



**HAL**  
open science

# Développement de plateformes de signalisation dérivées de particules pseudo-virales pour contrôler les fonctions cellulaires

Hasna Maayouf

► **To cite this version:**

Hasna Maayouf. Développement de plateformes de signalisation dérivées de particules pseudo-virales pour contrôler les fonctions cellulaires. Biologie cellulaire. Université de Haute Alsace - Mulhouse, 2024. Français. NNT : 2024MULH7387 . tel-04810394

**HAL Id: tel-04810394**

**<https://theses.hal.science/tel-04810394v1>**

Submitted on 29 Nov 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.

UNIVERSITÉ DE HAUTE-ALSACE  
UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

# THÈSE

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE HAUTE-ALSACE**  
**ECOLE DOCTORALE : Physique et chimie physique (ED 182)**

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue publiquement par  
**HASNA MAAYOUF**

Le 10 octobre 2024

---

## **Développement de plateformes de signalisation dérivées de particules pseudo-virales pour contrôler les fonctions cellulaires**

---

Sous la direction du Dr. Laurent PIEUCHOT

Jury :

Dr. Nathalie THERET, Directrice de recherche, Université de Rennes (Rapporteur)  
Dr. Lionel MAURIZI, Chargé de recherche, Université de Bourgogne (Rapporteur)  
Dr. Johanne LEROY-DUDAL, Maître de conférences, CY Cergy Paris Université (Examinateur)  
Dr. Coline PINESE, Associate Professeur, Université de Montpellier (Examinateur)  
Dr. Damien BAIGL, Professeur, Université Pierre-et-Marie-Curie (Président)  
Dr. Laurent PIEUCHOT, Chargé de recherche, Université de Haute Alsace (Directeur de thèse)



## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma sincère gratitude au Dr. Laurent PIEUCHOT et au Dr. Karine Anselme pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse au sein de leur équipe. Je remercie particulièrement le Dr. Pieuchot, directeur de thèse, pour son encadrement rigoureux et bienveillant, sa disponibilité et le partage de ses connaissances. Ce fut un réel plaisir de travailler sur ce projet innovant sous sa direction.

Je souhaite adresser mes sincères remerciements aux membres de mon jury, les Dr. Nathalie Theret et Lionel Maurizi, pour l'honneur qu'ils ont fait en acceptant d'évaluer mes travaux. Je remercie également les Dr. Johanne Leroy-Dudal, Coline Pinese et Damien Baigl d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du laboratoire qui ont participé de près ou de loin à ce projet. Je souhaite remercier tout particulièrement Tatiana Pethitory pour m'avoir formé aux techniques de microscopie confocale, ainsi qu'Isabelle Brigaud pour son soutien en biologie moléculaire. Leur expertise, leurs conseils et leur bienveillance m'ont été précieux. J'adresse également mes remerciements à Thomas Dos Santos, désormais docteur, pour sa contribution au projet et pour sa gentillesse.

Je remercie les Dr. Ambroise Lambert et Franck Carreiras et leur thésard Alphonse Boché du laboratoire ERRMECe pour leur collaboration fructueuse. Un grand merci à Alphonse pour ses précieuses analyses sur les points focaux et pour son aide. Je remercie les Dr. Arnaud Ponche et Carole Arnold pour leur soutien et leurs conseils. Je tiens à remercier les stagiaires Louise Abbou et Guillaume Grosjean pour leur implication dans ce projet. Je souhaite une belle réussite aux doctorantes restantes, Marie-Ly et Eve, et les remercie pour leur soutien et pour tous les bons moments passés ensemble. Je remercie également Gorgio, qui soutiendra sa thèse en même temps que moi, pour les discussions et les bons moments que nous avons partagés. Enfin, je tiens à remercier la Dr. Rayane Hedna pour son aide dans ce projet.

Enfin, je souhaite exprimer ma profonde gratitude à mes parents, ma famille et mes amis pour leur soutien et leur encouragement pour réaliser ces grandes études. Merci à mes parents pour m'avoir offert un cadre de vie propice à mes études et pour les sacrifices qu'ils ont faits pour me permettre d'en arriver là où je suis aujourd'hui.



## Résumé

Diverses stratégies de fonctionnalisation de surface existent pour améliorer la biocompatibilité des matériaux utilisés dans les dispositifs implantables, comme les matériaux de substitution osseuse. Le choix du matériau est crucial selon son application (administration de médicaments, ingénierie tissulaire, etc.). Le polydiméthylsiloxane (PDMS), par exemple, bien qu'utilisé dans de nombreux domaines, présente des propriétés de surface défavorables à l'adhérence cellulaire. Pour y remédier, il est possible de fonctionnaliser sa surface avec des protéines entières de la matrice extracellulaire (MEC) ou des peptides synthétiques dérivés de celles-ci. Bien que ces approches offrent certaines solutions, des défis tels que le coût de production, la solubilité et le contrôle de la présentation en 3D entravent leur manipulation. Pour surmonter ces défis, nous avons développé des particules pseudo-virales (VLPs) présentant différents peptides bioactifs à leur surface. Ces particules sont formées à partir de 180 copies de la protéine d'enveloppe CP3, dérivée du bactériophage à ARN AP205. Nous avons génétiquement modifié la protéine CP3 à ses extrémités N- et C-terminales pour produire des VLPs présentant des peptides d'adhésion (RGD et YIGSR) et ostéogéniques (BMP2). Les peptides RGD et YIGSR sont dérivés respectivement de la fibronectine et de la laminine, et les peptides BMP2, de la protéine recombinante humaine BMP2. Nous avons caractérisé la structure des VLPs et réalisé des essais biologiques pour évaluer leur bioactivité à la surface du PDMS en utilisant des cellules de myoblaste C2C12. Nos résultats démontrent que les VLPs que nous avons conçues stimulent les processus d'adhésion, de migration, de prolifération et de différenciation. Nous avons également conçu des VLPs hétéromériques co-exprimant les peptides RGD et YIGSR ou BMP2 et avons montré que leur bioactivité est maintenue lorsqu'ils sont combinés sur la même particule. En parallèle, nous avons comparé les interactions cellulaires et la formation des adhésions focales induites par la VLP-RGD avec celles induites par la fibronectine dont elle dérivée, en mettant en évidence des similitudes et des différences. Ce travail démontre que les VLPs d'AP205 peuvent être utilisées comme nano-plateformes de signalisation pour stimuler diverses fonctions cellulaires, avec des applications potentielles en nanomédecine et dans les biomatériaux. L'utilisation de particules SpyCatcher AP205 a également été explorée pour présenter des peptides fusionnés génétiquement aux SpyTag avec des interactions covalentes contrôlées. Ce système ouvre des perspectives pour le développement de nouveaux biomatériaux multifonctionnels.



## Abstract

Scientists have explored various surface functionalization strategies to improve the biocompatibility of materials used in implantable devices, such as bone replacement materials. The choice of material remains crucial, depending on its application (drug delivery, tissue engineering, etc.). Polydimethylsiloxane (PDMS), for example, although used in many fields, has surface properties unfavorable for cell adhesion. To overcome this, scientists often employ surface functionalization with whole extracellular matrix (ECM) proteins or synthetic peptides derived from them to mimic the bioactive cues from the microenvironment. While these approaches offer some solutions, challenges such as production cost, solubility, and control of 3D presentation hinder their manipulation. To address these challenges, we present virus-like particles (VLPs) consisting of 180 copies of the envelope protein CP3, derived from the AP205 RNA bacteriophage. We genetically modified the CP3 protein at both N- and C- termini to create VLPs that display the adhesion peptides RGD and YIGSR, derived from fibronectin and laminin respectively, and the osteogenic peptide BMP2, derived from the human recombinant BMP2 protein. We characterized their structure and performed biological assays to evaluate their bioactivity on the PDMS surface using C2C12 myoblast cells. Our results demonstrate that the designed VLPs stimulate adhesion, migration, proliferation, and differentiation processes. We engineered heteromeric VLPs co-expressing RGD and YIGSR or BMP2 peptides and showed that their bioactivity is maintained when combined on the same particle. In parallel, we compared cell interactions and focal adhesion recruitment with VLP-RGD and its derived fibronectin, highlighting similarities and differences. This work demonstrates that AP205 VLPs can be used as nanoscale signaling platforms to stimulate multiple cell functions, with potential applications in nanomedicine and biomaterials. Additionally, we explored AP205 SpyCatcher particles to display peptides genetically fused to SpyTag with controlled covalent interactions, opening prospects for the development of multifunctional biomaterials.



## Liste des abréviations

|                 |   |              |  |
|-----------------|---|--------------|--|
| <b>MEC</b>      | Matrice Extracellulaire   | <b>HGF</b>   | Hepatocyte growth factor               |
| <b>VLP</b>      | Virus Like-Particles<br>(particules pseudo-virales)                             | <b>SDF-1</b> | Stromal cell-derived factor-1          |
| <b>PGs</b>      | Protéoglycanes  | <b>IGF-1</b> | Insulin-like Growth-Factor-1           |
| <b>GAGs</b>     | Glycosaminoglycanes   | <b>Pax</b>   | Paired box                             |
| <b>TGFβ</b>     | Transforming Growth Factor<br>β   | <b>MRFs</b>  | Myogenic regulatory factors            |
| <b>FACITs</b>   | Fibril-associated collagens   | <b>MyoD</b>  | Myoblast determination<br>protein-1    |
| <b>RGD</b>      | Arginine-Glycine-Acide<br>aspartique  | <b>Mef2</b>  | Myocyte enhancer factor-2              |
| <b>LDV</b>      | Leucine-Acide aspartique-<br>Valine   | <b>MyoG</b>  | Myogenin                               |
| <b>N- ter</b>   | N- terminale  | <b>MyH</b>   | Myosin heavy chains                    |
| <b>C- ter</b>   | C- terminale  | <b>Mrf4</b>  | Myogenic factor-6                      |
| <b>AFs</b>      | Adhésions focales   | <b>BMPs</b>  | Protéines osseuses<br>morphogénétiques |
| <b>CAM</b>      | Cell Adhesion Molecules   | <b>CSMs</b>  | Cellules souches<br>mésenchymateuses   |
| <b>I-CAM</b>    | Intracellular Adhesive<br>Molecules   | <b>Runx2</b> | Runt-related transcription<br>factor-2 |
| <b>FAK</b>      | Focal Adhesion Kinase   | <b>Osx</b>   | Osterix                                |
| <b>ILK</b>      | Integrin-Linked-Kinase  | <b>OP-1</b>  | Osteogenic protein-1                   |
| <b>Arp 2/3</b>  | Actin Related Protein 2/3   | <b>BMPR</b>  | Bone morphogenic protein<br>receptor   |
| <b>GF</b>       | Growth Factor   | <b>MAPK</b>  | Mitogen activated kinases              |
| <b>RTK</b>      | Receptor Tyrosine Kinase  | <b>p38</b>   | Mitogen-activated protein<br>kinase    |
| <b>EGFR</b>     | Epidermal Growth Factor   | <b>E2F</b>   | E2 promoter-binding factors            |
| <b>PI3K/Akt</b> | Phosphoinoside 3-Kinase /<br>Protein Kinase B                                   | <b>JNK</b>   | Jun N-terminal kinase                  |
| <b>MEK/ERK</b>  | Mitogen-Activated Protein<br>Kinase / Extracellular signal-<br>Regulated Kinase | <b>ALP</b>   | Alkaline Phosphatase                   |
| <b>GTPases</b>  | Cytosolic G proteins  | <b>PDMS</b>  | Polydiméthylsiloxane                   |
| <b>Rho A</b>    | Ras homolog family member<br>A  | <b>SDS</b>   | Dodécylsulfate de sodium               |

|              |  |                 |   |
|--------------|--|-----------------|---|
| <b>ADN</b>   | Acide Désoxyribonucléique                                      | <b>MC3T3-E1</b> | Pré-ostéoblastes de souris                  |
| <b>ARN</b>   | Acide Ribonucléique  | <b>C2C12</b>    | Cellules de myoblastes de souris            |
| <b>AA</b>    | Acides aminés  | <b>RGD</b>      | Arginine-Glycine-Acide aspartique           |
| <b>CDK</b>   | Kinases dépendantes des cyclines                               | <b>LDV</b>      | Leucine-Aspartate-Valine                    |
| <b>FGF-2</b> | Fibroblast growth factor 2                                     | <b>YIGSR</b>    | Tyrosine-Isoleucine-Glycine-Sérine-Arginine |
| <b>hBMSC</b> | Cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine | <b>IKVAV</b>    | Isoleucine-Lysine-Valine-Alanine-Valine     |

## Liste des figures

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Figure 1 : Représentation schématique de la classification des protéoglycanes (PGs).....</i>   | <i>25</i> |
| <i>Figure 2 : Classification des collagènes selon leur capacité à former des agrégats.....</i>  | <i>26</i> |
| <i>Figure 3 : Représentation schématique des différents domaines protéiques de la fibronectine .....</i>  | <i>28</i> |
| <i>Figure 4 : Les différents isoformes de laminines .....</i>   | <i>29</i> |
| <i>Figure 5 : Les principaux composants de la matrice extracellulaire (MEC) et leurs interactions avec les cellules via les récepteurs cellulaires, tels que les intégrines.....</i>                    | <i>30</i> |
| <i>Figure 6 : Schéma de l'architecture moléculaire d'une adhésion focale basé sur l'analyse iPALM.....</i>  | <i>31</i> |
| <i>Figure 7 : Classification des ligands spécifiques aux intégrines .....</i>   | <i>32</i> |
| <i>Figure 8 : Illustration du processus d'activation des intégrines.....</i>  | <i>33</i> |
| <i>Figure 9 : Les Voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la régulation du cytosquelette via les intégrines et les récepteurs de facteurs de croissance (GFR).....</i>               | <i>35</i> |
| <i>Figure 10 : Polarisation et distribution du cytosquelette lors de la migration des fibroblastes.....</i>   | <i>36</i> |
| <i>Figure 11 : Voies de signalisation régulant la migration cellulaire via les interactions des intégrines à la MEC .....</i>   | <i>37</i> |
| <i>Figure 12: Schéma des différentes couches composants le muscle squelettique (gauche) et représentation des principaux composants de la MEC entourant les myofibres (droite).....</i>                 | <i>39</i> |
| <i>Figure 13 : Schéma représentant les facteurs de transcription exprimés au cours des étapes de la différenciation des cellules musculaires squelettiques .....</i>                                    | <i>40</i> |
| <i>Figure 14: Coopération des récepteurs d'intégrines et de facteurs de croissance dans la régulation de la différenciation ostéogénique.....</i>   | <i>41</i> |
| <i>Figure 15 : Étapes de différenciation de l'engagement des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) vers la lignée ostéoblastique.....</i>  | <i>41</i> |
| <i>Figure 16 : Structure de la BMP2 (vert) avec les épitopes ("wrist" et "knuckle") interagissant avec les récepteurs BMPR-IA (marron) et BMPR-II (bleu).....</i>                                       | <i>42</i> |
| <i>Figure 17 : Voies de signalisation activées en aval du récepteur BMPR en réponse à la BMP2 dans la régulation de la différenciation des CSMs en ostéoblastes .....</i>                               | <i>43</i> |
| <i>Figure 18: Les différents domaines d'interaction de la fibronectine aux intégrines et aux protéines de la MEC .....</i>  | <i>49</i> |
| <i>Figure 19 : Structure des différentes chaînes <math>\alpha 1</math>, <math>\beta 1</math> et <math>\gamma 1</math> composants la laminine et les domaines d'interaction avec les intégrines.....</i> | <i>50</i> |
| <i>Figure 20 : Les trois principales théories expliquant l'origine des virus .....</i>  | <i>59</i> |
| <i>Figure 21 : Principaux avantages des VLPs.....</i>   | <i>60</i> |

|  |     |
|--|-----|
| <i>Figure 22 : Différents types de capsides virales : (A) hélicoïdale, (B) icosaédrique, (C) sphérique, et (D) hybride</i>   | 61  |
| <i>Figure 23 : Les différents types de VLPs non enveloppées (A) et enveloppées (B)</i>   | 63  |
| <i>Figure 24 : Différents types de triangulation (T) et diamètres de capsides virales</i>  | 64  |
| <i>Figure 25 : Les principes de la symétrie icosaédrique et des nombres de triangulation (T) dans les capsides virales</i>   | 65  |
| <i>Figure 26 : Structures des particules AP205 et MS2 avec les extrémités N- (bleu) et C- (rouge) terminales exposées à leur surface</i>   | 68  |
| <i>Figure 27 : Classification des méthodes de fonctionnalisation de la surface des VLPs</i>  | 70  |
| <i>Figure 28 : Les différents systèmes d'expression hétérologue pour la production de VLPs</i>   | 73  |
| <i>Figure 29 : Diagrammes circulaires illustrant les différentes applications des VLPs en pourcentage, recueillies à partir des sites officiels de la santé et des médicaments (FDA, EMA, WHO et ANSM)</i> | 76  |
| <i>Figure 30 : VLPs en tant que plateformes de diagnostic et pour les applications théranostiques</i>  | 78  |
| <i>Figure 31 : Système SpyCatcher : SpyTag</i>   | 79  |
| <i>Figure 32 : Vecteurs utilisés pour le clonage moléculaire</i>   | 83  |
| <i>Figure 33 : VLPs en tant que plateformes de présentation de peptides</i>  | 104 |
| <i>Figure 34 : Caractérisation des VLPs homomériques et hétéromériques</i>   | 106 |
| <i>Figure 35 : Fonctionnalisation de la surface du PDMS par les VLPs</i>   | 108 |
| <i>Figure 36 : VLPs en tant que plateformes multifonctionnelles pour stimuler l'adhérence et la migration cellulaire</i>   | 111 |
| <i>Figure 37 : VLPs multifonctionnelles pour stimuler la prolifération cellulaire</i>  | 113 |
| <i>Figure 38 : Association des peptides RGD et YIGSR à la surface des VLPs pour stimuler la différenciation myogénique</i>   | 115 |
| <i>Figure 39 : Comparaison de l'étalement et de la morphologie des cellules C2C12 sur la fibronectine et les VLP-RGD</i>   | 117 |
| <i>Figure 40 : Les VLP-RGD stimulent un grand nombre d'AFs à la périphérie des cellules C2C12</i>  | 119 |
| <i>Figure 41 : Effet de la fibronectine et des VLP-RGD sur le recrutement des récepteurs intégrines <math>\beta_1</math> et <math>\alpha_6\beta_3</math> dans les cellules C2C12</i>                       | 121 |
| <i>Figure 42 : Des hydrogels d'alginate fonctionnalisés avec les VLP-RGD stimulent l'adhérence et l'étalement des C2C12</i>  | 122 |
| <i>Figure 43 : Conception de particules multifonctionnelles avec des peptides bioactifs grâce au couplage SpyCatcher : SpyTag pour la formation d'hydrogel 3D</i>  | 124 |
| <i>Figure 44 : Couplage des VLPs SpyCatcher avec les ligands SpyT</i>  | 127 |
| <i>Figure 45 : Conception de VLPs SpyCatcher fusionnées aux SpyT-rhBMP2 pour stimuler la différenciation ostéogénique</i>  | 128 |
| <i>Figure 46 : VLPs en tant que plateformes de signalisation pour stimuler diverses fonctions cellulaires</i>  | 129 |

Figure 47 : (A) Profil d'exclusion des VLPs d'AP205 à 280 nm. (B) Gel SDS-PAGE des fractions d'élution VLPs d'AP205, récoltées après la chromatographie d'exclusion stérique. .... 133

Figure 48 : Image TEM des VLP-RGD (coloration négative). Les VLP-RGD adsorbées sur des grilles de microscopie électronique en carbone/formvar..... 133

Figure 49 : Gel SDS-PAGE des étapes de production et de purification des VLPs d'AP205 ..... 133

Figure 50 : Gel SDS-PAGE des étapes de production et de purification des VLP-RGD..... 134

Figure 51 : Gel SDS-PAGE des étapes de production et de purification des VLP-YIGSR..... 134

Figure 52 : Gel SDS-PAGE des étapes de production et de purification des VLP-BMP2 ..... 134

Figure 53 : Gel SDS-PAGE des étapes de production et de purification des VLP RGD-BMP2 ..... 135

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Séquences de peptides/épitopes avec des effets synergiques ..... 53

Tableau 2 : Génotype des souches E. coli ..... 82

Tableau 3 : Liste des oligonucléotides utilisés pour le clonage des variants AP205 dans pET-15b par PCR . 84

Tableau 4 : Liste des oligonucléotides utilisés pour le clonage des variants AP205 dans pETDuet-1 par PCR ..... 84

Tableau 5 : Liste des oligonucléotides pour le clonage des SpyTag-ligands dans pET-15b par PCR. .... 85

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des séquences d'acides aminés des variants AP205 ..... 87

Tableau 7 : Description des peptides exprimés à la surface des VLPs..... 88

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des séquences d'acides aminés des SpyT-ligands ..... 88

Tableau 9 : Amorces utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes myogéniques par qPCR ..... 99

Tableau 10 : Amorces utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes ostéogéniques par qPCR. .... 99



## Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Remerciements</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>Résumé</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>Abstract</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>Liste des abréviations</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>Liste des figures</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>Liste des tableaux</b> .....  | <b>13</b> |
| <b>Introduction</b> .....  | <b>21</b> |
| <b>Chapitre 1 : Interactions cellule – Matrice Extracellulaire (MEC)</b> .....   | <b>22</b> |
| I. Mimer l’environnement cellulaire <i>in vivo</i> pour la conception de biomatériaux.....                             | 23        |
| A. Les protéines de la MEC pour diriger le comportement cellulaire.....  | 23        |
| 1. Structure et fonction des protéines de la MEC.....  | 24        |
| <i>Protéoglycanes</i> .....  | 24        |
| <i>Collagènes</i> .....  | 26        |
| <i>Élastines</i> .....   | 27        |
| <i>Fibronectine</i> .....  | 27        |
| <i>Laminines</i> .....   | 28        |
| <i>Vitronectines</i> .....   | 29        |
| 2. Interaction des protéines de la MEC aux intégrines : régulation du comportement cellulaire.....                     | 30        |
| <i>Formation d’adhésion focale via les intégrines</i> .....  | 33        |
| 3. Coopération des intégrines et des récepteurs de facteurs de croissance pour diriger le comportement cellulaire..... | 34        |
| <i>La prolifération cellulaire</i> .....   | 35        |
| <i>La migration cellulaire</i> .....   | 36        |
| <i>Différenciation myogénique</i> .....  | 38        |
| <i>Différenciation ostéogénique</i> .....  | 40        |
| B. Fonctionnalisation de biomatériaux avec des protéines de la MEC pour diriger le comportement cellulaire.....        | 44        |
| <i>Collagène</i> .....   | 45        |
| <i>Fibronectine</i> .....  | 46        |
| <i>Laminines</i> .....   | 46        |
| <i>Protéines osseuses morphogénétiques (BMPs)</i> .....  | 47        |
| C. Limites des biomatériaux à base de protéines de la MEC.....   | 47        |
| II. Peptides bioactifs dérivés de protéines de la MEC pour diriger le comportement cellulaire.....                     | 47        |

|    |  |    |
|----|--|----|
| A. | Fonctionnalisation de biomatériaux avec des peptides bioactifs reconnus par les intégrines ..... | 48 |
| 1. | Peptides d'adhésion dérivés de la fibronectine .....   | 48 |
|    | <i>Tripeptide Argine-Glycine-Acide aspartique (RGD)</i> .....                                    | 48 |
| 2. | Peptides d'adhésion dérivés des laminines.....   | 50 |
|    | <i>YIGSR et IKVAV</i> .....  | 50 |
| 3. | Peptides d'adhésion dérivés du collagène .....   | 51 |
| 4. | Peptides dérivés des BMPs.....   | 51 |
| 5. | Effet synergique des peptides .....  | 52 |
|    | <i>RGD et peptides dérivés de la laminine (YIGSR et IKVAV)</i> .....                             | 52 |
|    | <i>RGD et BMP2 pour stimuler la différenciation ostéogénique</i> .....                           | 52 |
| B. | Limites des biomatériaux à base de peptides bioactifs.....                                       | 53 |

**Chapitre 2 : Les particules pseudo-virales (VLPs) en tant que plateformes de présentation de peptides bioactifs .....**

|                        |   |    |
|------------------------|---|----|
| <b>bioactifs .....</b> | <b>55</b>   |    |
| I.                     | Les particules pseudo-virales (VLPs).....   | 56 |
| A.                     | Généralités .....   | 56 |
| B.                     | Origine évolutive des virus .....   | 57 |
| C.                     | Caractéristiques des VLPs.....  | 59 |
| 1.                     | Les différents types de VLPs.....   | 61 |
|                        | <i>Les VLPs non-enveloppées</i> .....   | 61 |
|                        | <i>Les VLPs enveloppées</i> .....   | 62 |
| 2.                     | Mécanisme d'autoassemblage et géométrie .....   | 63 |
|                        | <i>Géométrie</i> .....  | 63 |
|                        | <i>Autoassemblage</i> .....   | 66 |
|                        | <i>Autoassemblage et géométrie de la VLP d'AP205</i> .....                                | 67 |
| D.                     | Production, purification et formulation des VLPs pour les applications biomédicales ..... | 68 |
| 1.                     | Les méthodes de fonctionnalisation des VLPs : génétique ou chimique.....                  | 69 |
| 2.                     | Les méthodes de production.....   | 70 |
|                        | <i>Bactéries</i> .....  | 70 |
|                        | <i>Levures</i> .....  | 71 |
|                        | <i>Insectes et baculovirus</i> .....  | 71 |
|                        | <i>Cellules de mammifères</i> .....   | 72 |
|                        | <i>Plantes</i> .....  | 72 |
| 3.                     | Purification .....  | 73 |
| 4.                     | Formulation .....   | 74 |
| 5.                     | Les techniques de caractérisation .....   | 74 |
| E.                     | Applications biotechnologiques .....  | 75 |
|                        | <i>Vaccins à base de VLPs</i> .....   | 77 |
|                        | <i>VLPs pour la délivrance de drogues thérapeutiques</i> .....                            | 77 |

|                                       |   |           |
|---------------------------------------|---|-----------|
| II.                                   | Le couplage SpyCatcher : SpyTag pour la conception de vaccins et d'hydrogel .....           | 78        |
| 1.                                    | La VLP d'AP205 SpyCatcher en tant que plateforme de vaccination .....                       | 78        |
| 2.                                    | Système SpyCatcher : SpyTag pour la conception de vaccins .....                             | 79        |
| 3.                                    | Système SpyCatcher : SpyTag pour la formation d'hydrogels .....                             | 79        |
| <b>Objectif de la thèse .....</b>     |   | <b>81</b> |
| <b>Matériels &amp; Méthodes .....</b> |   | <b>82</b> |
| I.                                    | Production de plasmides recombinants .....  | 82        |
| A.                                    | Matériel .....  | 82        |
| 1.                                    | Micro-organismes .....  | 82        |
| 2.                                    | Vecteurs .....  | 82        |
| 3.                                    | Oligonucléotides utilisés pour le clonage des protéines AP205 .....                         | 83        |
| a)                                    | Particules homomériques (pET-15b) .....   | 83        |
| b)                                    | Particules hétéromériques (pETDuet-1) .....   | 84        |
| 4.                                    | Oligonucléotides utilisés pour le clonage des protéines SpyTag-ligands .....                | 85        |
| B.                                    | Méthodes .....  | 86        |
| 1.                                    | Clonage moléculaire .....   | 86        |
| a)                                    | Conception des plasmides recombinants et des amorces .....                                  | 86        |
|                                       | <i>Particules AP205</i> .....   | 86        |
|                                       | <i>Protéines SpyTag-ligands</i> .....   | 88        |
| b)                                    | Amplification des gènes d'intérêt par PCR (Polymerase Chain Reaction) .....                 | 89        |
| c)                                    | Digestion des plasmides avec les enzymes de restriction (linéarisation des plasmides) ..... | 89        |
| d)                                    | Électrophorèse sur gel d'agarose et extraction d'ADN .....                                  | 89        |
| e)                                    | Ligation des gènes d'intérêt dans un plasmide .....   | 90        |
| f)                                    | Transformation des bactéries compétentes et sélection des clones .....                      | 90        |
| g)                                    | Extraction et purification des plasmides recombinants .....                                 | 91        |
| 2.                                    | Analyse des plasmides recombinants .....  | 91        |
| a)                                    | Sélection et criblage des clones d'intérêt par PCR .....                                    | 91        |
| b)                                    | Séquençage .....  | 91        |
| II.                                   | Production et purification des protéines recombinantes .....                                | 92        |
| 1.                                    | Expression des protéines recombinantes AP205 VLPs et SpyTag-ligands .....                   | 92        |
| 2.                                    | Purification .....  | 92        |
| a)                                    | Purification des AP205 VLPs .....   | 92        |
| b)                                    | Purification des SpyTag-ligands .....   | 93        |
| c)                                    | Purification des SpyT-rhBMP2 à partir des corps d'exclusion .....                           | 93        |
| III.                                  | Analyse des productions de protéines recombinantes .....                                    | 94        |
| 1.                                    | Analyse des protéines recombinantes par SDS-PAGE .....                                      | 94        |

|      |  |            |
|------|--|------------|
| 2.   | Analyse des particules par chromatographie d'exclusion stérique.....   | 95         |
| 3.   | Quantification des protéines par micro-BCA.....  | 95         |
| 4.   | Analyse de la taille des particules par la technique de Diffusion Dynamique de la Lumière .....                                | 95         |
| 5.   | Analyse des particules par microscopie électronique à transmission.....  | 96         |
| 6.   | Adsorption des VLPs sur les surfaces de culture PDMS.....  | 96         |
| IV.  | Essais cellulaires .....   | 96         |
| A.   | Matériel.....  | 96         |
| B.   | Méthodes .....   | 97         |
| 1.   | Étude des fonctions cellulaires en réponse au VLPs.....  | 97         |
|      | Adhérence des C2C12 sur les VLPs.....  | 97         |
|      | Imagerie cellulaire et évaluation de la motilité cellulaire .....  | 97         |
|      | Test de prolifération cellulaire et de viabilité.....  | 97         |
|      | Différenciation myogénique.....  | 98         |
|      | Différenciation ostéogénique.....  | 99         |
|      | Immunomarquages .....  | 99         |
|      | Quantification des adhésions focales et clusters d'intégrines .....  | 100        |
| V.   | Test d'assemblages des VLPs SpyCatcher avec les SpyTag-ELP-ligand .....  | 100        |
|      | Couplage des SpT-ELP-ligand aux VLPs SpyCatcher et analyse par SDS-PAGE .....  | 100        |
|      | Analyse des couplages SpyCatcher : SpyT par chromatographie d'exclusion stérique .....   | 101        |
|      | Test d'adhésion sur les SpyCatcher : SpyTag-ELP-RGD.....   | 101        |
| VI.  | Analyse statistique .....  | 101        |
| VII. | Outils informatiques.....  | 101        |
|      | <b>Résultats et Discussion.....</b>  | <b>103</b> |
| I.   | Particules pseudo-virales en tant que plateformes de signalisation.....  | 103        |
|      | Développement et caractérisation des VLPs homomériques et hétéromériques. ....   | 103        |
|      | VLPs en tant que plateformes multifonctionnelles pour stimuler l'adhérence et la migration cellulaire. .                       | 108        |
|      | VLPs en tant que plateformes multifonctionnelles pour stimuler la prolifération et la différenciation cellulaire.....          | 112        |
|      | La présence de RGD à la surface des VLPs favorise la prolifération des C2C12.....  | 112        |
|      | Effet des peptides RGD et YIGSR et de leur association à la surface des VLPs pour stimuler la différenciation myogénique ..... | 113        |
|      | Effet des VLP-BMP2 sur la différenciation ostéogénique.....  | 114        |
|      | VLP-RGD pour stimuler le clustering d'intégrines à l'échelle nanométrique .....  | 116        |
|      | Les VLP-RGD modulent l'étalement des cellules C2C12 de manière dose dépendante.....  | 116        |
|      | Les VLP-RGD stimulent la formation d'un plus grand nombre d'adhésion focales (AFs) à la périphérie des cellules .....          | 118        |
|      | Les VLP-RGD stimulent un recrutement d'un plus grand nombre de récepteurs intégrines $\beta$ 1 .....                           | 120        |
|      | Des hydrogels d'alginate fonctionnalisés avec les VLP-RGD stimulent l'adhérence des cellules C2C12.....                        | 122        |

|   |            |
|---|------------|
| II. Conception de particules multifonctionnelles avec divers peptides bioactifs grâce au couplage SpyCatcher : SpyTag. .... | 123        |
| Couplage de VLPs SpyCatcher avec divers ligands Spytag.....   | 125        |
| Conception de VLPs SpyC fusionnées aux SpyT-rhBMP2 comme plateformes de stimulation de l'ostéogénèse. ....                  | 127        |
| <b>Conclusion et perspectives .....</b>   | <b>129</b> |
| <b>Annexes .....</b>  | <b>133</b> |
| <b>Appendice.....</b>   | <b>136</b> |
| Liste des communications .....  | 136        |
| <b>Références .....</b>   | <b>138</b> |



## Introduction

L'équipe de Biomatériaux-Biointerfaces dans laquelle j'ai réalisé ma thèse, se consacre à l'étude du comportement cellulaire au contact des surfaces présentant des molécules et/ou des topographies variées, en combinant la biologie et la science des matériaux. La compréhension des interactions entre les cellules et les matériaux est au cœur des travaux du groupe. Ces recherches leur permettent d'aborder des questions biologiques fondamentales, d'améliorer la conception de biomatériaux existants ou en développement et de mettre au point de nouvelles applications en médecine. L'équipe étudie également l'influence que peuvent avoir différentes surfaces sur l'activité des protéines.

Cette thèse explore un nouveau thème basé sur l'utilisation de particules-pseudo virales (VLPs) en tant que plateformes de présentation multifonctionnelles de peptides bioactifs pour diriger le comportement cellulaire. Ce sujet pluridisciplinaire vise à développer de nouveaux outils et un savoir-faire dans le cadre d'une nouvelle thématique de recherche sur le biomimétisme et les matériaux bioinspirés et biodérivés au sein du laboratoire.

Dans ce premier chapitre d'introduction, nous aborderons en détail le rôle des composants majeurs de la matrice extracellulaire (MEC) dans la régulation du comportement cellulaire, et leur utilisation dans la conception et la fonctionnalisation de biomatériaux. Ensuite, nous discuterons des peptides bioactifs dérivés de ces protéines matricielles, qui sont utilisés pour la conception de biomatériaux, notamment dans les applications en ingénierie tissulaire.

Dans le second chapitre, nous nous concentrerons sur les particules pseudo-virales (VLPs) utilisées dans le cadre de nos travaux. Nous présenterons leurs caractéristiques, leurs méthodes de production et de purification, ainsi que leurs applications actuelles dans le domaine biomédical. L'objectif est d'exploiter la surface des VLPs pour mimer les interactions cellule-MEC à l'échelle nanométrique, en ciblant des récepteurs spécifiques par la présentation de peptides bioactifs à leur surface. Un de nos objectifs sera d'utiliser cette capacité pour diriger le comportement cellulaire, incluant l'adhérence, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire.

# Chapitre 1 : Interactions cellule – Matrice Extracellulaire (MEC).

## I. Mimer l'environnement cellulaire *in vivo* pour la conception de biomatériaux

Diverses stratégies sont mises en œuvre afin d'améliorer l'intégration des biomatériaux dans l'environnement biologique<sup>1,2</sup>. Les biomatériaux regroupent tous les matériaux synthétiques ou vivants destinés à substituer une fonction biologique déficiente. Ceux-ci incluent tout dispositif implantable dans un organisme, destiné à interagir avec les tissus sans entraîner de réactions inflammatoires (biocompatibilité). Le biomatériau implanté doit également s'intégrer au sein du tissu (biointégration). Les biomatériaux sont utilisés, par exemple, dans les systèmes d'administration de médicaments, les outils d'imagerie, l'ingénierie tissulaire, les prothèses et les équipements chirurgicaux<sup>3,4</sup>. L'interface biomatériau/tissu est l'une des pistes qui tend à optimiser et à rendre fonctionnelle la surface du matériau qui est au contact des cellules vivantes et qui pourrait influencer leur comportement.

Un des principaux objectifs, outre l'amélioration des propriétés mécaniques du matériau, est de mimer l'environnement cellulaire *in vivo* fourni par la MEC qui régule les fonctions physiologiques cellulaires. Il est donc crucial de comprendre comment les protéines qui composent la MEC interagissent avec les cellules au sein du microenvironnement et régulent leur comportement.

### A. Les protéines de la MEC pour diriger le comportement cellulaire

Au sein des tissus, les cellules interagissent avec la MEC qui régule leur comportement et assure un support structurel et mécanique aux cellules<sup>5</sup>. La MEC permet l'ancrage des cellules et régule leur comportement (adhérence, migration, prolifération et différenciation cellulaire). Celle-ci est présente dans tous les tissus et organes sous forme d'un stroma présent entre les îlots cellulaires (fibroblastes, ostéoblastes, etc.) au sein des tissus conjonctifs, ou de membrane basale de 50 à 150 nm d'épaisseur à l'interface entre un épithélium et un tissu conjonctif<sup>5</sup>. Leur mode d'organisation, leur composition et leur forme sont adaptées à chaque tissu. Les cellules (ex. fibroblastes) participent également à la synthèse et au remodelage de la MEC.

Le matrisome désigne l'ensemble des composants de la MEC et représente aujourd'hui une référence internationale pour identifier et classier les macromolécules de la MEC impliquées dans diverses fonctions biologiques<sup>7</sup>. La MEC est formée d'un enchevêtrement hétérogène et complexe de macromolécules fibreuses et adhésives multifonctionnelles, de structures et de tailles variables à différentes échelles<sup>6</sup>. La MEC est composée de deux classes principales de macromolécules : les

protéoglycanes (PGs) et les protéines fibreuses. Les principales protéines fibreuses de la MEC sont le collagène, l'élastine, la fibronectine et la laminine<sup>6</sup>.

## 1 Structure et fonction des protéines de la MEC

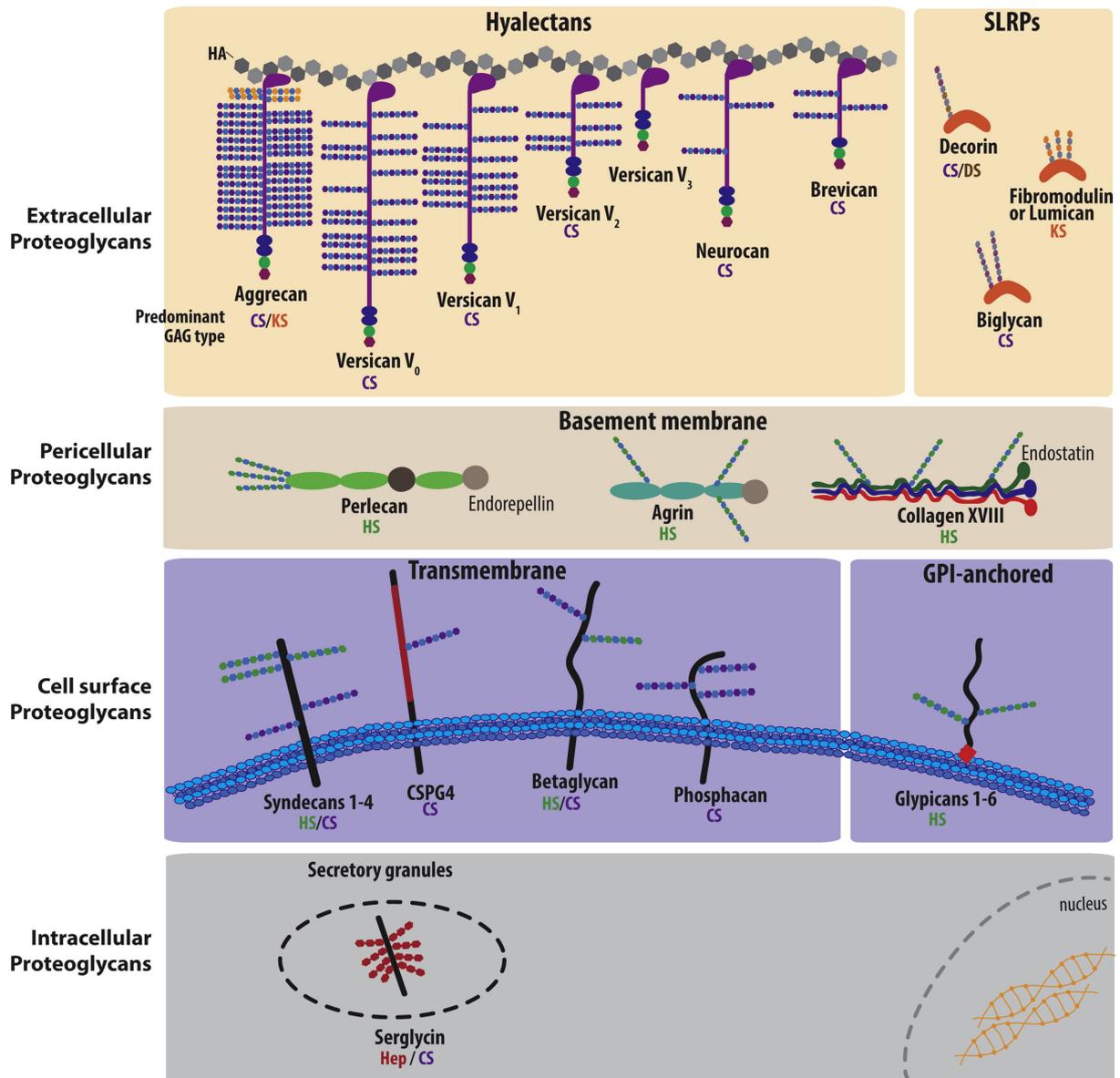
### *Protéoglycanes*

Les PGs sont des protéines hautement glycosylées constituées d'un axe protéique associé à une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs)<sup>5</sup>. En raison de leur haut degré de sulfatation, les PGs sont très hydrophiles. Ainsi, les GAGs tendent à adopter une structure déployée en milieu aqueux et retiennent une grande quantité d'eau (ex. agrécane), et jouent un rôle crucial pour les propriétés mécaniques des tissus cartilagineux par exemple<sup>5</sup>.

Il existe une grande diversité de PGs selon la nature du GAG, la longueur des chaînes de GAGs et le polymorphisme génétique de leur axe protéique<sup>5</sup> (**Figure 1**). Ceci leur confère une affinité et un mode d'association avec les cellules et ainsi des fonctions biologiques différentes.

**Polymorphisme génétique :**  
*variation dans la séquence d'ADN d'un gène au sein d'une population.*

Au sein de la MEC, les PGs interagissent avec des protéines matricielles, telles que le collagène et participent ainsi à leur intégration<sup>5</sup> (**Figure 1**). Les PGs sont également impliquées dans l'enchevêtrement de nombreuses molécules biologiquement actives, telles que les facteurs de croissance pour réguler le comportement cellulaire (ex. TGF- $\beta$ , Transforming Growth Factor- $\beta$ )<sup>9</sup>. D'autres PGs sont transmembranaires (ex. syndecans) et jouent un rôle dans l'ancrage des cellules à la MEC<sup>5,9</sup> (**Figure 1**). Enfin, il existe des PGs intracellulaires, comme les serglycines présentes dans les granules sécrétoires des mastocytes et des macrophages, qui participent au stockage de molécules bioactives<sup>5</sup> (**Figure 1**).

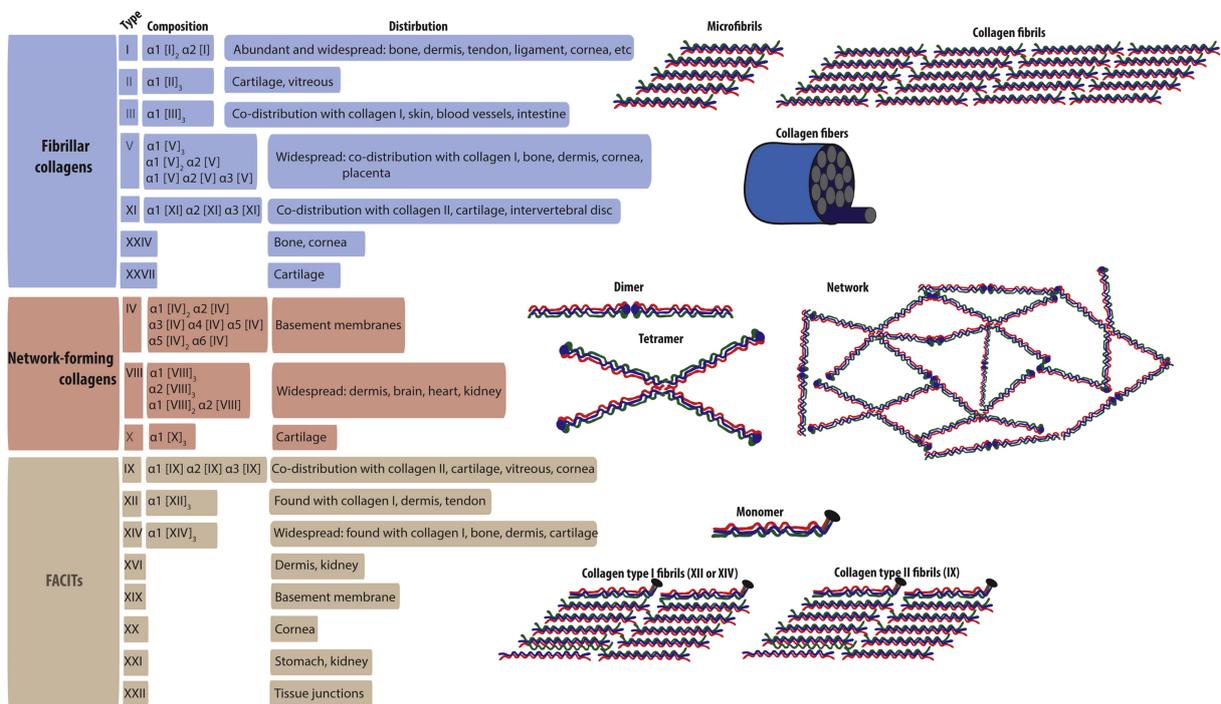


**Figure 1 : Représentation schématique de la classification des protéoglycans (PGs).** Les PGs sont classés en fonction de leur localisation, des modules protéiques et de leur homologie de séquence. Les PGs extracellulaires, incluant les hyalactanes (ex. agrégane) et les SLRPs (petites protéines riches en laucine), telles que la décorine, se trouvent dans la matrice extracellulaire. Les PGs péricellulaires, tels que le perlecan, sont localisés dans la membrane basale. Les PGs de surface cellulaire, qui incluent les protéines transmembranaires (ex. syndécans) et les protéines ancrées par GPI (glypicans 1 à 6), se trouvent à la surface de la cellule. Les PGs intracellulaires, comme la sérglycine, sont localisés dans les granules sécrétoires. Les différents types de glycosaminoglycans (GAG) associés sont indiqués en couleurs : CS (chondroïtine sulfate), KS (kératane sulfate), DS (dermatane sulfate), HS (héparane sulfate) et Hep (héparine). (Theocharis et al. <sup>5</sup>)

## Collagènes

Parmi les protéines fibreuses, les collagènes sont les plus abondants du corps humain et constituent jusqu'à 30% de la masse protéique totale chez les organismes multicellulaires<sup>10</sup>. Les collagènes apportent un soutien et une rigidité aux tissus, régulent l'adhérence cellulaire et sont impliqués dans la chimiotaxie, la migration cellulaire et dans le développement tissulaire<sup>5</sup>. À ce jour, on dénombre 28 types de collagène identifiés chez les vertébrés, classés selon leur capacité à former des agrégats (types fibres, réseaux ou Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices (FACITs))<sup>5</sup> (**Figure 2**). Ils sont généralement formés par l'association de trois chaînes polypeptidiques identiques ou différentes en une triple hélice composée de séquences Gly-X-Y. Ils peuvent ensuite s'assembler en complexe supramoléculaire sous formes de fibrilles ou de réseaux selon le type de collagène (**Figure 2**).

Les collagènes fibrillaires (ex. collagènes type I, III, type XI) sont majoritairement présents dans le stroma (**Figure 2**). Tandis que les collagènes non fibrillaires (ex. collagènes type IX, IV et VI)) sont incorporés au niveau de la membrane basale (**Figure 2**). Le collagène de type I est ubiquitaire et représente environ 90% des collagènes fibrillaires<sup>10</sup>. Les fibres de collagène sont produites entre autres par les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les chondrocytes<sup>5,10</sup>.



**Figure 2 : Classification des collagènes selon leur capacité à former des agrégats.** Les collagènes sont classés en différents types en fonction de leur composition, de leur structure et de leur localisation. Les collagènes fibrillaires regroupent les types I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII, formant des microfibrilles et fibres principalement présentes dans les os, la peau, le cartilage, les vaisseaux sanguins et autres tissus

*conjonctifs. Les collagènes formant des réseaux incluent les types IV, VIII et X, formant des réseaux de dimères, tétramères et autres structures, localisés dans les membranes basales, le cerveau, le cœur et d'autres tissus. Les collagènes FACIT (Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices) composés de collagènes de types IX, XII, XVI, XIX, XX et XXII sont associés aux fibres de collagènes de types I et II, présents dans divers tissus comme le derme, le rein, et les jonctions tissulaires. (Theocharis et al.<sup>5</sup>)*

### ***Élastines***

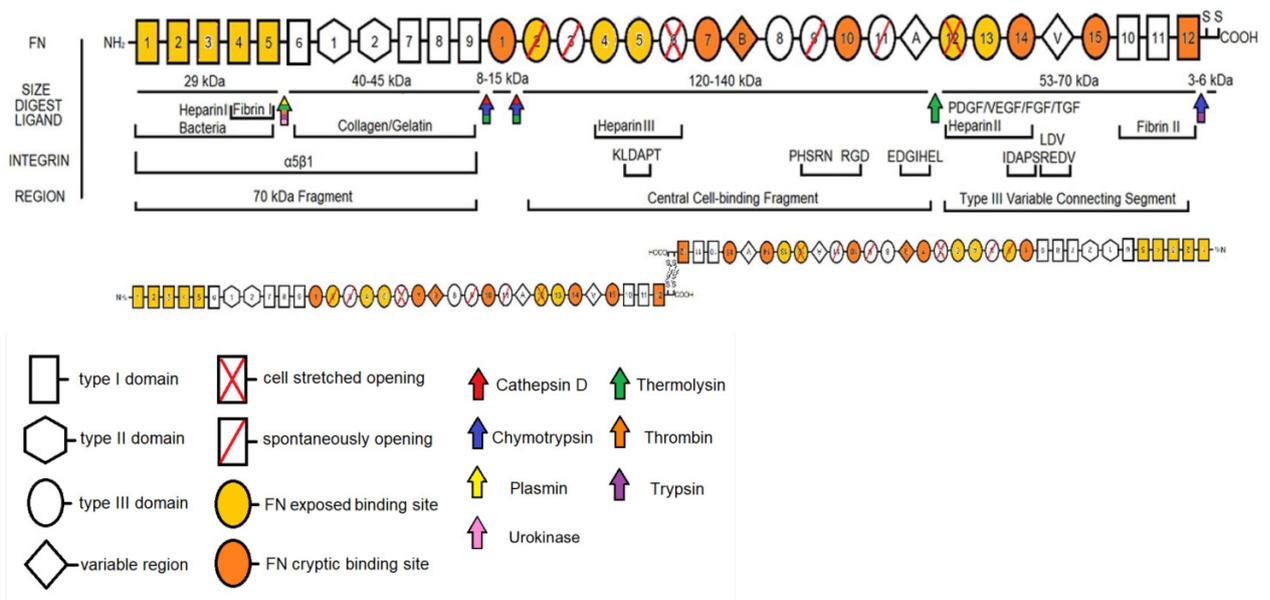
Les collagènes s'associent avec les élastines au sein de la MEC, une autre protéine fibreuse majeure sécrétée dans l'espace extracellulaire. Celles-ci sont plus abondantes dans les tissus qui nécessitent une flexibilité (ex. ligaments)<sup>5,11</sup>. Elles jouent également un rôle important dans l'assemblage de la MEC. Lorsqu'elles sont sécrétées dans la MEC (tropoélastine), elles s'assemblent en fibres puis s'organisent sous forme de réseaux fibrillaires. Elles sont constituées par des monomères de tropoélastine qui forment deux chaînes polypeptidiques avec un segment riche en hélice  $\alpha$  (alanine et lysine) et un segment hydrophobe<sup>5</sup>.

### ***Fibronectine***

Une troisième protéine fibreuse de la MEC, la fibronectine, joue un rôle crucial dans le maintien de l'attachement des cellules et dans la régulation des fonctions cellulaires. La fibronectine est composée de deux chaînes polypeptidiques (220 à 250 kDa) reliées par deux ponts disulfures au niveau des extrémités C-terminales (**Figure 3**)<sup>12</sup>.

Son gène est soumis à un épissage alternatif, ce qui donne deux types d'isoformes différents : la fibronectine cellulaire insoluble, sécrétée en tant que dimère dans la MEC principalement par les fibroblastes, et la fibronectine plasmatique, qui est sécrétée dans la circulation sanguine par les hépatocytes<sup>5,6</sup>.

La fibronectine possède des séquences répétées de trois domaines protéiques (domaines type I, II et III) impliquées dans les interactions protéine-protéine et protéine-cellule (**Figure 3**)<sup>5,6</sup>. Elle possède divers sites d'interaction avec d'autres dimères de fibronectine ainsi que le collagène, l'héparine et la fibrine et les récepteurs intégrines à la surface des cellules (**Figure 3**)<sup>5,6</sup>. En s'attachant à la fibronectine, les cellules exercent un étirement et une force de traction sur celle-ci grâce au cytosquelette actine-myosine, notamment lors de leur migration<sup>5,6</sup>. La fibronectine est également impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire<sup>12</sup>. L'interaction avec les récepteurs cellulaires est essentielle à l'assemblage de la fibronectine en fibrilles plus longues<sup>12</sup>.

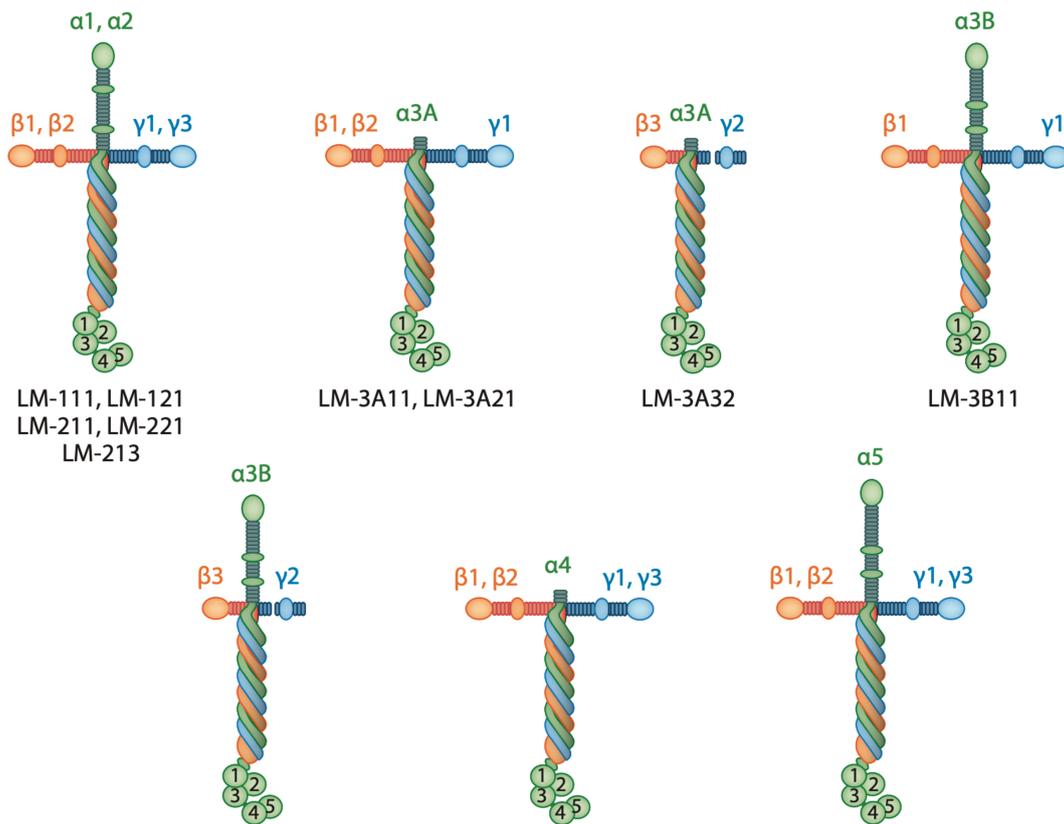


**Figure 3 : Représentation schématique des différents domaines protéiques de la fibronectine.** La fibronectine est composée de répétitions de domaines de type I (rectangles), types II (pentagones) et type III (ovales). Plusieurs sites de liaison spécifiques permettent l'interaction avec différents ligands comme le collagène, la gélatine, la fibrine, l'héparine, et également des intégrines. Des sites de clivage enzymatique sont indiqués par des flèches colorées représentant différentes protéases, comme la thrombine et la trypsine, qui modulent la conformation et la fonction de la fibronectine. (Dalton et al.<sup>12</sup>)

### Laminines

Les laminines font partie des principaux composants des membranes basales et participent à l'adhérence des cellules et à la régulation du comportement cellulaire<sup>6</sup>. Elles sont composées de trois chaînes polypeptidiques  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  qui s'associent en forme de croix avec deux bras courts et un bras long, reliés par des ponts disulfures (**Figure 4**)<sup>13</sup>. Selon la nature et la combinaison des trois chaînes polypeptidiques, on dénombre quinze isotopes de laminine identifiés, qui jouent un rôle important dans le maintien du phénotype tissulaire<sup>14</sup>.

Les différents domaines protéiques présents sur les chaînes polypeptidiques de la laminine sont impliqués dans différentes fonctions cellulaires selon leur interaction spécifique avec les intégrines<sup>14</sup>. Elles possèdent ainsi de nombreuses fonctions biologiques, telles que l'adhérence, la migration, la différenciation et l'embryogenèse<sup>14</sup>. Par exemple, les laminines-111 jouent un rôle dans la différenciation des cellules souches en neurones et en myoblastes (précurseurs des cellules musculaires)<sup>14</sup>. Les laminines-332 présentes à l'interface entre l'épiderme et le derme assurent l'intégrité de la peau en favorisant l'adhérence des kératinocytes à la membrane basale<sup>14</sup>. Les laminines (ex. laminine-111) peuvent également interagir avec les protéines de la MEC, telles que le collagène IV et le nidogène qui composent la lame basale<sup>14</sup>.



**Figure 4 : Les différents isoformes de laminines.** Chaque isoforme de laminine est représenté par la présence d'une chaîne alpha ( $\alpha$ , vert), une chaîne bêta ( $\beta$ , orange) et une chaîne gamma ( $\gamma$ , bleu). Les combinaisons spécifiques des chaînes définissent la structure et les fonctions de chaque isoforme dans les tissus. (Domogatskaya et al. <sup>14</sup>)

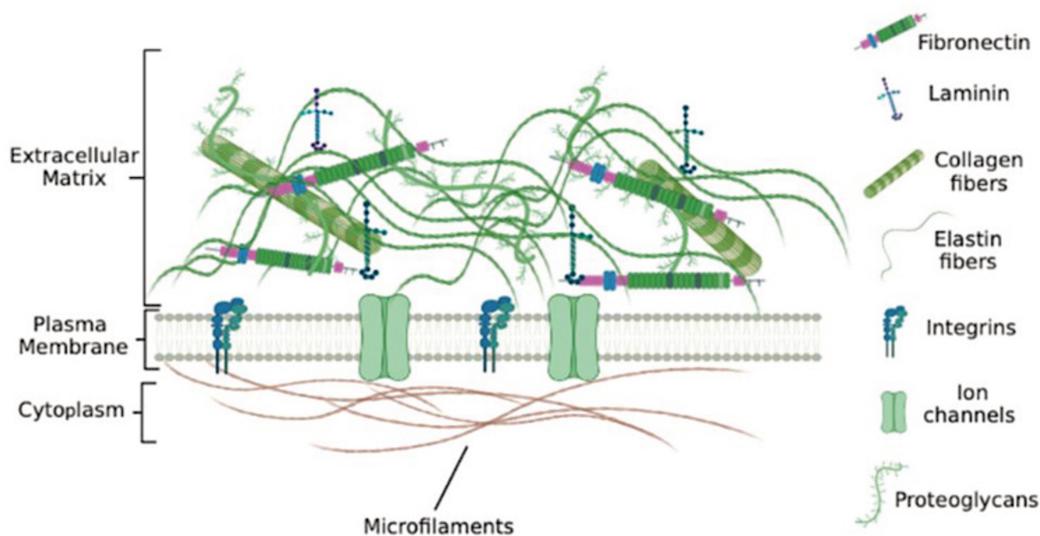
### Vitronectines

Enfin, on retrouve la vitronectine présente sous forme active et inactive au sein de la MEC<sup>15</sup>. En interagissant avec les cellules via les récepteurs intégrines, elles initient leur adhérence et régulent leur comportement (migration et prolifération cellulaire). Elles sont également impliquées dans la régulation des systèmes protéolytiques, la coagulation et la réaction inflammatoire<sup>15</sup>.

Les différentes protéines matricielles citées précédemment possèdent divers sites d'interaction spécifiques qui leur permettent de s'organiser et de s'associer entre elles sous forme d'un réseau protéique tridimensionnel associé aux cellules<sup>5,6</sup>.

Les cellules interagissent avec les composants matriciels au niveau de sites de reconnaissance spécifiques, appelés ligands, grâce à des récepteurs de surface cellulaire, y compris les intégrines et les PGs engagés dans la liaison avec la MEC<sup>11</sup>.

**Ligand :** molécule qui se fixe à un récepteur cible, entraînant une réponse biologique spécifique.



**Figure 5 : Les principaux composants de la matrice extracellulaire (MEC) et leurs interactions avec les cellules via les récepteurs cellulaires, tels que les intégrines.** La MEC est composée de différentes molécules, y compris des fibres de collagène, des fibres d'élastine, et des glycoprotéines incluant les protéoglycans, la fibronectine et la laminine. Ces différents composants s'associent entre eux pour former un réseau fibrillaire tridimensionnel interagissant avec les récepteurs cellulaires, tels que les intégrines, permettant la régulation du comportement des cellules. (Wu et al.<sup>6</sup>)

## 2. Interaction des protéines de la MEC aux intégrines : régulation du comportement cellulaire

Les intégrines sont impliquées dans la plupart des interactions cellules-MEC<sup>11,16</sup>. Ce sont des protéines transmembranaires organisées en hétérodimères composées de deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ , avec un large domaine N-terminal (N-ter) associé aux protéines matricielles et un court domaine C-terminal (C-ter) lié au cytosquelette d'actine<sup>5,17</sup>.

Les intégrines font partie de la famille des CAMs (Cell Adhesion Molecules) et jouent un rôle important dans les interactions cellule-MEC. Elles intègrent les signaux du microenvironnement via leur domaine extracellulaire N-ter et

**CAM** : protéines membranaires qui initient les interactions adhésives entre les cellules ou entre les cellules et la MEC.

transmettent ces signaux à l'intérieur de la cellule via leur domaine intracellulaire C-ter, régulant ainsi le comportement cellulaire<sup>17</sup>. Parmi les interactions cellule-MEC, on retrouve les hémidesmosomes, assurés par les intégrines  $\alpha_6\beta_4$ , qui font le lien entre les filaments intermédiaires intracellulaires, le collagène de type IV, et les laminines présentes dans la lame basale<sup>17</sup>. Ensuite, on retrouve les adhésions focales (AFs) médiées principalement par les intégrines. Lorsque les intégrines se lient avec les protéines matricielles, elles initient la formation de ces adhésions focales, nécessaires à la

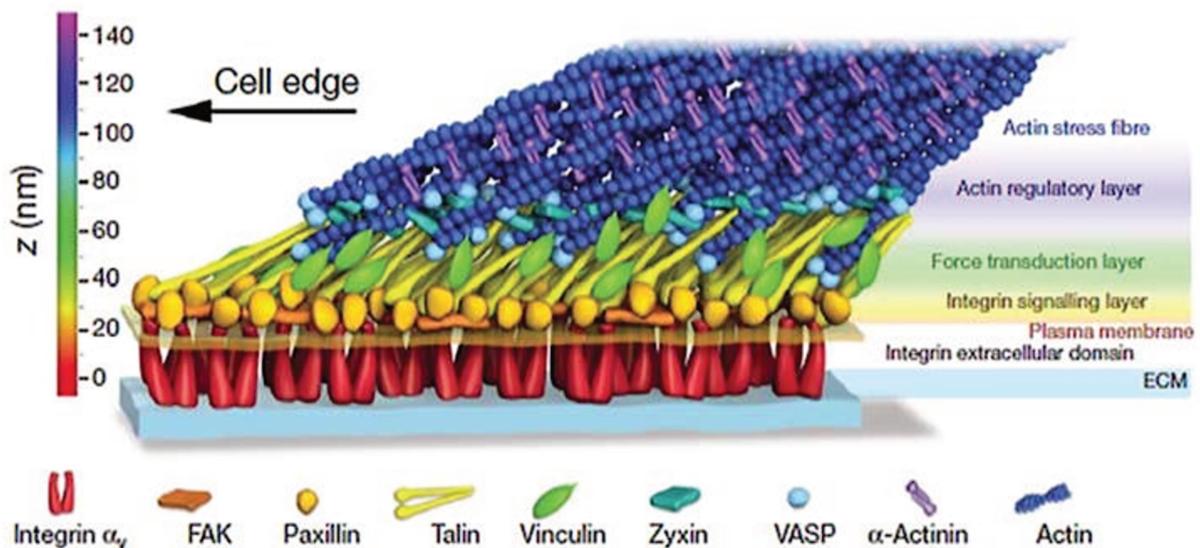
régulation de l'adhérence et de la migration des cellules<sup>5,17</sup>. Les adhésions focales peuvent faire 2 à 10  $\mu\text{m}$  de long et 0,25 à 0,5  $\mu\text{m}$  de large<sup>18</sup>. Ce sont des structures dynamiques qui changent de taille et de composition au cours du processus adhésif et migratoire.

Les intégrines sont également impliquées dans les interactions transitoires (Intracellular Adhesive Molecules, I-CAM) lors de la migration des cellules sanguines (rolling des leucocytes), et lors de la dissémination métastatique<sup>19</sup>.

**I-CAM :** protéines d'adhésion cellulaires appartenant à la superfamille des immunoglobulines, jouant un rôle dans l'inflammation et les réponses immunitaires.

**Extrémités N- et C-ter :** définies les groupes amino (-NH<sub>2</sub>) et carboxyle (-COOH) présents aux extrémités d'une chaîne polypeptidique ou protéique. Ces extrémités sont définies par la séquence d'acides aminés et leur orientation dans l'espace.

**Hémidesmosomes :** complexes multiprotéiques de jonction situés à la face basale des cellules épithéliales. Ils permettent l'ancrage des cellules à la membrane basale.

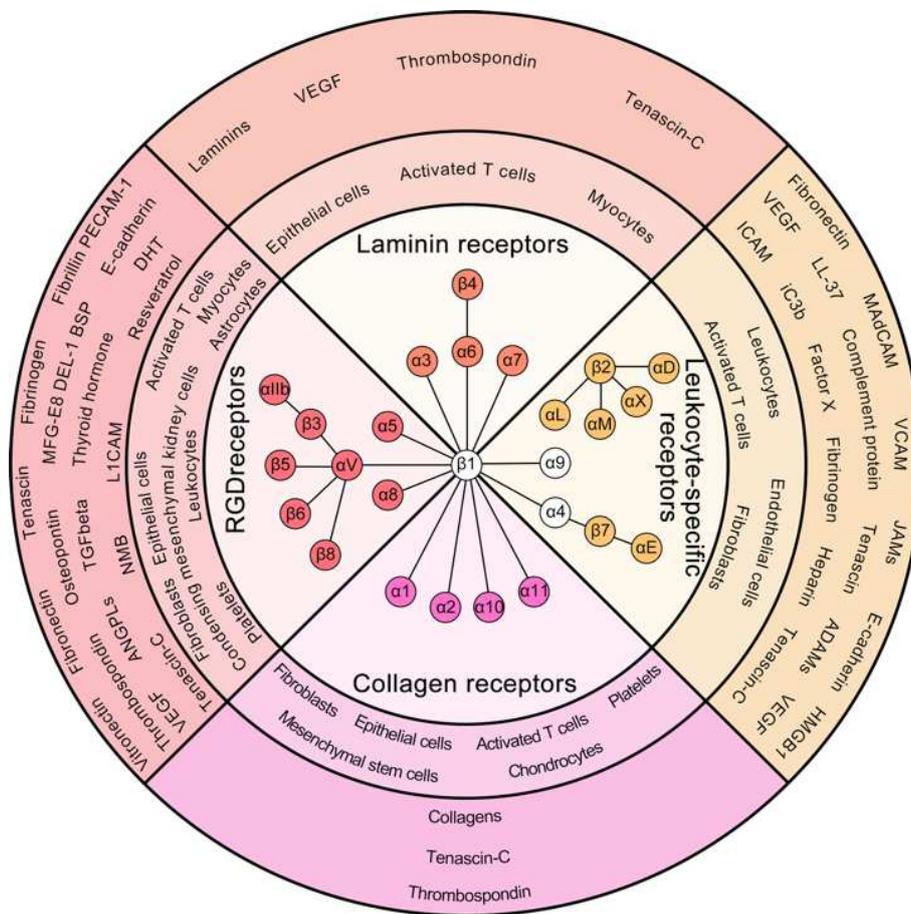


**Figure 6 :** Schéma de l'architecture moléculaire d'une adhésion focale basé sur l'analyse iPALM. Modèle schématique de l'architecture moléculaire d'une adhésion focale et les positions des protéines déterminées expérimentalement. Représentation des complexes de signalisation des intégrines et les interactions moléculaires qui facilitent la transmission de la force et les signaux entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine. (Kanchanawong et al.<sup>18</sup>)

À ce jour, il existe 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  identifiées, et leurs combinaisons donnent 24 types d'intégrines différents (Figure 7)<sup>17</sup>. Les intégrines interagissent avec un ligand spécifique des protéines

**Cluster d'intégrines :** regroupement des intégrines à la surface des cellules suite à leur interaction avec des ligands matriciels.

matricielles, ce qui régule une fonction cellulaire spécifique<sup>24</sup>. La spécificité de leur interaction avec les ligands de la MEC régule leur répartition spatiale sur les membranes cellulaires en clusters<sup>20,21</sup>. Les clusters d'intégrines sont essentiels pour une signalisation efficace et dépend de la densité globale des ligands<sup>22</sup>. Les intégrines reconnaissent divers ligands au niveau des protéines de la MEC, dont les sites RGD (arginine-glycine-acide aspartique) et LDV (leucine-acide aspartique-valine) en fonction de leurs chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ <sup>23</sup>. Les intégrines peuvent aussi s'associer aux protéases (MMPs) et participent ainsi à la protéolyse péricellulaire<sup>17</sup>. Après leur synthèse dans le cytoplasme, elles sont hautement glycosylées dans le réticulum endoplasmique puis dans l'appareil de Golgi, ce qui est nécessaire à leur fonction<sup>17</sup>.



**Figure 7 : Classification des ligands spécifiques aux intégrines.** Au centre du diagramme : les 24 types d'intégrines identifiés et divisés en quatre catégories selon leur ligand d'interaction spécifique. À l'extérieur du diagramme : classification des différentes protéines matricielles interagissant avec les différents types d'intégrines exprimés par les cellules (Pang et al. <sup>24</sup>).

### Formation d'adhésion focale via les intégrines

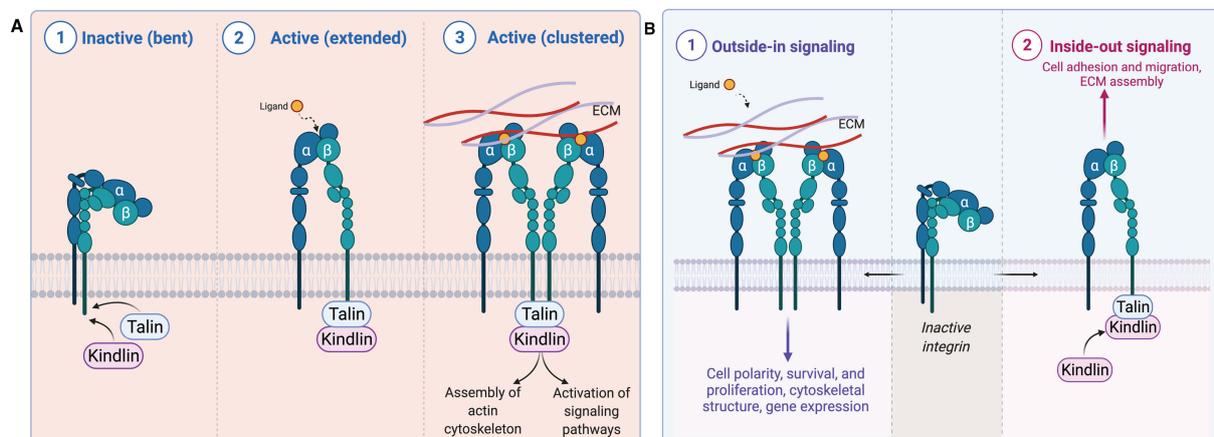
Les intégrines sont impliquées dans la transduction des signaux intégrés de l'espace extracellulaire vers le cytoplasme des cellules (signalisation « outside-in ») et du cytoplasme vers l'espace extracellulaire (signalisation « inside-out ») (**Figure 8**)<sup>25,26</sup>.

La signalisation « inside-out » module l'affinité et l'avidité des intégrines pour leurs ligands matriciels via le recrutement de la taline et de la Kindline à leur extrémité C-ter, induisant un changement conformationnel (**Figure 8**)<sup>26</sup>. Par exemple, lors de la migration cellulaire, les signaux des récepteurs de croissance (ex. EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor) activent les voies de signalisation intracellulaires qui, en recrutant la taline, favorisent l'activation des intégrines et l'adhérence cellulaire à la fibronectine<sup>26</sup>.

La signalisation « outside-in » initiée par la liaison des intégrines aux ligands matriciels active des voies intracellulaires induisant diverses réponses cellulaires, dont la prolifération (**Figure 8**)<sup>26</sup>.

**Affinité** : décrit l'intensité ou la force de l'interaction spécifique entre une molécule et son ligand.

**Avidité** : décrit l'intensité ou la force totale des interactions entre un ligand et une protéine ou un récepteur.



**Figure 8 : Illustration du processus d'activation des intégrines.** (A) activation des intégrines après la liaison aux ligands matriciels, ce qui déclenche le recrutement des protéines cytosoliques et l'activation de voies de signalisation en aval. (B) l'activation des intégrines conduit soit à une signalisation « outside-in » après la liaison aux ligands de la MEC, nécessaire à la prolifération des cellules, soit à une signalisation « inside-out » après fixation des protéines cytosoliques au domaine intracellulaire des intégrines, ce qui régule l'adhérence et la migration cellulaire. (Karamanos et al.<sup>26</sup>)

Lors de la liaison des intégrines aux ligands matriciels, des molécules cytosoliques sont recrutées en aval et activent une signalisation en cascade par phosphorylation des complexes protéiques jusqu'à l'expression de gènes cibles dans le noyau. Parmi ces molécules recrutées, la taline se lie au niveau C-ter des intégrines en faisant le lien avec le cytosquelette, ce qui contribue à renforcer

le clustering des intégrines (adhésions naissantes)<sup>17,25,26</sup>. Ces adhésions vont murir en recrutant des protéines cytosoliques au niveau des contacts focaux (adhésions focales). Parmi celles-ci, la kinase des adhésions focales (FAK) est recrutée au niveau du cluster d'intégrine et se lie à la taline et à la paxilline<sup>17,25,26</sup>. Une fois phosphorylée, elle active le recrutement d'autres substrats par phosphorylation, dont la protéine Src (tyrosine kinase). Un autre facteur recruté en aval des intégrines est la protéine ILK (Integrin-Linked-Kinase) qui sert de plateforme structurale de recrutement des protéines en aval. Celle-ci permet ainsi le recrutement de la paxilline qui assure un lien entre FAK et ILK<sup>17,25,26</sup>. Elle peut être recrutée directement au niveau des intégrines ou via la FAK ou ILK. La vinculine peut être aussi recrutée par la paxilline ou les intégrines. Elle établit un lien avec la MEC en interagissant avec le cytosquelette d'actine. Elle peut lier Arp 2/3 (Actin Related Protein 2/3) qui favorise la polymérisation d'actine au niveau de la plaque focale<sup>17,25,26</sup>. Toutes les protéines cytosoliques citées ci-dessus participent entre autres à la formation et au renforcement des adhésions focales et régulent ainsi le regroupement des intégrines suite à leur liaison aux protéines matricielles.

La formation de ces adhésions focales est indispensable à l'aboutissement et à la régulation de différentes réponses cellulaires, dont la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire<sup>25,26</sup>. La coopération entre les récepteurs intégrines impliqués dans la formation des adhésions focales avec les récepteurs de facteurs de croissance (GFs) est impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires (adhérence, prolifération et différenciation)<sup>27</sup>. Ces fonctions cellulaires seront décrites par la suite.

### 3. Coopération des intégrines et des récepteurs de facteurs de croissance pour diriger le comportement cellulaire

En effet, la plupart des processus cellulaires *in vivo* sont régulés par les interactions cellules – cellules et cellules – MEC. Les signaux provenant du microenvironnement (cellules et MEC) sont intégrés par les récepteurs intégrines et les récepteurs de facteurs de croissance qui coopèrent pour diriger le comportement cellulaire. L'activation de ces deux types de récepteurs implique les mêmes voies de signalisation et mécanismes régulant les processus physiologiques et pathologiques<sup>27,28</sup>. Plusieurs exemples montrent que les signaux synergiques fournis par les récepteurs d'adhésion et les récepteurs de facteur de croissance sont nécessaires pour coordonner les réponses biochimiques et biologiques dans plusieurs types de cellules<sup>27,28</sup>. Les intégrines peuvent s'associer directement aux récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase (RTK), tels que le récepteur de facteur de croissance épidermique (EGFR) pour favoriser leur activation et orchestrer leur endocytose et leur recyclage<sup>29,30</sup>. La coopération entre ces deux types de récepteurs régule la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire *in vivo*.

**La prolifération cellulaire**

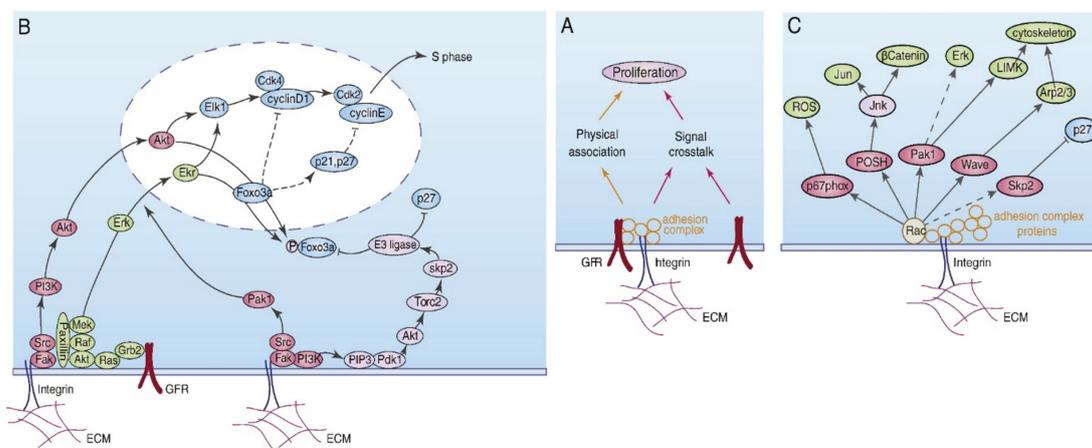
Les signaux d'adhésion provenant du microenvironnement sont nécessaires à la survie des cellules et à leur prolifération<sup>31</sup>. Seules les cellules souches au sein de cellules différenciées, telles que les cellules germinales et les cellules souches de l'épithélium intestinal gardent la capacité d'une prolifération active<sup>31</sup>. L'adhérence des cellules via les intégrines est cruciale dans la progression des phases du cycle cellulaire. La transition de l'état de repos vers la prolifération est également dépendante de stimuli extracellulaires et, plus particulièrement, des facteurs de croissance provenant du microenvironnement (MEC/cellules)<sup>31</sup>. Lors de la prolifération cellulaire, les voies de signalisation intracellulaires majeures régulées par les récepteurs de facteurs de croissance et les intégrines sont les voies PI3K/Akt, Mek/Erk, et les voies impliquant les petites protéines GTPases (Rho and Rac)<sup>27</sup>.

Le cycle cellulaire implique quatre phases : la phase G1 (croissance et préparation de la réplication de l'ADN), la phase S (réplication de l'ADN), la phase G2 (croissance et préparation de la mitose), et enfin la phase M (division cellulaire)<sup>31</sup>. Toutes ces phases sont étroitement régulées par plusieurs protéines, nommées cyclines et kinases dépendantes des cyclines (CDKs), qui forment un complexe protéique pour coordonner la progression de chaque étape du cycle

**Cycline-CDKs** : complexes protéiques essentiels au contrôle du cycle cellulaire.

**Checkpoint** : point de contrôle qui régule la progression du cycle cellulaire via les complexes cycline-CDK.

(checkpoint) (**Figure 9**)<sup>31,33</sup>. Lors de l'interaction des cellules avec la MEC, les intégrines recrutent indirectement des protéines adaptatrices du cytosol, telles que la taline et la paxilline ainsi que des enzymes telles que FAK et les petites protéines GTPases<sup>33</sup>. Ces effecteurs régulent le recrutement des complexes cycline – CDKs en aval, qui activent ensuite la transcription des gènes nécessaires à la prolifération, tels que c-Jun et E2F<sup>33</sup>.



**Figure 9 : Les Voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la régulation du cytosquelette via les intégrines et les récepteurs de facteurs de croissance (GFR). (A) les intégrines et les GFR**

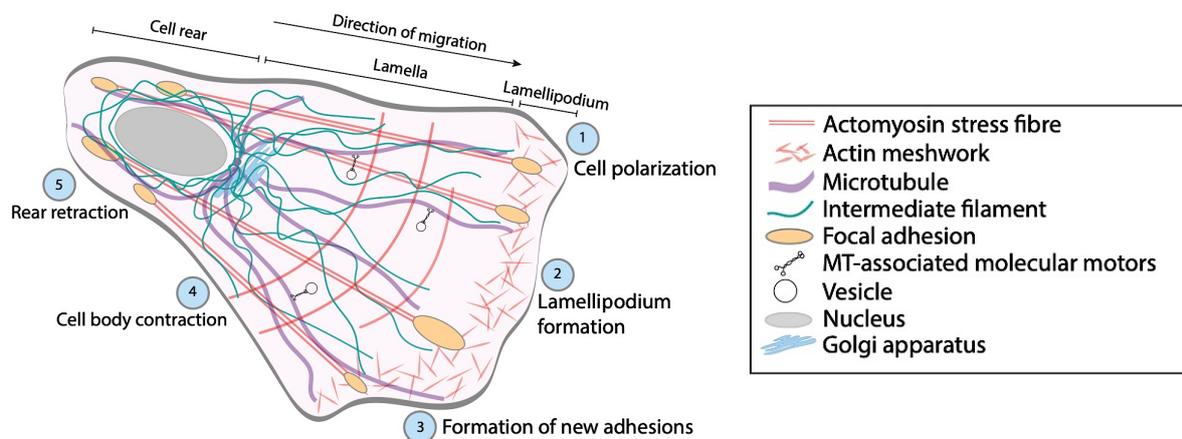
interagissent par des associations physiques et des interconnexions de signalisation (signal crosstalk), ce qui contribue à la régulation de la prolifération cellulaire. (B) la liaison des intégrines et des GFR aux ligands matriciels déclenche une cascade de signalisation impliquant des molécules cytosoliques comme PI3K, Akt, et FAK. (C) l'activation des intégrines entraîne également des signaux qui affectent le cytosquelette, en passant par Rac, Pak1 et Ink. (Moreno-Layseca et Streuili<sup>33</sup>)

### La migration cellulaire

Les ligands matriciels des intégrines jouent également un rôle important lors de la migration cellulaire<sup>34</sup>. Les cellules sont capables de se diriger en fonction de gradients de ligands matriciels (haptotaxie) qui vont réguler la migration des cellules<sup>35</sup>.

En réponse aux signaux migratoires, les cellules, telles que les fibroblastes et les myoblastes, acquièrent un phénotype mésenchymateux<sup>34</sup>. La morphologie polarisée que les cellules vont adopter va dépendre de la nature du signal biochimique et biophysique et de la matrice sous-jacente<sup>34</sup>. Dans le cas de la migration mésenchymateuse, celle-ci implique un certain nombre d'événements coordonnés : la formation de protrusions membranaires et de zones d'adhérence dynamiques, accompagnée de la réorganisation du cytosquelette puis de la translocation du corps cellulaire. En migrant, les cellules forment en leur front des lamellipodes composés de filaments d'actine branchés, ainsi que des filopodes composés de faisceaux d'actine parallèles les uns aux autres (**Figure 10**)<sup>34</sup>. Les lamellipodes se forment grâce à la polymérisation d'actine et orientent la direction de migration. En revanche, au niveau du front arrière, les cellules forment une seule queue de rétraction avec des fibres de tension d'actine qui jouent un rôle contractile (**Figure 10**)<sup>34</sup>.

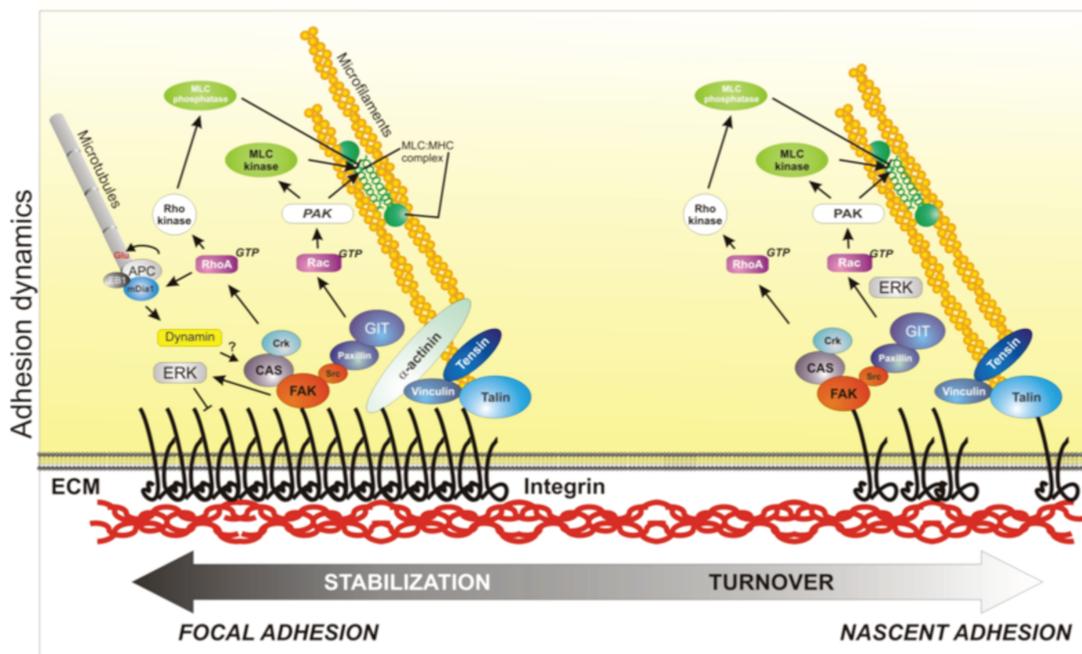
Il existe également d'autres types de migration, comme la migration amiboïde adoptée par exemple par les cellules immunitaires, qui ne seront pas détaillés ici<sup>36</sup>.



**Figure 10 : Polarisation et distribution du cytosquelette lors de la migration des fibroblastes. (Les étapes de la migration mésenchymateuse, Seetharaman and Etienne-Manneville<sup>34</sup>).**

Lors de la migration, les cellules forment des adhésions focales très actives et dynamiques médiées par les intégrines engagées dans la liaison avec la matrice (**Figure 11**)<sup>37,38</sup>. Les adhésions focales sont stabilisées par la fixation de protéines intracellulaires, telles que la taline, la vinculine et la paxilline en aval des intégrines. Au niveau de ces zones d'adhérence, le recrutement de FAK en aval des intégrines favorise la polymérisation d'actine et l'organisation des lamellipodes par Arp2/3 via l'activation de Rac (**Figure 11**). Tandis qu'au niveau du front arrière, le recrutement de la myosine II par l'activation de Rho A permet la contraction d'actine puis la propulsion du corps cellulaire suite au désassemblage des adhésions focales par clivage protéolytique<sup>38,39</sup>. L'organisation des filaments d'actine joue un rôle essentiel dans la migration cellulaire en adaptant la forme des cellules à la matrice sous-jacente, notamment grâce à l'activité de petites protéines G appartenant à la famille Rho<sup>38,39</sup>. La formation d'un gradient de protéines G cytosoliques (GTPases) entre le front de migration et le front arrière de la cellule permet de coupler la dynamique des adhésions focales avec l'organisation des filaments d'actine<sup>38,39</sup>. Lors de la migration, on observe une position centrale voire postérieure du noyau avec une réorganisation des microtubules<sup>38,39</sup>.

**Lamellipodes :** projections cytoplasmiques formées par la polymérisation d'actine et composés de filaments d'actine branchés.



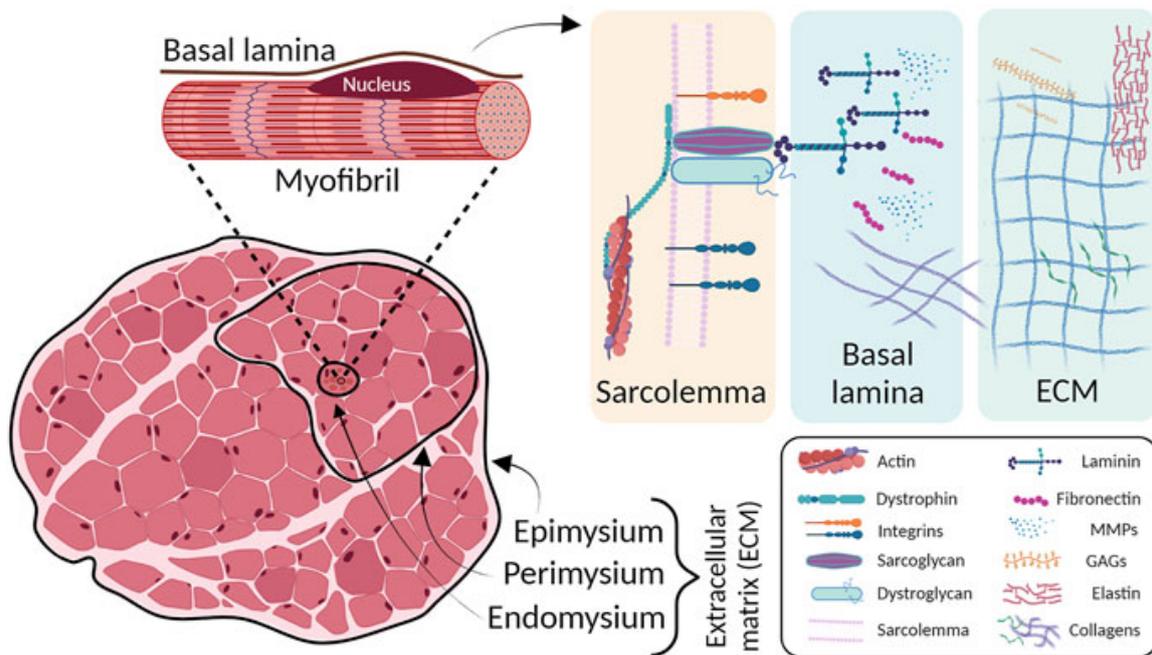
**Figure 11 : Voies de signalisation régulant la migration cellulaire via les interactions des intégrines à la MEC. Processus de formation et de maturation des adhésions focales. Les adhésions focales se forment à partir de sites d'adhésions naissantes via les intégrines, initiant le recrutement de protéines cytosoliques, comme la taline et la vinculine qui interagissent avec l'actine. Des protéines de**

*signalisation, telles que RhoA et Rac (via des GTPases), activent des voies de signalisation spécifiques conduisant à la polymérisation de l'actine. Les adhésions naissantes évoluent vers une adhésion focale mature via le recrutement de FAK et CAS, et des protéines de signalisation intracellulaire ERK et PAK, contribuant à la stabilité de l'adhésion. (Vicente-Manzanares et al.<sup>38</sup>)*

### ***Différenciation myogénique***

L'interaction des intégrines avec les composants de la MEC intervient également dans la régulation de l'homéostasie et le développement du muscle squelettique du stade embryonnaire jusqu'à la sénescence<sup>40</sup>. Le muscle squelettique est le tissu le plus abondant du corps humain (environ 40% du poids total du corps)<sup>40</sup>. La myogenèse est le processus biologique qui aboutit à la constitution de tissus musculaires à partir de cellules souches. Durant la différenciation et la maturation des myoblastes, l'interaction cellule - MEC entre la lame basale et l'endomysium joue un rôle important dans la régénération du muscle squelettique (**Figure 12**)<sup>41</sup>. De ce fait, la composition de la MEC affecte les propriétés physiologiques des cellules myogéniques. Un certain nombre d'intégrines, telles que les intégrines  $\alpha_7\beta_1$  sont exprimées par les myoblastes. Au niveau des fibres musculaires, l'intégrine  $\alpha_7\beta_1$  est distribué le long du sarcolemme (membrane des fibres musculaires) au niveau des costamères, points d'ancrage des myofibrilles au sarcolemme<sup>41</sup>. Ces récepteurs jouent un rôle central dans la physiologie et le développement musculaire. Une sous-expression de ces intégrines, est responsable de pathologies liées au muscle, telles que les dystrophies musculaires impliquant également les laminines<sup>42</sup>. En revanche, une surexpression des intégrines  $\alpha_7\beta_1$  entraîne une augmentation du recrutement des protéines cytosoliques impliquées dans la formation des adhésions focales<sup>43</sup>. Ceci montre l'importance de l'expression de ce type d'intégrine dans le maintien de l'intégrité du muscle squelettique.

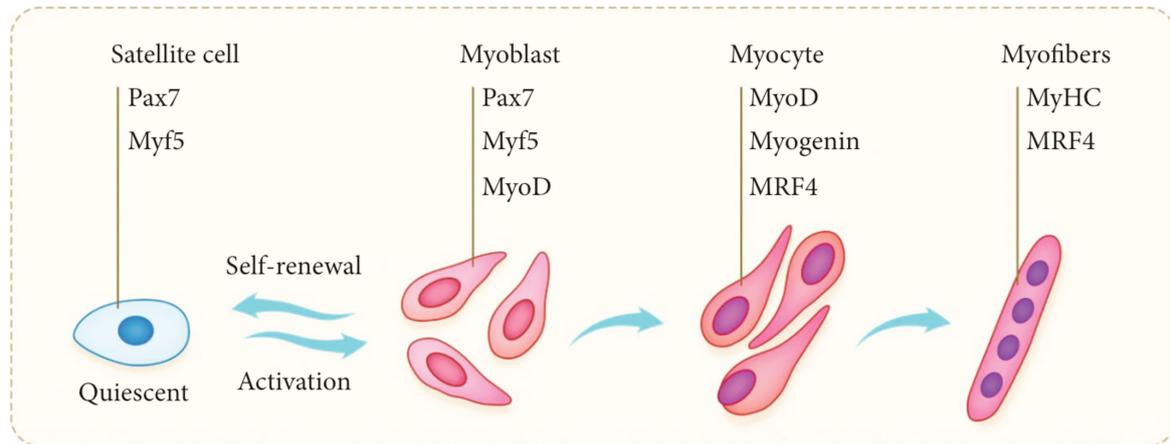
Les cellules musculaires progénitrices (cellules satellites) présentes au niveau de la lame basale, jouent un rôle important dans la régénération du muscle squelettique<sup>44</sup>. La sécrétion des facteurs de croissance, tels que FGF-2 (facteur de croissance des fibroblastes), HGF (facteur de croissance des hépatocytes) et SDF-1 (facteur dérivé des cellules stromales), induit la prolifération des cellules satellites<sup>44</sup>. Le collagène IV présent dans la lame basale et sécrété par les fibroblastes, stimule la différenciation et la fusion des myoblastes via l'activation du facteur IGF-1 (insulin-like growth factor-1)<sup>44</sup>. L'expression et le dépôt de la laminine-1 par les cellules satellites, maintient l'adhérence des fibres musculaires à la lame basale<sup>41</sup>. De plus, la fibronectine favorise l'adhérence et facilite la fusion et l'alignement des myoblastes durant leur différenciation<sup>41</sup>.



**Figure 12:** Schéma des différentes couches composant le muscle squelettique (gauche) et représentation des principaux composants de la MEC entourant les myofibrilles (droite). La myofibrille, composante contractile de la fibre musculaire, est entourée par la membrane cellulaire (sarcolemme). La lame basale sert de couche intermédiaire reliant la fibre musculaire à la MEC, composée de protéines matricielles comme la laminine et des complexes de dystroglycane, pour ancrer la fibre musculaire à la MEC. Les couches d'épimysium, de périmysium et d'endomysium enveloppent les fibres musculaires, fournissant protection, soutien et transmission des forces lors de la contraction. (Carraro et al.<sup>41</sup>)

Lorsque les cellules satellites quittent la phase de quiescence, elles se différencient, ceci aboutit à l'activation des facteurs de transcription, tels que Pax 3 et 7 (**Figure 13**)<sup>45</sup>. Pax 3 est le premier facteur myogénique exprimé par les cellules satellites<sup>45</sup>. Il régule l'expression d'autres facteurs de transcription, tels que Pax7 ou des facteurs de régulation myogénique (MRF) comme le facteur myogénique 5 (Myf5) ou encore le facteur de différenciation myogénique (MyoD, appelé également Myf3)<sup>45</sup>. L'ensemble de ces facteurs détermine l'entrée des cellules souches vers la voie myogénique. Myf5 et MyoD sont impliqués dans la prolifération des cellules satellites et ensuite à l'activation des facteurs de transcription Mef2, MyoG (myogénine) et MyH (Myosin heavy chains) impliqués dans la différenciation des cellules satellites en myofibrilles (**Figure 13**)<sup>45</sup>. MyoG contrôle la différenciation finale en engendrant la fusion des myoblastes mononucléés en myotubes multinucléés<sup>46</sup>. Pour fusionner, les cellules réarrangent leur membrane et réorganisent leur cytosquelette d'actine. Les noyaux migrent et s'accumulent au centre du myotube<sup>45</sup>. Ensuite, les myotubes entrent dans l'étape de maturation où elles expriment notamment des protéines ostéoblastiques caractéristiques, telles que l'ostéocalcine et le collagène-1<sup>45</sup>. Les noyaux migrent à la périphérie du myotube, aboutissant à la formation d'une

myofibrille<sup>45</sup>. De plus, au cours de la maturation, l'expression des gènes caractéristiques continue. En effet, l'expression de Mrf4 et MyH est augmentée tout au long de la différenciation, car il s'agit des protéines indispensables pour la différenciation et au fonctionnement des cellules musculaires<sup>47,48</sup>. A l'inverse, d'autres protéines comme la MyoG voient leur expression diminuer au cours de la différenciation. A la fin de la maturation, les cellules sont différenciées en myotubes, et vont pouvoir se regrouper et s'aligner pour former les fibres musculaires<sup>47</sup>.



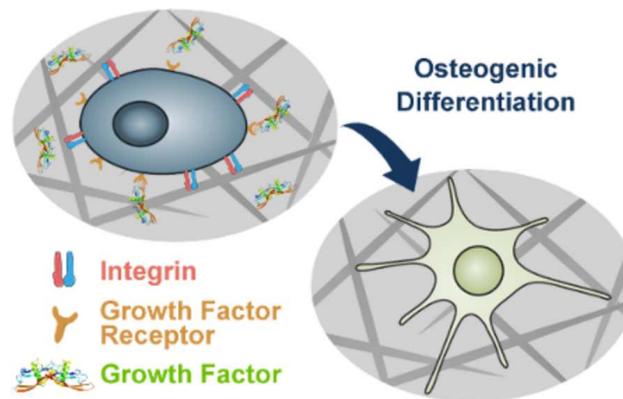
**Figure 13 : Schéma représentant les facteurs de transcription exprimés au cours des étapes de la différenciation des cellules musculaires squelettiques.** En état de repos, les cellules satellites expriment des marqueurs, tels que Pax7 et Myf5. Suite à l'activation, les cellules satellites deviennent des myoblastes, exprimant Pax7, Myf5 et MyoD. Les myoblastes se différencient ensuite en myocytes, exprimant MyoD, myogénine, et MRF4. Les myocytes fusionnés forment des myofibrilles matures, caractérisées par l'expression de MyHC et MRF4. (Yu et al.<sup>47</sup>)

### Différenciation ostéogénique

Outre la coopération entre les récepteurs de facteurs de croissance et les intégrines, les protéines matricielles assurent également la protection et la libération de divers facteurs de croissance séquestrés dans la MEC<sup>7</sup>. C'est le cas notamment des protéines osseuses morphogénétiques (BMPs), appartenant à la famille des facteurs de croissance TGF- $\beta$ <sup>49</sup>. En se liant aux facteurs de croissance, les protéines de la MEC régulent leur accessibilité et leur activité jusqu'à leur libération par les MMPs extracellulaires<sup>50</sup>.

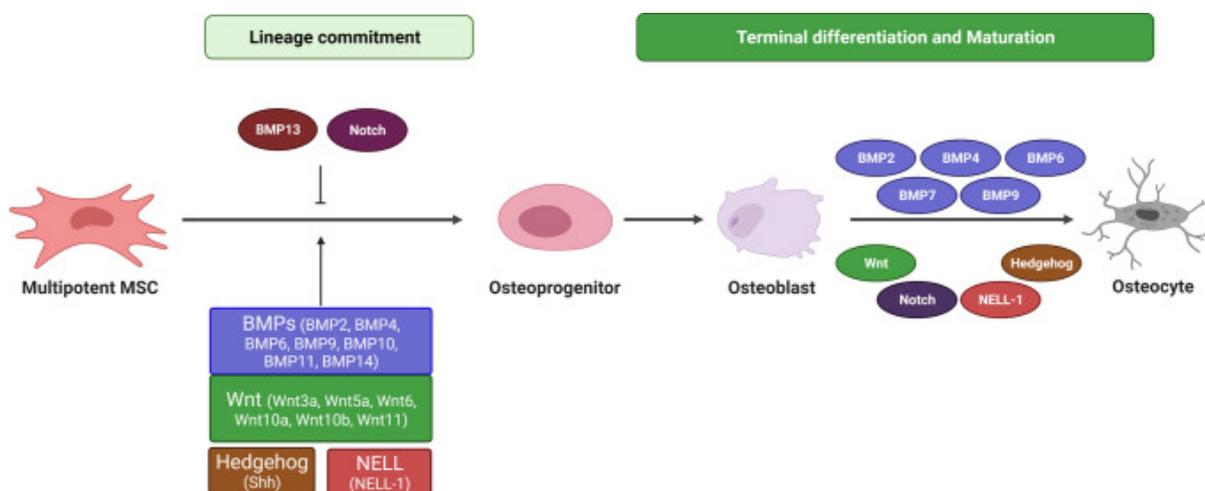
**MMPs :** famille d'enzymes protéolytiques spécialisées dans la dégradation des composants de la MEC.

Dans le processus de différenciation ostéogénique, la coopération entre les ligands matriciels des intégrines et les facteurs de croissance module la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) en ostéoblastes au sein du microenvironnement osseux (**Figure 14**)<sup>51,52</sup>.



**Figure 14: Coopération des récepteurs d'intégrines et de facteurs de croissance dans la régulation de la différenciation ostéogénique.** (Wei et al.<sup>51</sup>)

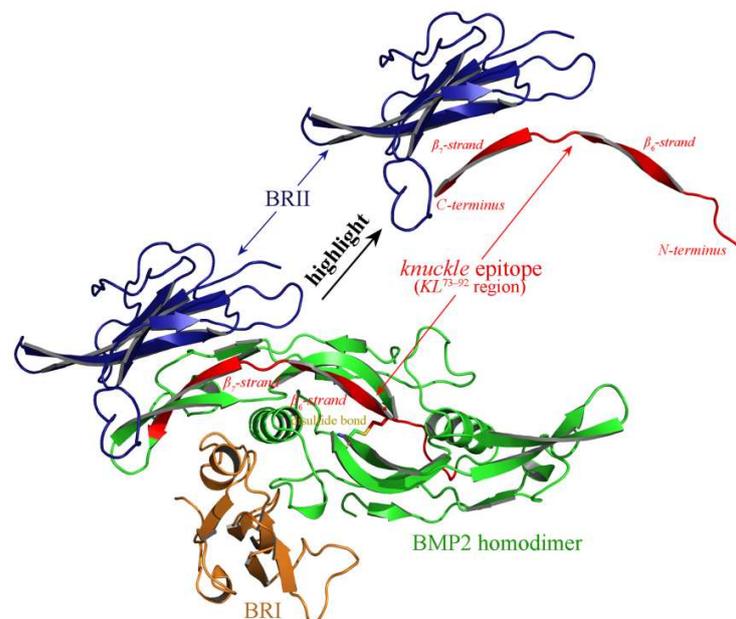
Plusieurs étapes de différenciation sont nécessaires à l'obtention d'ostéoblastes matures. Elles font opérer différents facteurs caractéristiques à différents niveaux d'expression (**Figure 15**). Le premier type cellulaire qui émerge suite à une induction des CSMs sont les progéniteurs des ostéoblastes qui surexpriment des facteurs de transcription, tels que Runx2 et Osterix (osx), par rapport aux CSMs<sup>53</sup>.



**Figure 15 : Étapes de différenciation de l'engagement des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) vers la lignée ostéoblastique.** Lors de l'engagement, les CSMs se différencient en ostéoprogéniteurs sous l'influence de plusieurs facteurs, les familles de protéines BMPs, Wnt, ainsi que Hedgehog (Shh) et NELL-1. Les ostéoprogéniteurs deviennent ensuite des ostéoblastes, qui se maturent en ostéocytes, sous l'action des BMPs (ex. BMP2 et BMP4), ainsi que des voies Wnt, Notch, Hedgehog et NELL-1. (Thomas et Jaganathan<sup>52</sup>).

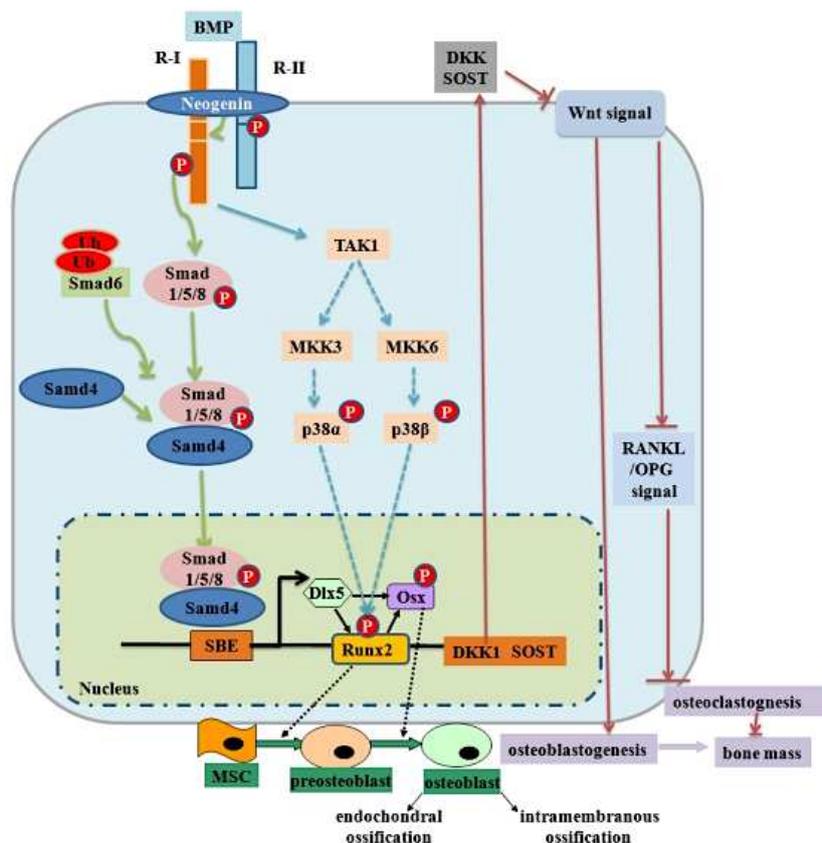
Au sein du microenvironnement osseux, les BMPs favorisent la formation osseuse<sup>49</sup>. Les BMPs peuvent être classées en sous-famille selon leur fonction, le récepteur sur lequel elles agissent et les voies de signalisation activées en aval des récepteurs. Les sous-familles BMP-2/4, OP-1 (Osteogenic protein-1) et BMP-9/10 participent à la formation de tissus osseux et cartilagineux *in vivo*<sup>49,54</sup>.

Les BMPs sont intrinsèquement instables *in vivo* et leur transport et diffusion au sein de la MEC doit être régulé par les MMPs extracellulaires pour une libération contrôlée<sup>49</sup>. Par exemple, le clivage de la protéine morphogénétique osseuse-2 (BMP2) par les MMPs extracellulaires assure son activité sur les récepteurs cellulaires pour réguler la régénération osseuse et les défauts osseux<sup>49</sup>. Les BMP2 agissent sur des récepteurs transmembranaires (homodimères) à activité sérine/thréonine kinase (BMPRs). Ces récepteurs possèdent un domaine extracellulaire de liaison au ligand, un domaine transmembranaire et un domaine catalytique cytosolique à activité enzymatique<sup>57</sup>. Les BMP2 sont des homodimères qui possèdent deux motifs de liaison à ces récepteurs (**Figure 16**)<sup>57,58</sup>. Un site de liaison à haute affinité (épitope « wrist », résidus 84 à 102) pour le récepteur de type I, BMPR-1A, et un site de liaison à faible affinité (épitope « knuckle », résidus 68 à 92) pour le récepteur de type II, BMPR-II (**Figure 16**)<sup>57,61</sup>. Les BMPs peuvent se lier aux récepteurs de type I en l'absence de récepteurs de type II, mais les deux sont nécessaires à la transduction du signal<sup>59,60</sup>. Les spécificités de liaison des BMPs aux récepteurs de type I sont influencées par les récepteurs de type II présents à la membrane des cellules<sup>61</sup>. Ces deux types de récepteurs sont nécessaires à la transduction du signal.



**Figure 16 : Structure de la BMP2 (vert) avec les épitopes ("wrist" et "knuckle") interagissant avec les récepteurs BMPR-IA (marron) et BMPR-II (bleu). (Zhao et al.<sup>61</sup>)**

L'interaction de la BMP2 aux récepteurs BMPR-IA et BMPR-II, entraîne leur activation par phosphorylation croisée après dimérisation du récepteur<sup>57,62</sup>. BMPR-II phosphoryle BMPR-IA sur les résidus sérine/thréonine<sup>62</sup>. L'activation de ces récepteurs entraîne le recrutement des protéines de la famille smad (smads 1/5/8) qui interagissent avec les résidus phosphorylés (**Figure 17**). Une fois activé, le complexe smads 1/5/8 interagit avec smad 4, ce qui entraîne la translocation du complexe dans le noyau pour activer l'expression de gènes cibles, tels que Runx2 et osterix (osx) (**Figure 17**)<sup>57,62</sup>. Ces deux facteurs régulent l'expression de protéines de maturation des ostéoblastes, telles que la phosphatase alcaline (Alkaline Phosphatase, ALP)<sup>57,62</sup>. À ce moment, on désigne ces cellules comme des préostéoblastes. Les BMPs peuvent également induire un signal SMAD-indépendant via les « mitogen activated kinases » (MAPK) : Erk (extracellular signal regulated kinase), JNK (Jun N-terminal kinase) ou p38 (p38 MAPK), qui interviennent dans l'expression de gènes ostéogéniques<sup>63</sup>. Ces différentes voies de signalisation sont impliquées dans la prolifération et la différenciation des CSMs en os ou en cartilage<sup>64</sup>.



**Figure 17 : Voies de signalisation activées en aval du récepteur BMPR en réponse à la BMP2 dans la régulation de la différenciation des CSMs en ostéoblastes.** La liaison des BMPs à ses récepteurs (-I et -II) active la phosphorylation des protéines Smad 1/5/8, qui se lie ensuite à Smad4 et se déplacent

*dans le noyau. Le complexe initie l'expression des gènes Dlx5 et Osx, activant Runx2, un facteur clé dans l'engagement des CSMs vers la lignée ostéoblastique. En parallèle, la voie de signalisation TAK1 active les voies p38, contribuant également à l'ostéogénèse. Les signaux Wnt, inhibés par DKK1 et SOST, régulent l'activation/inhibition de RANKL/OPG, modulant l'ostéoclastogénèse. (Chen et al.<sup>62</sup>)*

## B. Fonctionnalisation de biomatériaux avec des protéines de la MEC pour diriger le comportement cellulaire

Les connaissances sur le rôle des protéines au sein de la MEC, ont grandement contribué au développement de biomatériaux ou de matrices qui miment l'environnement cellulaire *in vivo* pour l'ingénierie tissulaire. En effet, la plupart des matériaux utilisés (ex. polymères, composites, silicones) ne permettent pas l'adhérence, la prolifération et la différenciation des cellules, et nécessitent donc d'être modifiés pour augmenter leur biocompatibilité<sup>65</sup>. Dans certains cas, les matériaux ne présentent pas d'effet toxique, mais les propriétés physico-chimiques de leur surface (ex. charge, mouillabilité, topographie) ne favorisent pas la croissance cellulaire<sup>65</sup>. C'est le cas du polydiméthylsiloxane (PDMS) par exemple, qui est souvent utilisé grâce à sa facilité de fabrication, sa flexibilité, sa biocompatibilité et ses propriétés mécaniques intéressantes pour les applications biomédicales et pour les tests *in vitro* en recherche fondamentale<sup>101</sup>.

La surface des matériaux peut être traitée pour augmenter leur affinité pour les protéines, avec par exemple le traitement plasma pour rendre la surface hydrophile, mais cette technique peut modifier les propriétés mécaniques du matériau<sup>66</sup>.

Dans ce but, l'utilisation de protéines bioactives et/ou de facteurs de croissance de la MEC ont montré leur efficacité pour augmenter la biocompatibilité des biomatériaux et améliorer leurs propriétés biologiques. Le collagène, la fibronectine ou la laminine sont parmi les protéines les plus utilisées pour mimer l'environnement cellulaire *in vivo* et pour développer des substrats pour la croissance cellulaire<sup>66</sup>.

La fonctionnalisation de surface des matériaux par les protéines bioactives est nécessaire à l'ancrage des cellules et donc à leur survie. Les protéines ont tendance à s'adsorber naturellement sur les matériaux<sup>67</sup>. Elles peuvent provenir des milieux de cultures ou des fluides biologiques, tels que le sang<sup>66</sup>. La cinétique d'adsorption d'une protéine est principalement dépendante de son affinité à la surface et de sa concentration, mais aussi de la compétition avec les autres protéines (effet Vroman)<sup>67,68</sup>. Par conséquent, pour éviter un échange compétitif entre protéines non désirées, il est intéressant d'immobiliser une protéine d'intérêt avant tout autre contact afin d'obtenir une réponse cellulaire spécifique. Les groupes fonctionnels des protéines de la MEC

**Effet Vroman :** phénomène selon lequel les protéines initialement adsorbées sur une surface sont progressivement remplacées par des protéines ayant une plus grande affinité pour cette surface.

peuvent être soit greffés chimiquement de façon covalente, ou soit adsorbés physiquement à la surface du matériau.

Les protéines de la MEC peuvent également être incorporées à l'intérieur de la matrice du biomatériau pour améliorer ses propriétés biologique et mécanique, telles que les hydrogels à partir de polymères naturels (ex. alginate, chitosane) ou synthétiques<sup>66,69</sup>. Les hydrogels sont généralement utilisés pour contrôler la libération de biomolécules et de drogues thérapeutiques pour des applications en ingénierie tissulaire et pour étudier, par exemple, le processus de morphogénèse<sup>69</sup>. En revanche, leur utilisation est limitée par leurs faibles propriétés mécaniques. Des hydrogels protéiques sont généralement obtenus à partir de protéines de la MEC purifiées par décellularisation de tissus à l'aide de détergents comme le SDS (dodécyl sulfate de sodium)<sup>69</sup>. Cette technique consiste à éliminer les cellules des tissus tout en préservant la structure et la composition des protéines de la MEC. Certains de ces hydrogels sont commercialisés pour des applications biomédicales (ex. Biotène®, par GlaxoSmithKline)<sup>70</sup> et pour des études fondamentales, tels que la croissance cellulaire (ex. Matrigel™)<sup>71</sup>.

### *Collagène*

Le collagène est utilisé pour diverses applications en ingénierie tissulaire et est le plus souvent isolé à partir de l'os, de la peau et des tendons, en général obtenu depuis le bœuf ou le porc<sup>72</sup>. Le collagène de type I est généralement utilisé dans le développement de biomatériaux à base de collagène<sup>72</sup>. Le collagène est biocompatible et présente une faible réaction inflammatoire de l'hôte. En revanche, son extraction et sa purification sous forme pure, nécessitent des coûts très élevés<sup>66,72</sup>. De plus, il a une tendance à se dégrader rapidement et son utilisation reste limitée en raison de ses propriétés mécaniques. Pour ces raisons, il est souvent utilisé pour mettre au point des polymères naturels ou synthétiques biodégradables<sup>72</sup>. Il est également combiné à d'autres polymères pour obtenir des biomatériaux biocompatibles et mécaniquement stables pour des applications en ingénierie tissulaire. Par exemple, les collagènes de types I et IV ont été utilisés sur des substrats à base de gel en polyacrylamide présentant différentes rigidités pour diriger la différenciation des CSMs en myoblastes ou en ostéoblastes<sup>73</sup>.

Le collagène de type I est également utilisé dans la conception d'hydrogels et dans le traitement des plaies cutanées, par exemple<sup>74</sup>. Les fibrilles de collagène peuvent s'auto-assembler à pH neutre en fibres (12 à 120 µm de diamètre) et former un hydrogel par réticulation en milieu aqueux<sup>75,76</sup>.

### ***Fibronectine***

La fonctionnalisation de surface par la fibronectine permet d'améliorer l'adhérence, la migration et la prolifération des cellules<sup>77</sup>. Celle-ci est généralement isolée et purifiée à partir de sérums d'animaux<sup>77</sup>. Elle est présente dans les milieux de culture supplémentés aux sérums pour permettre l'adhérence et la croissance des cellules en culture *in vitro*<sup>77</sup>. La fibronectine peut être adsorbée physiquement ou immobilisée à la surface du matériau pour augmenter l'interaction des cellules à la surface. L'homogénéité de la fibronectine à la surface du matériau peut être affectée en présence de fibronectine plasmatique présente dans le milieu de culture, du fait de l'effet Vroman<sup>67,77</sup>. De plus, l'interaction des cellules avec la fibronectine est limitée par l'accessibilité de ses sites d'interaction aux intégrines et par sa stabilité à la surface du matériau<sup>77,78</sup>. Il a été montré par exemple, que le flux de liquide physiologique peut altérer l'homogénéité d'une couche de fibronectine adsorbée ou greffée<sup>78</sup>. La technique de fonctionnalisation doit donc être choisie selon l'application souhaitée et le type de matériau utilisé. La fibronectine est aussi utilisée en tant que substrat de culture pour étudier la migration des cellules cancéreuses en recherche fondamentale, dans le contexte de la dissémination métastatique<sup>79</sup>.

La fibronectine est également utilisée dans la fonctionnalisation d'hydrogel. Le plus souvent, la fibronectine est couplée à d'autres protéines bioactives et à des facteurs de croissance pour réguler un processus cellulaire spécifique. Elle a été utilisée par exemple dans des hydrogels avec de la fibrine, du fibrinogène, de l'héparine et avec la BMP-2 pour stimuler la différenciation des cellules précurseurs d'ostéoblastes (MC3T3-E1) en ostéoblastes<sup>80</sup>. Ce système d'hydrogel favorise la libération de la BMP-2 pour la régénération osseuse grâce à la lyse de la fibrine par la plasmine (peptidase).

### ***Laminines***

Dans les tests *in vitro*, les laminines sont utilisées pour fonctionnaliser les surfaces de culture et pour favoriser la prolifération et la différenciation des cellules<sup>66,73</sup>. La combinaison avec d'autres protéines bioactives permet de stimuler des fonctions cellulaires de façon synergique. Par exemple, la co-immobilisation de la laminine et de la fibronectine sur des substrats en acrylate de polyuréthane, stimule de manière synergique la différenciation myogénique des cellules de myoblastes (C2C12), par rapport à l'immobilisation d'une seule de ces protéines<sup>81</sup>.

Les laminines sont également utilisées dans la fonctionnalisation d'hydrogels pour diriger le comportement cellulaire. Par exemple, les laminines ont été greffées sur des hydrogels à base de polyacrylamide avec différentes rigidités pour mimer la différenciation des cellules du muscle<sup>73</sup>.

### *Protéines osseuses morphogénétiques (BMPs)*

Les BMPs sont utilisées dans des applications, telles que l'ingénierie tissulaire, pour la régénération de l'os et la réparation des défauts osseux à l'aide de biomatériaux dans le traitement des maladies touchant l'os<sup>55</sup>. La BMP-2 et la BMP-7 ont été les deux BMPs autorisées par la FDA (Food and Drug Administration) pour des utilisations cliniques de régénération osseuse<sup>82-84</sup>.

La BMP-2 humaine recombinante (rhBMP-2) associée au collagène, est utilisée pour traiter les fractures tibiales et stimuler la fusion vertébrale<sup>82-84</sup>. Tandis que la BMP-7 humaine recombinante (rhBMP-7), commercialisée sous le nom de OP-1 Putty, est utilisée pour la fusion de la colonne lombaire et le traitement des fractures osseuses<sup>82-84</sup>. La BMP-2 a également été utilisée pour fonctionnaliser la surface de microsphères à base de silicium par immobilisation chimique et covalente, pour des applications de reconstruction osseuse<sup>85</sup>.

### C. Limites des biomatériaux à base de protéines de la MEC

Cependant, le développement de biomatériaux basés sur des protéines entières de la MEC peut entraîner certaines complications. Tout d'abord, ces protéines sont difficiles à obtenir (éthique, méthodes de purification complexes, coût élevé)<sup>86,87</sup>. Leur origine est, la plupart du temps, exogène, ce qui peut avoir des conséquences sur la réponse immunitaire si un matériau est destiné à être implanté, ce qui nécessite en plus une administration en antibiotique chez des patients<sup>86,87</sup>. De plus, les protéines sont sensibles à la dégradation protéolytique, ce qui est susceptible d'étendre la réponse immunitaire et de diminuer les interactions avec les cellules<sup>86,87</sup>. Enfin, l'accessibilité des sites de liaison aux récepteurs cellulaires des protéines dépend de leur orientation, que ce soit par adsorption physique ou par immobilisation covalente. L'autre alternative est la fonctionnalisation de surface par des peptides bioactifs dérivés de protéines de la MEC (fibronectine, laminine, etc.)<sup>66</sup>.

## II. Peptides bioactifs dérivés de protéines de la MEC pour diriger le comportement cellulaire

La caractérisation des domaines d'interaction des protéines de la MEC a permis le développement de peptides dérivés de celles-ci pour diriger le comportement cellulaire<sup>88</sup>. En effet, au sein des tissus, les cellules interagissent avec des ligands peptidiques au niveau des protéines matricielles via leurs récepteurs cellulaires à l'échelle nanométrique. Les protéines matricielles présentent des domaines de liaisons cellulaires spécifiques composés généralement de moins de 50 acides aminés<sup>92</sup>. Une séquence composée d'au moins deux acides aminés est considérée comme un

peptide<sup>92</sup>. L'interaction des cellules avec ces séquences peptidiques est médiée principalement par les intégrines qui participent à la régulation de la plupart des fonctions cellulaires.

Dans cette partie, nous discuterons des divers peptides exploités dans les biomatériaux (fonctionnalisation de surfaces et hydrogels), en tant que systèmes pour améliorer le ciblage de récepteurs cellulaires et pour mimer les interactions cellule – MEC à l'échelle nanométrique.

## A. Fonctionnalisation de biomatériaux avec des peptides bioactifs reconnus par les intégrines

Ces dernières années, les motifs d'adhésions aux intégrines du collagène, de la fibronectine et de la laminine ont été identifiés pour développer des peptides bioactifs destinés à diverses applications, telles que la biothérapie pour cibler des cellules<sup>88</sup>. Ils permettent de stimuler des fonctions cellulaires en ciblant spécifiquement des récepteurs membranaires. Ils ont également une faible immunogénicité, comparés aux protéines entières<sup>89</sup>. Ces domaines bioactifs courts sont bien définis et peuvent être facilement synthétisés chimiquement<sup>89</sup>. De plus, grâce aux avancées dans le domaine de synthèse de peptides ces vingt dernières années, ont permis de faire chuter leur coût de production et d'améliorer leur accessibilité, ce qui donne les moyens d'optimiser leur efficacité et leur stabilité<sup>90</sup>. Ces caractéristiques spécifiques leur ont valu un grand intérêt dans la conception et la fonctionnalisation de biomatériaux. Ils peuvent être soit adsorbés à la surface du matériau ou soit greffés chimiquement de façon covalente<sup>94</sup>.

L'utilisation de peptides présentent plusieurs avantages, tels que leur synthèse à faible coût, ce qui facilite leur utilisation dans les procédés industriels par exemple<sup>94</sup>. De plus, leur bioactivité est maintenue après stérilisation, une étape qui en général dénature les protéines<sup>94</sup>.

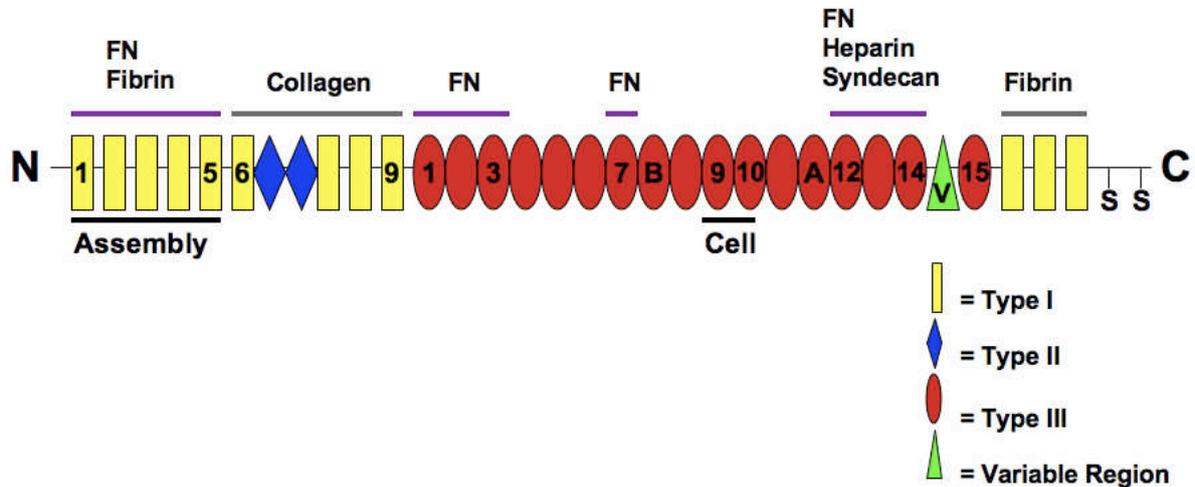
### 1. Peptides d'adhésion dérivés de la fibronectine

Divers peptides dérivés de protéines de la MEC sont utilisés comme substrats pour diriger le comportement cellulaire. Quelques exemples de leur utilisation seront présentés ci-après.

#### *Tripeptide Arginine-Glycine-Acide aspartique (RGD)*

Le tripeptide arginine-glycine-acide aspartique (RGD) est l'un des peptides les plus étudiés pour favoriser l'adhérence cellulaire et l'ostéo-intégration<sup>91,97</sup>. Les sites RGD sont présents sur de nombreuses protéines de la MEC, telles que la fibronectine (**Figure 18**), la vitronectine, l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse, le fibrinogène et dans certains types de collagène, reconnues par diverses intégrines<sup>92</sup>. Le site RGD est reconnu par plus d'une dizaine d'intégrines, telles que les intégrines  $\alpha_v\beta_1$ ,

$\alpha_v\beta_3$ , et  $\alpha_5\beta_1$ <sup>93</sup>. Le peptide RGD dérivé de la fibronectine est présent sur celle-ci dans le domaine FNIII9.  
10 (Figure 18)<sup>96</sup>.



*Figure 18: Les différents domaines d'interaction de la fibronectine aux intégrines et aux protéines de la MEC<sup>96</sup>.*

Plusieurs peptides contenant la séquence RGD ont été élaborés avec des structures variables. En dehors du contexte protéique, le peptide RGD n'a qu'une très faible activité qui est nettement améliorée en ajoutant des acides aminés à ses extrémités : RGD (inactif) < RGD-NH<sub>2</sub> < RGDS < GRGDSP<sup>94</sup>. De plus, les résidus adjacents améliorent la flexibilité du peptide et la sélectivité des récepteurs<sup>94</sup>.

Les peptides RGD ont été utilisés pour fonctionnaliser par exemple des polymères synthétiques, tels que le diacrylate de polyéthylène glycol (PEGDA), pour contrôler l'adhérence et l'étalement des cellules<sup>95</sup>. Les peptides RGD peuvent être également combinés à des facteurs de croissance pour stimuler une fonction cellulaire spécifique. Par exemple, il a été montré que la fonctionnalisation de surface par les peptides RGD combinés à la BMP-2 augmente de façon synergique le degré d'engagement des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine (hBMSC) vers le lignage ostéoblastique<sup>99</sup>.

L'ajout de peptides RGD à des hydrogels en association avec des facteurs de croissance s'est révélé efficace dans le domaine de l'ingénierie tissulaire<sup>102-104</sup>. Les peptides RGD ont été largement utilisés dans la fonctionnalisation d'hydrogels combinés à des facteurs de croissance, pour la régénération osseuse<sup>102,104</sup>. Des hydrogels d'alginate composés à 0,5% de peptides RGD ont été

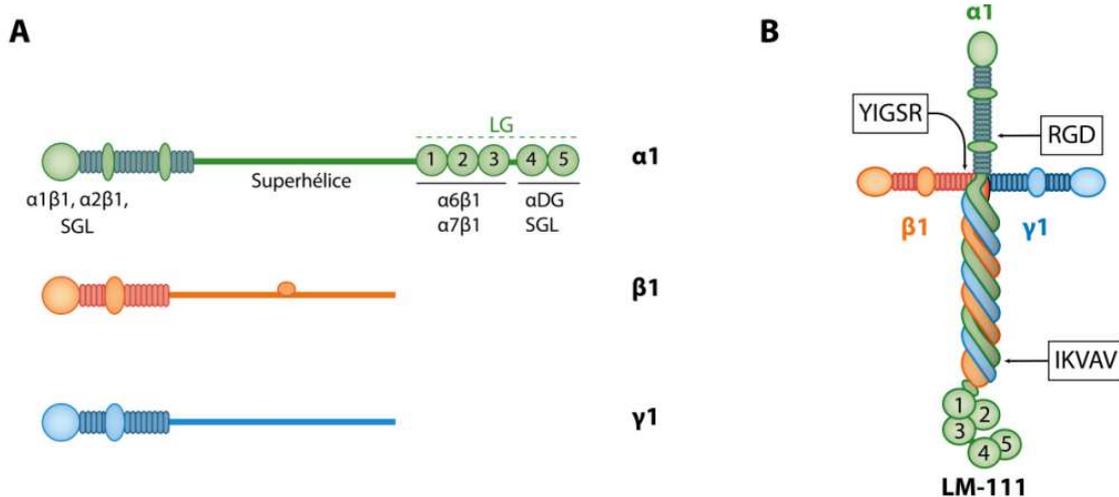
élaborés pour cultiver des cellules en 3D<sup>105</sup>. L'ajout de peptides RGD induit la différenciation et le développement de cellules souches embryonnaires humaines en tissus composant la rétine<sup>105</sup>.

Le peptide RGD fait partie des peptides d'adhésion clés dans la fonctionnalisation d'un biomatériau, bien qu'il convienne de l'associer à d'autres molécules spécifiques du tissu ou de l'organe à réparer ou à remplacer.

## 2. Peptides d'adhésion dérivés des laminines

### *YIGSR et IKVAV*

D'autres peptides sont également utilisés pour fonctionnaliser la surface de matériaux pour la culture cellulaire, tels que les peptides YIGSR et IKVAV dérivés de la laminine. Ces séquences sont dérivées respectivement de la longue chaîne  $\alpha 1$  et de la courte chaîne  $\beta 1$  de la laminine (**Figure 19**)<sup>106</sup>. Ils sont utilisés pour fonctionnaliser la surface de matériaux (ex. implants, hydrogels, matrices) pour l'adhérence, la prolifération et la différenciation cellulaire<sup>107,108</sup>.



**Figure 19 : Structure des différentes chaînes  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  et  $\gamma 1$  composant la laminine et les domaines d'interaction avec les intégrines.** (A) La chaîne  $\alpha$  contient un domaine globulaire (LG) à son extrémité C-terminale. Elle concentre les régions principales d'interaction avec les récepteurs cellulaires (intégrines  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_4$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_7\beta_1$ ). L'extrémité N-terminale contient différents domaines globulaires (LG) capables d'interagir également avec des intégrines. (B) Représentation schématique de la laminine-111 et positionnement des peptides bioactifs RGD, IKVAV et YIGSR dérivés de cette protéine (adapté de Domogatskaya et al.<sup>106</sup>).

Le peptide IKVAV est impliqué dans différentes activités biologiques, telles que l'adhérence cellulaire et la différenciation des cellules souches neurales *in vitro*, l'angiogenèse, la production de collagénase IV et la croissance tumorale. Ce peptide est reconnu par les cellules comme un épitope

bioactif de la laminine<sup>109,110</sup>. Le peptide KVAV interagit de façon spécifique aux cellules neurales PC12 au niveau de la sous unité intégrine  $\beta 1$  et favorise leur adhérence et leur différenciation sur des films de polymères conducteurs mimant la membrane cellulaire<sup>109,111</sup>.

L'adhérence des cellules au peptide YIGSR est principalement médiée par une interaction avec les intégrines  $\alpha_6\beta_1$  et  $\alpha_4\beta_1$ <sup>112</sup>. Le peptide YIGSR est impliqué dans l'adhérence des cellules endothéliales du cordon ombilical (HUVECs)<sup>113</sup>. De plus, lorsqu'il est combiné au peptide RGD, les cellules adhèrent et prolifèrent davantage, montrant un effet synergique entre les deux peptides<sup>113</sup>.

Les peptides YIGSR et KVAV sont également connus pour s'autoassembler en diverses structures, telles que les nanofibres et les nanotubes dans des conditions environnementales spécifiques<sup>115</sup>. En contrôlant les conditions environnementales, telles que la polarité du solvant, le pH et la nature des liaisons chimiques, les autoassemblages peuvent être contrôlés<sup>115</sup>. Par exemple, les peptides YIGSR et KVAV ont été modifiés chimiquement pour former des autoassemblages en gel supramoléculaire et en jouant sur la polarité du solvant<sup>115,116</sup>. Ils ont été incorporés dans des hydrogels pour promouvoir la différenciation neuronale<sup>115,116</sup>.

### 3. Peptides d'adhésion dérivés du collagène

Il existe 28 types de collagène mis en évidence en fonction de leur organisation et de leur fonction. Ceci a permis le développement de différents peptides dérivés des différents types de collagène<sup>88</sup>. Par exemple, les peptides dérivés du collagène de type I, DGEA et GFOGER, ont été étudiés dans l'ingénierie des tissus osseux<sup>117</sup>. L'incorporation des peptides DGEA dans des hydrogels stimule la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines<sup>117</sup>. Les peptides GFOGER incorporés dans des polymères synthétiques stimulent la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse<sup>118</sup>. D'autres peptides dérivés du collagène I, tels que FPGER, sont utilisés pour promouvoir la migration et la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes cutanés dans des hydrogels lors de test *in vitro*<sup>119</sup>.

### 4. Peptides dérivés des BMPs

Des épitopes dérivés des BMP-2, 6 et 7 ont été mis en évidence et utilisés dans des applications en ingénierie tissulaire. Ces peptides proviennent principalement de la BMP-2 et de la BMP-7<sup>120</sup>. Par exemple, l'épitope « KPSSAPTQLN » dérivé de la BMP-7, a été utilisé pour développer des hydrogels avec des propriétés anti-inflammatoires et anti-apoptotique<sup>121</sup>.

Des peptides dérivés de la BMP-2 ont montré des propriétés ostéogéniques lors de tests *in vitro* et *in vivo*. Le peptide « KIPKASSVPTELSAISTLYL » dérivé de l'épitope court de la BMP-2 (résidus 73 à 92) et qui se lie au récepteur BMPR-II, a été utilisé dans des hydrogels pour promouvoir la différenciation des hMSCs en ostéoblastes<sup>122</sup>. Ce peptide a également été utilisé pour fonctionnaliser des implants de titane et pour induire l'expression d'ALP dans un modèle de préostéoblastes murin MC3T3<sup>123</sup>.

## 5. Effet synergique des peptides

### ***RGD et peptides dérivés de la laminine (YIGSR et IKVAV)***

L'interaction de la laminine avec d'autres protéines de la MEC *via* leurs trois bras plus courts, module la prolifération et la différenciation cellulaire. Parmi ces interactions, il a été montré que la fibronectine et la laminine modulent le comportement cellulaire. Par exemple, la fonctionnalisation de surfaces par les peptides RGD et IKVAV influence le potentiel d'adhésion et de différenciation des cellules hMSCs de façon synergique, par l'interaction avec différentes intégrines spécifiques<sup>112</sup>.

Des surfaces en silicone fonctionnalisées de façon covalente avec les peptides RGD et YIGSR favorisent l'adhérence des myocytes, de façon comparable à la fibronectine et à la laminine<sup>128</sup>. De plus, il a été démontré que la co-immobilisation de la laminine et de la fibronectine a un effet synergique sur la différenciation des C2C12 en myoblastes<sup>81</sup>. Les peptides YIGSR et RGD dérivés de celles-ci, ont été utilisés pour induire l'adhérence et la différenciation myogénique des C2C12, cultivées sur du PDMS plat et rainuré<sup>114</sup>.

Ceci montre l'importance de développer des biomatériaux fonctionnalisés avec différents peptides pour induire une fonction cellulaire spécifique (**Tableau 1**), notamment pour le traitement des maladies liées au muscle squelettique.

### ***RGD et BMP2 pour stimuler la différenciation ostéogénique***

La synergie entre les peptides BMP-2 et RGD a également été étudiée. Plusieurs études ont pu montrer que les peptides présentés ensemble à la surface de substrats de culture avaient un effet synergique sur l'ostéogénèse<sup>124,125</sup>. De plus, cette synergie a été observée en présence de protéines entières de la rhBMP2 et de la fibronectine aux cellules<sup>126</sup>.

| Fonction                                    | Source   | Peptide/Épitope   |
|---|--|---|
| Adhérence cellulaire                        | Fibronectine   | RGDS, PHSRN   |
|   | Fibronectine, laminine   | RGDS, IKVAV, YIGSR  |
|   | Fibronectine, laminine   | RGDS, REDV, IKVAV, YIGSR  |
|   | Fibronectine, laminine   | FRGDF, DIKVAV   |
|   | Laminine   | IKVAV, YIGSR  |
|   | Fibronectine, cadhérine  | RGD, HAVDIGGGK  |
|   | Fibronectine   | FNIII9-10 + FNIII12-14  |
|   | Fibronectine, laminine, collagène  | GRGDSP, YIGSR, TAGSCLRKFST  |
|   | Fibronectine, tenascine-C  | RGD, Tenascine-C  |
| Adhérence cellulaire/Facteurs de croissance | Marrow homing-, heparin-binding motif, fibronectin   | SKPPGTSS + FHRRIKA + PRGDSGYRGDS  |
|   | Fibronectine, VEGF   | GPRGDSGYRGDS + KLTWQELYQLKYKGI  |
|   | Fibronectine, BMP-2  | GGRGDS + KIPKASSVPTLS-AISTLYL   |
|   | Fibronectine, vitronectine, laminine, IGF-1  | (GRGDSP)4K + FRHRNRKGY + IKVAV, IGF-1   |
|   | Fibronectine, collagène, VEGF  | RGDS + DGEA + SVVYGLR   |
|   | Laminine, BDNF   | IKVAV + RGIDKRHWNSQ   |
| Facteurs de croissance                      | NGF, BDNF  | CTDIKKGCTGACDGKQC + RGIDKRHWNSQ   |
|   | VEGF, BDNF   | KLTWQELYQLKYKGI + RGIDKRHWNSQ   |
| D'autres combinaisons                       | Fibronectine, MMP-2-cleavable  | RGDS + LRG<br>RGD + TPGPQGIAGQ  |
|   | Fibronectine, stathérine   | RGDS + DDDEEKFLRRIGRFG  |
|   | Fibronectine, hydroxyapatite   | RGDS + REDV + HAP   |
|   | Entactine/nidogène, vitronectine, vWF, nétrine-1, fibronectine, collagène I/IX, fibrinogène, ostéopontine, thrombospondine, tenascine-C, laminines, MMP-1, -2, -3, -7, -9, -13, -14. | RGD + QWRDTWAR + PHSRN-RGD + GFOGER + GPR + SVVYLR + YSMKKTMM + VTCG + DGEA + AEIDGIEL + IKVAV + LRE + YIGSR + LRG + IPESLRAG + GPLGLWAR + VPLSLYSG + VPLSLTMG + RPFMIMG + SGESPAYTA + VPMSMRGG |
|   | Collagène I, IV, XVIII, laminine $\alpha$ , laminine $\beta$ , thrombospondine, tenascine-C, périostine, nidogène, fibuline  | DGEA + FYFDLR + IVRRADRAAVP + IKVAV + YIGSR + VTCG + EIDGIEL + ALMKYHILNTLQCSE + RGD + IPVSLRSG + RPFMIMG + VPLSLYSG + VPLSLTMG + IPESLRAG  |

**Tableau 1 : Séquences de peptides/épitopes avec des effets synergiques.** BDNF, facteur neurotrophique dérivé du cerveau ; BMP, protéine morphogénétique osseuse ; IGF, facteur de croissance de type insuline ; MMP, métalloprotéinase de la matrice ; NGF, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ; vWF, facteur de von Willebrand. (Ligorio et Mata<sup>88</sup>)

## B. Limites des biomatériaux à base de peptides bioactifs

L'utilisation de peptides bioactifs à la surface de matériaux peut présenter certaines limites. Tout d'abord, il est difficile de contrôler la distribution spatiale ou l'orientation des peptides à l'échelle nanométrique et de maintenir leur solubilité à la surface des matériaux, que ce soit par greffage chimique ou adsorption physique. De plus, au sein de la MEC, les peptides bioactifs des protéines sont distribués de manière complexe en trois dimensions à l'échelle nanométrique, ce qui rend difficile l'introduction uniforme de peptides sur des surfaces 2D<sup>129</sup>. Par ailleurs, la plupart des voies de

signalisation impliquées dans les réponses cellulaires, sont régulées par les intégrines, qui s'activent en formant des clusters après leurs interactions avec divers peptides de la MEC<sup>11,12</sup>. Il est donc crucial de développer un système permettant de contrôler la densité, la distribution et l'orientation des peptides pour améliorer l'interaction avec les intégrines et renforcer leur regroupement (clustering), et ainsi stimuler diverses réponses cellulaires.

Des architectures protéiques bien définies peuvent aider à résoudre ces problèmes. Des recherches récentes s'appuient sur le détournement de protéines de capsid de divers virus pour créer des autoassemblages moléculaires à l'échelle nanométrique bien organisés et bien définis (Virus-Like Particles, VLPs)<sup>130</sup>. Bien que ces technologies aient été largement utilisées pour le développement de vaccins ou de systèmes d'administration de médicaments, elles n'ont pas encore été employées dans le domaine des biomatériaux. Nous nous sommes donc intéressés à l'utilisation des VLPs comme plateformes de présentation de peptides bioactifs à l'échelle nanométrique, reconnus par les cellules.

Le prochain chapitre, sera consacré aux VLPs. Tout d'abord, nous évoquerons l'origine évolutive des virus qui ont inspiré leur développement. Nous décrirons ensuite les caractéristiques et les différents types de VLPs produites dans les systèmes d'expression hétérologue, ainsi que leurs mécanismes d'autoassemblage. Pour finir, nous discuterons des méthodes de fonctionnalisation des VLPs, ainsi que les techniques de purification et de caractérisation nécessaires à leurs applications biomédicales.

## Chapitre 2 : Les particules pseudo-virales (VLPs) en tant que plateformes de présentation de peptides bioactifs.

# I. Les particules pseudo-virales (VLPs)

## A. Généralités

Les progrès dans le domaine des nanotechnologies et des techniques de technologie recombinante, ont permis de développer des architectures protéiques bien définies avec des fonctionnalités diverses. La nanotechnologie est un domaine interdisciplinaire consacré à l'ingénierie et au développement de

**Liposome** : vésicule sphérique composée d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques, pouvant encapsuler des molécules hydrophiles dans son cœur aqueux.

structures allant de 1 à 500 nm, que ce soit à visées industrielles, cosmétiques ou thérapeutiques. Les structures qui correspondent à cette échelle sont définies comme des nanoparticules<sup>131,132</sup>. Les progrès dans les domaines de la physique, de la chimie, et des biosciences, ont permis le développement de nanoparticules (NPs), avec une stabilité et une solubilité améliorée à des fins biomédicales, telles que l'administration de médicaments, la thérapie génique et les vaccins<sup>132</sup>. Par exemple, les liposomes sont largement utilisés dans le domaine biomédical<sup>133</sup>. En revanche, leur faible stabilité et leur capacité limitée à transporter des médicaments hydrophobes, rendent difficile la délivrance de médicaments lors de leur administration<sup>133</sup>. Les nanoparticules dérivées de capsides de virus peuvent remédier à ces inconvénients.

Les virus présentent une grande diversité de formes, de tailles et de symétries, offrant ainsi des plateformes polyvalentes pour la présentation d'antigènes avec une stœchiométrie contrôlée<sup>131</sup>. Les autoassemblages protéiques dérivés de virus ont inspiré les scientifiques à développer des particules pseudo-virales (VLPs), utilisées dans de nombreuses applications, y compris les vaccins<sup>131,134</sup>.

Une recherche cumulative dans Google Scholar montre une augmentation significative du nombre de publications sur les VLPs au fil des ans. On compte plus de 96 000 publications de 1995 jusqu'en 2023, ce qui illustre un intérêt des scientifiques pour les technologies basées sur les VLPs et les applications qu'elles peuvent offrir.

Bien que l'origine évolutive des virus demeure un sujet de débat, l'étude de leur structure a permis de développer des nanoparticules capables de reproduire leur architecture.

Avant de documenter les caractéristiques et l'utilisation des VLPs dans les applications biomédicales, il est important de connaître les théories émises sur l'origine des virus qui ont inspiré leur développement.

## B. Origine évolutive des virus

Les virus occupent une place particulière au sein du vivant. Ils possèdent tous en commun un acide nucléique (ARN ou ADN) protégé par une capsidie protéique enveloppée ou non par une ou plusieurs membrane(s) lipidique(s)<sup>135</sup>. Les virus sont dépendants de cellules animales, végétales ou bactériennes pour répliquer leur matériel génétique, et sont donc considérés comme organismes non vivants, classés dans un règne à part des eucaryotes et procaryotes.

Bien que leur évolution et leur origine ne soient pas encore bien élucidées en raison de leur grande diversité et complexité, plusieurs théories ont fait débat dans le monde scientifique. Nous allons citer principalement trois grandes théories : la théorie progressive qui propose une évolution d'éléments génétiques vers une capacité à se déplacer entre cellules ; la théorie régressive qui suppose que les virus sont des restes d'organismes cellulaires dégénérés ; et enfin la théorie évolutive qui suggère que les virus pourraient être la première unité capable de se répliquer et ainsi être à l'origine des premières cellules vivantes (**Figure 20**)<sup>136,137</sup>. Ces théories sont principalement basées sur la comparaison des homologues entre les virus, les virions et les cellules pour comprendre les origines et l'évolution des virus.

La première hypothèse suppose que les virus sont nés progressivement, en tant qu'éléments génétiques mobiles et qui ont acquis par la suite la capacité à se déplacer entre les cellules (**Figure 20**)<sup>136,137</sup>. Cette hypothèse a été examinée en étudiant le mécanisme de propagation du génome des rétrovirus appartenant à la famille des virus du VIH. Ces virus possèdent un ARN monocaténaire qui est converti en ADN double brin par leur propre enzyme virale, la transcriptase inverse, une fois que le virus pénètre dans la cellule<sup>138</sup>. L'ADN viral migre ensuite vers le noyau pour s'insérer dans le génome de la cellule hôte, grâce à une autre enzyme virale, l'intégrase<sup>138</sup>. L'ADN est ensuite transcrit en plusieurs copies d'ARN monocaténaire par l'ARN polymérase de la cellule hôte<sup>138</sup>. Ainsi, les virus progénitaux nouvellement formés, s'assemblent avant de quitter la cellule hôte pour recommencer ce processus. La capacité de se déplacer d'une cellule à une autre en s'appropriant la machinerie de leur hôte pour créer de nouvelles copies d'eux-mêmes (virions parasites), pourrait supposer qu'ils ne sont apparus qu'après l'apparition des cellules. Le parasitisme est également un moyen de diffuser leur matériel génétique entre les espèces et participe donc à leur évolution<sup>136,137</sup>.

**Parasitisme** : lorsqu'un organisme, appelé le parasite, vit aux dépens de l'autre, appelé l'hôte.

La seconde hypothèse, dite « régressive », spécule que les virus sont apparus en tant qu'organismes libres qui sont devenus des parasites par la suite (**Figure 20**)<sup>136,137</sup>. Cette théorie est inspirée de l'origine endosymbiotique des mitochondries qui étaient à la base des bactéries libres<sup>139</sup>. Des études génomiques suggèrent que les mitochondries et la bactérie *Rickettsia prowazekii* partagent un ancêtre commun et libre<sup>139</sup>. Ainsi, les virus peuvent avoir évolué à partir d'organismes complexes qui auraient adopté un mode parasitaire.

**Endosymbiotique** : relation symbiotique dans laquelle un organisme vit à l'intérieur des cellules d'un autre organisme.

**LUCA** : le plus récent organisme duquel descendent tous les organismes vivants actuels (Archée, Bactérie et Eucaryote).

Ceux illustrant le mieux cette hypothèse sont les virus nucléocytoplasmiques à ADN, Mimivirus, récemment découverts<sup>140</sup>. Ces virus ont un diamètre bien plus important (environ 750nm) comparé à celui de la grippe (80 nm) et au poliovirus (30nm)<sup>140,141</sup>. Ils possèdent également un génome de grande taille (environ 1,2 million de paires de bases), et dépendent moins de leur hôte pour la réplication de leur matériel génétique comparé aux autres virus. Ces virus pourraient être des descendants d'organismes plus complexes, qui ont développé une relation symbiotique<sup>136,137</sup>. En revanche, les virus connus à ce jour sont tous parasites, nécessitant un hôte pour leur reproduction. Ainsi, il reste peu probable que les virus aient émergés avant la diversification de LUCA (Last Universal Common Ancestor).

Enfin, la dernière hypothèse, dite « Virus-First » (« primordial virus world » ou « virus early »), suppose que les virus sont les précurseurs de la vie (**Figure 20**)<sup>136,137</sup>. Celle-ci a été émise par plusieurs chercheurs qui ont postulé que les virus existaient dans un monde « précellulaire », en tant que premières entités à se répliquer<sup>142</sup>. Au fil du temps, ces entités seraient devenues plus organisées et plus complexes, tout comme les enzymes impliquées dans la synthèse des membranes et parois cellulaires, qui ont évolué et entraîné la formation de cellules<sup>143</sup>.

La plupart des biologistes s'accordent sur le fait que l'ARN a été la première molécule de réplication<sup>144,145</sup>. Les molécules d'ARN sont également impliquées dans les processus de catalyse, c'est le cas des ribozymes. On peut supposer que les ribozymes pourraient avoir joué un rôle dans la réplication et la catalyse dans les premières formes de vie<sup>146</sup>. Certains chercheurs ont proposé que les précurseurs des Mimivirus, de par la taille de leur génome et leur grande autonomie, seraient à l'origine de l'émergence des cellules eucaryotes<sup>147,148</sup>.

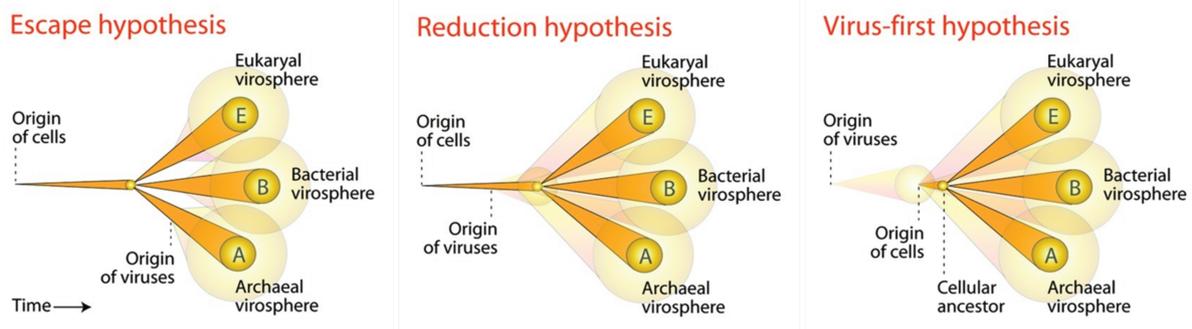


Figure 20 : Les trois principales théories expliquant l'origine des virus. (Nasir et al.<sup>137</sup>)

Si les théories sur l'origine des virus sont encore débattues, il est certain que leur évolution est liée à celle de leurs hôtes. La coévolution des virus, des cellules qu'ils infectent et des systèmes immunitaires constitue une pression de sélection naturelle, poussant les virus à s'adapter sans cesse aux changements de leur environnement<sup>149,150</sup>.

Bien que de nombreux virus puissent être classés en fonction de leur apparence structurelle et de la similitude du repliement de leurs protéines d'enveloppe, la grande divergence de leurs séquences génétiques limite l'identification d'origines communes<sup>149</sup>.

En revanche, tous les virus partagent une structure basée sur un autoassemblage ordonné et répétitif de protéines, appelées capsides. La majorité des virus classés, ont une forme icosaédrique (70 %), tandis que 29 % ont une structure en hélice et 1 % une structure en fuseau<sup>135</sup>. Ces structures sont particulièrement intéressantes pour les applications biotechnologiques.

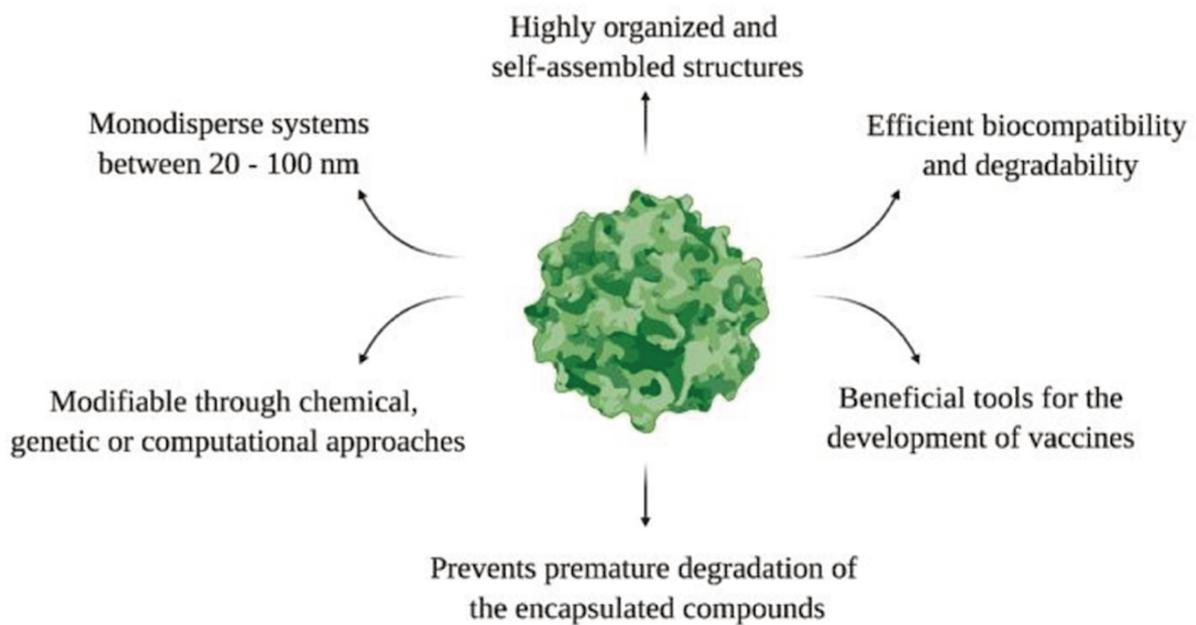
### C. Caractéristiques des VLPs

Différents types de virus ont inspiré les scientifiques ces dernières années pour développer des VLPs pour des applications en vaccinologie et pour l'administration de médicaments<sup>131</sup>. Les VLPs font référence aux nanoparticules qui s'autoassemblent à partir de l'expression de protéines codant pour la capside, l'enveloppe virale, ou des protéines dérivées de virus multicouches. Les particules formées à partir de protéines non virales ou artificielles peuvent également être considérées comme des

**Sélection naturelle :** processus par lequel les traits héréditaires favorables à la survie et à la reproduction d'un organisme, deviennent plus communs dans une population au fil du temps. Théorie proposée par Charles Darwin et Alfred Russel Wallace.

**Coévolution :** processus évolutif réciproque par lequel deux espèces ou plus, étroitement liées par des interactions biologiques, développent des adaptations réciproques en réponse aux pressions de sélection exercées par l'autre.

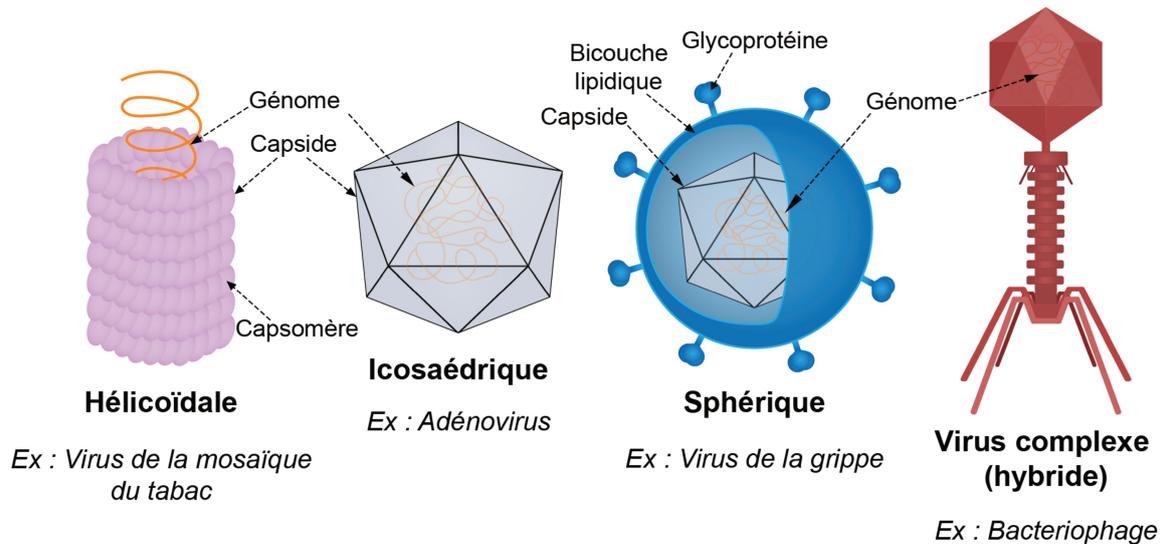
VLPs<sup>151</sup>. Les VLPs sont structurellement similaires aux virus dont elles sont dérivées, mais n'ont pas de génome viral complet et sont donc incapables de se répliquer, ce qui les rend inoffensives<sup>131,151</sup>. Les protéines des capsides de virus peuvent être modifiées génétiquement ou chimiquement en laboratoire (**Figure 21**), ce qui offre une facilité de fonctionnalisation pour le ciblage cellulaire, contrairement aux autres NPs inorganiques<sup>131,151</sup>. La variété des structures adoptées par les différentes VLPs, les rend attrayantes pour diverses applications, notamment pour la vaccination ou la délivrance de molécules (protéines ou acides nucléiques)<sup>131,151</sup>.



**Figure 21 : Principaux avantages des VLPs.** (Mejía-Méndez et al.<sup>131</sup>)

Les VLPS peuvent s'assembler à partir d'une même ou de différentes protéines virales, en suivant divers types de symétrie : icosaédrique, sphérique, hélicoïdale ou hybride (**Figure 22**)<sup>131</sup>. Leur taille varie entre 20 et 200 nm, selon le virus à partir duquel elles sont dérivées (**Figure 21**)<sup>131</sup>. Elles peuvent être produites en laboratoire dans des systèmes d'expression hétérologue<sup>131</sup>, ce qui permet d'en produire de grandes quantités sans manipuler de virus pathogènes.

**Système d'expression hétérologue :** organisme hôte dans lequel est inséré un fragment d'ADN étranger afin de produire des protéines d'intérêt.



**Figure 22 : Différents types de capsides virales : (A) hélicoïdale, (B) icosaédrique, (C) sphérique, et (D) hybride.**

## 1. Les différents types de VLPs

Les virus sont classés en familles en fonction de divers critères structuraux et génétiques. Les principaux critères structuraux incluent le type et la taille de leur acide nucléique (ADN ou ARN), la forme et la taille de leur capside, ainsi que la présence d'une enveloppe lipidique provenant de la cellule hôte<sup>151</sup>. Sur cette base, les VLPs se répartissent en deux groupes principaux : enveloppées et non enveloppées (**Figure 23**).

### **Les VLPs non-enveloppées**

Les VLPs dérivées de virus non enveloppés, sont formées d'une ou plusieurs protéines de capside virale (ex. papillomavirus (HPV), nucléocapsides)<sup>151</sup>. Dans cette catégorie, il existe des VLPs à une seule, double ou triple couche, avec une ou plusieurs protéines à leur surface (**Figure 23**). Elles sont obtenues de manière recombinante et sont capables de s'autoassembler spontanément pour former un complexe protéique comparable à l'organisation du virus duquel elles sont dérivées<sup>151</sup>. Elles sont produites dans des systèmes d'expression eucaryotes ou procaryotes. La surface de leur capside peut être modifiée par des approches chimiques ou génétiques pour afficher des épitopes en vue du développement de vaccins<sup>151,156</sup>. Leur processus d'assemblage peut reposer sur l'expression d'une seule protéine virale, telle que le virus HPV<sup>151</sup>. En revanche, la production de VLPs hétéromériques est plus complexe et sont

**Protéine recombinante :** protéine exprimée à partir d'un gène d'intérêt inséré dans un vecteur d'expression puis introduit dans un système d'expression hétérologue.

généralement exprimées dans des systèmes eucaryotes, tels que les levures<sup>151</sup>. Certaines VLPs du virus Norwalk (NV) et du virus de l'hépatite E sont utilisées dans des études précliniques pour stimuler les réponses humorales chez des souris<sup>151,173</sup>. D'autres VLPs non enveloppées dérivées du virus SV40 (Simian Virus 40) sont utilisées comme systèmes de délivrance de gènes, tels que les SV40-VLP<sup>152</sup>.

### **Les VLPs enveloppées**

À l'inverse, les VLPs dérivées de virus enveloppés, contiennent une membrane lipidique dérivée de l'hôte, dans laquelle des glycoprotéines virales sont incorporées (**Figure 23**)<sup>151,156</sup>. Les VLPs enveloppées peuvent être classées en sous-groupes en fonction de la complexité de leur assemblage. La plupart sont composées d'une seule couche de protéines, telles que les VLPs dérivées de l'hépatite B et ont la structure la plus simple<sup>157</sup>. D'autres possèdent une couche externe et une couche interne (double couche) constituées de différentes protéines, souvent nécessaires à la composition de la particule et à l'interaction avec la cellule hôte<sup>151,156</sup>. Une ou plusieurs glycoprotéines peuvent être insérées dans la membrane lipidique et sont généralement les principaux antigènes ciblés par le système immunitaire. La nature, l'origine et la composition de l'enveloppe sont différentes en fonction du virus d'origine<sup>151,156</sup>.

Les VLPs enveloppées sont généralement produites dans des systèmes eucaryotes. Leur enveloppe virale peut être conçue pour afficher des adjuvants et des antigènes par des méthodes chimiques ou génétiques<sup>151</sup>. Leur couche protéique est ainsi ciblée par les anticorps lors des réponses immunitaires et constitue un élément essentiel pour développer des vaccins<sup>151</sup>.

Cependant, leur assemblage est techniquement complexe en raison des propriétés inhérentes à leur enveloppe lipidique, qui incluent une cascade de réactions intermédiaires et de nombreuses sous-unités protéiques encapsulant le génome<sup>151</sup>. Les acides aminés nécessaires à leur assemblage peuvent être identifiés grâce à des approches de mutagenèse<sup>157</sup>. Parallèlement à l'identification des acides aminés clés, la prédiction d'organisation 3D (ex. AlphaFold) permet d'explorer les conséquences structurales de ces modifications. Par exemple, AlphaFold peut servir d'outil de prédiction de structures protéiques complémentaire aux techniques expérimentales comme la cristallographie. Dans le cas du développement de VLPs, cet outil peut prédire la structure de la capsid et/ou de l'enveloppe lipidique qui les composent, des éléments clés qui déterminent leur assemblage et leur fonctionnalité. La modélisation sur AlphaFold devient un outil prometteur pour comprendre la structure 3D des protéines, notamment dans le domaine pharmaceutique et le

**Mutagenèse :** technique basée sur l'introduction de mutations dans la séquence d'ADN d'un organisme ou d'un vecteur génétique.

**AlphaFold :** outil de modélisation des protéines, développé par DeepMind et basé sur des algorithmes pour prédire la structure 3D des protéines à partir de leur séquence d'acides aminés.

développement de vaccins à base de VLPs. Grâce à cet outil, la structure de milliers de protéines est référencée dans des bases de données, telles que la Protein Data Bank (PDB), rendant les structures accessibles à la communauté scientifique mondiale.

Les premières VLPs enveloppées utilisées en vaccination étaient constituées de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (HBsAg)<sup>157</sup>.

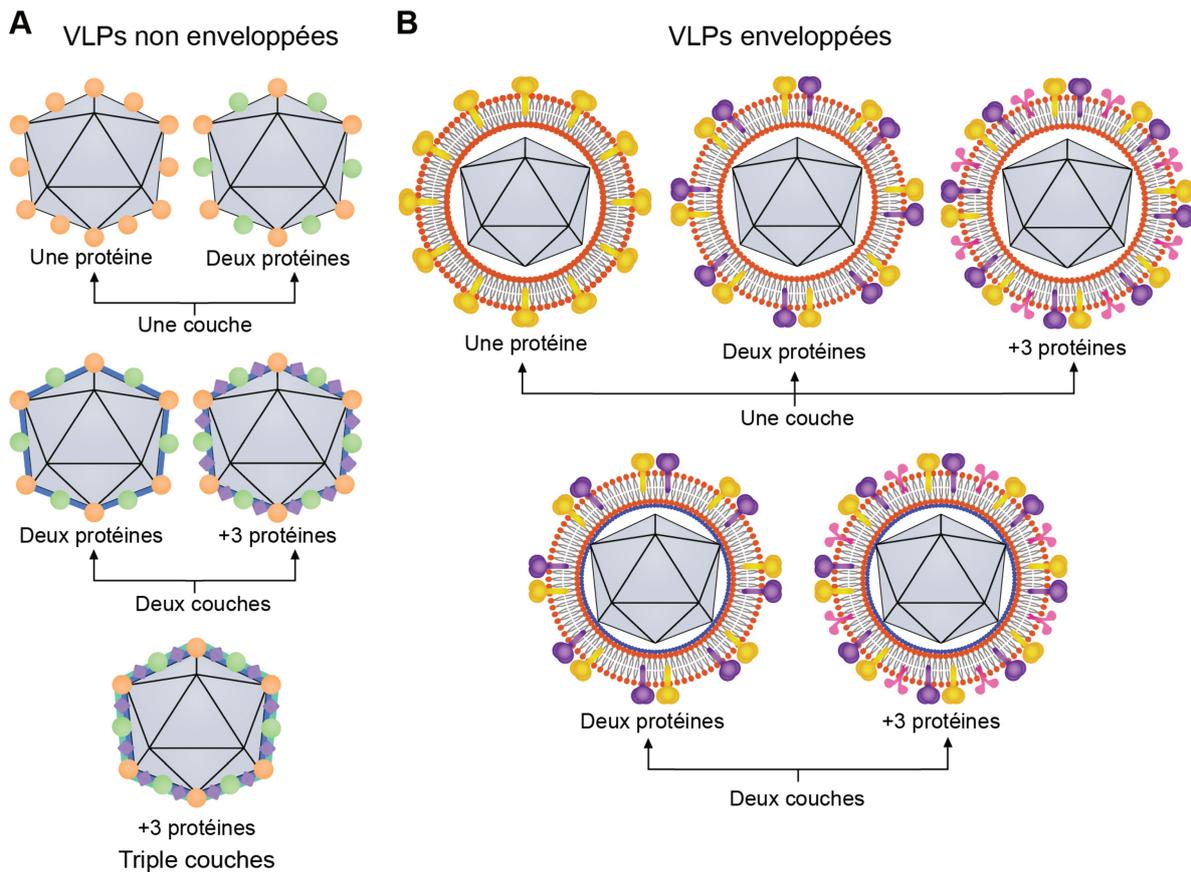


Figure 23 : Les différents types de VLPs non enveloppées (A) et enveloppées (B).

## 2. Mécanisme d'autoassemblage et géométrie

### Géométrie

La plupart des virus utilisés dans le développement de VLPs adoptent des arrangements icosaédriques, dont la taille varie entre 20 et 800 nm, dictée par le nombre d'interactions protéine-protéine et protéine-acide nucléique, selon la théorie de Caspar-

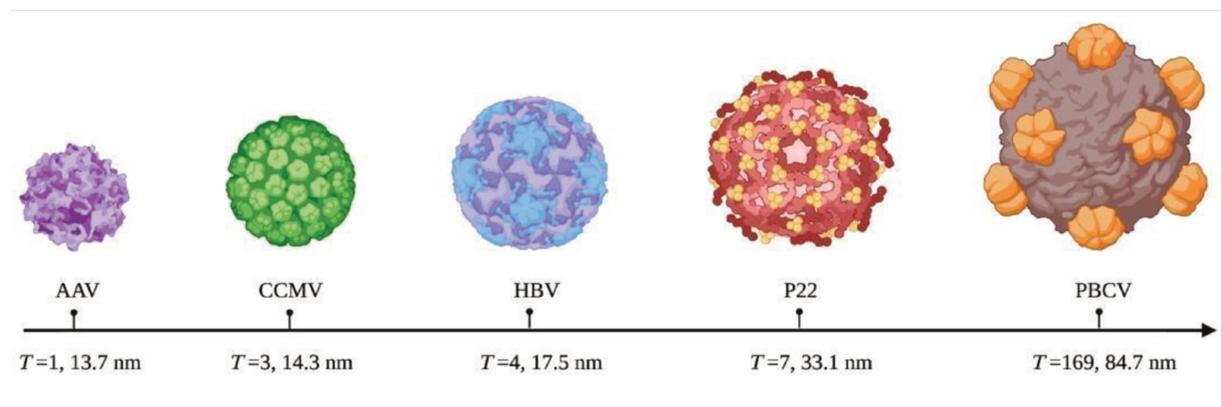
**Capsomère** : unité constituée de plusieurs sous-unités protéiques formant la capsid d'un virus.

Klug<sup>161</sup>. Ces interactions conduisent à l'assemblage tridimensionnel des capsomères, essentiel pour la liaison aux récepteurs cellulaires et la libération du matériel génétique.

L'architecture structurale et la symétrie des capsides icosaoédriques sont dictées par le nombre de triangulations (T)<sup>161</sup>. La symétrie fait référence à la façon dont les capsomères sont organisés géométriquement. Plus le nombre T est important, plus le diamètre de la capside, sa capacité de vectorisation de médicaments et son nombre d'interactions seront élevés (Figure 24)<sup>131</sup>. Ce nombre T correspond à la subdivision de chaque face triangulaire de l'icosaèdre, ce qui détermine la disposition et le nombre total de capsomères dans la capside<sup>131,161</sup>.

**Nombre de triangulations (T) :** indique combien de fois les faces triangulaires d'un icosaèdre sont subdivisées pour former la capside d'un virus.

**Face triangulaire :** unité géométrique équilatérale qui compose la surface d'un icosaèdre.



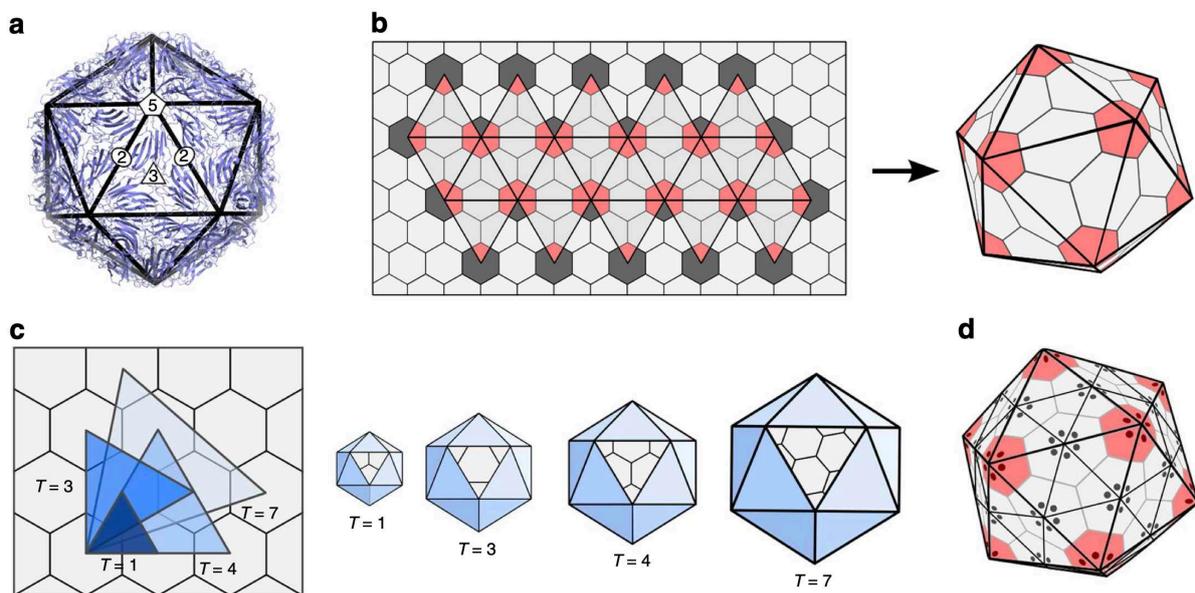
**Figure 24 :** Différents types de triangulation (T) et diamètres de capsides virales. L'axe indique la taille des particules virales en fonction de leur nombre de triangulation (T). (Mejía-Méndez et al.<sup>131</sup>)

Malgré une grande diversité dans la géométrie des capsides virales, la plupart des VLPs utilisées pour les applications biomédicales ou pour la recherche fondamentale présentent une symétrie hélicoïdale ou icosaoédrique<sup>131,151</sup>. Ces structures simples et régulières permettent un large éventail de modifications chimiques et génétiques sans compromettre l'intégrité de la capside. Les capsides à symétrie icosaoédrique présentent une forme sphérique, tandis que la symétrie hélicoïdale est associée à une forme en bâtonnet<sup>131,151</sup>. Les sphères et les tiges sont des formes élémentaires qui peuvent être facilement combinées et assemblées pour créer toute une diversité de structures 3D complexes comme des échafaudages et des réseaux. Il est intéressant de noter que les nanostructures de carbone artificiel présentent les mêmes formes : nanosphères et nanotubes<sup>162</sup>.

La forme très régulière et géométrique des capsides virales permet de les modéliser facilement par des polyèdres, ce qui facilite la compréhension de leur assemblage<sup>161</sup>. Les capsides virales dites « sphériques » sont en fait des icosaèdres, c'est-à-dire des polyèdres comportant 20 faces triangulaires

et 12 sommets, chaque sommet reliant 5 faces (**Figure 25**)<sup>161</sup>. Les capsides icosaédriques se présentent sous différentes formes selon leur taille et leur complexité, ces deux paramètres étant bien représentés par le nombre de triangulations  $T$ <sup>131,161</sup>. Le nombre  $T$  est un paramètre pratique pour décrire grossièrement la capsidite et évaluer le nombre de monomères qu'elle peut contenir<sup>131,161</sup>.

Les capsides  $T=1$ , les plus simples, sont constituées de 60 sous-unités capsomériques réparties dans 12 pentamères ( $12 \times 5 = 60$ )<sup>131,161</sup> (**Figure 25**), comme celui du virus de la mosaïque satellite du tabac<sup>163</sup>. Les capsides  $T=2$ , comme celle du bactériophage  $\phi 6$ <sup>164</sup>, contiennent 120 sous-unités, tandis que les capsides  $T=3$ , plus complexes, comme celles du phage *Acetivobacter* AP205, et du poliovirus en comportent environ 180<sup>153</sup>. La manipulation de ces valeurs permet de modifier le diamètre de la VLP et le nombre d'interactions de ses sous-unités, en combinant des approches de modélisation et d'ingénierie moléculaire. Par exemple, la protéine matricielle M2 du virus de la grippe joue un rôle crucial dans l'assemblage des VLPs<sup>185</sup>. En modifiant la longueur de sa région transmembranaire, il est possible de moduler le diamètre des VLPs. De plus, l'introduction de mutations dans la région cytosolique de M2 peut influencer les interactions protéiques au sein de la particule, améliorant ainsi sa stabilité et sa morphologie.



**Figure 25 : Les principes de la symétrie icosaédrique et des nombres de triangulation (T) dans les capsides virales.** (a) organisation des pentamères et des hexamères dans une capsidite de structure icosaédrique. Les unités de sous-assemblage sont numérotées pour montrer la disposition des capsomères. (b) projection en deux dimensions avec les hexamères en gris et les pentamères en rouge, qui se regroupent pour former une structure icosaédrique. (c) diagramme des nombres de triangulation, illustrant les différentes configurations possibles pour les capsidites virales ( $T=1$ ,  $T=3$ ,  $T=4$

et T=7). (d) capsid*e* icosaédrique en vue tridimensionnelle, où les pentamères sont indiqués en rouge et les hexamères en blanc. (Twarock et al.<sup>161</sup>)

### **Autoassemblage**

L'assemblage des VLPs utilise exclusivement des protéines virales et exclut le matériel génétique. Elles peuvent ainsi être produites à partir des capsides de divers virus et bactériophages. Comprendre leur mécanisme d'assemblage permet d'améliorer la capacité et la stabilité de la capsid*e* à vectoriser des médicaments et la valence des antigènes à ajouter à sa surface.

L'autoassemblage de la capsid*e* virale est un mécanisme hautement reproductible, la forme de la capsid*e* dépendant uniquement de la nature du monomère<sup>131,158</sup>. Les monomères s'autoassemblent souvent spontanément en solution pour former des VLPs sans avoir besoin d'un génome viral ou de protéines d'échafaudage virales comme les protéines virales VP1 ou VP2<sup>158</sup>. L'autoassemblage des monomères en capsid*e* virale est facilité par un équilibre thermodynamique, basé sur les interactions Van der Waals, hydrogènes, hydrophobes et électrostatiques durant les phases de nucléation et de croissance<sup>158,232</sup>.

Le processus d'autoassemblage repose sur des interactions dimériques, médiées par des interactions hydrophobes et polaires<sup>158</sup>. Fonctionnellement, la protéine d'enveloppe n'existe pas sous forme de monomère. L'assemblage varie en fonction des types d'interactions impliquées, telles que les interactions protéine-protéine, protéine-acide nucléique, ion métallique et ponts disulfures<sup>158,232</sup>. Les protéines d'échafaudage et les acides nucléiques peuvent être utilisés pour faciliter l'autoassemblage *in vitro* de la capsid*e* de nombreux VLPs, tels que le bactériophage MS2<sup>201,232</sup>.

Il existe plusieurs types d'autoassemblage, basés sur le niveau d'organisation des capsides. Les VLPs sont composées de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de capsomères<sup>158,232</sup>. Chaque capsomère peut être constitué de plusieurs sous-unités protéiques (monomères) qui s'assemblent pour former des protomères. Ces protomères peuvent organiser les capsomères en structures virales icosaédriques ou hélicoïdales, en fonction de la symétrie du virus. Dans une structure virale icosaédrique, la capsid*e* contient 12 pentamères (5 capsomères) aux sommets de l'icosaèdre et les faces triangulaires de

**Équilibre thermodynamique :** état dynamique stable dans lequel un système physique n'échange plus d'énergie ou de matière avec son environnement.

**Monomère :** sous-unité protéique capable d'interagir avec d'autres monomères pour former un polymère.

**Icosaèdre :** polyèdre à 20 faces triangulaires équilatérales.

**Protomères :** protéines qui s'assemblent via des interactions non covalentes pour former des complexes protéiques symétriques ou asymétriques.

**Pentamères :** un type de capsomère composé de cinq unités protéiques, situées aux sommets de l'icosaèdre

**Hexamères :** un type de capsomère composé de six unités protéiques, recouvrant les faces triangulaires de la capsid*e*.

l'icosaèdre sont recouvertes par des hexamères (6 capsomères), d'après la théorie Caspar et Klug<sup>158,232</sup>. Les capsides à symétrie hélicoïdale sont caractérisées par une forme en bâtonnet, où les capsomères s'assemblent de manière séquentielle autour du génome viral pour former une hélice<sup>158,232</sup>.

Bien que la composition des sous-unités de la capside ait été documentée, la dynamique de l'autoassemblage n'a pas été complètement élucidée. Il a longtemps été difficile de savoir s'il s'agissait d'une étape multiple et séquentielle ou d'un assemblage direct des sous-unités. Des études récentes ont utilisé des pinces optiques et la spectroscopie de force acoustique (AFS) pour déchiffrer la dynamique de l'assemblage<sup>160</sup>. Elles ont montré que les VLPs issues des virus SV40 s'assemblent via un processus en plusieurs étapes autour de leur matériel génétique en structure compacte et stable<sup>160</sup>.

La modélisation mathématique a été utilisée pour proposer un processus en plusieurs étapes pour l'assemblage des VLPs : (1) d'abord, les protomères s'assemblent en capsomères (pentamères et hexamères) ; (2) l'autoassociation débute par un événement de nucléation qui consiste en la formation d'un dimère de capsomères ; (3) l'étape d'élongation débute par l'ajout séquentiel de capsomères au premier dimère<sup>159</sup>. Les interactions entre les résidus d'acides aminés et les capsomères situés dans la structure, ont lieu via des interactions faibles (van der Waals, ioniques et hydrogènes)<sup>158,159</sup>. Enfin, les particules nouvellement assemblées subissent un processus de maturation consistant en la formation de liaisons disulfures pour la stabilisation des VLPs<sup>158,159</sup>.

Ces connaissances permettent notamment d'envisager des stratégies d'encapsulation de médicaments et de concevoir de nouvelles VLPs avec une meilleure efficacité de vectorisation.

### ***Autoassemblage et géométrie de la VLP d'AP205***

Dans le cadre de nos travaux, nous avons utilisé les VLPs dérivées du bactériophage (ou phage) à ARN simple brin (sb) composé d'une enveloppe protéique<sup>153</sup>. Ce phage fait partie des virus de la famille des *Leviviridae*, tels que les phages MS2 et Q $\beta$ , qui affectent les bactéries Gram négatives<sup>153</sup>. Leur génome est constitué d'ARN entouré par une capside assemblée à partir de 178 copies d'une protéine d'enveloppe (CP3) et d'une protéine de maturation responsable de l'adsorption du phage sur les pili bactériens. Les monomères des capsides des phages interagissent en dimères par des interactions hydrophobes et polaires<sup>153</sup>. L'assemblage de leur capside requiert la présence d'acides nucléiques<sup>153</sup>.

***Bactériophage ou phage*** : virus infectant spécifiquement les bactéries.

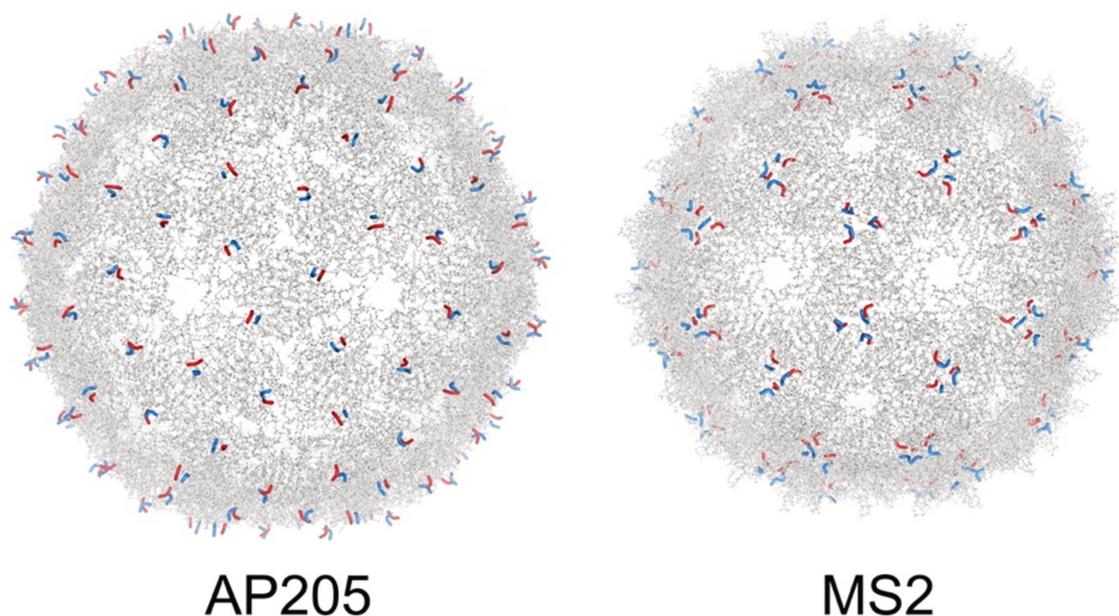
***Pili bactériens*** : structures protéiques filamenteuses à la surface des bactéries.

Les dimères ont une topologie unique chez les phages à ARN<sup>153</sup>. La particule assemblée a une forme qui se rapproche d'un icosaèdre. Elle est composée d'une région d'hélices  $\alpha$  à l'intérieur de la

structure et d'une région de feuillets  $\beta$  à l'extérieur<sup>153</sup>. La VLP d'AP205 est composée de 180 monomères au total pour un diamètre d'environ 30 nm<sup>153</sup>. Lorsque les VLPs d'AP205 s'autoassemblent, les extrémités N- et C- ter de la protéine d'enveloppe CP3 sont exposées uniformément à la surface externe de la capsid, comparées aux particules MS2<sup>153</sup> (**Figure 26**). Cette caractéristique spécifique leur confère une meilleure tolérance aux insertions de séquences peptidiques, sans compromettre l'intégrité de la particule, par rapport aux autres phages à ARN.

De nombreuses recherches ont exploré l'utilisation de ce système modulaire pour afficher des ligands peptidiques ou épitopes de manière régulière et répétitive<sup>154,155</sup>. Ces VLPs ont démontré leur capacité à induire une réponse immunitaire robuste contre le virus du SRAS-CoV-2<sup>155</sup>.

**Épitope :** courte séquence d'acides aminés sur un antigène, reconnue par le paratope d'un anticorps ou par un récepteur de cellule immunitaire.



**Figure 26 :** Structures des particules AP205 et MS2 avec les extrémités N- (bleu) et C- (rouge) terminales exposées à leur surface. (Shishovs et al.<sup>153</sup>)

#### D. Production, purification et formulation des VLPs pour les applications biomédicales

Le développement de VLPs pour les applications biomédicales suit généralement un procédé en quatre étapes : (1) modification génétique ou chimique de la protéine virale, (2) production dans les systèmes d'expression hétérologue, (3) purification et (4) formulation<sup>131,166</sup>. La première étape vise à modifier génétiquement la séquence codant pour la ou les protéine(s) virale(s) ou à apporter des modifications chimiques sur celle(s)-ci avec des caractéristiques spécifiques. La seconde étape permet

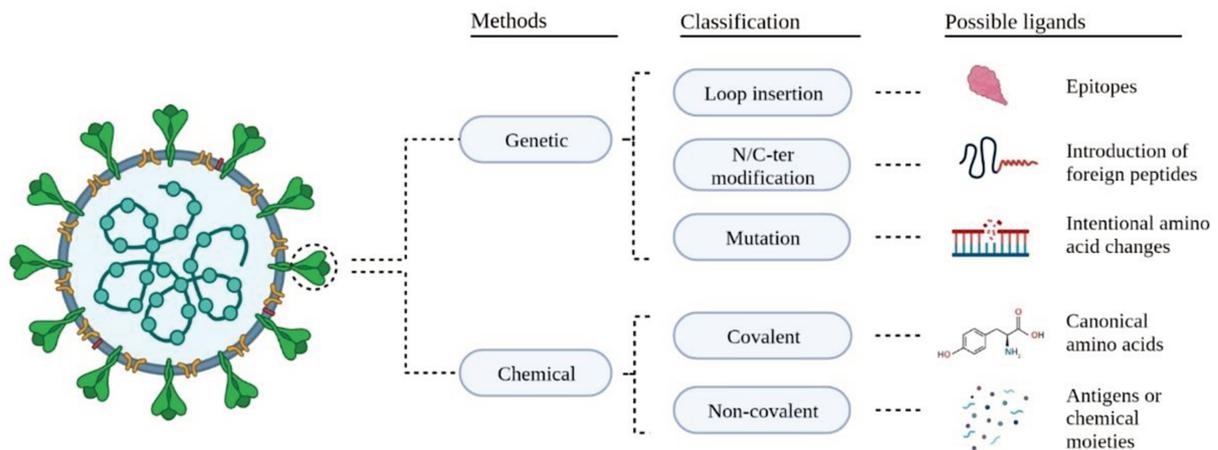
la production de VLPs à grande échelle dans des systèmes d'expression hétérologue. Une fois produites, les VLPs sont purifiées pour éliminer les impuretés et les contaminants provenant de la cellule hôte dans laquelle elles ont été produites. La dernière étape permet de s'assurer de la stabilité et de l'efficacité du produit final. Ces différentes étapes jouent un rôle crucial dans l'efficacité de leur utilisation en tant que vaccins ou vecteurs thérapeutiques, et seront détaillées par la suite.

## 1. Les méthodes de fonctionnalisation des VLPs : génétique ou chimique

La modification génétique ou chimique de la protéine virale pour l'assemblage des VLPs, offre de nombreuses possibilités de constructions dans le développement de vaccins et de thérapies<sup>167</sup>. Les VLPs possèdent trois interfaces disponibles à la modification chimique ou génétique : externe, entre les sous-unités et interne<sup>131</sup>. Cette dernière est utilisée pour encapsuler des molécules d'intérêt thérapeutique, telles que des enzymes, des gènes et des agents d'imagerie<sup>131,168</sup>. La modification de la surface externe des VLPs peut être réalisée avec des approches chimiques (covalentes et/ou non covalentes) et génétiques<sup>131</sup> (**Figure 27**). La Figure 27 illustre les différentes approches utilisées pour fonctionnaliser la surface externe et interne des VLPs, avec quelques exemples de ligands utilisés.

Les modifications chimiques impliquent l'altération post-traductionnelle des protéines virales après leur production<sup>131,167</sup>. Celles-ci incluent les modifications covalentes (cross-linking) où les acides aminés comme l'acide aspartique, la lysine et la cystéine créent des liaisons covalentes avec des ligands peptidiques à la surface des VLPs. Les modifications covalentes permettent d'améliorer l'intégrité et la stabilité des VLPs. Ensuite, dans le cas des modifications non covalentes, des molécules, telles que les fluorophores, les polysaccharides ou les ligands thérapeutiques sont ajoutées par greffage chimique<sup>131</sup>. Puis, on retrouve les glycosylations qui permettent l'ajout de chaînes de sucres aux protéines, ce qui modifie l'immunogénicité et la stabilité des VLPs<sup>131</sup>.

Enfin, la dernière approche utilisée dans la fonctionnalisation de la surface des VLPs est la modification génétique par des techniques de clonage moléculaire<sup>131,167</sup>. Ces modifications peuvent être réalisées en introduisant des séquences d'ADN qui codent pour des épitopes antigéniques, des ligands ou des protéines fluorescentes aux extrémités N- et C-ter<sup>131,167</sup>. Cette méthode permet d'introduire des éléments fonctionnels à la surface des VLPs pour améliorer le ciblage cellulaire et leur polyvalence en tant que plateformes vaccinales<sup>166,167</sup>. Les capsides peuvent également être modifiées par mutagenèse dirigée ou être synthétisées pour améliorer leur stabilité et leur immunogénicité<sup>131,167</sup>.



**Figure 27 : Classification des méthodes de fonctionnalisation de la surface des VLPs.** Les différentes méthodes de modification des protéines et les types de ligands associés, par des modifications génétiques (insertion de boucle, modifications des extrémités N- ou C- terminales et mutations) ou par des modifications chimiques (covalente et non covalente). (Mejía-Méndez et al.<sup>131</sup>)

## 2. Les méthodes de production

Après avoir identifié les gènes codant pour les éléments fonctionnels nécessaires à l'assemblage des VLPs, ceux-ci sont insérés dans des vecteurs d'expression par des techniques de clonage moléculaire<sup>131,167</sup>. Les vecteurs sont ensuite introduits dans des systèmes d'expression hétérologue par transfection chimique, électroporation ou infection virale<sup>167</sup>.

Les systèmes d'expression de VLPs utilisés, comprennent les cellules bactériennes, les levures, les cellules d'insectes et les cellules de mammifères<sup>151,167</sup> (**Figure 28**). Le choix final de la plateforme de production est défini par des facteurs clés, tels que le coût ou la nécessité de modifications post-traductionnelles (PTM).

**Modifications post-traductionnelles :** modifications chimiques qui surviennent après la traduction d'une protéine dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.

### **Bactéries**

Les systèmes bactériens utilisés sont principalement basés sur des souches commerciales d'*Escherichia coli* (*E. coli*). Les bactéries sont utilisées pour produire des VLPs grâce à leur vitesse de croissance élevée et leur culture à faible coût<sup>151,167,169</sup>. Les bactéries sont généralement utilisées pour produire des VLPs non enveloppées avec une ou deux protéines structurales virales. En revanche, ces systèmes ne sont pas toujours les plus adaptés pour produire des VLPs, en raison de problèmes de solubilité des protéines, de l'incapacité à former des ponts disulfures ou à intégrer des PTMs<sup>151,167</sup>. La solubilité limitée des protéines virales recombinantes dans ces systèmes favorise la formation de corps d'inclusion, ce qui compromet le traitement en aval. Dans certains cas, les conditions de cultures

bactériennes sont adaptées pour permettre la production de VLPs solubles<sup>170,171</sup>. La température et la composition du milieu de culture peuvent influencer l'assemblage des VLPs (ex. VLPs issues des densovirus IHHNV<sup>170</sup> et du bactériophage Q $\beta$ <sup>171</sup>).

La production de VLPs dans les bactéries peut être également obtenue par co-expression de deux gènes à partir d'un seul vecteur d'expression<sup>172</sup>. Divers vaccins à base de VLPs produits à l'aide de ce système ont fait l'objet d'essais cliniques contre des maladies infectieuses, tels que le vaccin contre l'hépatite E (Hecolin<sup>®</sup>)<sup>173</sup>. Cependant, lorsque la production de VLPs nécessite des PTMs, les systèmes eucaryotes sont utilisés.

### **Levures**

Différentes espèces de levures ont été utilisées pour produire certaines VLPs, telles que les VLP-HBV chez *Hansenula polymorpha* qui ont conduit à la production de vaccins<sup>151,167,169</sup>. Les cellules de levure, en particulier celles dérivées des souches de *Pichia* et *Hansenula*, sont plus compliquées que les systèmes bactériens<sup>151,167</sup>. En effet, les vecteurs d'expression doivent d'abord être préparés et sélectionnés dans des bactéries avant d'être introduits dans les cellules de levure pour obtenir des levures recombinantes stables avec un transgène intégré au génome<sup>151,167</sup>. Les cellules de levure transformées avec le gène d'expression peuvent atteindre des densités élevées avant que la protéine recombinante ne soit induite<sup>151,167</sup>. Un modèle de levure robuste et rentable pour la production de VLPs enveloppées a été établi par Wetzel et al.<sup>175</sup>.

L'avantage de ce système est la production de VLPs recombinantes avec des PTMs, telles que la glycosylation ou la phosphorylation. Ceci a conduit à la production de vaccins à base de VLPs de l'hépatite B<sup>174</sup>. Les levures représentent également une alternative pour se séparer des endotoxines bactériennes lors du développement de vaccins à base de VLPs. Cependant, dans le cas des VLPs enveloppées, telles que celles dérivées du VIH-2, les cellules de levure (ex. souche *S. cerevisiae*) ne permettent pas la multimérisation de la protéine Gag en VLPs<sup>176</sup>.

Des rendements plus faibles et une non-homogénéité de l'architecture de la VLP finale peuvent survenir en raison de la dégradation par les protéases dans les levures<sup>151,167</sup>. Ces limitations peuvent être évitées avec d'autres systèmes d'expression, tels que les baculovirus et insectes.

### **Insectes et baculovirus**

Lorsque l'expression de plusieurs protéines est requise, les systèmes baculovirus/cellules d'insectes sont choisis en tant que systèmes de production polyvalents<sup>151,167</sup>. Ces systèmes sont largement utilisés pour la production de VLPs en laboratoire ou à l'échelle industrielle. Des baculovirus

recombinants contenant le ou les gènes codant pour les protéines d'intérêt sont utilisés pour infecter des cellules d'insectes préalablement cultivées à la concentration souhaitée<sup>151,167</sup>. Pour obtenir des VLPs qui contiennent plus d'une protéine structurale, les cellules d'insectes sont infectées par plusieurs baculovirus monocistroniques différents (co-infection) ou un seul ARN polycistronique (co-expression)<sup>151,167</sup>. Ces stratégies permettent d'identifier les protéines nécessaires à la formation de VLPs, telles que celles dérivées du virus de l'herpès HSV<sup>177</sup> et du virus de la grippe<sup>178,179</sup>. De plus, ces systèmes peuvent produire des niveaux élevés d'expression combinés à des PTMs de protéines complexes, ce qui peut être crucial pour l'autoassemblage de certaines VLPs dans les applications biomédicales<sup>180</sup>.

En revanche, l'une des principales limites de ces systèmes est la contamination des protéines recombinantes par les baculovirus enveloppés.

### ***Cellules de mammifères***

Les cellules de mammifères sont le système d'expression le mieux adapté pour reproduire la conformation des virus, lorsque des PTMs complexes et des glycosylations sont nécessaires<sup>151,167,169</sup>. Divers modèles cellulaires de mammifères peuvent être utilisés, tels que le myélome murin (Sp2/0, NS0), l'ovaire de hamster chinois (CHO) et les fibroblastes de rein de hamster (BHK-21)<sup>182,183</sup>. L'utilisation de ce système permet la production de VLPs avec une membrane lipidique similaire à celle de l'hôte du virus<sup>184</sup>. Ce système a été largement utilisé pour la production de VLPs en laboratoire ou à grande échelle pour le développement de vaccins. Cela a permis la production de VLPs enveloppées hybrides et complexes avec plusieurs protéines structurales et des glycoprotéines<sup>185</sup>. Hsin et al. ont développé des VLPs dérivées du virus MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome coronavirus) en utilisant les cellules Huh7 comme système d'expression pour comprendre le mécanisme d'infection de ce virus<sup>186</sup>. Dans une autre étude, des VLPs dérivées des virus de l'influenza A et B ont été produites par transfection transitoire dans des lignées cellulaires Vero (cellules épithéliales rénales), 293 T (cellules rénales embryonnaires) ou CHO-K1 (ovaire de hamster chinois), afin d'évaluer leur potentiel immunogène chez la souris<sup>184</sup>.

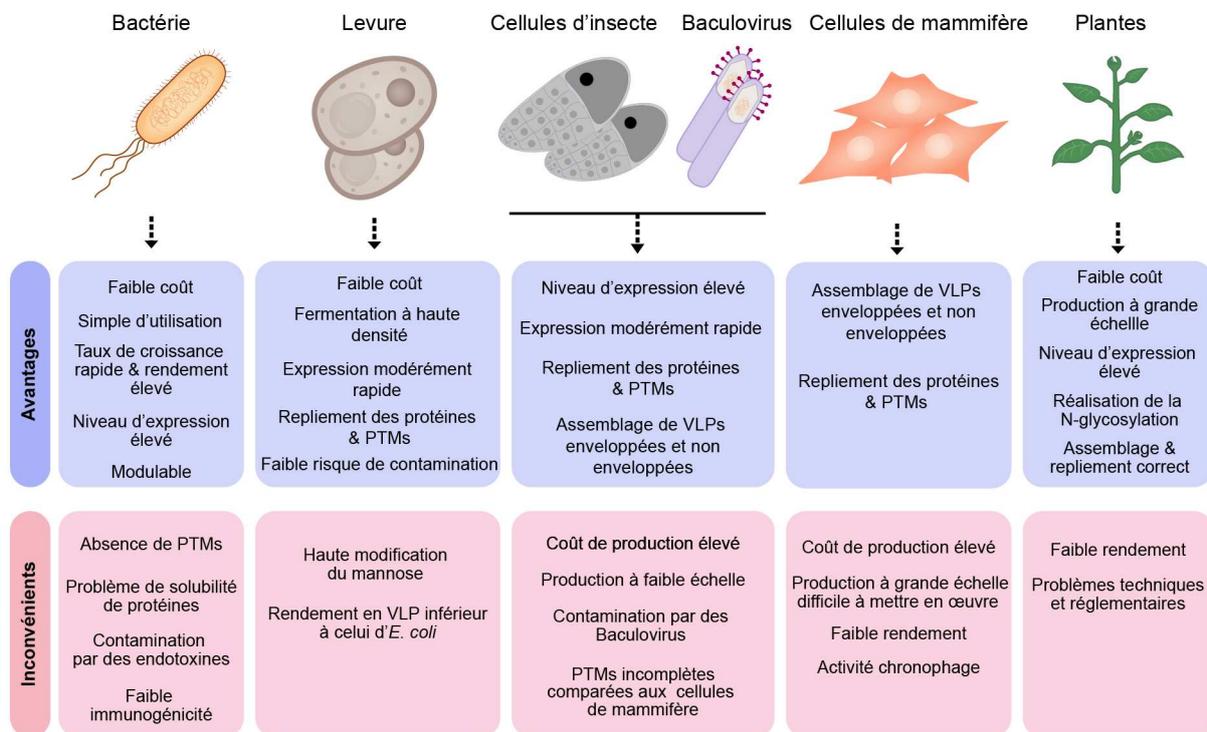
En revanche, les coûts de production élevés et le faible rendement sont les principaux inconvénients de ce système d'expression.

### ***Plantes***

Enfin, les plantes, l'un des systèmes les plus utilisés pour produire des protéines recombinantes ou des médicaments biologiques<sup>187</sup>, présentent plusieurs avantages pour la production de vaccins à base de VLPs. Les plantes peuvent générer des quantités importantes de protéines

recombinantes à grande échelle et à faible coût, sans nécessiter d'installations de fermentation coûteuses<sup>151,167,169</sup>. Elles possèdent également les machines cellulaires nécessaires pour effectuer des PTMs pour le bon repliement et assemblage des protéines<sup>187</sup>.

Contrairement aux systèmes procaryotes, les plantes ont la capacité d'effectuer la N-glycosylation<sup>187</sup>. Elles présentent également un faible risque d'introduction d'agents pathogènes humains<sup>151,167</sup>. Grâce à ces avantages, les plantes ont été utilisées pour produire des vaccins à base de VLPs, telles que celles dérivées du Norovirus humain (NoV)<sup>188</sup>.



**Figure 28 : Les différents systèmes d'expression hétérologue pour la production de VLPs.** Comparaison des plateformes d'expression pour la production de VLPs, en fonction de l'assemblage des VLPs (enveloppées ou non) et de la présence de modifications post-traductionnelles (PTMs). Cette classification montre les avantages et les limites de chaque système pour la production de VLPs selon le type d'assemblage et les PTMs.

### 3. Purification

Une fois produites, les VLPs sont purifiées pour éliminer les impuretés et les contaminants provenant de la cellule hôte dans laquelle elles ont été produites pour les applications en aval<sup>151,167,169</sup>.

Les techniques de purification couramment utilisées sont la chromatographie, l'ultracentrifugation et la filtration. La chromatographie d'affinité permet de capturer les VLPs en fonction de leur affinité pour des ligands spécifiques. Les VLPs peuvent être modifiées génétiquement pour inclure des étiquettes de purification, telles que les étiquettes poly-histidines ou GSK (Glycine-Serine-Lysine)<sup>151,167,169</sup>. Après la purification par affinité, une chromatographie d'exclusion (SEC) ou une dialyse est réalisée pour éliminer les petites molécules et les tampons d'élution. Enfin, l'ultracentrifugation peut être utilisée pour concentrer et purifier les VLPs en fonction de leur densité. Ces différentes techniques peuvent être combinées pour obtenir un produit final pur et de haute qualité nécessaire à la production de vaccins<sup>151,167</sup>.

**Étiquette histidine :** courte séquence d'acides aminés composée généralement de six résidus d'histidine. Celle-ci est souvent ajoutée à l'extrémité N- ou C-terminale d'une protéine d'intérêt pour faciliter sa purification et sa détection.

**Étiquette GSK :** courte séquence d'acides aminés ajoutée à une protéine d'intérêt pour faciliter sa purification et sa détection.

#### 4. Formulation

Enfin, l'étape de formulation, la dernière étape avant l'obtention d'un vaccin à base de VLPs, permet d'assurer la stabilité et l'efficacité du produit final<sup>151,167,169</sup>. Les vaccins à base de VLPs sont généralement formulés avec des adjuvants (ex. sels d'aluminium) pour renforcer la réponse immunitaire, et des stabilisants (ex. acides aminés) pour prolonger leur efficacité et leur durée de vie<sup>167,169</sup>.

#### 5. Les techniques de caractérisation

Les VLPs purifiées sont analysées par des techniques standard utilisées pour évaluer la pureté, la morphologie, la distribution de taille, le potentiel zêta ( $\zeta$ -potentiel) et le poids moléculaire ( $M_w$ )<sup>167</sup>.

Tout d'abord, leur pureté peut être analysée par SDS-PAGE pour vérifier la taille de la protéine de capsid et par électrophorèse sur gel d'agarose pour les complexes protéine-acide nucléique<sup>167</sup>.

L'observation directe des VLPs par microscopie électronique à transmission (TEM) et microscopie électronique à balayage (SEM) permet de vérifier que l'assemblage s'est effectué correctement<sup>151,167</sup>. L'imagerie TEM permet également de confirmer la taille des VLPs produites<sup>151,167</sup>. Dans le cas de l'observation au SEM, la taille, la forme et la composition peuvent être analysées en combinaison avec les observations au TEM. Par exemple, cela a été utilisé pour l'observation des VLPs du SRAS-CoV-2<sup>189</sup>. L'analyse structurale des capsides virales assemblées est cruciale pour identifier les résidus exposés en surface pouvant être modifiés chimiquement sans altérer la structure globale<sup>151,167</sup>.

De plus, le développement de nouvelles générations de microscopes électroniques a permis de déchiffrer la structure de plusieurs particules virales à haute résolution grâce à la Cryo-EM, telles que celle du virus HPV<sup>190</sup>.

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) ou de diffusion quasi-élastique (QELS) permet de mesurer la taille hydrodynamique de macromolécules soumises au mouvement brownien dans une solution<sup>191</sup>. Cette technique est non destructive et permet d'étudier la distribution de la taille des NPs, de détecter les changements conformationnels des acides nucléiques. Pour les VLPs, le DLS s'est révélé être une méthode simple pour analyser leur taille et leur tendance à s'agréger<sup>151,167</sup>. En combinaison avec d'autres approches de caractérisation, telles que la dichroïsme circulaire (CD)<sup>193</sup>, le DLS permet de vérifier la stabilité des VLPs, comme celles dérivées du virus Norwalk (NV), sous différentes températures et conditions de pH<sup>192</sup>.

Le DLS est également utilisé pour déterminer le potentiel zêta ( $\zeta$ ) des VLPs<sup>167</sup>. Le signe du potentiel  $\zeta$  renseigne sur la nature et l'intensité de la charge de surface des particules<sup>191</sup>. Un potentiel  $\zeta$  élevé en valeur absolue (positif ou négatif) indique une forte répulsion électrostatique entre les particules. Cette répulsion s'oppose aux forces d'attraction et tend à empêcher les particules de s'agglomérer. L'agglomération des VLPs peut compromettre leur activité biologique ou rendre difficile leur formulation<sup>167</sup>. Cette valeur peut être modulée par la fonctionnalisation de la surface de la VLP<sup>151,167</sup>.

## E. Applications biotechnologiques

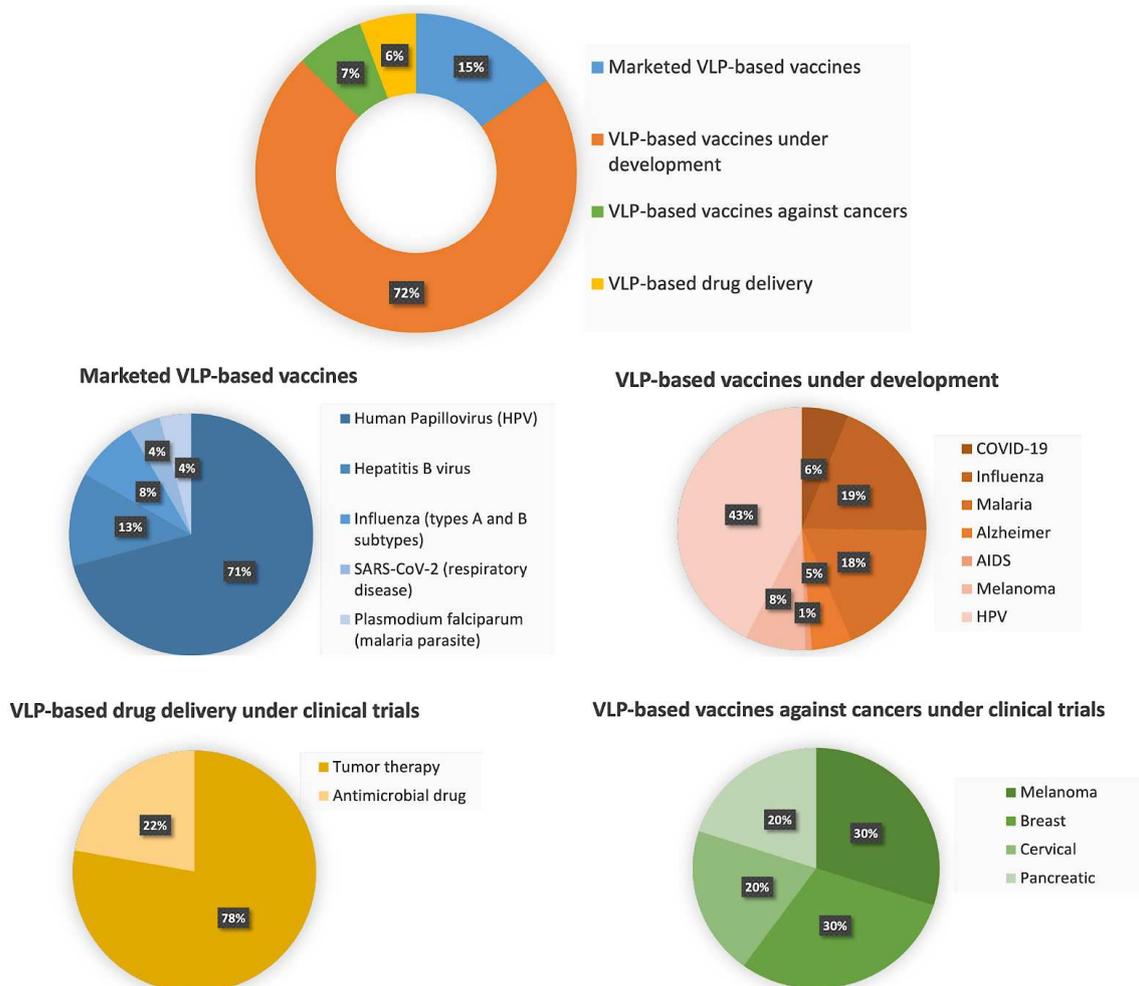
Bien que les vaccins traditionnels à base de virus atténués ou inactivés aient montré leur efficacité, certains présentent des limites en termes d'immunogénicité<sup>134,169</sup>. Les récentes épidémies (ex. COVID-19) ont ainsi accéléré le développement de nouvelles stratégies vaccinales, notamment, les vaccins à ARNm, ADN et vecteurs viraux.

Les VLPs constituent une alternative prometteuse, offrant plusieurs avantages par rapport aux vaccins conventionnels<sup>134,169</sup>. La présentation répétée d'épitopes antigéniques à leur surface renforce leur immunogénicité, ce qui permet d'activer une réponse immunitaire plus robuste<sup>134,169</sup>.

Dans cette partie, nous discuterons des vaccins à base de VLPs approuvés actuellement par les sites officiels du médicament et de la santé : FDA, EMA (European Medicines Agency), WHO (World Health Organisation) et ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicaments). Nous aborderons ensuite les vaccins à base de VLPs en cours d'essai clinique pour les maladies infectieuses et les cancers, ainsi que ceux utilisés pour la délivrance de drogues thérapeutiques.

La plupart des capsides virales utilisées en biotechnologie mesurent entre 20 et 200 nm de diamètre<sup>131,134</sup>. La taille et la géométrie de la capside virale ont une influence sur la taille du médicament à encapsuler ainsi que le nombre de peptides ou d'épitopes à afficher pour l'application biotechnologique<sup>134</sup>. Ces paramètres peuvent influencer, par exemple, la réponse des lymphocytes B et le potentiel immunogène des antigènes présentés à la surface des VLPs<sup>134</sup>.

La Figure 29 illustre les applications actuelles des VLPs, notamment les vaccins anti-infectieux commercialisés et en développement, ainsi que les vaccins anti-cancéreux et les VLPs pour la délivrance de médicaments thérapeutiques en cours de développement. Ces informations ont été recueillies à partir des sites officiels sur les médicaments et la santé, cités précédemment, et représentées sous forme de diagrammes circulaires.



**Figure 29 : Diagrammes circulaires illustrant les différentes applications des VLPs en pourcentage, recueillies à partir des sites officiels de la santé et des médicaments (FDA, EMA, WHO et ANSM).**

### *Vaccins à base de VLPs*

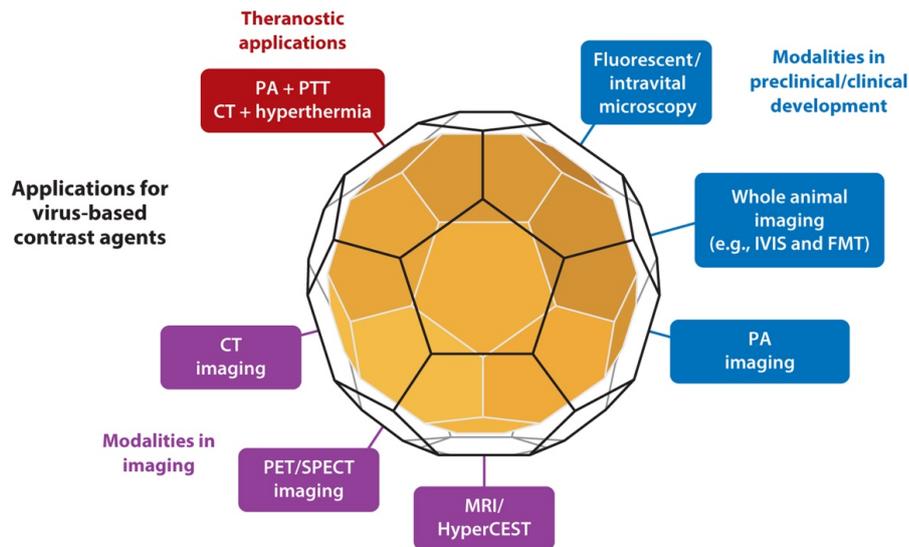
En 1986, le vaccin contre l'hépatite B (RECOMBIVAX HB) devient le premier vaccin humain à base de VLPs autorisé sur le marché par la FDA<sup>194</sup>. Il est formulé à partir d'un autoassemblage de l'antigène HBsAg en particules de 22 nm. D'autres vaccins ont suivi, tels que le Gardasil® en 2006 et le Cervarix® en 2009 contre le papillomavirus humain (HPV)<sup>195</sup>. Ils permettent de protéger contre deux types principaux de virus (HPV 16 et 18) reconnus pour causer près de 70 % des cancers du col de l'utérus<sup>195</sup>. Depuis, de nombreux autres vaccins à base de VLPs ont été mis sur le marché (environ 15%) ou sont en cours d'études cliniques (environ 15%) (**Figure 29**).

Parmi les vaccins à base de VLPs en cours de développement, 43% sont contre le virus HPV, 19% ciblent le virus Influenza, 18% visent la malaria, 8% sont destinés à la maladie d'Alzheimer et 6% sont contre le COVID-19 (**Figure 29**)<sup>134,196,197</sup>.

Les VLPs sont également développées pour présenter des antigènes spécifiques pour cibler des cellules cancéreuses. De nombreux vaccins anti-cancéreux à base de VLPs sont en cours d'essais cliniques. C'est le cas, par exemple, d'un vaccin utilisant les VLPs du virus de la parvovirose canine (CPV) pour cibler les cellules cancéreuses exprimant le récepteur de transferrine (TFR) à leur surface<sup>198</sup>. On dénombre actuellement 30% de vaccins à base de VLPs contre le cancer du sein et 20% contre le cancer pancréatique et le cancer cervical (**Figure 29**)<sup>199,200</sup>.

### *VLPs pour la délivrance de drogues thérapeutiques*

Les VLPs peuvent également être utilisées pour encapsuler des molécules thérapeutiques, telles que les médicaments et les agents de chimiothérapie. Par exemple, les VLPs issues du phage MS2 ont été utilisées pour délivrer des siRNA et des chimiothérapeutiques (doxorubicine, cisplatine) dans le traitement du carcinome hépatocellulaire et du carcinome épidermoïde humain<sup>201</sup>. En plus de leurs applications en thérapie, les VLPs peuvent également être utilisées en imagerie moléculaire<sup>202</sup>. En les couplant à des fluorophores, il est possible de visualiser leur localisation au sein des cellules et des tissus, offrant ainsi un outil pour étudier les processus biologiques<sup>202</sup> (**Figure 30**).



**Figure 30 : VLPs en tant que plateformes de diagnostic et pour les applications théranostiques.** (Shukla et al.<sup>202</sup>)

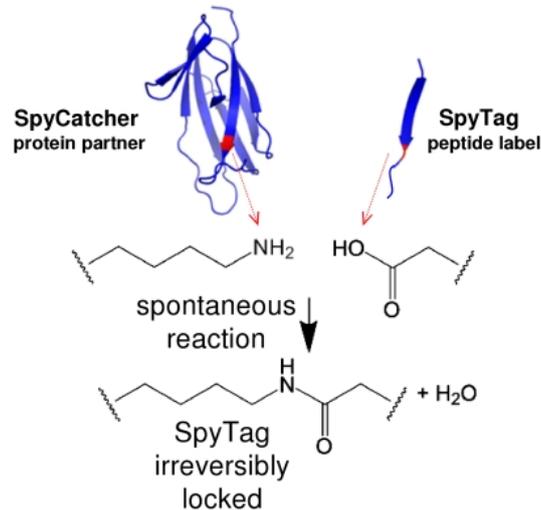
## II. Le couplage SpyCatcher : SpyTag pour la conception de vaccins et d'hydrogel

Zakeri et al. ont développé un nouveau système pour coupler des peptides antigéniques à la surface des VLPs, basé sur l'interaction covalente entre la VLP d'AP205 SpyCatcher et les peptides SpyTag<sup>234</sup>. Ce système permet de concevoir des vaccins à base de VLPs SpyCatcher qui expriment des peptides antigéniques fusionnés à des SpyTag par simple réaction chimique. Cette méthode permet de s'affranchir des modifications génétiques pour produire des VLPs hétéromériques, ce qui pourrait perturber leur autoassemblage dans les systèmes d'expression hétérologue.

### 1. La VLP d'AP205 SpyCatcher en tant que plateforme de vaccination

La VLP d'AP205 peut être utilisée avec le système de couplage SpyCatcher : SpyTag. Ce système est issu du domaine CnaB2 de la protéine de liaison à la fibronectine FbaB extraite de *Streptococcus pyogenes* (**Figure 31**)<sup>234</sup>. Les 13 derniers acides aminés du domaine CnaB2 correspondent au SpyTag (SpyT), contenant un résidu aspartate, et les résidus restants de ce domaine correspondent à SpyCatcher (SpyC), constitué d'un résidu lysine (**Figure 31**)<sup>234</sup>. Les résidus aspartate et lysine réagissent pour former spontanément une liaison covalente isopeptidique rapide, stable (entre 4°C et 17°C) et cytocompatible. Le couplage SpyC : SpyT permet l'élaboration de VLPs dont chaque monomère est fusionné à la protéine SpyC (134 aa) (SpyC- AP205), sans modifier sa capacité à s'autoassembler<sup>203</sup>. De ce fait, elles peuvent être fusionnées à plusieurs peptides différents couplés aux SpyT par interaction isopeptidique, sans ajout de réactifs ou de catalyseurs additionnels. L'équipe initiatrice du système

SpyC : SpyT a également mis au point des variantes, telles que SpyCatcher002 : SpyTag002, qui sont plus stables aux changements de conditions de température, de pH et de tampons<sup>204</sup>.



**Figure 31 : Système SpyCatcher : SpyTag.** Ce système est issu du domaine CnaB2 de la protéine de liaison à la fibronectine extraite de *Streptococcus pyogenes*. Les 13 derniers acides aminés de ce domaine correspondent au SpyTag, avec un résidu aspartate, et les résidus restants correspondent à SpyCatcher constitué d'un résidu lysine. Ces résidus peuvent interagir ensemble pour former spontanément une liaison covalente isopeptidique. (Zakeri et al.<sup>234</sup>)

## 2. Système SpyCatcher : SpyTag pour la conception de vaccins

Ce système a fait ses preuves, par exemple, dans le cas de l'immunisation de souris avec l'antigène peptidique Pfs25 contre le parasite responsable du paludisme<sup>205</sup>. Des travaux ont confronté trois techniques de présentation de ce peptide par AP205 (chimique, génétique et via SpyT)<sup>206,208</sup>. L'utilisation du couple protéine/peptide via SpyT, induit une réponse plus importante et plus qualitative comparée aux deux autres méthodes. Plus récemment, des équipes ont développé des vaccins contre le SARS-CoV-2 grâce à la même technique<sup>207</sup>. Les VLPs d'AP205 SpyCatcher sont des plateformes versatiles qui offrent une solution prometteuse pour le développement de vaccins. Tous ces travaux montrent que les VLPs d'AP205 peuvent être employées comme plateformes modulaires pour la présentation de différents peptides.

## 3. Système SpyCatcher : SpyTag pour la formation d'hydrogels

Le système SpyC : SpyT peut aussi être utilisé en tant que couple de réticulation pour la formation d'hydrogels. Des hydrogels hétéro-polymériques ont été conçus à base d'acide hyaluronique

et d'élastine (ELP) dont la gélification se produit en quelques minutes grâce aux liaisons SpyC : SpyT<sup>209</sup>. L'élastine recombinante utilisée est basée sur une chaîne de polypeptides (VPGXG), connue pour conférer une élasticité et une organisation similaires à celles de l'élastine naturelle<sup>209</sup>. Ce couple SpyC : SpyT a permis de relier des domaines globulaires (GB1 et FNIII) à des protéines élastomères pour former des hydrogels stables encapsulant des fibroblastes<sup>210</sup>. Des cellules souches embryonnaires ont pu être cultivées dans des hydrogels 3D à base d'ELP, dont les polypeptides se polymérisent grâce au système SpyC : SpyT au centre et/ou aux extrémités de l'ELP<sup>211</sup>.

Ce système de couplage lié aux VLPs et à la formation d'hydrogels est très prometteur et offre de vastes perspectives pour des applications dans le domaine de la vaccination et des biomatériaux.

Cependant, malgré les nombreuses applications des VLPs décrites, leur utilisation reste encore très limitée dans le domaine des biomatériaux. Nous avons envisagé une application consistant à mimer les interactions cellules-MEC à l'échelle nanométrique grâce à la structure des VLPs et à les combiner avec les systèmes SpyC : SpyT pour la conception de biomatériaux multifonctionnels.

## Objectif de la thèse

Ce projet vise à développer des VLPs en tant que plateformes de signalisation pour diriger le comportement cellulaire à la surface des matériaux. L'objectif est de concevoir des particules présentant les peptides bioactifs RGD, YIGSR et BMP2, dont leur bioactivité est bien documentée dans la littérature, comme décrit précédemment. Un des principaux intérêts de ce projet est de développer des VLPs hétéromériques co-exprimant les peptides RGD et BMP2, ou RGD et YIGSR, afin d'évaluer leur synergie respective sur la différenciation ostéogénique et myogénique des cellules C2C12.

A ce jour, les VLPs ne sont pas encore exploitées dans le domaine des biomatériaux. L'un des volets principaux de cette thèse est d'utiliser ces VLPs comme plateformes de signalisation pour fonctionnaliser des matériaux et ainsi mimer les interactions cellule-MEC à l'échelle nanométrique. L'utilisation de cette technologie pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pour la conception de biomatériaux fonctionnels.

Les principaux défis résident dans la production reproductible de VLPs fonctionnalisées et le contrôle de la densité et de la stœchiométrie des peptides bioactifs à leur surface. Il est en effet difficile de produire, par des moyens génétiques, des VLPs présentant plus de deux peptides différents ou des protéines entières et complexes à leur surface, telles que la rh-BMP2. Un contrôle optimal de la présentation de différents peptides est essentiel pour induire des réponses cellulaires spécifiques.

Pour surmonter ces limites, nous avons alors exploré la possibilité d'associer de manière covalente des peptides bioactifs à la surface des VLPs grâce au système SpyCatcher : SpyTag, permettant un contrôle de leur stœchiométrie. Ce système pourrait être exploité pour étudier la synergie entre différents peptides dans des fonctions cellulaires spécifiques. Il permettrait également de concevoir des biomatériaux multifonctionnels, notamment pour des applications en régénération tissulaire et en nanomédecine.

## Matériels & Méthodes

### I. Production de plasmides recombinants

#### A. Matériel

##### 1. Micro-organismes

Les souches bactériennes utilisées pour l'amplification de plasmides ou les productions de protéines recombinantes proviennent de l'espèce *Escherichia coli* (*E.coli*). La souche *E.coli* TOP10 (One Shot™ TOP10, Invitrogen) est optimisée pour le clonage moléculaire. Celle-ci permet une réplication stable d'un nombre élevé de copies de plasmides nécessaire à la réalisation de clonages moléculaires. La souche *E.coli* BL21 (One Shot™ BL21 Star™ DE3, Invitrogen) permet une expression élevée de protéines recombinantes, basée sur le promoteur T7, et contient un génotype qui favorise une stabilité élevée de l'ARNm (**Tableau 2**).

| Nom de la souche         | Génotype  |
|--------------------------|---|
| One Shot™ TOP10          | F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ( <i>araleu</i> ) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> |
| One Shot™ BL21 Star™ DE3 | F- <i>ompT HSDS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)  |

**Tableau 2 : Génotype des souches *E. coli*.**

##### 2. Vecteurs

Les vecteurs pET-15b (Addgene ID : GSP 1663) et pETDuet-1 (Addgene ID : GSP 3131) ont été utilisés dans nos travaux pour le clonage et l'amplification de séquences d'ADN d'intérêt. Ces plasmides possèdent un gène de résistance à l'ampicilline (AmpR) (**Figure 32**).

Le plasmide pET-15b utilisé contient un promoteur T7, une région multiple de clonage (MCS), un site de clivage à la thrombine et une séquence codant une étiquette 6-histidines (6-his) en aval du site de clonage.

Le plasmide petDuet-1 est utilisé pour la co-expression de deux gènes d'intérêt. Ce plasmide possède deux MCS (MCS1 et MCS2) et chacune est précédée d'un promoteur T7, d'un opérateur lac et d'un site de liaison au ribosome. Le site MCS1 inclut une étiquette 6-his en aval de ce site de clonage.

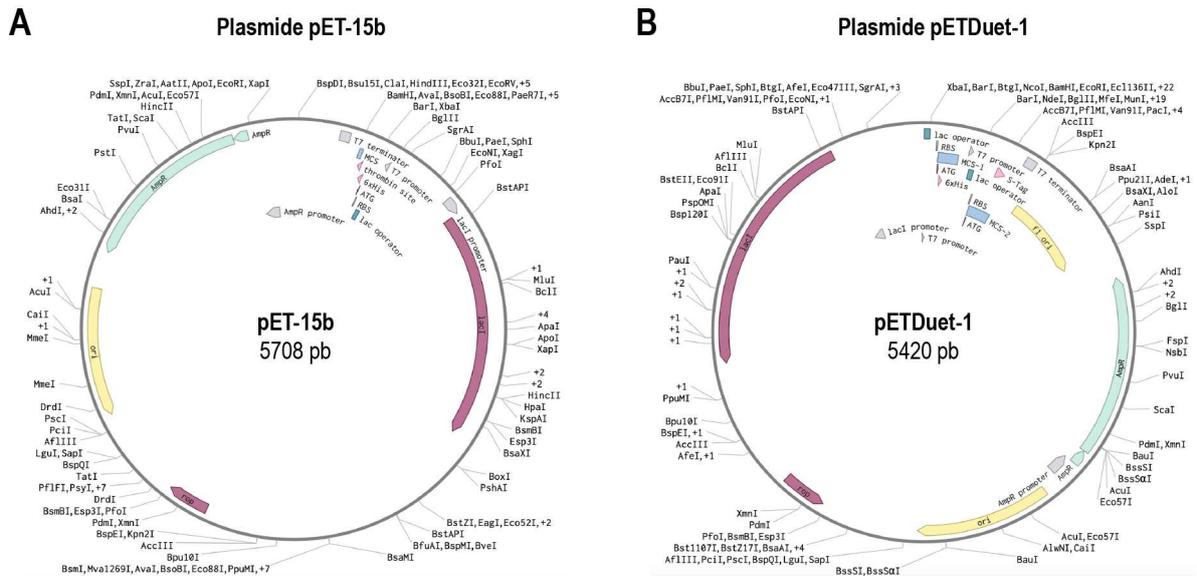


Figure 32 : Vecteurs utilisés pour le clonage moléculaire. (A) Les vecteurs pET-15b permettent un clonage rapide des produits de ligation d'intérêt par PCR. (B) Les vecteurs pETDuet-1 permettent l'insertion de deux gènes d'intérêt par ligation en deux étapes.

### 3. Oligonucléotides utilisés pour le clonage des protéines AP205

#### a) Particules homomériques (pET-15b)

##### Clonage d'AP205-RGD dans pET-15b

| Amorces               |                | Séquence   | Longueur | Tm   | % GC |
|-----------------------|----------------|--|----------|------|------|
| <b>Sens (5')</b>      | NdeI_His-AP205 | GCCGCGCGGCAGCCATATGGCGAACAAACCGATG CAGC                                | 38 bp    | 76°C | 66%  |
| <b>Anti-Sens (3')</b> | RGD-BamH1      | GTTAGCAGCCGGATCCTTATTTCCGGGCTATCGCCG CGGCCCGCTGCCGCGGTGGTATCGCTGCTCA C | 70 bp    | 83°C | 67%  |

##### Clonage d'AP205-YIGSR dans pET-15b

| Amorces               |                | Séquence   | Longueur | Tm   | % GC |
|-----------------------|----------------|--|----------|------|------|
| <b>Sens (5')</b>      | NdeI_His-AP205 | GCCGCGCGGCAGCCATATGGCGAACAAACCGATG CAGC                                | 38 bp    | 76°C | 66%  |
| <b>Anti-Sens (3')</b> | YIGSR-BamH1    | GTTAGCAGCCGGATCCTTACCCGTAACCGCGGCT GCCAATATAGCCGCTGCCGCGGTGGTATCGCTG C | 69 bp    | 81°C | 64%  |

##### Clonage d'AP205-BMP2 dans pET-15b

| Amorces               |                | Séquence  | Longueur | Tm   | % GC |
|-----------------------|----------------|---|----------|------|------|
| <b>Sens (5')</b>      | NdeI_His-AP205 | GCCGCGCGGCAGCCATATGGCGAACAAACCGATG CAGC   | 38 bp    | 76°C | 66%  |
| <b>Anti-Sens (3')</b> | BMP2-BamH1     | GTTAGCAGCCGGATCCTTACAGATACAGGGTGCT AATCGCGGACAATTCGTCGGCACACTGAGGCTT TTGGGATTTTGCCGCTGCCGCGGTGGTATCGCT GCTCAC | 109 bp   | 81°C | 58%  |

**Clonage d'AP205-SpyCatcher dans pET-15b**

| Amorces               |                  | Séquence                                   | Longueur | Tm   | % GC |
|-----------------------|------------------|--|----------|------|------|
| <b>Sens (5')</b>      | NdeI_His-AP205   | GCCGCGCGGCAGCCATATGGCGAACAAACCG<br>ATGCAGC | 38 bp    | 79°C | 66%  |
| <b>Anti-Sens (3')</b> | SpyCatcher-BamH1 | GTAATCGCCGCTGCCCGCGGTGGTATCGCTGC<br>TCAC   | 36 bp    | 78°C | 66%  |

**Tableau 3 : Liste des oligonucléotides utilisés pour le clonage des variants AP205 dans pET-15b par PCR.**

b) Particules hétéromériques (pETDuet-1)

**Clonage d'AP205-RGD dans pETDuet-1**

| Amorces               |                | Séquence  | Longueur | Tm   | % GC |
|-----------------------|----------------|---|----------|------|------|
| <b>Sens (5')</b>      | NdeI_His-AP205 | CATCACCACAGCCAGATGGCGAACAAACCGAT<br>GCAGC                                   | 37 bp    | 71°C | 57%  |
| <b>Anti-Sens (3')</b> | RGD-BamH1      | GCTCGAATTCGGATCTTATTCGGGCTATCGCC<br>GCGGCCGCGCTGCCCGCGGTGGTATCGCTGC<br>TCAC | 69 bp    | 82°C | 65%  |

**Clonage de HA-AP205-BMP2 dans pETDuet-1**

| Amorces               |               | Séquence   | Longueur | Tm   | % GC |
|-----------------------|---------------|--|----------|------|------|
| <b>Sens (5')</b>      | NdeI_HA-AP205 | AGAAGGAGATATACAATGTATCCGTATGATGT<br>GCCGATTATGCGGGCAGCGGCCGAGCGGC<br>ATGGCGAACAAACCGATGC                               | 82 bp    | 79°C | 55%  |
| <b>Anti-Sens (3')</b> | BMP2-EcoRV    | CAAATTGAGATCTGCTTACAGATACAGGGTGCT<br>AATCGCGGACAATTCCGTCCGACACTCGAGG<br>CTTTGGGATTTTGCCGCTGCCCGCGGTGGTAT<br>CGCTGCTCAC | 108 bp   | 80°C | 55%  |

**Clonage de HA-AP205-YIGSR dans pETDuet-1**

| Amorces               |               | Séquence   | Longueur | Tm   | % GC |
|-----------------------|---------------|--|----------|------|------|
| <b>Sens (5')</b>      | NdeI_HA-AP205 | AGAAGGAGATATACATATGTACCCATACGATGT<br>TCCAGATTACGCTGGCAGCGGCCGGAACAAAC<br>CGATGCA | 73 bp    | 75°C | 49%  |
| <b>Anti-Sens (3')</b> | YIGSR-EcoRV   | GCGTGGCCGGCCGATATCCAATTGAGATCTGCT<br>TACCCGTAACCGCGGCTGCCAATATAGCCGCCG<br>CTGCC  | 71 bp    | 80°C | 62%  |

**Tableau 4 : Liste des oligonucléotides utilisés pour le clonage des variants AP205 dans pETDuet-1 par PCR.**

#### 4. Oligonucléotides utilisés pour le clonage des protéines SpyTag-ligands

##### Clonage de SpyT-ELP-RGD dans pET15b

| Amorces               |               | Séquence   | Longueur | Tm   | % GC |
|-----------------------|---------------|--|----------|------|------|
| <b>Sens (5')</b>      | NdeI_SpyTag   | GCCGCGCGGCAGCCATATGGCCCATATTGTCATGG<br>TTGATGC                                   | 42 bp    | 74°C | 59%  |
| <b>Anti-sens (3')</b> | BamHI_RGD-ELP | GTTAGCAGCCGGATCCTCTTATTCGGGCTATCGCC<br>GCGGCCGCCGCTGCCGTCGAGCAGCCCCGCCGGC<br>ACG | 73 bp    | 85°C | 71%  |

##### Clonage de SpyT-ELP-YIGSR dans pET15b

| Amorces               |                 | Séquence   | Longueur | Tm   | % GC |
|-----------------------|-----------------|--|----------|------|------|
| <b>Sens (5')</b>      | NdeI_SpyTag     | GCCGCGCGGCAGCCATATGGCCCATATTGTCATGG<br>TTGATGC   | 42 bp    | 74°C | 59%  |
| <b>Anti-sens (3')</b> | BamHI_YIGSR-ELP | CTTTGTTAGCAGCCGGATCCTCTTATTACCCGTAAC<br>CGCGGCTGCCAATATAGCCGCCGCTGCCGTCGAGC<br>AGCCCGC | 78 bp    | 81°C | 61%  |

##### Clonage de SpyT-ELP-IKVAV dans pET15b

| Amorces               |                 | Séquence  | Longueur | Tm   | % GC |
|-----------------------|-----------------|---|----------|------|------|
| <b>Sens (5')</b>      | NdeI_SpyTag     | GCCGCGCGGCAGCCATATGGCCCATATTGTCATGG<br>TTGATGC                                    | 42 bp    | 74°C | 59%  |
| <b>Anti-sens (3')</b> | BamHI_IKVAV-ELP | CTTTGTTAGCAGCCGGATCCTCTTATAAACCGCCA<br>CTTTAATGCCGCTGCCGTCGAGCAGCCCCGCCGGC<br>ACG | 74 bp    | 80°C | 59%  |

##### Clonage de SpyT-ELP-COL-I dans pET15b

| Amorces               |                | Séquence  | Longueur | Tm   | % GC |
|-----------------------|----------------|---|----------|------|------|
| <b>Sens (5')</b>      | NdeI_SpyTag    | GCCGCGCGGCAGCCATATGGCCCATATTGTCATGG<br>TTGATGC                                    | 42 bp    | 74°C | 59%  |
| <b>Anti-Sens (3')</b> | BamHI_COLI-ELP | CTTTGTTAGCAGCCGGATCCTCttattaGCGTTCGCC<br>GGGCAGGCCCGCGCTGCCGTCGAGCAGCCCCGCC<br>GG | 73 bp    | 83°C | 68%  |

##### Clonage de SpyT-rhBMP2 dans pET15b

| Amorces               |              | Séquence  | Longueur | Tm   | % GC |
|-----------------------|--------------|---|----------|------|------|
| <b>Sens (5')</b>      | NdeI_SpyTag  | GCCGCGCGGCAGCCATATGGCCCATATTGTTATGG<br>TGGATGCGTATAAAGGTGGGGCGGCGGTGGTGG<br>AGGCCAAGCCAAACACAAACAGCGGAAAC | 98 bp    | 78°C | 59%  |
| <b>Anti-Sens (3')</b> | BamHI_rhBMP2 | GTTAGCAGCCGGATCCCTAGCGACACCCACAACCC<br>TCCACAAC   | 43 bp    | 73°C | 60%  |

**Tableau 5 : Liste des oligonucléotides pour le clonage des SpyTag-ligands dans pET-15b par PCR.**

## B. Méthodes

### 1. Clonage moléculaire

#### a) Conception des plasmides recombinants et des amorces

##### ***Particules AP205***

Le logiciel Benchling a été utilisé pour le design des plasmides et la sélection des amorces utilisées pour les réactions de PCR, à l'aide de l'outil « Molecular Biology ».

Le gène AP205 a été synthétisé avec une optimisation de bases pour une expression dans *E.coli*, et a été inséré dans le vecteur pET15b. Le vecteur pET15b contenant la séquence codante pour AP205 a été utilisé comme matrice pour le design des variants AP205. L'optimisation de bases permet d'adapter les codons d'ADN ou d'ARN pour correspondre aux préférences codonales de l'organisme hôte.

Les séquences codantes pour les peptides RGD, YIGSR et BMP2 ont été fusionnées en amont du gène AP205 avec séparation par un polypeptide GSG (Glycine-Serine-Glycine) dans le vecteur pET15b. Le polypeptide GSG est utilisée pour ses propriétés flexibles et pour séparer deux domaines fonctionnels dans une protéine recombinante.

Les variants AP205 co-exprimés dans le vecteur pETDuet-1 ont été modifiés à la fois en N- et en C-terminal. Des séquences codantes l'étiquette HA et le peptide YIGSR ou BMP2 ont été fusionnées respectivement en aval et en amont du gène AP205 au niveau du site MCS2. L'étiquette HA est une courte séquence dérivée de l'hémagglutinine du virus de la grippe, utilisée pour la détection et la purification des protéines recombinantes.

Environ 15 paires de bases des plasmides pET15b et pETDuet ont été ajoutées aux extrémités 5' des amorces sens et 3' des amorces antisens pour permettre la recombinaison directionnelle des inserts d'intérêt. La recombinaison directionnelle repose sur l'utilisation de deux enzymes de restriction différentes pour générer des extrémités cohésives compatibles avec celles du vecteur. Cela permet l'insertion et l'orientation correctes du fragment d'intérêt dans le vecteur.

Les séquences d'acides aminés d'AP205 fusionnés aux peptides d'intérêt sont répertoriées dans le **Tableau 6**. Les séquences ont été optimisées en traduction inverse pour une expression en *E. coli*.

| Variants AP205             | Plasmide d'expression | Séquence d'acides aminés<br><i>Rouge</i> : 6-his, <i>violet</i> : HA, <i>vert</i> : polypeptide GSG  | Poids moléculaire du variant AP205 |
|----------------------------|-----------------------|--|------------------------------------|
| 6-his-AP205                | pET-15b               | MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMANKPMQPITSTANKIV<br>WSDPTRLSTTFASLLRQRVKVGVIAELNNVSGQYVSVYK<br>RPAPKPEGCADACVIMPNNENQSIRTVISGSAENLTLKAE<br>WETHKRNVDTLFASGNAGLGFLDPTAAIVSSDTTA  | 16 172 Da                          |
| 6-his-AP205-<br>RGD        | pET-15b               | MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMANKPMQPITSTANKIV<br>WSDPTRLSTTFASLLRQRVKVGVIAELNNVSGQYVSVYK<br>RPAPKPEGCADACVIMPNNENQSIRTVISGSAENLTLKAE<br>WETHKRNVDTLFASGNAGLGFLDPTAAIVSSDTTAGSG<br>GRGDSPK  | 17 071 Da                          |
| 6-his-AP205-<br>BMP2       | pET-15b               | MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMANKPMQPITSTANKIV<br>WSDPTRLSTTFASLLRQRVKVGVIAELNNVSGQYVSVYK<br>RPAPKPEGCADACVIMPNNENQSIRTVISGSAENLTLKAE<br>WETHKRNVDTLFASGNAGLGFLDPTAAIVSSDTTAGSGK<br>IPKASSVPTLSAISTLYL  | 18 473 Da                          |
| 6-his-AP205-<br>YIGSR      | pET-15b               | MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMANKPMQPITSTANKIV<br>WSDPTRLSTTFASLLRQRVKVGVIAELNNVSGQYVSVYK<br>RPAPKPEGCADACVIMPNNENQSIRTVISGSAENLTLKAE<br>WETHKRNVDTLFASGNAGLGFLDPTAAIVSSDTTAGSG<br>GYIGSRGYG  | 16 960 Da                          |
| 6-his-AP205-<br>RGD        | pETDuet-1             | MGSSHHHHHHSQMANKPMQPITSTANKIVWSDPTRL<br>STTFASLLRQRVKVGVIAELNNVSGQYVSVYKRPAPKPEG<br>CADACVIMPNNENQSIRTVISGSAENLTLKAEWETHKRN<br>VDTLFASGNAGLGFLDPTAAIVSSDTTAGSGGRGDSPK  | 16 308 Da                          |
| HA-AP205-<br>BMP2          | pETDuet-1             | MYPYDVPDYAGSGANKPMQPITSTANKIVWSDPTRLST<br>TFASLLRQRVKVGVIAELNNVSGQYVSVYKRPAPKPEGC<br>ADACVIMPNNENQSIRTVISGSAENLTLKAEWETHKRN<br>DTLFASGNAGLGFLDPTAAIVSSDTTAGSGKIPKASSVPT<br>ELSAISTLYL  | 17 596 Da                          |
| HA-AP205-<br>YIGSR         | pETDuet-1             | MYPYDVPDYAGSGANKPMQPITSTANKIVWSDPTRLST<br>TFASLLRQRVKVGVIAELNNVSGQYVSVYKRPAPKPEGC<br>ADACVIMPNNENQSIRTVISGSAENLTLKAEWETHKRN<br>DTLFASGNAGLGFLDPTAAIVSSDTTAGSGGYIGSRGYG   | 16 406 Da                          |
| 6-his-AP205-<br>SpyCatcher | pET-15b               | MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMANKPMQPITSTANKIV<br>WSDPTRLSTTFASLLRQRVKVGVIAELNNVSGQYVSVYK<br>RPAPKPEGCADACVIMPNNENQSIRTVISGSAENLTLKAE<br>WETHKRNVDTLFASGNAGLGFLDPTAAIVSSDTTAGSG<br>DYDIPTTENLYFQGAMVTTLSGLSGEQGPSGDMTTEED<br>SATHIKFSKRDEDGRELAGATMELRDCSGKTISTWISDG<br>HVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATPIEFTVNEDGQ<br>VTVDGEATEGDAHTGSSGS | 30 732 Da                          |

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des séquences d'acides aminés des variants AP205.

| Peptide    | Séquence d'acides aminés | Description   |
|------------|--------------------------|---|
| RGD        | GRGDSPK                  | Dérivé du site RGD de la fibronectine               |
| YIGSR      | GYIGSRGYG                | Dérivé de la courte chaîne $\beta_1$ de la laminine |
| BMP2       | KIPKASSVPTELSAISTLYL     | Dérivé de l'épitope de la rh-BMP2 (résidus 73 à 92) |
| 6x His-tag | HHHHHH                   | Étiquette de purification                           |
| HA-tag     | YPYDVPDYA                | Dérivé de l'hémagglutine de la grippe humaine       |

**Tableau 7 : Description des peptides exprimés à la surface des VLPs.**

### Protéines SpyTag-ligands

Les plasmides contenant les gènes codant pour les protéines SpyTag-ELP-ligand et les amorces spécifiques ont été établis à partir de la matrice pQE80L-SpyTag-ELP-SpyTag (Addgene, référence : 112634). Une courte séquence d'ADN d'environ 15 paires de bases de pET15b a été ajoutée à chaque extrémité en 5' pour l'amorce sens et 3' pour l'amorce antisens pour rendre possible la recombinaison directionnelle dans le plasmide. Les séquences d'acides aminés des SpyTag fusionnés aux peptides d'intérêt en C-terminal, sont répertoriées dans le tableau ci-dessous. Les séquences ont été optimisées en traduction inverse pour une expression en *E. coli*.

| SpyT-ligands              | Séquence d'acides aminés  | Poids moléculaire | Description du peptide                               |
|---------------------------|---|-------------------|--|
| SpyT-ELP-<br><b>RGD</b>   | MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAHIVMVDAYKPTKLDGH(GVGVP) <sub>3</sub><br>GEGVP(GVGVP) <sub>4</sub> GEGVP(GVGVP) <sub>4</sub> GEGVPGVGVPVGVGELYAVTGRG<br>RAPACSAPIATSVP(GVGVP) <sub>2</sub> GEGVP(GVGVP) <sub>4</sub> GEGVP(GVGVP) <sub>4</sub><br>GEGVP(GVGVP) <sub>2</sub> GLLDGS <b>GGRGDSPK</b>   | 20 491 Da         | Dérivé du site RGD de la fibronectine                |
| SpyT-ELP-<br><b>YIGSR</b> | MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAHIVMVDAYKPTKLDGH(GVGVP) <sub>3</sub><br>GEGVP(GVGVP) <sub>4</sub> GEGVP(GVGVP) <sub>4</sub> GEGVPGVGVPVGVGELYAVTGRG<br>RAPACSAPIATSVP(GVGVP) <sub>2</sub> GEGVP(GVGVP) <sub>4</sub> GEGVP(GVGVP) <sub>4</sub><br>GEGVP(GVGVP) <sub>2</sub> GLLDGS <b>GGYIGSRGYG</b> | 20 704 Da         | Dérivé de la courte chaîne $\beta_1$ de la laminine  |
| SpyT-ELP-<br><b>IKVAV</b> | MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAHIVMVDAYKPTKLDGH(GVGVP) <sub>3</sub><br>GEGVP(GVGVP) <sub>4</sub> GEGVP(GVGVP) <sub>4</sub> GEGVPGVGVPVGVGELYAVTGRG<br>RAPACSAPIATSVP(GVGVP) <sub>2</sub> GEGVP(GVGVP) <sub>4</sub> GEGVP(GVGVP) <sub>4</sub><br>GEGVP(GVGVP) <sub>2</sub> GLLDGS <b>GSIKAVV</b>    | 20 304 Da         | Dérivé de la longue chaîne $\alpha_1$ de la laminine |
| SpyT-ELP-<br><b>COL-I</b> | MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAHIVMVDAYKPTKLDGH(GVGVP) <sub>3</sub><br>GEGVP(GVGVP) <sub>4</sub> GEGVP(GVGVP) <sub>4</sub> GEGVPGVGVPVGVGELYAVTGRG<br>RAPACSAPIATSVP(GVGVP) <sub>2</sub> GEGVP(GVGVP) <sub>4</sub> GEGVP(GVGVP) <sub>4</sub><br>GEGVP(GVGVP) <sub>2</sub> GLLDGS <b>GGLPGER</b>    | 20 403 Da         | Dérivé du collagène I                                |
| SpyT-<br><b>rhBMP2</b>    | MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAHIVMVDAYKGGGGGGGG <b>QAKH</b><br>KQRKRLKSSCKRHPLYVDFSDVGVNDWVAPPVGYHAFYCHGECFPFL<br>ADHLNSTNHAIVQTLVNSVNSKIPKACCVPTELSAISMLYLDENEKVVL<br>KNYQDMVVEGCGCR   | 16 784 Da         | Dérivé de la rh-BMP2                                 |

**Tableau 8 : Tableau récapitulatif des séquences d'acides aminés des SpyT-ligands.**

#### b) Amplification des gènes d'intérêt par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Pour amplifier les gènes d'intérêt à partir de la matrice et des amorces décrites précédemment, un volume final de 50  $\mu\text{L}$  a été préparé dans de l'eau RNase free, contenant 1x final d'ADN polymérase (CloneAmp HiFi PCR Premix, Takara), 0,3  $\mu\text{M}$  final d'amorces sens et antisens et 200 ng de matrice plasmidique. Les mélanges réactionnels ont été incubés dans un thermocycleur T3000 (Biometra T3000 Thermocycler, Labrepc) selon les indications du protocole d'utilisation de l'enzyme et la température d'hybridation des amorces au gène d'intérêt. Le programme comprend 10 secs de dénaturation de l'ADN à 98°C, ce qui permet d'activer l'ADN polymérase, suivi de 35 cycles comprenant 10 secs de dénaturation à 98°C et 15 secs d'hybridation.

#### c) Digestion des plasmides avec les enzymes de restriction (linéarisation des plasmides)

Pour la linéarisation des plasmides, nous avons utilisé des enzymes de restriction qui génèrent des fragments avec des extrémités cohésives sortantes (NdeI, BamHI et EcoRV). Les enzymes de restriction permettent de couper des fragments d'ADN au niveau d'une séquence de nucléotides spécifique, appelée site de restriction.

Le plasmide pET15b a été digéré par NdeI et BamHI avec le kit Fast Digestion of DNA (ThermoFisher Scientific). Ces deux sites de restriction bordent le gène AP205 et SpyTag-ELP-ligand inclus dans pET15b (**Figure 32**).

Le plasmide pETDuet-1 possède un seul site NdeI et un seul site EcoRV sur le second promoteur. Ces enzymes ont permis le clonage des gènes d'intérêt codant pour les variants AP205.

Les digestions ont été réalisées dans un volume final de 20  $\mu\text{l}$  contenant 1  $\mu\text{g}$  de plasmide, 1  $\mu\text{l}$  de chaque enzyme FastDigest, 2  $\mu\text{l}$  de 10X FastDigest Buffer (Thermo Scientific) et 13,5  $\mu\text{l}$  d'eau RNase free. Le mélange a été incubé à 37°C (température optimale d'activité des enzymes) pendant 10 min sur un bloc chauffant.

#### d) Électrophorèse sur gel d'agarose et extraction d'ADN

Un gel d'agarose (1,2%, TopVision Agarose Tablets, Thermo Scientific) a été réalisé pour vérifier la bonne digestion des plasmides et la bonne amplification des gènes d'intérêt. Pour permettre la visualisation des gènes sous rayons ultraviolets (UV), 5  $\mu\text{l}$  d'intercalant d'ADN (SYBR Safe DNA gel stain, Invitrogen) a été ajouté à la solution d'agarose avant d'y être coulée dans un moule. Les échantillons contenant les plasmides linéarisés et les gènes d'intérêt amplifiés ont été homogénéisés avec 25% de tampon de charge (Gel Loading Buffer Tracklit, Invitrogen) avant d'être déposés dans les puits. Le marqueur de taille TrackIt™ 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) a été déposé dans une piste du gel.

La migration des échantillons a été réalisée à 100 volts pendant 1h dans un tampon TAE 1X. Le gel est ensuite visualisé avec une révélation sous UV (ChemiDoc™ Touch, Bio-rad). Les bandes attendues correspondant aux amplicons d'intérêt et au plasmide digéré ont été découpées à l'aide d'un scalpel stérile.

Les fragments d'ADN récupérés du gel ont été extraits et purifiés à l'aide du kit Gel Extraction QIAquick (QIAGEN), d'après les recommandations du fabricant.

#### e) Ligation des gènes d'intérêt dans un plasmide

Le plasmide linéarisé et le fragment d'ADN d'intérêt sont mélangés avec un ratio moléculaire de 2 inserts pour 1 vecteur, en vue d'une ligation enzymatique (plasmide recombinant). La recombinaison repose sur les 15 pb complémentaires au plasmide ajouté de part et d'autre du fragment. Ceux-ci permettent de joindre précisément le gène d'intérêt au plasmide.

La réaction a lieu dans un volume final de 10 µl contenant 2 µl de 5X In-Fusion snap HD Enzyme Premix, 100 ng de plasmide linéarisé, 15 ng de fragments d'ADN (ratio 1 : 2) et de l'eau RNase free pour compléter, à l'aide du kit InFusion HD Cloning (Takara Bio). Le mélange est ensuite incubé pendant 15 min à 50°C sur un bloc chauffant, puis déposé sur glace.

#### f) Transformation des bactéries compétentes et sélection des clones

Les bactéries chimio-compétentes One Shot *E. coli* TOP10 commerciales ont été transformées avec les produits de recombinaison obtenus précédemment. Ces bactéries sont chimio-compétentes et sont donc capables d'intégrer les plasmides en réponse à un choc thermique, tout comme les bactéries *E. coli* BL21 utilisées pour la production de protéines (*cf. voir page 93*).

Les bactéries sont d'abord décongelées sur glace au moins 15 min avant leur utilisation. 2,5 µl de produits de recombinaison sont ajoutés à 50 µl de bactéries TOP10. Le mélange est incubé 30 min sur glace pour laisser le temps au plasmide d'adhérer à la membrane des bactéries. Cette étape a notamment lieu grâce à la présence de cations Ca<sup>2+</sup> dans le milieu, qui neutralisent la charge négative de l'ADN et favorisent le rapprochement avec la membrane bactérienne, également chargée négativement. Après incubation, un choc thermique est réalisé à 42°C pendant 45 secs, ce qui permet d'ouvrir les pores pour l'introduction des plasmides dans les bactéries. L'échantillon est immédiatement placé sur glace pendant 2 min. Ensuite, 500 µl de milieu LB (Lysogeny broth, Thermo Fischer Scientific) ou SOC (Super optimal medium, Thermo Fisher Scientific) préalablement préchauffé, est ajouté aux bactéries pour leur régénération pendant 1h à 37°C. Les bactéries sontensemencées sur gélose, composée de Lysogeny Broth (LB) et d'agar supplémenté avec 100 µg/mL d'ampicilline, puis incubées pendant une nuit à 37°C. L'antibiotique permet de sélectionner les colonies (clones) qui ont intégré un plasmide et qui possèdent donc une résistance à l'ampicilline.

A partir de la gélose, 5 à 10 colonies isolées sont sélectionnées. Chaque colonie est incubée dans 3 ml de milieu de culture LB (10g de peptone 140, 5g de levure et 10g de chlorure de sodium par litre) supplémenté avec 100 µg/mL d'ampicilline pendant une nuit à 37°C sous agitation.

#### g) Extraction et purification des plasmides recombinants

Après la culture des colonies bactériennes, les bactéries sont lysées pour extraire les plasmides à l'aide du kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific), selon le protocole du fabricant. La concentration des plasmides purifiés a été dosée au Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

## 2. Analyse des plasmides recombinants

### a) Sélection et criblage des clones d'intérêt par PCR

Une vérification de la transformation sur les clones bactériens purifiés, a été réalisée par PCR, en utilisant une amorce sens spécifique au plasmide en amont de l'insert (T7 promoteur) et une amorce antisens spécifique au gène d'intérêt (oligonucléotide utilisé pour le clonage). La préparation des mix PCR a été réalisée dans un volume final de 25 µl contenant 5 µl de tampon de réaction (5X MyTaq Reaction Buffer, Bioline™), 0,5 µl de chaque amorce à 20 µM et 0,5 µl d'ADN polymérase (MyTaq DNA Polymerase). Le mélange réactionnel a été incubé dans un thermocycleur programmé à 35 cycles, dont un cycle comprend : 15 secs de dénaturation à 95°C, 15 secs d'hybridation des amorces à 50°C et 10 secs d'élongation de l'ADN à 72°C.

Les produits de PCR ont été ensuite déposés sur gel d'agarose à 1,2% et migrés pendant 1h à 100 volts, pour vérifier et sélectionner les clones qui possèdent un seul amplicon correspondant à la taille de celui de l'insert d'intérêt amplifié (contrôle positif).

### b) Séquençage

Les clones positifs ayant intégré le gène d'intérêt et qui ont été préalablement purifiés par Miniprep, ont été sélectionnés pour la réalisation du séquençage. Les échantillons sélectionnés ont été envoyés à Eurofins Genomics EU Sequencing (Allemagne) pour le séquençage des inserts plasmidiques à l'aide de la méthode Sanger, afin de valider la séquence insérée dans le plasmide. Le séquençage est réalisé en utilisant l'amorce T7 promoteur en amont du gène d'intérêt en 5' et l'amorce T7 terminal en aval du gène d'intérêt en 3'.

Les résultats de séquençage obtenus ont été analysés avec le programme d'alignement de séquence MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) sur [Benchmarking](#).

## II. Production et purification des protéines recombinantes

### 1. Expression des protéines recombinantes AP205 VLPs et SpyTag-ligands

La souche BL21 a été transformée avec les plasmides obtenus précédemment. Cette souche permet l'expression des protéines recombinantes.

Une colonie correspondant à chaque construction a été cultivée dans 1 ou 2 litres de milieu de culture LB supplémenté à 100 µg/mL d'ampicilline à 37°C, sous agitation (160 rpm) jusqu'à une  $DO_{600nm}$  de 0,6-0,8. L'expression des protéines a été induite avec 1 mM d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, Sigma™). L'IPTG est un analogue non métabolisable du lactose, qui induit l'expression de gènes sous le contrôle de promoteurs lac opéron. Les cultures ont été incubées pendant 4-5 h à 37°C, sous agitation à 160 rpm. Après induction, les bactéries ont été récoltées par centrifugation à 4 000 rpm pendant 20 min (rotor JA10.5, Beckman Coulter) et ont été congelées à -20°C.

### 2. Purification

#### a) Purification des AP205 VLPs

Les culots bactériens ont été mis en suspension dans un tampon de lyse contenant 50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl et 10 mM imidazole (pH 8) avec 1 mg/mL de lysozyme pendant 30 min sur glace. Les bactéries ont été lysées par sonication pendant 5 min à 125 watts (sonicateur Q500, Fisherbrand™). Le lysat bactérien a été incubé avec 5 µg/mL de DNase (Sigma™) et 10 µg/mL de RNase (Sigma™) pendant 15 min puis centrifugé pendant 25 min à 10k RCF à 4°C (rotor JA20, Beckam Coulter). Le surnageant contenant les protéines recombinantes a été filtré avec un filtre stérile de 0,45 µm (Whatman Puradisc).

Pour les cultures d'un litre, les particules ont été purifiées par affinité sur une résine d'agarose Ni-NTA. Le surnageant a été incubé avec les billes d'agarose (25 µl de billes d'agarose par 250 µg de protéines his-taguées) pendant 1h à 4°C sous agitation. La suspension a été ensuite centrifugée à 500 g pendant 5 min pour sédimenter les billes attachées aux protéines his-taguées. Les billes d'agarose sont ensuite rincées deux fois avec un tampon de lavage contenant 50 mM de  $NaH_2PO_4$ , 300 mM de NaCl, 20 mM d'imidazole à pH 8, puis centrifugé à 500 g pendant 5 min pour éliminer le surnageant contenant les protéines non spécifiques. Les protéines d'intérêt sont éluées par compétition avec de l'imidazole (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 500 mM imidazole à 99% de pureté, pH 8). Cette technique est basée sur une interaction entre les ions métalliques de nickel ( $Ni^{2+}$ ) immobilisés sur le support de la résine d'agarose et les groupements histidines (donneur d'électron), par une liaison covalente via l'agent chélateur acide iminoacétique (IDA). La solution d'éluion contenant une forte concentration

d'imidazole, permet de remplacer les protéines his-taguées sur les sites de liaison avec les métaux par l'imidazole.

Pour les cultures de 2 litres, les particules AP205 ont été purifiées par chromatographie d'affinité (NGC, Bio-rad) en utilisant une colonne d'affinité IMAC Ni-NTA (EconoFit Profinity IMAC 5 ml, Bio-rad) basée sur le même principe expliqué précédemment. La colonne a été équilibrée dans un premier temps avec un tampon de lyse (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) avec un débit de 2 ml/min, selon les recommandations du fournisseur. Le surnageant préalablement filtré avec un filtre 0,45 µm, a été appliqué à la colonne avec un débit de 2 ml/min, puis une étape de lavage de la colonne a été effectuée avec un tampon de lavage (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0). Les protéines d'intérêt ont été ensuite éluées avec un tampon d'éluion contenant une forte concentration d'imidazole (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 1 M imidazole, pH 8.0). Cette technique d'éluion par compétition est souvent utilisée pour éluer une protéine d'intérêt étiquetée 6-his sans modifier les conditions physicochimiques du milieu.

Les fractions éluées ont été dialysées en utilisant une membrane avec un cut-off de 3,5 kDa (G2 Slide-A-Lyzer™, Thermo Scientific™) dans du PBS 1X, afin d'éliminer l'imidazole. Les échantillons de protéines purifiées ont été congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C pour des analyses ultérieures.

#### b) Purification des SpyTag-ligands

Après la lyse bactérienne et la purification des SpyTag-ligands avec les billes d'agarose (*cf. voir le protocole de purification des AP205 VLPs page 89*), les protéines ont été éluées avec un tampon d'éluion contenant 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole à pH 8.

#### c) Purification des SpyT-rhBMP2 à partir des corps d'exclusion

##### - Isolation des corps d'inclusion

Après induction et centrifugation, le culot bactérien a été suspendu dans un tampon contenant 20 mM de Tris-HCl (pH 8), 0,5 mM d'EDTA et 0,1 % de Triton X-100. Les bactéries ont ensuite été lysées par sonication 3 fois pendant 15 sec avec 30 sec d'intervalle à 125 watts (sonicateur Q500, Fisherbrand™). Après centrifugation à 1 000 rpm, le culot contenant les corps d'inclusion a été incubé dans un tampon de dénaturation contenant 20 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM de NaCl, 6 M d'urée et 5 mM de DTT à 4°C overnight sous agitation. Cette étape permet la dénaturation des corps d'inclusion contenant les SpyTag-rhBMP2. La solution est ensuite centrifugée à 15 000 rpm à 4°C pour récupérer le surnageant contenant les protéines solubles dénaturées.

#### - **Purification des SpyT-rhBMP2 en condition dénaturante**

Les protéines SpyTag-rhBMP2 ont été purifiées en utilisant les billes d'agarose Ni-NTA. Le surnageant a été incubé avec les billes d'agarose Ni-NTA (25 µl de billes d'agarose par 250 µg de protéines his-taguées) pendant 1h à 4°C sous agitation. Les SpyTag-rhBMP2 ont été élués avec un tampon d'éluion contenant 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM d'imidazole, 6 M d'urée et 5 mM DTT à pH 7,5.

#### - **Renaturation des SpyT-rhBMP2**

100 µl de l'éluion des SpyT-rhBMP2 a été ajouté à 2 900 µl de tampon de renaturation contenant 55mM Tris, pH 8.2, 10.56 mM NaCl, 0.44 mM KCl, 550 mM de Guanidine HCl, 2.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 550 mM L-Arginine et 1mM DTT. Le DTT empêche la formation de ponts disulfure incorrects entre les cystéines des protéines, maintenant leur structure. La L-Arginine agit en interférant avec les interactions non spécifiques entre les protéines, empêchant leur agrégation.

La solution a été incubée à 4°C overnight sous agitation. La solution a été ensuite dialysée avec une cassette G2 Slide-A-Lyzer™ de 3,5 kDa MWCO (Thermo Scientific™) dans du PBS 1X, afin de retirer les agents réducteurs. La concentration des protéines purifiées a été dosée par MicroBCA selon les recommandations du fabricant.

Des aliquots de chaque étape de purification ont été prélevés pour l'analyse par SDS-PAGE.

### III. Analyse des productions de protéines recombinantes

#### 1. Analyse des protéines recombinantes par SDS-PAGE

Le SDS-PAGE a été utilisé pour séparer les protéines en fonction de la masse moléculaire de leur chaîne polypeptidique. Cette technique nous a permis de déterminer la taille des protéines et d'analyser leur pureté.

20 µl de chaque échantillon de protéine a été diluée avec du tampon Laemmli (6% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycérol, 10% (w/v) Bêta-Mercaptoethanol, 0,004% (w/v) bleu de bromophénol à pH 6.8, 125 mM Tris-HCl) et ensuite incubés à 95°C pendant 10 min. Le SDS est un détergent anionique qui permet la dénaturation des protéines et le Bêta-Mercaptoéthanol permet la réduction des ponts disulfure.

Les échantillons ont été déposés sur un gel Mini-protean TGX Stain-Free Precast (Bio-Rad) et ont été séparés par électrophorèse. Le SDS-PAGE a été réalisé à 150 volts pendant 50 min. Les gels Stain-Free utilisés contiennent des composés fluorescents (trihalo) qui réagissent avec les tryptophanes des protéines et permettent de visualiser ces derniers par imagerie avec le système ChemiDoc™ (Bio-Rad).

Pour les gels de Coomassie, les échantillons de protéines ont été déposés sur des gels commerciaux Mini-PROTEAN® TGX™ Precast (Bio-Rad) puis colorés avec la solution de coloration de

Coomassie Bio-Safe (Bio-Rad) conformément aux recommandations du fabricant. Le colorant Coomassie se lie aux résidus basiques et aromatiques des protéines, et permet ainsi de détecter les protéines dépourvues de résidu tryptophane.

## 2. Analyse des particules par chromatographie d'exclusion stérique

Les fractions éluées ont été purifiées par chromatographie d'exclusion stérique, en utilisant une colonne de 24 ml contenant une résine Sephacryl® 200-HR (Sigma™). La résine est constituée d'une matrice poreuse de particules sphériques (billes) permettant la séparation de molécules selon leur volume hydrodynamique. Les molécules dont la taille excède celle des pores de la résine sont exclues de la matrice (volume mort de la colonne). Les molécules de taille intermédiaire et inférieure pénètrent dans les pores, et sont éluées séquentiellement selon un gradient de taille décroissante.

La colonne utilisée a un seuil de séparation entre 5 et 250 kDa. Toutes les molécules supérieures à 250 kDa sont exclues de la colonne et sont éluées dans les premières fractions. 500 µl d'échantillon ont été injectés à la colonne préalablement équilibrée avec un tampon PBS 1X (1 ml/min), selon les recommandations du fournisseur. Les protéines ont été éluées avec du PBS 1X à 1 ml/min. Pour comparer les pics d'exclusion des protéines d'intérêt, une gamme étalon de protéines de poids moléculaires connus a été appliquée à la colonne d'exclusion en suivant les mêmes étapes décrites précédemment. La gamme étalon contient 1 mg/ml de bleu de dextran (2 MDa), 1 mg/ml d'albumine (44 kDa) et 1 mg/ml de myoglobine (17 kDa) dilués dans du PBS 1X.

## 3. Quantification des protéines par micro-BCA

Le kit MicroBCA (Thermo Scientific™) a été utilisé conformément aux recommandations du fabricant. Une gamme standard de BSA de 5 µg/mL à 1 mg/mL a été utilisée. Pour chaque échantillon et pour la gamme de BSA, un mélange de 50 µL de protéines purifiées après dialyse et 150 µL de réactif ont été incubés pendant 30 min à 37°C. L'absorbance du composé violet a ensuite été mesurée à 570 nm par un lecteur de microplaques Multiskan™ (Thermo Scientific™) et comparée à la gamme standard.

## 4. Analyse de la taille des particules par la technique de Diffusion Dynamique de la Lumière

Les particules purifiées ont été diluées dans du PBS 1X à la concentration de 0,1 mg/ml et filtrées avec un filtre de 1 µm avant d'être chargées dans une cuvette. Les mesures ont été effectuées avec un angle de 173° en triplicat technique à 25°C et un temps d'équilibrage de 60 secs (Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical). Le diamètre estimé des VLPs et le pourcentage de polydispersité ont été analysés avec le logiciel ZS XPLOER.

## 5. Analyse des particules par microscopie électronique à transmission

Les particules purifiées (5 µl) ont été adsorbées sur des grilles de microscopie électronique en carbone/formvar pendant 10 minutes à température ambiante. Les grilles ont été rincées 3 fois avec de l'eau pure et ont été colorées avec une solution d'acétate d'uranyle à 2% pendant 1 min à température ambiante. L'excès de suspension a été absorbé avec un papier filtre sur le côté de la grille. Les échantillons ont ensuite été observés avec un microscope électronique à transmission (JEOL, ARM-200F).

## 6. Adsorption des VLPs sur les surfaces de culture PDMS

Le PDMS liquide et l'agent de réticulation (kit d'élastomère silicone Sylgard™ 184) ont été mélangés dans un ratio de 10 g de silicone pour 1g de réticulent (10 : 1), puis coulés dans les puits de plaque de culture. Les boîtes de culture ont été placées au four à 80°C pendant 4 heures pour que le PDMS polymérise. Avant la réalisation des expériences de culture cellulaire, les puits ont été stérilisés avec de l'éthanol à 70 % et rincés trois fois avec de l'eau stérile. 200 µl de fibronectine ou de suspensions de VLPs diluées dans du PBS 1x à différentes concentrations ont été adsorbées pendant 30 minutes sur les surfaces PDMS à température ambiante. Les surfaces ont été rincées deux fois avec du PBS 1x pour éliminer les protéines non attachées. Pour s'assurer de l'adsorption des particules sur le PDMS, les étiquettes 6-his ont été marquées avec un anticorps de souris anti-histidines (Abcam™, dilution 1:1000) et détectées avec un anticorps IgG anti-souris de chèvre (Alexa Fluor™ 650, dilution 1:500).

# IV. Essais cellulaires

## A. Matériel

La lignée cellulaire de myoblaste de souris immortalisée (C2C12, ATCC® CRL-1772™) a été choisie au cours de ces travaux pour les différentes études du comportement cellulaire en réponse aux VLPs. Les cellules C2C12 ont été choisies pour leur capacité à se différencier en cellules myoblastiques et ostéogéniques dans des conditions de culture appropriées. Ces cellules sont maintenues dans un milieu DMEM à 4,5 mg/mL de glucose (Gibco™) contenant 10 % (v/v) de sérum fœtal bovin (FBS) et 1 % (v/v) de pénicilline et de streptomycine et cultivées dans une étuve à 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub> jusqu'à 70% de confluence. Les cellules ont été utilisées entre 3 et 12 passages.

## B. Méthodes

### 1. Étude des fonctions cellulaires en réponse au VLPs

#### **Adhérence des C2C12 sur les VLPs**

Les C2C12 ont été cultivées à une densité de 5000 cellules/cm<sup>2</sup> sur PDMS (plaque de 24 puits) préalablement fonctionnalisé avec la fibronectine ou les VLPs dans un milieu complet pendant 18h à 37°C. Après 18h d'incubation sur les substrats PDMS, les cellules ont été fixées avec 4% de paraformaldéhyde pendant 15 min à température ambiante. Les filaments d'actine F et le noyau des cellules ont été révélés respectivement avec les sondes fluorescentes Alexa Fluor™ 488 Phalloïdine (Invitrogen™, ab150077, dilution 1:40) et Hoechst 33342 (ThermoFisher™, dilution 1 :50), après incubation pendant 30 min à température ambiante. Les cellules ont été visualisées sous un microscope confocal à balayage laser (LSM 800 Zeiss) avec les objectifs x20 et x63 en réalisant une série de coupes optiques avec le programme d'acquisition Zen. Les cellules ont été segmentées à l'aide du plugin Cellpose 2.0 (ImageJ/FIJI) avec un seuil de 100 µm de surface cellulaire. La surface cellulaire (µm<sup>2</sup>) a été analysée pour chaque segmentation, et les images de segmentation ont été générées en format TIFF.

#### **Imagerie cellulaire et évaluation de la motilité cellulaire**

La suspension cellulaire a été mélangée avec la sonde fluorescente d'ADN SPY555 (Spirochrome™, dilution 1:1000) pour le marquage des noyaux. Les cellules ont étéensemencées à une densité de 5000 cellules/cm<sup>2</sup> sur des substrats PDMS pendant 2h avec du milieu complet à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après incubation, l'acquisition des cellules a été lancée sous un microscope confocal à Spinning-Disk (Ti2e SD CSU W1, Nikon) avec un objectif x10 à immersion glycérol pendant 18h à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Des images ont été acquises toutes les 15 min, soit un total de 49 images.

Le logiciel Imaris® (Oxford Instruments) a été utilisé pour suivre le mouvement des cellules au cours du temps. Un seuil de 5 µm a été utilisé pour détecter automatiquement les noyaux cellulaires. L'algorithme "autoregressive Motion" a permis de suivre la position et la vitesse de chaque cellule sur l'ensemble de la période d'acquisition (18 h).

#### **Test de prolifération cellulaire et de viabilité**

La viabilité et la prolifération des cellules C2C12 ont été quantifiées à l'aide du réactif Alamar Blue (Sigma). Les cellules C2C12 ont été cultivées sur la fibronectine ou les VLPs adsorbées sur les surfaces PDMS dans des plaques de culture à 48 puits dans un milieu DMEM complet pendant 24h, 48h et 72h. Le pourcentage de réduction de l'Alamar Blue et la prolifération relative ont été estimés

selon les formules fournies par le fabricant, listés ci-dessous. Le nombre de noyaux a été compté dans chaque puit (triplicat) après 24h et 72h, sous un microscope confocal avec un objectif x10 (Ti2e SD CSU W1, Nikon). Les cellules ont été préalablement fixées et marquées au Alexa Fluor 488 et au Hoechst, après chaque temps d'incubation.

*Différence de pourcentage entre les cellules traitées et le contrôle*

$$= \frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(O2 \times P1) - (O1 \times P2)} \times 100$$

O1 = coefficient d'extinction molaire (E) de l'Alamar Blue oxydé (bleu) à 570 nm

O2 = E de l'Alamar Blue oxydé à 600 nm

A1 = absorption à 570 nm

A2 = absorption à 600 nm

P1 = absorption du contrôle positif à 570 nm

P2 = absorption du contrôle positif à 600 nm

### **Différenciation myogénique**

Les C2C12 ont été cultivées dans des plaques à 48 puits (5000 cellules/cm<sup>2</sup>) pendant 3 jours à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Pour le contrôle positif, les cellules ont été incubées dans un milieu d'induction myogénique composé de DMEM supplémenté à 2% de sérum de cheval (HS) après l'ensemencement dans du milieu complet. Pour le contrôle non traité, les cellules ont étéensemencées dans du milieu DMEM complet. Pour évaluer la réponse myogénique aux VLP, les C2C12 ont été incubées sur les VLP-YIGSR, les VLP-RGD et les VLP RGD-YIGSR, préalablement adsorbées sur PDMS puis cultivées dans un milieu DMEM complet. Après 3 jours, l'ARN total a été extrait des cellules à l'aide d'un kit RNeasy Mini (Qiagen™). L'ARN purifié a été quantifié par son absorbance à 260nm. L'ADNc a été synthétisé à partir de 0,5 µg d'ARN total par RT-PCR avec 4µl de iScript RT Supermix (Bio-Rad™). La réaction de transcription inverse a été réalisée dans le thermocycleur pendant 5 min à 25°C, puis 20 min à 46°C et 1 min à 95°C pour inhiber la réaction. L'ADNc obtenu a été dilué au 1 : 20 avec de l'eau exempte de RNase. Les réactions de qPCR ont été réalisées à l'aide du kit iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad™, réf 1725124). La réaction d'amplification a été réalisée dans le CFX96 Touch (Bio-Rad). L'ADNc a été amplifié à 60°C en utilisant des amorces de souris, listées ci-dessous. Les résultats de PCR ont été évalués à l'aide du programme LinRegPCR (version 2015.2).

| Nom                                       | Numéro d'accension | Amorces (5'→3')   |
|---|--------------------|---|
| <i>Rpl0</i> -                             | NM_013536.2        | Sens - ACCTCCTTCTCCAGGCTTT<br>Antisens - TCAGCATGTTTCAGCAGTGTG    |
| <i>Myod1</i> – Myogenic différenciation 1 | NM_010866.2        | Sens - GCTCTGATGGCATGATGGATTAC<br>Antisens - CTATGCTGGACAGGCAGTCG |
| <i>Myog</i> – Myogenin                    | NM_031189.2        | Sens - GTCCCAACCCAGGAGATCATT<br>Antisens - AGTTGGGCATGGTTTCGTCT   |
| <i>Myh1</i> – Myosin heavy chain 1        | NM_030679.2        | Sens - TCCAGCTGAACCACTCCAAC<br>Antisens - TGCAGCTGAGTGCCTTGAG     |
| <i>Mrf4</i> – Myogenic regulatory factor  | NM_008657.3        | Sens - GACCCCTACAGCTACAAACCC<br>Antisens - TTGCTCCTCCTTCCTTAGCAG  |

**Tableau 9 : Amorces utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes myogéniques par qPCR.**

### Différenciation ostéogénique

Les cellules C2C12 ont été cultivées dans des plaques 24 puits (5000 cellules/cm<sup>2</sup>) pendant 24h dans du milieu complet DMEM. Le milieu a été changé avec du milieu de culture supplémenté avec de la rh-BMP2 (Peprotech™) à 300 ng/ml, ou les peptides BMP2 ou les VLP-BMP2 à 40 µg/ml. Les cellules ont été incubées pendant 7 jours à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après la période de culture, l'ARN total a été extrait des cellules à l'aide d'un kit RNeasy Mini (Qiagen). L'ADNc a été synthétisé à partir de 0,5 µg d'ARN total par RT-PCR puis amplifié par PCR en utilisant des couples d'amorces pour le gène osterix et pour les gènes *rpl0* et 18S de souris, listées ci-dessous.

| Nom                  | Numéro d'accension | Amorces (5'→3')  |
|----------------------|--------------------|--|
| <i>Rpl0</i> -        | NM_013536.2        | Sens - ACCTCCTTCTCCAGGCTTT<br>Antisens - TCAGCATGTTTCAGCAGTGTG |
| 18S                  | NM_007475.5        | Sens - AAGAATCCAGTGTCGACCA<br>Antisens - CCACAAACACAACCTGGGTCA |
| <i>Osx</i> – Osterix | NM_130458          | Sens - CAAGAGGTTCACTCGCTCTG<br>Antisens - CAAGTGGTCGCTTCTGGTAA |

**Tableau 10 : Amorces utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes ostéogéniques par qPCR.**

### Immunomarquages

Les C2C12 ont étéensemencées à une densité de 5000 cellules/cm<sup>2</sup> sur des surfaces PDMS fonctionnalisées avec la fibronectine ou les VLPs pendant 18h. Les cellules ont été fixées avec 4% de paraformaldéhyde pendant 15 min et perméabilisées avec 0,2% de Triton pendant 7 min à

température ambiante. La saturation des sites non spécifiques a été réalisée avec une solution d'albumine sérique bovine (BSA) à 5 % pendant 30 min à température ambiante.

Pour le marquage des adhésions focales, les cellules ont été incubées pendant 1h avec l'anticorps monoclonal primaire de lapin anti-vinculine (Sigma™, dilution 1:50) puis avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin Alexa fluor™ 488 (Abcam™, ab150077, dilution 1:500).

Pour le marquage des intégrines  $\beta 1$ , les cellules ont été marquées avec l'anticorps primaire anti-intégrine  $\beta 1$  de souris (Sigma™, dilution 1:300) et l'anticorps secondaire anti-souris de chèvre Alexa fluor™ 647 (Abcam™, ab150115, dilution 1:500). Pour le marquage des intégrines  $\alpha\beta 3$ , les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire polyclonal de lapin anti- $\alpha\beta 3$  (ThermoFisher™, BS-1310R, dilution 1:50) et l'anticorps secondaire chèvre anti-lapin Chromeo™ 546 (Abcam™, ab60316, dilution 1:50). Les filaments d'actine F et le noyau des cellules ont été marqués respectivement avec les sondes fluorescentes Alexa Fluor™ 488 et Hoechst. Les images ont été prises sous un microscope confocal à balayage laser (LSM 800 Zeiss) avec les objectifs x20 et x63. L'intensité de fluorescence de la vinculine et des intégrines  $\beta 1$  et  $\alpha\beta 3$  de chaque cellule a été analysée via le logiciel plugin Cellpose (ImageJ/FIJI) pour la segmentation des cellules.

### **Quantification des adhésions focales et clusters d'intégrines**

L'analyse des points focaux a été réalisée par le plugin "Find maxima" avec un seuil automatique pour le comptage des points focaux. Un comptage a été effectué pour chaque zone normalisée de 0 à 10  $\mu\text{m}$  entre la périphérie du noyau et la membrane cellulaire. La normalisation et le comptage ont été réalisés sur FIJI (ImageJ)<sup>212</sup>. Pour l'analyse des clusters d'intégrines  $\beta 1$  et d'intégrines  $\alpha\beta 3$ , chaque cellule a été analysée par un seuil automatique avec FIJI puis via le plugin "analyze particles". La morphologie des cellules segmentées via CellPose avec les différents paramètres mesurés ont été analysés via Celltool<sup>213</sup>.

## **V. Test d'assemblages des VLPs SpyCatcher avec les SpyTag-ELP-ligand**

### **Couplage des SpT-ELP-ligand aux VLPs SpyCatcher et analyse par SDS-PAGE**

L'interaction entre les SpyT-ligands et les AP205-SpyCatcher VLPs a été évaluée sous différents ratios moléculaires afin de déterminer lequel pourrait assurer une saturation totale par les SpyT-ligands sur les AP205-SpCatcher VLPs. Les ratios testés sont d'un ligand pour un monomère (1 : 1) et de deux ligands pour un monomère (2 : 1). Ces associations ont été effectuées pendant 2h à température ambiante sous agitation à 400 rpm (Multi Plate Shaker MTS-1, Grant-Bio).

Les interactions entre les SpyT-ligands et SpyC VLPs ont été analysées par SDS-PAGE en utilisant un gel de Coomassie car les SpyT-ELP-ligand ne contiennent aucun résidu triptophane. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie (Bio-Safe™ Coomassie Stain, Bio-Rad), suivant le protocole du fabricant.

#### **Analyse des couplages SpyCatcher : SpyT par chromatographie d'exclusion stérique**

Des échantillons contenant 500 µg/mL d'AP205 SpyCatcher VLPS ont été mélangés à 300 µg/mL de SpyT-sfGFP (addgene ID : 133454), de SpyT-ELP-RGD ou de SpyT-ELP-SpyT dans du PBS 1X, soit avec un ratio 1 : 1, pour un volume final de 1 ml. Après incubation pendant 2h à température ambiante, 500 µl du mélange ont été appliqués à la colonne d'exclusion (Enrich™ SEC 650). Les protéines ont été éluées avec du PBS 1X avec un débit de 1 ml/min.

#### **Test d'adhésion sur les SpyCatcher : SpyTag-ELP-RGD**

Les C2C12 ont étéensemencées sur les substrats PDMS fonctionnalisés avec la fibronectine, les VLP-RGD ou les SpyCatcher : SpyTag-ELP-RGD pendant 18h dans du milieu DMEM complet à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après fixation avec du paraformaldéhyde, les filaments d'actine F et le noyau ont été marqués respectivement avec les sondes fluorescentes Alexa Fluor™ 488 Phalloïdine et Hoechst. Les images ont été acquises par microscopie confocale (LSM 800) et analysées avec Cellpose 2.0 (ImageJ) pour la segmentation des cellules. La surface de chaque cellule (µm<sup>2</sup>) a été mesurée à partir des images obtenues.

## VI. Analyse statistique

Chaque expérience est répétée au minimum trois fois. Des analyses statistiques ont été effectuées en utilisant les tests t student (T-Test) et les tests ANOVA à un (one-way ANOVA) ou deux facteurs (two-way ANOVA), avec un seuil de signification à 0,05 (95%). Les graphiques ont été générés à l'aide du logiciel Prism (GraphPad).

## VII. Outils informatiques

- **Benchling** : Plateforme en ligne développée par Sajith Wickramasekara et Ashu Singhal, conçue pour les scientifiques et chercheurs en sciences de la vie afin de gérer et analyser des données biologiques et de faciliter la gestion de projets via des carnets de laboratoire numériques. Elle comprend des outils pour la conception des amorces et des plasmides, ainsi que pour l'analyse des séquences d'ADN, d'ARN et d'acides aminés à l'aide de l'outil « Molecular Biology ».

Site : <https://www.benchling.com>

- **ImageJ (FIJI)** : Logiciel open source conçu pour le traitement et l'analyse d'images en 2D, 3D et en temps réel, incluant des plugins supplémentaires et des macros automatisées pour l'analyse en sciences de la vie. Développé initialement par le National Institutes of Health (NIH) aux États-Unis.

Site : <https://imagej.net/software/fiji/>

- **CellPose** : Logiciel open source développé par Carsen Stringer et Marius Pachitariu à l'institut de Neurobiologie computationnelle de l'Université de Harvard. Ce logiciel permet la segmentation automatique des cellules en reconnaissant les contours cellulaires dans les images de microscopie.

Site : <https://www.cellpose.org>

- **CellTool** : Logiciel open source permettant l'analyse d'images (morphologie cellulaire) de microscopie à fluorescence. Il combine la gestion des données, le traitement d'images, la modélisation mathématique et la présentation graphique des données.

GitHub : <https://github.com/zpincus/celltool>

## Résultats et Discussion

### I. Particules pseudo-virales en tant que plateformes de signalisation

#### Développement et caractérisation des VLPs homomériques et hétéromériques.

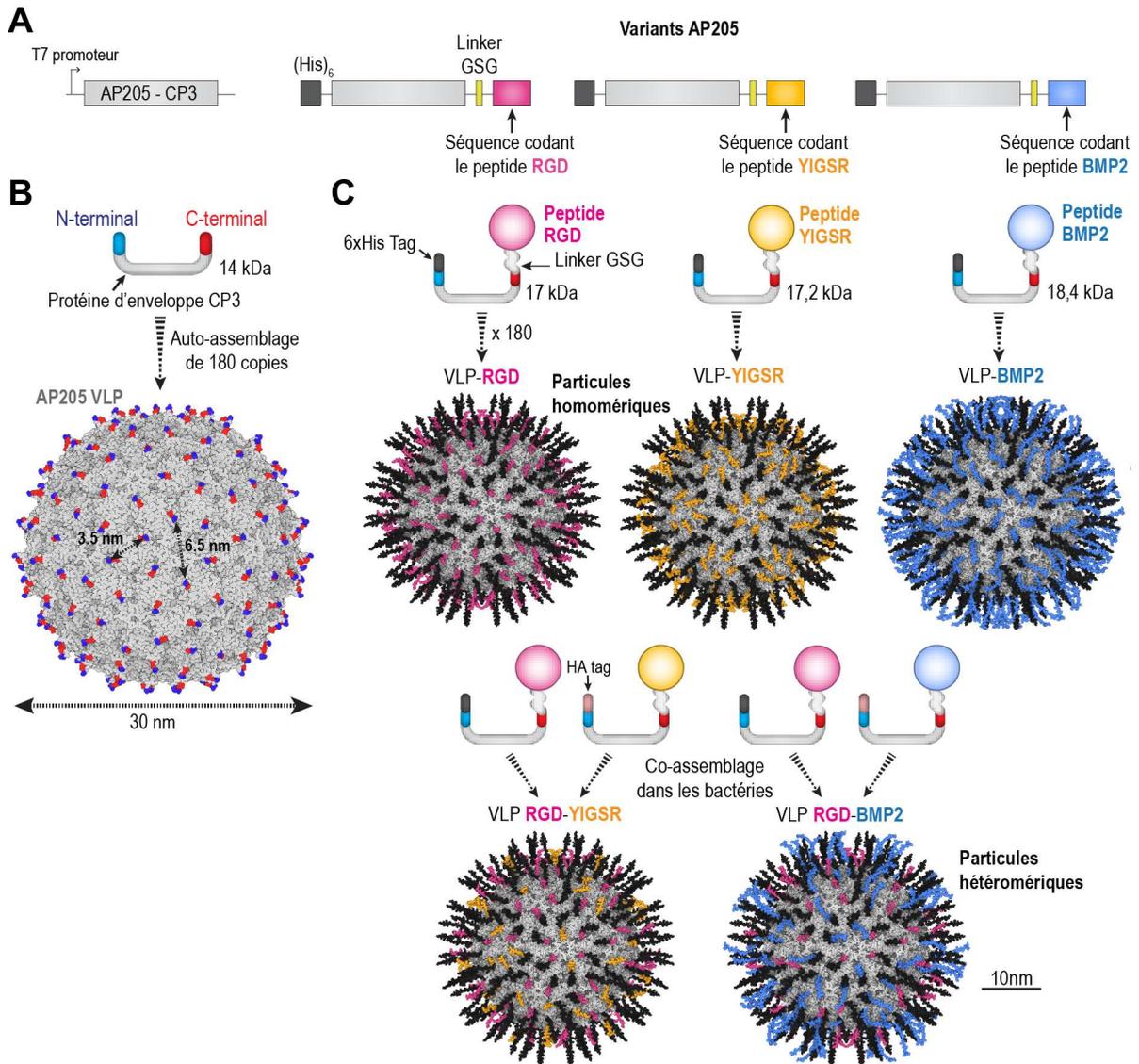
Le développement de variantes de la particule AP205 a été focalisé sur l'ajout de peptides dont leur activité biologique est connue et documentée dans la littérature<sup>100,115,128</sup>. Nous avons développé des particules présentant des peptides d'adhésion RGD et YIGSR issus respectivement de la fibronectine et de la laminine, ainsi que des peptides ostéogéniques BMP2, dérivés de l'épitope de la rhBMP2 (résidus 72 à 92, "KIPKASSVPTELSAISTLYL"). Ces peptides sont connus pour induire des réponses cellulaires similaires à celles des protéines dont elles sont dérivées. Nous avons également développé des particules hétéromériques co-exprimant les peptides RGD et BMP2, ou RGD et YIGSR, afin d'étudier respectivement leur effet synergique sur la différenciation ostéogénique et myogénique.

Nous avons fusionné génétiquement une étiquette 6-his à l'extrémité N-terminale de la protéine de capsid AP205-CP3 et des peptides bioactifs à son extrémité C-terminale, séparés par un polypeptide GSG (linker) (**Figure 33A, C**). L'étiquette 6-his permet la purification des particules, tandis que le linker GSG assure une flexibilité des peptides à la surface des VLPs.

Pour les particules hétéromériques, un premier monomère AP205-CP3 a été fusionné à une étiquette 6-his à l'extrémité N-terminale et à un peptide RGD à l'extrémité C-terminale (**Figure 33C**). Un second monomère AP205-CP3 a été fusionné à une étiquette HA (hémagglutinine de l'influenza humaine) à l'extrémité N-terminale, et soit au peptide YIGSR, soit au peptide BMP2 à l'extrémité C-terminale (**Figure 33C**).

Les séquences des cinq monomères ont été soumises à AlphaFold pour prédire leur structure. Les modèles obtenus ont été superposés à la structure cristalline expérimentale du monomère AP205-CP3, résolue par le groupe de Kaspars Tars<sup>153</sup>. Par application d'opérateurs de symétrie icosaédrique, nous avons généré des modèles 3D des VLPs, en collaboration avec le groupe de Kaspars Tars (**Figure 33C**). La structure cristalline expérimentale la VLP d'AP205 a servi de référence pour valider nos modèles AlphaFold. L'utilisation d'AlphaFold, nous a permis de modéliser les distances entre les extrémités N- et C- terminales à la surface de la VLP d'AP205 (**Figure 33B**). Cette analyse nous permet d'estimer la distance entre les peptides et de mettre en évidence leur organisation spatiale.

Le design des VLPs par clonage moléculaire nous a permis d'établir une plateforme robuste pour contrôler l'arrangement spatial et la distribution de peptides bioactifs à l'échelle nanométrique.



**Figure 33 : VLPs en tant que plateformes de présentation de peptides.** (A) Représentation schématique des constructions génétiques : la protéine de capsid CP3 du phage AP205 est fusionnée à une étiquette 6-his en N-terminal et à différents peptides bioactifs en C-terminal, séparés par un linker GSG. (B) La structure 3D de la VLP d'AP205 résolue par cristallographie, et (C) les modèles 3D prédits par AlphaFold de VLPs présentant les peptides RGD, YIGSR et BMP2 à leur surface (VLPs homomériques et hétéromériques).

Les particules purifiées ont été analysées par différentes techniques. Nous avons d'abord analysé la pureté des productions par SDS-PAGE en conditions dénaturantes (**Figure 34A**). La Figure 34A montre la présence d'une bande majoritaire correspondant à la taille attendue des différents monomères AP205. Les bandes correspondant aux monomères AP205, AP205-YIGSR et AP205-RGD sont situées à environ 17 kDa et la bande correspondant aux monomères AP205-BMP2 est à environ 20 kDa, car le peptide BMP2 contient plus d'acides aminés (20 acides aminés, soit 20 kDa environ). Nous avons également obtenu la présence de bandes majoritaires correspondant aux monomères qui

composent les particules hétéromériques (**Figure 34A**). Pour les VLP RGD-BMP2, la première bande à environ 18 kDa correspond à la taille attendue du monomère AP205-BMP2 et la seconde à environ 17 kDa correspond à celle du monomère AP205-RGD. En revanche, les monomères AP205-RGD et AP205-YIGSR au sein de la VLP-RGD-YIGSR ont un poids moléculaire de 16 kDa avec une différence de 98 Da, ce qui ne nous permet pas de les séparer sur gel. La présence des deux monomères au sein de la particule a pu être confirmée par western-blot avec des anticorps ciblant les étiquettes 6-his et HA.

Nous avons pu produire efficacement les différentes VLPs avec des rendements de 1 à 5 mg par litre de culture bactérienne (**Figure 34B**). Un résultat similaire à celui obtenu par Yenkoidiok-Douti et al., qui parviennent à purifier 1 mg de VLPs par litre<sup>214</sup>.

Après purification par affinité, nous avons séparé les VLPs assemblées des monomères par chromatographie d'exclusion stérique (SEC), une technique qui permet de séparer les protéines en fonction de leur volume hydrodynamique (**Figure 34C**). Les profils d'exclusion obtenus montrent un pic d'élution majeur de l'ordre du mégadalton comme attendu, en se basant sur le profil d'exclusion de protéines standard (2000 – 17 kDa) (**Figure 34C**). Ceci indique que la majorité des monomères AP205 sont assemblés en particules. Nous avons également observé l'élution d'espèces de poids moléculaire inférieur autour de 15 ml correspondant au pic d'élution de l'albumine (44 kDa), qui correspondent à des dimères non assemblés (**Figure 47**).

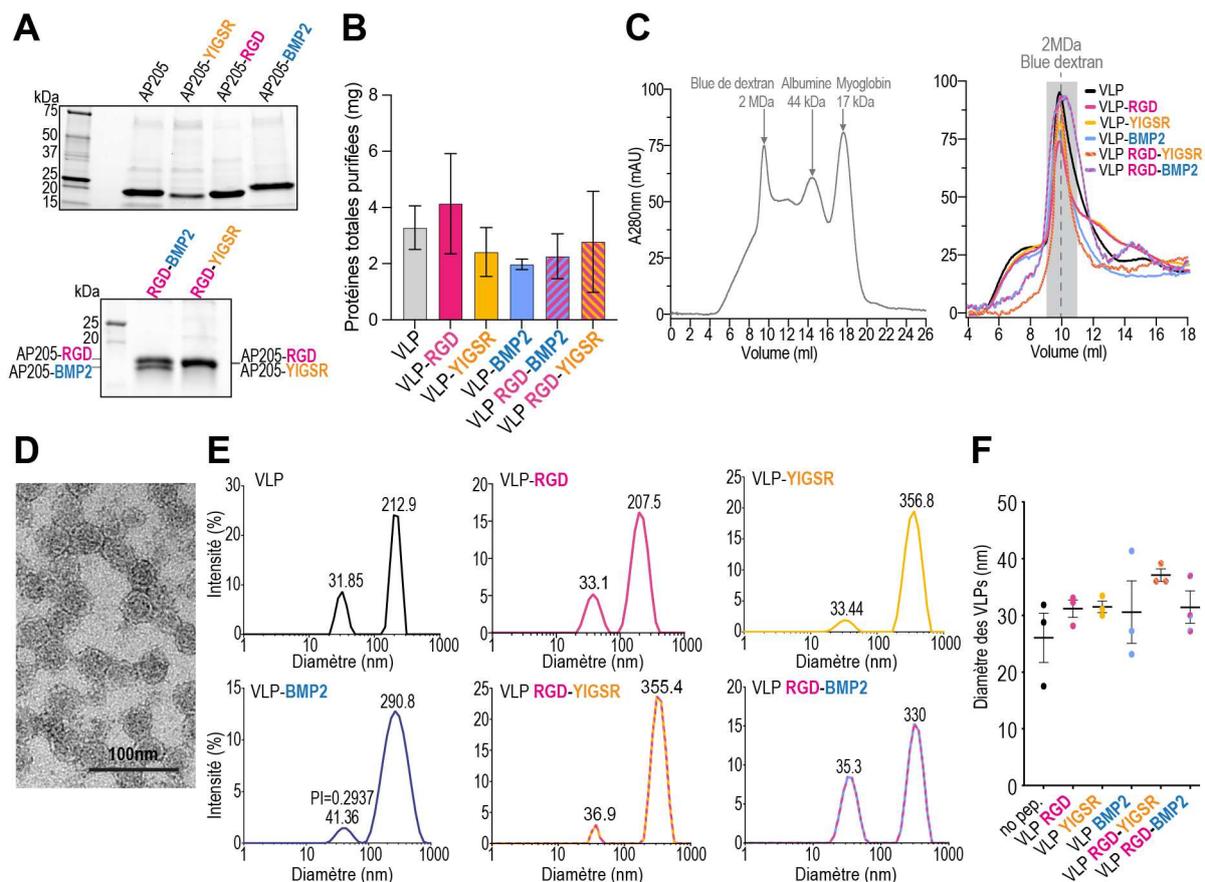
Nous avons analysé la fraction des particules assemblées par microscopie électronique à transmission (TEM). L'analyse des VLPs d'AP205 a été réalisée sur la plateforme d'imagerie électronique de l'EMBL à Heidelberg. L'analyse a confirmé l'assemblage des monomères AP205 en nanoparticules, avec un diamètre moyen de  $31.8 \pm 3.3$  nm (moyenne  $\pm$  SD, n=21) (**Figure 34D**). Nous avons tenté de poursuivre ces observations à la plateforme de microscopie électronique de l'IS2M (**Figure 48**). Cette plateforme, spécialisée dans les matériaux, ne possède ni les équipements, ni les compétences pour l'étude d'objets protéiques, et nous n'avons pas pu reproduire les observations réalisées à Heidelberg.

Nous avons donc opté pour la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS) pour estimer la taille des différentes VLPs (**Figure 34E, F**). Les résultats montrent une population de particules avec un diamètre moyen compris entre 26 nm et 37 nm. Une seconde population observée correspond à des tailles de 200 et 300 nm, suggérant que les VLPs ont une propension à l'agrégation. La différence entre les populations de particules détectées n'est pas directement corrélée à une différence quantitative, car la lumière diffusée par les plus gros agrégats peut être beaucoup plus intense, jusqu'à un facteur de  $10^6$ .

Pour calculer précisément les quantités des populations de particules détectées, il est nécessaire de connaître l'indice de réfraction de nos particules. Nous n'avons pas pu mesurer cet

indice ; par conséquent, nous avons utilisé la valeur de 1,45, proche de celle des protéines, pour estimer le pourcentage d'intensité en fonction du diamètre.

Le diamètre des pics de faible intensité correspondant aux VLPs monodispersées est présenté dans la Figure 34F. Les VLPs sans peptides à leur surface ont un diamètre moyen de 26 nm. Les VLP-RGD, VLP-YIGSR et VLP-BMP2 ont des diamètres moyens compris entre 30 et 31 nm (**Figure 34F**). Les particules hétéromériques présentent un diamètre moyen de 37 nm pour les VLP RGD-YIGSR et de 30 nm pour les VLP RGD-BMP2 (**Figure 34F**).



**Figure 34 : Caractérisation des VLPs homomériques et hétéromériques.** (A) SDS-PAGE en conditions dénaturantes des monomères AP205 composant les VLPs homomériques et hétéromériques après purification par affinité. (B) Rendement des protéines totales purifiées par litre de culture bactérienne (mg/L de culture). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SD,  $n=4$ . (C) Profils d'éluion des protéines standards (bleu de dextran, myoglobine et albumine) et des VLPs à 280 nm, analysés par chromatographie d'exclusion stérique. Le pic principal correspond aux VLPs assemblées. (D) Image des VLPs d'AP205 observée par microscopie électronique à transmission. Échelle : 100nm. (E) Distribution du diamètre des VLPs selon l'intensité (%), analysée par DLS. (F) Diamètres moyens des pics d'intensité correspondant aux VLPs monodispersées, mesurés par DLS (moyenne  $\pm$  SEM,  $n=3$ ).

Afin d'étudier les fonctions biologiques induites par les peptides présentés à la surface des VLPs, nous avons choisi le PDMS en tant que substrat pour l'adsorption physique des particules (**Figure 35A**). Le PDMS offre plusieurs avantages, tels que sa facilité de fabrication, sa rigidité modulable et sa transparence, qui permet l'observation par microscopie confocale inversée. De plus, sa nature inerte en fait un substrat de culture intéressant pour mettre en évidence uniquement les effets des protéines déposées à sa surface.

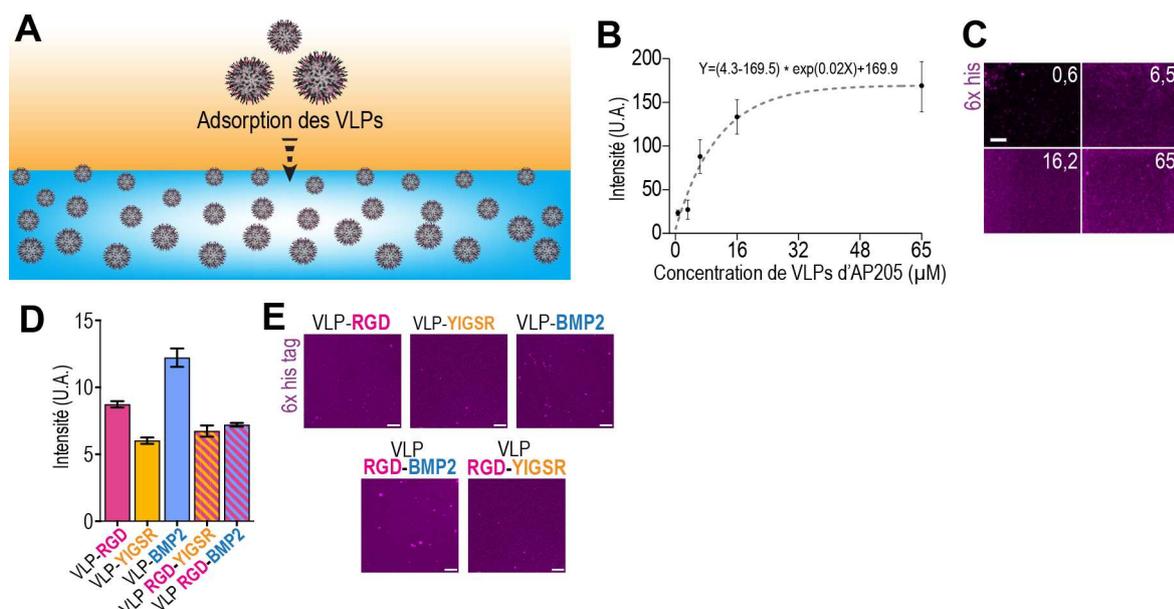
Pour toutes nos expériences, nous avons utilisé un mélange PDMS/réticulant standard, conférant au substrat un module de Young (module de rigidité) compris entre 1 et 3 MPa, caractéristique d'un matériau souple<sup>215</sup>.

Pour évaluer la capacité d'adsorption du PDMS, nous avons incubé les VLPs purifiées à sa surface et évalué leur adsorption par microscopie confocale après rinçage et immunomarquage anti-his (**Figure 35B, C**). Nous avons mesuré la fluorescence obtenue avec une série de concentration des VLPs d'AP205. À faible concentration (0,6  $\mu\text{M}$ ), les VLPs recouvrent de manière hétérogène le PDMS (**Figure 35B, C**). En augmentant leur concentration, nous avons observé une couverture de surface de plus en plus homogène. À partir de 6,5  $\mu\text{M}$ , la surface est entièrement recouverte de manière uniforme (**Figure 35 B, C**). Un plateau est atteint à 65  $\mu\text{M}$ , suggérant que la capacité maximale d'adsorption des VLPs par le PDMS est atteinte à cette concentration (**Figure 35B**).

Nous avons ensuite comparé l'adsorption des variantes de VLPs (**Figure 35D, E**). L'intensité de fluorescence est comparable entre les VLP-YIGSR, VLP RGD-YIGSR et les VLP RGD-BMP2 (**Figure 35D**). En revanche, l'intensité de fluorescence est plus élevée avec les VLP-BMP2 et les VLP-RGD, ce qui suggère une adsorption plus importante au substrat (**Figure 35D**). Cependant, il est difficile d'estimer la quantité absolue ou la densité des VLPs adsorbées sur le PDMS avec cette méthode, qui ne fournit que des quantités relatives.

L'adsorption des VLPs à la surface du PDMS peut être influencée par la charge globale de leur surface, en fonction de la composition en acides aminés des peptides. Les peptides BMP2 et RGD possèdent plusieurs acides aminés hydrophiles qui peuvent interagir avec la surface hydrophobe du PDMS, ce qui pourrait expliquer l'intensité de fluorescence élevée. Une mesure du potentiel zêta des VLPs par DLS pourrait être envisagée pour obtenir des informations sur la charge électrostatique à la surface des VLPs et comprendre comment celle-ci influence leur adsorption à la surface du PDMS. Une charge plus élevée pourrait accroître l'affinité des VLPs pour la surface hydrophobe du PDMS, entraînant ainsi une adsorption plus importante. Il est donc important de prendre en compte la charge de la séquence d'acides aminés à exprimer à la surface des VLPs.

Compte tenu de ces résultats, nous avons choisi la concentration de 65  $\mu\text{M}$  pour toutes nos expériences, assurant ainsi une couverture homogène du PDMS par les VLPs.



**Figure 35 : Fonctionnalisation de la surface du PDMS par les VLPs.** (A) Schéma illustrant l'adsorption des VLPs d'AP205 à la surface du PDMS. (B) Intensité de fluorescence des VLPs adsorbées à la surface du PDMS à différentes concentrations pendant 30 min à température ambiante. Courbe obtenue par régression non linéaire (les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  SD). (C) Immunomarquage des étiquettes 6x his des VLPs d'AP205 et (E) des variantes de VLPs adsorbées à la surface du PDMS. (D) Intensité de fluorescence des variantes de VLPs adsorbées à la surface du PDMS ( $65 \mu\text{M}$ ) (moyenne  $\pm$  SD). (E) Immunomarquage des étiquettes 6x his des variantes de VLPs adsorbées à la surface du PDMS.

## VLPs en tant que plateformes multifonctionnelles pour stimuler l'adhérence et la migration cellulaire.

Après avoir déterminé la concentration permettant la saturation de la surface du PDMS, nous avons étudié différents processus cellulaires en réponse aux VLPs (**Figure 36A**). Les essais biologiques ont été réalisés en utilisant la lignée cellulaire de myoblaste de souris (C2C12), connue pour sa capacité à se différencier en myotubes ou en ostéoblastes dans des conditions de culture appropriées. En effet, plusieurs études ont rapporté des effets synergiques de peptides bioactifs sur l'adhérence, la prolifération et la différenciation des C2C12<sup>100,115</sup>. Dans cette optique, le développement de particules hétérométriques exprimant deux peptides bioactifs nous permet de stimuler différentes fonctions cellulaires.

Pour l'étude de l'adhérence cellulaire, nous avons cultivé les cellules C2C12 pendant 18 heures (h) sur des substrats PDMS recouverts soit de VLPs, soit de fibronectine (**Figure 36B, C**). Les VLPs exprimant les peptides RGD stimulent significativement l'étalement, bien que de manière légèrement inférieure à celle observée avec la fibronectine (**Figure 36B**). La fibronectine a de multiples domaines de liaison adhésive en plus des RGD, ce qui pourrait expliquer une activité supérieure aux VLP-RGD.

En revanche, les VLPs n'exprimant aucun peptide, ou celles exprimant les peptides BMP2 et YIGSR stimulent peu l'adhérence et l'étalement des cellules (**Figure 36B**). Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature, qui montrent que les peptides YIGSR stimulent moins l'adhérence que les peptides RGD<sup>115,128,216</sup>.

Nous avons pu montrer que la présence de RGD sur les particules hétéromériques favorise davantage l'étalement des cellules C2C12 comparées aux particules homomériques exprimant uniquement YIGSR ou BMP2 (**Figure 36B**). Les VLPs RGD-BMP2 et RGD-YIGSR augmentent en effet significativement l'étalement des cellules comparé aux particules homomériques VLP-BMP2 et VLP-YIGSR (**Figure 36B**). Ceci montre que la bioactivité du peptide RGD est maintenue sur les particules hétéromériques et souligne son importance pour promouvoir l'étalement des cellules. L'adhérence des cellules est indispensable à l'aboutissement et à la régulation de différentes réponses cellulaires, dont la prolifération et la migration. Ces résultats montrent que ces particules hétéromériques peuvent servir de plateformes de signalisation multifonctionnelles à la surface de matériaux.

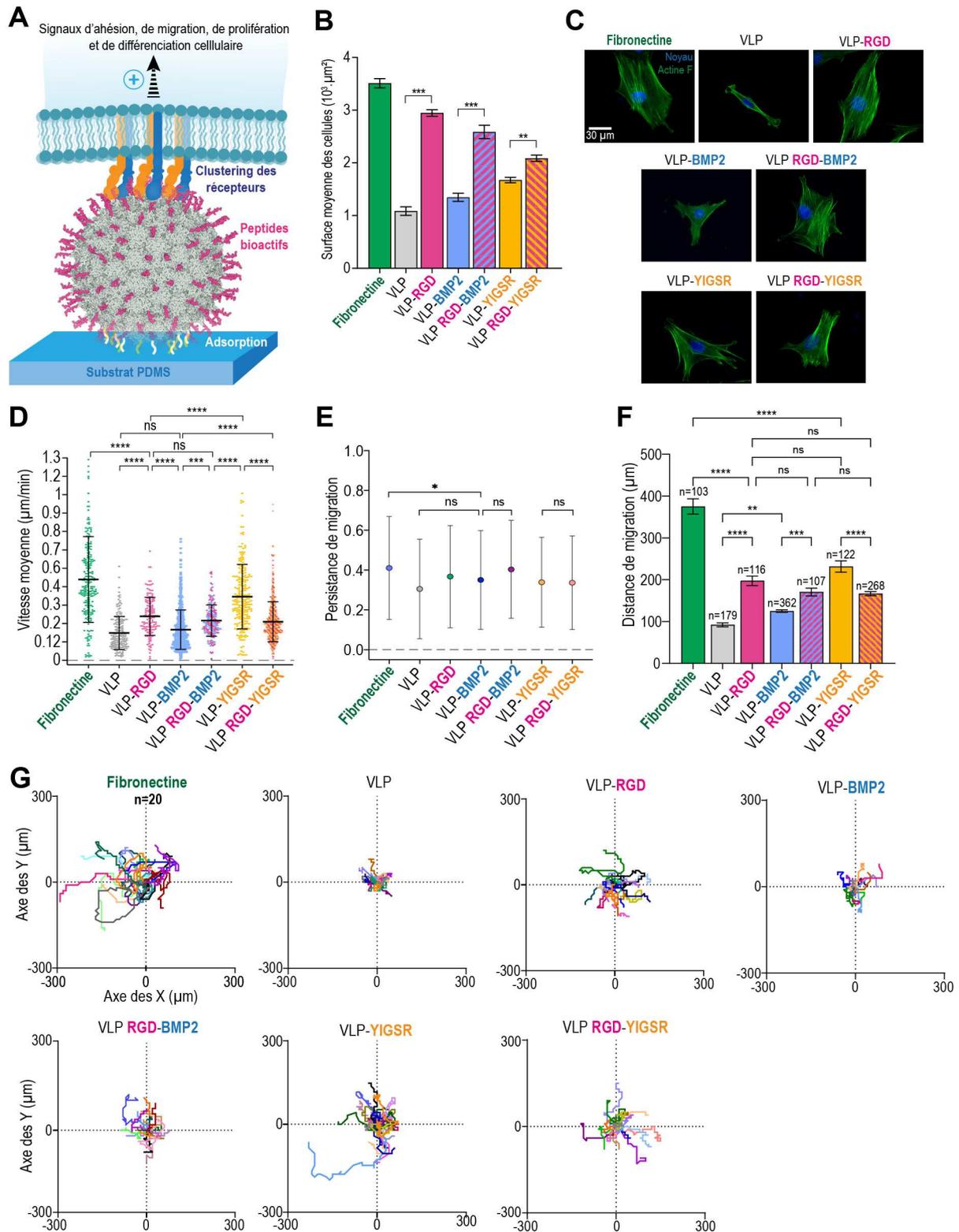
Nous avons analysé la migration des cellules en réponse aux VLPs pendant 18h. En utilisant le noyau comme marqueur de position, nous avons quantifié la vitesse (**Figure 36D**), la persistance (**Figure 36E**) et la distance totale de migration parcourue (**Figure 36F**) de chaque cellule au cours du temps. Les cellules présentent des dynamiques de migration variables selon le substrat, plus élevées sur la fibronectine (0,51  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) et les particules exprimant le peptide YIGSR (0,40  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (**Figure 36D**). La fibronectine et la laminine sont connues pour favoriser la migration des cellules dans des conditions physiologiques ou pathologiques<sup>79,217</sup>. En revanche, on observe une vitesse de migration significativement plus faible sur les particules exprimant le peptide RGD (**Figure 36D**). Par ailleurs, nous n'observons pas de différence de persistance de migration entre les substrats (**Figure 36E**). Les surfaces recouvertes de fibronectine ou de VLPs présentent un indice de directionnalité compris entre 0,3 et 0,4, ce qui signifie que les cellules n'adoptent pas de migration directionnelle (**Figure 36E**).

Nos résultats montrent également que la distance de migration totale parcourue par les cellules C2C12 est significativement plus élevée sur les substrats revêtus de fibronectine par rapport à ceux revêtus de VLPs (**Figure 36F, G**).

Des travaux ont démontré qu'une vitesse de migration élevée est généralement associée à une polarisation d'actine et à une formation de lamellipodes plus importante chez les cellules<sup>218</sup>. De plus, l'orientation des fibres de fibronectine favorise et oriente la migration des cellules, notamment dans le cas de la progression tumorale, par exemple<sup>79</sup>. Ces données expliquent potentiellement pourquoi les cellules C2C12 migrent davantage sur la fibronectine que sur les VLPs exprimant le peptide RGD.

Une autre hypothèse est le remodelage de ces particules par les cellules. En effet, les VLPs sont adsorbées physiquement à la surface du PDMS et pourraient avoir tendance à se détacher sous l'effet des forces de traction exercées par les cellules, notamment via les intégrines qui se lient aux peptides RGD. Lors de la migration cellulaire *in vivo*, les cellules exercent en effet des forces mécaniques sur les ligands matriciels et modifient l'état mécanique et l'organisation de la matrice sous-jacente<sup>221</sup>. Les VLP-RGD pourraient favoriser le regroupement des intégrines en clusters et augmenter les forces de traction exercées par les cellules lors de leur migration. De plus, ces forces de traction, générées par la contraction des fibres d'actine, pourraient être renforcées par le recrutement de RhoA et l'activation de la myosine II. Des études ont démontré que ces protéines jouent des rôles essentiels dans la génération de la tension du cytosquelette lors de l'activation des intégrines<sup>233</sup>. Les VLP-RGD pourraient stimuler davantage le recrutement de RhoA au front avant des cellules. Un western-blot pourrait être envisagé pour confirmer si les VLP-RGD induisent une expression plus importante de RhoA par rapport à la fibronectine.

Nos résultats s'alignent globalement avec les données de la littérature, indiquant que la fibronectine favorise davantage l'étalement et la motilité cellulaire que les peptides RGD<sup>128,222</sup>. La densité et la taille des clusters de RGD à la surface d'un substrat peuvent moduler l'adhérence et la migration cellulaire : une densité élevée favorise une adhésion plus forte des cellules mais réduit la vitesse de migration<sup>222</sup>. La présence de RGD à haute densité sur les VLPs pourrait avoir des effets similaires, conduisant à une migration plus faible.



**Figure 36 : VLPs en tant que plateformes multifonctionnelles pour stimuler l'adhérence et la migration cellulaire.** (A) VLPs en tant que plateformes de signalisation pour stimuler le regroupement des intégrines à l'échelle nanométrique. (B) Quantification de l'étalement des cellules de myoblaste C2C12 après 18h de culture sur la fibronectine ou les VLPs adsorbées sur PDMS (moyenne  $\pm$  SEM). (C) Immunomarquage des C2C12 après 18h de culture sur les différents substrats (vert : Actine-F et bleu :

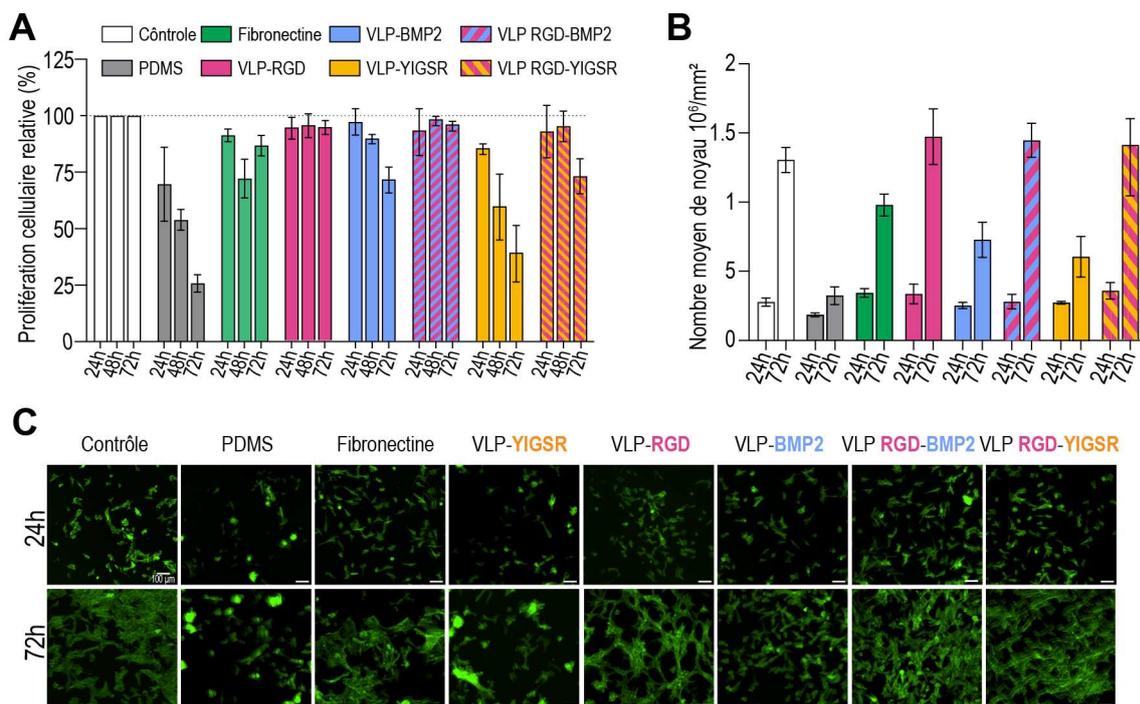
noyau). (D) Vitesse moyenne des cellules C2C12 ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) pendant 18h de migration sur la fibronectine et les VLPs (moyenne  $\pm$  SD,  $n>140$  cellules dans 3 expériences indépendantes). (E) Persistance et (F) distance totale de migration parcourue par les cellules pendant 18h de migration sur la fibronectine et les VLPs. (G) Trajectoire des cellules après 18h de migration sur la fibronectine et les VLPs ( $n=20$  dans 3 expériences indépendantes). (B, D, E et F) Les valeurs de probabilité ont été obtenues par le test one-way ANOVA avec le test de comparaisons multiples Tukey, avec un seuil de signification de 0,05 : \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.005$ , \*\*\*\* $p<0.001$ .

## **VLPs en tant que plateformes multifonctionnelles pour stimuler la prolifération et la différenciation cellulaire.**

La présence de RGD à la surface des VLPs favorise la prolifération des C2C12

Plusieurs études suggèrent que le renforcement des clusters d'intégrines régule divers processus cellulaires, dont la prolifération<sup>33</sup>. Pour étudier la prolifération des cellules C2C12 en réponse aux VLPs, nous avons mesuré leur activité métabolique à 24h, 48h et 72h, en utilisant le réactif Alamar Blue (**Figure 37A**). Le pourcentage de prolifération relatif a été calculé en comparant la réduction du réactif entre les cellules cultivées sur des surfaces commerciales en polystyrène et celles cultivées sur des surfaces recouvertes de fibronectine ou de VLPs (**Figure 37A**).

Les cellules prolifèrent sur toutes les VLPs, mais à un taux moins élevé sur les VLP-YIGSR et les VLP-BMP2, ce qui concorde avec les résultats d'étalement cellulaire (**Figure 37A**). La densité et le pourcentage de prolifération relatif des C2C12 sont augmentés en présence de RGD sur les particules homomériques et hétéromériques (**Figure 37A, B**). Le nombre de cellules à 72h est plus élevé sur les VLP-RGD que sur les VLP-YIGSR (**Figure 37B**), ce qui suggère que RGD est plus efficace que YIGSR pour favoriser la croissance des C2C12. La présence de RGD combinée au peptide YIGSR ou BMP2 sur les VLPs hétéromériques favorise significativement la prolifération des cellules. La présence des sites RGD reconnus par les intégrines pourrait favoriser l'activation de la signalisation cellulaire impliquée dans l'induction de la prolifération cellulaire, telle que la voie PI3K/Akt<sup>31</sup>. L'adhérence des cellules via les intégrines est donc cruciale dans l'induction de la prolifération cellulaire. Cela suggère que le peptide RGD sur les particules hétéromériques pourrait être utilisé pour promouvoir l'adhérence et la prolifération des cellules dans des applications de biomatériaux, telles que l'ingénierie tissulaire.



**Figure 37 : VLPs multifonctionnelles pour stimuler la prolifération cellulaire.** (A) Pourcentage relatif de la prolifération des cellules (test Alamar blue), cultivées sur la fibronectine et les VLPs pendant 24h, 48h et 72h, en comparaison avec le contrôle (moyenne  $\pm$  SD,  $n = 4$ ). (B) Densité des cellules C2C12 (noyau/ $\text{mm}^2$ ) sur les différents substrats après 24h et 72h (moyenne  $\pm$  SEM,  $n=3$ ). (C) Immunomarquage des cellules C2C12 après 24h et 72h de culture sur les différents substrats (actin-F : vert). Échelle : 100  $\mu\text{m}$ .

Effet des peptides RGD et YIGSR et de leur association à la surface des VLPs pour stimuler la différenciation myogénique

L'action des peptides RGD et YIGSR, ainsi que l'effet synergique de leur association, a été démontré dans l'induction de la différenciation des C2C12 en myotubes<sup>115</sup>. Nous avons donc étudié l'effet des VLP-YIGSR, VLP-RGD et VLP RGD-YIGSR sur la différenciation myogénique (**Figure 38**). Les cellules ont étéensemencées à la même densité sur des surfaces PDMS fonctionnalisées avec les différents VLPs, puis cultivées pendant 3 jours. En parallèle, les cellules ont été cultivées sur des surfaces commerciales en polystyrène non traitées, en présence de milieu de culture supplémenté soit au sérum de veau foetal (SVF, contrôle négatif), soit au sérum de cheval (HS).

L'analyse de l'expression des gènes MyoG et Myh1, marqueurs clés de la différenciation myogénique, révèle des profils d'expression distincts en réponse aux différents traitements. Les C2C12 traitées avec les VLP-RGD présentent une augmentation significative de l'expression de ces deux gènes par rapport aux VLP-YIGSR et au groupe contrôle (10% SVF) (**Figure 38A**). Ces résultats suggèrent que

les peptides RGD présentés à la surface des VLPs favorisent davantage l'engagement des cellules dans la voie de différenciation myogénique, conduisant à la formation de myotubes. En revanche, les VLP-YIGSR, bien qu'induisant une augmentation de l'expression de MyoG par rapport au contrôle, ont un effet moins marqué sur Myh1, suggérant un engagement partiel dans la voie de différenciation.

La co-expression des peptides RGD et YIGSR sur les VLPs amplifie encore cet effet, notamment sur l'expression de Myh1. Ces résultats indiquent que la combinaison de ces deux peptides optimise le processus de différenciation en favorisant également la prolifération cellulaire via MyoD et la fusion des cellules en myotubes. En effet, le facteur MyoD est impliqué dans la prolifération des cellules et dans l'activation de l'expression des gènes MyoG et Myh1, indispensables à la formation des myotubes<sup>45</sup>.

De plus, les cellules sont positives au marquage du facteur MHC-I en réponse aux VLP-YIGSR, VLP-RGD et VLP RGD-YIGSR, avec une localisation cytoplasmique particulièrement marquée dans les cellules cultivées sur les VLP RGD-YIGSR (**Figure 38B**).

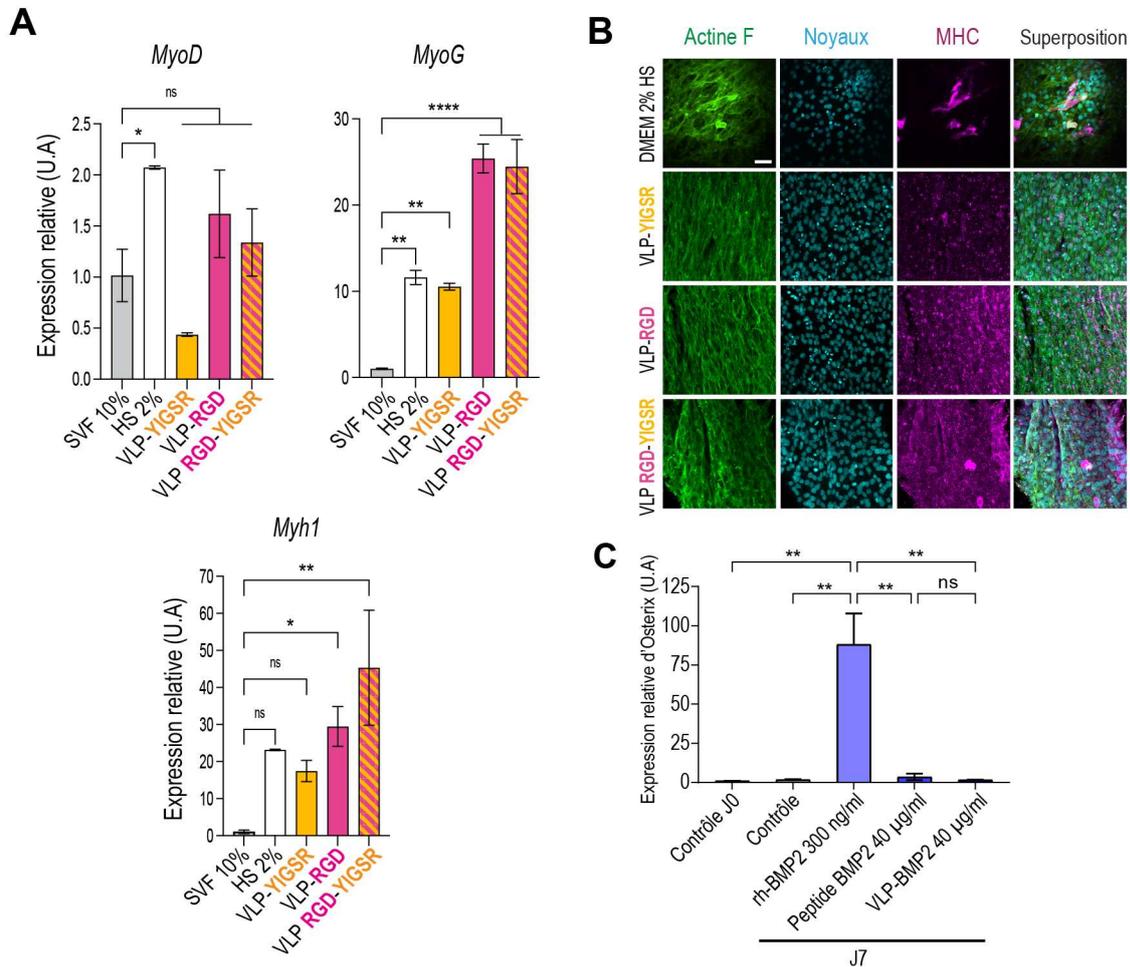
Ces observations sont en accord avec les données de la littérature, démontrant que l'association des peptides RGD et YIGSR favorise l'attachement cellulaire et active des voies de signalisation favorisant la différenciation myogénique<sup>115</sup>.

Ces résultats soulignent l'intérêt de développer des plateformes multifonctionnelles présentant différents peptides pour moduler la bioactivité et la réponse cellulaire. Les VLPs hétéromériques, co-exprimant les peptides RGD et YIGSR, se révèlent être des outils prometteurs pour stimuler la différenciation myogénique des cellules C2C12. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement de stratégies thérapeutiques basées sur les VLPs pour la régénération musculaire.

#### Effet des VLP-BMP2 sur la différenciation ostéogénique

Nous avons également évalué l'effet des peptides BMP2 seuls et exposés à la surface des VLPs sur la différenciation ostéogénique des C2C12 (**Figure 38C**). Contrairement à la rhBMP2 (contrôle positif), les peptides BMP2 seuls ou à la surface des VLPs n'ont pas induit d'expression du gène Osterix, un marqueur clé de la différenciation ostéogénique (**Figure 38C**). L'association des peptides BMP2 et RGD à la surface des VLPs n'a également pas montré d'effet sur la différenciation ostéogénique (les résultats ne sont pas montrés ici). Cette absence d'effet pourrait s'expliquer par une interaction insuffisante avec les récepteurs BMPR-IA et II, essentiels à l'activation de la voie Smad et à l'expression des gènes ostéogéniques<sup>59,60</sup>. Le peptide BMP2 utilisé dans cette étude, dérivé de l'épitope 2 de la rhBMP2, cible spécifiquement le récepteur de type I, il est probable qu'il ne puisse pas activer efficacement la cascade de signalisation intracellulaire. Ces résultats soulignent l'importance de

l'interaction simultanée avec les récepteurs de type I et II pour une transduction complète du signal BMP.



**Figure 38 : Association des peptides RGD et YIGSR à la surface des VLPs pour stimuler la différenciation myogénique.** (A) Analyse par qPCR de l'expression des gènes MyoD, MyoG et Myh1 au cours de la différenciation myogénique, après 3 jours de culture des C2C12 en réponse aux VLP-YIGSR, VLP-RGD et VLP RGD-YIGSR (moyenne  $\pm$  SD, n=2). Valeurs de probabilité obtenues par le test one-way ANOVA suivi du test Dunnett en comparaison avec le contrôle négatif (SVF 10%) : \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  et \*\*\*\* $p < 0.001$ . (B) Immunomarquage du noyau (bleu), de l'actine F (vert) et de la chaîne lourde de myosine MHC (magenta), après 3 jours de culture des C2C12 sur les différents substrats. Images observées au microscope confocal (objectif x20). (C) Expression du facteur ostéogénique Osterix dans les cellules C2C12 cultivées pendant 7 jours dans un milieu DMEM supplémenté en rhBMP2 (300 ng/ml), aux peptides BMP2 (40 µg/ml) ou aux VLP-BMP2 (40 µg/ml) (moyenne  $\pm$  SD, n=2). Les valeurs de probabilité ont été obtenues par le test one-way ANOVA (Tukey), \*\* $p < 0,01$ .

## VLP-RGD pour stimuler le clustering d'intégrines à l'échelle nanométrique

Dans nos travaux, nous avons montré que les peptides RGD à la surface des VLPs induisent efficacement l'adhérence et la prolifération des C2C12, et sa combinaison avec le peptide YIGSR permet de stimuler la différenciation des C2C12 en myotubes.

Dans notre étude, 180 peptides RGD sont exposés à la surface d'une seule particule de 30 nm et pourraient potentiellement favoriser la formation de clusters d'intégrines impliqué dans la régulation de la plupart des fonctions cellulaires. Nous avons comparé la morphologie cellulaire et la formation des AFs entre les cellules cultivées sur les VLP-RGD et sur fibronectine, pour compléter nos résultats.

### Les VLP-RGD modulent l'étalement des cellules C2C12 de manière dose dépendante

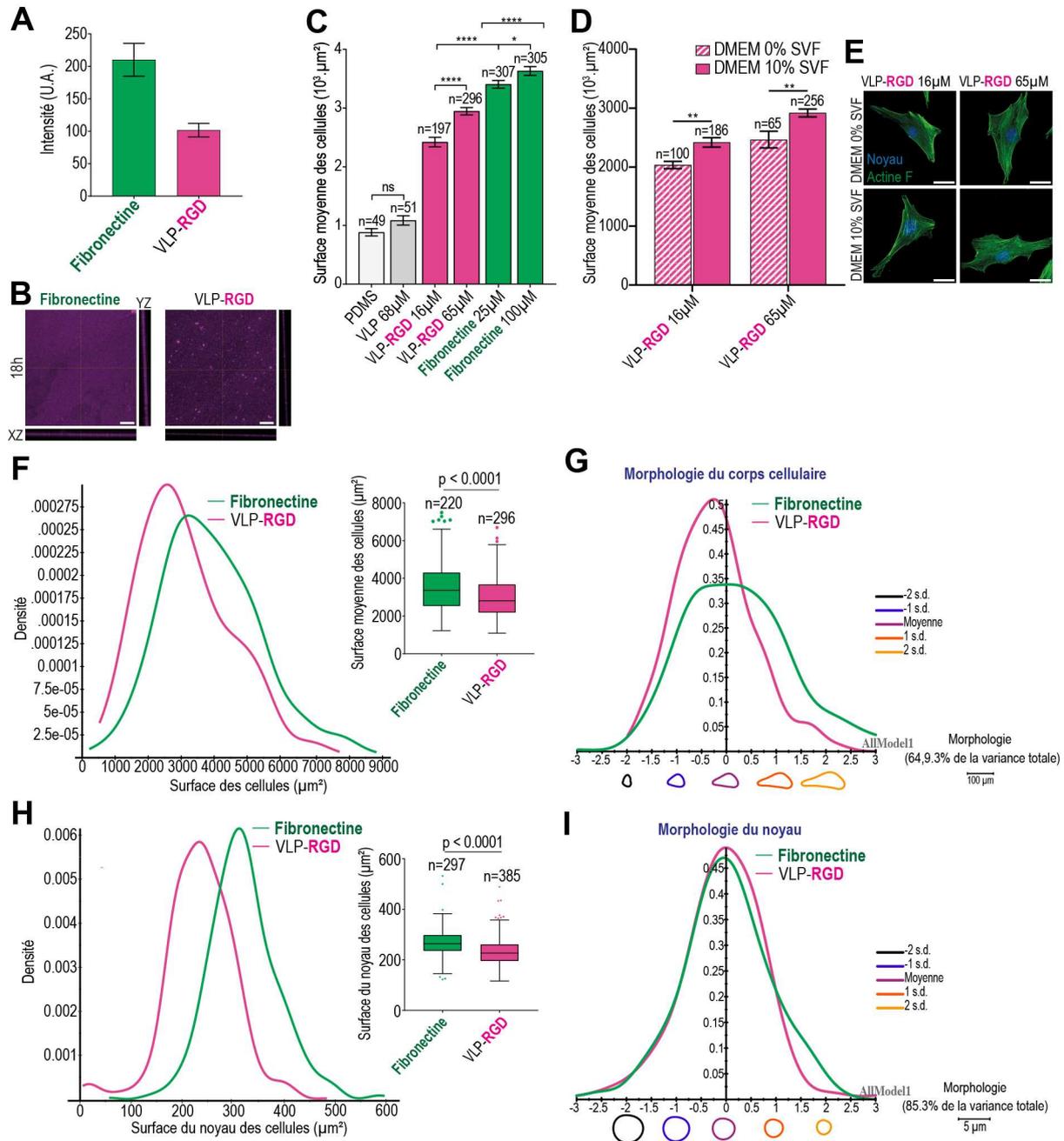
Tout d'abord, nous avons analysé la stabilité de la couche de VLP-RGD ou de fibronectine après 18h d'incubation dans du milieu complet à 37°C. Après 18h d'incubation dans du milieu de culture, le revêtement de VLP-RGD reste homogène sur le substrat PDMS (**Figure 39A, B**).

Nous avons analysé l'étalement des C2C12 en réponse aux VLP-RGD ou à la fibronectine à différentes concentrations après 18h de culture (**Figure 39C, D**). Les VLP-RGD stimulent l'étalement des cellules de façon dose-dépendante, la concentration de 65  $\mu\text{M}$  de VLP-RGD conduisant à un étalement plus important (2945  $\mu\text{m}^2$ ) que la concentration de 16  $\mu\text{M}$  (2514  $\mu\text{m}^2$ ) (**Figure 35C**). L'étalement est plus élevé avec la fibronectine que les VLP-RGD. En réponse à une forte concentration de fibronectine ou de VLP-RGD, on observe une grande proportion de cellules avec un étalement autour de 2500 et 4000  $\mu\text{m}^2$  dans les 2 conditions et une population de cellules autour de 7000 et 8500  $\mu\text{m}^2$  pour la condition fibronectine (**Figure 39F**). De plus, les C2C12 adoptent une morphologie plus polarisée en réponse à la fibronectine comparée aux VLP-RGD (**Figure 39G**), ce qui explique la migration plus importante des cellules sur ce substrat.

Nous avons également montré que les VLP-RGD étaient capables de promouvoir l'adhérence et l'étalement des cellules en l'absence de milieu supplémenté au SVF qui contient généralement des molécules adhésives comme la fibronectine (**Figure 39D, E**). Ces résultats soulignent le potentiel des VLP-RGD en tant que plateformes bioactives pour promouvoir l'adhérence cellulaire sans dépendre de molécules adhésives exogènes, telles que la fibronectine ou la vitronectine.

Nous avons également évalué l'étalement et la morphologie du noyau en réponse à la fibronectine et aux VLP-RGD (**Figure 39H, I**). Les résultats montrent que le noyau des cellules s'étend davantage sur la fibronectine que sur les VLP-RGD (**Figure 39H**). En revanche, la morphologie du noyau des cellules est comparable dans les deux conditions (**Figure 39I**). Lors de la migration cellulaire *in vivo*,

l'étalement des cellules entraîne l'étalement du noyau via l'actine corticale et joue un rôle de mécanosenseur dans la régulation d'une motilité dirigée<sup>34</sup>.



**Figure 39 : Comparaison de l'étalement et de la morphologie des cellules C2C12 sur la fibronectine et les VLP-RGD.** (A) Intensité de fluorescence de la fibronectine et des VLP-RGD adsorbées sur les surfaces PDMS pendant 18h à 37°C dans du milieu de culture complet. (B) Immunomarquage de la fibronectine et des étiquettes 6-his. (C) Quantification de la surface d'étalement des cellules en  $\mu\text{m}^2$  sur la fibronectine ou sur les VLP-RGD à différentes concentrations après 18h de culture (moyenne  $\pm$  SEM). (D) Surface d'étalement des C2C12 en  $\mu\text{m}^2$  sur les VLP-RGD après 18h de culture dans du milieu de culture avec ou sans sérum SVF (moyenne  $\pm$  SEM). (C, D) Les valeurs de probabilité ont été obtenues

par le test one-way ANOVA (Tukey) : \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$  et \*\*\*\* $p < 0.001$ . (E) Immunomarquage des C2C12 sur les VLP-RGD après 18h de culture avec ou sans milieu de culture supplémenté en SVF (vert : actine F, bleu : noyau). Échelle : 30  $\mu\text{m}$ . (F) Distribution de la surface des cellules et (H) du noyau des C2C12 après 18h de culture sur de la fibronectine ou sur les VLP-RGD. (G) Morphologie moyenne des cellules et (I) du noyau des cellules après 18h de culture sur de la fibronectine ou sur les VLP-RGD, analysé via Celltool.

Les VLP-RGD stimulent la formation d'un plus grand nombre d'adhésion focales (AFs) à la périphérie des cellules

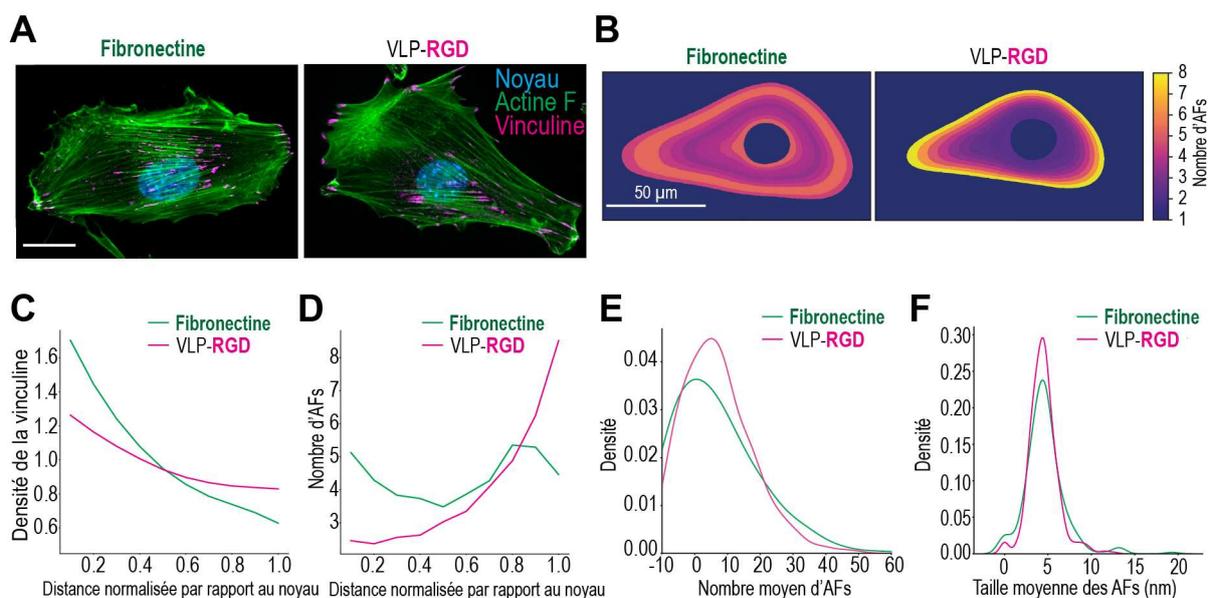
Pour vérifier l'hypothèse d'une adhésion cellulaire plus forte sur les VLP-RGD, nous avons quantifié la formation d'AFs après 18h de culture sur les VLP-RGD ou sur la fibronectine (**Figure 40A**), en collaboration avec le laboratoire ERRMECe. Nous avons utilisé la vinculine, protéine impliquée dans la formation des AFs, pour quantifier l'intensité de fluorescence et la distribution de ces structures. Le logiciel Cellpose, utilisé pour la segmentation des cellules<sup>212</sup>, a permis de générer un champ vectoriel dans la cellule (segmentation subcellulaire) en partant du noyau comme point central jusqu'à la périphérie (**Figure 40B**). Les profils d'intensité des régions segmentées ont été récupérés pour générer les graphiques (**Figure 40C, D, E, F**). La Figure 40B représente les morphologies moyennes des cellules/noyaux par condition obtenues par l'analyse sur le logiciel Celltool<sup>213</sup>, chacune étant ensuite normalisée et transformée en heatmap en fonction du paramètre mesuré. Les résultats sont représentés avec la densité moyenne de la vinculine (**Figure 40C**) ou le nombre d'AFs (**Figure 40D**) en fonction de la distance normalisée entre la périphérie du noyau (proche de 0) et la membrane des cellules (proche de 1).

La distribution des AFs diffère entre les cellules cultivées sur la fibronectine et celles cultivées sur les VLP-RGD. Sur les VLP-RGD, les AFs sont distribuées de manière hétérogène, avec une accumulation plus importante en périphérie cellulaire, tandis que sur la fibronectine, la distribution est homogène (**Figure 40B et D**). En revanche, le nombre total et la taille moyenne des AFs par cellule restent comparables dans les deux conditions (**Figure 40E et F**).

Il a été montré que la formation de AFs en clusters régule la motilité cellulaire et que leur taille prédit la migration des cellules indépendamment de leur densité et de leur composition moléculaire<sup>223</sup>. Ces travaux ont également montré qu'il n'y a pas de corrélation significative entre le nombre total d'AFs, la densité de leur surface et la vitesse de migration des cellules. En revanche, la vitesse des cellules augmente lorsque la taille des AFs augmente<sup>223</sup>. Bien que la taille moyenne des AFs ne diffèrent pas significativement entre nos deux conditions, les AFs sont préférentiellement localisées en périphérie cellulaire sur les VLP-RGD. Ces observations suggèrent que les VLP-RGD influencent l'organisation spatiale des AFs dans les cellules.

Une distribution périphérique accrue des AFs en réponse aux VLP-RGD pourrait suggérer une modulation de la migration cellulaire. Cette observation pourrait suggérer que la formation de lamellipodes (protrusions membranaires) est plus importante au front des cellules. Or, les cellules cultivées sur les VLP-RGD adoptent une morphologie moins polarisée et une migration moins importante. Cette morphologie moins polarisée pourrait être due à une répartition plus importante des forces d'adhésion en périphérie, limitant la formation de fronts directionnels. Ceci pourrait suggérer un recrutement plus important de clusters d'intégrines à la périphérie des cellules puisqu'il a été établi que l'adhésion cellulaire est renforcée par ces clusters en réponse aux peptides RGD par rapport à la fibronectine<sup>21,222</sup>.

Une autre hypothèse pour expliquer le recrutement important des AFs à la périphérie des cellules cultivées sur les VLP-RGD est leur internalisation. Cette hypothèse pourrait être explorée en utilisant des molécules fluorescentes ciblant le peptide RGD afin de suivre leur localisation au sein des cellules durant leur migration.



**Figure 40 : Les VLP-RGD stimulent un grand nombre d'AFs à la périphérie des cellules C2C12.** (A) Immunomarquage de la vinculine (magenta), des filaments d'actine F (vert) et du noyau (bleu) des cellules C2C12 après 18h de culture sur la fibronectine ou les VLP-RGD adsorbées sur PDMS. Échelle : 30  $\mu$ m. (B) Représentations de la morphologie et de la distribution moyenne du nombre d'AFs des C2C12 en réponse à la fibronectine ou aux VLP-RGD (heatmap). (C) Distribution de la densité de la vinculine (intégrale=1) et (D) du nombre d'AFs en fonction de la distance entre la périphérie du noyau (proche de 0) et la membrane des cellules (proche de 1). (E) Nombre total moyen et (F) la taille moyenne des AFs par cellule en réponse à la fibronectine ou aux VLP-RGD.

## Les VLP-RGD stimulent un recrutement d'un plus grand nombre de récepteurs intégrines $\beta_1$

Nous avons ensuite étudié le recrutement et la localisation des récepteurs intégrines  $\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_1$  dans les cellules, en réponse aux VLP-RGD ou à la fibronectine (**Figure 41E**). Les intégrines  $\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$  ont été marquées pour quantifier la distribution de l'intensité de fluorescence dans les cellules en utilisant les logiciels Cellpose et Celltool comme précédemment. Le nombre de clusters d'intégrines  $\alpha_v\beta_3$  a été quantifié à partir de la périphérie du noyau vers la membrane des cellules (**Figure 41C**).

Nous avons montré que les cellules ensemencées sur les VLP-RGD présentent un signal de fluorescence plus important après immunomarquage des intégrines  $\beta_1$  par rapport à la fibronectine (**Figure 41A**). En revanche, leur distribution est homogène dans les deux conditions (**Figure 41D**).

Le recrutement important d'intégrines  $\beta_1$  en réponse aux VLP-RGD pourrait suggérer une augmentation des forces d'adhésion, favorisée par la forte densité de sites RGD. De nombreux récepteurs intégrines avec une sous-unité  $\beta_1$ , tels que  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$  et  $\alpha_8\beta_1$ <sup>29</sup>, sont spécifiques aux sites RGD, ce qui pourrait expliquer un recrutement élevé de récepteurs intégrines  $\beta_1$  par les VLP-RGD. La présence de 180 peptides RGD à la surface de la VLP pourrait stimuler une formation plus importante de clusters  $\beta_1$  via une signalisation outside-in.

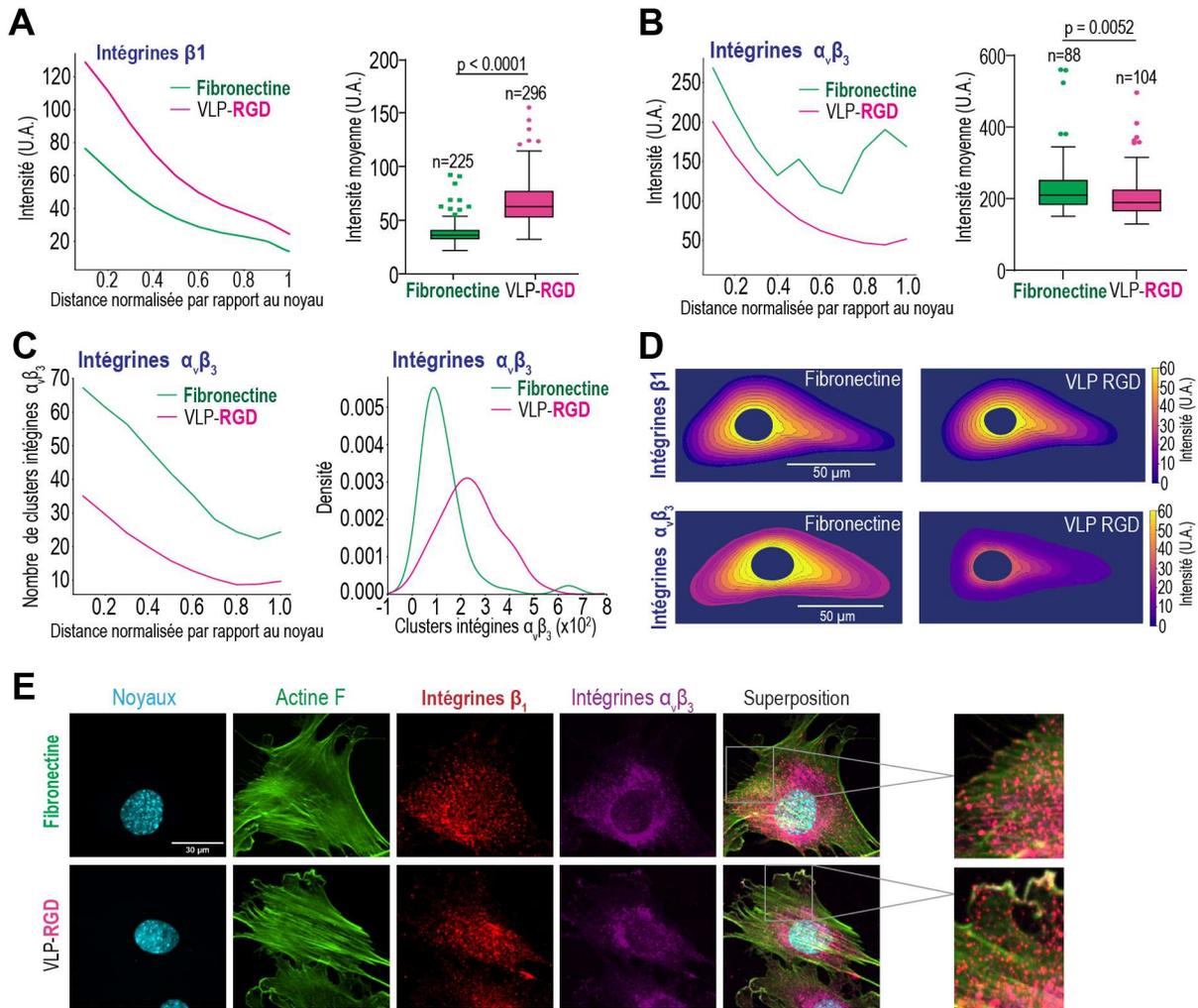
En revanche, la distribution de ces intégrines ne suit pas celle des AFs en réponse aux VLP-RGD, ce qui suggère que d'autres types d'intégrines sont recrutés en périphérie cellulaire.

Il a été démontré que le recrutement des récepteurs intégrines  $\alpha_v\beta_3$  est régulé par les intégrines  $\alpha_5\beta_1$  dans les cellules<sup>226</sup>. Ces deux types de récepteurs intégrines coopèrent durant l'adhérence et la migration des cellules et sont impliqués dans la mécano-signalisation<sup>226</sup>. Nous avons analysé le recrutement et la localisation de ces intégrines dans les cellules en réponse aux VLP-RGD ou à la fibronectine (**Figure 41B, C**). Nous avons montré que les clusters d'intégrines  $\alpha_v\beta_3$  sont plus recrutés dans les cellules cultivées sur la fibronectine, avec un recrutement plus important à proximité du noyau des cellules comparé aux VLP-RGD (**Figure 41B, C, D**).

Le recrutement des intégrines  $\alpha_v\beta_3$  dans la formation des AFs est régulé par les intégrines  $\alpha_5\beta_1$  durant l'étalement des cellules et la maturation des AFs<sup>226</sup>. Ces résultats expliquent l'étalement plus important des cellules sur la fibronectine que sur les VLP-RGD. De plus, les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  sont localisées davantage en périphérie cellulaire en réponse à la fibronectine, ce qui suggère que la maturation des AFs impliquées dans l'adhérence et la migration des cellules est plus importante à la périphérie des cellules. Plus intéressant encore, les VLP-RGD induisent un recrutement moins important des intégrines  $\alpha_v\beta_3$  à la périphérie des cellules, ce qui peut expliquer un étalement et un phénotype migratoire des cellules moins importants.

Les travaux de Lin et al. ont démontré que l'activation des intégrines  $\beta_1$  favorise significativement les forces de traction cellulaires, comparées aux intégrines  $\beta_3$ <sup>233</sup>. La localisation plus

importante des intégrines  $\beta_1$  en réponse aux VLP-RGD pourrait suggérer une activation plus importante de ces intégrines, favorisant ainsi une force de traction cellulaire.

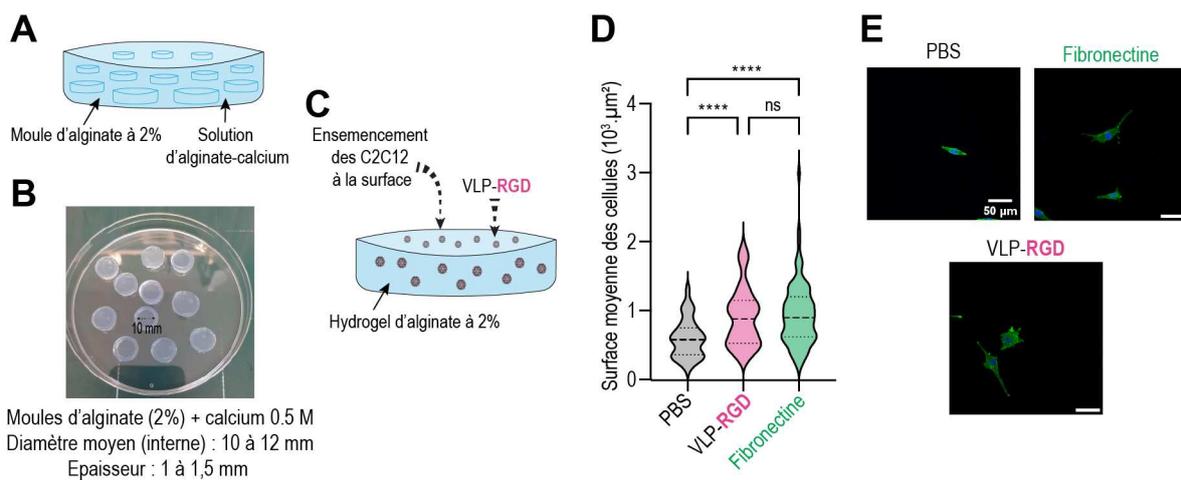


**Figure 41 : Effet de la fibronectine et des VLP-RGD sur le recrutement des récepteurs intégrines  $\beta_1$  et  $\alpha_5\beta_3$  dans les cellules C2C12.** Distribution de l'intensité de fluorescence des intégrines  $\beta_1$  (A) et  $\alpha_5\beta_3$  (B) dans les cellules, avec une représentation de l'intensité de fluorescence moyenne totale (moyenne  $\pm$  SD). Les valeurs de probabilité ont été obtenues par le test-t student. (C) Distribution du nombre de clusters d'intégrines  $\alpha_5\beta_3$  en fonction de la distance normalisée entre la périphérie du noyau à la membrane des cellules. (D) Représentations de la morphologie et de la distribution moyenne de l'intensité des intégrines  $\beta_1$  et  $\alpha_5\beta_3$  dans les C2C12 cultivées sur la fibronectine ou les VLP-RGD (heatmap). (E) Immunomarquage du noyau (bleu), des filaments d'actine F (vert), des intégrines  $\beta_1$  (rouge) et  $\alpha_5\beta_3$  (magenta) des C2C12 après 18h de culture sur la fibronectine et les VLP-RGD adsorbées sur PDMS.

## Des hydrogels d'alginate fonctionnalisés avec les VLP-RGD stimulent l'adhérence des cellules C2C12.

Pour compléter cette étude sur l'adhérence des C2C12 en réponse aux VLP-RGD par rapport à la fibronectine, nous avons évalué leur étalement sur des hydrogels d'alginate (**Figure 42**). Des moules d'hydrogels d'alginate à 2% ont été préparés en présence d'une solution d'alginate et de calcium à 0,5 M pour la réticulation. Après la polymérisation des hydrogels, des moules d'alginate de 1 cm de diamètre ont été obtenus (**Figure 42B**). Les C2C12 ont été cultivées pendant 24h sur ces hydrogels, soit fonctionnalisés avec des VLP-RGD, soit avec de la fibronectine. Les résultats montrent que les hydrogels fonctionnalisés avec les VLP-RGD stimulent un étalement cellulaire significativement plus important que les hydrogels non fonctionnalisés (PBS) (**Figure 42D**). De plus, cet étalement est comparable à celui observé sur les hydrogels fonctionnalisés avec de la fibronectine.

Ces observations montrent l'importance des sites RGD dans la fonctionnalisation de matériaux pour promouvoir l'adhérence cellulaire dans la conception de biomatériaux.



**Figure 42 : Des hydrogels d'alginate fonctionnalisés avec les VLP-RGD stimulent l'adhérence et l'étalement des C2C12.** (A) Schéma illustrant la préparation de moules d'alginate en utilisant une solution d'alginate à 2% supplémentée au calcium à 0.5 M pour la réticulation. (B) Images des moules d'alginate obtenus avec un diamètre interne moyen de 10 à 12 nm et une épaisseur de 1 à 1,5 nm. (C) Schéma d'illustration de l'ensemencement des cellules C2C12 à la surface d'hydrogel d'alginate fonctionnalisé avec les VLP-RGD. (D) Quantification de la surface moyenne des C2C12 cultivées pendant 24h sur des hydrogels d'alginate à 2% fonctionnalisé avec du PBS, les VLP-RGD ou de la fibronectine. Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  SD. Les tests statistiques ont été obtenus par le test one-way ANOVA (Tukey), \*\*\* $p < 0.005$ . (E) Immunomarquage des C2C12 après 24h de culture sur les hydrogels fonctionnalisés avec de la fibronectine et les VLP-RGD ou recouverts de PBS.

## II. Conception de particules multifonctionnelles avec divers peptides bioactifs grâce au couplage SpyCatcher : SpyTag.

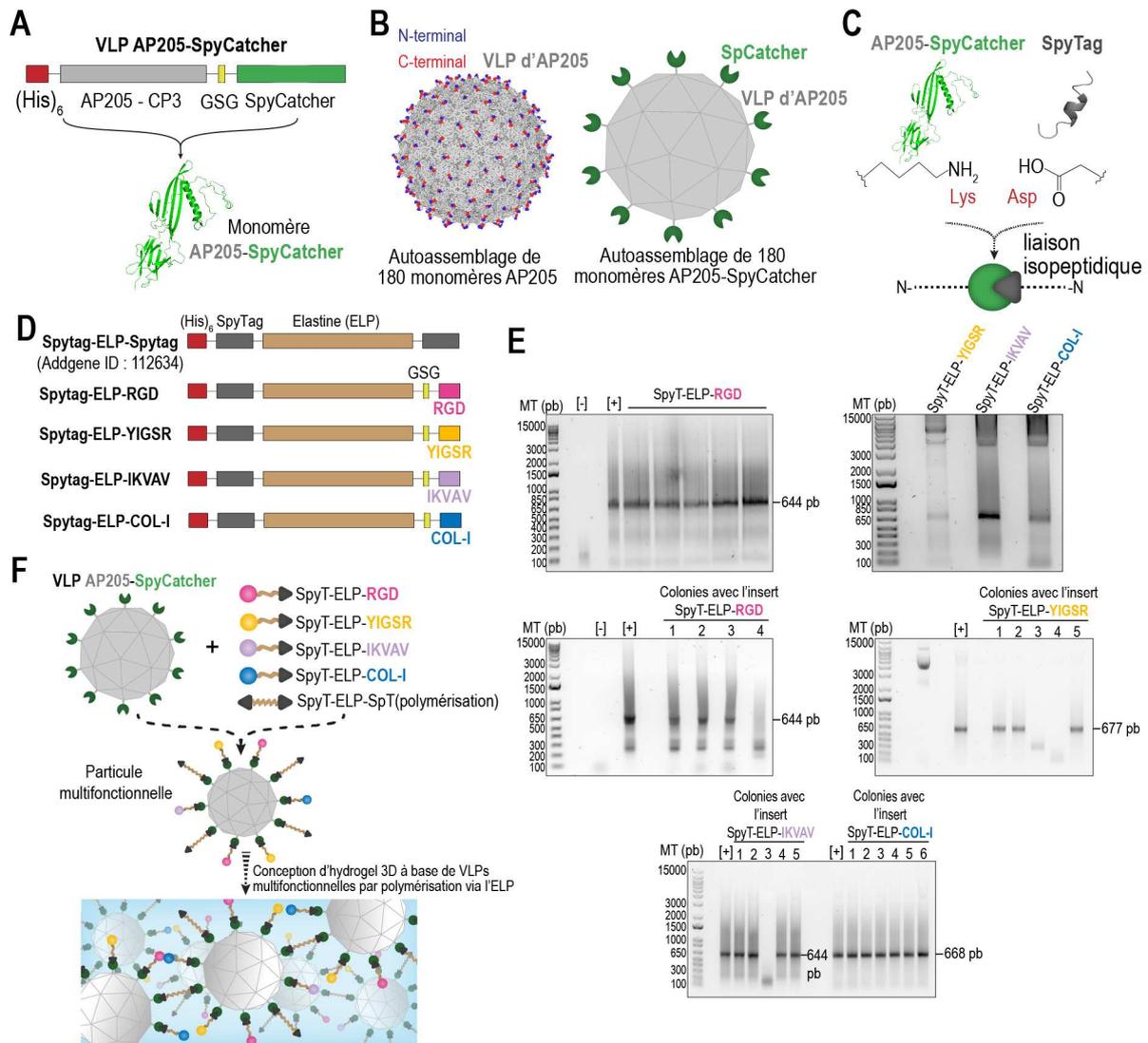
Nos premières études ont démontré l'efficacité de VLPs génétiquement fusionnés à des peptides bioactifs pour stimuler diverses fonctions cellulaires sur des substrats PDMS. En revanche, le contrôle de la stœchiométrie de différents peptides à la surface des VLPs par modification génétique est une des majeures limites de ce système. L'utilisation du système SpyCatcher : SpyTag offre une solution prometteuse pour contrôler la densité et la stœchiométrie de peptides bioactifs à la surface des VLPs SpyCatcher.

Pour la suite du projet, nous avons conçu divers peptides bioactifs couplés à une séquence SpyTag (SpyT) pour former des particules multifonctionnelles en utilisant la particule SpyCatcher d'AP205 (SpyC). Le gène de la capsid d'enveloppe AP205-CP3 est fusionné à une étiquette 6-his en 5' et au gène codant pour le monomère SpyC en 3' (**Figure 43A**). La VLP d'AP205 peut être ainsi utilisée avec le système de couplage SpyC : SpyT pour créer des autoassemblages protéiques multifonctionnels par interaction covalente isopeptidique (**Figure 43A, B, C**). Cela permet l'insertion polyvalente de divers peptides couplés à un SpyT à la surface des VLPs SpyCatcher.

Pour cela, différentes constructions SpyTag-Elastine (ELP) fusionnées à une séquence du peptide RGD, YIGSR, IKVAV ou Collagène - I (COL-I) ont été conçues par clonage moléculaire à partir de la matrice SpyTag-ELP-SpyTag (Addgene ID : 112634) (**Figure 43D**).

L'analyse des colonies de bactéries transformées par PCR montre la présence des inserts SpyT-ELP-RGD, SpyT-ELP-YIGSR, SpyT-ELP-IKVAV et SpyT-ELP-COL-I aux tailles attendues.

Ces différents SpyT-ELP-ligands pourront être utilisés pour fonctionnaliser la particule SpyCatcher, permettant ainsi la conception d'hydrogels 3D par polymérisation via l'ELP (**Figure 43F**).



**Figure 43 : Conception de particules multifonctionnelles avec des peptides bioactifs grâce au couplage SpyCatcher : SpyTag pour la formation d'hydrogel 3D.** (A) Schéma illustratif du gène codant le monomère AP205 SpyCatcher avec le gène de la capside d'enveloppe AP205-CP3 fusionné à une étiquette 6-his et au gène codant pour le monomère SpyCatcher. (B) Illustration de l'assemblage de 180 monomères AP205-SpyCatcher pour former les VLPs. (C) Schéma illustrant l'interaction covalente entre un monomère AP205-SpyCatcher et un SpyTag par liaison isopeptidique, permettant l'attachement covalent de peptides à la surface des VLPs. (D) Schéma illustrant la construction des différents gènes SpyTag-Elastine fusionnés à une séquence du peptide RGD, YIGSR, IKVAV ou Collagène - I (COL-I). (E) Analyse des colonies de bactéries transformées par PCR pour vérifier la présence des inserts SpyTag-ELP-RGD, SpyTag-ELP-YIGSR, SpyTag-ELP-IKVAV et SpyTag-ELP-COL-I. Les bandes correspondent aux tailles attendues des fragments insérés dans le plasmide pet15b par recombinaison homologue. (F) Schéma illustrant la formation de particules multifonctionnelles SpyCatcher présentant divers peptides bioactifs via l'interaction covalente SpyCatcher : SpyTag, pour la conception d'hydrogel 3D par polymérisation via l'ELP.

## Couplage de VLPs SpyCatcher avec divers ligands Spytag

Pour réaliser les tests de couplage SpyC : SpyT, nous avons purifié par chromatographie d'affinité les VLPs SpyCatcher (**Figure 44A**). La Figure 44A montre un pic d'éluion à 280 nm correspondant à l'éluion des VLPs SpyCatcher. La taille attendue du monomère AP205-SpyC a été confirmée par SDS-PAGE en conditions dénaturantes, avec une bande située à environ 37 kDa (**Figure 44B**).

Nous avons réalisé de premiers tests de couplage SpyC : SpyT en utilisant les SpyT-ELP-RGD et les SpyT fluorescents, SpyT-sfGFP (Addgene ID : 133454) et SpyT-mKate2 (Addgene ID : 133452) (Figure 44C). L'utilisation des SpyT fluorescents permet de créer des VLPs fluorescentes facilement détectables par imagerie et spectroscopie, ce qui est utile pour des études ultérieures.

L'interaction covalente entre les ligands SpyT et les VLPs SpyCatcher a été évaluée sous différents ratios moléculaires afin de déterminer le ratio optimal permettant une saturation totale des monomères AP205-SpyC par les ligands SpyT. Les ratios testés sont d'un ligand par monomère (1 : 1) et de deux ligands par monomère (2 : 1). Les associations ont été effectuées pendant 2 heures à température ambiante sous agitation.

Nous avons évalué l'interaction covalente entre les VLPs SpyC et les ligands SpyT par SDS-PAGE en conditions dénaturantes (**Figure 44D**). La Figure 44D montre les tailles moléculaires attendues des protéines seules ou en association avec les VLPs SpyC après leur purification. Les SpyT-mKate2 (29 kDa), SpyT-sfGFP (30 kDa) et SpyT-ELP-RGD (20 kDa) migrent à la taille attendue. Lorsque les ligands SpyT sont associés aux VLPs SpyC à un ratio 1 : 1, on observe un décalage des bandes à environ 60 kDa pour les SpyT fluorescents liés aux monomères AP205-SpyC. On observe également une bande à environ 50 kDa pour les SpyT-ELP-RGD liés aux monomères AP205-SpyC (**Figure 44D**). Ceci démontre l'interaction covalente entre les ligands SpyT et les VLPs SpyC. Avec un ratio 2 : 1, l'interaction entre les ligands SpyT et les VLPs SpyC se produit également, mais on observe des bandes plus intenses correspondant aux ligands non liés aux monomères AP205-SpyC, ce qui indique un excès de SpyT. Cela montre qu'il est possible de saturer la surface des VLPs SpyC avec les ligands SpyT en ajustant les ratios moléculaires, créant ainsi une plateforme de présentation de ligands flexible.

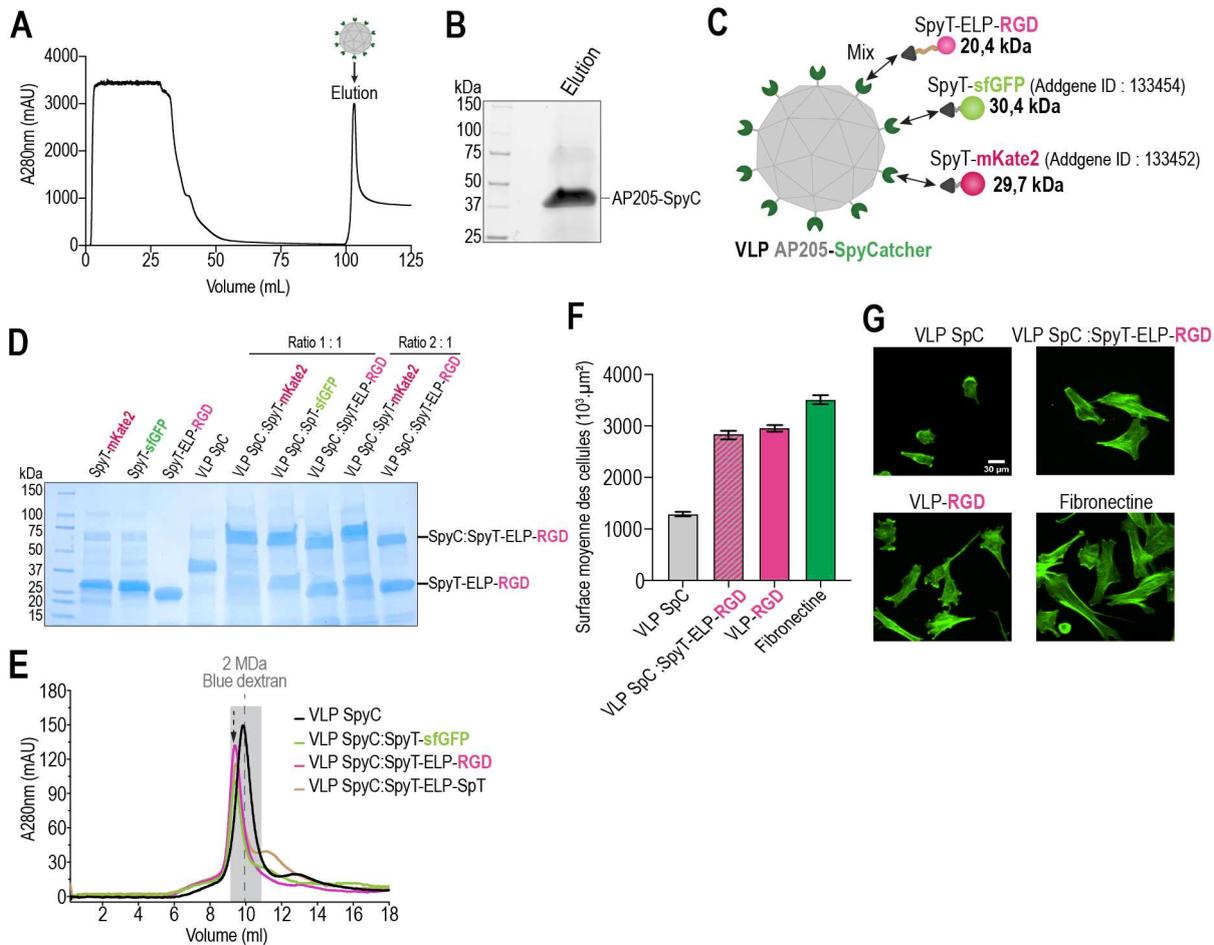
Nous avons pu confirmer l'association covalente entre les VLPs SpyC et les ligands SpyT avec un ratio moléculaire 1 : 1, par chromatographie d'exclusion stérique (**Figure 44E**). Les profils d'exclusion montrent un décalage des pics après l'association des VLPs SpyC avec les SpyT-sfGFP, les SpyT-ELP-RGD et les SpyT-ELP-SpyT (9,8 ml pour les VLPs SpyC seules à 9,3 ml pour les complexes). Les profils d'exclusion révèlent un pic majoritaire dans la région du mégadalton. Ceci indique que la plupart

des ligands SpyT sont liés aux VLPs SpyC, comme démontré précédemment par l'analyse SDS-PAGE en utilisant un ratio 1 : 1.

Ces résultats démontrent que le système de couplage SpyC : SpyT est efficace pour créer des VLPs fonctionnalisées avec divers peptides. En ajustant les ratios moléculaires, il est possible de contrôler la densité de ligands à la surface des VLPs, offrant une plateforme polyvalente pour des applications en biomatériaux.

Nous avons étudié l'adhérence et l'étalement des C2C12 en réponse aux particules SpyC : SpyT-ELP-RGD, comparées aux VLP-RGD utilisées dans nos travaux initiaux, afin de démontrer la disponibilité des peptides RGD associés à l'élastine (ELP) (**Figure 44F, G**). Les C2C12 ont été cultivées pendant 18h sur les VLPs SpyC seuls, les complexes SpyC VLP : SpyT-ELP-RGD, les VLP-RGD et la fibronectine, adsorbés sur PDMS. Les résultats montrent un étalement significatif des C2C12 sur les complexes SpyC VLP : SpyT-ELP-RGD comparé aux VLPs SpyC seuls, et de façon comparable à celui observé avec les VLP-RGD. Ceci montre que l'élastine n'affecte pas la disponibilité des peptides RGD à la surface des VLPs SpyC.

Ces résultats démontrent la faisabilité de créer des complexes SpyC : SpyT multifonctionnels et leur potentiel pour la formation d'hydrogels 3D via la polymérisation de l'élastine.



**Figure 44 : Couplage des VLPs SpyCatcher avec les ligands SpyT.** (A) Chromatogramme de purification des VLPs SpyC par affinité à 280 nm. (B) Analyse SDS-PAGE en conditions dénaturantes de VLPs SpyC après élution par chromatographie d'affinité. (C) Schéma de la construction des VLPs SpyC avec les SpyT-ELP-RGD, les SpyT-sfGFP (Addgene ID : 133454) et les SpyT-mKate2 (Addgene ID : 133452) pour obtenir des VLPs fonctionnalisées. (D) Analyse par SDS-PAGE en conditions dénaturantes des VLPs SpyC et des ligands SpyT seuls et après association covalente (2h à température ambiante) à différents ratios moléculaires (1 : 1 ou 2 : 1). (E) Profils d'exclusion à 280 nm des VLPs SpyC seuls et après association avec les ligands SpyT. (F) Quantification de la surface d'étalement (moyenne ± SEM) des C2C12 à partir de (G) l'immunomarquage des C2C12 (Actin F : vert) après 18h de culture sur les VLPs SpyC seules, les complexes SpyC : SpyT-ELP-RGD, les VLP-RGD ou la fibronectine, adsorbés sur PDMS.

### Conception de VLPs SpyC fusionnées aux SpyT-rhBMP2 comme plateformes de stimulation de l'ostéogénèse.

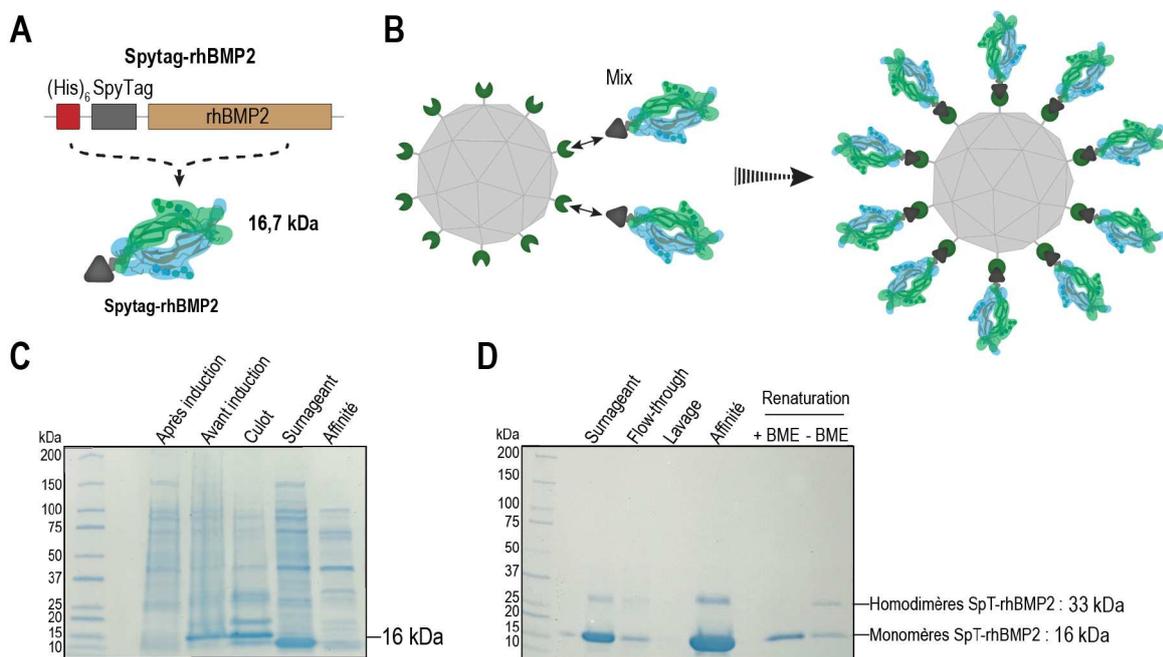
Dans nos études précédentes, les peptides BMP2 à la surface des VLPs n'ont pas montré d'effet sur la différenciation des C2C12 en ostéoblastes. Nous avons alors développé une construction contenant la séquence de la protéine recombinante humaine 2 (rhBMP2) entière fusionnée à une

étiquette 6-his et à une séquence SpyT à partir de la matrice SpyT-ELP-SpyT (**Figure 45A**). L'insertion de SpyTag permet de fonctionnaliser la surface des VLPs SpyC (**Figure 45B**).

Nous avons produit les SpyT-rhBMP2 dans les bactéries *E. coli* BL21 et les avons purifiés à partir des corps d'inclusion des bactéries en conditions dénaturantes (**Figure 45C**). Les SpyT-rhBMP2 purifiés en conditions dénaturantes ont été renaturés en se basant sur des protocoles de production et de renaturation de la rhBMP2 à partir des corps d'inclusion d'*E. coli* dans la littérature<sup>227-229</sup>. La renaturation de la rhBMP2 permet la formation des trois ponts disulfures nécessaires à son assemblage en homodimère, à sa bioactivité et à sa reconnaissance par les récepteurs BMPR-I et II.

Nous avons purifié les SpyT-rhBMP2 par affinité à partir des corps d'inclusion en conditions dénaturantes, avec une bande majoritaire observée à la taille attendue des monomères SpyT-rhBMP2 (**Figure 45D**). Après renaturation, on observe la présence d'une bande correspondant à la taille de l'homodimère SpyT-rhBMP2, à environ 33 kDa, en l'absence d'agent réducteur BME (**Figure 45D**). En revanche, il reste une fraction de SpyT-rhBMP2 non renaturés avec une bande située à environ 16 kDa.

Des optimisations de protocole sont encore nécessaires pour permettre la renaturation complète des SpyT-rhBMP2, un processus chronophage qui n'a pu être achevé durant les travaux de cette thèse.



**Figure 45 : Conception de VLPs SpyCatcher fusionnées aux SpyT-rhBMP2 pour stimuler la différenciation ostéogénique.** (A) Schéma de la construction de SpyT-rhBMP2. La séquence de la rhBMP2 est fusionnée à une étiquette 6-his et à la séquence SpyT en N-terminal, formant un complexe de 16,7 kDa. (B) Schéma illustrant la fonctionnalisation de VLPs SpC avec les SpyT-rhBMP2. (C) Analyse SDS-PAGE en conditions dénaturantes des étapes de production et de purification des SpyT-rhBMP2. (D) Analyse SDS-PAGE en conditions dénaturantes des étapes de purification et de renaturation des SpyT-rhBMP2.

(D) Analyse SDS-PAGE de l'étape de purification de renaturation des SpyT-rhBMP2 à partir des corps d'inclusion après purification par affinité avec les billes d'agarose Ni-NTA.

## Conclusion et perspectives

### VLPs hétéromériques : Des nano-plateformes multifonctionnelles

Les résultats de cette thèse démontrent le potentiel des VLPs en tant que plateformes polyvalentes pour présenter différents peptides capables de stimuler diverses fonctions cellulaires. Notre étude souligne leur capacité à mimer les interactions cellule-MEC *in vivo* (Figure 46).

Nous avons montré que de multiples peptides peuvent être affichés à la surface des VLPs tout en préservant leur bioactivité. Les VLPs hétéromériques présentant le peptide RGD favorisent l'adhérence, la prolifération et la différenciation cellulaire. Cette présentation sphérique des peptides maximise leur exposition aux récepteurs cellulaires, offrant de nouvelles perspectives pour le développement de biomatériaux. Ces particules peuvent être utilisées pour fonctionnaliser des substrats de culture cellulaire. De plus, la combinaison de différents motifs peptidiques à la surface d'une même VLP permet d'étudier de nouvelles synergies entre les peptides issus de protéines de la MEC.

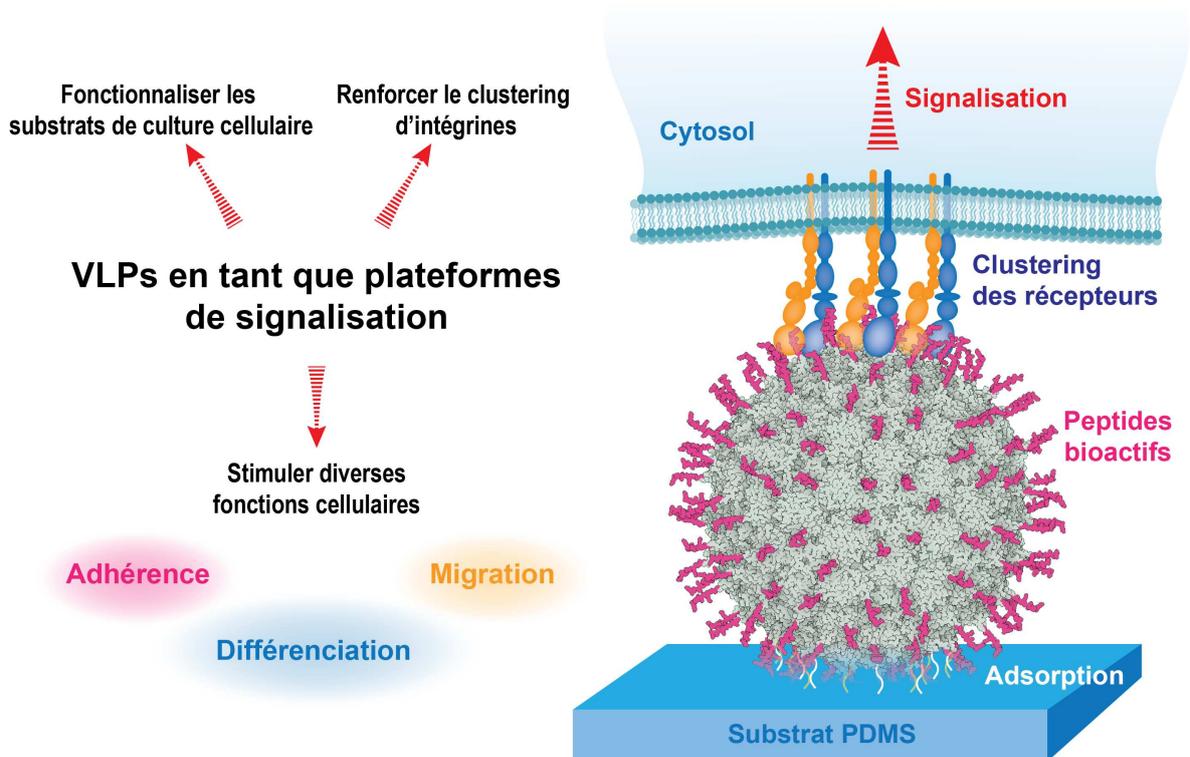


Figure 46 : VLPs en tant que plateformes de signalisation pour stimuler diverses fonctions cellulaires.

Un contrôle précis de la présentation des peptides à la surface des VLPs est crucial pour optimiser les interactions avec les récepteurs cellulaires. En particulier, la capacité des VLPs à favoriser le clustering des intégrines ouvre de nouvelles perspectives pour moduler la signalisation cellulaire et contrôler les processus biologiques. Une meilleure compréhension de ces assemblages peptidiques à l'échelle nanométrique sur le comportement cellulaire est essentielle pour concevoir de nouveaux biomatériaux innovants, notamment dans le domaine de la régénération tissulaire. Ce projet souligne l'avantage significatif de développer des VLPs fonctionnalisées par des moyens génétiques, permettant une fonctionnalisation encodable de ces nanoplateformes. Néanmoins, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour optimiser la production et la reproductibilité de ces VLPs fonctionnalisées, afin de garantir leur efficacité et leur stabilité dans divers environnements biologiques.

### ***VLP-RGD : Vers de nouvelles stratégies thérapeutiques***

Nos résultats indiquent que les VLP-RGD stimulent l'étalement et la motilité cellulaire, bien que ces effets soient moins marqués que ceux de la fibronectine. Les VLP-RGD, en concentrant 180 peptides sur une seule particule de 30 nm avec un espacement estimé à au moins 4 nm, offrent une grande densité de ligands. Étant donné que la largeur de la partie extracellulaire d'une intégrine  $\alpha_v\beta_3$  a été estimée à environ 3,1 Å (soit 0,31 nm), il est possible qu'un grand nombre de peptides RGD d'une même VLP interagissent potentiellement avec plusieurs intégrines<sup>224</sup>. Dans nos travaux, les VLP-RGD stimulent le recrutement des intégrines  $\beta_1$  et de  $\alpha_v\beta_3$  en clusters. Ces observations suggèrent que ces particules favorisent l'assemblage de complexes d'adhésion intégrine-cytosquelette nécessaires à la transmission des signaux d'adhésion, de prolifération et de différenciation.

Le RGD à la surface des VLPs peut être utilisé pour faciliter l'adhérence cellulaire via les récepteurs intégrines, afin de cibler les cellules cancéreuses dans les applications de nanomédecine. Les peptides RGD ont fait l'objet de nombreuses recherches en vue de leur utilisation en biotechnologie et en médecine, particulièrement récemment pour le ciblage du cancer<sup>230</sup>. Les VLP-RGD peuvent être utilisées pour désagréger et inhiber la formation de sphéroïdes. Nous avons réalisé des tests de formation de sphéroïdes en présence de VLP-RGD, de VLPs sans peptides ou de fibronectine pendant 20h et 60h, en collaboration avec les laboratoires ERRMECe et ENS. Lors de ces premiers tests, nous avons observé une diminution significative de l'aire des sphéroïdes en présence de VLP-RGD par rapport à la fibronectine après 20h et 60h. Des tests supplémentaires sont encore nécessaires pour compléter ces résultats. Ces observations ouvrent de nouvelles perspectives sur l'utilisation de VLP-RGD pour inhiber la formation de sphéroïdes en ciblant des intégrines spécifiques surexprimées dans certains cancers<sup>230</sup>. Nos résultats montrent également que les VLP-RGD réduisent significativement la

motilité cellulaire comparée à la fibronectine, suggérant leur potentiel pour limiter la migration de cellules cancéreuses.

Le couplage de peptides RGD avec d'autres motifs peptidiques bioactifs à la surface des VLPs peut également s'avérer prometteur pour améliorer l'efficacité de l'administration des médicaments<sup>230</sup>. Ceci constitue une alternative aux systèmes d'administration de médicaments à base de peptides, qui présentent certaines limites (ex. ciblage, biodisponibilité, instabilité *in vivo*)<sup>231</sup>. Certains peptides sont sensibles à la dégradation protéolytique ou enzymatique. Pour limiter cela, la surface de la VLP peut servir de plateforme stable et robuste pour la co-présentation de peptides RGD et antimicrobiens pour favoriser l'implantation de biomatériaux en réduisant le risque d'infection.

### ***Limites de l'utilisation de ce système***

Dans notre système actuel, la stœchiométrie à la surface des particules est directement liée à la force des promoteurs, ce qui entraîne un rapport stœchiométrique de un pour un. De ce fait, il est difficile d'ajuster la stœchiométrie par des moyens génétiques, et il est également complexe de produire des particules présentant plus de deux peptides différents. En outre, l'expression de protéines entières à la surface des VLPs, telle que la rhBMP2, reste un défi.

Une possibilité, que nous avons commencé à explorer, consiste à ajouter les peptides dans une deuxième étape en utilisant les systèmes de couplage SpyCatcher : SpyTag, qui a été utilisé avec succès pour développer des vaccins multivalents. Cela permettrait de combiner plusieurs peptides à la surface des VLPs avec une stœchiométrie spécifique. Ce système est prometteur non seulement pour le développement de vaccins, mais aussi dans la conception d'hydrogels 3D<sup>208,209</sup>. Nous avons démontré l'efficacité de ce système pour conjuguer des peptides à la surface des VLPs à différentes stœchiométries, ouvrant des perspectives pour l'élaboration d'hydrogels 3D multifonctionnels. De plus, nous avons pu concevoir par clonage moléculaire, et produire la protéine entière rhBMP2 fusionnée au SpyTag, afin de pallier les résultats non concluants de la bioactivité du peptide BMP2 sur la différenciation ostéogénique.

Pour la continuité du projet, nous avons conçu diverses protéines de fusion SpyTag-élastine combinées à des peptides bioactifs dérivés du collagène I (GLPGER), de la laminine (YIGSR et IKVAV) et de la fibronectine (RGD). Ces constructions seront utilisées dans un projet ANR visant à développer des réseaux protéiques multifonctionnels. L'objectif est de créer des échafaudages 3D par photopolymérisation, qui serviront de supports pour la présentation de ligands SpyTag. Ces ligands interagiront avec les VLPs SpyCatcher, pour construire des interfaces matériaux/cellules. Le second objectif est de fusionner des polymères PEG-PLA (poly(éthylène glycol)-polylactide) aux SpyTag. Ces co-polymères interagiront avec les VLPs SpyCatcher pour former des élastomères et des hydrogels 3D.

Ces matériaux offriront des propriétés mécaniques et une dégradation ajustables en fonction des applications envisagées.

Annexes

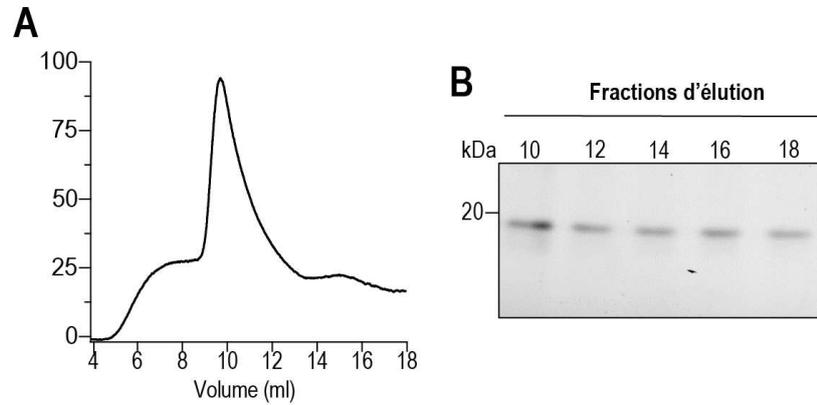


Figure 47 : (A) Profil d'exclusion des VLPs d'AP205 à 280 nm. (B) Gel SDS-PAGE des fractions d'élution VLPs d'AP205, récoltées après la chromatographie d'exclusion stérique.

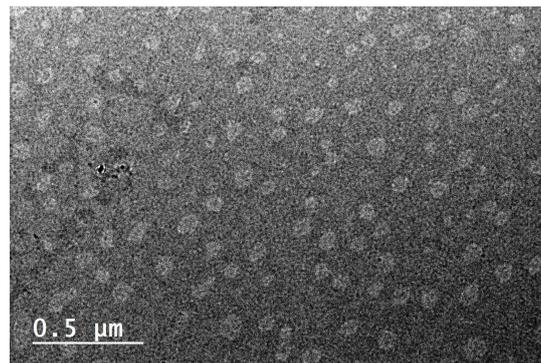


Figure 48 : Image TEM des VLP-RGD (coloration négative). Les VLP-RGD adsorbées sur des grilles de microscopie électronique en carbone/formvar.

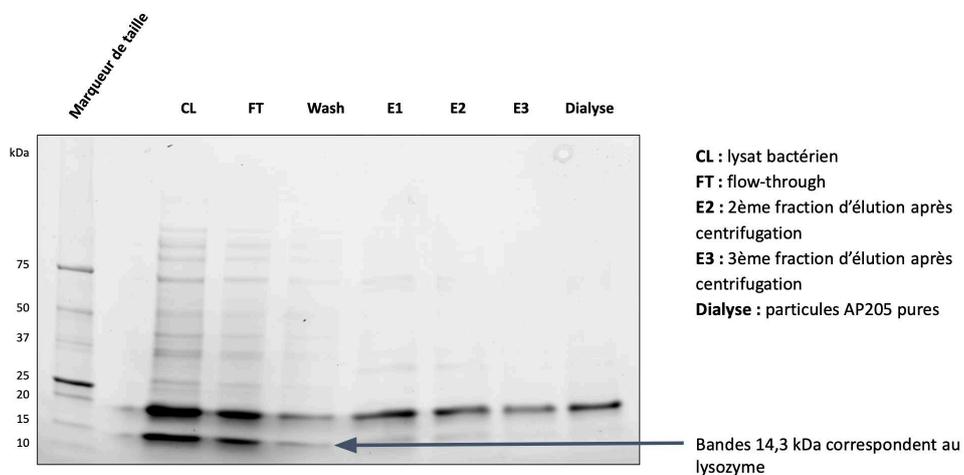


Figure 49 : Gel SDS-PAGE des étapes de production et de purification des VLPs d'AP205.

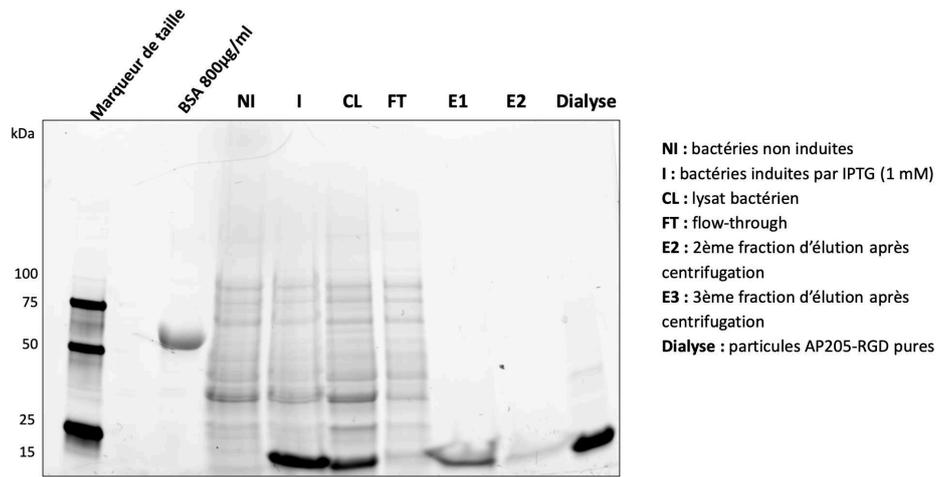


Figure 50 : Gel SDS-PAGE des étapes de production et de purification des VLP-RGD.

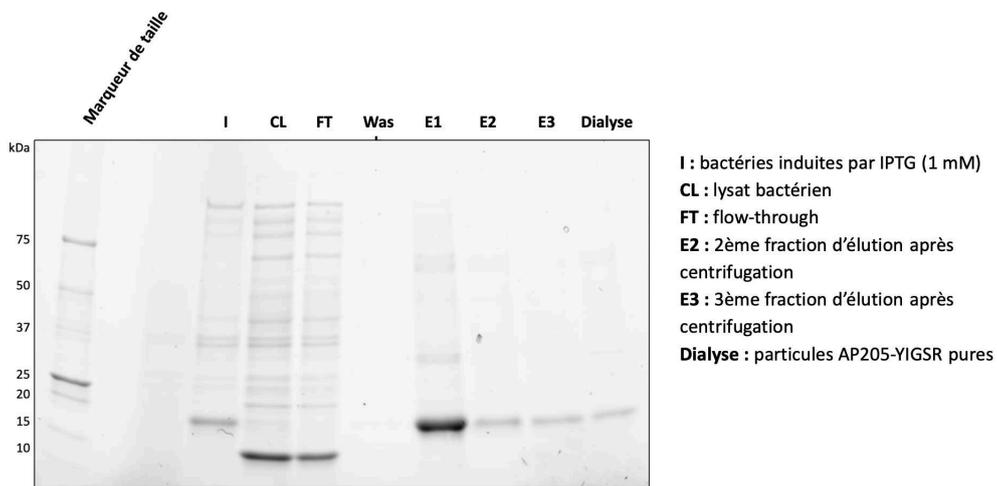


Figure 51 : Gel SDS-PAGE des étapes de production et de purification des VLP-YIGSR.

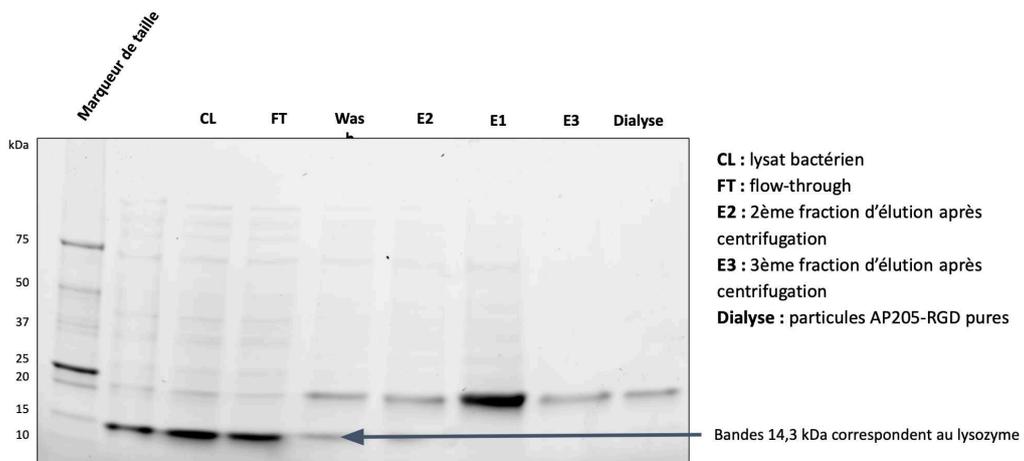


Figure 52 : Gel SDS-PAGE des étapes de production et de purification des VLP-BMP2.

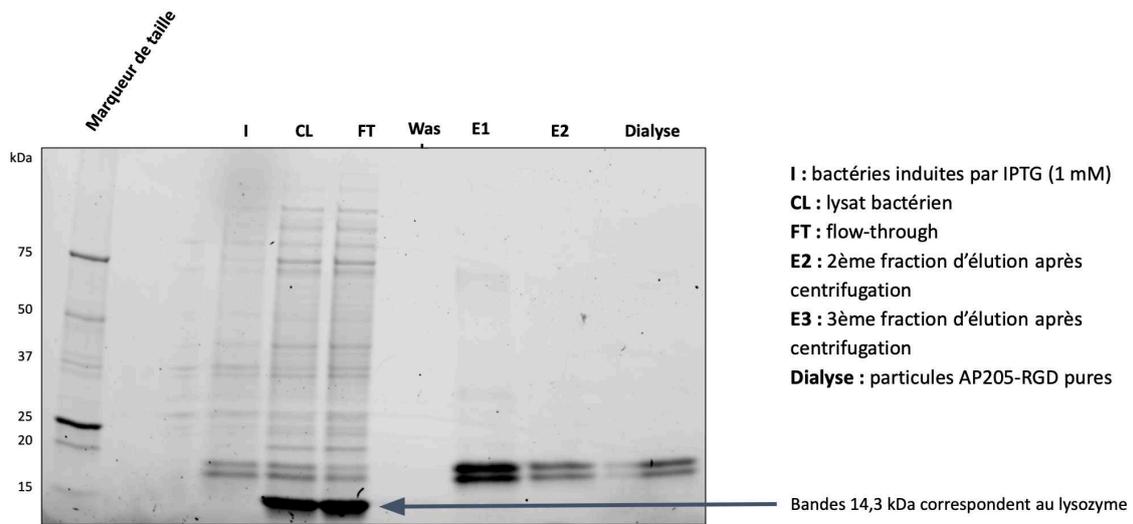


Figure 53 : Gel SDS-PAGE des étapes de production et de purification des VLP RGD-BMP2.

## Appendice

### Liste des communications

#### Publication :

- Hasna Maayouf, Thomas Dos Santos, Alphonse Boche, Rayane Hedna, Kaspars Tars, Isabelle Brigaud, Tatiana Petithory, Franck Carreiras, Carole Arnold, Ambroise Lambert, Laurent Pieuchot. 2024. "Biomimetic Virus-Like Particles to Control Cell Functions." *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.09.14.612851>.

*Article soumis à Trends in Biotechnology et accessible sur BioRxiv.*

#### Présentations orales :

- **SFBMEc conference, Strasbourg, du 16 au 17 Novembre 2023**

Hasna Maayouf, Thomas Dos-Santos, Isabelle Brigaud, Tatiana Petithory, Carole Arnold and Laurent Pieuchot

*Virus-Like Particles as nano-signaling platforms to control cell behavior.*

- **Annual meeting IS2M, Mulhouse, 1er au 2 Juin 2023**

Hasna Maayouf, Thomas Dos-Santos, Isabelle Brigaud, Tatiana Petithory, Carole Arnold and Laurent Pieuchot

*Virus-Like Particles as nano-signaling platforms to control cell behavior.*

- **Young Scientist Day IS2M, Mulhouse, 13 Avril 2023**

Hasna Maayouf, Thomas Dos-Santos, Isabelle Brigaud, Tatiana Petithory, Carole Arnold and Laurent Pieuchot

*Virus-Like Particles as nano-signaling platforms to control cell behavior.*

- **ITI FunMat PhD day, Strasbourg, 15 Septembre 2023**

Hasna Maayouf, Thomas Dos-Santos, Isabelle Brigaud, Tatiana Petithory, Carole Arnold and Laurent Pieuchot

*Virus-Like Particles as nano-signaling platforms to control cell behavior.*

- **Colloque ENSCMu, Mulhouse, 15 décembre 2022**

Hasna Maayouf, Thomas Dos-Santos, Isabelle Brigaud, Tatiana Petithory, Carole Arnold and Laurent Pieuchot

*Virus-Like Particles as nano-signaling platforms to control cell behavior.*

- **European Society of Biomaterials Congress (ESB), Bordeaux, du 4 au 08 Septembre 2022**

Hasna Maayouf, Thomas Dos-Santos, Isabelle Brigaud, Tatiana Petithory, Carole Arnold and Laurent Pieuchot

*Development of Virus-Like Particle platforms for the control of cell fate.*

**Posters :**

- **Young Scientist Day IS2M, Mulhouse, 14 Mars 2024**

Hasna Maayouf, Thomas Dos-Santos, Isabelle Brigaud, Tatiana Petithory, Carole Arnold and Laurent Pieuchot

*Virus-Like Particles as signaling platforms to control cell behavior.*

- **Summer School ITI, Strasbourg, du 4 au 7 Juillet 2023**

Hasna Maayouf, Thomas Dos-Santos, Isabelle Brigaud, Tatiana Petithory, Carole Arnold and Laurent Pieuchot

*Virus-Like Particles as nano-signaling platforms to control cell behavior.*

- **ITI HiFunMat Scientific PhD day, Strasbourg, 21 Avril /2022**

Hasna Maayouf, Thomas Dos-Santos, Isabelle Brigaud, Tatiana Petithory, Carole Arnold and Laurent Pieuchot

*Virus-Like Particles as nano-signaling platforms to control cell behavior.*

- **Congrès PhD Ecole Doctorale PCP, Strasbourg, 30 Mars 2022**

Hasna Maayouf, Thomas Dos-Santos, Isabelle Brigaud, Tatiana Petithory, Carole Arnold and Laurent Pieuchot

*Development of Virus-Like Particle platforms for the control of cell fate.*

## Références

1. Lotfi, M., M. Nejib, M. Naceur, M. Lotfi, M. Nejib, and M. Naceur. 2013. *Cell Adhesion to Biomaterials: Concept of Biocompatibility. Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/53542>.
2. Inayat-hussain, S, N F Rajab, and E L Siew. 2009. "20 - In Vitro Testing of Biomaterials Toxicity and Biocompatibility." In *Cellular Response to Biomaterials*, edited by Lucy Di Silvio, 508–37. Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845695477.3.508>.
3. Parisi, Ludovica, Andrea Toffoli, Giulia Ghiacci, and Guido M. Macaluso. 2018. "Tailoring the Interface of Biomaterials to Design Effective Scaffolds." *Journal of Functional Biomaterials* 9 (3): 50. <https://doi.org/10.3390/jfb9030050>.
4. Francis, Arul Prakash, Akshaya Rani Augustus, Sathyapriya Chandramohan, Suhail Ahmad Bhat, Veeraraghavan Vishnu Priya, and Rukkumani Rajagopalan. 2023. "A Review on Biomaterials-Based Scaffold: An Emerging Tool for Bone Tissue Engineering." *Materials Today Communications* 34 (March):105124. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.105124>.
5. Theocharis, Achilleas D., Spyros S. Skandalis, Chrysostomi Gialeli, and Nikos K. Karamanos. 2016. "Extracellular Matrix Structure." *Advanced Drug Delivery Reviews, Extracellular Matrix (ECM) and ECM-like materials: Therapeutic Tools and Targets in Cancer Treatment*, 97 (February):4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.
6. "The Extracellular Matrix: Its Composition, Function, Remodeling, and Role in Tumorigenesis - PMC." n.d. Accessed June 12, 2024. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10123695/>.
7. Shao, Xinhao, Clarissa D Gomez, Nandini Kapoor, James M Considine, Christopher Grams, Yu (Tom) Gao, and Alexandra Naba. 2023. "MatrisomeDB 2.0: 2023 Updates to the ECM-Protein Knowledge Database." *Nucleic Acids Research* 51 (D1): D1519–30. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1009>.
8. Xue, Meilang, and Christopher J. Jackson. 2015. "Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring." *Advances in Wound Care* 4 (3): 119–36. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0485>.
9. Wight, T. N., M. G. Kinsella, and E. E. Qvarnström. 1992. "The Role of Proteoglycans in Cell Adhesion, Migration and Proliferation." *Current Opinion in Cell Biology* 4 (5): 793–801. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(92\)90102-i](https://doi.org/10.1016/0955-0674(92)90102-i).
10. Deshmukh, Shrutal Narendra, Alka M Dive, Rohit Moharil, and Prashant Munde. 2016. "Enigmatic Insight into Collagen." *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP* 20 (2): 276–83. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.185932>.
11. Yue, Beatrice. 2014. "Biology of the Extracellular Matrix: An Overview." *Journal of Glaucoma* 23 (November): S20. <https://doi.org/10.1097/IJG.000000000000108>.

12. Dalton, Caleb J., and Christopher A. Lemmon. 2021. "Fibronectin: Molecular Structure, Fibrillar Structure and Mechanochemical Signaling." *Cells* 10 (9): 2443. <https://doi.org/10.3390/cells10092443>.
13. Hohenester, Erhard. 2019. "Structural Biology of Laminins." *Essays in Biochemistry* 63 (3): 285–95. <https://doi.org/10.1042/EBC20180075>.
14. Domogatskaya, Anna, Sergey Rodin, and Karl Tryggvason. 2012. "Functional Diversity of Laminins." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28 (1): 523–53. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155750>.
15. Schwartz, Iris, Dalia Seger, and Shmuel Shaltiel. 1999. "Vitronectin." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31 (5): 539–44. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00005-9).
16. Aplin, A. E., A. Howe, S. K. Alahari, and R. L. Juliano. 1998. "Signal Transduction and Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors: The Role of Integrins, Cadherins, Immunoglobulin-Cell Adhesion Molecules, and Selectins." *Pharmacological Reviews* 50 (2): 197–263.
17. Danen, Erik H. J. 2013. "Integrins: An Overview of Structural and Functional Aspects." In *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Landes Bioscience. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6259/>.
18. Kanchanawong, Pakorn, Gleb Shtengel, Ana M. Pasapera, Ericka B. Ramko, Michael W. Davidson, Harald F. Hess, and Clare M. Waterman. 2010. "Nanoscale Architecture of Integrin-Based Cell Adhesions." *Nature* 468 (7323): 580–84. <https://doi.org/10.1038/nature09621>.
19. Lustig, L., and B. Denduchis. 1993. "[Integrins: a family of cell adhesion receptors]." *Medicina* 53 (4): 357–63.
20. Lee, Kuen Yong, Eben Alsberg, Susan Hsiong, Wendy Comisar, Jennifer Linderman, Robert Ziff, and David Mooney. 2004. "Nanoscale Adhesion Ligand Organization Regulates Osteoblast Proliferation and Differentiation." *Nano Letters* 4 (8): 1501–6. <https://doi.org/10.1021/nl0493592>.
21. Koo, Lily Y., Darrell J. Irvine, Anne M. Mayes, Douglas A. Lauffenburger, and Linda G. Griffith. 2002. "Co-Regulation of Cell Adhesion by Nanoscale RGD Organization and Mechanical Stimulus." *Journal of Cell Science* 115 (7): 1423–33. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.7.1423>.
22. Schwartzman, Mark, Matteo Palma, Julia Sable, Justin Abramson, Xian Hu, Michael P. Sheetz, and Shalom J. Wind. 2011. "Nanolithographic Control of the Spatial Organization of Cellular Adhesion Receptors at the Single-Molecule Level." *Nano Letters* 11 (3): 1306–12. <https://doi.org/10.1021/nl104378f>.
23. Humphries, Jonathan D., Adam Byron, and Martin J. Humphries. 2006. "INTEGRIN LIGANDS." *Journal of Cell Science* 119 (Pt 19): 3901–3. <https://doi.org/10.1242/jcs.03098>.

24. Pang, Xiacong, Xu He, Zhiwei Qiu, Hanxu Zhang, Ran Xie, Zhiyan Liu, Yanlun Gu, Nan Zhao, Qian Xiang, and Yimin Cui. 2023. "Targeting Integrin Pathways: Mechanisms and Advances in Therapy." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8 (1): 1–42. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01259-6>.
25. Shen, Bo, M Keegan Delaney, and Xiaoping Du. 2012. "Inside-out, Outside-in, and inside–Outside-in: G Protein Signaling in Integrin-Mediated Cell Adhesion, Spreading, and Retraction." *Current Opinion in Cell Biology, Cell-to-cell contact and extracellular matrix*, 24 (5): 600–606. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.08.011>.
26. Karamanos, Nikos K., Achilleas D. Theocharis, Zoi Piperigkou, Dimitra Manou, Alberto Passi, Spyros S. Skandalis, Demitrios H. Vynios, et al. 2021. "A Guide to the Composition and Functions of the Extracellular Matrix." *The FEBS Journal* 288 (24): 6850–6912. <https://doi.org/10.1111/febs.15776>.
27. Ivaska, Johanna, and Jyrki Heino. 2011. "Cooperation Between Integrins and Growth Factor Receptors in Signaling and Endocytosis." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27 (1): 291–320. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154017>.
28. Eliceiri, Brian P. 2001. "Integrin and Growth Factor Receptor Crosstalk." *Circulation Research* 89 (12): 1104–10. <https://doi.org/10.1161/hh2401.101084>.
29. Aplin, A. E., A. Howe, S. K. Alahari, and R. L. Juliano. 1998. "Signal Transduction and Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors: The Role of Integrins, Cadherins, Immunoglobulin-Cell Adhesion Molecules, and Selectins." *Pharmacological Reviews* 50 (2): 197–263.
30. Miyamoto, S, H Teramoto, J S Gutkind, and K M Yamada. 1996. "Integrins Can Collaborate with Growth Factors for Phosphorylation of Receptor Tyrosine Kinases and MAP Kinase Activation: Roles of Integrin Aggregation and Occupancy of Receptors." *Journal of Cell Biology* 135 (6): 1633–42. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.6.1633>.
31. Jones, Michael J., and Matthew C. Jones. 2024. "Cell Cycle Control by Cell-Matrix Interactions." *Current Opinion in Cell Biology* 86 (February):102288. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2023.102288>.
32. Velthoven, Cindy T. J. van, and Thomas A. Rando. 2019. "Stem Cell Quiescence: Dynamism, Restraint, and Cellular Idling." *Cell Stem Cell* 24 (2): 213–25. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.01.001>.
33. Moreno-Layseca, Paulina, and Charles H. Streuli. 2014. "Signalling Pathways Linking Integrins with Cell Cycle Progression." *Matrix Biology* 34 (February):144–53. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.10.011>.
34. Seetharaman, Shailaja, and Sandrine Etienne-Manneville. 2020. "Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration." *Trends in Cell Biology* 30 (9): 720–35. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.06.004>.
35. Oudin, Madeleine J., and Valerie M. Weaver. 2016. "Physical and Chemical Gradients in the Tumor Microenvironment Regulate Tumor Cell Invasion, Migration, and Metastasis." *Cold Spring*

- Harbor Symposia on Quantitative Biology* 81 (January):189–205. <https://doi.org/10.1101/sqb.2016.81.030817>.
36. Friedl, Peter. 2004. "Prespecification and Plasticity: Shifting Mechanisms of Cell Migration." *Current Opinion in Cell Biology* 16 (1): 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.11.001>.
  37. Burridge, K., and M. Chrzanowska-Wodnicka. 1996. "Focal Adhesions, Contractility, and Signaling." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12:463–518. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.463>.
  38. Vicente-Manzanares, Miguel, Donna J. Webb, and A. Rick Horwitz. 2005. "Cell Migration at a Glance." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 21): 4917–19. <https://doi.org/10.1242/jcs.02662>.
  39. Ridley, Anne J., Martin A. Schwartz, Keith Burridge, Richard A. Firtel, Mark H. Ginsberg, Gary Borisy, J. Thomas Parsons, and Alan Rick Horwitz. 2003. "Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back." *Science* 302 (5651): 1704–9. <https://doi.org/10.1126/science.1092053>.
  40. Loreti, Mafalda, and Alessandra Sacco. 2022. "The Jam Session between Muscle Stem Cells and the Extracellular Matrix in the Tissue Microenvironment." *Npj Regenerative Medicine* 7 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41536-022-00204-z>.
  41. Carraro, Eugenia, Lucia Rossi, Edoardo Maghin, Marcella Canton, and Martina Piccoli. 2022. "3D in Vitro Models of Pathological Skeletal Muscle: Which Cells and Scaffolds to Elect?" *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10 (July). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.941623>.
  42. Barraza-Flores, Pamela, Christina R. Bates, Ariany Oliveira-Santos, and Dean J. Burkin. 2020. "Laminin and Integrin in LAMA2-Related Congenital Muscular Dystrophy: From Disease to Therapeutics." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 13 (February):1. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00001>.
  43. Boppart, Marni D., and Ziad S. Mahmassani. 2019. "Integrin Signaling: Linking Mechanical Stimulation to Skeletal Muscle Hypertrophy." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 317 (4): C629–41. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00009.2019>.
  44. Yin, Hang, Feodor Price, and Michael A. Rudnicki. 2013. "Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche." *Physiological Reviews* 93 (1): 23–67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2011>.
  45. Asfour, Hasan A., Mohammed Z. Allouh, and Raed S. Said. 2018. "Myogenic Regulatory Factors: The Orchestrators of Myogenesis after 30 Years of Discovery." *Experimental Biology and Medicine* 243 (2): 118. <https://doi.org/10.1177/1535370217749494>.
  46. Ganassi, Massimo, Sara Badodi, Kees Wanders, Peter S Zammit, and Simon M Hughes. n.d. "Myogenin Is an Essential Regulator of Adult Myofibre Growth and Muscle Stem Cell Homeostasis." *eLife* 9:e60445. <https://doi.org/10.7554/eLife.60445>.

47. Yu, Dengjie, Zijun Cai, Daishi Li, Yi Zhang, Miao He, Yuntao Yang, Di Liu, Wenqing Xie, Yusheng Li, and Wenfeng Xiao. 2021. "Myogenic Differentiation of Stem Cells for Skeletal Muscle Regeneration." *Stem Cells International* 2021 (February):8884283. <https://doi.org/10.1155/2021/8884283>.
48. Hernández-Hernández, J. Manuel, Estela G. García-González, Caroline E. Brun, and Michael A. Rudnicki. 2017. "The Myogenic Regulatory Factors, Determinants of Muscle Development, Cell Identity and Regeneration." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 72 (December):10–18. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.11.010>.
49. Chen, Di, Ming Zhao, and Gregory R. Mundy. 2004. "Bone Morphogenetic Proteins." *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 22 (4): 233–41. <https://doi.org/10.1080/08977190412331279890>.
50. "Extracellular Matrix, Inflammation, and the Angiogenic Response | Cardiovascular Research | Oxford Academic." n.d. Accessed January 28, 2023. <https://academic.oup.com/cvscres/article/86/2/226/373085>.
51. Wei, Qiang, Theresa L M Pohl, Anja Seckinger, Joachim P Spatz, and Elisabetta A Cavalcanti-Adam. 2015. "Regulation of Integrin and Growth Factor Signaling in Biomaterials for Osteodifferentiation." *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 11 (May):773–83. <https://doi.org/10.3762/bjoc.11.87>.
52. Thomas, Sachin, and Bithiah Grace Jaganathan. 2022. "Signaling Network Regulating Osteogenesis in Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Cell Communication and Signaling* 16 (1): 47–61. <https://doi.org/10.1007/s12079-021-00635-1>.
53. Tjempakasari, Artaria, Heri Suroto, and Djoko Santoso. 2021. "Mesenchymal Stem Cell Senescence and Osteogenesis." *Medicina* 58 (1): 61. <https://doi.org/10.3390/medicina58010061>.
54. Ducky, Patricia, and Gerard Karsenty. 2000. "The Family of Bone Morphogenetic Proteins." *Kidney International* 57 (6): 2207–14. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00081.x>.
55. Sheikh, Zeeshan, Mohammad Ahmad Javaid, Nader Hamdan, and Raheel Hashmi. 2015. "Bone Regeneration Using Bone Morphogenetic Proteins and Various Biomaterial Carriers." *Materials* 8 (4): 1778–1816. <https://doi.org/10.3390/ma8041778>.
56. Gautschi, Oliver P., Sönke P. Frey, and René Zellweger. 2007. "Bone Morphogenetic Proteins in Clinical Applications." *ANZ Journal of Surgery* 77 (8): 626–31. <https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.2007.04175.x>.
57. Miyazono, Kohei, Yuto Kamiya, and Masato Morikawa. 2010. "Bone Morphogenetic Protein Receptors and Signal Transduction." *Journal of Biochemistry* 147 (1): 35–51. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp148>.
58. Halloran, Daniel, Hilary W. Durbano, and Anja Nohe. 2020. "Bone Morphogenetic Protein-2 in Development and Bone Homeostasis." *Journal of Developmental Biology* 8 (3): 19. <https://doi.org/10.3390/jdb8030019>.

59. Rosenzweig, B L, T Imamura, T Okadome, G N Cox, H Yamashita, P ten Dijke, C H Heldin, and K Miyazono. 1995. "Cloning and Characterization of a Human Type II Receptor for Bone Morphogenetic Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (17): 7632–36.
60. Massagué, Joan. 2012. "TGF $\beta$  Signalling in Context." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13 (10): 616–30. <https://doi.org/10.1038/nrm3434>.
61. Zhao, Guangzong, Longqiang Zhang, Lifan Che, Huazhuang Li, Yao Liu, and Jun Fang. 2021. "Revisiting Bone Morphogenetic Protein-2 Knuckle Epitope and Redesigning the Epitope-Derived Peptides." *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society* 27 (6): e3309. <https://doi.org/10.1002/psc.3309>.
62. Chen, Guiqian, Chuxia Deng, and Yi-Ping Li. 2012. "TGF- $\beta$  and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation." *International Journal of Biological Sciences* 8 (2): 272–88. <https://doi.org/10.7150/ijbs.2929>.
63. Aubin, Josée, Alice Davy, and Philippe Soriano. 2004. "In Vivo Convergence of BMP and MAPK Signaling Pathways: Impact of Differential Smad1 Phosphorylation on Development and Homeostasis." *Genes & Development* 18 (12): 1482–94. <https://doi.org/10.1101/gad.1202604>.
64. Reddi, A. H. 2000. "Morphogenesis and Tissue Engineering of Bone and Cartilage: Inductive Signals, Stem Cells, and Biomimetic Biomaterials." *Tissue Engineering* 6 (4): 351–59. <https://doi.org/10.1089/107632700418074>.
65. Papenburg, Bernke J., Emilie Doods Rodrigues, Matthias Wessling, and Dimitrios Stamatialis. 2010. "Insights into the Role of Material Surface Topography and Wettability on Cell-Material Interactions." *Soft Matter* 6 (18): 4377–88. <https://doi.org/10.1039/B927207K>.
66. Klimek, Katarzyna, and Grazyna Ginalska. 2020. "Proteins and Peptides as Important Modifiers of the Polymer Scaffolds for Tissue Engineering Applications-A Review." *Polymers* 12 (4): 844. <https://doi.org/10.3390/polym12040844>.
67. Barnthip, Naris, Purnendu Parhi, Avantika Golas, and Erwin A. Vogler. 2009. "Volumetric Interpretation of Protein Adsorption: Kinetics of Protein-Adsorption Competition from Binary Solution." *Biomaterials* 30 (33): 6495–6513. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.016>.
68. Hirsh, Stacey L., David R. McKenzie, Neil J. Nosworthy, John A. Denman, Osman U. Sezerman, and Marcela M. M. Bilek. 2013. "The Vroman Effect: Competitive Protein Exchange with Dynamic Multilayer Protein Aggregates." *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 103 (March):395–404. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.039>.
69. Mantha, Somasundar, Sangeeth Pillai, Parisa Khayambashi, Akshaya Upadhyay, Yuli Zhang, Owen Tao, Hieu M. Pham, and Simon D. Tran. 2019. "Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine." *Materials* 12 (20): 3323. <https://doi.org/10.3390/ma12203323>.

70. Cascone, Sara, and Gaetano Lamberti. 2020. "Hydrogel-Based Commercial Products for Biomedical Applications: A Review." *International Journal of Pharmaceutics* 573 (January):118803. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118803>.
71. Kleinman, Hynda K., and George R. Martin. 2005. "Matrigel: Basement Membrane Matrix with Biological Activity." *Seminars in Cancer Biology* 15 (5): 378–86. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.004>.
72. Dong, Chanjuan, and Yonggang Lv. 2016. "Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives." *Polymers* 8 (2): 42. <https://doi.org/10.3390/polym8020042>.
73. Rowlands, Andrew S., Peter A. George, and Justin J. Cooper-White. 2008. "Directing Osteogenic and Myogenic Differentiation of MSCs: Interplay of Stiffness and Adhesive Ligand Presentation." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 295 (4): C1037–44. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.67.2008>.
74. La Monica, Francesco, Simona Campora, and Giulio Gherzi. 2024. "Collagen-Based Scaffolds for Chronic Skin Wound Treatment." *Gels* 10 (2): 137. <https://doi.org/10.3390/gels10020137>.
75. Achilli, Matteo, and Diego Mantovani. 2010. "Tailoring Mechanical Properties of Collagen-Based Scaffolds for Vascular Tissue Engineering: The Effects of pH, Temperature and Ionic Strength on Gelation." *Polymers* 2 (4): 664–80. <https://doi.org/10.3390/polym2040664>.
76. Gentleman, Eileen, Andrea N. Lay, Darryl A. Dickerson, Eric A. Nauman, Glen A. Livesay, and Kay C. Dee. 2003. "Mechanical Characterization of Collagen Fibers and Scaffolds for Tissue Engineering." *Biomaterials* 24 (21): 3805–13. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00206-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00206-0).
77. Parisi, Ludovica, Andrea Toffoli, Benedetta Ghezzi, Beatrice Mozzoni, Simone Lumetti, and Guido M. Macaluso. 2020. "A Glance on the Role of Fibronectin in Controlling Cell Response at Biomaterial Interface." *The Japanese Dental Science Review* 56 (1): 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2019.11.002>.
78. Montaña-Machado, Vanessa, Ludivine Hugoni, Sergio Díaz-Rodríguez, Ranna Tolouei, Pascale Chevallier, Emmanuel Pauthe, and Diego Mantovani. 2016. "A Comparison of Adsorbed and Grafted Fibronectin Coatings under Static and Dynamic Conditions." *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP* 18 (35): 24704–12. <https://doi.org/10.1039/c6cp04527h>.
79. Graf, Fabian, Patrick Horn, Anthony D. Ho, Michael Boutros, and Christian Maercker. 2021. "The Extracellular Matrix Proteins Type I Collagen, Type III Collagen, Fibronectin, and Laminin 421 Stimulate Migration of Cancer Cells." *The FASEB Journal* 35 (7): e21692. <https://doi.org/10.1096/fj.202002558RR>.
80. Ao, Qiang, Shilin Wang, Qing He, Hirotomo Ten, Kenichi Oyama, Akihiro Ito, Jing He, Rabia Javed, Aijun Wang, and Akira Matsuno. 2020. "Fibrin Glue/Fibronectin/Heparin-Based Delivery System of BMP2 Induces Osteogenesis in MC3T3-E1 Cells and Bone Formation in Rat Calvarial Critical-Sized Defects." *ACS Applied Materials & Interfaces* 12 (11): 13400–410. <https://doi.org/10.1021/acscami.0c01371>.

81. Lee, Eunjee A., Giyoung Jung, Sung Gap Im, and Nathaniel S. Hwang. 2015. "Extracellular Matrix-Immobilized Nanotopographical Substrates for Enhanced Myogenic Differentiation." *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 103 (6): 1258–66. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33308>.
82. Dimitriou, Rozalia, Elena Jones, Dennis McGonagle, and Peter V. Giannoudis. 2011. "Bone Regeneration: Current Concepts and Future Directions." *BMC Medicine* 9 (1): 66. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>.
83. Sasikumar, Karuppanan P., Sugumari Elavarasu, and Jayaprakash S. Gadagi. 2012. "The Application of Bone Morphogenetic Proteins to Periodontal and Peri-Implant Tissue Regeneration: A Literature Review." *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 4 (Suppl 2): S427. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.100320>.
84. Kuroda, Yutaka, Toshiyuki Kawai, Koji Goto, and Shuichi Matsuda. 2019. "Clinical Application of Injectable Growth Factor for Bone Regeneration: A Systematic Review." *Inflammation and Regeneration* 39 (1): 20. <https://doi.org/10.1186/s41232-019-0109-x>.
85. Damia, Chantal, David Marchat, Charly Lemoine, Nathalie Douard, Vincent Chaleix, Vincent Sol, Nathanaël Larochette, Delphine Logeart-Avramoglou, Joël Brie, and Eric Champion. 2019. "Functionalization of Phosphocalcic Bioceramics for Bone Repair Applications." *Materials Science and Engineering: C* 95 (February):343–54. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.01.008>.
86. Faulón Marruecos, David, Daniel K. Schwartz, and Joel L. Kaar. 2018. "Impact of Surface Interactions on Protein Conformation." *Current Opinion in Colloid & Interface Science, Biological Colloids and Interfaces*, 38 (November):45–55. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2018.08.002>.
87. Cramer, MC, and SF Badylak. 2020. "Extracellular Matrix-Based Biomaterials and Their Influence Upon Cell Behavior." *Annals of Biomedical Engineering* 48 (7): 2132–53. <https://doi.org/10.1007/s10439-019-02408-9>.
88. Ligorio, Cosimo, and Alvaro Mata. 2023. "Synthetic Extracellular Matrices with Function-Encoding Peptides." *Nature Reviews Bioengineering* 1 (7): 518–36. <https://doi.org/10.1038/s44222-023-00055-3>.
89. "Cost-Effective Flow Peptide Synthesis: Metamorphosis of HPLC." 2021. *Organic Process Research & Development* 25 (2): 182–91. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00178>.
90. Zambrowicz, Aleksandra, Monika Timmer, Antoni Polanowski, Gert Lubec, and Tadeusz Trziszka. 2013. "Manufacturing of Peptides Exhibiting Biological Activity." *Amino Acids* 44 (2): 315–20. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1379-7>.
91. Huettnner, Nick, Tim R. Dargaville, and Aurelien Forget. 2018. "Discovering Cell-Adhesion Peptides in Tissue Engineering: Beyond RGD." *Trends in Biotechnology* 36 (4): 372–83. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.01.008>.

92. Ruoslahti, E. 1996. "RGD and Other Recognition Sequences for Integrins." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12:697–715. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.697>.
93. Ludwig, Beatrice S., Horst Kessler, Susanne Kossatz, and Ute Reuning. 2021. "RGD-Binding Integrins Revisited: How Recently Discovered Functions and Novel Synthetic Ligands (Re-)Shape an Ever-Evolving Field." *Cancers* 13 (7): 1711. <https://doi.org/10.3390/cancers13071711>.
94. Heckmann, Dominik, and Horst Kessler. 2007. "Design and Chemical Synthesis of Integrin Ligands." *Methods in Enzymology* 426:463–503. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)26020-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)26020-3).
95. Hersel, Ulrich, Claudia Dahmen, and Horst Kessler. 2003. "RGD Modified Polymers: Biomaterials for Stimulated Cell Adhesion and Beyond." *Biomaterials, Synthesis of Biomimetic Polymers*, 24 (24): 4385–4415. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00343-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00343-0).
96. "Fibronectin: A Cell Adhesion and Blood Clotting Protein - Owlcation." n.d. Accessed June 18, 2024. <https://owlcation.com/stem/Fibronectin-A-Cell-Adhesion-and-Blood-Clotting-Protein>.
97. Jang, Yongjun, Yongdoo Park, and Jongseong Kim. 2020. "Engineering Biomaterials to Guide Heart Cells for Matured Cardiac Tissue." *Coatings* 10 (10): 925. <https://doi.org/10.3390/coatings10100925>.
98. Yu, Cheng-han, Jaslyn Bee Khuan Law, Mona Suryana, Hong Yee Low, and Michael P. Sheetz. 2011. "Early Integrin Binding to Arg-Gly-Asp Peptide Activates Actin Polymerization and Contractile Movement That Stimulates Outward Translocation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (51): 20585–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109485108>.
99. Huang, Jinghuan, Stefan V. Gräter, Francesca Corbellini, Sabine Rinck, Eva Bock, Ralf Kemkemer, Horst Kessler, Jiandong Ding, and Joachim P. Spatz. 2009. "Impact of Order and Disorder in RGD Nanopatterns on Cell Adhesion." *Nano Letters* 9 (3): 1111–16. <https://doi.org/10.1021/nl803548b>.
100. Bilem, I., P. Chevallier, L. Plawinski, E. D. Sone, M. C. Durrieu, and G. Laroche. 2016. "RGD and BMP-2 Mimetic Peptide Crosstalk Enhances Osteogenic Commitment of Human Bone Marrow Stem Cells." *Acta Biomaterialia* 36 (May):132–42. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.03.032>.
101. Mata, Alvaro, Aaron J. Fleischman, and Shuvo Roy. 2005. "Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems." *Biomedical Microdevices* 7 (4): 281–93. <https://doi.org/10.1007/s10544-005-6070-2>.
102. Yang, Meng, Zheng-Chu Zhang, Yan Liu, You-Rong Chen, Rong-Hui Deng, Zi-Ning Zhang, Jia-Kuo Yu, and Fu-Zhen Yuan. 2021. "Function and Mechanism of RGD in Bone and Cartilage Tissue Engineering." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9 (December):773636. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.773636>.
103. Li, Junling, Yan Zhang, Xing Zhou, Shili Wang, Ruirui Hao, Jinxiang Han, Mian Li, Yurong Zhao, Cuixia Chen, and Hai Xu. 2022. "Enzymatically Functionalized RGD-Gelatin Scaffolds That Recruit

- Host Mesenchymal Stem Cells *in Vivo* and Promote Bone Regeneration.” *Journal of Colloid and Interface Science* 612 (April):377–91. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.12.091>.
104. Kumar, Vijay Bhooshan, Om Shanker Tiwari, Gal Finkelstein-Zuta, Sigal Rencus-Lazar, and Ehud Gazit. 2023. “Design of Functional RGD Peptide-Based Biomaterials for Tissue Engineering.” *Pharmaceutics* 15 (2): 345. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020345>.
105. Yang, Fan, Christopher G. Williams, Dong-an Wang, Hyukjin Lee, Paul N. Manson, and Jennifer Elisseff. 2005. “The Effect of Incorporating RGD Adhesive Peptide in Polyethylene Glycol Diacrylate Hydrogel on Osteogenesis of Bone Marrow Stromal Cells.” *Biomaterials* 26 (30): 5991–98. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.018>.
106. Hunt, Nicola C., Dean Hallam, Ayesha Karimi, Carla B. Mellough, Jinju Chen, David H. W. Steel, and Majlinda Lako. 2017. “3D Culture of Human Pluripotent Stem Cells in RGD-Alginate Hydrogel Improves Retinal Tissue Development.” *Acta Biomaterialia* 49 (February):329–43. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.016>.
107. Domogatskaya, Anna, Sergey Rodin, and Karl Tryggvason. 2012. “Functional Diversity of Laminins.” *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28 (1): 523–53. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155750>.
108. Panayotou, G., P. End, M. Aumailley, R. Timpl, and J. Engel. 1989. “Domains of Laminin with Growth-Factor Activity.” *Cell* 56 (1): 93–101. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90987-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90987-2).
109. Kikkawa, Yamato, Kentaro Hozumi, Fumihiko Katagiri, Motoyoshi Nomizu, Hynda K. Kleinman, and Jennifer E. Koblinski. 2013. “Laminin-111-Derived Peptides and Cancer.” *Cell Adhesion & Migration* 7 (1): 150–256. <https://doi.org/10.4161/cam.22827>.
110. Patel, Rajkumar, Mallesh Santhosh, Jatis Kumar Dash, Rajshekhar Karpoomath, Amitabh Jha, Jeonghun Kwak, Madhumita Patel, and Jong Hak Kim. 2019. “Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV) Peptide for Neuronal Tissue Engineering.” *Polymers for Advanced Technologies* 30 (1): 4–12. <https://doi.org/10.1002/pat.4442>.
111. Nomizu, Motoyoshi, Benjamin S. Weeks, Christi A. Weston, Woo Hoo Kim, Hynda K. Kleinman, and Yoshihiko Yamada. 1995. “Structure-Activity Study of a Laminin A1 Chain Active Peptide Segment Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV).” *FEBS Letters* 365 (2–3): 227–31. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00475-O](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00475-O).
112. Zhu, Bo, Shyh-Chyang Luo, Haichao Zhao, Hsing-An Lin, Jun Sekine, Aiko Nakao, Chi Chen, Yoshiro Yamashita, and Hsiao-hua Yu. 2014. “Large Enhancement in Neurite Outgrowth on a Cell Membrane-Mimicking Conducting Polymer.” *Nature Communications* 5 (1): 4523. <https://doi.org/10.1038/ncomms5523>.
113. Frith, Jessica Ellen, Richard James Mills, James Edward Hudson, and Justin John Cooper-White. 2012. “Tailored Integrin–Extracellular Matrix Interactions to Direct Human Mesenchymal Stem

- Cell Differentiation." *Stem Cells and Development* 21 (13): 2442–56. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0615>.
114. Castellanos, Maria Isabel, Carlos Mas-Moruno, Anna Grau, Xavier Serra-Picamal, Xavier Trepal, Fernando Albericio, Michael Joner, et al. 2017. "Functionalization of CoCr Surfaces with Cell Adhesive Peptides to Promote HUVECs Adhesion and Proliferation." *Applied Surface Science* 393 (January):82–92. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.09.107>.
115. Wang, Peng-Yuan, Tsung-Han Wu, Wei-Bor Tsai, Wei-Hsuan Kuo, and Meng-Jiy Wang. 2013. "Grooved PLGA Films Incorporated with RGD/YIGSR Peptides for Potential Application on Skeletal Muscle Tissue Engineering." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 110 (October):88–95. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.04.016>.
116. Li, Qianqian, King L. Chow, and Ying Chau. 2014. "Three-Dimensional Self-Assembling Peptide Matrix Enhances the Formation of Embryoid Bodies and Their Neuronal Differentiation." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 102 (6): 1991–2000. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34876>.
117. Silva, Gabriel A., Catherine Czeisler, Krista L. Niece, Elia Beniash, Daniel A. Harrington, John A. Kessler, and Samuel I. Stupp. 2004. "Selective Differentiation of Neural Progenitor Cells by High-Epitope Density Nanofibers." *Science* 303 (5662): 1352–55. <https://doi.org/10.1126/science.1093783>.
118. Anderson, Joel M., Jeremy B. Vines, Jessica L. Patterson, Haiyan Chen, Amjad Javed, and Ho-Wook Jun. 2011. "Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Synergistically Enhanced by Biomimetic Peptide Amphiphiles Combined with Conditioned Medium." *Acta Biomaterialia* 7 (2): 675–82. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.08.016>.
119. Wojtowicz, Abigail M., Asha Shekaran, Megan E. Oest, Kenneth M. Dupont, Kellie L. Templeman, Dietmar W. Hutmacher, Robert E. Guldborg, and Andrés J. García. 2010. "Coating of Biomaterial Scaffolds with the Collagen-Mimetic Peptide GFOGER for Bone Defect Repair." *Biomaterials* 31 (9): 2574–82. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.008>.
120. Bradshaw, Michael, Diwei Ho, Mark W. Fear, Fabrizio Gelain, Fiona M. Wood, and K. Swaminathan Iyer. 2014. "Designer Self-Assembling Hydrogel Scaffolds Can Impact Skin Cell Proliferation and Migration." *Scientific Reports* 4 (1): 6903. <https://doi.org/10.1038/srep06903>.
121. Wang, Cunyang, Yan Liu, Yubo Fan, and Xiaoming Li. 2017. "The Use of Bioactive Peptides to Modify Materials for Bone Tissue Repair." *Regenerative Biomaterials* 4 (3): 191–206. <https://doi.org/10.1093/rb/rbx011>.
122. Li, Xiaochuan, Shi Cheng, Yaohong Wu, Jingwei Ying, Chaofeng Wang, Tianyong Wen, Xuedong Bai, Wei Ji, Deli Wang, and Dike Ruan. 2018. "Functional Self-Assembled Peptide Scaffold Inhibits Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced Inflammation and Apoptosis in Nucleus Pulposus Cells by Suppressing Nuclear Factor- $\kappa$ B Signaling." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 106 (4): 1082–91. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36301>.

123. Madl, Christopher M., Manav Mehta, Georg N. Duda, Sarah C. Heilshorn, and David J. Mooney. 2014. "Presentation of BMP-2 Mimicking Peptides in 3D Hydrogels Directs Cell Fate Commitment in Osteoblasts and Mesenchymal Stem Cells." *Biomacromolecules* 15 (2): 445–55. <https://doi.org/10.1021/bm401726u>.
124. Seol, Yang-Jo, Yoon-Jeong Park, Sang-Cheol Lee, Kyoung-Hwa Kim, Jue-Yeon Lee, Tae-Il Kim, Yong-Moo Lee, et al. 2006. "Enhanced Osteogenic Promotion around Dental Implants with Synthetic Binding Motif Mimicking Bone Morphogenetic Protein (BMP)-2." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 77A (3): 599–607. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30639>.
125. Moore, Nicole M., Nancy J. Lin, Nathan D. Gallant, and Matthew L. Becker. 2011. "Synergistic Enhancement of Human Bone Marrow Stromal Cell Proliferation and Osteogenic Differentiation on BMP-2-Derived and RGD Peptide Concentration Gradients." *Acta Biomaterialia* 7 (5): 2091–2100. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.01.019>.
126. Kim, Yeji, Julie N. Renner, and Julie C. Liu. 2014. "Incorporating the BMP-2 Peptide in Genetically-Engineered Biomaterials Accelerates Osteogenic Differentiation." *Biomaterials Science* 2 (8): 1110–19. <https://doi.org/10.1039/C3BM60333D>.
127. Brigaud, Isabelle, Rémy Agniel, Johanne Leroy-Dudal, Sabrina Kellouche, Arnaud Ponche, Tahar Bouceba, Natalia Mihailescu, et al. 2017. "Synergistic Effects of BMP-2, BMP-6 or BMP-7 with Human Plasma Fibronectin onto Hydroxyapatite Coatings: A Comparative Study." *Acta Biomaterialia* 55 (June):481–92. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.04.013>.
128. Boateng, Samuel Y., Syed S. Lateef, William Mosley, Thomas J. Hartman, Luke Hanley, and Brenda Russell. 2005. "RGD and YIGSR Synthetic Peptides Facilitate Cellular Adhesion Identical to That of Laminin and Fibronectin but Alter the Physiology of Neonatal Cardiac Myocytes." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 288 (1): C30–38. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00199.2004>.
129. Cukierman, E., R. Pankov, D. R. Stevens, and K. M. Yamada. 2001. "Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension." *Science (New York, N.Y.)* 294 (5547): 1708–12. <https://doi.org/10.1126/science.1064829>.
130. Rohovie, Marcus J., Maya Nagasawa, and James R. Swartz. 2017. "Virus-like Particles: Next-Generation Nanoparticles for Targeted Therapeutic Delivery." *Bioengineering & Translational Medicine* 2 (1): 43–57. <https://doi.org/10.1002/btm2.10049>.
131. Mejía-Méndez, Jorge L., Rafael Vazquez-Duhalt, Luis R. Hernández, Eugenio Sánchez-Arreola, and Horacio Bach. 2022. "Virus-like Particles: Fundamentals and Biomedical Applications." *International Journal of Molecular Sciences* 23 (15): 8579. <https://doi.org/10.3390/ijms23158579>.
132. "Polymers | Free Full-Text | Nanoparticles as Drug Delivery Systems: A Review of the Implication of Nanoparticles's Physicochemical Properties on Responses in Biological Systems." n.d. Accessed June 18, 2024. <https://www.mdpi.com/2073-4360/15/7/1596>.

133. "Lipid-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery: An Overview of the Production Techniques and Difficulties Encountered in Their Industrial Development | ACS Materials Au." n.d. Accessed June 18, 2024. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmaterialsau.3c00032>.
134. Nooraei, Saghi, Howra Bahrulolum, Zakieh Sadat Hoseini, Camellia Katalani, Abbas Hajizade, Andrew J. Easton, and Gholamreza Ahmadian. 2021. "Virus-like Particles: Preparation, Immunogenicity and Their Roles as Nanovaccines and Drug Nanocarriers." *Journal of Nanobiotechnology* 19 (1): 59. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00806-7>.
135. Louten, Jennifer. 2016. "Virus Structure and Classification." *Essential Human Virology*, 19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00002-8>.
136. Forterre, Patrick. 2006. "The Origin of Viruses and Their Possible Roles in Major Evolutionary Transitions." *Virus Research, Comparative Genomics and Evolution of Complex Viruses*, 117 (1): 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.010>.
137. Nasir, Arshan, Kyung Mo Kim, and Gustavo Caetano-Anollés. 2012. "Viral Evolution." *Mobile Genetic Elements* 2 (5): 247–52. <https://doi.org/10.4161/mge.22797>.
138. "Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase - PubMed." n.d. Accessed June 18, 2024. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8868066/>.
139. "The Genome Sequence of Rickettsia Prowazekii and the Origin of Mitochondria - PubMed." n.d. Accessed June 18, 2024. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9823893/>.
140. Raoult, Didier, Stéphane Audic, Catherine Robert, Chantal Abergel, Patricia Renesto, Hiroyuki Ogata, Bernard La Scola, Marie Suzan, and Jean-Michel Claverie. 2004. "The 1.2-Megabase Genome Sequence of Mimivirus." *Science (New York, N.Y.)* 306 (5700): 1344–50. <https://doi.org/10.1126/science.1101485>.
141. La Scola, Bernard, Stéphane Audic, Catherine Robert, Liang Jungang, Xavier de Lamballerie, Michel Drancourt, Richard Birtles, Jean-Michel Claverie, and Didier Raoult. 2003. "A Giant Virus in Amoebae." *Science (New York, N.Y.)* 299 (5615): 2033. <https://doi.org/10.1126/science.1081867>.
142. Koonin, Eugene V., and William Martin. 2005. "On the Origin of Genomes and Cells within Inorganic Compartments." *Trends in Genetics* 21 (12): 647–54. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.09.006>.
143. Prangishvili, David, Patrick Forterre, and Roger A. Garrett. 2006. "Viruses of the Archaea: A Unifying View." *Nature Reviews Microbiology* 4 (11): 837–48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1527>.
144. Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2002. "The RNA World and the Origins of Life." In *Molecular Biology of the Cell. 4th Edition*. Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26876/>.

145. Robertson, Michael P, and Gerald F Joyce. 2012. "The Origins of the RNA World." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (5): a003608. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003608>.
146. Müller, Ulrich F. 2009. "Evolution of Ribozymes in an RNA World." *Chemistry & Biology* 16 (8): 797–98. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.08.001>.
147. Villarreal, L. P., and V. R. DeFilippis. 2000. "A Hypothesis for DNA Viruses as the Origin of Eukaryotic Replication Proteins." *Journal of Virology* 74 (15): 7079–84. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.15.7079-7084.2000>.
148. Bell, P. J. 2001. "Viral Eukaryogenesis: Was the Ancestor of the Nucleus a Complex DNA Virus?" *Journal of Molecular Evolution* 53 (3): 251–56. <https://doi.org/10.1007/s002390010215>.
149. Nasir, Arshan, and Gustavo Caetano-Anollés. 2015. "A Phylogenomic Data-Driven Exploration of Viral Origins and Evolution." *Science Advances* 1 (8): e1500527. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500527>.
150. Koonin, Eugene V. 2009. "On the Origin of Cells and Viruses." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1178 (1): 47–64. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04992.x>.
151. Roldão, A., A. C. Silva, M. C. M. Mellado, P. M. Alves, and M. J. T. Carrondo. 2011. "1.47 - Viruses and Virus-Like Particles in Biotechnology: Fundamentals and Applications." In *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, edited by Murray Moo-Young, 625–49. Burlington: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00072-6>.
152. Takahashi, Ryou-u, Shin-nosuke Kanesashi, Takamasa Inoue, Teruya Enomoto, Masa-aki Kawano, Hiroko Tsukamoto, Fumitaka Takeshita, et al. 2008. "Presentation of Functional Foreign Peptides on the Surface of SV40 Virus-like Particles." *Journal of Biotechnology* 135 (4): 385–92. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.05.012>.
153. Shishovs, Mihails, Janis Rumnieks, Christoph Diebolder, Kristaps Jaudzems, Loren B. Andreas, Jan Stanek, Andris Kazaks, et al. 2016. "Structure of AP205 Coat Protein Reveals Circular Permutation in ssRNA Bacteriophages." *Journal of Molecular Biology* 428 (21): 4267–79. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.025>.
154. Yenkoidiok-Douti, Lampouguin, Adeline E. Williams, Gaspar E. Canepa, Alvaro Molina-Cruz, and Carolina Barillas-Mury. 2019. "Engineering a Virus-Like Particle as an Antigenic Platform for a Pfs47-Targeted Malaria Transmission-Blocking Vaccine." *Scientific Reports* 9 (1): 16833. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53208-z>.
155. Liu, Xuelan, Xinyue Chang, Dominik Rothen, Mariliza Derveni, Pascal Krenger, Salony Roongta, Edward Wright, et al. 2021. "AP205 VLPs Based on Dimerized Capsid Proteins Accommodate RBM Domain of SARS-CoV-2 and Serve as an Attractive Vaccine Candidate." *Vaccines* 9 (4): 403. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040403>.
156. Nooraee, Saghi, Howra Bahrololum, Zakieh Sadat Hoseini, Camellia Katalani, Abbas Hajizade, Andrew J. Easton, and Gholamreza Ahmadian. 2021. "Virus-like Particles: Preparation,

- Immunogenicity and Their Roles as Nanovaccines and Drug Nanocarriers." *Journal of Nanobiotechnology* 19 (1): 59. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00806-7>.
157. Moradi Vahdat, Maryam, Farshad Hemmati, Abozar Ghorbani, Daria Rutkowska, Alireza Afsharifar, Mohammad Hadi Eskandari, Nahid Rezaei, and Ali Niazi. 2021. "Hepatitis B Core-Based Virus-like Particles: A Platform for Vaccine Development in Plants." *Biotechnology Reports* 29 (February):e00605. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00605>.
158. Sevvana, Madhumati, Thomas Klose, and Michael G. Rossmann. 2021. "Principles of Virus Structure." *Encyclopedia of Virology*, 257–77. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814515-9.00033-3>.
159. Zhang, Lin, Linda H. L. Lua, Anton P. J. Middelberg, Yan Sun, and Natalie K. Connors. 2015. "Biomolecular Engineering of Virus-like Particles Aided by Computational Chemistry Methods." *Chemical Society Reviews* 44 (23): 8608–18. <https://doi.org/10.1039/C5CS00526D>.
160. Rosmalen, Mariska G. M. van, Douwe Kamsma, Andreas S. Biebricher, Chenglei Li, Adam Zlotnick, Wouter H. Roos, and Gijs J. L. Wuite. 2020. "Revealing in Real-Time a Multistep Assembly Mechanism for SV40 Virus-like Particles." *Science Advances* 6 (16): eaaz1639. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz1639>.
161. "Structural Puzzles in Virology Solved with an Overarching Icosahedral Design Principle | Nature Communications." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://www.nature.com/articles/s41467-019-12367-3>.
162. Sivamaran, V., V. Balasubramanian, M. Gopalakrishnan, V. Viswabaskaran, and A. Gourav Rao. 2022. "Combined Synthesis of Carbon Nanospheres and Carbon Nanotubes Using Thermal Chemical Vapor Deposition Process." *Chemical Physics Impact* 4 (June):100072. <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2022.100072>.
163. "Double-Helical RNA in Satellite Tobacco Mosaic Virus - PubMed." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8421525/>.
164. "Partitivirus Structure Reveals a 120-Subunit, Helix-Rich Capsid with Distinctive Surface Arches Formed by Quasisymmetric Coat-Protein Dimers - PMC." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2556151/>.
165. "Recent Advances in Carbon Nanomaterials for Biomedical Applications: A Review - PMC." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7993985/>.
166. Mohsen, Mona O., and Martin F. Bachmann. 2022. "Virus-like Particle Vaccinology, from Bench to Bedside." *Cellular & Molecular Immunology* 19 (9): 993–1011. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00897-8>.
167. Zeltins, Andris. 2013. "Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review." *Molecular Biotechnology* 53 (1): 92–107. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9598-4>.

168. Ikwuagwu, Bon, and Danielle Tullman-Ercek. 2022. "Virus-like Particles for Drug Delivery: A Review of Methods and Applications." *Current Opinion in Biotechnology* 78 (December):102785. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102785>.
169. Tariq, Hasnat, Sannia Batool, Saaim Asif, Mohammad Ali, and Bilal Haider Abbasi. 2022. "Virus-Like Particles: Revolutionary Platforms for Developing Vaccines Against Emerging Infectious Diseases." *Frontiers in Microbiology* 12 (January):790121. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.790121>.
170. Hou, Luhong, Hao Wu, Limei Xu, and Feng Yang. 2009. "Expression and Self-Assembly of Virus-like Particles of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus in *Escherichia Coli*." *Archives of Virology* 154 (4): 547–53. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0336-6>.
171. Brown, Steven D., Jason D. Fiedler, and M. G. Finn. 2009. "Assembly of Hybrid Bacteriophage Q $\beta$  Virus-like Particles." *Biochemistry* 48 (47): 11155–57. <https://doi.org/10.1021/bi901306p>.
172. Hammond, Rosemarie W., and John Hammond. 2010. "Maize Rayado Fino Virus Capsid Proteins Assemble into Virus-like Particles in *Escherichia Coli*." *Virus Research* 147 (2): 208–15. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.11.002>.
173. "Hepatitis E Vaccine—Illuminating the Barriers to Use - PMC." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9815658/>.
174. Freivalds, Janis, Andris Dislers, Velta Ose, Paul Pumpens, Kaspars Tars, and Andris Kazaks. 2011. "Highly Efficient Production of Phosphorylated Hepatitis B Core Particles in Yeast *Pichia Pastoris*." *Protein Expression and Purification* 75 (2): 218–24. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.09.010>.
175. Wetzel, David, Theresa Rolf, Manfred Suckow, Andreas Kranz, Andreas Barbian, Jo-Anne Chan, Joachim Leitsch, et al. 2018. "Establishment of a Yeast-Based VLP Platform for Antigen Presentation." *Microbial Cell Factories* 17. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0868-0>.
176. "Defect of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Gag Assembly in *Saccharomyces Cerevisiae* | Journal of Virology." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.00027-07>.
177. Tatman, J. D., V. G. Preston, P. Nicholson, R. M. Elliott, and F. J. Rixon. 1994. "Assembly of Herpes Simplex Virus Type 1 Capsids Using a Panel of Recombinant Baculoviruses." *Journal of General Virology* 75 (5): 1101–13. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-5-1101>.
178. Pushko, Peter, Terrence M. Tumpey, Fang Bu, John Knell, Robin Robinson, and Gale Smith. 2005. "Influenza Virus-like Particles Comprised of the HA, NA, and M1 Proteins of H9N2 Influenza Virus Induce Protective Immune Responses in BALB/c Mice." *Vaccine* 23 (50): 5751–59. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.07.098>.

179. Latham, Theresa, and Jose M. Galarza. 2001. "Formation of Wild-Type and Chimeric Influenza Virus-Like Particles Following Simultaneous Expression of Only Four Structural Proteins." *Journal of Virology* 75 (13): 6154–65. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.13.6154-6165.2001>.
180. F, Strobl, Ghorbanpour Sm, Palmberger D, and Striedner G. 2020. "Evaluation of Screening Platforms for Virus-like Particle Production with the Baculovirus Expression Vector System in Insect Cells." *Scientific Reports* 10 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57761-w>.
181. "Production of GP64-Free Virus-like Particles from Baculovirus-Infected Insect Cells - PubMed." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29300162/>.
182. "Human Cell Lines for Biopharmaceutical Manufacturing: History, Status, and Future Perspectives - PubMed." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26383226/>.
183. Z, Shirbaghaee, and Bolhassani A. 2016. "Different Applications of Virus-like Particles in Biology and Medicine: Vaccination and Delivery Systems." *Biopolymers* 105 (3). <https://doi.org/10.1002/bip.22759>.
184. "Influenza A and B Virus-like Particles Produced in Mammalian Cells Are Highly Immunogenic and Induce Functional Antibodies - PubMed." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31590935/>.
185. Wu, Chia-Ying, Yi-Chun Yeh, Yu-Chih Yang, Ching Chou, Ming-Tsan Liu, Ho-Sheng Wu, Jia-Tsong Chan, and Pei-Wen Hsiao. 2010. "Mammalian Expression of Virus-Like Particles for Advanced Mimicry of Authentic Influenza Virus." *PLOS ONE* 5 (3): e9784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009784>.
186. "Nucleocapsid Protein-Dependent Assembly of the RNA Packaging Signal of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus - PubMed." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29793506/>.
187. "Plant Molecular Farming of Virus-like Nanoparticles as Vaccines and Reagents - PubMed." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31486296/>.
188. "Immunogenicity and Protective Potency of Norovirus GII.17 Virus-like Particle-Based Vaccine - PubMed." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32088791/>.
189. Fougeroux, Cyrielle, Louise Goksøyr, Manja Idorn, Vladislav Soroka, Sebenzile K. Myeni, Robert Dagil, Christoph M. Janitzek, et al. 2021. "Capsid-like Particles Decorated with the SARS-CoV-2 Receptor-Binding Domain Elicit Strong Virus Neutralization Activity." *Nature Communications* 12 (1): 324. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20251-8>.
190. "The C-Terminal Arm of the Human Papillomavirus Major Capsid Protein Is Immunogenic and Involved in Virus-Host Interaction - PubMed." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27276427/>.

191. "Particle Size Measurement Using Dynamic Light Scattering at Ultra-Low Concentration Accounting for Particle Number Fluctuations - PMC." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8510349/>.
192. Ausar, Salvador F., Thomas R. Foubert, Mary H. Hudson, Thomas S. Vedvick, and C. Russell Middaugh. 2006. "Conformational Stability and Disassembly of Norwalk Virus-like Particles: EFFECT OF pH AND TEMPERATURE \*." *Journal of Biological Chemistry* 281 (28): 19478–88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603313200>.
193. Micsonai, András, Frank Wien, Linda Kernya, Young-Ho Lee, Yuji Goto, Matthieu Réfrégiers, and József Kardos. 2015. "Accurate Secondary Structure Prediction and Fold Recognition for Circular Dichroism Spectroscopy." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (24): E3095–3103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500851112>.
194. "Hepatitis B Virus (HBV) Subviral Particles as Protective Vaccines and Vaccine Platforms - PMC." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7077199/>.
195. "Human Papillomavirus Vaccines: An Updated Review - PMC." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7565290/>.
196. "Virus-like Particle Vaccines and Platforms for Vaccine Development - PMC." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10223759/>.
197. Alpuche-Lazcano, Sergio P., Matthew Stuiblé, Bassel Akache, Anh Tran, John Kelly, Sabahudin Hrapovic, Anna Robotham, et al. 2023. "Preclinical Evaluation of Manufacturable SARS-CoV-2 Spike Virus-like Particles Produced in Chinese Hamster Ovary Cells." *Communications Medicine* 3 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s43856-023-00340-7>.
198. Hashemzadeh, Mohammad Sadegh, and Nariman Gharari. 2023. "Biosynthesis of a VLP-Type Nanocarrier Specific to Cancer Cells Using the BEVS Expression System for Targeted Drug Delivery." *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 21 (1): 20. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00479-9>.
199. Ruzzi, Francesca, Maria Sofia Semprini, Laura Scalambra, Arianna Palladini, Stefania Angelicola, Chiara Cappello, Olga Maria Pittino, Patrizia Nanni, and Pier-Luigi Lollini. 2023. "Virus-like Particle (VLP) Vaccines for Cancer Immunotherapy." *International Journal of Molecular Sciences* 24 (16). <https://doi.org/10.3390/ijms241612963>.
200. Kim, Kyeong Rok, Ae Sol Lee, Su Min Kim, Hye Ryoung Heo, and Chang Sup Kim. 2023. "Virus-like Nanoparticles as a Theranostic Platform for Cancer." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10 (January). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1106767>.
201. "Cell-Specific Delivery of Diverse Cargos by Bacteriophage MS2 Virus-Like Particles - PMC." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144304/>.

202. Shukla, Sourabh, He Hu, Hui Cai, Soo-Khim Chan, Christine E. Boone, Veronique Beiss, Paul L. Chariou, and Nicole F. Steinmetz. 2020. "Plant Viruses and Bacteriophage-Based Reagents for Diagnosis and Therapy." *Annual Review of Virology* 7 (1): 559. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-010720-052252>.
203. H. Keeble, Anthony, and Mark Howarth. 2020. "Power to the Protein: Enhancing and Combining Activities Using the Spy Toolbox." *Chemical Science* 11 (28): 7281–91. <https://doi.org/10.1039/D0SC01878C>.
204. "Evolving Accelerated Amidation by SpyTag/SpyCatcher to Analyze Membrane Dynamics - PubMed." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29024296/>.
205. "A Nanoparticle Vaccine Displaying the Ookinete PSOP25 Antigen Elicits Transmission-Blocking Antibody Response against Plasmodium Berghei | Parasites & Vectors | Full Text." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-023-06020-8>.
206. Brune, Karl D., Darren B. Leneghan, Iona J. Brian, Andrew S. Ishizuka, Martin F. Bachmann, Simon J. Draper, Sumi Biswas, and Mark Howarth. 2016. "Plug-and-Display: Decoration of Virus-Like Particles via Isopeptide Bonds for Modular Immunization." *Scientific Reports* 6 (1): 19234. <https://doi.org/10.1038/srep19234>.
207. Fougereux, Cyrielle, Louise Goksøyr, Manja Idorn, Vladislav Soroka, Sebenzile K. Myeni, Robert Dagil, Christoph M. Janitzek, et al. 2021. "Capsid-like Particles Decorated with the SARS-CoV-2 Receptor-Binding Domain Elicit Strong Virus Neutralization Activity." *Nature Communications* 12 (1): 324. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20251-8>.
208. Bruun, Theodora U. J., Anne-Marie C. Andersson, Simon J. Draper, and Mark Howarth. 2018. "Engineering a Rugged Nanoscaffold To Enhance Plug-and-Display Vaccination." *ACS Nano* 12 (9): 8855–66. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02805>.
209. Wieduwild, Robert, and Mark Howarth. 2018. "Assembling and Decorating Hyaluronan Hydrogels with Twin Protein Superglues to Mimic Cell-Cell Interactions." *Biomaterials* 180 (October):253–64. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.020>.
210. Gao, Xiaoye, Jie Fang, Bin Xue, Linglan Fu, and Hongbin Li. 2016. "Engineering Protein Hydrogels Using SpyCatcher-SpyTag Chemistry." *Biomacromolecules* 17 (9): 2812–19. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00566>.
211. "Synthesis of Bioactive Protein Hydrogels by Genetically Encoded SpyTag-SpyCatcher Chemistry - PubMed." n.d. Accessed June 19, 2024. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25049400/>.
212. Stringer, Carsen, Tim Wang, Michalis Michaelos, and Marius Pachitariu. 2021. "Cellpose: A Generalist Algorithm for Cellular Segmentation." *Nature Methods* 18 (1): 100–106. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01018-x>.

213. Pincus, Z., and J. A. Theriot. 2007. "Comparison of Quantitative Methods for Cell-Shape Analysis." *Journal of Microscopy* 227 (Pt 2): 140–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2007.01799.x>.
214. Yenkoidiok-Douti, Lampouguin, Adeline E. Williams, Gaspar E. Canepa, Alvaro Molina-Cruz, and Carolina Barillas-Mury. 2019. "Engineering a Virus-Like Particle as an Antigenic Platform for a Pfs47-Targeted Malaria Transmission-Blocking Vaccine." *Scientific Reports* 9 (1): 16833. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53208-z>.
215. Seghir, R., and S. Arscott. 2015. "Extended PDMS Stiffness Range for Flexible Systems." *Sensors and Actuators A: Physical* 230 (July):33–39. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2015.04.011>.
216. Rosellini, Elisabetta, Caterina Cristallini, Giulio D. Guerra, and Niccoletta Barbani. 2015. "Surface Chemical Immobilization of Bioactive Peptides on Synthetic Polymers for Cardiac Tissue Engineering." *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 26 (9): 515–33. <https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1030991>.
217. Missirlis, Dimitris, Tamás Haraszti, Horst Kessler, and Joachim P. Spatz. 2017. "Fibronectin Promotes Directional Persistence in Fibroblast Migration through Interactions with Both Its Cell-Binding and Heparin-Binding Domains." *Scientific Reports* 7 (1): 3711. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03701-0>.
218. Yolland, Lawrence, Mubarik Burki, Stefania Marcotti, Andrei Luchici, Fiona N. Kenny, John Robert Davis, Eduardo Serna-Morales, et al. 2019. "Persistent and Polarized Global Actin Flow Is Essential for Directionality during Cell Migration." *Nature Cell Biology* 21 (11): 1370–81. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0411-5>.
219. Conklin, Matthew W., Jens C. Eickhoff, Kristin M. Ricking, Carolyn A. Pehlke, Kevin W. Eliceiri, Paolo P. Provenzano, Andreas Friedl, and Patricia J. Keely. 2011. "Aligned Collagen Is a Prognostic Signature for Survival in Human Breast Carcinoma." *The American Journal of Pathology* 178 (3): 1221–32. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.076>.
220. Dabare, Panthihage Ruvini L., Akash Bachhuka, Rahul M. Visalakshan, Hanieh S. Shirazi, Kostya Ostriko, Louise E. Smith, and Krasimir Vasilev. 2021. "Mechanistic Insight in Surface Nanotopography Driven Cellular Migration." *ACS Biomaterials Science & Engineering* 7 (10): 4921–32. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.1c00853>.
221. Oudin, Madeleine J., and Valerie M. Weaver. 2016. "Physical and Chemical Gradients in the Tumor Microenvironment Regulate Tumor Cell Invasion, Migration, and Metastasis." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 81 (January):189–205. <https://doi.org/10.1101/sqb.2016.81.030817>.
222. Maheshwari, G., G. Brown, D.A. Lauffenburger, A. Wells, and L.G. Griffith. 2000. "Cell Adhesion and Motility Depend on Nanoscale RGD Clustering." *Journal of Cell Science* 113 (10): 1677–86. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.10.1677>.

223. Kim, Dong-Hwee, and Denis Wirtz. 2013. "Focal Adhesion Size Uniquely Predicts Cell Migration." *The FASEB Journal* 27 (4): 1351–61. <https://doi.org/10.1096/fj.12-220160>.
224. Xiong, J. P., T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, and M. A. Arnaout. 2001. "Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin Alpha Vbeta3." *Science (New York, N.Y.)* 294 (5541): 339–45. <https://doi.org/10.1126/science.1064535>.
225. Jain, Kashish, Kyna Yu En Lim, Michael P. Sheetz, Pakorn Kanchanawong, and Rishita Changede. 2023. "Intrinsic Self-Organization of Integrin Nanoclusters within Focal Adhesions Is Required for Cellular Mechanotransduction." bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.11.20.567975>.
226. Diaz, Carolina, Stefanie Neubauer, Florian Rechenmacher, Horst Kessler, and Dimitris Missirlis. 2020. "Recruitment of  $\alpha v \beta 3$  Integrin to  $\alpha 5 \beta 1$  Integrin-Induced Clusters Enables Focal Adhesion Maturation and Cell Spreading." *Journal of Cell Science* 133 (1): jcs232702. <https://doi.org/10.1242/jcs.232702>.
227. Sharapova, N. E., A. P. Kotnova, Z. M. Galushkina, N. V. Lavrova, N. N. Poletaeva, A. E. Tukhvatulin, A. S. Semikhin, et al. 2010. "Production of the Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Escherichia Coli and Testing of Its Biological Activity in Vitro and in Vivo." *Molecular Biology* 44 (6): 923–30. <https://doi.org/10.1134/S0026893310060099>.
228. Gieseler, Gesa, Iliyana Pepelanova, Lena Stuckenberg, Louis Villain, Volker Nölle, Uwe Odenthal, Sascha Beutel, Ursula Rinas, and Thomas Scheper. 2017. "Purification of Bone Morphogenetic Protein-2 from Refolding Mixtures Using Mixed-Mode Membrane Chromatography." *Applied Microbiology and Biotechnology* 101 (1): 123–30. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7784-1>.
229. Long, Shinong, Lynn Truong, Krista Bennett, Andrew Phillips, Flossie Wong-Staal, and Hongwen Ma. 2006. "Expression, Purification, and Renaturation of Bone Morphogenetic Protein-2 from Escherichia Coli." *Protein Expression and Purification* 46 (2): 374–78. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.09.025>.
230. Javid, Hossein, Mahsa Akbari Oryani, Nastaran Rezaghlinejad, Ali Esparham, Mahboubeh Tajaldini, and Mehdi Karimi-Shahri. 2024. "RGD Peptide in Cancer Targeting: Benefits, Challenges, Solutions, and Possible Integrin–RGD Interactions." *Cancer Medicine* 13 (2): e6800. <https://doi.org/10.1002/cam4.6800>.
231. Apostolopoulos, Vasso, Joanna Bojarska, Tsun-Thai Chai, Sherif Elnagdy, Krzysztof Kaczmarek, John Matsoukas, Roger New, et al. 2021. "A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives." *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (2): 430. <https://doi.org/10.3390/molecules26020430>.
232. Perlmutter, Jason D., and Michael F. Hagan. 2015. "Mechanisms of Virus Assembly." *Annual Review of Physical Chemistry* 66 (April):217–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040214-121637>.

233. Lin, Grace L., Daniel M. Cohen, Ravi A. Desai, Mark T. Breckenridge, Lin Gao, Martin J. Humphries, and Christopher S. Chen. 2013. "Activation of Beta 1 but Not Beta 3 Integrin Increases Cell Traction Forces." *FEBS Letters* 587 (6): 763–69. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.068>.
234. Zakeri, Bijan, Jacob O. Fierer, Emrah Celik, Emily C. Chittock, Ulrich Schwarz-Linek, Vincent T. Moy, and Mark Howarth. 2012. "Peptide Tag Forming a Rapid Covalent Bond to a Protein, through Engineering a Bacterial Adhesin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (12): E690-697. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115485109>.