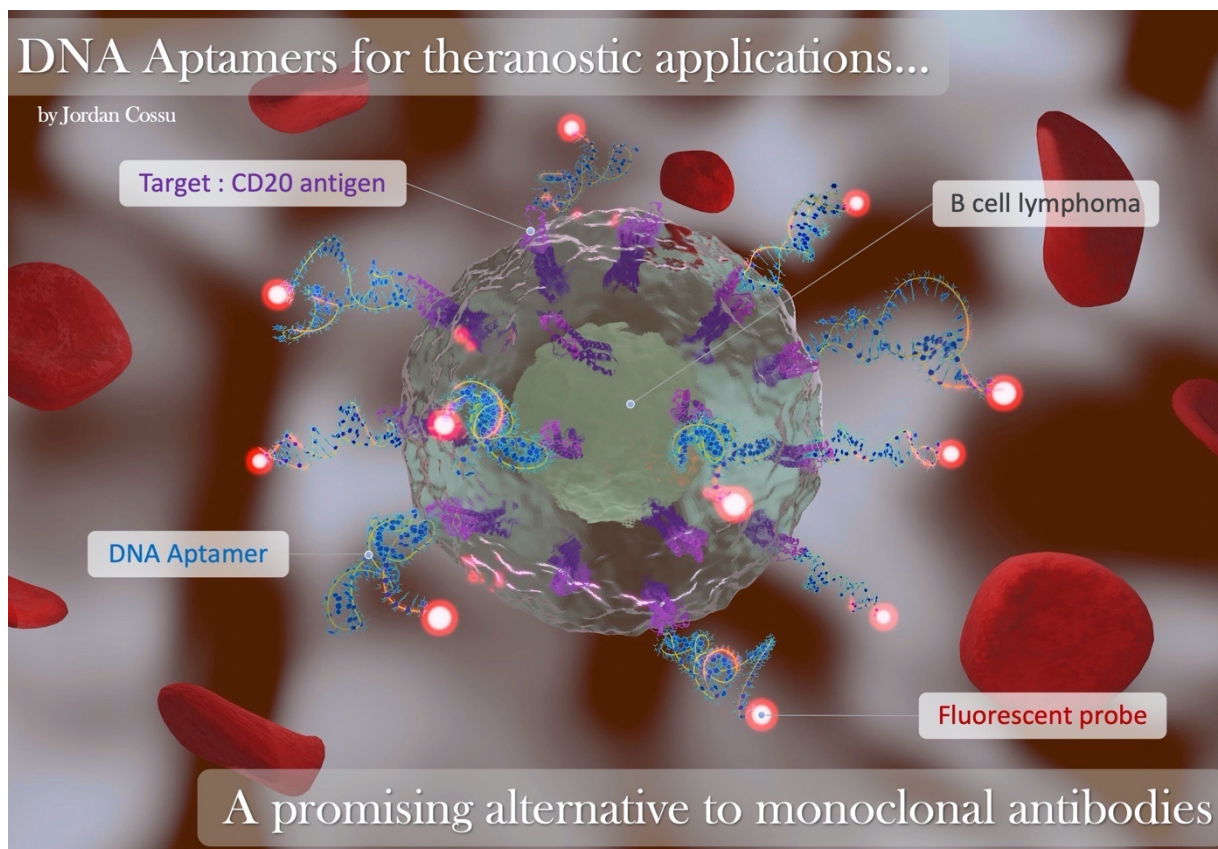
Selection and characterization of single-stranded DNA aptamers against the CD-20 antigen.

Jordan Cossu, Véronique Frachet, Corinne Ravelet, Eric Peyrin et Didier Boturyn

(Prix de la meilleure communication orale)

c) « Graphical Abstract »

° Participation au concours « Graphical Abstract » / Labex ARCANE — Février 2023



Références Bibliographiques

- (1) Landgraf, W.; Sandow, J. Recombinant Human Insulins – Clinical Efficacy and Safety in Diabetes Therapy. *Eur. Endocrinol.* **2016**, *12* (1), 12–17. <https://doi.org/10.17925/EE.2016.12.01.12>.
- (2) Immunowatch-Edition-6-ADC.Pdf. <https://www.mabdesign.fr/wp-content/uploads/2023/03/Immunowatch-Edition-6-ADC.pdf> (accessed 2023-08-10).
- (3) Chames, P.; Van Regenmortel, M.; Weiss, E.; Baty, D. Therapeutic Antibodies: Successes, Limitations and Hopes for the Future. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157* (2), 220–233. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x>.
- (4) *Incidence nationale des cancers en 2023 - Incidence et mortalité des cancers.* <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Les-donnees-sur-les-cancers/Incidence-et-mortalite-des-cancers/Incidence-nationale-des-cancers-en-2023> (accessed 2023-08-03).
- (5) Estimations Nationales de l'incidence et de La Mortalité Par Cancer En France Métropolitaine Entre 1990 et 2018.
- (6) *Traitements contre le cancer - Combattre la maladie - Prévention - ARTAC.* https://www.artac.info/fr/prevention/combattre-la-maladie/traitements-contre-le-cancer_000068.html (accessed 2023-08-03).
- (7) Pardoll, D. M. The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12* (4), 252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>.
- (8) Camacho, L. H. CTLA-4 Blockade with Ipilimumab: Biology, Safety, Efficacy, and Future Considerations. *Cancer Med.* **2015**, *4* (5), 661–672. <https://doi.org/10.1002/cam4.371>.
- (9) *Les thérapies ciblées, qu'est-ce que c'est ? - Le traitement des personnes atteintes d'un cancer Regarder les cancers autrement.* <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Regarder-les-cancers-autrement/Le-traitement-des-personnes-atteintes-d-un-cancer/Les-therapies-ciblees-qu-est-ce-que-c-est> (accessed 2023-08-04).
- (10) *Thérapies ciblées anticancéreuses (1/2) - EM consulte.* <https://www.em-consulte.com/article/975020/therapies-ciblees-anticancereuses%C2%A012> (accessed 2023-08-04).
- (11) Dreyer, C.; Raymond, E.; Faivre, S. Les thérapies ciblées et leurs indications dans les tumeurs solides. *Rev. Médecine Interne* **2009**, *30* (5), 416–424. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2008.12.022>.
- (12) Lee, Y. T.; Tan, Y. J.; Oon, C. E. Molecular Targeted Therapy: Treating Cancer with Specificity. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *834*, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.034>.
- (13) Ferrara, N.; Hillan, K. J.; Novotny, W. Bevacizumab (Avastin), a Humanized Anti-VEGF Monoclonal Antibody for Cancer Therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *333* (2), 328–335. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.132>.
- (14) Gm, K. Bevacizumab: A Review of Its Use in Advanced Cancer. *Drugs* **2014**, *74* (16). <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0302-9>.
- (15) Mentzer, S. J.; Wilson, R. E.; Burakoff, S. J.; Herrmann, S. H. Membrane-Bound Anti-CD3

Monoclonal Antibodies Trigger Cytolytic T-Lymphocyte-Mediated Tumor Lysis. *Arch. Surg. Chic. Ill 1960* **1988**, 123 (10), 1280–1285. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1988.01400340106019>.

(16) Watier, H. [From the ancient serotherapy to naked antibodies: a century of successful targeted therapies]. *Med. Sci. MS* **2009**, 25 (12), 999–1009. <https://doi.org/10.1051/medsci/20092512999>.

(17) Kindt, T. J.; Goldsby, R. A.; Osborne, B. A.; Kuby, J. *Kuby Immunology*; W. H. Freeman, 2007. (PDF accessed 2023-06-03).

(18) Lobo, E. D.; Hansen, R. J.; Balthasar, J. P. Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *J. Pharm. Sci.* **2004**, 93 (11), 2645–2668. <https://doi.org/10.1002/jps.20178>.

(19) Goulet, D. R.; Atkins, W. M. Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. *J. Pharm. Sci.* **2020**, 109 (1), 74–103. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.031>.

(20) Adams, G. P.; Weiner, L. M. Monoclonal Antibody Therapy of Cancer. *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23 (9), 1147–1157. <https://doi.org/10.1038/nbt1137>.

(21) Coley WB. The Treatment of Malignant Tumors by Repeated Inoculations of Erysipelas. *J. Am. Med. Assoc.* **1893**, XX (22), 615. <https://doi.org/10.1001/jama.1893.02420490019007>.

(22) Hopton Cann, S. A.; van Netten, J. P.; van Netten, C. Dr William Coley and Tumour Regression: A Place in History or in the Future. *Postgrad. Med. J.* **2003**, 79 (938), 672–680.

(23) Coley, W. B. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus Erysipelas and the Bacillus Prodigiosus). *Proc. R. Soc. Med.* **1910**, 3 (Surg Sect), 1–48.

(24) Parish, C. R. Cancer Immunotherapy: The Past, the Present and the Future. *Immunol. Cell Biol.* **2003**, 81 (2), 106–113. <https://doi.org/10.1046/j.0818-9641.2003.01151.x>.

(25) Köhler, G.; Milstein, C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* **1975**, 256 (5517), 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>.

(26) Klee, G. G. Human Anti-Mouse Antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2000**, 124 (6), 921–923. <https://doi.org/10.5858/2000-124-0921-HAMA>.

(27) Reichert, J. M.; Rosensweig, C. J.; Faden, L. B.; Dewitz, M. C. Monoclonal Antibody Successes in the Clinic. *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23 (9), 1073–1078. <https://doi.org/10.1038/nbt0905-1073>.

(28) Baldo, B. A. Immune- and Non-Immune-Mediated Adverse Effects of Monoclonal Antibody Therapy: A Survey of 110 Approved Antibodies. *Antibodies* **2022**, 11 (1), 17. <https://doi.org/10.3390/antib11010017>.

(29) Scott, A. M.; Wolchok, J. D.; Old, L. J. Antibody Therapy of Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, 12 (4), 278–287. <https://doi.org/10.1038/nrc3236>.

(30) Mitoma, H.; Horiuchi, T.; Tsukamoto, H.; Ueda, N. Molecular Mechanisms of Action of Anti-TNF- α Agents - Comparison among Therapeutic TNF- α Antagonists. *Cytokine* **2018**, 101, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.014>.

- (31) Khoj, K.; Mariotte, D.; Defer, G.; Petit, G.; Toutirais, O.; Le Mauff, B. Natalizumab in Multiple Sclerosis Treatment: From Biological Effects to Immune Monitoring. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 549842. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.549842>.
- (32) Braster, R.; O'Toole, T.; Egmond, M. Myeloid Cells as Effector Cells for Monoclonal Antibody Therapy of Cancer. *Methods San Diego Calif* **2013**, *65*. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.06.020>.
- (33) van de Donk, N. W. C. J.; Usmani, S. Z. CD38 Antibodies in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Modes of Resistance. *Front. Immunol.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02134>.
- (34) Weiner, G. J. Rituximab: Mechanism of Action. *Semin. Hematol.* **2010**, *47* (2), 115–123. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2010.01.011>.
- (35) Johnson, P.; Glennie, M. The Mechanisms of Action of Rituximab in the Elimination of Tumor Cells. *Semin. Oncol.* **2003**, *30* (1 Suppl 2), 3–8. <https://doi.org/10.1053/sonc.2003.50025>.
- (36) *Lymphome non hodgkinien : points clés - Lymphome non hodgkinien*. <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Lymphome-non-hodgkinien/Points-cles> (accessed 2023-08-08).
- (37) Binder, M.; Otto, F.; Mertelsmann, R.; Veelken, H.; Trepel, M. The Epitope Recognized by Rituximab. *Blood* **2006**, *108* (6), 1975–1978. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-014639>.
- (38) 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.* **2006**, *6* (5 Pt 1), 859–866. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01288.x>.
- (39) Reff, M. E.; Carner, K.; Chambers, K. S.; Chinn, P. C.; Leonard, J. E.; Raab, R.; Newman, R. A.; Hanna, N.; Anderson, D. R. Depletion of B Cells in Vivo by a Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody to CD20. *Blood* **1994**, *83* (2), 435–445.
- (40) *Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties - PubMed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23211638/> (accessed 2021-05-17).
- (41) Moreno Torres, I.; García-Merino, A. Anti-CD20 Monoclonal Antibodies in Multiple Sclerosis. *Expert Rev. Neurother.* **2017**, *17* (4), 359–371. <https://doi.org/10.1080/14737175.2017.1245616>.
- (42) Rizzieri, D. Zevalin[®] (Ibritumomab Tiuxetan): After More than a Decade of Treatment Experience, What Have We Learned? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, *105*, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.07.008>.
- (43) Vose, J. M. Bexxar: Novel Radioimmunotherapy for the Treatment of Low-Grade and Transformed Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma. *The Oncologist* **2004**, *9* (2), 160–172. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.9-2-160>.
- (44) Lamb, Y. N. Ocrelizumab: A Review in Multiple Sclerosis. *Drugs* **2022**, *82* (3), 323–334. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01672-9>.

- (45) Kang, C.; Blair, H. A. Ofatumumab: A Review in Relapsing Forms of Multiple Sclerosis. *Drugs* **2022**, *82* (1), 55–62. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01650-7>.
- (46) Freeman, C. L.; Sehn, L. H. A Tale of Two Antibodies: Obinutuzumab versus Rituximab. *Br. J. Haematol.* **2018**, *182* (1), 29–45. <https://doi.org/10.1111/bjh.15232>.
- (47) Du, J.; Wang, H.; Zhong, C.; Peng, B.; Zhang, M.; Li, B.; Huo, S.; Guo, Y.; Ding, J. Structural Basis for Recognition of CD20 by Therapeutic Antibody Rituximab. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (20), 15073–15080. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701654200>.
- (48) Bar, L.; Nguyen, C.; Galibert, M.; Santos-Schneider, F.; Aldrian, G.; Dejeu, J.; Lartia, R.; Coche-Guérente, L.; Molina, F.; Boturyn, D. Determination of the Rituximab Binding Site to the CD20 Epitope Using SPOT Synthesis and Surface Plasmon Resonance Analyses. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (17), 6865–6872. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00960>.
- (49) *Anti-CD20-mediated B-cell depletion in autoimmune diseases: successes, failures and future perspectives* - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0085253820301083> (accessed 2023-08-08).
- (50) Salles, G.; Mounier, N.; de Guibert, S.; Morschhauser, F.; Doyen, C.; Rossi, J.-F.; Haioun, C.; Brice, P.; Mahé, B.; Bouabdallah, R.; Audhuy, B.; Ferme, C.; Dartigeas, C.; Feugier, P.; Sebban, C.; Xerri, L.; Foussard, C. Rituximab Combined with Chemotherapy and Interferon in Follicular Lymphoma Patients: Results of the GELA-GOELAMS FL2000 Study. *Blood* **2008**, *112* (13), 4824–4831. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-153189>.
- (51) Edwards, J. C. W.; Szczepanski, L.; Szechinski, J.; Filipowicz-Sosnowska, A.; Emery, P.; Close, D. R.; Stevens, R. M.; Shaw, T. Efficacy of B-Cell-Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350* (25), 2572–2581. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032534>.
- (52) Immunowatch-Edition-6-ADC.Pdf. <https://www.mabdesign.fr/wp-content/uploads/2023/03/Immunowatch-Edition-6-ADC.pdf> (accessed 2023-09-25).
- (53) Holliger, P.; Hudson, P. J. Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (9), 1126–1136. <https://doi.org/10.1038/nbt1142>.
- (54) Cartron, G.; Dacheux, L.; Salles, G.; Solal-Celigny, P.; Bardos, P.; Colombat, P.; Watier, H. Therapeutic Activity of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody and Polymorphism in IgG Fc Receptor FcgammaRIIIa Gene. *Blood* **2002**, *99* (3), 754–758. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.3.754>.
- (55) 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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2003**, *21* (21), 3940–3947. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.05.013>.
- (56) Chadd, H. E.; Chamow, S. M. Therapeutic Antibody Expression Technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12* (2), 188–194. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(00\)00198-1](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00198-1).
- (57) Preithner, S.; Elm, S.; Lippold, S.; Locher, M.; Wolf, A.; da Silva, A. J.; Baeuerle, P. A.; Prang, N. S. High Concentrations of Therapeutic IgG1 Antibodies Are Needed to Compensate for

Inhibition of Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity by Excess Endogenous Immunoglobulin G. *Mol. Immunol.* **2006**, *43* (8), 1183–1193. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.07.010>.

(58) Wang, W.; Wang, E.; Balthasar, J. Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *84* (5), 548–558. <https://doi.org/10.1038/clpt.2008.170>.

(59) Pillay, V.; Gan, H. K.; Scott, A. M. Antibodies in Oncology. *New Biotechnol.* **2011**, *28* (5), 518–529. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.03.021>.

(60) *Physiologically based pharmacokinetic model for specific and nonspecific monoclonal antibodies and fragments in normal tissues and human tumor xenografts in nude mice - PubMed.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8137258/> (accessed 2023-08-09).

(61) Jain, R. K. Physiological Barriers to Delivery of Monoclonal Antibodies and Other Macromolecules in Tumors. *Cancer Res.* **1990**, *50* (3 Suppl), 814s–819s.

(62) W, W.; S, S.; DI, Z.; K, K.; S, N. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96* (1). <https://doi.org/10.1002/jps.20727>.

(63) Mahler, H.-C.; Friess, W.; Grauschopf, U.; Kiese, S. Protein Aggregation: Pathways, Induction Factors and Analysis. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98* (9), 2909–2934. <https://doi.org/10.1002/jps.21566>.

(64) Manache, L.; Dulieu, C.; Boussif, O. Anticorps thérapeutiques - Importance de la galénique pour l'efficacité et la sécurité. *médecine/sciences* **2009**, *25* (12), 1063–1069. <https://doi.org/10.1051/medsci/200925121063>.

(65) 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.* **2017**, *8*, 1287. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01287>.

(66) Rouet, R.; Lowe, D.; Dudgeon, K.; Roome, B.; Schofield, P.; Langley, D.; Andrews, J.; Whitfeld, P.; Jermutus, L.; Christ, D. Expression of High-Affinity Human Antibody Fragments in Bacteria. *Nat. Protoc.* **2012**, *7* (2), 364–373. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.448>.

(67) *Fragmentation of Immunoglobulin G - Andrew - 2003 - Current Protocols in Cell Biology - Wiley Online Library.* <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471143030.cb1604s17> (accessed 2023-08-09).

(68) Herrington-Symes, A. P.; Farys, M.; Khalili, H.; Brocchini, S. Antibody Fragments: Prolonging Circulation Half-Life Special Issue-Antibody Research. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **2013**, *4* (5), 689–698. <https://doi.org/10.4236/abb.2013.45090>.

(69) Kawashima, H. Radioimmunotherapy: A Specific Treatment Protocol for Cancer by Cytotoxic Radioisotopes Conjugated to Antibodies. *ScientificWorldJournal* **2014**, *2014*, 492061. <https://doi.org/10.1155/2014/492061>.

(70) Chapman, A. P.; Antoniw, P.; Spitali, M.; West, S.; Stephens, S.; King, D. J. Therapeutic Antibody Fragments with Prolonged in Vivo Half-Lives. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17* (8), 780–783. <https://doi.org/10.1038/11717>.

- (71) Ruiz Garcia, V.; Burls, A.; Cabello, J. B.; Vela Casasempere, P.; Bort-Marti, S.; Bernal, J. A. Certolizumab Pegol (CDP870) for Rheumatoid Arthritis in Adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2017**, 2017 (9), CD007649. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007649.pub4>.
- (72) *Antibody therapeutics approved or in regulatory review in the EU or US*. The Antibody Society. <https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/> (accessed 2023-08-10).
- (73) Weisser, N. E.; Hall, J. C. Applications of Single-Chain Variable Fragment Antibodies in Therapeutics and Diagnostics. *Biotechnol. Adv.* **2009**, 27 (4), 502–520. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.004>.
- (74) Bannas, P.; Hambach, J.; Koch-Nolte, F. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Front. Immunol.* **2017**, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01603>.
- (75) Ewert, S.; Cambillau, C.; Conrath, K.; Plückthun, A. Biophysical Properties of Camelid V(HH) Domains Compared to Those of Human V(H)3 Domains. *Biochemistry* **2002**, 41 (11), 3628–3636. <https://doi.org/10.1021/bi011239a>.
- (76) Vaccaro, C.; Zhou, J.; Ober, R. J.; Ward, E. S. Engineering the Fc Region of Immunoglobulin G to Modulate in Vivo Antibody Levels. *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23 (10), 1283–1288. <https://doi.org/10.1038/nbt1143>.
- (77) Diebolder, C. A.; Beurskens, F. J.; de Jong, R. N.; Koning, R. I.; Strumane, K.; Lindorfer, M. A.; Voorhorst, M.; Ugurlar, D.; Rosati, S.; Heck, A. J. R.; van de Winkel, J. G. J.; Wilson, I. A.; Koster, A. J.; Taylor, R. P.; Saphire, E. O.; Burton, D. R.; Schuurman, J.; Gros, P.; Parren, P. W. H. I. Complement Is Activated by IgG Hexamers Assembled at the Cell Surface. *Science* **2014**, 343 (6176), 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.1248943>.
- (78) *FDA Approval: Blinatumomab - PubMed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26374073/> (accessed 2023-08-10).
- (79) Panowski, S.; Bhakta, S.; Raab, H.; Polakis, P.; Junutula, J. R. Site-Specific Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy. *mAbs* **2014**, 6 (1), 34–45. <https://doi.org/10.4161/mabs.27022>.
- (80) Diamantis, N.; Banerji, U. Antibody-Drug Conjugates--an Emerging Class of Cancer Treatment. *Br. J. Cancer* **2016**, 114 (4), 362–367. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.435>.
- (81) Donaghy, H. Effects of Antibody, Drug and Linker on the Preclinical and Clinical Toxicities of Antibody-Drug Conjugates. *mAbs* **2016**, 8 (4), 659–671. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1156829>.
- (82) Steiner, M.; Neri, D. Antibody-Radionuclide Conjugates for Cancer Therapy: Historical Considerations and New Trends. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2011**, 17 (20), 6406–6416. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0483>.
- (83) Nygren, P.-A.; Skerra, A. Binding Proteins from Alternative Scaffolds. *J. Immunol. Methods* **2004**, 290 (1–2), 3–28. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.04.006>.
- (84) Weidle, U. H.; Auer, J.; Brinkmann, U.; Georges, G.; Tiefenthaler, G. The Emerging Role of New Protein Scaffold-Based Agents for Treatment of Cancer. *Cancer Genomics Proteomics* **2013**,

10 (4), 155–168.

(85) Könning, D.; Kolmar, H. Beyond Antibody Engineering: Directed Evolution of Alternative Binding Scaffolds and Enzymes Using Yeast Surface Display. *Microb. Cell Factories* **2018**, *17*, 32. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0881-3>.

(86) Luo, R.; Liu, H.; Cheng, Z. Protein Scaffolds: Antibody Alternatives for Cancer Diagnosis and Therapy. *RSC Chem. Biol.* **3** (7), 830–847. <https://doi.org/10.1039/d2cb00094f>.

(87) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature* **1990**, *346* (6287), 818–822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>.

(88) Nimjee, S. M.; White, R. R.; Becker, R. C.; Sullenger, B. A. Aptamers as Therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2017**, *57*, 61–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558>.

(89) Tuerk, C.; Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science* **1990**, *249* (4968), 505–510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>.

(90) Cai, S.; Yan, J.; Xiong, H.; Liu, Y.; Peng, D.; Liu, Z. Investigations on the Interface of Nucleic Acid Aptamers and Binding Targets. *The Analyst* **2018**, *143* (22), 5317–5338. <https://doi.org/10.1039/c8an01467a>.

(91) Hermann, T.; Patel, D. J. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science* **2000**, *287* (5454), 820–825. <https://doi.org/10.1126/science.287.5454.820>.

(92) Hicke, B. J.; Marion, C.; Chang, Y. F.; Gould, T.; Lynott, C. K.; Parma, D.; Schmidt, P. G.; Warren, S. Tenascin-C Aptamers Are Generated Using Tumor Cells and Purified Protein. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (52), 48644–48654. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104651200>.

(93) Kara, N.; Ayoub, N.; Ilgu, H.; Fotiadis, D.; Ilgu, M. Aptamers Targeting Membrane Proteins for Sensor and Diagnostic Applications. *Mol. Basel Switz.* **2023**, *28* (9), 3728. <https://doi.org/10.3390/molecules28093728>.

(94) Percze, K.; Szakács, Z.; Scholz, É.; András, J.; Szeitner, Z.; Kieboom, C. H. van den; Ferwerda, G.; Jonge, M. I. de; Gyurcsányi, R. E.; Mészáros, T. Aptamers for Respiratory Syncytial Virus Detection. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42794. <https://doi.org/10.1038/srep42794>.

(95) Wang, L.; Wang, R.; Wei, H.; Li, Y. Selection of Aptamers against Pathogenic Bacteria and Their Diagnostics Application. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *34* (10), 149. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2528-2>.

(96) *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid - PubMed.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13054692/> (accessed 2023-08-22).

(97) Takezawa, Y.; Shionoya, M. Supramolecular DNA Three-Way Junction Motifs With a Bridging Metal Center. *Front. Chem.* **2019**, *7*, 925. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00925>.

(98) Lilley, D. M. Structures of Helical Junctions in Nucleic Acids. *Q. Rev. Biophys.* **2000**, *33* (2), 109–159. <https://doi.org/10.1017/s0033583500003590>.

(99) Förster, U.; Weigand, J. E.; Trojanowski, P.; Suess, B.; Wachtveitl, J. Conformational

Dynamics of the Tetracycline-Binding Aptamer. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (4), 1807–1817. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr835>.

(100) Dolinnaya, N. G.; Ogloblina, A. M.; Yakubovskaya, M. G. Structure, Properties, and Biological Relevance of the DNA and RNA G-Quadruplexes: Overview 50 Years after Their Discovery. *Biochem. Biokhimiia* **2016**, *81* (13), 1602–1649. <https://doi.org/10.1134/S0006297916130034>.

(101) Guéron, M.; Leroy, J. L. The I-Motif in Nucleic Acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10* (3), 326–331. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(00\)00091-9](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(00)00091-9).

(102) Fernandez-Millan, P.; Autour, A.; Ennifar, E.; Westhof, E.; Ryckelynck, M. Crystal Structure and Fluorescence Properties of the iSpinach Aptamer in Complex with DFHBI. *RNA N. Y. N* **2017**, *23* (12), 1788–1795. <https://doi.org/10.1261/rna.063008.117>.

(103) Sun, H.; Zu, Y. A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application. *Mol. Basel Switz.* **2015**, *20* (7), 11959–11980. <https://doi.org/10.3390/molecules200711959>.

(104) Arshavsky-Graham, S.; Urmann, K.; Salama, R.; Massad-Ivanir, N.; Walter, J.-G.; Scheper, T.; Segal, E. Aptamers vs. Antibodies as Capture Probes in Optical Porous Silicon Biosensors. *The Analyst* **2020**, *145* (14), 4991–5003. <https://doi.org/10.1039/d0an00178c>.

(105) Pusuluri, A.; Krishnan, V.; Lensch, V.; Sarode, A.; Bunyan, E.; Vogus, D. R.; Menegatti, S.; Soh, H. T.; Mitragotri, S. Treating Tumors at Low Drug Doses Using an Aptamer-Peptide Synergistic Drug Conjugate. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2019**, *58* (5), 1437–1441. <https://doi.org/10.1002/anie.201812650>.

(106) Sun, H.; Zhu, X.; Lu, P. Y.; Rosato, R. R.; Tan, W.; Zu, Y. Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2014**, *3* (8), e182. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.32>.

(107) Tuerk, C.; Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science* **1990**, *249* (4968), 505–510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>.

(108) El-Aziz, T. M. A.; Ravelet, C.; Molgo, J.; Fiore, E.; Pale, S.; Amar, M.; Al-Khoury, S.; Dejeu, J.; Fadl, M.; Ronjat, M.; Taiwe, G. S.; Servent, D.; Peyrin, E.; De Waard, M. Efficient Functional Neutralization of Lethal Peptide Toxins in Vivo by Oligonucleotides. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 7202. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07554-5>.

(109) Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. SELEX--a (r)Evolutionary Method to Generate High-Affinity Nucleic Acid Ligands. *Biomol. Eng.* **2007**, *24* (4), 381–403. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.06.001>.

(110) Lisi, S.; Fiore, E.; Scarano, S.; Pascale, E.; Boehman, Y.; Ducongé, F.; Chierici, S.; Minunni, M.; Peyrin, E.; Ravelet, C. Non-SELEX Isolation of DNA Aptamers for the Homogeneous-Phase Fluorescence Anisotropy Sensing of Tau Proteins. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1038*, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.029>.

(111) *From ugly duckling to swan: unexpected identification from cell-SELEX of an anti-Annexin A2 aptamer targeting tumors - PubMed.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24489826/> (accessed

2023-08-23).

- (112) Civit, L.; Theodorou, I.; Frey, F.; Weber, H.; Lingnau, A.; Gröber, C.; Blank, M.; Dambrune, C.; Stunden, J.; Beyer, M.; Schultze, J.; Latz, E.; Ducongé, F.; Kubbutat, M. H. G.; Mayer, G. Targeting Hormone Refractory Prostate Cancer by in Vivo Selected DNA Libraries in an Orthotopic Xenograft Mouse Model. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 4976. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41460-2>.
- (113) Stoltenburg, R.; Strehlitz, B. Refining the Results of a Classical SELEX Experiment by Expanding the Sequence Data Set of an Aptamer Pool Selected for Protein A. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (2), 642. <https://doi.org/10.3390/ijms19020642>.
- (114) Nguyen Quang, N.; Bouvier, C.; Henriques, A.; Lelandais, B.; Ducongé, F. Time-Lapse Imaging of Molecular Evolution by High-Throughput Sequencing. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (15), 7480–7494. <https://doi.org/10.1093/nar/gky583>.
- (115) Nguyen Quang, N.; Perret, G.; Ducongé, F. Applications of High-Throughput Sequencing for In Vitro Selection and Characterization of Aptamers. *Pharm. Basel Switz.* **2016**, *9* (4), 76. <https://doi.org/10.3390/ph9040076>.
- (116) Famulok, M.; Mayer, G. Aptamers and SELEX in Chemistry & Biology. *Chem. Biol.* **2014**, *21* (9), 1055–1058. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.08.003>.
- (117) Kohlberger, M.; Gadermaier, G. SELEX: Critical Factors and Optimization Strategies for Successful Aptamer Selection. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2022**, *69* (5), 1771–1792. <https://doi.org/10.1002/bab.2244>.
- (118) Jones, S.; Daley, D. T. A.; Luscombe, N. M.; Berman, H. M.; Thornton, J. M. Protein–RNA Interactions: A Structural Analysis. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29* (4), 943–954.
- (119) Darmostuk, M.; Rimpelova, S.; Gbelcova, H.; Ruml, T. Current Approaches in SELEX: An Update to Aptamer Selection Technology. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33* (6 Pt 2), 1141–1161. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.008>.
- (120) Coleman, T. M.; Huang, F. Optimal Random Libraries for the Isolation of Catalytic RNA. *RNA Biol.* **2005**, *2* (4), 129–136. <https://doi.org/10.4161/rna.2.4.2285>.
- (121) Wang, T.; Chen, C.; Larcher, L. M.; Barrero, R. A.; Veedu, R. N. Three Decades of Nucleic Acid Aptamer Technologies: Lessons Learned, Progress and Opportunities on Aptamer Development. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37* (1), 28–50. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.001>.
- (122) Germer, K.; Leonard, M.; Zhang, X. RNA Aptamers and Their Therapeutic and Diagnostic Applications. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *4* (1), 27–40.
- (123) Pobanz, K.; Lupták, A. Improving the Odds: Influence of Starting Pools on in Vitro Selection Outcomes. *Methods San Diego Calif* **2016**, *106*, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.04.021>.
- (124) McKeague, M.; McConnell, E. M.; Cruz-Toledo, J.; Bernard, E. D.; Pach, A.; Mastronardi, E.; Zhang, X.; Beking, M.; Francis, T.; Giamberardino, A.; Cabecinha, A.; Ruscito, A.; Aranda-Rodriguez, R.; Dumontier, M.; DeRosa, M. C. Analysis of In Vitro Aptamer Selection Parameters. *J. Mol. Evol.* **2015**, *81* (5–6), 150–161. <https://doi.org/10.1007/s00239-015-9708-6>.

- (125) Legiewicz, M.; Lozupone, C.; Knight, R.; Yarus, M. Size, Constant Sequences, and Optimal Selection. *RNA N. Y. N* **2005**, *11* (11), 1701–1709. <https://doi.org/10.1261/rna.2161305>.
- (126) Cowperthwaite, M. C.; Ellington, A. D. Bioinformatic Analysis of the Contribution of Primer Sequences to Aptamer Structures. *J. Mol. Evol.* **2008**, *67* (1), 95–102. <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9130-4>.
- (127) Pan, W.; Xin, P.; Clawson, G. A. Minimal Primer and Primer-Free SELEX Protocols for Selection of Aptamers from Random DNA Libraries. *BioTechniques* **2008**, *44* (3), 351–360. <https://doi.org/10.2144/000112689>.
- (128) Kimoto, M.; Yamashige, R.; Matsunaga, K.; Yokoyama, S.; Hirao, I. Generation of High-Affinity DNA Aptamers Using an Expanded Genetic Alphabet. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31* (5), 453–457. <https://doi.org/10.1038/nbt.2556>.
- (129) Röthlisberger, P.; Hollenstein, M. Aptamer Chemistry. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *134*, 3–21. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.007>.
- (130) Latham, J. A.; Johnson, R.; Toole, J. J. The Application of a Modified Nucleotide in Aptamer Selection: Novel Thrombin Aptamers Containing 5-(1-Pentynyl)-2'-Deoxyuridine. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22* (14), 2817–2822.
- (131) Vaught, J. D.; Bock, C.; Carter, J.; Fitzwater, T.; Otis, M.; Schneider, D.; Rolando, J.; Waugh, S.; Wilcox, S. K.; Eaton, B. E. Expanding the Chemistry of DNA for in Vitro Selection. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (12), 4141–4151. <https://doi.org/10.1021/ja908035g>.
- (132) Wlotzka, B.; Leva, S.; Eschgfäller, B.; Burmeister, J.; Kleinjung, F.; Kaduk, C.; Muhn, P.; Hess-Stumpp, H.; Klussmann, S. In Vivo Properties of an Anti-GnRH Spiegelmer: An Example of an Oligonucleotide-Based Therapeutic Substance Class. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (13), 8898–8902. <https://doi.org/10.1073/pnas.132067399>.
- (133) White, R. R.; Sullenger, B. A.; Rusconi, C. P. Developing Aptamers into Therapeutics. *J. Clin. Invest.* **2000**, *106* (8), 929–934.
- (134) Kong, H. Y.; Byun, J. Nucleic Acid Aptamers: New Methods for Selection, Stabilization, and Application in Biomedical Science. *Biomol. Ther.* **2013**, *21* (6), 423–434. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2013.085>.
- (135) Adler, A.; Forster, N.; Homann, M.; Göringer, H. U. Post-SELEX Chemical Optimization of a Trypanosome-Specific RNA Aptamer. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2008**, *11* (1), 16–23. <https://doi.org/10.2174/138620708783398331>.
- (136) Koshkin, A. A.; Singh, S. K.; Nielsen, P.; Rajwanshi, V. K.; Kumar, R.; Meldgaard, M.; Olsen, C. E.; Wengel, J. LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the Adenine, Cytosine, Guanine, 5-Methylcytosine, Thymine and Uracil Bicyclonucleoside Monomers, Oligomerisation, and Unprecedented Nucleic Acid Recognition. *Tetrahedron* **1998**, *54* (14), 3607–3630. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00094-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00094-5).
- (137) Petersen, M.; Wengel, J. LNA: A Versatile Tool for Therapeutics and Genomics. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21* (2), 74–81. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)00038-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)00038-0).
- (138) Pasternak, A.; Wengel, J. Unlocked Nucleic Acid--an RNA Modification with Broad

- Potential. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (10), 3591–3597. <https://doi.org/10.1039/c0ob01085e>.
- (139) Vater, A.; Klussmann, S. Turning Mirror-Image Oligonucleotides into Drugs: The Evolution of Spiegelmer(®) Therapeutics. *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (1), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.09.004>.
- (140) Lapa, S. A.; Chudinov, A. V.; Timofeev, E. N. The Toolbox for Modified Aptamers. *Mol. Biotechnol.* **2016**, *58* (2), 79–92. <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9907-9>.
- (141) Ohuchi, S. Cell-SELEX Technology. *BioResearch Open Access* **2012**, *1* (6), 265–272. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0253>.
- (142) Zhu, C.; Feng, Z.; Qin, H.; Chen, L.; Yan, M.; Li, L.; Qu, F. Recent Progress of SELEX Methods for Screening Nucleic Acid Aptamers. *Talanta* **2023**, *266* (Pt 1), 124998. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124998>.
- (143) Pristoupil, T. I.; Kramlová, M. Microchromatographic Separation of Ribonucleic Acids from Proteins on Nitrocellulose Membranes. *J. Chromatogr.* **1968**, *32* (4), 769–770. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)80565-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)80565-3).
- (144) Song, K.-M.; Lee, S.; Ban, C. Aptamers and Their Biological Applications. *Sensors* **2012**, *12* (1), 612–631. <https://doi.org/10.3390/s120100612>.
- (145) Bayat, P.; Nosrati, R.; Alibolandi, M.; Rafatpanah, H.; Abnous, K.; Khedri, M.; Ramezani, M. SELEX Methods on the Road to Protein Targeting with Nucleic Acid Aptamers. *Biochimie* **2018**, *154*, 132–155. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.09.001>.
- (146) Wildner, S.; Huber, S.; Regl, C.; Huber, C. G.; Lohrig, U.; Gadermaier, G. Aptamers as Quality Control Tool for Production, Storage and Biosimilarity of the Anti-CD20 Biopharmaceutical Rituximab. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1111. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37624-1>.
- (147) Cruz-Aguado, J. A.; Penner, G. Determination of Ochratoxin a with a DNA Aptamer. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (22), 10456–10461. <https://doi.org/10.1021/jf801957h>.
- (148) Szeto, K.; Reinholt, S. J.; Duarte, F. M.; Pagano, J. M.; Ozer, A.; Yao, L.; Lis, J. T.; Craighead, H. G. High-Throughput Binding Characterization of RNA Aptamer Selections Using a Microplate-Based Multiplex Microcolumn Device. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406* (11), 2727–2732. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7661-7>.
- (149) Bruno, J. G. In Vitro Selection of DNA to Chloroaromatics Using Magnetic Microbead-Based Affinity Separation and Fluorescence Detection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *234* (1), 117–120. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6517>.
- (150) Qian, J.; Lou, X.; Zhang, Y.; Xiao, Y.; Soh, H. T. Rapid Generation of Highly Specific Aptamers via Micromagnetic Selection. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (13), 5490–5495. <https://doi.org/10.1021/ac900759k>.
- (151) Ruscito, A.; DeRosa, M. C. Small-Molecule Binding Aptamers: Selection Strategies, Characterization, and Applications. *Front. Chem.* **2016**, *4*, 14. <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00014>.
- (152) Nutiu, R.; Li, Y. In Vitro Selection of Structure-Switching Signaling Aptamers. *Angew. Chem.*

Int. Ed Engl. **2005**, *44* (7), 1061–1065. <https://doi.org/10.1002/anie.200461848>.

(153) Stoltenburg, R.; Nikolaus, N.; Strehlitz, B. Capture-SELEX: Selection of DNA Aptamers for Aminoglycoside Antibiotics. *J. Anal. Methods Chem.* **2012**, *2012*, 415697. <https://doi.org/10.1155/2012/415697>.

(154) Boussebayle, A.; Torca, D.; Ollivaud, S.; Braun, J.; Bofill-Bosch, C.; Dombrowski, M.; Groher, F.; Hamacher, K.; Suess, B. Next-Level Riboswitch Development-Implementation of Capture-SELEX Facilitates Identification of a New Synthetic Riboswitch. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (9), 4883–4895. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz216>.

(155) Wang, J.; Gong, Q.; Maheshwari, N.; Eisenstein, M.; Arcila, M. L.; Kosik, K. S.; Soh, H. T. Particle Display: A Quantitative Screening Method for Generating High-Affinity Aptamers. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2014**, *53* (19), 4796–4801. <https://doi.org/10.1002/anie.201309334>.

(156) Boder, E. T.; Wittrup, K. D. Yeast Surface Display for Screening Combinatorial Polypeptide Libraries. *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15* (6), 553–557. <https://doi.org/10.1038/nbt0697-553>.

(157) Gordon, C. K. L.; Wu, D.; Pusuluri, A.; Feagin, T. A.; Csordas, A. T.; Eisenstein, M. S.; Hawker, C. J.; Niu, J.; Soh, H. T. Click-Particle Display for Base-Modified Aptamer Discovery. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14* (12), 2652–2662. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00587>.

(158) Mendonsa, S. D.; Bowser, M. T. In Vitro Evolution of Functional DNA Using Capillary Electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (1), 20–21. <https://doi.org/10.1021/ja037832s>.

(159) Tang, J.; Xie, J.; Shao, N.; Yan, Y. The DNA Aptamers That Specifically Recognize Ricin Toxin Are Selected by Two in Vitro Selection Methods. *Electrophoresis* **2006**, *27* (7), 1303–1311. <https://doi.org/10.1002/elps.200500489>.

(160) Berezovski, M. V.; Musheev, M. U.; Drabovich, A. P.; Jitkova, J. V.; Krylov, S. N. Non-SELEX: Selection of Aptamers without Intermediate Amplification of Candidate Oligonucleotides. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (3), 1359–1369. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.200>.

(161) Xing, L.; Zhang, Y.; Yang, J. Graphene Oxide-Assisted Non-Immobilized SELEX of Chiral Drug Ephedrine Aptamers and the Analytical Binding Mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *514* (1), 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.067>.

(162) Ohuchi, S. Cell-SELEX Technology. *BioResearch Open Access* **2012**, *1* (6), 265–272. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0253>.

(163) Haghighi, M.; Khanahmad, H.; Palizban, A. Selection and Characterization of Single-Stranded DNA Aptamers Binding Human B-Cell Surface Protein CD20 by Cell-SELEX. *Mol. Basel Switz.* **2018**, *23* (4), 715. <https://doi.org/10.3390/molecules23040715>.

(164) Gedi, V.; Kim, Y.-P. Detection and Characterization of Cancer Cells and Pathogenic Bacteria Using Aptamer-Based Nano-Conjugates. *Sensors* **2014**, *14* (10), 18302–18327. <https://doi.org/10.3390/s141018302>.

(165) Mayer, G.; Ahmed, M.-S. L.; Dolf, A.; Endl, E.; Knolle, P. A.; Famulok, M. Fluorescence-Activated Cell Sorting for Aptamer SELEX with Cell Mixtures. *Nat. Protoc.* **2010**, *5* (12), 1993–2004. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.163>.

- (166) Sefah, K.; Shanguan, D.; Xiong, X.; O'Donoghue, M. B.; Tan, W. Development of DNA Aptamers Using Cell-SELEX. *Nat. Protoc.* **2010**, *5* (6), 1169–1185. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.66>.
- (167) Kunii, T.; Ogura, S.; Mie, M.; Kobatake, E. Selection of DNA Aptamers Recognizing Small Cell Lung Cancer Using Living Cell-SELEX. *The Analyst* **2011**, *136* (7), 1310–1312. <https://doi.org/10.1039/c0an00962h>.
- (168) Lin, N.; Wu, L.; Xu, X.; Wu, Q.; Wang, Y.; Shen, H.; Song, Y.; Wang, H.; Zhu, Z.; Kang, D.; Yang, C. Aptamer Generated by Cell-SELEX for Specific Targeting of Human Glioma Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (8), 9306–9315. <https://doi.org/10.1021/acsmi.0c11878>.
- (169) Wang, H.; Zhang, Y.; Yang, H.; Qin, M.; Ding, X.; Liu, R.; Jiang, Y. In Vivo SELEX of an Inhibitory NSCLC-Specific RNA Aptamer from PEGylated RNA Library. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2018**, *10*, 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.12.003>.
- (170) Chen, L.; He, W.; Jiang, H.; Wu, L.; Xiong, W.; Li, B.; Zhou, Z.; Qian, Y. In Vivo SELEX of Bone Targeting Aptamer in Prostate Cancer Bone Metastasis Model. *Int. J. Nanomedicine* **2019**, *14*, 149–159. <https://doi.org/10.2147/IJN.S188003>.
- (171) Mi, J.; Ray, P.; Liu, J.; Kuan, C.-T.; Xu, J.; Hsu, D.; Sullenger, B. A.; White, R. R.; Clary, B. M. In Vivo Selection Against Human Colorectal Cancer Xenografts Identifies an Aptamer That Targets RNA Helicase Protein DHX9. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2016**, *5* (4), e315. <https://doi.org/10.1038/mtna.2016.27>.
- (172) Wang, K.; Wang, M.; Ma, T.; Li, W.; Zhang, H. Review on the Selection of Aptamers and Application in Paper-Based Sensors. *Biosensors* **2022**, *13* (1), 39. <https://doi.org/10.3390/bios13010039>.
- (173) Gao, S.; Hu, B.; Zheng, X.; Cao, Y.; Liu, D.; Sun, M.; Jiao, B.; Wang, L. Gonyautoxin 1/4 Aptamers with High-Affinity and High-Specificity: From Efficient Selection to Aptasensor Application. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *79*, 938–944. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.032>.
- (174) Kaur, H.; Yung, L.-Y. L. Probing High Affinity Sequences of DNA Aptamer against VEGF165. *PLoS One* **2012**, *7* (2), e31196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031196>.
- (175) Debiais, M.; Lelievre, A.; Smietana, M.; Müller, S. Splitting Aptamers and Nucleic Acid Enzymes for the Development of Advanced Biosensors. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48* (7), 3400–3422. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa132>.
- (176) Melaine, F.; Roupioz, Y.; Buhot, A. Gold Nanoparticles Surface Plasmon Resonance Enhanced Signal for the Detection of Small Molecules on Split-Aptamer Microarrays (Small Molecules Detection from Split-Aptamers). *Microarrays* **2015**, *4* (1), 41–52. <https://doi.org/10.3390/microarrays4010041>.
- (177) Freeman, R.; Sharon, E.; Tel-Vered, R.; Willner, I. Supramolecular Cocaine-Aptamer Complexes Activate Biocatalytic Cascades. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (14), 5028–5029. <https://doi.org/10.1021/ja809496n>.
- (178) Cossu, J.; Thoreau, F.; Boturyn, D. Multimeric RGD-Based Strategies for Selective Drug Delivery to Tumor Tissues. *Pharmaceutics* **2023**, *15* (2), 525.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020525>.

(179) Z, T.; D, S.; K, W.; H, S.; K, S.; P, M.; Hw, C.; Y, L.; W, T. Selection of Aptamers for Molecular Recognition and Characterization of Cancer Cells. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (13). <https://doi.org/10.1021/ac070189y>.

(180) Sheng, W.; Chen, T.; Tan, W.; Fan, Z. H. Multivalent DNA Nanospheres for Enhanced Capture of Cancer Cells in Microfluidic Devices. *ACS Nano* **2013**, *7* (8), 7067–7076. <https://doi.org/10.1021/nn4023747>.

(181) Amano, R.; Takada, K.; Tanaka, Y.; Nakamura, Y.; Kawai, G.; Kozu, T.; Sakamoto, T. Kinetic and Thermodynamic Analyses of Interaction between a High-Affinity RNA Aptamer and Its Target Protein. *Biochemistry* **2016**, *55* (45), 6221–6229. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00748>.

(182) Chang, A. L.; McKeague, M.; Liang, J. C.; Smolke, C. D. Kinetic and Equilibrium Binding Characterization of Aptamers to Small Molecules Using a Label-Free, Sensitive, and Scalable Platform. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (7), 3273–3278. <https://doi.org/10.1021/ac5001527>.

(183) Lou, X.; Egli, M.; Yang, X. Determining Functional Aptamer-Protein Interaction by Biolayer Interferometry. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2016**, *67* (1), 7.25.1-7.25.15. <https://doi.org/10.1002/cpnc.18>.

(184) Barrows, J. K.; Van Dyke, M. W. Biolayer Interferometry for DNA-Protein Interactions. *PLoS ONE* **2022**, *17* (2), e0263322. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263322>.

(185) Sakamoto, T.; Ennifar, E.; Nakamura, Y. Thermodynamic Study of Aptamers Binding to Their Target Proteins. *Biochimie* **2018**, *145*, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.10.010>.

(186) Salim, N. N.; Feig, A. L. Isothermal Titration Calorimetry of RNA. *Methods* **2009**, *47* (3), 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.09.003>.

(187) Jauset Rubio, M.; Svobodová, M.; Mairal, T.; Schubert, T.; Künne, S.; Mayer, G.; O’Sullivan, C. K. β -Conglutin Dual Aptamers Binding Distinct Aptatopes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408* (3), 875–884. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9179-z>.

(188) Geng, X.; Zhang, D.; Wang, H.; Zhao, Q. Screening Interaction between Ochratoxin A and Aptamers by Fluorescence Anisotropy Approach. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (8), 2443–2449. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6736-1>.

(189) Kim, E. Y.; Kim, J. W.; Kim, W. K.; Han, B. S.; Park, S. G.; Chung, B. H.; Lee, S. C.; Bae, K.-H. Selection of Aptamers for Mature White Adipocytes by Cell SELEX Using Flow Cytometry. *PLoS One* **2014**, *9* (5), e97747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097747>.

(190) Soundy, J.; Day, D. Selection of DNA Aptamers Specific for Live *Pseudomonas Aeruginosa*. *PLoS ONE* **2017**, *12* (9), e0185385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185385>.

(191) Song, W.; Song, Y.; Li, Q.; Fan, C.; Lan, X.; Jiang, D. Advances in Aptamer-Based Nuclear Imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2022**, *49* (8), 2544–2559. <https://doi.org/10.1007/s00259-022-05782-0>.

(192) Eaton, R. M.; Shallcross, J. A.; Mael, L. E.; Mears, K. S.; Minkoff, L.; Scoville, D. J.; Whelan, R. J. Selection of DNA Aptamers for Ovarian Cancer Biomarker HE4 Using CE-SELEX and High-

Throughput Sequencing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (23), 6965–6973. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8665-7>.

(193) Billet, B.; Chovelon, B.; Fiore, E.; Faure, P.; Ravelet, C.; Peyrin, E. Detection of Small Molecules by Fluorescence Intensity Using Single Dye Labeled Aptamers and Quencher Transition Metal Ions. *Biosens. Bioelectron.* **2022**, *205*, 114091. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114091>.

(194) Zhu, G.; Chen, X. Aptamer-Based Targeted Therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *134*, 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.08.005>.

(195) Egli, M.; Manoharan, M. Chemistry, Structure and Function of Approved Oligonucleotide Therapeutics. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51* (6), 2529–2573. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad067>.

(196) Kourlas, H.; Schiller, D. S. Pegaptanib Sodium for the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration: A Review. *Clin. Ther.* **2006**, *28* (1), 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2006.01.009>.

(197) Ng, E. W. M.; Shima, D. T.; Calias, P.; Cunningham, E. T.; Guyer, D. R.; Adamis, A. P. Pegaptanib, a Targeted Anti-VEGF Aptamer for Ocular Vascular Disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5* (2), 123–132. <https://doi.org/10.1038/nrd1955>.

(198) Zhou, J.; Rossi, J. Aptamers as Targeted Therapeutics: Current Potential and Challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (3), 181–202. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.199>.

(199) Shigdar, S.; Schrand, B.; Giangrande, P. H.; De Franciscis, V. Aptamers: Cutting Edge of Cancer Therapies. *Mol. Ther.* **2021**, *29* (8), 2396–2411. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.06.010>.

(200) Fu, Z.; Xiang, J. Aptamers, the Nucleic Acid Antibodies, in Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (8), 2793. <https://doi.org/10.3390/ijms21082793>.

(201) Alshaer, W.; Hillaireau, H.; Fattal, E. Aptamer-Guided Nanomedicines for Anticancer Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *134*, 122–137. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.09.011>.

(202) Alshaer, W.; Hillaireau, H.; Vergnaud, J.; Ismail, S.; Fattal, E. Functionalizing Liposomes with Anti-CD44 Aptamer for Selective Targeting of Cancer Cells. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26* (7), 1307–1313. <https://doi.org/10.1021/bc5004313>.

(203) Thiel, K. W.; Hernandez, L. I.; Dassie, J. P.; Thiel, W. H.; Liu, X.; Stockdale, K. R.; Rothman, A. M.; Hernandez, F. J.; McNamara, J. O.; Giangrande, P. H. Delivery of Chemo-Sensitizing siRNAs to HER2+-Breast Cancer Cells Using RNA Aptamers. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (13), 6319–6337. <https://doi.org/10.1093/nar/gks294>.

(204) Yu, X.; Ghamande, S.; Liu, H.; Xue, L.; Zhao, S.; Tan, W.; Zhao, L.; Tang, S.-C.; Wu, D.; Korkaya, H.; Maihle, N. J.; Liu, H. Y. Targeting EGFR/HER2/HER3 with a Three-in-One Aptamer-siRNA Chimera Confers Superior Activity against HER2+ Breast Cancer. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2018**, *10*, 317–330. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.12.015>.

(205) *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide | Journal of the American Chemical Society.* <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja00897a025> (accessed 2023-04-21).

(206) Liu, J. L.; Zabetakis, D.; Goldman, E. R.; Anderson, G. P. Selection and Characterization of

Single Domain Antibodies against Human CD20. *Mol. Immunol.* **2016**, *78*, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.09.013>.

(207) Bar, L.; Dejeu, J.; Lartia, R.; Bano, F.; Richter, R. P.; Coche-Guérente, L.; Boturyn, D. Impact of Antigen Density on Recognition by Monoclonal Antibodies. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (7), 5396–5403. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00092>.

(208) *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*; Chan, W., White, P., Chan, W., White, P., Eds.; Practical Approach Series; Oxford University Press: Oxford, New York, 1999.

(209) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>.

(210) Tam, J. P.; Wu, C. R.; Liu, W.; Zhang, J. W. *Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications*. ACS Publications. <https://doi.org/10.1021/ja00017a044>.

(211) Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. Capillary Zone Electrophoresis. *Science* **1983**, *222* (4621), 266–272. <https://doi.org/10.1126/science.6623076>.

(212) Linhardt, R. J.; Toida, T. Tech.Sight. Capillary Electrophoresis. Ultra-High Resolution Separation Comes of Age. *Science* **2002**, *298* (5597), 1441–1442. <https://doi.org/10.1126/science.298.5597.1441>.

(213) Gordon, M. J.; Huang, X.; Pentoney, S. L.; Zare, R. N. Capillary Electrophoresis. *Science* **1988**, *242* (4876), 224–228. <https://doi.org/10.1126/science.242.4876.224>.

(214) Karger, B. L. High-Performance Capillary Electrophoresis. *Nature* **1989**, *339* (6226), 641–642. <https://doi.org/10.1038/339641a0>.

(215) Mardis, E. R. A Decade's Perspective on DNA Sequencing Technology. *Nature* **2011**, *470* (7333), 198–203. <https://doi.org/10.1038/nature09796>.

(216) Štěpánová, S.; Kašička, V. Recent Developments and Applications of Capillary and Microchip Electrophoresis in Proteomics and Peptidomics (2015–Mid 2018). *J. Sep. Sci.* **2019**, *42* (1), 398–414. <https://doi.org/10.1002/jssc.201801090>.

(217) Heemskerck, A. A. M.; Deelder, A. M.; Mayboroda, O. A. CE–ESI–MS for Bottom-up Proteomics: Advances in Separation, Interfacing and Applications. *Mass Spectrom. Rev.* **2016**, *35* (2), 259–271. <https://doi.org/10.1002/mas.21432>.

(218) Zhu, C.; Yang, G.; Ghulam, M.; Li, L.; Qu, F. Evolution of Multi-Functional Capillary Electrophoresis for High-Efficiency Selection of Aptamers. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37* (8), 107432. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107432>.

(219) Tohala, L.; Oukacine, F.; Ravelet, C.; Peyrin, E. Chiral Resolution Capabilities of DNA Oligonucleotides. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (11), 5491–5495. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01252>.

(220) Stalcup, A. M. Chiral Separations. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2010**, *3* (1), 341–363. <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.111808.073635>.

(221) Mosing, R. K.; Bowser, M. T. Isolating Aptamers Using Capillary Electrophoresis–SELEX (CE–SELEX). In *Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Methods and Protocols*; Mayer, G., Ed.; Methods in

Molecular Biology™; Humana Press: Totowa, NJ, 2009; pp 33–43. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-557-2_3.

(222) Berezovski, M.; Drabovich, A.; Krylova, S. M.; Musheev, M.; Okhonin, V.; Petrov, A.; Krylov, S. N. Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures: A Universal Tool for Development of Aptamers. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (9), 3165–3171. <https://doi.org/10.1021/ja042394q>.

(223) Nie, H.; Chen, Y.; Lü, C.; Liu, Z. Efficient Selection of Glycoprotein-Binding DNA Aptamers via Boronate Affinity Monolithic Capillary. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (17), 8277–8283. <https://doi.org/10.1021/ac4015353>.

(224) Hetzke, T.; Vogel, M.; Gophane, D. B.; Weigand, J. E.; Suess, B.; Sigurdsson, S. T.; Prisner, T. F. Influence of Mg²⁺ on the Conformational Flexibility of a Tetracycline Aptamer. *RNA N. Y. N* **2019**, *25* (1), 158–167. <https://doi.org/10.1261/rna.068684.118>.

(225) Rosito, M.; Testi, C.; Parisi, G.; Cortese, B.; Baiocco, P.; Di Angelantonio, S. Exploring the Use of Dimethyl Fumarate as Microglia Modulator for Neurodegenerative Diseases Treatment. *Antioxid. Basel Switz.* **2020**, *9* (8), 700. <https://doi.org/10.3390/antiox9080700>.

(226) Oukacine, F.; Gèze, A.; Choïnard, L.; Putaux, J.-L.; Stahl, J.-P.; Peyrin, E. Inline Coupling of Electrokinetic Preconcentration Method to Taylor Dispersion Analysis for Size-Based Characterization of Low-UV-Absorbing Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (4), 2493–2500. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03344>.

(227) Tamamura, H.; Otaka, A.; Nakamura, J.; Okubo, K.; Koide, T.; Ikeda, K.; Ibuka, T.; Fujii, N. Disulfide Bond-Forming Reaction Using a Dimethyl Sulfoxide/Aqueous HCl System and Its Application to Regioselective Two Disulfide Bond Formation. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, *45* (4), 312–319. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1995.tb01043.x>.

(228) Postollec, F.; Falentin, H.; Pavan, S.; Combrisson, J.; Sohier, D. Recent Advances in Quantitative PCR (qPCR) Applications in Food Microbiology. *Food Microbiol.* **2011**, *28* (5), 848–861. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.008>.

(229) Melhus, K. B.; Larsen, R. H.; Stokke, T.; Kaalhus, O.; Selbo, P. K.; Dahle, J. 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.* **2007**, *22* (4), 469–479. <https://doi.org/10.1089/cbr.2007.371>.

(230) Huber, W.; Mueller, F. Biomolecular Interaction Analysis in Drug Discovery Using Surface Plasmon Resonance Technology. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12* (31), 3999–4021. <https://doi.org/10.2174/138161206778743600>.

(231) Cooper, M. A. Optical Biosensors in Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (7), 515–528. <https://doi.org/10.1038/nrd838>.

(232) *Surface plasmon resonance for the characterization of bacterial polysaccharide antigens: a review* - *MedChemComm* (RSC Publishing). <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/md/c4md00088a> (accessed 2023-05-17).

- (233) Biacoresensorsurfacehandbookweb.Pdf.
<https://facilities.bioc.cam.ac.uk/files/media/biacoresensorsurfacehandbookweb.pdf> (accessed 2023-05-17).
- (234) Zhou, M.; Li, Q.; Wang, R. Current Experimental Methods for Characterizing Protein–Protein Interactions. *ChemMedChem* **2016**, *11* (8), 738–756. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500495>.
- (235) O’Shannessy, D. J.; Brigham-Burke, M.; Soneson, K. K.; Hensley, P.; Brooks, I. Determination of Rate and Equilibrium Binding Constants for Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance: Use of Nonlinear Least Squares Analysis Methods. *Anal. Biochem.* **1993**, *212* (2), 457–468. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1355>.
- (236) Langmuir, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids, *Journal of the American Chemical Society.* **1917**, *183* (1), 102-105. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja02268a002> (accessed 2023-06-03).
- (237) Srivastava, V. K.; Yadav, R. Chapter 9 - Isothermal Titration Calorimetry. In *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*; Misra, G., Ed.; Academic Press, 2019; pp 125–137. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816548-5.00009-5>.
- (238) Indyk, L.; Fisher, H. F. Theoretical Aspects of Isothermal Titration Calorimetry. *Methods Enzymol.* **1998**, *295*, 350–364. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(98\)95048-0](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(98)95048-0).
- (239) Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L. N. Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter. *Anal. Biochem.* **1989**, *179* (1), 131–137. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90213-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90213-3).
- (240) *Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry - PubMed.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11785756/> (accessed 2023-06-10).
- (241) *On the Value of c: Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry? | Journal of the American Chemical Society.* <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja036166s> (accessed 2023-06-10).
- (242) Mw, F.; Ea, L. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods Cell Biol.* **2008**, *84*. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)84004-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)84004-0).
- (243) Pierce, M. M.; Raman, C. S.; Nall, B. T. Isothermal Titration Calorimetry of Protein–Protein Interactions. *Methods* **1999**, *19* (2), 213–221. <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0852>.
- (244) *Selection of a novel CD19 aptamer for targeted delivery of doxorubicin to lymphoma cells - PMC.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6003574/> (accessed 2023-06-15).
- (245) Mendonsa, S. D.; Bowser, M. T. In Vitro Selection of High-Affinity DNA Ligands for Human IgE Using Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (18), 5387–5392. <https://doi.org/10.1021/ac049857v>.
- (246) Zhang, X.; Yang, G.; Liu, W.; Liu, Q.; Wang, Z.; Fan, K.; Qu, F.; Huang, Y. Screening and Identification of ssDNA Aptamers for Low-Density Lipoprotein (LDL) Receptor-Related Protein 6. *Molecules* **2023**, *28* (9), 3838. <https://doi.org/10.3390/molecules28093838>.

- (247) Zhang, X.; Yang, G.; Zhao, Y.; Dai, X.; Liu, W.; Qu, F.; Huang, Y. Selection and Identification of an ssDNA Aptamer for Fibroblast Activation Protein. *Molecules* **2023**, *28* (4), 1682. <https://doi.org/10.3390/molecules28041682>.
- (248) Zhang, Y.; Yu, Z.; Jiang, F.; Fu, P.; Shen, J.; Wu, W.; Li, J. Two DNA Aptamers against Avian Influenza H9N2 Virus Prevent Viral Infection in Cells. *PLoS ONE* **2015**, *10* (3), e0123060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123060>.
- (249) Sattari, R.; Palizban, A.; Khanahmad, H. Single-Strand DNA-Like Oligonucleotide Aptamer Against Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9 Using CE-SELEX: PCSK9 Targeting Selection. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2020**, *34* (4), 475–485. <https://doi.org/10.1007/s10557-020-06986-y>.
- (250) Ashley, J.; Li, S. F. Y. Three-Dimensional Selection of Leptin Aptamers Using Capillary Electrophoresis and Implications for Clone Validation. *Anal. Biochem.* **2013**, *434* (1), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.11.024>.
- (251) Mendonsa, S. D.; Bowser, M. T. In Vitro Selection of Aptamers with Affinity for Neuropeptide Y Using Capillary Electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (26), 9382–9383. <https://doi.org/10.1021/ja052406n>.
- (252) Yang, J.; Bowser, M. T. Capillary Electrophoresis-SELEX Selection of Catalytic DNA Aptamers for a Small-Molecule Porphyrin Target. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (3), 1525–1530. <https://doi.org/10.1021/ac302721j>.
- (253) Wu, C.; Wan, W.; Zhu, J.; Jin, H.; Zhao, T.; Li, H. Induction of Potent Apoptosis by an Anti-CD20 Aptamer *via* the Crosslink of Membrane CD20 on Non-Hodgkin's Lymphoma Cells. *RSC Adv.* **2017**, *7* (9), 5158–5166. <https://doi.org/10.1039/C6RA27154E>.
- (254) McKinnon, K. M. Flow Cytometry: An Overview. *Curr. Protoc. Immunol.* **2018**, *120*, 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>.
- (255) Zafrani, L.; Monneret, G. Comprendre la cytométrie en flux. **2017**.
- (256) Maleki, R.; Rahimpour, A.; Rajabibazl, M. Construction and Evaluation of Wild and Mutant Ofatumumab scFvs against the Human CD20 Antigen. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2023**, *53* (3), 239–246. <https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2073598>.
- (257) Fasihi-Ramandi, M.; Amani, J.; Salmanian, A.; Moazzeni, S.; Ahmadi, K. Production and Characterization of New Anti-Human CD20 Monoclonal Antibody. *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.* **2015**, *14* (5), 502–508.
- (258) *A multivalent DNA aptamer specific for the B-cell receptor on human lymphoma and leukemia - PubMed.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21030439/> (accessed 2023-06-14).
- (259) Chu, Y.; Hochberg, J.; Yahr, A.; Ayello, J.; van de Ven, C.; Barth, M.; Czuczman, M.; Cairo, M. S. Targeting CD20+ Aggressive B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma by Anti-CD20 CAR mRNA-Modified Expanded Natural Killer Cells In Vitro and in NSG Mice. *Cancer Immunol. Res.* **2015**, *3* (4), 333–344. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0114>.
- (260) Hua, S.; Saunders, M.; Dimapasoc, L. M.; Jeong, S. H.; Kim, B. J.; Kim, S.; So, M.; Lee, K.-S.; Kim, J. H.; Lam, K. S.; Lebrilla, C. B.; An, H. J. Differentiation of Cancer Cell Origin and Molecular Subtype by Plasma Membrane N-Glycan Profiling. *J. Proteome Res.* **2014**, *13* (2), 961–968.

<https://doi.org/10.1021/pr400987f>.

(261) Tsai, P.-C.; Hernandez-Illizaliturri, F. J.; Bangia, N.; Olejniczak, S.; Czuczman, M. S. Regulation of CD20 in Rituximab-Resistant Cell Lines (RRCL) and B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma (B-NHL). *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18* (4), 1039–1050. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1429>.

(262) Montano, M. 2 - Model Systems. In *Translational Biology in Medicine*; Montano, M., Ed.; Woodhead Publishing, 2014; pp 9–33. <https://doi.org/10.1533/9781908818652.9>.

(263) Encarnaç o, J. C.; Barta, P.; Fornstedt, T.; Andersson, K. Impact of Assay Temperature on Antibody Binding Characteristics in Living Cells: A Case Study. *Biomed. Rep.* **2017**, *7* (5), 400–406. <https://doi.org/10.3892/br.2017.982>.

(264) *Factors affecting the antigen-antibody reaction - PubMed.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19204779/> (accessed 2023-06-15).

(265) Markham, N. R.; Zuker, M. UNAFold: Software for Nucleic Acid Folding and Hybridization. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2008**, *453*, 3–31. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-429-6_1.

(266) Zuker, M. Mfold Web Server for Nucleic Acid Folding and Hybridization Prediction. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (13), 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>.

(267) SantaLucia, J. A Unified View of Polymer, Dumbbell, and Oligonucleotide DNA Nearest-Neighbor Thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95* (4), 1460–1465. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1460>.

(268) Swierczewska, M.; Lee, S.; Chen, X. The Design and Application of Fluorophore–Gold Nanoparticle Activatable Probes. *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP* **2011**, *13* (21), 9929–9941. <https://doi.org/10.1039/c0cp02967j>.

(269) Dirksen, A.; Dawson, P. E. Expanding the Scope of Chemoselective Peptide Ligations in Chemical Biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12* (6), 760–766. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.10.009>.

(270) Harmand, T. J. R.; Murar, C. E.; Bode, J. W. New Chemistries for Chemoselective Peptide Ligations and the Total Synthesis of Proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *22*, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.09.032>.

(271) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2001**, *40* (11), 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5).

(272) A, D.; L, B.; T, L.; E, D. Access to a Stabilized I-Motif DNA Structure through Four Successive Ligation Reactions on a Cyclopeptide Scaffold. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18* (32). <https://doi.org/10.1039/d0ob01311k>.

(273) Matteucci, M. D.; Caruthers, M. H. Synthesis of Deoxyoligonucleotides on a Polymer Support. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (11), 3185–3191. <https://doi.org/10.1021/ja00401a041>.

Depuis une 20aine d'années, les anticorps monoclonaux (mAb) sont apparus comme une classe prometteuse de produits pharmaceutiques pour le traitement de nombreuses pathologies dont le cancer. Cependant, peu de mAbs sont utilisés en thérapie un quart de siècle après leur découverte. Le coût de la thérapie est un facteur limitatif majeur, avec des coûts annuels qui peuvent avoisiner les 100 000 euros par patient, ce qui soulève de graves préoccupations quant à leur pertinence économique. Par ailleurs, comme la plupart des protéines, de nombreux facteurs, tels que l'agrégation, leur grande taille (150 kDa), et leur immunogénicité, limitent leur utilisation en oncologie. Il y a donc un besoin urgent en systèmes moléculaires qui intègrent les propriétés des mAbs tout en s'affranchissant de ces obstacles. A partir des expertises de deux laboratoires partenaires (DCM et DPM, Grenoble), nous proposons de concevoir des mimes du mAb rituximab qui est utilisé pour traiter certains lymphomes, et dont l'épitope CD20 est parfaitement connu. Pour cela, des aptamères sélectifs de l'épitope CD20 ont été sélectionnés en utilisant l'électrophorèse capillaire (méthode de CE-SELEX). Après caractérisation *in vitro* notamment par titration calorimétrique isotherme (ITC), les séquences ont été optimisées afin de limiter les poids moléculaires ainsi que les coûts de production. L'objectif est ensuite de greffer ces candidats sur des châssis cyclopeptidiques sous une forme multimérique *via* l'utilisation de réactions chimiosélectives du type ligation « oxime » et CuAAC (copper(I)-catalyzed azide alkyne cycloaddition). Les composés les plus affins sont finalement étudiés lors d'expériences biologiques préliminaires permettant de vérifier la spécificité des mimes du rituximab.

Mots clés : Aptamères, peptides, interactions biomoléculaires, mimes d'anticorps, CE-SELEX.

In the late 90's, the monoclonal antibodies (mAbs) became a major tool for therapeutic purposes. However, some restrictions¹ provided strong arguments for the development of alternative agents like aptamers, that integrate the benefits of mAbs while circumventing these limits. As a proof of concept, we propose to design small synthetic antibody mimics of the Rituximab, uses to treat some lymphomas by targeting the CD20 antigen. In order to prepare efficient and selective mimics, a selection of recognition elements must be achieved. Aptamers were chosen because of their very low immunogenicity, their high affinity generally for their target, their structural and chemical stability and the fact that their production is carried out by organic synthesis². Few DNA sequences were thus selected from a random ssDNA library using the systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) method, coupled to capillary electrophoresis (CE). Among the modified SELEX methods, CE-SELEX was preferred due to its multiple benefits such as less consumption of samples, a natural binding environment, and a higher screening efficiency. The affinity and specificity of the best candidates for their target, were then characterized in solution by CE and isothermal titration calorimetry (ITC) and in cellulo using flow cytometry. Thus, the first part of this project led to the selection of specific recognition elements, selected against a short fragment of the CD20 antigen. Our main goal now, is to design dimeric or tetrameric compounds on macromolecular scaffolds using chemical ligations such as oxime or CuAAC (copper(I)-catalyzed azide alkyne cycloaddition) to assess the multivalent effects.

Keywords: Aptamers, peptides, biomolecular interactions, antibody mimics, CE-SELEX.