



**HAL**  
open science

# Approches immuno-thérapeutiques et immuno-diagnostiques précliniques ciblant les récepteurs A et B des endothélines. Applications au glioblastome et au mélanome

Marie Hautiere

► **To cite this version:**

Marie Hautiere. Approches immuno-thérapeutiques et immuno-diagnostiques précliniques ciblant les récepteurs A et B des endothélines. Applications au glioblastome et au mélanome. Cancer. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASQ017 . tel-04812764

**HAL Id: tel-04812764**

**<https://theses.hal.science/tel-04812764v1>**

Submitted on 1 Dec 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.

Approches immuno-thérapeutiques et  
immuno-diagnostiques précliniques ciblant  
les récepteurs A et B des endothélines.  
Applications au glioblastome et au  
mélanome.

*Preclinical immunotherapeutic and immunodiagnostic approaches  
targeting endothelin A and B receptors. Applications to glioblastoma and  
melanoma.*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n°569 : innovation thérapeutique,  
du fondamental à l'appliqué (ITFA)  
Spécialité de doctorat : Sciences pharmacologiques  
Graduate School : Health and Drug Sciences  
Réfèrent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans le **Laboratoire d'Etude de l'Unité Neurovasculaire & Innovation Thérapeutique (Université Paris-Saclay, CEA)** et dans le **Laboratoire d'Imagerie Biomédicale Multimodale Paris Saclay (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, INSERM)**, sous la direction de **Didier BOQUET**, chercheur CEA, et le co-encadrement de **Charles TRUILLET**, chercheur CEA.

**Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 15 mai 2023, par**

**Marie HAUTIERE**

**Composition du Jury**

Membres du jury avec voix délibérative

<b>Corinne BALLEYGUIER</b> Professeure des universités - Praticien hospitalier, IGR, Université Paris Saclay	Présidente
<b>Thierry CHARDES</b> Directeur de recherche, INSERM, Université de Montpellier	Rapporteur & Examineur
<b>Fabien CHAUVEAU</b> Chargé de recherche, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur & Examineur
<b>Françoise CAILLER</b> Présidente et Directrice scientifique de SurgiMab	Examinatrice
<b>Anne-Sophie SALABERT</b> Maître de conférences - Praticien hospitalier, INSERM, Université de Toulouse	Examinatrice
<b>Jean-Luc TEILLAUD</b> Directeur de recherche, INSERM, Sorbonne Université	Examineur



**Titre :** Approches immuno-thérapeutiques et immuno-diagnostiques précliniques ciblant les récepteurs A et B des endothélines. Applications au glioblastome et au mélanome.

**Mots clés :** anticorps thérapeutique, Récepteurs des endothélines, imagerie par fluorescence, tomographie par émission de positon, imagerie bimodale, anticorps associé à une cytotoxine

**Résumé :** L'axe endothéline, constitué de 3 ligands et de 2 Récepteurs des endothélines de type A (ETA) et de type B (ETB), joue un rôle moteur dans le déclenchement de douze sur quatorze des fonctions majeures, décrites par le Dr Douglas Hanahan, permettant le développement tumoral et notamment ceux du glioblastome et du mélanome. Cette tumeur primaire cérébrale et le mélanome métastatique souffrent toujours de mauvais pronostic du fait de leur forte hétérogénéité et nécessitent de nouvelles approches thérapeutiques pour améliorer la prise en charge des patients atteints de ces tumeurs.

Notre laboratoire a breveté le rendomab-A63 (RA63) dirigé contre ETA et le rendomab-B49 (RB49) dirigé contre ETB. Ils présentent une spécificité et une affinité remarquables pour leur récepteur respectif exprimé à la surface de cellules souches humaines de glioblastome et à la surface de cellules humaines de mélanome. Leurs capacités d'internalisation, après fixation sur leur récepteur, permettent de développer des approches thérapeutiques et diagnostiques ciblant les tumeurs ETA+ et ETB+. Durant ma thèse, ces anticorps ont été chimérisés afin de minimiser leur immunogénicité en vue d'applications cliniques futures.

Si la chimérisation du RA63 (xiRA63) n'a pas posé de difficulté, la chimérisation de l'anticorps RB49 (xiRB49) a révélé une complexité structurale de l'anticorps. Pour une approche thérapeutique, le xiRB49 a été conjugué à une molécule cytotoxique pour devenir un antibody drug conjugate (ADC). Son efficacité thérapeutique remarquable a été évalué sur un modèle préclinique de mélanome.

L'absence de stratification des patients pour leur éligibilité à un traitement ciblé peut augmenter le risque d'échec thérapeutique de ce dernier. Cet écueil peut être évité par la mise en place d'une imagerie moléculaire in vivo permettant la stratification des patients exprimant le biomarqueur reconnu par l'anticorps thérapeutique. On peut, ainsi, espérer une amélioration de l'état de santé des patients éligibles à cette immunothérapie. Cette approche a été mise en œuvre en radio-marquant le xiRA63 au zirconium 89 pour caractériser sa pharmacocinétique et sa biodistribution par immunoPET dans un modèle préclinique de glioblastome (GBM) humain. Les résultats ont montré la capacité du [89Zr]-xiRA63 à traverser la barrière hémato-encéphalique tumorale et à détecter spécifiquement les GBM ETA+ soulignant son potentiel en clinique comme la perspective d'une stratification des patients atteints de GBM ETA+ par imagerie TEP. Dans une version double sonde imagerie TEP-fluorescence, le xiRA63 montre sa capacité (i) à diagnostiquer et stratifier les patients atteints de GBM ETA+ par imagerie immuno-TEP et (ii) à assister le geste chirurgical *via* la fluorescence en visualisant la masse tumorale optimisant ainsi la résection de la tumeur tout en épargnant le tissu sain adjacent.

L'ensemble de ces travaux ont permis la rédaction de trois articles pour des publications dans des journaux à comité de lecture et d'un brevet.

**Title :** Preclinical immunotherapeutic and immunodiagnostic approaches targeting endothelin A and B receptors. Applications to glioblastoma and melanoma.

**Keywords :** Therapeutic antibody, endothelin receptors, fluorescence imaging, Positron Emission Tomography, Bimodal Imaging, Antibody Drug Conjugate .

**Abstract :** The endothelin axis, consisting of three ligands and two types of endothelin receptors A (ETA) and B (ETB), have a driving role in the initiation of twelve out of the fourteen major functions, that trigger tumor development, such as particularly the development of glioblastoma and melanoma, as described by Dr. Douglas Hanahan. This primary brain tumor and metastatic melanoma is still poorly prognosed due to their high heterogeneity and would require new therapeutic approaches to improve the management of patients with these tumors.

Our laboratory patented the randomab-A63 (RA63) targeted ETA and randomab-B49 (RB49) directed against ETB. They show remarkable specificity and affinity for their respective receptors expressed on the human glioblastoma stem cells surface and on the human melanoma cells surface. Their internalization capacities, after binding to their receptor, allow the development of therapeutic and diagnostic approaches targeting ETA+ and ETB+ tumors. During my PhD, these antibodies were chimerized in order minimize their self-immunogenicity for the purpose of future clinical applications.

While the chimerization process of RA63 (xiRA63) did not show any problem, the RB49 chimerization (xiRB49) revealed its structural complexity. For a therapeutic approach, xiRB49 was coupled with a cytotoxic molecule to become an antibody drug conjugate (ADC). Its remarkable therapeutic efficiency was evaluated with a preclinical model of melanoma.

The lack of patients's classification for their eligibility to these specific therapy can increase the risk of therapeutic failure. However, it can be avoided by the use of in vivo molecular imaging, which allow the stratification of the patients' expressing biomarker as recognized by the therapeutic antibody. Therefore, patients' health status can be improved using the adjusted immunotherapy. This approach was implemented by the radiolabeling of the xiRA63 with zirconium 89 to characterize its pharmacokinetics and biodistribution by immunoPET in a preclinical model of human glioblastoma (GBM). The results showed the ability of [89Zr]-xiRA63 to cross the blood-tumor brain barrier and to specifically detect ETA+ on GBMs, highlighting its potential for clinic use to stratify ETA+ GBM patients by PET imaging. The dual-labeling PET-fluorescence xiRA63 imaging set-up shows its ability to (i) diagnose and stratify ETA+ GBM patients by immuno-PET imaging, and (ii) to assist the surgical procedure with fluorescence, allowing to visualize the tumor mass, optimizing the resection of the tumor while sparing the adjacent healthy tissue

These works allowed the preparation of three articles due to be published in scientific journals and a patent.

---

# Remerciements

---

Je souhaiterais avant tout remercier les membres du jury qui ont bien voulu me faire l'honneur d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie plus particulièrement Thierry Chardes et Fabien Chauveau d'avoir été rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Corinne Balleyguier, Françoise Cailler, Anne-Sophie Salabert et Jean-Luc Teillaud qui ont accepté de faire partie de ce jury et avec qui j'ai pu avoir des échanges extrêmement intéressants et constructifs au cours de cette soutenance.

Je voudrais remercier :

Stéphanie Simon, chef du Service de Pharmacologie et Immunoanalyse, pour m'avoir permis d'effectuer ces trois années dans les meilleures conditions possibles et de m'avoir accordé du temps pour discuter de l'après thèse.

Vincent Lebon, chef du Service Hospitalier Frédéric Joliot où j'ai réalisé une partie de ces travaux de thèse.

Aloïse Mabondzo, directeur du laboratoire du Laboratoire d'Étude de l'Unité Neurovasculaire & Innovation Thérapeutique, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse. Je le remercie aussi pour son temps et son sens de l'humour.

Un remerciement tout particulier à mon directeur de thèse Didier Boquet sans qui ce projet n'aurait jamais vu le jour. Je te remercie pour ta bienveillance, ta patience, ton écoute et tous ces moments accordés. Comme tu l'as si bien dit lors de la soutenance, cela ne fait pas trois ans mais bien sept années que nous collaborons. Tu m'as vu grandir et évoluer. Ta pédagogie et ta confiance m'ont permis d'apprendre le métier de chercheur en toute sérénité. Nos conversations vont me manquer. Pour tout ça, et bien plus, je te serai toujours reconnaissante.

Je remercie aussi mon co-encadrant de thèse, Charles Truillet, pour sa disponibilité et le transfert de son savoir-faire. Cette expérience professionnelle au sein de ton laboratoire a été très enrichissante.

Je tiens également à remercier les membres de l'ANR DUALMAB qui m'ont beaucoup apporté pendant cette thèse. Nos nombreuses réunions et discussions ont été primordiales dans la compréhension de mon sujet de thèse et surtout pour mener à bien le projet qui m'a été confié. En ce sens, je remercie Franck Denat, Delphine Vivier, Claire Bernhard, Jean-philippe Hugnot, Donovan Pineau, Pierre-Alix Dancer et Paul Dorval.

Un grand remerciement à Anne-Cécile, Narciso et Amaury, trois personnalités incroyables et membres incontournables du LENIT. Sans vous, le laboratoire sombrerait rapidement dans le chaos. Cette fois-ci, je vous promets qu'il n'y aura aucun « spoiler » de série et aucune blague dans ce paragraphe mais juste un grand MERCI. Merci de m'avoir formé,

pour votre patience et votre soutien émotionnel sans faille, merci pour tous ces moments de rire et de galères passés ensemble, pour cette recherche incessante de ragots, merci de m'avoir fait passer une merveilleuse thèse et d'avoir cru en mes capacités. J'ai encore plein de secrets à vous révéler, alors la suite au prochain épisode... *Xoxo gossip girl*

Je remercie également Léa K et Cyril, les prochains thésards de notre équipe qui vont devoir tout déchirer. L'une de mes plus belles réussites au cours de ces trois dernières années a été de vous embarquer dans cette folle aventure qu'est la thèse. Vous allez probablement me détester pendant les six derniers mois mais je sais que vous allez réussir et que tout se passera bien. Ce trio de thésards aux parcours et aux personnalités si différents va me manquer. Votre bonne humeur et votre joie de vivre m'ont toujours réconfortée lors de ma rédaction et pendant la préparation de l'oral. J'espère pouvoir vous rendre la pareille dans les futurs moments difficiles.

Je tenais également à remercier Auriane, une collègue toujours prête à faire des blagues diaboliques à nos chers étudiants #smiley démon#. Je te remercie également pour tes expériences culinaires pour le moins étonnantes et pour tous tes précieux conseils et échanges me permettant de définir mes objectifs professionnels. Je tiens également à remercier Clémence pour ses conseils avisés concernant mon avenir professionnel et pendant la rédaction de thèse, ainsi que pour tous les échanges scientifiques et personnels que nous avons pu avoir.

Je remercie aussi tous les autres membres et étudiants du LENIT. Eva pour sa joie de vivre et sa bonne humeur quotidienne, un véritable petit rayon de soleil au laboratoire. Léa B pour m'avoir supportée pendant ces moments intenses de rédactions dans notre grotte. Courage pour la suite c'est la dernière ligne droite !! Elisa aka papuche, pour sa folie, sa bonne humeur et avec qui j'ai beaucoup ri. Romane, pour sa créativité et sa motivation, qui sans le savoir m'a toujours donné de bonnes idées et m'a inspirée au cours de cette thèse. Amalia pour avoir toléré mes mauvaises blagues et pour m'avoir fait rire avec sa personnalité juste incroyable. François pour tes nombreuses conversations philosophiques et ta bienveillance, hâte de te revoir avec Seb !

Bien évidemment, je ne pouvais pas finir les remerciements de cette thèse sans remercier mes compatriotes de week-end, de soirée et de pause-café du SPI : Donatien, Chloé J, Julien, Jessica, Justyna, Maxence, Chloé A, Paloma, Nina, Justine, Dylan, Vincent, Anaïs, Chenqin, Anne-sophie, Fanny, Justine, Lilas, Christian, Loïs, avec qui j'ai passé tant de bons moments ces dernières années. J'espère tous vous revoir tous très rapidement !

De même, je remercie l'équipe du SHFJ. Tout d'abord Caroline et Dimitri pour m'avoir épaulée au cours de toutes ces manipulations. C'était très agréable de travailler avec vous et on s'est bien amusé donc merci. Je tiens également à remercier Estelle, un esprit libre et un exemple pour moi, avec qui j'ai beaucoup échangé au cours de cette thèse. Merci à Sarah, Sophie et Gaëlle, qui ont été les premières personnes que j'ai côtoyées à mon arrivée au SHFJ. Votre joie de vivre, votre sens de l'humour et votre bonne humeur ont égayé mes journées et continuerons je l'espère à faire partie de ma vie. Merci à Eugénie, Sébastien B, Amélie, Alizée,

Goran, Louis, Kévin, Précieuse, Louise, Sébastien G, qui ont fait en sorte que cette expérience au sein du SHFJ soit une aventure agréable et enrichissante. Enfin, un petit message tout particulier à Soizic, qui a partagé mon bureau et qui, malgré son impolitesse quotidienne, est devenu une véritable amie. Je souhaite également remercier Sophia, une hybride mi-SHFJ & mi-SCBM. Je te remercie pour ta joie, ta folie et en particulier pour ton aide précieuse lors de la rédaction. On a vécu beaucoup de galère ensemble mais heureusement, la thèse, c'est aussi des fous rires et des moments de joies que je garderai en mémoire. Tout comme Soizic, tu es devenue une véritable amie et je sais qu'on se reverra rapidement.

Je remercie mes amis de toujours pour leur soutien, leur patience et leur joie de vivre. Ils ont toujours été présents et m'ont permis d'avancer à tout instant. Alors merci à Alice, Elise, Alexis, Chloé, Cynthia, Nicolas D, Damien, Fanny, Léo, Aurore, Dada, Coco, Nico B, Baguette, Michou, Elea, Hélo, Marie S, Marie L.

Je remercie ma famille pour leur soutien qui m'a donné la force d'affronter toutes les épreuves aussi bien professionnelles que personnelles. Ces dernières années ont été intenses et leurs encouragements, leur fierté et leurs attentions ont été d'un profond soutien et m'ont permis d'arriver là où j'en suis. Sans vous je ne serai rien mais avec vous je peux devenir ce que je veux. Une pensée particulière pour mon frère, ma sœur, et surtout pour mes parents pour leur confiance et leur soutien indéfectibles.

Enfin, Seb, je ne te remercierai jamais assez pour ta patience, ton écoute, ton sens de l'humour et surtout pour avoir été mon havre de paix non pas ces trois dernières années mais ces huit années passées. Merci du fond du cœur pour avoir toujours su rire des situations qui me paraissaient dramatiques, pour avoir été présent dans tous ces moments de joie, de fatigue, de surprise et parfois de colère. Merci de m'avoir changé les idées et de ne m'avoir jamais rien reproché dans mes moments d'incertitudes. Notre complicité, notre quotidien et notre amour a été ma force ces dernières années. Enfin, je te remercie pour ton soutien au quotidien et de me rendre heureuse.



---

# Table des matières

---

Remerciements .....	
Table des matières .....	
Liste des tableaux .....	
Liste des figures .....	
Liste des abréviations .....	
Introduction Générale .....	1
I.    L'axe endothéline .....	3
1)    Les endothélines .....	3
a.    Endothéline et endothélium .....	3
b.    Biosynthèse et modulation du système endothéline.....	5
2)    Les Récepteurs des endothélines .....	7
a.    Structure et biodistribution des Récepteurs des endothélines.....	7
b.    Biosynthèse, variants et isoformes des Récepteurs des endothélines .....	12
c.    Modification post traductionnelle .....	14
d.    Dimérisation et oligomérisation des ETR .....	15
3)    Signalisation de l'axe endothéline physiologique .....	16
a.    Transducteurs de la signalisation des ETR : Protéine G et $\beta$ -arrestine .....	17
b.    Voie de signalisation classique des RCPG .....	18
II.    Endothéline et tumeurs.....	22
1)    Généralités des cancers .....	22
a.    Définition.....	22
b.    « Hallmarks of cancer ».....	23
2)    Axe endothéline et oncologie .....	26
a.    Axe endothéline et tumeurs associées .....	26
b.    Implication de l'axe endothéline dans les « hallmarks of cancer ».....	28

## Table des matières

c.	Les Récepteurs des endothélines, une opportunité thérapeutique contre le cancer déjà initiée en phase clinique.....	39
3)	Le récepteur des endothélines B, une cible potentielle pour le traitement du mélanome de grade IV .....	42
a.	Généralités .....	42
b.	Prise en charge des patients .....	44
c.	L'axe endothéline, une opportunité thérapeutique du mélanome .....	48
4)	Le récepteur des endothélines A, un candidat biomarqueur pour le diagnostic et la thérapie des glioblastomes .....	50
a.	Généralités .....	50
b.	Prise en charge des patients .....	52
c.	L'axe endothéline comme biomarqueur des cellules de GBM et des CSG.....	55
III.	Les anticorps ciblant les Récepteurs des endothélines, un outil de choix pour le théranostique .....	57
1)	Généralités sur les anticorps.....	57
a.	Structure des Immunoglobulines .....	58
b.	Fonctions des Immunoglobulines .....	61
c.	Les Immunoglobulines de type G (IgG) et leur modification post traductionnelles.....	63
d.	Mesure des interactions antigènes membranaires et anticorps .....	63
2)	Ingénierie des anticorps et leur caractéristique pharmacologique.....	64
a.	Optimisation des AcM pour une efficacité thérapeutique accrue .....	66
b.	Modification des propriétés pharmacocinétiques et biodistribution : .....	66
c.	Anticorps multi spécificités .....	69
d.	Ingénierie des anticorps, ingénierie cellulaire : CAR-T, CAR-M .....	70
e.	Stratégies de conjugaison des anticorps .....	70
3)	La bioconjugaison des anticorps un enjeu majeur pour la médecine ciblée : de l'approche thérapeutique à la stratification des patients par l'imagerie in vivo.....	74

## Table des matières

a.	L'essor des ADC .....	74
b.	Le diagnostic des tumeurs médié par des immuno-conjugués .....	76
4)	Les rendomabs : nouveaux anticorps ciblant les Récepteurs des endothélines.....	80
	Objectifs des travaux de thèse.....	85
	Résultats des travaux de thèse.....	87
I.	Chapitre I : Ingénierie des anticorps .....	89
1)	Introduction de l'étude .....	89
2)	Article en cours de soumission dans mAbs (date prévisionnelle : fin mars / début avril 2023) .....	93
3)	Études complémentaires.....	125
a.	Contexte du ThioFab-xiRB49-P125T .....	125
b.	Paramètres physico-chimiques du ThioFab-xiRB49-P125T .....	125
c.	Etudes fonctionnelles des anticorps : détermination des courbes de liaison des anticorps sur ET <sub>B</sub> .....	126
d.	Validation fonctionnelle du ThioFab-xiRB49-P125T.....	127
4)	Discussion et perspectives.....	131
II.	Chapitre II : L'anticorps xiRB49-MMAE, un nouveau et puissant anticorps thérapeutique contre le mélanome .....	135
1)	Introduction de l'étude .....	135
2)	Article pour soumission dans Journal for Immunotherapy of cancer ~ avril 2023 138	
3)	Discussion et perspectives.....	173
III.	Chapitre III : Validation préclinique par immunoTEP du [ <sup>89</sup> Zr]-xiRA63 et de son fragment [ <sup>89</sup> Zr]-ThioFab-xiRA63 comme outil diagnostique du glioblastome humain.....	177
1)	Introduction de l'étude .....	177
2)	Article soumis dans EJNMMI en février 2023.....	181
3)	Étude complémentaire.....	219
4)	Discussion et perspectives.....	220

## Table des matières

IV. Chapitre IV : Evaluation du xiRA63 pour une approche de chirurgie guidée par fluorescence précédée d'une imagerie préopératoire TEP dans un modèle préclinique de glioblastome humain.....	227
1) Introduction de l'étude .....	227
2) Résultats .....	231
a. Validation de la chirurgie guidée par fluorescence médiée par les anticorps ciblant les Récepteurs des endothélines sur un modèle préclinique de tumeurs sous-cutanées .....	231
b. Preuve de concept in vivo de la chirurgie guidée par fluorescence d'un glioblastome humain et planifiée par une imagerie isotopique pré-opératoire à l'aide de l'anticorps xiRA63 .....	238
3) Discussion et perspectives.....	253
Conclusion Générale .....	257
Communications scientifiques .....	263
I. Communications orales .....	263
II. Publications .....	264
1) Accepté.....	264
2) Soumis.....	265
3) En cours de rédaction/finalisation .....	265
Bibliographie.....	267
Annexes .....	285
I. Matériel et méthode supplémentaire du chapitre I .....	285
1) ThioFab-xiRB49-P125T .....	285
2) Test de compétition pour trouver la fonctionnalité du ThioFab.....	285
3) Analyse statistique : .....	286
II. Matériel et méthode supplémentaire du chapitre IV .....	287
1) Partie 1 : Validation de la chirurgie guidée par fluorescence médiée par les anticorps ciblant les Récepteurs des endothélines sur un modèle pré-clinique de tumeurs sous-cutanées.....	288

## Table des matières

a.	Préparation des immunoconjugués.....	288
b.	Expérimentation in vivo .....	290
c.	Imagerie KIS800 de KaerLabs fluorescente.....	291
d.	Biodistribution ex vivo avec KIS800 de KaerLabs.....	291
2)	Partie 2 : Preuve de concept in vivo de la chirurgie guidée par fluorescence d'un glioblastome humain et prédéfinie par une imagerie nucléaire pré-opérative à l'aide de l'anticorps xiRA63.....	291
a.	Préparation des immunoconjugués.....	291
b.	Expérimentation in vivo .....	292
c.	iTLC .....	293
d.	iTLC étude de la stabilité.....	293
e.	Autoradiographie et fluorescence ex vivo .....	294
f.	Imagerie KIS800 de Kaer Labs fluorescente .....	294



---

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1</b> : Biodistribution tissulaire et cellulaire de l'axe endothéline .....	8
<b>Tableau 2</b> : Expression de l'axe endothéline dans différentes tumeurs .....	27
<b>Tableau 3</b> : Essais cliniques des molécules antagonistes ciblant ETR dans un contexte tumoral .....	39
<b>Tableau 4</b> : Classification TNM selon la 7 <sup>ème</sup> édition de l' <i>American Joint Committee on Cancer</i> .....	45
<b>Tableau 5</b> : Les différentes classes d'anticorps .....	60
<b>Tableau 6</b> : Anticorps ciblant les Récepteurs des endothélines dans différentes pathologies .....	80
<b>Tableau 7</b> : Classification des Rendomabs-B selon leur reconnaissance de lignées de mélanomes métastatiques .....	81
<b>Tableau 8</b> : Caractéristiques des AcM RB1, RB4, RB49 et RA63 .....	81
<b>Tableau 9</b> : Comparaison de l'affinité apparente et des Bmax entre les anticorps conjugués et non conjugués .....	238
<b>Tableau 10</b> : Informations de l'injection du [ <sup>89</sup> Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 pour la résection tumorale d'un GBM humain prélocalisé par imagerie TEP .....	245



---

## Liste des figures

---

<b>Figure 1</b> : Schéma de la structure en acides aminés de l'ET-1, -2 et - 3 .....	4
<b>Figure 2</b> : Schéma de la biosynthèse de l'endothéline .....	5
<b>Figure 3</b> : Structure classique des RCPG .....	9
<b>Figure 4</b> : Structure en 2 dimensions (2D) d'ETA et d'ETB humains obtenues par la GPCRdb .....	9
<b>Figure 5</b> : Modélisation et représentation schématique de la cristallographie des récepteurs des endothélines dans leur état actif et inactif .....	11
<b>Figure 6</b> : Alignement protéique des séquences de l'ET <sub>A</sub> humain vs murin <i>via</i> le site NCBI .....	12
<b>Figure 7</b> : Principales isoformes des récepteurs selon NCBI ET <sub>A</sub> et ET <sub>B</sub> .....	13
<b>Figure 8</b> : Schéma illustrant une voie de signalisation dite « classique » .....	16
<b>Figure 9</b> : Schéma de la structure et du fonctionnement des RCPG et de leur protéine G .....	17
<b>Figure 10</b> : Signalisation physiologique de l'axe endothéline .....	21
<b>Figure 11</b> : Schéma général des étapes d'un cancer .....	22
<b>Figure 12</b> : Évolution des « Hallmarks of cancer » .....	23
<b>Figure 13</b> : Implication de l'axe endothéline dans les différents processus résultant en l'acquisition d'un phénotype tumoral .....	28
<b>Figure 14</b> : Dialogue entre la signalisation de l'endothéline et celle de l'hypoxie .....	33
<b>Figure 15</b> : Métastases, une histoire en plusieurs étapes .....	34
<b>Figure 16</b> : Axe endothéline et invadopode .....	35
<b>Figure 17</b> : Dialogue entre la signalisation de l'endothéline et celle de la $\beta$ -caténine .....	36
<b>Figure 18</b> : Schéma des différentes couches de la peau et de ses constituants .....	42
<b>Figure 19</b> : classification de clark .....	46
<b>Figure 20</b> : Perturbation de la fonction de la BHE causé par les cellules gliales invasives .....	54
<b>Figure 21</b> : Représentation schématique de la structure d'une IgG1 .....	58
<b>Figure 22</b> : Structure schématique d'une IgG .....	61
<b>Figure 23</b> : De l'anticorps murins vers un anticorps humanisé .....	65
<b>Figure 24</b> : Représentation schématique de différents formats d'anticorps et leur demi-vie associée ...	67
<b>Figure 25</b> : Recyclage cellulaire des IgG orchestré par l'interaction FcRn et région Fc des anticorps...	68

## Liste des figures

<b>Figure 26 :</b> Réaction de la transglutaminase avec un substrat contenant une lysine pour l'immunoconjugaison d'un peptide .....	71
<b>Figure 27 :</b> Conjugaison site spécifique des anticorps par la transglutaminase .....	72
<b>Figure 28 :</b> Réaction chimique groupement thiol-maleimide .....	73
<b>Figure 29 :</b> Représentation schématique d'un anticorps conjugué à une drogue (ADC) .....	74
<b>Figure 30 :</b> Fonctionnement classique d'un ADC .....	75
<b>Figure 31 :</b> Etapes d'un examen TEP .....	77
<b>Figure 32 :</b> Epitope mapping du récepteur ET <sub>B</sub> du RB1, RB4 et RB49 .....	83
<b>Figure 33 :</b> Cristallisation du récepteur ET <sub>B</sub> .....	84
<b>Figure 34 :</b> Différents formats d'anticorps produits et caractérisés au cours de la thèse .....	91
<b>Figure 35 :</b> Courbes de dénaturation thermique et températures d'inflexion T <sub>i1</sub> et T <sub>i2</sub> des anticorps xiRB49-P125T, Fab-xiRB49-P125T, et ThioFab-xiRB49-P125T .....	126
<b>Figure 36 :</b> Courbes de liaison obtenue en cytométrie en flux des anticorps Fab-xiRB49-P125T, et ThioFab-xiRB49-P125T permettant la détermination de leur K <sub>d</sub> apparent et de leur B <sub>max</sub> .....	127
<b>Figure 37 :</b> Protocole du test de compétition .....	128
<b>Figure 38 :</b> Courbes de liaison obtenues par cytométrie en flux du test de compétition entre le xiRB49-P125T et le Thio-Fab-xiRB49-P125T ou le Fab-xiRB49-P125T .....	129
<b>Figure 39 :</b> Courbes de liaison obtenues par cytométrie en flux avec un anticorps secondaire anti-Fd. Schéma récapitulatif des anticorps secondaires reconnaissant les Fab-xiRB49-P125T et ThioFab-xiRB49-P125T .....	130
<b>Figure 40 :</b> Représentation schématique des anticorps RB49, xiRB49, RA63 et xiRA63 et de leurs isotopes .....	131
<b>Figure 41 :</b> Schéma récapitulatif des anticorps secondaires reconnaissant xiRB49-P125T .....	133
<b>Figure 42 :</b> Courbe de liaison comparant les anticorps xiRA63 et xiRB49 obtenue sur des cellules CSG Gli7 par cytométrie en flux et détermination de leur K <sub>d</sub> apparent et de leur B <sub>max</sub> .....	223
<b>Figure 43 :</b> Expression relative des ARNm des transcrits issus des gènes <i>EDNRA</i> et <i>EDNRB</i> obtenus par RT-qPCR sur la lignée de CSG humaines Gli7 implantées dans le modèle préclinique .....	225
<b>Figure 44 :</b> Schéma de la plateforme fonctionnalisable appelée MOMIP (MonOolecular Multimodal Imaging Probes) et basée sur la tétrazine .....	233
<b>Figure 45 :</b> Schéma de l'étude de la faisabilité de la résection tumorale guidée par fluorescence des tumeurs sous-cutanées .....	235
<b>Figure 46 :</b> Etude longitudinale de la fluorescence émise par les anticorps xiRA63-MOIP-IR800 ou xiRB49-MOIP-IR800 sur un modèle préclinique de tumeurs sous-cutanées CHO-ET <sub>A</sub> , CHO-ET <sub>B</sub> et CHO-WT .....	238

## Liste des figures

<b>Figure 47</b> : Quantification relative de la fluorescence émise par les anticorps xiRA63-MOMIP-IR800 ou xiRB49-MOIP-IR800 au niveau des tumeurs .....	239
<b>Figure 48</b> : Biodistribution <i>ex vivo</i> de la fluorescence dans des organes clés .....	241
<b>Figure 49</b> : Schéma de l'étude de la faisabilité de la résection tumorale guidée par fluorescence d'un GBM humain prélocalisé par immunoTEP .....	243
<b>Figure 50</b> : Comparaison des courbes de liaison du xiRA63 et du xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 obtenues par cytométrie en flux .....	244
<b>Figure 51</b> : Exemple d'imagerie IRM ou TEP des cerveaux de souris implantées avec des tumeurs ou du PBS 48 h p.i. du xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 .....	246
<b>Figure 52</b> : Quantification de la concentration du xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 au niveau du site d'implantation des cellules (ou du PBS pour le groupe contrôle) 48 h p.i. dans les 3 différents groupes de souris extrapolée de l'imagerie immunoTEP .....	247
<b>Figure 53</b> : Stabilité de l'anticorps dans le plasma xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 48 h p.i. ....	249
<b>Figure 54</b> : Biodistribution de l'anticorps xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 48 h p.i. ....	250
<b>Figure 55</b> : Exemples d'images fluorescentes des trois groupes de souris obtenues post mortem lors des différentes étapes de chirurgie à 48 h p.i. du [ <sup>89</sup> Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 .....	252
<b>Figure 56</b> : Images des cerveaux de souris avant et après ablation tumorale guidée par fluorescence obtenues à l'aide de l'appareil KIS800 de Kaer Labs .....	253
<b>Figure 57</b> : Résidus fluorescents de la tumeur imagés par l'appareil KIS800 à 100 ms, 200 ms et 1000 ms et coloration H&E de coupe de cerveaux correspondants à ces résidus .....	254
<b>Figure 58</b> : Comparaison du signal obtenu par immunoTEP et du signal fluorescent reconstruit en 3D représentant la tumeur cérébrale .....	255
<b>Figure 59</b> : Comparaison du signal obtenu par autoradiographie et du signal fluorescent sur des coupes de tumeur cérébrale .....	256
<b>Figure 60</b> : Exemple pour une souris de chaque groupe de l'imagerie IRM et TEP superposées .....	260



---

## Liste des abréviations

---

Aa : acides aminés	CSG : cellules souches de glioblastome
AcM : anticorps monoclonaux	DAG : diacylglycérol
ADC : antibody drug conjugate	DFO : desferrioxamine
ADCC : antibody dependent cell-mediated cytotoxicity	DI : dose injectée
ADN : acide désoxyribonucléique	DLS : dynamic light scattering
AJCC : american joint committee on cancer	DMA : dynamique moléculaire accélérée
Akt : protéine kinase B	DOL : degree of labeling
AMM : autorisation de mise sur le marché	EGFR : epidermal growth factor receptor
AMPc : adénosine monophosphate cyclase	EJNMMI : european journal of nuclear medicine and molecular imaging
ARN : acide ribonucléique	EPR : enhanced permeability and retention
ASK1 : apoptosis signal-regulating kinase 1	ET : endothéline
ATP : adénosine triphosphate	ET <sub>A</sub> : Récepteurs des endothélines de type A
BHE : barrière hémato encéphalique	ET <sub>B</sub> : Récepteurs des endothélines de type B
Bcl-2 : B-cell lymphoma protein-2	ETR : Récepteurs des endothélines
Ca <sup>2+</sup> : calcium	ECE : enzymes de conversion à l'endothéline
CAR : chimeric antigenic receptor	ERK : extra-cellular signal-Regulated Kinase
CDC : complement dependent cytotoxicity	Fab : fragment antigen Binding site
CDR: complementary determining regions	Fc : fragment cristallisable
CH : constant heavy chain	FcRn : récepteur Fc néonatal
CHO : chinese hamster ovary	FDA : food & drug administration
CL : constant light chain	FR : framework
CpG: cytosine-phosphate-Guanine	FOXO1 : fork head box protein O1
CREB : cAMP response element-binding protein	GDP : guanosine diphosphate
CS : cellule souche	GBM : glioblastome
CSC : cellules souches cancéreuses	GPCR : G-protein coupled receptor

## Liste des abréviations

GRK : G protein-coupled receptor kinase	MEK : mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase
GSK3 : glycogen synthase kinase 3 $\beta$	MFI : mean fluorescent intensity
GTP : guanosine triphosphate	MMAE : monométhyl auristatine E
H&E : hématoxyline et à l'éosine	MMP : métalloprotéases
HEK : human embryonic kidney	MOMIP : monomolecular multimodal imaging probes
HIF-1 $\alpha$ : hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$	NCBI : national center for biotechnology information
HO-1 : hème oxygénase 1	NEP : neutrale endopeptidase
IDH : isocitrate déshydrogénase	NF $\kappa$ B : nuclear factor kappa B
ILK : integrin-like kinase	NF1 : neurofibromatose de type 1
IFN- $\alpha$ : interferon alpha	NK : natural killer
Ig : immunoglobulines	OMS : organisation mondiale de la santé
IHC : Immunohistochimie	ORL : oto-rhino-laryngologiste
INCA : institut national du cancer	PCR : polymérase chain reaction
IPSCs : induced pluripotent stem cells	PDGF- $\alpha$ : platelet derived growth factor- $\alpha$
iP3 : inositol tri-phosphate	PD-L1 : programmed death-ligand 1
IRM : imagerie par résonance magnétique	PHD2 : prolyl hydroxylase 2
ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif	Pi : phosphate inorganique
ITIM : immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif	PiP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
iTLC : instant thin layer chromatography	PI3K : phosphoinositide 3-kinase
JNK : c-jun N-terminal kinases	PKA : protéine kinase A
LB : lymphocyte B	PKC : protéine kinase C
LT : lymphocytes T	PLC : phospholipase C
mAb : monoclonal antibody	PPIX : porphyrine fluorescente
MAPK : mitogen-activated protein kinase	PSMA : prostate-specific membrane antigen
MCAM : melanoma cell adhesion molecule	RAF : rapidly accelerated fibrosarcoma
MDM2 : mouse double minute 2	RA63 : randomab A63

## Liste des abréviations

RB49 : rendomab B49

RCPG : récepteurs couplés aux protéines aux protéines G

REL : réticulum endoplasmique lisse

RFc $\gamma$  : récepteur aux fragments constant gamma

RTK : récepteurs à activité tyrosine kinase

ScFv : single-chain variable fragments

SDS/PAGE : sodium dodecylsulfate / polyacrylamid gel electrophoresis

SEER : surveillance epidemiology, and End Results

SI : système immunitaire

SLIC : sequence and ligation independent cloning

SNC : système nerveux central

SRC : sarcoma kinase

TAM : tumor-associated macrophages

TCGA : the cancer genome atlas

TCO : trans-cyclooctène

T<sub>i</sub> : températures d'inflexion

TDM : tomodensitométrie

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

TEP : tomographie à émission de positons

TM : domaine transmembranaire

TNF- $\alpha$  : transforming necrosis factor- $\alpha$

TNM : tumeur, ganglion (nodes), métastases

UV : ultraviolet

ValCit : valine-citrulline

VEGF : vascular endothelial growth factor

VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor

VH : variable heavy chain

VL : variable light chain

VOI : volume of interest

YAP : yes-associated protein

2D : deux-dimensions

3D : trois dimensions

5-ALA : acide 5-aminolévulinique

$\beta$ -arr :  $\beta$ -arrestine

$\beta$ -cat :  $\beta$ -caténine



---

# Introduction Générale

---



## I. L'axe endothéline

### 1) Les endothélines

#### a. Endothéline et endothélium

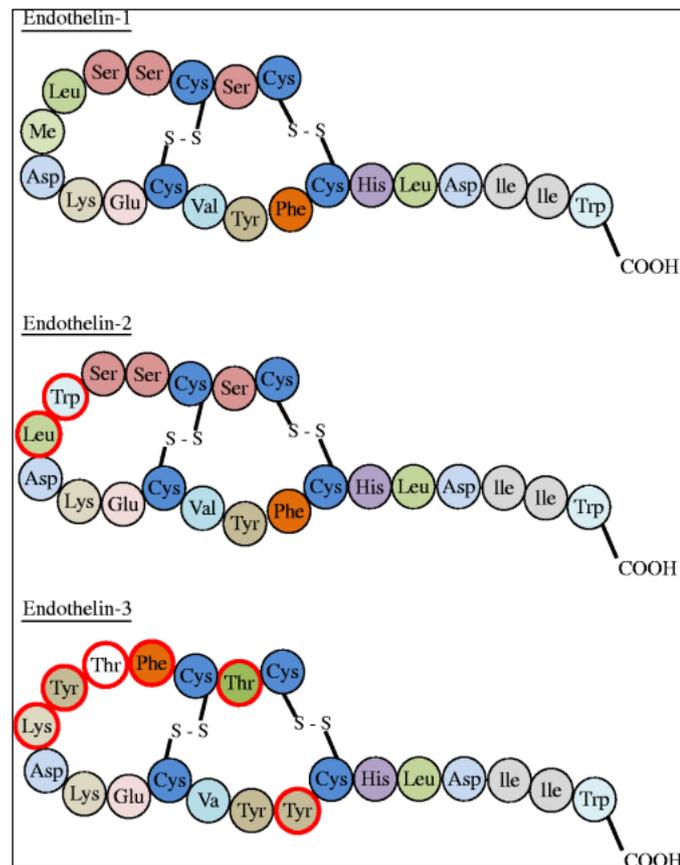
L'endothéline-1 (ET-1), un puissant vasoconstricteur de 21 acides aminés (aa), a été découverte en 1985 par Hickey et ses collaborateurs <sup>1</sup> puis isolée et purifiée par Yanagisawa et ses collaborateurs à partir du surnageant de milieu de culture des cellules endothéliales de porc <sup>2</sup>. L'ensemble des membres de la famille des endothélines ainsi que leur rôle physiologique respectif est maintenant bien connu et documenté avec plus de 30 000 articles scientifiques publiés ces 30 dernières années <sup>3</sup>.

Depuis 1989, 3 isoformes ont été identifiées : L'endothéline-1 (ET-1), -2 (ET-2) et -3 (ET-3) <sup>4</sup>. Ces isoformes présentent une forte homologie de séquence (**Figure 1**), avec seulement deux acides aminés différents entre ET-1 et ET-2 et 6 acides aminés distincts entre ET-1 et ET-3, leur procurant une structure similaire (<sup>5</sup>). Chacune de ces isoformes est composée d'une hélice alpha et de deux ponts disulfures, unissant les cystéines 3 et 11 et les cystéines 1 et 15. Leur intégrité est nécessaire à l'activité du peptide. L'endothéline 1 constitue l'isoforme la plus exprimée au sein de la famille endothéline dans le système cardiovasculaire humain et est par conséquent la plus étudiée dans la littérature. Ce ligand a une masse molaire de 2492 Dalton avec une région carboxy-terminale hydrophobe (C-terminale) et une région amino-terminale (N-terminale) composée des 2 ponts disulfures précédemment évoqués. La partie C-terminale du peptide semblerait être impliquée dans la transduction du signal vasoconstrictif. Quant à la sélectivité de l'ET-1 pour son récepteur, elle serait due à la région N-terminale <sup>6</sup>.

Les endothélines sont exprimées par un large éventail de cellules parmi lesquelles figurent les cellules endothéliales, les macrophages, les fibroblastes pour l'ET-1, les cellules épithéliales de l'intestin et du rein pour l'ET-2 et enfin des cellules du système nerveux central ou périphérique comme des neurones, des cellules gliales, des cellules de purkinje au niveau du néostriatum, de l'hippocampe, du cervelet et du bulbe olfactif pour l'ET-3. L'isoforme 3 de l'endothéline est particulièrement abondante au niveau du système nerveux central mais n'y est pas restreinte et peut également être retrouvée au niveau de divers tissus tel que le cœur, l'endomètre, le foie, les intestins ou encore les poumons <sup>7-9</sup>. Toutefois, l'endothéline 1 reste majoritairement produite par l'endothélium vasculaire, une couche interne des vaisseaux sanguins d'origine mésodermique qui est en contact avec le sang et composée de cellules

## Introduction générale

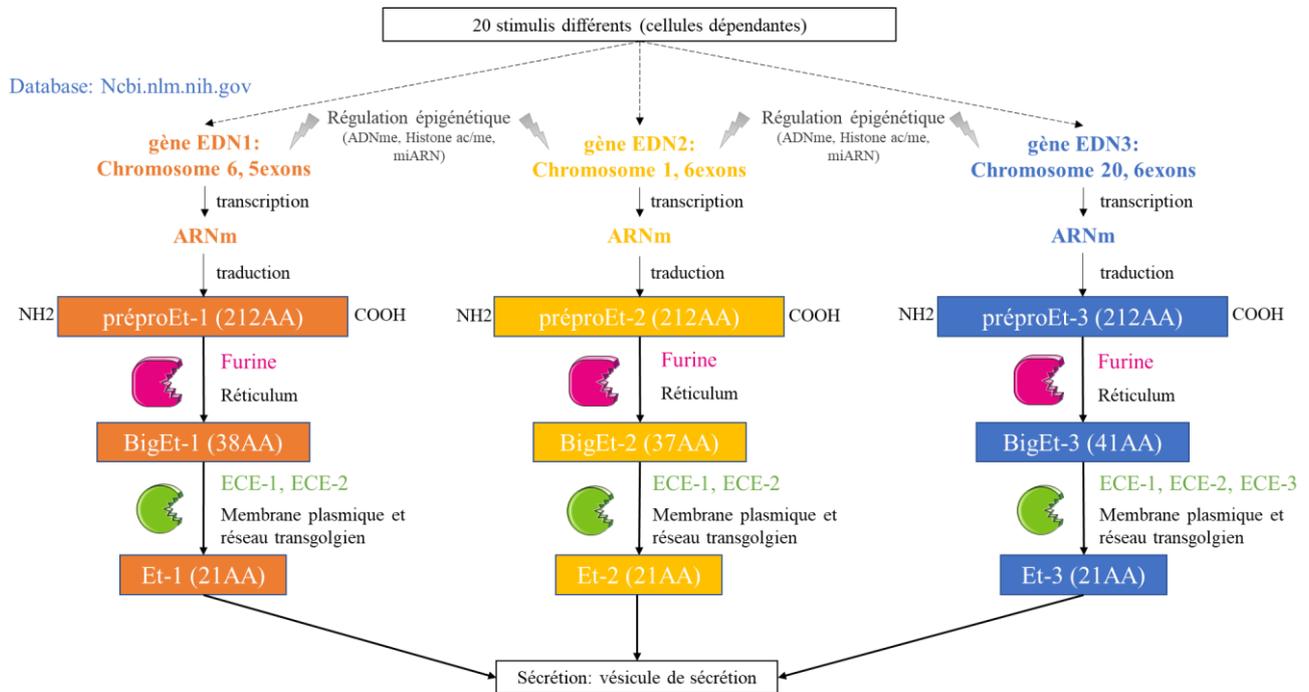
endothéliales polarisées. En effet, la concentration d'ET-1 dans la paroi vasculaire est 100 fois supérieure à celle qui est observée dans le plasma <sup>10</sup>. Les cellules endothéliales constituent une barrière permettant des échanges moléculaires entre le sang et différents tissus et jouent un rôle essentiel dans le contrôle du tonus vasculaire <sup>9,11</sup>. Les caractéristiques de l'endothélium vasculaire varient en fonction de l'organe à proximité duquel il se situe. Par exemple, au niveau du système nerveux central, les cellules endothéliales sont fortement liées entre elles par des jonctions cellulaires dites serrées, constituant une véritable barrière sélective, la présence de ces jonctions serrées représentant un réel frein au passage de molécules dans le système nerveux central. On parle alors de la barrière hémato-encéphalique (BHE) <sup>12</sup>. Au contraire, au voisinage des reins, la lame basale de l'endothélium vasculaire contient des « pores » permettant à certaines molécules d'être réabsorbées efficacement par l'organisme <sup>13</sup>.



**Figure 1 : Schéma de la structure en acides aminés de l'ET-1, -2 et -3.** Les acides aminés entourés en rouge correspondent aux acides aminés divergent avec l'ET-1. (Chester *et al.*, 2014).

*b. Biosynthèse et modulation du système endothéline*

L'endothéline est produite par l'endothélium de façon autocrine (par la cellule elle-même), paracrine (par les cellules voisines) et par l'environnement (le stroma) <sup>9</sup>. La libération d'endothéline est régulée de façon très fine (**Figure 2**).



**Figure 2 : Schéma de la biosynthèse de l'endothéline.** Les gènes *EDN1,2,3* sont transcrits puis traduits sous forme de pré-pro-endothélines, précurseur de 212 acides aminés qui est ensuite clivé par une endopeptidase pour devenir des précurseurs inactifs se nommant les Big-endothélines. Enfin, ces peptides de 38 à 41 acides aminés sont clivés par l'ECE1 ou une chymase (sérine protéase) permettant de former la protéine mature active ET-1, -2 et -3.

Au niveau transcriptionnel, une surexpression des ETs est observée lors de la fixation de facteurs de transcription sur des régions régulatrices proches des promoteurs des gènes *EDN1, 2* et *3*. Par exemple il est connu que certains activateurs transcriptionnels tels que NFκB (Nuclear Factor kappa B), HIF-1α (Hypoxia-Inducible Factor 1α) ou encore FOXO1 (Fork Head Box protein O1) interfèrent avec l'expression du gène de la préproET-1 <sup>9,14</sup>. La régulation de l'axe endothéline peut aussi être médiée par des modifications épigénétiques. Par exemple, l'état de méthylation du gène *EDN1* peut affecter sa transcription <sup>15,16</sup>. De plus, il existe de nombreux *stimuli* extracellulaires tels que des médiateurs solubles comme l'angiotensine II, la

## Introduction générale

thrombine et l'insuline, le TNF- $\alpha$  qui peuvent amplifier la production d'endothéline<sup>14,17-19</sup>. Cette régulation est cellule dépendante et varie selon l'environnement cellulaire. Lorsque la production de l'endothéline est stimulée, la transcription des gènes *EDN1*, *EDN2* et *EDN3*, localisés respectivement sur les chromosomes 6, 1 et 20, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), est amorcée. Les transcrits sont alors traduits en 3 précurseurs d'environ 200 acides aminés : les préproEndothélines-1, -2 et -3 (**Figure 2**). Sous cette forme, ces endothélines sont inactives et plusieurs étapes enzymatiques de clivage sont nécessaires à leur maturation et activation<sup>17,20</sup>. Tout d'abord, les préproendothélines -1, -2 et -3 sont clivées au niveau de sites dibasiques par une endopeptidase de type Furine, formant alors un second précurseur plus communément appelé les BigETs -1,-2,-3 (ou proETs -1,-2,-3) et longs de 38, 37 et 41 acides aminés respectivement<sup>4,21,22</sup>. A cette étape ces précurseurs sont partiellement actifs. A titre d'exemple, la BigET-1 est 1000 fois moins puissante que l'ET-1 en tant qu'agent vasoconstricteur sur des vaisseaux isolés<sup>23</sup>. Enfin, l'ET-1,-2,-3 de 21 acides aminés biologiquement active est obtenu après le clivage des bigETs au niveau des sites Trp-Val pour la bigET-1,-2 et Trp-Ile pour la big-ET-3 par les Enzymes de Conversion à l'Endothéline (ECE)-1, -2 et -3 (**Figure 2**)<sup>24,25</sup>. Tandis qu'ECE-1 et ECE-2 agissent sur toutes les BigETs, ECE-3 semble être spécifique de BigET-3<sup>26</sup>. Enfin, d'autres enzymes sont capables d'agir sur la maturation des BigETs. Par exemple, après inhibition de l'action des ECEs, les chymases ont été identifiées comme jouant un rôle dans le processus de maturation des BigETs<sup>17,27</sup>. Les endothélines une fois produites sont accumulées dans des vésicules de stockage des cellules endothéliales appelées granules Weibel-Palade qui les libéreront après stimulation<sup>28</sup>.

L'endothéline 1 est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques. On peut citer le développement et la migration des cellules de la crête neurale, l'homéostasie rénale, l'angiogenèse, la respiration, la régulation de la pression artérielle ou encore la vasoconstriction. Il est à noter que l'ET-1 est le vasoconstricteur le plus puissant connu dans la littérature<sup>3,7,9,18</sup>. De par ses fonctions pléiotropiques, la concentration de l'endothéline circulante de l'ordre du picomolaire, doit être finement régulée afin de permettre, entre autres, une élimination rapide pour éviter ses effets. Sa demi-vie plasmatique de rat est de 7 min<sup>29</sup>. Il a été montré que l'endopeptidase neutrale (NEP) jouait un rôle prépondérant dans la dégradation et la régulation de l'ET-1 circulante<sup>30</sup>. D'autres études ont suggéré que la cathepsine A et la Sérine Carboxypeptidase SCEP1 pourraient être impliquées dans l'inactivation de l'endothéline en la dégradant<sup>31</sup>. Sa clairance pulmonaire et rénale élevée concourent également à sa courte durée de vie et faible concentration plasmatique.<sup>29,32</sup> ET-1

joue donc un rôle essentiel dans l'homéostasie de la pression artérielle de l'organisme en se fixant sur leurs récepteurs. Structuellement très proche de l'ET-1, la fonction de l'ET-2 a longtemps été associée à celles rapportées pour l'ET-1. Depuis peu, son rôle a été de nouveau exploré. Il a notamment été mis en évidence que ET-2 joue un rôle clé dans la physiologie ovarienne et facilite l'ovulation <sup>33</sup>. Enfin, l'ET-3 joue un rôle dans la maturation des mélanoblastes épidermiques dérivés des cellules de la crête neurale ainsi qu'au niveau des précurseurs du système nerveux entérique <sup>3,9</sup>.

### 2) Les Récepteurs des endothélines

#### a. Structure et biodistribution des Récepteurs des endothélines

Deux Récepteurs des endothélines (ETR) ont été identifiés : le récepteur des endothélines de type A (ET<sub>A</sub>) et le récepteur des endothélines de type B (ET<sub>B</sub>) <sup>34,35</sup>. Ils appartiennent à la classe 1 ou famille A des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG ou GPCR). ET<sub>B</sub> reconnaît les trois endothélines (ET-1, ET-2 et ET-3) avec la même affinité (proche du nM) alors qu'ET<sub>A</sub> a une affinité également de l'ordre du nM pour ET-1 et ET-2 et de l'ordre du 0,1 μM pour ET-3 <sup>3,9</sup>. L'ensemble de ces trois ligands, ET-1, -2 et -3, et de ces deux récepteurs, ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> constitue l'axe endothéline. Les ETR sont exprimés de façon ubiquitaire dans l'organisme (**Tableau 1**). Cependant, il existe une prédominance d'ET<sub>B</sub> au niveau de l'endothélium vasculaire (cellules endothéliales) et d'ET<sub>A</sub> à la surface des cellules musculaires lisses vasculaires, au niveau des cardiomyocytes et des cellules de Kupffer du foie <sup>36,37</sup>.

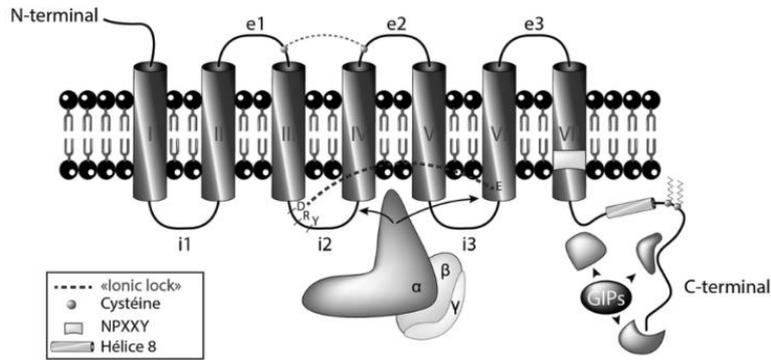
L'invalidation du gène codant le récepteur des endothélines de type A, *EDNRA*, est létale causant des problèmes cardiovasculaires et des déformations crâniofaciales majeures. Ces études ont mis en évidence le rôle essentiel d'ET<sub>A</sub> dans la migration des cellules de la crête neurale mais également dans la régulation de la vasoconstriction <sup>38</sup>. De même, l'invalidation du gène *EDNRB* provoque un mégacôlon aganglionnaire, une insuffisance rénale et un trouble pigmentaire de la peau entraînant le décès des souris dès les 8 premières semaines <sup>39</sup>. Ces travaux soulignent l'importance de l'axe endothéline dans le développement embryonnaire et dans les premiers mois de vie.

**Tableau 1 Biodistribution tissulaire et cellulaire de l'axe endothéline :** Expression physiologique des Récepteurs des endothélines et de leurs ligands dans différents tissus et cellules humaines (source : thèse Bertrand Allard, 2012, Université Paris-Sud)

	ET-1	ET-2	ET-3	ETRs
Endothélium vasculaire	+			ETBR
Endothélium lymphatique	+			ETBR
Cellules musculaires lisses vasculaires	+		+	ETAR>>ETBR
Coeur	+	+	+	ETAR>>ETBR
Poumon	+		+	ETAR-ETBR
Intestin/Côlon	+			ETAR-ETBR
Pancréas	+			ETAR-ETBR
Rein	+	+	+	ETBR>ETAR
Surrénales	+		+	ETAR-ETBR
Foie	+			ETAR-ETBR
Thyroïde	+			ETAR-ETBR
Follicule Ovarien: - granulosa	+	+		ETAR
Utérus: - endomètre	+	+	+	ETAR-ETBR
- myomètre	+			ETAR>ETBR
Placenta	+			ETAR-ETBR
Testicules	+			ETAR>ETBR
Epididyme	+			ETAR-ETBR
Pénis (corps caverneux)	+			ETAR>ETBR
Prostate	+			ETAR-ETBR
Cerveau (neurones, astrocytes)	+		+	ETAR-ETBR
Système nerveux périphérique	+	+	+	ETAR-ETBR
Peau (mélanocytes, kératinocytes)	+			ETBR
Macrophages, Granulocytes	+		+	ETBR, ETAR
Tissu adipeux	+			ETAR, ETBR
Os				ETAR-ETBR

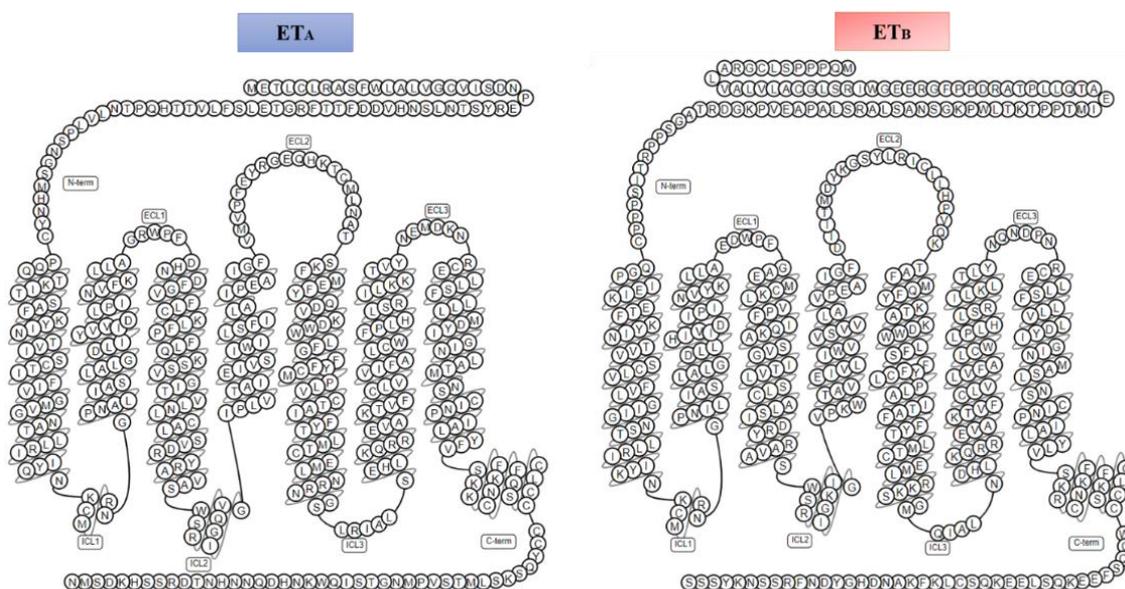
Les Récepteurs des endothélines sont des membres de la superfamille des protéines membranaires couplées aux protéines G (GPCR, G-protein coupled Receptor). Ils sont constitués de 7 domaines transmembranaires (TM). Couplés à des protéines G hétérotrimériques au niveau de l'extrémité carboxyle du GPCR, ils permettent la transduction du signal à l'intérieur de la cellule. Les domaines TM sont constitués d'hélices  $\alpha$  reliées par des boucles intracellulaires (**Figure 3** i1, i2, i3) et extracellulaires (**Figure 3** e1, e2, e3). Il est également fréquent de retrouver 2 cystéines conservées entre les régions extracellulaires e1 et e2<sup>40</sup>. Il existe souvent une dernière hélice  $\alpha$  intracellulaire (hélice 8) se situant au niveau de la partie C-terminale du récepteur.

## Introduction générale



**Figure 3 : Structure classique des RCPG** (Bockaert *et al.*, 2012). Récepteurs à 7 domaines TM liés par 3 boucles extracellulaires (e1, e2 et e3) et 3 boucles intracellulaires (i1, i2, i3). Le domaine N-terminal est localisé dans la région extracellulaire alors que le domaine C-terminal composé d'une 8<sup>ème</sup> hélice se situe du côté intracellulaire et peut entrer en interaction avec des protéines intracellulaires (GIPs : *GPCR Interacting Proteins*).

ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> comptent respectivement 427 et 442 acides aminés avec un poids moléculaire respectif de 49 kDa et 50 kDa. Leurs séquences peptidiques ne présentent que 59 % d'homologie. Leur différence en nombre d'acides aminés réside au niveau de la région N-terminale avec, dans le cas d'ET<sub>A</sub>, 69 acides aminés alors que celle d'ET<sub>B</sub> semble légèrement plus importante avec 90 acides aminés. La longueur des 7 domaines transmembranaires, comprise entre 30 et 45 aa, et du domaine C-terminal, composé d'une quarantaine d'acides aminés après la 8<sup>ème</sup> hélice  $\alpha$ , semble commune aux deux récepteurs (**Figure 4**). Ces données structurales ont pu être recueillies grâce à la *GPCR database* ([GPCRdb](http://www.gpcrdb.org)), une base de données de référence des RCPG qui combine des données structurales, de séquençage, et de fonctions des RCPG grâce aux progrès technologiques tels que le séquençage du génome à haut débit, ou encore les avancées technologiques en cryo-microscopie électronique <sup>41</sup>.



**Figure 4 : Structure en 2 dimensions (2D) d'ET<sub>A</sub> et d'ET<sub>B</sub> humains obtenues par la GPCRdb.**

## Introduction générale

Ces nouvelles bases de données sont d'une grande aide pour la compréhension des mécanismes structuraux et dynamiques des RCPG qui s'avèrent être une problématique de longue date dans la conception de nouveaux médicaments les ciblant. En effet, ces structures sont en constant mouvement entraînant des changements d'orientation entre les hélices  $\alpha$  ou des boucles extra- et intra-cellulaires. Ces modifications conformationnelles sont extrêmement rapides, de l'ordre de la nanoseconde <sup>42</sup>. La cristallographie des RCPG a donc constitué un véritable défi et a contribué à l'obtention du prix Nobel de chimie à Brian Kobilka et Robert Lefkowitz en 2012 avec la cristallographie du RCPG  $\beta_2$ -adrénergique en présence d'un antagoniste <sup>43,44</sup>. La cristallographie a permis d'obtenir des informations structurales essentielles dans les changements conformationnels de  $ET_B$  en absence ou en présence de  $ET-1$  <sup>45</sup>.

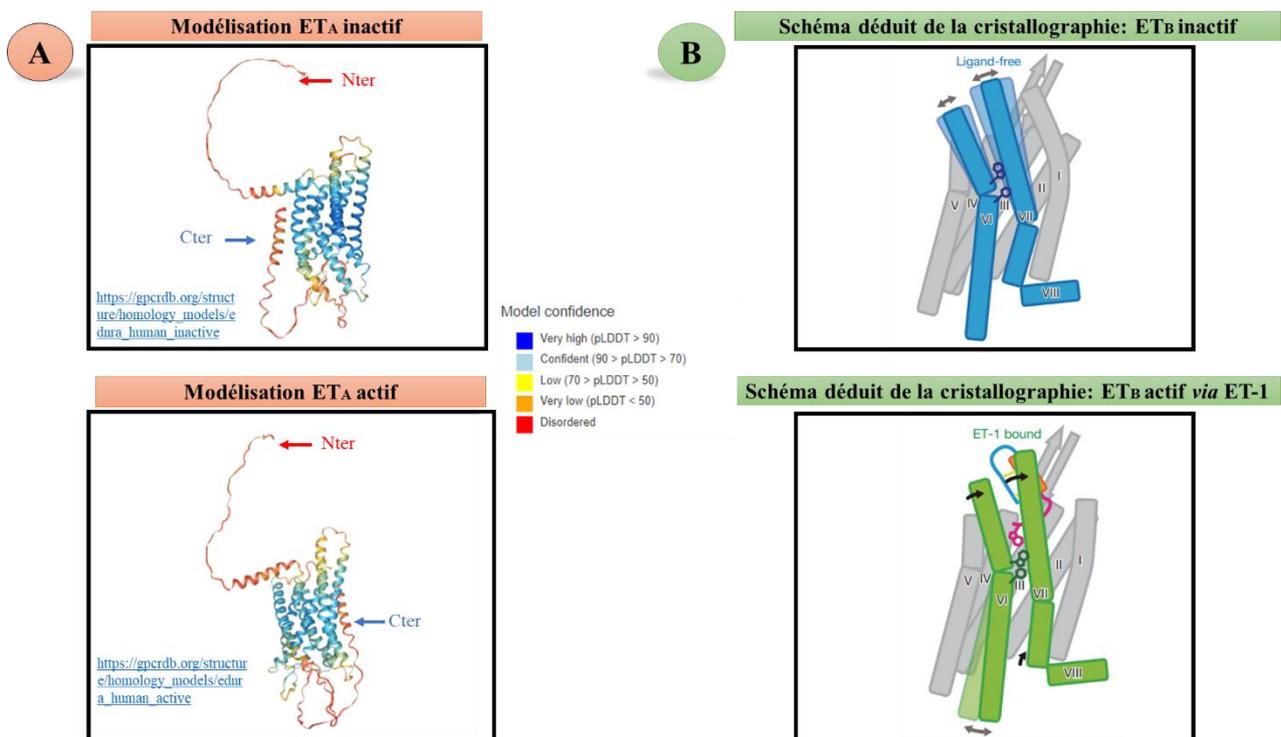
Les RCPG ont longtemps été considérés comme des récepteurs localisés uniquement au niveau de la membrane plasmique des cellules modulant l'expression des gènes qu'au travers de leurs voies de signalisation. Plusieurs travaux décrivent que ces récepteurs peuvent également être localisés au niveau de l'enveloppe nucléaire et pourraient ainsi moduler des fonctions biologiques différentes des RCPG de la membrane plasmique <sup>46</sup>. Par ailleurs, la présence d' $ET_A$  et  $ET_B$  fonctionnels au niveau de l'enveloppe nucléaire a été montré dans différentes études <sup>47-49</sup>. Les RCPG nucléaires  $ET_A$  et  $ET_B$  semblent être modifiés dans des conditions pathologiques. Comprendre les mécanismes physiopathologiques reliés à cette localisation nucléaire est un enjeu majeur de la recherche actuelle.

Plusieurs équipes ont cherché à identifier les sites de fixation de  $ET-1$  sur  $ET_A$  et  $ET_B$  <sup>50</sup>.  $ET-1$  se lie avec la région N-terminale d' $ET_A$  et plusieurs acides aminés se trouvant dans les régions transmembranaires 1, 2, 3 et 6 (Gly97, Lys140, Lys159, Gln165 et Phe315) <sup>51</sup>. Ces données expérimentales ainsi que des analyses de la séquence protéique d' $ET_A$ , ont permis la modélisation de sa forme active et inactive (**Figure 5A**). Concernant  $ET_B$ , des données expérimentales majeures ont été obtenues suite à la cristallisation de ce récepteur en présence de ses agonistes endogènes  $ET-1$  et  $ET-3$  ou dépourvu de ligand <sup>45</sup>. L'analyse de différentes mutations induites sur le récepteur a mis en évidence l'implication d'un plus grand nombre de résidus d'acides aminés pour sa liaison avec l' $ET-1$  qu'avec l' $ET-3$ . Les travaux de cristallisation de  $ET_B$ , réalisés par le Dr. Shihoya révèlent l'implication des régions transmembranaires 1, 2, 6 et 7 de  $ET_B$  dans sa liaison avec l'endothéline. (**Figure 5B**). Ces résultats soulignent le caractère allostérique de ce récepteur avec des changements conformationnels induits par les agonistes. Lors de sa fixation, l' $ET-1$  se loge dans la cavité du

## Introduction générale

récepteur déplaçant ainsi le domaine N-terminal normalement enfoui dans cette cavité. Si des données structurales existent pour ET<sub>B</sub>, ET<sub>A</sub> n'a toujours pas été cristallisé à ce jour. La modélisation de ce dernier révèle que ET<sub>A</sub> ne posséderait qu'une forme inactive (**Figure 5A**).

Ces données de cristallographie ou de modélisation soulignent la complexité structurale et dynamique des Récepteurs des endothélines auxquelles s'ajoute la compréhension des processus impliqués dans la régulation de l'expression génétique et épigénétique lors de leur biosynthèse.



**Figure 5 : Modélisation et représentation schématique de la cristallographie des Récepteurs des endothélines dans leur état actif et inactif.** À gauche (A) est présentée la modélisation effectuée par la GPCRdb de ET<sub>A</sub> à l'état actif correspondant à son état structural lors de son association avec un ligand tel que l'ET-1 ou à l'état inactif lorsque le récepteur est dépourvu de ligand. À droite (B) se trouve une représentation schématique du récepteur ET<sub>B</sub> déduite des résultats obtenus par cristallographie (Shihoya *et al.*, 2016). Les flèches noires indiquent un changement conformationnel au niveau des TM6 et 7, rendus plus flexibles du côté intracellulaire suite à l'interaction de ET<sub>B</sub> médié par ET-1.

## Introduction générale

### b. Biosynthèse, variants et isoformes des Récepteurs des endothélines

Le récepteur des endothélines de type A est codé par le gène *EDNRA* composé de 63 858 pb qui se trouve sur le chromosome 4 comprenant 9 exons (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Ce récepteur appartient à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), jouant un rôle essentiel dans la communication cellulaire et l'homéostasie de l'organisme. Entre les régions extracellulaires d'ET<sub>A</sub> humain et murin, 65% des acides aminés sont conservés, l'essentiel des variations étant localisé dans la région N-terminale (**Figure 6**).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
810 bits(2091)	0.0	Compositional matrix adjust.	394/427(92%)	411/427(96%)	0/427(0%)
<b>Query = ET<sub>A</sub> humain</b>	1	METLCLRASFWLALVGCVISDNPERYSTNLSNHVDDFTFRGTELSFLVTTHTQPTNLVLP			60
<b>Subject= ET<sub>A</sub> murin</b>	1	M CL A FWL +VG V++DNPERYS NLS+H++DFT F GTE++FL TTH+P NL LP			60
		<b>MSIFCLAAYFWLTMVGGVMADNPERYSANLSSHMEDFTFPFPGTEINFLGTTTHRPPNLALP</b>			60
	61	SNGSMHNYCPQQTKITSAFKYINTVISCTIFIVGMVGNATLLRIIYQNKCMRNGPNALIA			120
	61	SNGSMH YCPQQTKIT+AFKYINTVISCTIFIVGMVGNATLLRIIYQNKCMRNGPNALIA			120
		<b>SNGSMHGYCPQQTKITTA</b> FKYINTVISCTIFIVGMVGNATLLRIIYQNKCMRNGPNALIA			120
	121	SLALGDLIYVVIDLPINVFKLLAGRWPFDHDFGVFLCKLFPFLQKSSVGITVNLNLCALS			180
	121	SLALGDLIYVVIDLPINVFKLLAGRWPFDHDFGVFLCKLFPFLQKSSVGITVNLNLCALS			180
		<b>SLALGDLIYVVIDLPINVFKLLAGRWPF</b> DHDFGVFLCKLFPFLQKSSVGITVNLNLCALS			180
	181	VDRYRAVASWSRVQIGIGIPLVTAIEIVSIWILSFILAIPEAIGFVMPFVEYRGEQHKTCM			240
	181	VDRYRAVASWSRVQIGIGIPL+TAIEIVSIWILSFILAIPEAIGFVMPFVEY+GE H+TCM			240
		<b>VDRYRAVASWSRVQIGIGIPL</b> TAIEIVSIWILSFILAIPEAIGFVMPFVEYKGEHRTCM			240
	241	LNATSKFMEFYQDVKDWLFGFYFCMPLVCTAIFYTLMTCEMLNRRNGSLRIALSEHLKQ			300
	241	LNATSKFMEFYQDVKDWLFGFYFCMPLVCTAIFYTLMTCEMLNRRNGSLRIALSEHLKQ			300
		<b>LNATSKFMEFYQDVKDWLFGFYFCMPLVCTAIFYTLMTCEMLNRRNGSLRIALSEHLKQ</b>			300
	301	RREVAKTVFCLVIFALCWFLHLSRILKKTVYNEMDKNRCELLSFLLLMDYIGINLATM			360
	301	RREVAKTVFCLVIFALCWFLHLSRILKKTVY+EMDKNRCELLSFLLLMDYIGINLATM			360
		<b>RREVAKTVFCLVIFALCWFLHLSRILKKTVY</b> EMDKNRCELLSFLLLMDYIGINLATM			360
	361	NSCINPIALYFVSKFKKNCQSCLCGCCYQSKSLMTSVPMNGTSIQWKNHQNHNHNTDRS			420
	361	NSCINPIALYFVSKFKKNCQSCLCGCC+QSKSLMTSVPMNGTSIQWKN +QNNHNT+RS			420
		<b>NSCINPIALYFVSKFKKNCQSCLCGCC</b> HQSKSLMTSVPMNGTSIQWKNQEQNNHNTERS			420
	421	SHKDSMN 427			
	421	SHKDSMN 427			
		<b>SHKDSMN 427</b>			

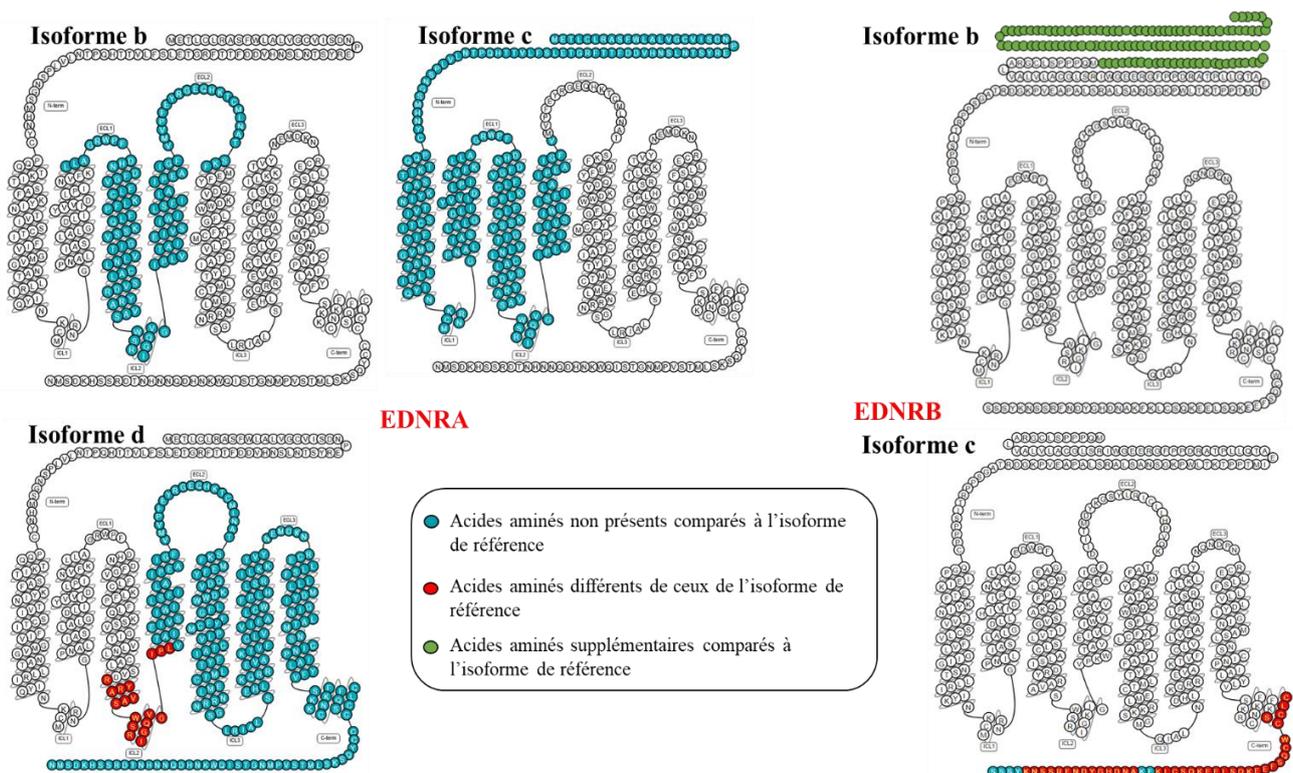
**Figure 6 : Alignement protéique des séquences de l'ET<sub>A</sub> humain vs murin via le site NCBI.** Les séquences soulignées en rouge correspondent aux séquences de la région N-terminale ; en jaune de la région extracellulaire 1 ; en orange de la région extracellulaire 2 ; en rose de la région extracellulaire 3. Dans cet alignement la Query correspond à la séquence en acide aminée de l'ET<sub>A</sub> humain et le subject à celle de l'ET<sub>A</sub> murin.

Le nombre de transcrits diffère entre les banques de données américaine <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> ou européenne [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/), allant de 6 transcrits à 9 transcrits différents codant jusqu'à 7 isoformes de ET<sub>A</sub>. Certaines isoformes ont subi des délétions, d'autres des substitutions (**Figure 7**). L'isoforme dite de référence, la plus fréquente dans les tissus, code pour un récepteur ET<sub>A</sub> de 427 aa. Les autres

## Introduction générale

isoformes issues d'épissage alternatif sont moins fréquentes et leur rôle peu documenté. Elles ont néanmoins été identifiées dans différents tissus sains tels que l'aorte et le poumon mais également dans des conditions pathologiques comme le mélanome <sup>52,53</sup>.

Le récepteur des endothélines B est codé par le gène *EDNRB*, localisé sur le chromosome 13, il contient 160 168 pb et comporte 9 exons. Entre les régions extracellulaires de ET<sub>B</sub> humain et murin, 65% des acides aminés sont conservés, l'essentiel des variations étant localisé dans la région N-terminale. Cette dernière est particulièrement longue et peut être clivée par une métalloprotéase permettant l'élimination des 64 premiers acides aminés, tout en conservant sa capacité de liaison de ET-1 <sup>54</sup>. Tout comme ET<sub>A</sub>, le nombre de transcrits diffère entre les banques de données américaine <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> ou européenne [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Info/Index](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index), allant de 4 transcrits à 8 transcrits différents codant jusqu'à 6 isoformes de ET<sub>B</sub>. Une étude remarquable sur le cancer du sein a présenté un potentiel rôle des isoformes d'ET<sub>B</sub> comme étant impliquées dans des processus de développement de ce cancer <sup>55</sup>. Toutefois, l'isoforme de l'ET<sub>B</sub>, dite de référence et la plus décrite est l'isoforme a, composée de 442 aa. (**Figure 7**).



**Figure 7 : Principales isoformes des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> décrits dans la base de données NCBI.** ET<sub>A</sub> peut être traduite en 4 isoformes et ET<sub>B</sub> en 3 isoformes.

## Introduction générale

Cette liste des transcrits référencé, dans la littérature et les banques de données, n'est peut-être pas exhaustive. En effet, les données issues de la génomique, de la transcriptomique et de la protéomique évoluent. L'étude des variants de ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> reflète un niveau de complexité dans la signalisation de l'axe endothéline en conditions physiopathologiques mal compris de nos jours et constitue un domaine de recherche à part entière. Les modifications post traductionnelles des récepteurs et leur capacité à s'oligomériser sous forme d'homo/hétérodimère ou –trimère sont des paramètres à prendre également en compte pour appréhender la complexité de la signalisation *via* les endothélines.

### *c. Modification post traductionnelle*

Les ETR possèdent des domaines N-terminaux et C-terminaux importants, propices aux modifications post-traductionnelles régulant leur activité. Les glycosylations, les palmitoylations et les phosphorylations sont les plus décrites dans la littérature.

*La glycosylation* lie de façon covalente un glucide à une chaîne peptidique. On trouve, dans la littérature, plus d'une dizaine de N-glycosylations qui se localisent sur la région N-terminale des ETR<sup>3,9,21</sup>.

*La palmitoylation* correspond à la liaison covalente entre un acide gras et une cystéine d'une protéine. Il existe cinq sites de palmitoylation retrouvés dans le domaine C-terminal d'ET<sub>A</sub> et quatre dans ce même domaine pour ET<sub>B</sub><sup>3,9,21</sup>. Cette modification post traductionnelle peut interférer avec des voies de signalisation de la phospholipase C (PLC) et des voies Mitogen-activated protein kinase (MAPK), en perturbant l'ancrage membranaire de la région C-terminale des récepteurs<sup>56</sup>. Cette modification post traductionnelle sert de sélecteur au couplage des protéines G hétérotrimériques et à l'activation des voies de signalisation en fonction des *stimuli* de l'environnement<sup>57</sup>.

Enfin, il existe 15 sites de *phosphorylation* pour ET<sub>A</sub> et 13 pour ET<sub>B</sub> au niveau de leur région C-terminale<sup>3,9,57</sup>. Elle correspond à l'addition d'un groupement phosphate sur la protéine. Cette modification post-traductionnelle, bien connue de la littérature, joue de nombreux rôles. Par exemple, une équipe a démontré qu'elle permettait la désactivation rapide du récepteur ET<sub>B</sub> (5 minutes) après stimulation à l'ET-1. Dans le cas d'ET<sub>A</sub>, son inactivation ne semble pas être dépendante de cet état de phosphorylation mais plutôt par son internalisation lente après son activation<sup>58</sup>.

### *d. Dimérisation et oligomérisation des ETR*

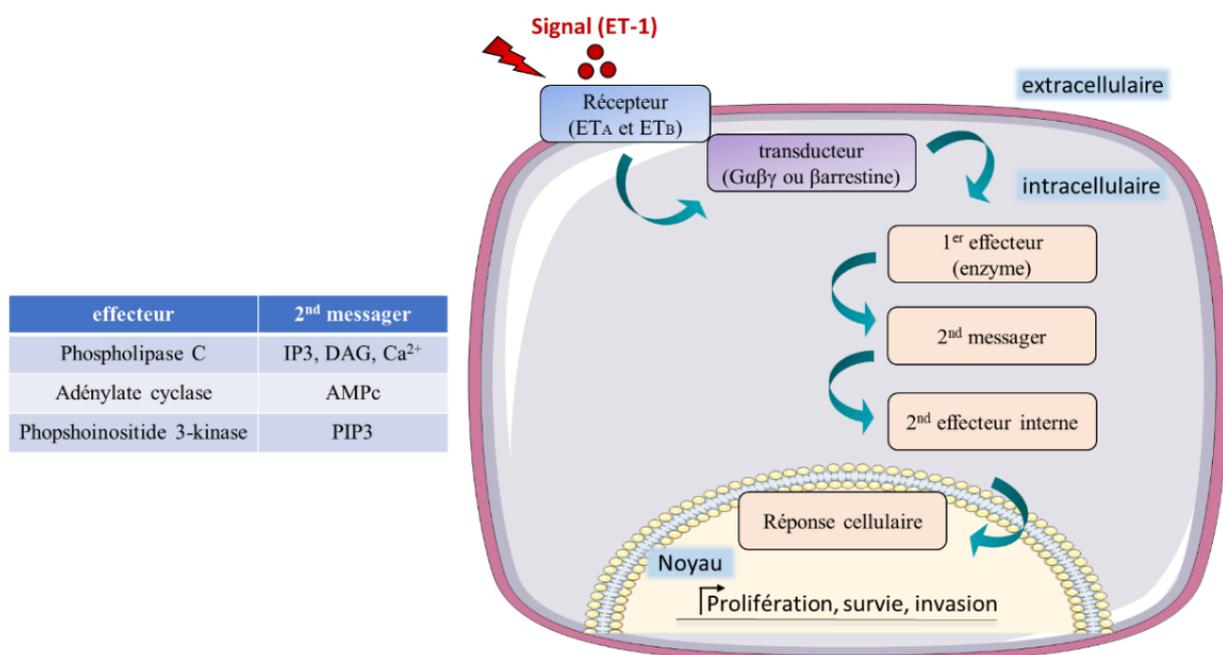
Depuis les années 2010, il est admis que les Récepteurs des endothélines sont présents dans un premier temps sous forme de monomères, puis d'homodimères ( $ET_B-ET_B$  ou  $ET_A-ET_A$ ) ou d'hétérodimères ( $ET_A-ET_B$ ), allant parfois jusqu'à des formes tétramériques<sup>59-61</sup>. Ces oligomères sont présents de manière constitutive dans l'organisme. Pour élucider le rôle de ces oligomères, des petites molécules antagonistes et agonistes ont été utilisées. Par définition, les molécules antagonistes se fixent aux récepteurs et inhibent leur activation normalement obtenue après fixation des ligands endogènes. Souvent, les antagonistes jouent le rôle de compétiteurs du ligand endogène et entraînent une réponse physiologique. Mais ils peuvent aussi être non-compétiteurs du ligand en se liant simultanément et en inhibant l'activation du récepteur. Quant aux molécules agonistes, elles activent les récepteurs.

L'utilisation de l'antagoniste d' $ET_A$ , le BQ123, a augmenté la présence de monomères  $ET_A$  et a significativement réduit sa forme dimérique. Cela suggère que la forme dimérique et monomérique peuvent toutes deux impacter l'activation du récepteur. Pourtant, l'utilisation d'un autre antagoniste d' $ET_A$ , le Sitaxentan, n'a montré aucun effet sur ces oligomères, réfutant dès lors l'hypothèse initiale<sup>62</sup>. Les cinétiques d'internalisation des hétérodimères, des homodimères ou des monomères ont également été étudiées au sein de la communauté et des résultats divergents ont été mis en évidence. Les formes dimériques d' $ET_B$  ( $ET_B-ET_B$  et  $ET_B-ET_A$ ) présentent une internalisation cellulaire plus lente que le monomère  $ET_B$ . L'agoniste d' $ET_B$ , BQ3020, induit la dissociation de l'hétérodimère  $ET_A-ET_B$  et sa rapide internalisation au sein des cellules. En revanche, cet agoniste n'a pas d'impact sur l'homodimère  $ET_B-ET_B$  et son internalisation cellulaire<sup>63</sup>. Ces résultats suggèrent que l'oligomérisation des Récepteurs des endothélines contribuerait à une diminution de leur internalisation cellulaire et augmenterait leur biodisponibilité à la membrane. Au niveau structurel, l'homodimérisation d' $ET_B$  serait médiée par les segments transmembranaires du récepteur<sup>64</sup>. Pour  $ET_A$ , le motif PDZ présent dans sa région C-terminale jouerait un rôle dans son homodimérisation et dans son hétérodimérisation avec  $ET_B$ . Lorsque celle-ci est mutée, la voie calcique est modifiée dans le temps, démontrant ainsi un lien étroit entre les hétérodimères et les voies de signalisation de l'endothéline<sup>65</sup>. Les conséquences de ces dimérisations sont mal définies et ce réseau semble extrêmement complexe puisque l'hétérodimérisation des ETR peut également s'effectuer avec d'autres récepteurs tels que le récepteur de la dopamine D3<sup>66</sup>.

L'exploration approfondie des Récepteurs des endothélines notamment de leurs isoformes, de leur épissage alternatif, de leurs modifications post-traductionnelles et de leur oligomérisation est nécessaire afin de mieux comprendre et maîtriser ce système et de développer des thérapies ciblées ou ajuster les traitements dans diverses pathologies causées par une dérégulation des Récepteurs des endothélines <sup>67</sup>.

### 3) Signalisation de l'axe endothéline physiologique

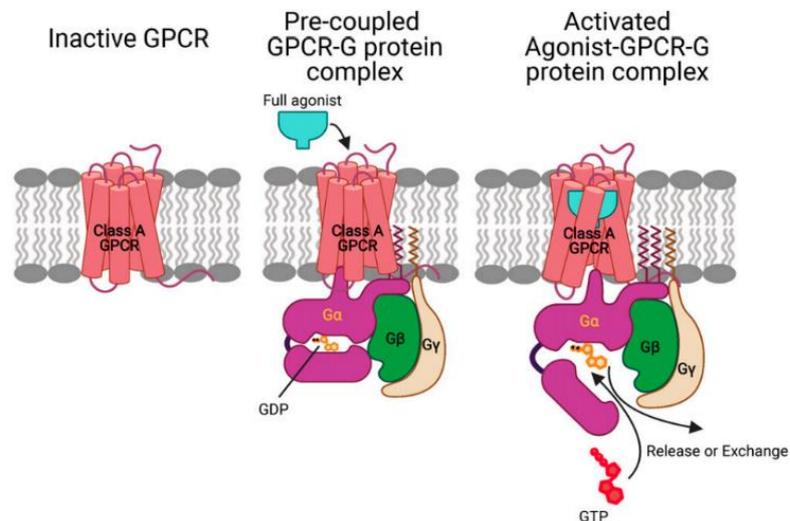
Comme décrit précédemment, l'axe endothéline, moteur de nombreux effets physiologiques au sein de la cellule, médie un grand nombre de voies de signalisation intracellulaires *via* ses récepteurs. Leurs régions extracellulaires, activées par leurs ligands, transduisent le signal par des modifications conformationnelles permettant le couplage aux protéines G ou aux  $\beta$ -arrestines. Ces dernières, aussi appelées transducteurs, activent un effecteur, souvent une enzyme, qui à son tour activera un second messenger puis un second effecteur interne, ce qui provoque une réponse cellulaire (**Figure 8**).



**Figure 8 : Schéma illustrant une voie de signalisation dite « classique ».** Voie de signalisation « classique » et tableau donnant des exemples d'effecteurs et principaux 2<sup>nd</sup> messagers des voies PLC,, Adénylate cyclase et PI3K

*a. Transducteurs de la signalisation des ETR : Protéine G et  $\beta$ -arrestine*

Les protéines G couplées aux RCPG sont des protéines hétérotrimériques composées de trois sous-unités de type alpha ( $G\alpha$ ), beta ( $G\beta$ ) et gamma ( $G\gamma$ ). Elles sont capables d'échanger leur GTP contre du GDP, déclenchant ainsi diverses voies de signalisation. La sous unité  $\alpha$  de la protéine G est composée de 2 domaines, l'un étant une hélice  $\alpha$  et l'autre possédant une activité catalytique GTPase, catalysant l'hydrolyse du guanosine triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP) et phosphate inorganique (Pi) <sup>68</sup>. Sous sa forme inactive la protéine  $G\alpha$  est liée au GDP et complexée avec  $G\beta$ - $G\gamma$ . Lorsque le récepteur lié à la  $G\alpha$  (dans notre cas les ETR) interagit avec son ligand ou un agoniste, ce dernier change de conformation, ce qui a pour conséquence la modification conformationnelle de la protéine  $G\alpha$  et la libération du GDP. Le GDP est alors remplacé par du GTP activant la protéine  $G\alpha$ . A ce moment-là, la protéine  $G\alpha$  se dissocie du complexe  $G\beta$ - $G\gamma$ . Une fois active, la protéine  $G\alpha$  transforme le GTP en GDP + Pi, et repasse sous sa forme inactive liée au GDP. Ceci permet à la protéine G d'interagir avec des protéines que l'on nomme protéines effectrices de la cascade de transduction du signal (**Figure 9**).



**Figure 9 : Schéma de la structure et du fonctionnement des RCPG et de leur protéine G** (Mafi *et al.*, 2022). Sans ligand, les RCPG sont dans une conformation inactive ainsi que la protéine G. Lorsque le récepteur rentre en interaction avec le ligand, la protéine G change de conformation et libère le GDP pour l'échanger contre du GTP.

Il existe une vingtaine de sous-unités  $\alpha$  de la protéine G, dans notre cas, seules 3 d'entre elles nous intéressent : la  $G\alpha_s$  (activateur), la  $G\alpha_i$  (inhibiteur), la  $G\alpha_q$  (activateur). C'est l'identité de ces sous-unités  $\alpha$  qui détermine la nature de l'effecteur. Par exemple, il est connu et bien référencé que la  $G\alpha_s$  active l'adénylate cyclase et augmente la synthèse d'AMPc à partir d'adénosine triphosphate (ATP), alors que la  $G\alpha_i$  inhibe l'adénylate cyclase et donc la

## Introduction générale

production d'AMPc. Enfin, la  $G_{\alpha q}$  stimule la phospholipase C (PLC), ce qui active la Protéine Kinase C (PKC) et la voie calcique dans le cytoplasme.  $ET_A$  a été identifié comme associé à  $G_{\alpha q}$  et  $G_{\alpha s}$  tandis que  $ET_B$  serait associé à  $G_{\alpha q}$  et  $G_{\alpha i}$  <sup>69-71</sup>. Au vu de la complexité des voies de signalisations des RCPG, seules les principales voies de signalisation seront décrites dans ce manuscrit : PLC, adénylate cyclase, PI3K, MAPK. Il est en effet important de connaître les principales cascades de signalisation pour mieux appréhender leur rôle dans un système pathologique et plus particulièrement dans le processus d'oncologie. Ces voies de signalisation seront détaillées dans la suite de cette partie introductive.

En parallèle des protéines G, les ETR sont capables de s'associer à d'autres protéines, notamment à la  $\beta$ -arrestine <sup>72,73</sup> modifiant la signalisation enclenchée par la protéine G, ce processus est appelé désensibilisation. En effet, Les RCPG activés par un agoniste vont enclencher, *via* les protéines G, leurs voies de signalisation, par exemple la production d'AMPc. Par la suite, des protéines de type kinases, *G protein-coupled receptor kinase* (GRK), sont recrutées à la membrane et phosphorylent le RCPG au niveau de son domaine C-terminal, induisant le recrutement de la  $\beta$ -arrestine. Celle-ci se fixe sur la protéine  $G_s$  et empêche son action. Ainsi, la désensibilisation permet de canaliser une stimulation excessive et régule des molécules biologiques comme par exemple la synthèse d'AMPc. Les  $\beta$ -arrestines peuvent aussi interagir avec d'autres protéines, parallèlement à leur interaction avec la protéine G, provoquant l'internalisation des RCPG ou l'activation d'autres voies de signalisation. Par exemple, la  $\beta$ -arrestine peut être liée à la clathrine avec AP2, favorisant dès lors l'endocytose du récepteur. La  $\beta$ -arrestine peut également se fixer à des protéines qui permettent l'activation d'autres voies de signalisation comme la voie des MAPK avec les protéines ERK2, JNK3, c-Raf ou ASK1 ou encore avec la protéine Akt (protéine kinase B) et bien d'autres <sup>74,75</sup>. Il est important de noter que toutes les protéines de ce système sont régulables, ce qui donne lieu à une cartographie extrêmement complexe et tissu-dépendante. Par exemple, il est connu que MDM2, une E3 ubiquitine ligase, peut ubiquitinyler la GRK et provoquer sa dégradation <sup>76</sup>. Dès lors, le taux de GRK diminue drastiquement, inhibant le phénomène de désensibilisation des RCPG ce qui permet une reprise de l'activité initiale des RCPG.

### *b. Voie de signalisation classique des RCPG*

Par définition, une voie de signalisation débute par l'activation du récepteur qui permet à son tour la stimulation de protéines effectrices primaires à activité enzymatique, des kinases ou des phosphatases, ou à activité non enzymatique, comme les canaux ioniques et les RCPG. Par la suite cet effecteur primaire active un second messager (**Figure 8**) qui active lui-même un

effecteur secondaire, jusqu'à l'obtention de facteurs de transcription ou de molécules déjà prêtes à agir permettant l'induction d'une réponse cellulaire.

Les Récepteurs des endothélines enclenchent la cascade de signalisation de la **phospholipase C (PLC) (Figure 10)**. La PLC permet l'activation de la voie calcique ainsi que l'activation de la Protéine Kinase C. Il existe 2 PLC, la PLC $\beta$  activée par les RCPG, plus précisément par la G $\alpha_q$ , et la PLC $\gamma$ , qui est, quant à elle, activée par des Récepteurs à activité Tyrosine Kinase (RTK). Ce type d'enzyme permet le clivage du phosphatidyl-inositol-diphosphate (PiP<sub>2</sub>) se localisant au niveau de la membrane plasmique en diacylglycérol (DAG) et en inositol tri-phosphate (iP<sub>3</sub>). L'iP<sub>3</sub> est un phosphoalcool hydrophile localisé dans le cytoplasme et contrôle l'activation de récepteurs situés au niveau du réticulum endoplasmique lisse (REL), une entité extrêmement riche en Ca<sup>2+</sup>, contrairement au cytoplasme. Ainsi, cette interaction active les canaux calciques du REL et permet l'efflux du calcium vers le cytoplasme. L'augmentation du Ca<sup>2+</sup> cytoplasmique régule différentes fonctions d'endocytose ou encore active des facteurs transcriptionnels tels que la protéine CREB (*cAMP Response Element-Binding protein*). La régulation de la réponse calcique lorsqu'elle n'est plus nécessaire se fait à l'aide de pompes d'efflux. Par exemple, des échangeurs Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> permettent d'échanger le Na<sup>+</sup> extracellulaire contre du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Dans ce contexte, il a d'ailleurs été démontré que ET-1 peut augmenter le Ca<sup>2+</sup> cytosolique par la voie PLC <sup>77</sup>.

Le DAG est composé d'un résidu glycérol et de deux acides gras liés de façon covalente. Etant de nature hydrophobe, ce dernier reste localisé à la membrane et active la protéine kinase de type C (PKC), une sérine thréonine kinase qui permet à son tour une réponse cellulaire par des interactions de phosphorylation. Par exemple, l'endothéline 1 stimule la production de la PKC par la voie PLC et potentialise la vasoconstriction dans des artérioles adipeuses humaines <sup>78</sup>. La signalisation ET-1 et PKC est également impliquée dans la synthèse de protéines et la prolifération cellulaire <sup>79</sup>.

Les Récepteurs des endothélines régulent aussi la voie de signalisation de **l'adénylate cyclase** à l'aide des protéines G $\alpha_s$  qui l'activent et G $\alpha_i$  qui l'inhibent (**Figure 10**). Ce premier effecteur est composé d'un domaine transmembranaire et d'un domaine catalytique qui permet la synthèse d'AMPc (adénosine monophosphate cyclase) à partir d'ATP (adénosine triphosphate). L'AMPc représente le 2<sup>nd</sup> messenger de cette voie de signalisation. Dans la littérature, les nombreux rôles physiologiques de l'AMPc ont été explorés dont le plus connu et référencé est son rôle dans l'activation par phosphorylation de la protéine kinase A (PKA). La PKA va, à son tour, moduler de nombreux signaux cellulaires dont la stimulation des canaux

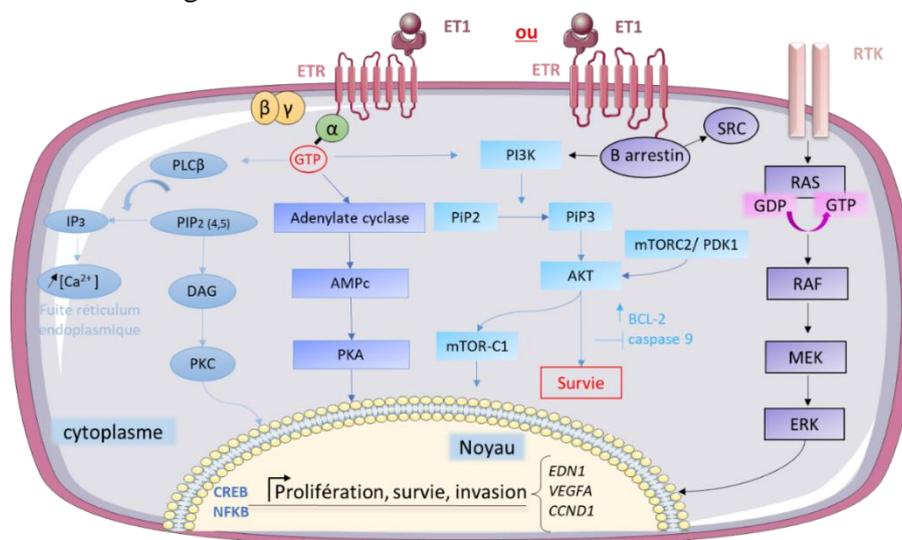
calciques. À l'instar de la PKC, la PKA régule divers effets biologiques comme des voies métaboliques avec l'activation de la synthèse du glycogène ou de lipides *via* des facteurs de transcription. À titre d'illustration, l'endothéline 1 permet la stimulation des muscles lisses *via* cette cascade de signalisation mais peut aussi avoir un tout autre rôle en perturbant la perméabilité de cellules au travers de la PKA <sup>80</sup>. L'AMPc a également été impliquée dans la modulation des canaux ioniques, l'induction de la contraction musculaire, et semblerait aussi interférer avec d'autres voies de signalisation. Il a d'ailleurs été mis en évidence que la voie de signalisation de l'adénylate cyclase-AMPc inhibait l'augmentation du calcium, préalablement stimulée par ET<sub>A</sub> <sup>81</sup>.

**La phosphoinositide 3-kinase (PI3K)** est une enzyme hétérodimérique composée d'une sous unité régulatrice (p85) et d'une sous unité catalytique (p110). La PI3K activée par des RCPG ou des RTK se retrouve à la membrane plasmique et se dissocie, inhibant l'activité régulatrice de la sous unité p85 sur p110. La sous unité catalytique p110 libre peut alors transformer des phosphoinositides (PIP2) en phosphatidylinositol-3-phosphate (PIP3). Le PIP3, second messenger de cette voie de signalisation, recrute la protéine AKT *via* son domaine homologue pleckstrine (PH). AKT est une protéine kinase qui peut être phosphorylée par PDK1 ou mTORC2. Une fois active, elle inhibe beaucoup de protéines telles que la GSK3, MDM2, FOXO qui ont pour rôle d'inhiber la prolifération cellulaire. AKT peut également inhiber le complexe TSC ce qui lève l'inhibition de mTORC1 qui, à son tour, active des facteurs de la transcription responsable de la prolifération, la survie et la migration cellulaire (**Figure 10**) <sup>82</sup>. La voie PI3K est d'ailleurs impliquée dans l'augmentation de la transcription du gène *EDNI* suite à sa stimulation par l'insuline ou par ET-1 constituant ainsi une boucle autocrine <sup>83</sup>.

**La Mitogen-Activated Proteine Kinase (MAPK)** est une cascade de signalisation composée de protéines kinases de type sérine/thréonine ou tyrosine qui transduisent leur signal par des phosphorylations successives (**Figure 10**). Dans la majorité des cas, cette voie est enclenchée suite à la réponse induite par l'interaction de facteurs de croissance avec des RTK et serait impliquée dans la prolifération, la survie, la migration, la différenciation, l'apoptose cellulaire ainsi que dans les phénomènes inflammatoires. Les RTK activés s'autophosphorylent et recrutent une GTPase se nommant RAS (*Rat Sarcoma*). Cette dernière activée recrute une nouvelle kinase, RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*), au niveau de la membrane plasmique, qui, à son tour, active séquentiellement par phosphorylation deux autres kinases MEK (*Mitogen-activated Extracellular signal-regulated Kinase*) et ERK (*Extra-cellular signal-Regulated Kinase*). RAF peut également être activée par diverses protéines telles que PKC, Src (*sarcoma kinase*), AKT et bien d'autres. Les ETR activés par l'ET-1 sont capables

de transactiver les RTK comme par exemple l'EGFR dans des cellules de carcinome épidermoïde <sup>84</sup>. Il a également été démontré que la palmitoylation des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> suite à la stimulation de ET-1 pouvait activer la voie MAPK <sup>56</sup>. Des travaux ont montré qu'une signalisation croisée entre la voie PI3K et MAPK activée par ET<sub>A</sub> existe dans les cellules musculaires lisses <sup>85</sup>. Une fois la protéine ERK activée, elle phosphoryle d'autres protéines qui induisent une réponse cellulaire adaptée au signal initial. ERK peut avoir une action dans le cytoplasme mais également au niveau nucléaire suite à sa translocation dans le noyau. Il est important de noter que ces voies de signalisation peuvent par ailleurs elles-mêmes réguler l'expression d'ET<sub>A</sub> et d'ET<sub>B</sub> <sup>86</sup>.

L'activation des voies de signalisation tel que la PLC, l'adénylate cyclase, la PI3K et la MAPK entraînent la prolifération, la survie, et la mobilité cellulaire (**Figure 10**). De nombreux travaux décrivent leur implication dans de nombreux processus pathologiques entre autres dans des voies de tumorigénèse <sup>87</sup>. L'endothéline agit comme véritable facteur mitogène en activant ces différentes voies de signalisation <sup>14</sup>.



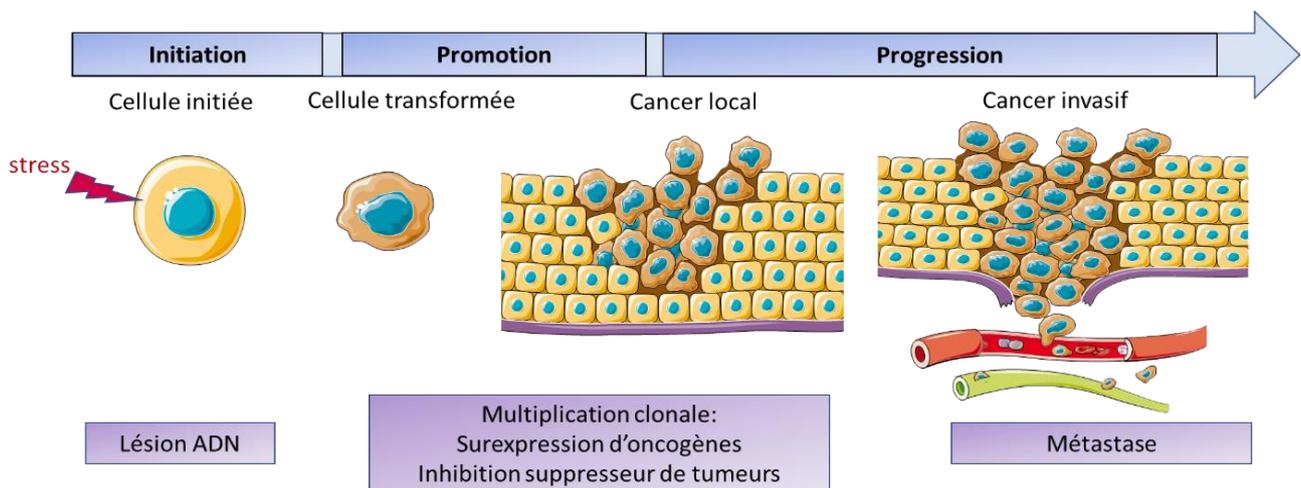
**Figure 10 : Signalisation physiologique de l'axe endothéline** (inspiré de Rosanò *et al.*, 2016). Les récepteurs de l'endothéline (ETR) activent la voie de signalisation de la phosphoinositide3 kinase (PI3K), permettant l'activation de la kinase AKT. Ce proto-oncogène, AKT, phosphoryle mTOR qui active de nombreux gènes notamment impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Les ETR activent également la phospholipase C  $\beta$  (PLC $\beta$ ) qui augmente la concentration calcique cytoplasmique et active la Protéine Kinase C (PKC) impliquée dans l'apoptose et la différenciation cellulaire. Les ETR activent aussi l'adénylate cyclase qui fabrique de l'AMPc à partir d'ATP. Ce second messager active la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle CREB, un facteur de transcription induisant la prolifération cellulaire. Enfin, les ETR peuvent être couplés à la  $\beta$ -arrêstine qui engendre la transactivation des récepteurs aux tyrosines kinase (RTK) *via* SRC (sarcoma kinase). Les RTK sont connus comme activant la voie de signalisation des MAPK (Mitogen-activated protein kinases) : RAS recrute RAF à la membrane plasmique permettant sa phosphorylation, puis RAF phosphoryle MEK qui phosphoryle ERK induisant la prolifération et la survie cellulaire.

## II. Endothéline et tumeurs

### 1) Généralités des cancers

#### a. Définition

Un cancer est une maladie causée par une accumulation de mutations entraînant une prolifération cellulaire non contrôlée et anarchique. Théoriquement, il existe autant de types de cancer que de cellules existantes dans notre organisme. Au cours de notre vie, des milliers de cellules cancéreuses apparaissent et sont éliminées par le système immunitaire. Il arrive cependant que certaines de ces cellules échappent à la réponse immunitaire, initiant la formation de tumeurs (**Figure 11**). En se développant, celles-ci vont envahir les tissus qui l'entourent et au-delà de leur délimitation habituelle, elles peuvent également essaimer à distance de l'organe colonisé pour former une tumeur secondaire, ou métastase.



**Figure 11 : Schéma général des étapes d'un cancer.** La phase d'initiation est un processus irréversible lors duquel une lésion est faite à l'ADN, *via*, par exemple, un génotoxique, et sera transmise aux cellules filles. La phase de promotion correspond à la multiplication des cellules initiées jusqu'à l'apparition d'une cellule cancéreuse. Les promoteurs (agents carcinogènes) stimulent la prolifération cellulaire. L'accroissement du taux de division cellulaire augmente les risques de mutations. La phase de progression est caractérisée par une multiplication des cellules cancéreuses et aboutit à la formation d'une tumeur bénigne qui peut devenir maligne et métastaser.

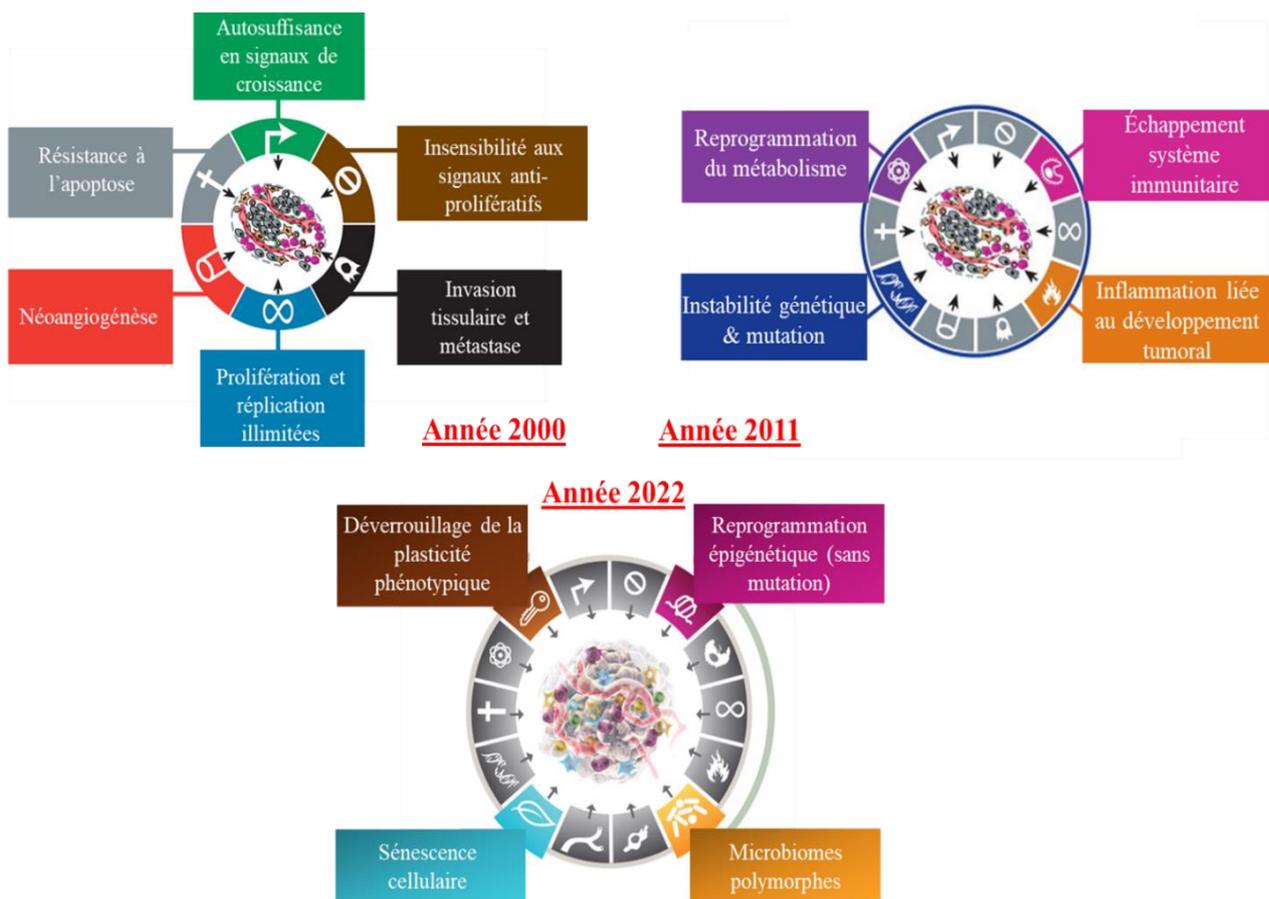
En proliférant, les cellules cancéreuses modifient leur environnement afin de créer un microenvironnement tumoral propice à leur progression et à leur développement. Il est constitué d'une matrice extracellulaire qui comprend des fibroblastes, des néovaisseaux présentant une architecture particulière mais également de cellules du système immunitaire (lymphocytes,

## Introduction générale

macrophages, cellules *Natural Killer* (NK) ...). Il a été identifié que cet environnement évolue conjointement à la tumeur et impacte fortement l'évolution de la maladie. Avec près de dix millions de décès par an dans le monde, le cancer représente un enjeu de santé publique (<https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer>). En France, cette pathologie multifactorielle représente la première cause de décès chez l'homme et la seconde chez la femme après les maladies de l'appareil circulatoire (<https://www.santepubliquefrance.fr/>).

### b. « *Hallmarks of cancer* »

Deux auteurs pionniers de la recherche sur le cancer, Hanahan et Weinberg, ont publié dans les années 2000 un article qui met en évidence l'extraordinaire complexité des tumeurs et qui décrit les caractéristiques fondamentales partagées par la plupart, sinon la totalité de ces tumeurs<sup>88</sup>. Ces caractéristiques, plus communément appelées « *Hallmarks of cancer* », ont été mises à jour et sont passées de 6 en 2000 à 14 en 2022 (Figure 12)<sup>89,90</sup>.



**Figure 12 : Évolution des « *Hallmarks of cancer* » (inspiré de Hanahan *et al* 2000, 2011, 2022).** Caractéristiques communes aux différentes tumeurs établies par Hanahan durant les vingt-deux dernières années.

## Introduction générale

Dans les années 2000, il a été établi qu'au cours d'un processus de tumorigenèse, il existe une prolifération incontrôlée qui peut être due à **une immortalité répllicative** de la cellule mutée. En effet, dans un processus physiologique, la cellule finit par mourir lorsque ses télomères se raccourcissent à cause d'un trop grand nombre de réplifications. Dans la cellule tumorale, l'activité accrue des télomérases, une enzyme qui permet le maintien de la longueur des télomères, lui confère des propriétés de réplification presque infinies. Ces enzymes compensent en permanence le raccourcissement inévitable des télomères, permettant d'éviter leur disparition et limitant, de fait, le déclenchement des phénomènes de sénescence ou d'apoptose qui en découleraient. De plus, la **cellule tumorale peut résister à l'apoptose**. Cette mort cellulaire programmée constitue un mécanisme de défense pour l'organisme. Elle permet d'éradiquer les cellules ayant subi des anomalies au cours de leur vie, comme des mutations au niveau de l'ADN. Afin de contourner ce phénomène, les cellules tumorales ont acquis une résistance aux signaux pro-apoptotiques notamment *via* des mutations. L'une des mutations la plus décrite dans la littérature permettant l'acquisition d'un phénotype résistant à l'apoptose est la mutation du gène de la protéine p53 considérée comme le gardien du génome. En effet, en conditions physiologiques, p53 permet l'induction de l'apoptose en cas de détection d'anomalies. Parfois une cellule saine a besoin de se diviser pour le maintien de l'homéostasie tissulaire. Pour cela, elle doit recevoir des signaux extracellulaires, aussi appelés facteurs de croissance, sécrétés par le microenvironnement. Ces signaux stimulent la division cellulaire. La cellule tumorale est capable de détourner ce système pour produire ses propres facteurs de croissance de façon autocrine. Cela lui confère **une autosuffisance en signaux de croissance** et permet la rapide prolifération des cellules tumorales. À l'inverse, l'environnement peut aussi envoyer des signaux antiprolifératifs engendrant une diminution de la prolifération cellulaire. La **cellule tumorale échappe à ces signaux antiprolifératifs** pour continuer son développement. Dès lors, elle peut muter certains de ces récepteurs qui ont pour rôle de transmettre les messages inhibant la prolifération cellulaire. Une tumeur peut également **créer ses propres vaisseaux sanguins** en détournant la vascularisation physiologique, ce qui lui permet un meilleur apport en oxygène et en nutriments, nécessaires à sa croissance et sa survie. Enfin, l'une des caractéristiques les plus létales qu'acquière une cellule tumorale est sa capacité à migrer vers d'autres organes et à les coloniser. Généralement, les cellules passent par la vascularisation lymphatique ou sanguine pour essaimer dans le corps. Ce processus est appelé **invasion ou métastase**.

Depuis 2011 quatre nouvelles caractéristiques des tumeurs ont été décrites par Hanahan, l'une d'entre elles étant la capacité des cellules tumorales à **reprogrammer leur métabolisme**. Par exemple, les cellules tumorales exploitent le glucose pour générer de l'ATP, source d'énergie cellulaire, même en conditions aérobies. Les cellules tumorales présentent également une forte **instabilité génomique** comparée aux cellules saines. Cela s'explique notamment par l'occurrence importante de mutations conduisant à une perte de fonction de certaines protéines clés, nécessaires au bon fonctionnement de la réplication et/ou de la réparation de l'ADN. De plus, l'instabilité génomique est la cause de l'existence d'une hétérogénéité de la réponse tumorale vis-à-vis de certains traitements, certaines cellules tumorales ayant acquis un phénotype résistant suite à la mutation de leur génome. Afin de continuer leur développement, les **cellules tumorales échappent au système immunitaire**. En conditions physiologiques, ce système d'alerte permet la détection et la destruction des cellules anormales avant que celles-ci ne deviennent tumorales. Toutefois, les cellules tumorales présentent des capacités d'évasion vis-à-vis du système immunitaire, limitant ainsi la réaction immunitaire délétère à la progression tumorale. Paradoxalement, une **réponse inflammatoire du microenvironnement tumoral** permet la croissance et la survie tumorale. En effet, des facteurs de croissance et de survie, appelés « facteurs pro-tumoraux » sont sécrétés par le microenvironnement tumoral et les cellules immunitaires et favorisent la progression néoplasique. Ainsi, les cellules immunitaires associées aux tumeurs, comme les *Tumor-Associated Macrophages* (TAM) occupent une place importante dans le processus de tumorigenèse.

Récemment, quatre nouvelles particularités typiques des cellules tumorales ont été mises en évidence. Dans un tissu sain, une cellule différenciée est issue d'un progéniteur lui-même issu de cellules moins différenciées pluripotentes. C'est ce qu'on appelle un modèle stochastique. Dans la théorie de l'évolution clonale, il est normalement impossible de revenir en arrière dans sa lignée. Pourtant, les cellules tumorales ont acquis la capacité de **déverrouillage de leur plasticité phénotypique** leur permettant de se différencier donc de redevenir progénitrices. Elles sont également capables de bloquer le processus de différenciation cellulaire et de rester au stade de cellules progénitrices, ou encore de se transdifférencier en une lignée cellulaire alors différente de la lignée initiale. La plasticité phénotypique observée dans les cellules tumorales serait en partie expliquée par la **reprogrammation épigénétique**. En effet, l'accumulation d'altérations épigénétiques entraîne l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. Ce phénomène joue un rôle prépondérant dans la progression tumorale. Par ailleurs, parmi les cellules présentes au

niveau du microenvironnement tumoral, les **cellules sénescents** ont été identifiées comme capables d'influer aussi sur le développement tumoral. Physiologiquement, une cellule sénescence est une cellule dont le cycle cellulaire s'arrête de façon irréversible. La sénescence cellulaire est souvent associée au vieillissement cellulaire mais peut également apparaître suite à un stress engendré par l'hyperactivité d'un oncogène ou par la perte d'activité d'un gène suppresseur de tumeur. Ainsi, le phénomène de sénescence contribue à la protection de l'organisme vis-à-vis du développement de cellules tumorales. Cependant, au niveau du microenvironnement tumoral, les cellules sénescents possèdent une activité pro-oncogènes *via* la sécrétion de facteurs de croissance qui permettent (i) le développement et la progression tumorale, (ii) l'induction de néovaisseaux (iii) l'invasion et les métastases. Enfin, les bactéries issues **du microbiome et proches du microenvironnement tumoral** peuvent aussi favoriser et stimuler les processus pro-tumoraux précédemment décrits. Dans la suite de ce manuscrit, l'influence de l'axe endothéline sur les propriétés tumorales sera décrite plus en profondeur afin de montrer sa pertinence en tant que cible pour de nouvelles thérapies.

### 2) *Axe endothéline et oncologie*

#### a. *Axe endothéline et tumeurs associées*

L'endothéline 1 agit comme un véritable facteur de croissance dans le développement tumoral, ce qui se traduit par des modifications de l'expression d'ET<sub>A</sub>, d'ET<sub>B</sub> et d'ET-1 dans différentes tumeurs comme le cancer du côlon, du sein, de l'ovaire, de la prostate, du rein, de la vessie, du poumon, de la sphère ORL, des gliomes ou encore du mélanome. La dérégulation du système endothéline est tumeur-dépendante (**Tableau 2**)<sup>14,73</sup>.

Plus généralement, la stimulation du récepteur des endothélines de type A par l'endothéline 1 induirait la prolifération des tumeurs épithéliales (**Tableau 2**). C'est par exemple des cellules tumorales issues de cancer de l'ovaire, cervical, de la prostate ou encore du côlon. A l'inverse, l'activité du récepteur des endothélines B est parfois diminuée dans ces tumeurs surexprimant le récepteur ET<sub>A</sub><sup>91-94</sup>. Si l'expression d'ET<sub>B</sub> n'est pas inhibée, alors son niveau d'expression reste à l'état basal. ET<sub>B</sub> est exprimé dans d'autres types tumoraux tels que dans le cancer de la peau et notamment dans le mélanome, le sarcome de Kaposi, le cancer du sein, de la vulve et certains gliomes (**Tableau 2**). Dans ces différentes tumeurs ET<sub>B</sub> joue un rôle dans la progression et la prolifération tumorale.<sup>55,95-97</sup> Lorsqu'un antagoniste de ce récepteur est

## Introduction générale

utilisé, il y a alors une inhibition de la prolifération cellulaire. Dès lors, ces antagonistes semblent constituer des candidats de choix pour la thérapie de ces tumeurs.

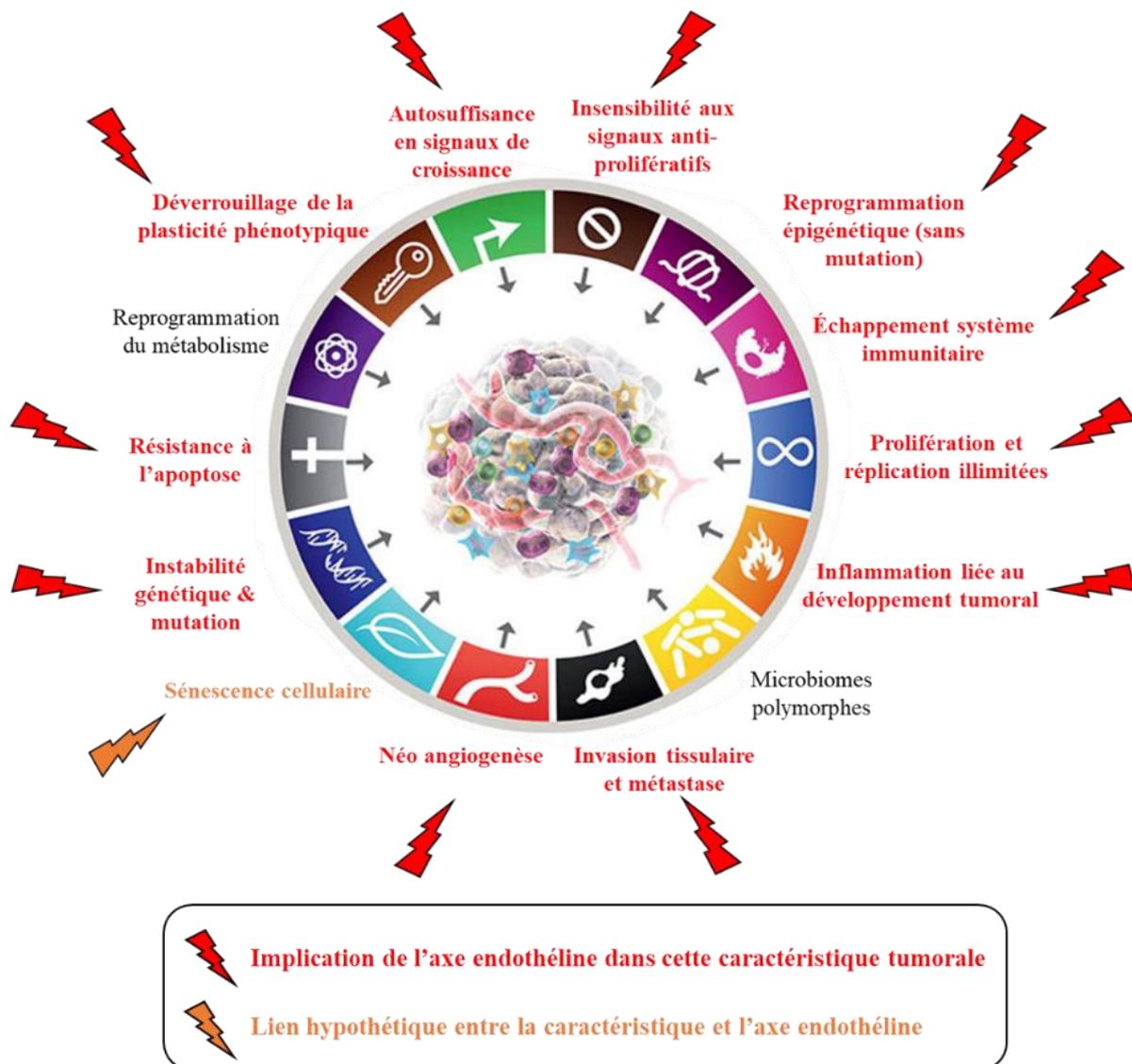
**Tableau 2: Expression de l'axe endothéline dans différentes tumeurs**

Tumeur	Expression ETR	Phénotypes associés avec l'expression des récepteurs aux endothélines
Cancer de la vessie	ETA et ETB	Associé à une diminution de la survie du patient
Glioblastome	ETA et ETB	Non reporté
Cancer du sein	ETA	Associé à une diminution de la survie du patient et provoque des métastases osseuses
Cancer cervical	ETA	Non reporté
Cancer colorectal	ETA	Associé à une diminution de la survie du patient et provoque l'augmentation du grade de la tumeur
Carcinome hépatocellulaire	Perte d'ETB	Non reporté
Cancer gastrique	ETA et perte d'ETB	Non reporté
Cancer ORL (head & neck)	ETA	Associé à une diminution de la survie du patient
Cancer du poumon	ETA et ETB	Associé à une diminution de la survie du patient
Mélanome	ETB	Phénotype plus agressif avec apparition de métastases aux ganglions lymphatiques associé à cette expression
Cancer de l'ovaire	ETA	Augmente le grade tumoral, la chimiorésistance et les métastases
Cancer de la prostate	ETA	Augmente le grade tumoral et les métastases osseuses
Cancer du rein	ETA et ETB	ETA influence le grade tumoral et ETB est associé au pronostic du patient
Cancer de la vulve	ETB	Associé à une diminution de la survie du patient

## Introduction générale

### *b. Implication de l'axe endothéline dans les « hallmarks of cancer »*

Le rôle de l'axe endothéline dans le développement tumoral est largement décrit dans la littérature scientifique <sup>14,73</sup> et répond à de nombreux processus pro-tumoraux décrits par Hanahan (**Figure 13**).



**Figure 13 : Implication de l'axe endothéline dans les différents processus résultant en l'acquisition d'un phénotype tumoral.**

### **Implication de l'axe endothéline dans l'autosuffisance de la tumeur en signaux de croissance**

L'endothéline peut être sécrétée de façon autocrine par des cellules de carcinome ovarien et participer, dès lors, à leur prolifération <sup>98</sup>. Toujours dans le cancer ovarien, les ETs sont également capables d'agir, de façon paracrine, comme facteur mitogène sur des fibroblastes en co-culture <sup>99</sup>. Enfin, la production l'ET-1 peut être induite par de nombreux *stimuli* exogènes, souvent associés au microenvironnement tumoral comme l'interleukine-1 $\beta$ , le *Transforming Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), le *Platelet Derived Growth Factor- $\alpha$*  (PDGF- $\alpha$ ) ou encore l'hypoxie <sup>100</sup>. Cette boucle autorégulatrice permet l'autosuffisance de la tumeur en signaux de croissance. Par ailleurs, plusieurs études ont montré une forte corrélation entre l'augmentation de l'expression de la boucle autocrine ET<sub>A</sub>/ET-1 et un mauvais pronostic et une diminution de la survie du patient. <sup>91,93,101</sup>.

### **Implication de l'axe endothéline dans la prolifération des cellules cancéreuses**

La sécrétion des ETs dans le microenvironnement tumoral va augmenter l'expression des ETR induisant une suractivation de leurs voies de signalisation. Ceci joue de nombreux rôles dans la progression tumorale. Par exemple, dans le carcinome ovarien, la sécrétion d'ET-1 stimule les voies de signalisation de la PLC, de la PKC et du calcium, provoquant une augmentation de la prolifération cellulaire <sup>102,103</sup>. L'endothéline joue donc un rôle mitogène pour la tumeur et favorise la prolifération illimitée des cellules cancéreuses. Nous avons déjà vu que la stimulation de l'axe endothéline pouvait transactiver la signalisation des récepteurs aux tyrosines kinases tels que l'EGFR (*cf* I.3.b. Voie de signalisation classique des RCPG). Il a par ailleurs été démontré que la stimulation de l'expression d'ET-1 peut induire la sécrétion d'EGF par cette signalisation croisée ETR-EGFR <sup>104</sup>. Ainsi, la coopération de ces voies de signalisation mène à une augmentation de la transcription de nombreux proto-oncogènes, gènes participant activement à la croissance et à la division cellulaire. Il a également été mis en évidence que l'activité de l'endopeptidase NEP (*Neutral EndoPeptidase*) dégradant ET-1 était significativement inhibée au niveau de tumeurs de prostate métastatiques. L'inhibition de la dégradation d'ET-1 conduit à une augmentation de son expression et ainsi à une stimulation de la prolifération tumorale <sup>105</sup>. De plus, il a été mis en évidence que des antagonistes spécifiques d'ET<sub>A</sub> inhibaient la prolifération de lignées cancéreuses ovariennes et colorectales, mettant alors en lumière le rôle de ce récepteur dans la prolifération cellulaire <sup>103,106</sup>. De même l'antagoniste d'ET<sub>B</sub>, l'A-192621, a montré un effet antitumoral sur des cellules de mélanome médié par les endothélines ET-1 et ET-3 <sup>107,108</sup>.

## **Implication de l'axe endothéline dans la résistance à l'apoptose et aux signaux anti-prolifératifs des cellules cancéreuses**

L'axe endothéline permet la résistance des cellules tumorales vis-à-vis de l'apoptose, mort cellulaire programmée <sup>109</sup>. L'axe ET-1/ET<sub>A</sub> est un marqueur de la progression tumorale et peut être utilisé comme indicateur de la survie à long terme des patients <sup>93</sup>. Le caractère létal de nombreux cancers est en partie dû à leur résistance vis-à-vis des thérapies utilisées. Par exemple, il a été mis en évidence que l'axe ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub>/β-arrestine interagissait avec la voie alternative Wnt et conférait aux cellules cancéreuses de l'ovaire une résistance à la chimiothérapie <sup>110</sup>. Toujours dans le cancer ovarien ou encore dans le cancer de la prostate, l'endothéline, *via* son récepteur ET<sub>A</sub>, active des kinases qui, à leur tour, stimulent la voie Akt <sup>111</sup>. Akt permet l'activation de facteurs de transcription tels que NFκB qui active l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-x<sub>L</sub> et inhibe l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Bad, Bax, Bak <sup>112</sup>. Ces résultats sont également confortés par l'utilisation d'atrasentan, antagoniste spécifique d'ET<sub>A</sub>, qui conduit à une inhibition de la transcription médiée par NFκB dans différents modèles tumoraux <sup>113</sup>. Des travaux sur le carcinome ovarien ont, de nouveau, mis en évidence l'implication de l'axe ET-1/ET<sub>A</sub> dans la promotion de l'échappement des cellules tumorales au paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>). En effet, en présence d'ET-1, les cellules tumorales de cancer de l'ovaire se sont avérées insensibles à l'apoptose, et ce, malgré un traitement concomitant au paclitaxel. Un traitement au BQ-123, antagoniste spécifique d'ET<sub>A</sub>, permet une restauration de la réponse apoptotique initiale attendue <sup>111</sup>. Le paclitaxel induit l'apoptose en phosphorylant la protéine Bcl-2, protéine anti-apoptotique, elle-même régulée par ET-1. Ce résultat a été également observé avec d'autres antagonistes d'ET<sub>A</sub> sur différents modèles tumoraux comme le cancer de la prostate <sup>114</sup>. L'évasion des tumeurs aux chimiothérapies peut également être médiée par l'axe endothéline et la voie Hippo avec la protéine YAP, comme exemplifié dans le cancer de l'ovaire <sup>115</sup>. La protéine STAT3 et l'axe ET-1/ET<sub>A</sub>/β-arrestine ont récemment été identifiés comme impliqués dans l'échappement à l'apoptose des cellules tumorales dans le cancer colorectal <sup>101</sup>. Une autre étude a démontré que l'inhibition de la voie ET-1/β-caténine par un antagoniste mixte, le macitentan, a permis de rétablir la sensibilité des cellules tumorales du cancer colorectal vis-à-vis de la chimiothérapie (oxaliplatine et 5-fluorouracile) <sup>116</sup>. Ainsi, ET<sub>A</sub> semble jouer un rôle prépondérant dans l'échappement des cellules tumorales aux signaux anti-prolifératifs.

Le rôle d'ET<sub>B</sub> dans l'échappement des cellules tumorales à l'apoptose a été moins étudié que celui d'ET<sub>A</sub>. Cependant, plusieurs études montrent un effet pro-apoptotique lors de

l'utilisation d'antagonistes de ce récepteur. Par exemple, le recours à BQ788, un antagoniste d'ET<sub>B</sub>, induit une augmentation de la mort cellulaire dans des cellules souches de glioblastome (CSG) <sup>117</sup>. En effet, la survie et la croissance de ces cellules tumorales sont médiées par l'axe ET-3/ET<sub>B</sub>. Le même effet de BQ788 a été décrit pour des cellules de mélanome. L'utilisation d'ARN interférents ciblant le récepteur ET<sub>B</sub> a également entraîné une élévation du taux de mort cellulaire <sup>118</sup>. Ces résultats suggèrent une implication conséquente d'ET<sub>B</sub> dans le phénomène d'évasion des cellules tumorales vis-à-vis de l'apoptose.

### **Implication de l'axe endothéline dans le déverrouillage de la plasticité phénotypique des cellules cancéreuses :**

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) correspond au processus au cours duquel la cellule épithéliale acquiert un phénotype et des propriétés mésenchymateuses. Il est à noter qu'une cellule mésenchymateuse est dotée d'un pouvoir d'évasion et d'une mobilité cellulaire accrue. Ainsi, ces cellules sont impliquées dans la progression tumorale en essaimant à distance mais sont aussi capables d'acquérir une plasticité phénotypique. L'axe endothéline joue un rôle dans la TEM et permet donc le déverrouillage de la plasticité phénotypique. Il a été démontré que l'axe ET-1/ET<sub>A</sub> induisait la TEM dans le cancer ovarien *via* une augmentation de l'expression du facteur de transcription Snail et la diminution de l'expression de la protéine E-cadhérine, élément clé des jonctions adhérentes entre les cellules. <sup>119</sup>. Dans le mélanome et le cancer ovarien, ces jonctions cellulaires peuvent également être perturbées suite à la phosphorylation des connexines induites par la protéine tyrosine kinase Src, elle-même stimulée par la suractivation des voies de signalisation des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> <sup>107,120</sup>. Une autre étude majeure démontre le rôle d'ET-1 dans l'augmentation de l'expression du *Facteur 1-alpha inductible par l'hypoxie* (HIF1- $\alpha$ ), protéine impliquée dans le phénomène hypoxique qui contribue, lui-même, à stimuler la transition épithélio-mésenchymateuse <sup>108</sup>. D'un autre côté, l'axe ET-1/ $\beta$ -caténine promeut la TEM par induction de métalloprotéases (MMP) qui sont des enzymes dégradant la lame basale bordant l'épithélium ce qui permet la formation d'une matrice propice à la migration cellulaire <sup>121</sup>.

L'axe endothéline a aussi été identifié comme jouant un rôle prédominant dans le déverrouillage phénotypique des cellules cancéreuses et son lien étroit avec les cellules souches cancéreuses (CSC) a été largement étudié dans la littérature. Les CSC possèdent des propriétés d'auto-renouveau qui contrôlent la tumorigénicité. Une cellule souche (CS) conserve son caractère souche/pluripotent grâce à son microenvironnement et à des facteurs de transcription qui empêchent sa différenciation. Ces CSC sont la cause de nombreuses rechutes dans les prises

## Introduction générale

en charge des cancers puisqu'elles résistent aux différentes chimiothérapies grâce à (i) la présence au niveau membranaire de transporteurs aussi appelés pompes d'efflux, (ii) leur potentiel d'adaptation face à un microenvironnement hostile, (iii) leur capacité dormante permettant d'échapper à la plupart des traitements anticancéreux (iv) leur aptitude à initier une tumeur *de novo*, même après éradication de l'entière de la tumeur primaire. Ces cellules souches sont de plus capables de créer des métastases<sup>122,123</sup>. La relation entre cellules souches et l'axe endothéline a été établie après observation d'un niveau d'expression élevé d'ET-1 dans l'environnement proche de CSC de côlon<sup>124</sup>. Des travaux récents ont montré qu'ET-1 agit principalement sur l'Hème Oxygenase 1 (HO-1), facteur permettant l'induction des CSC du côlon<sup>125</sup>.

Il est à noter que le phénomène de TEM et l'existence de CSC n'est pas spécifique du cancer du côlon et ont aussi été observés dans d'autres types de cancer tels que le cancer de l'ovaire par exemple<sup>126</sup>. La corrélation entre l'expression du récepteur ET<sub>A</sub> à la surface des CSC et l'occurrence de mécanismes de chimiorésistance a été bien démontré dans le cancer de l'ovaire. En effet, l'inhibition d'ET<sub>A</sub> a permis de restaurer la sensibilité de la tumeur à la chimiothérapie. De plus, l'inhibition de l'activité d'ET<sub>A</sub> semblerait permettre le rétablissement d'un phénotype épithélial plutôt que mésenchymateux et enfin, de diminuer le phénomène d'invasion tissulaire métastatique<sup>127</sup>.

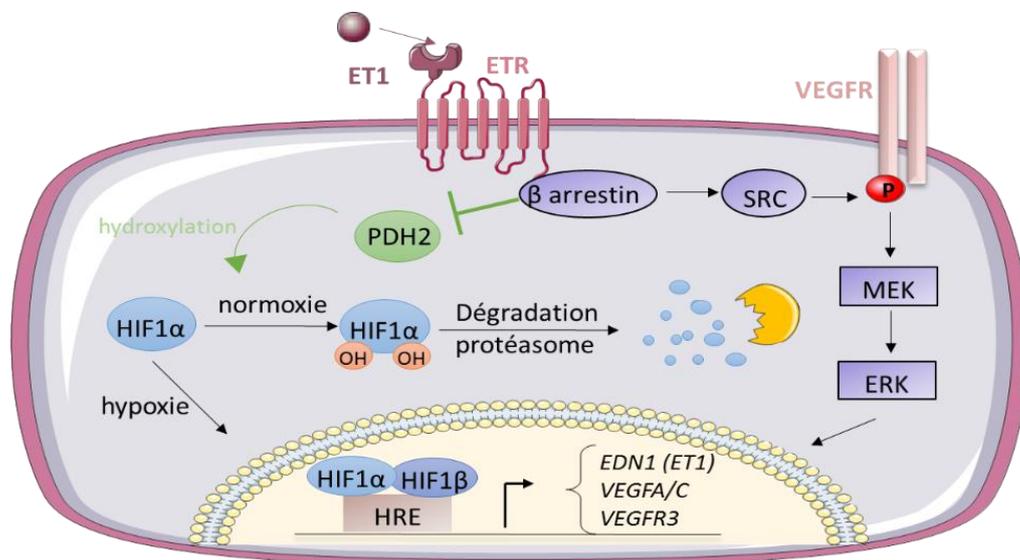
L'interaction de l'ET-1 et de la signalisation YAP a été décrite comme régulant la plasticité cellulaire ainsi que l'occurrence de métastases dans le cancer de l'ovaire<sup>128</sup>.

Enfin, une surexpression de la voie de signalisation ET-3/ET<sub>B</sub> a été observée dans le cas du glioblastome. Cet axe ET-3/ET<sub>B</sub> permettrait le maintien du caractère souche des CS de glioblastome (CSG)<sup>117</sup>. Dans la suite de ce manuscrit, cet aspect sera abordé plus en détails.

### **Implication de l'axe endothéline dans la néo-angiogenèse tumorale :**

L'axe endothéline est impliqué dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins tumoraux aussi appelée néo-angiogenèse. Tout d'abord, il a été montré dans le cas de différents cancers que l'ET-1, elle-même surexprimée, stimule la production de *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), une protéine contrôlant la formation de nouveaux vaisseaux<sup>129</sup>. Dans le cancer ovarien, le blocage des récepteurs d'ET-1 a permis une inhibition significative de la réponse angiogénique<sup>129</sup>. Une autre étude a mis en avant que l'utilisation du BQ788, antagoniste d'ET<sub>B</sub>, favoriserait la formation des vaisseaux lymphatiques *via* le facteur HIF-1 $\alpha$ <sup>130</sup>. Ce phénomène a ainsi été mis en évidence dans plusieurs types de cancer comme le cancer

ovarien, le cancer du sein, le cancer du poumon et le cancer cervical <sup>131</sup>. En effet, l'angiogénèse a été depuis longtemps identifiée comme régulée par différents facteurs environnementaux tels que l'hypoxie, pouvant être induite par l'axe endothéline (**Figure 14**) <sup>132</sup>. Ce processus, amplifié dans un système tumoral promeut l'angiogénèse <sup>14</sup>.



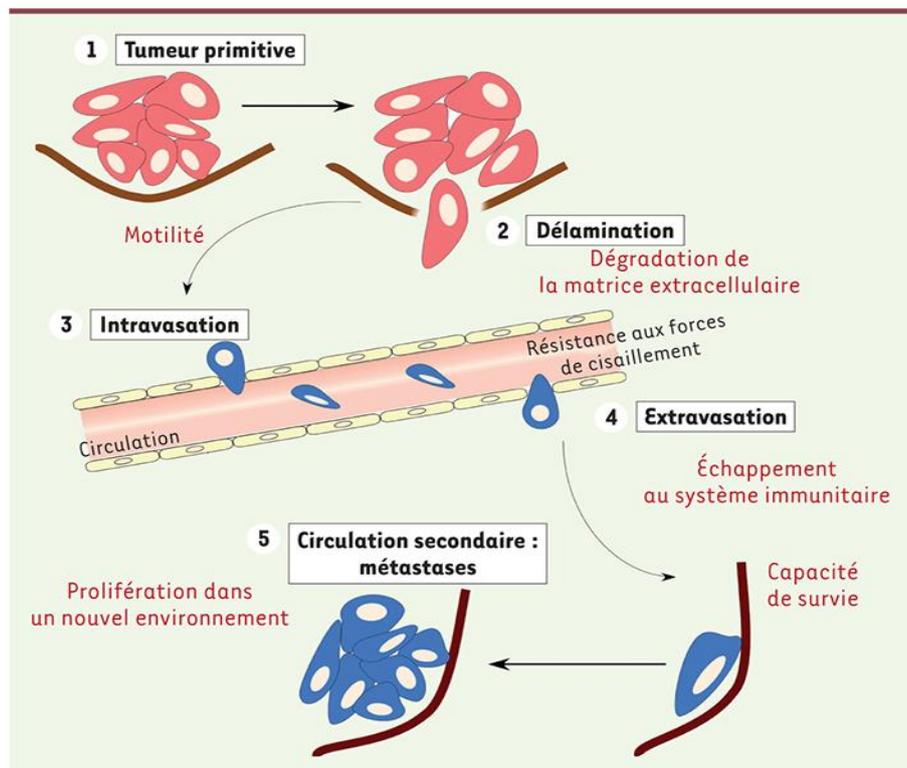
**Figure 14 : Dialogue entre la signalisation de l'endothéline et celle de l'hypoxie, inspirée de Rosanò et al., 2013.** Les ETR couplés à la  $\beta$ -arrestine permettent la régulation de HIF-1 $\alpha$  en inhibant son régulateur répresser : la protéine PHD2 (prolyl hydroxylase 2). En conditions de normoxie, PHD2 greffe deux fonctions hydroxyles sur HIF-1 $\alpha$  induisant sa dégradation par le protéasome. En présence d'endothéline, PHD2 est inhibée et HIF-1 $\alpha$  s'accumule puis se dimérise avec HIF1 $\beta$  permettant la translocation nucléaire et la transcription de gènes tels que *VEGFA*, *VEGFR* ou encore *EDN1* (ET-1). Ces gènes peuvent également être transcrits suite à la transactivation du VEGFR par SRC qui active les effecteurs MEK et ERK.

Cet exemple souligne bien l'importance de l'axe endothéline et son impact dans le microenvironnement tumoral.

### Implication de l'axe endothéline dans l'invasion tissulaire et métastases

Le processus de métastase peut être décomposé en plusieurs étapes (**Figure 15**) : la délamination, l'intravasation, la propagation dans l'organisme grâce aux vaisseaux sanguins et lymphatiques, l'extravasation et la colonisation d'un nouvel organe générant des tumeurs secondaires. Dans le processus de métastase, les cellules tumorales doivent acquérir un phénotype particulier et évoluer au sein d'un microenvironnement propice <sup>133</sup>. Le rôle de l'axe endothéline dans la modulation de l'intégrité de la membrane basale *via* l'inhibition de l'expression des cadhérines, et la stimulation de la production de métalloprotéases (MMP) a

déjà été évoqué en amont. Globalement, l'axe endothéline possède une fonction essentielle dans l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux *via* la stimulation de la TEM, ce qui permet aux cellules tumorales de migrer à distance de la tumeur primaire. Cette étape primordiale pour la progression tumorale a été mise en évidence dans diverses tumeurs dont le cancer du sein triple négatif, le carcinome ovarien ou encore le mélanome <sup>14,107,134,135</sup>. L'axe endothéline a aussi été identifié comme interagissant avec diverses kinases et intégrines, celles-ci contribuant, elles aussi, à l'induction d'une signalisation favorable à la mobilité cellulaire <sup>134</sup>.

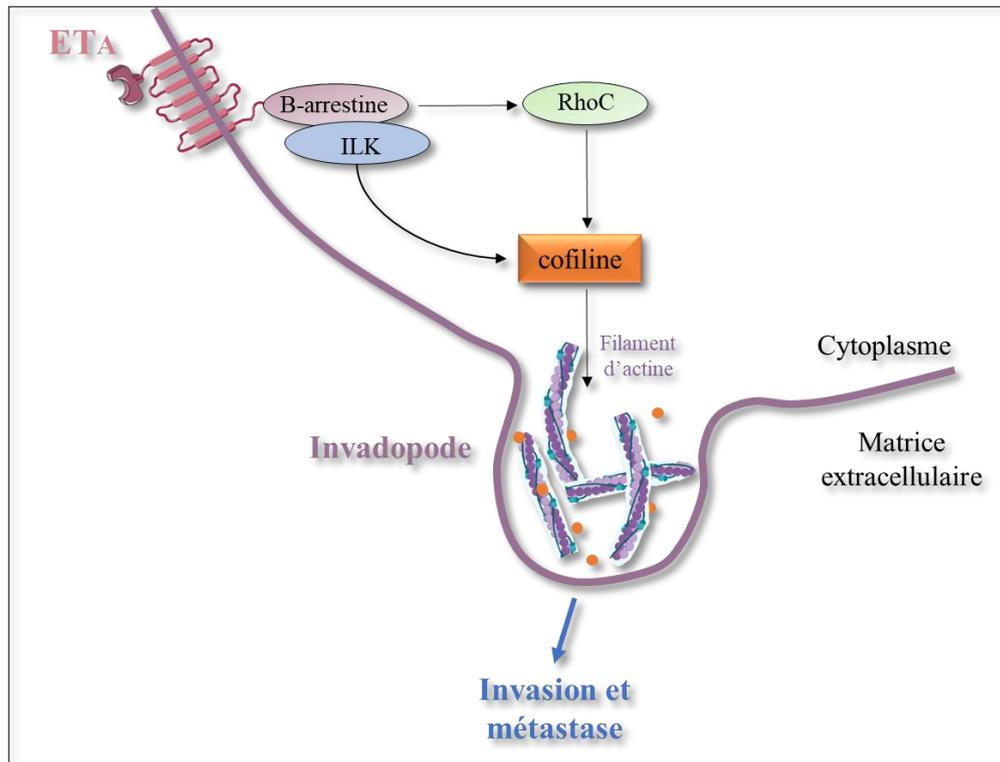


**Figure 15 : Métastases, une histoire en plusieurs étapes** (Hubert *et al.*, 2014). L'étape de délamination correspond au détachement de la cellule tumorale de sa masse primitive. Cette cellule tumorale poursuit son chemin dans la circulation sanguine, il s'agit de l'étape d'intravasation. Par la suite, afin d'essaimer dans différents organes, la cellule tumorale sort des vaisseaux par extravasation permettant ainsi l'initiation d'une nouvelle tumeur aussi appelée métastase.

Il est connu que les métalloprotéases et certains facteurs de croissance sont sécrétés par les invadopodes, excroissances de la membrane cellulaire. Ces structures dont la fonction reste encore mal définie sont étroitement associées au processus d'invasion des cellules tumorales. L'équipe de Rosanò et Bagnato a publié depuis 2016 cinq articles présentant le lien entre endothéline et invadopode. Ils ont ainsi mis en évidence que la voie  $ET_A/\beta$ -arrestine 1 contrôle

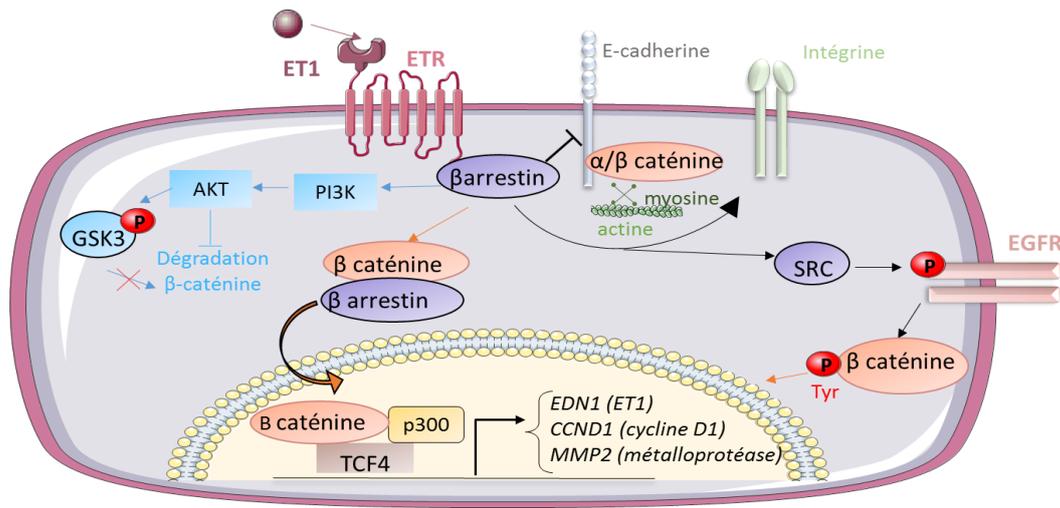
## Introduction générale

l'induction de la voie RhoC, GTPase qui régule la mobilité cellulaire et la formation de métastases par l'intermédiaire de la voie de la cofiline, un régulateur de l'actine (**Figure 16**)<sup>136,137</sup>. En effet, il semblerait que la  $\beta$ -arrestine 1 interagisse avec l'*Integrin-Like Kinase* (ILK) pour conduire à l'activation de la voie de la cofiline<sup>138</sup>. Par ailleurs l'expression importante de la voie  $ET_A/\beta$ -arrestine 1 est associée à un mauvais pronostic dans le cancer ovarien séreux de haut grade<sup>139</sup>.



**Figure 16 : Axe endothéline et invadopode** inspiré de Bagnato *et al.*, 2018. L'activation de  $ET_A/\beta$ -arr va induire la voie RhoC qui, à son tour, enclenche la signalisation de la cofiline. Cette dernière appartient à la famille des régulateurs d'actine impliqué dans la formation des invadopodes.

Afin de confirmer l'implication de l'axe endothéline dans le processus de métastase, le recours à de petites molécules antagonistes ciblant les ETR a été évalué. Dans le cancer métastatique ovarien, leur utilisation a permis l'inhibition complète de la formation de métastases<sup>127,140,141</sup>. Au niveau moléculaire, cela se traduit par une interaction entre la signalisation de l'axe endothéline et la voie de la  $\beta$ -caténine ( $\beta$ -cat) (**Figure 17**). En effet, le complexe  $\beta$ -arrestine/ $\beta$ -caténine permet le recrutement d'une acétyltransférase nommée p300, et permettent ensemble la transcription de gènes nécessaires à la migration cellulaire, à l'invasion tissulaire et à la TEM<sup>14,121</sup>.



**Figure 17 : Dialogue entre la signalisation de l'endothéline et celle de la β-caténine** (inspiré de Rosanò *et al.*, 2013). Le récepteur ETR couplé à la β arrestine active PI3K-Akt qui phosphoryle GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3β*), un des composants du complexe de dégradation de la β-caténine. La phosphorylation de GSK3 induit son inactivation, celle-ci ne pouvant donc plus dégrader la β-caténine. La β-arrestine inhibe la formation de jonctions adhérentes et libère la β-caténine qui se dimérise avec la β arrestine ce qui permet leur translocation nucléaire. La β-arrestine peut également transactiver l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) qui phosphoryle la β-caténine, induisant sa translocation au niveau nucléaire. La β-caténine nucléaire permet la transcription de EDN1, CCND1 et MMP2.

Les localisations métastatiques varient en fonction du type tumoral. Dans le cas du mélanome, les cellules exprimant le récepteur des endothélines B sembleraient métastaser et coloniser préférentiellement le système nerveux central <sup>142</sup> tandis que les cellules cancéreuses de vessie semblent avoir un tropisme pour métastaser au niveau pulmonaire <sup>143</sup>. De façon plus générale, il a été montré dans la littérature que les tumeurs solides telles que les tumeurs du sein, ou encore de la prostate métastasiaient fréquemment au niveau de l'os et que l'utilisation d'antagonistes spécifiques d'ET<sub>A</sub> inhibaient ces métastases <sup>144</sup>.

### Implication de l'axe endothéline dans l'échappement au système immunitaire

Les cellules cancéreuses ont développé de multiples mécanismes pour échapper au système immunitaire (SI). Dans le cancer de l'ovaire, ET<sub>B</sub> est capable de moduler l'infiltration des cellules du SI telles que les lymphocytes T (LT) au sein de la tumeur. L'utilisation de l'antagoniste BQ788, spécifique d'ET<sub>B</sub>, permet la ré-infiltration des LT dans la tumeur. <sup>145</sup>. L'endothéline 1 accélère le recrutement des macrophages au niveau tumoral et permet l'activation de leurs caractéristiques pro-tumorales ce qui facilite la survie, la prolifération et la dissémination des cellules malignes <sup>14,73</sup>. L'endothéline 2 partage une séquence similaire avec certaines chimiokines ce qui lui confère des propriétés similaires. Ainsi, dans le cancer du sein, ET-2 peut (i) recruter des macrophages exprimant ET<sub>B</sub> par chimiotactisme *via* la voie MAPK,

## Introduction générale

(ii) activer les macrophages pour qu'ils deviennent pro-tumoraux et enfin (iii) les acheminer vers les zones tumorales <sup>146</sup>.

### **Implication de l'axe endothéline dans l'inflammation liée au développement tumoral**

L'inflammation déclenchée par les cellules tumorales et les cellules immunitaires associées aux tumeurs permettent la progression du cancer. Ainsi, dans le cancer de la vessie, l'axe ET-1/ET<sub>A</sub> permet le recrutement de macrophages au sein de la tumeur. Ces macrophages sécrètent des cytokines pro-inflammatoires ainsi que des protéases qui permettent aux cellules tumorales de métastaser vers de nouveaux organes <sup>143</sup>. L'utilisation d'antagonistes ciblant ET<sub>A</sub> a permis de diminuer de manière significative le nombre de macrophages et de métastases pulmonaires soulignant ainsi l'importance de la voie endothéline pour leur recrutement et leur activation. Une étude sur le cancer du sein a mis en évidence que la production de l'interleukine 8 et du TNF- $\alpha$  par les macrophages induisait la sécrétion d'ET-1 dans le microenvironnement tumoral, qui, à son tour, favorise la progression tumorale <sup>147</sup>.

### **Axe endothéline et instabilité génétique**

Il est connu que les cellules tumorales présentent une forte instabilité génétique liée à l'occurrence importante de mutations au sein de leur patrimoine génétique. Afin de maintenir la stabilité génétique au sein des cellules, plusieurs protéines sont impliquées dont la plus importante est p53, considérée comme le gardien du génome. Dans un contexte physiologique, cette protéine possède une fonction de gène suppresseur de tumeur. Elle peut, par exemple, induire l'arrêt du cycle cellulaire par sénescence, activer le programme de réparation de l'ADN, déclencher l'apoptose et induire des changements métaboliques. Cependant, dans la plupart des cancers, la protéine p53 est mutée, ce qui altère ses fonctions de préservation de la stabilité génétique. Comme c'est par exemple le cas dans le cancer ovarien, dans lequel elle acquiert un rôle d'oncogène. Il a été démontré que l'axe endothéline régule l'activité de la protéine p53 mutée dans le cancer de l'ovaire. En effet, ET-1 active la  $\beta$ -arrestine, *via* sa fixation aux ETR, qui, à son tour, recrute et active la protéine YAP, protéine impliquée dans la voie de signalisation Hippo. Le complexe  $\beta$ -arrestine/YAP mobilise la protéine p53 mutée et l'achemine vers le noyau. p53 mutée sert alors de facteur de transcription pour de nombreux pro-oncogènes dont *EDN1*. Cette boucle autocrine et le complexe YAP/p53 mutée sont entièrement dépendants des ETR. En effet, l'inhibition des ETR *via* l'utilisation de macitentan bloque la transcription des pro-oncogènes normalement initiée par le complexe YAP/p53 mutée <sup>148</sup>. Ainsi, l'axe endothéline permet la progression tumorale par exploitation de l'instabilité génétique des cellules tumorales.

### **Implication de l'axe endothéline et reprogrammation génétique**

Comme évoqué précédemment, certaines tumeurs épithéliales expriment le récepteur ET<sub>A</sub> mais pas ET<sub>B</sub>. Cette diminution de l'expression du récepteur B des endothélines est en partie due à une hyperméthylation, une régulation épigénétique, d'une région d'ADN à proximité de son promoteur. La méthylation de l'ADN est nécessaire au développement physiologique des mammifères. Cependant, dans le cas de tumeurs de la vessie ou du côlon, l'hyperméthylation de régions nommées îlots Cytosine-phosphate-Guanine (CpG) à proximité du promoteur du gène *EDNRB*, codant pour ET<sub>B</sub>, a été mise en évidence<sup>92,94</sup>. L'hyperméthylation a pour conséquence l'inhibition de la transcription de ce gène. Ainsi, un changement dans le ratio ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> apparaît, nécessaire à la progression de ces tumeurs épithéliales. Ce phénomène a été identifié comme impactant 70 % des tumeurs métastatiques de la prostate et n'a pas été retrouvée au niveau des tissus sains<sup>94</sup>. Dans le cancer du sein, *EDN3*, codant pour ET-3, subirait le même mécanisme d'hyperméthylation, ce qui diminuerait son expression d'ET-3<sup>149</sup>. Enfin, ce même phénomène a été observé dans le cancer du côlon pour les gènes *EDN2* et *EDN3*<sup>150</sup>.

### **Potentielle implication de l'axe endothéline dans la sénescence des cellules tumorales :**

Des études ont suggéré un rôle de l'endothéline 1 dans la sénescence cellulaire dans diverses pathologies. Par exemple dans le diabète *via* la voie de signalisation PI3K/NFκB qui active la transcription de l'interleukine 6 et du TNF-α et rend le microenvironnement pro-inflammatoire, favorisant dès lors l'apparition de cellules sénescents<sup>151</sup>. De même, l'axe ET-1/ET<sub>A</sub> induit la sénescence cellulaire dans un contexte de sarcopénie, une dystrophie musculaire liée à l'âge en partie causée par la sénescence des myoblastes qui sont des cellules souches responsables de la formation des muscles squelettiques<sup>152</sup>. La sarcopénie, comme le cancer, est une pathologie liée au vieillissement et à un microenvironnement riche en facteurs pro-inflammatoires. Ainsi, l'étude de la relation entre la surexpression de l'ET-1 et la sénescence permettrait de mieux appréhender le traitement des cancers. Par exemple, une étude sur les adénocarcinomes pulmonaires a montré une corrélation entre l'augmentation de l'expression de l'ECE-2, l'enzyme de conversion de l'endothéline, et la sénescence cellulaire induite par le stress oxydatif<sup>153</sup>. Ainsi, même si ce phénomène n'est encore que très peu documenté, il semblerait que l'axe endothéline influencerait sur l'induction de la sénescence dans un contexte tumoral.

En conclusion de cette partie, l'axe endothéline est un axe majeur de la progression tumorale. Dès lors, il peut être considéré comme une cible thérapeutique de choix pour le

## Introduction générale

traitement de certains cancers. Ainsi, plusieurs types de cancer ont déjà fait l'objet de traitements par des antagonistes des Récepteurs des endothélines à un stade préclinique ou clinique <sup>154,155</sup>.

### *c. Les Récepteurs des endothélines, une opportunité thérapeutique contre le cancer déjà initiée en phase clinique*

L'implication de l'axe endothéline dans le processus de progression tumorale a donc été mis en évidence dans plusieurs types tumoraux différents. Afin de lutter contre la suractivation de l'axe endothéline dans les cellules tumorales, de nombreuses approches thérapeutiques ont été développées ces dernières années. Un exemple original était l'utilisation de polyphénols, un élément retrouvé dans la peau de raisin du vin rouge et du thé, qui pouvait inhiber l'ET-1 <sup>156</sup>. Cependant, seul le développement d'antagonistes des Récepteurs des endothélines a réellement permis une inhibition significative de l'axe endothéline. Les résultats positifs très encourageants obtenus après traitement par antagonistes des Récepteurs des endothélines a permis leur conquête du marché et leur utilisation en essais cliniques de phase II et III. Les essais cliniques des antagonistes des Récepteurs des endothélines dans la prise en charge du cancer sont recensés dans le **Tableau 3**. Par souci de simplicité, sont évoqués seulement les essais cliniques en oncologie.

**Tableau 3 : Essais cliniques des molécules antagonistes ciblant ETR dans un contexte tumoral**

Antagoniste ETR	Traitement combiné	Tumeur	Phase clinique	Résultat	référence
Zibotentan: cible ETA		Cancer prostate (non-métastatique CRPC; métastatique CRPC; non métastatique HRPC)	Phase III	NS sur SG	<a href="https://doi.org/10.1038/pca.2013.2">https://doi.org/10.1038/pca.2013.2</a>
	Docetaxel	Cancer prostate (non métastatique HRPC)	Phase III	NS sur SG	<a href="https://doi.org/10.1002/ncr.27674">https://doi.org/10.1002/ncr.27674</a> ; <a href="https://doi.org/10.1200/jco.2012.46.4149">https://doi.org/10.1200/jco.2012.46.4149</a>
	Pemetrexed	Cancer du poumon (NSCLC)	Phase II	NS sur SG	<a href="https://doi.org/10.1007/s00280-010-1538-z">https://doi.org/10.1007/s00280-010-1538-z</a>
Atrasentan: cible ETA		Cancer prostate (non-métastatique HRPC; métastatique HRPC)	Phase III	Amélioration du TTP	<a href="https://doi.org/10.1002/ncr.23864">https://doi.org/10.1002/ncr.23864</a> ; <a href="https://doi.org/10.1002/ncr.22996">https://doi.org/10.1002/ncr.22996</a>
	Docetaxel, prednisone	Cancer prostate ( métastatique CRPC)	Phase III	NS sur SG sauf les patients ayant des biomarqueurs de remodelage osseux	<a href="https://doi.org/10.1016/s1470-2045(13)70294-8">https://doi.org/10.1016/s1470-2045(13)70294-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1093/jncl/dj013">https://doi.org/10.1093/jncl/dj013</a> ; <a href="https://doi.org/10.1200/jco.2013.51.7417">https://doi.org/10.1200/jco.2013.51.7417</a>
		Gliome	Phase I	terminé	<a href="https://doi.org/10.1215/15228517-2008-013">https://doi.org/10.1215/15228517-2008-013</a>
		Carcinome à cellules rénales métastatique	Phase II	NS sur SG	<a href="https://doi.org/10.1016/j.clgc.2015.07.002">https://doi.org/10.1016/j.clgc.2015.07.002</a>
YM598: cible ETA		Cancer prostate	Phase II	terminé	<a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00050297">https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00050297</a>
		Cancer prostate métastatique	Phase II	terminé	<a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00048659">https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00048659</a>
SPI 1620: (agoniste) cible ET <sub>B</sub>	Docetaxel	Cancer vésicule biliaire	Phase II	NS sur SG	<a href="https://doi.org/10.1038/bjc.2017.160">https://doi.org/10.1038/bjc.2017.160</a>
Bosentan: cible ETA et ET <sub>B</sub>		Mélanome métastatique	Phase II	Bénéfice sur la SG de certain mélanome métastatique	<a href="https://doi.org/10.1007/s10637-006-9014-7">https://doi.org/10.1007/s10637-006-9014-7</a>
	Dacarbazine	Mélanome métastatique	Phase II	Pas d'effet combiné sur SG	<a href="https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-69">https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-69</a>
	Nab-paclitaxel, Gemcitabine	Cancer du pancréas	Phase I	terminée	<a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04158635">https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04158635</a>
Macitentan : cible ETA et ET <sub>B</sub>	Temozolomide	Glioblastome primaire	Phase I	terminée	<a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02254954">https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02254954</a>
	Temozolomide	Rechute glioblastome	Phase I	terminée	<a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01499251">https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01499251</a>

## Introduction générale

À ce stade, quatre modulateurs chimiques non peptidiques et antagonistes ont été très étudiés en phase clinique : le zibotentan, l'atrasentan, le bosentan et le macitentan.

Après analyse des résultats cliniques, la toxicité obtenue avec ces molécules thérapeutiques a été considérée comme acceptable avec des quantités administrées par voie orale comprises entre [62,5 – 125 mg] pour le bosentan, 10 mg pour le macitentan, 40 mg pour l'atrasentan et [10 – 100 mg] pour le zibotentan <sup>157-161</sup>. Les effets secondaires recensés durant ces essais cliniques sont, entre autres, maux de tête, nausées, vomissements, œdèmes et diarrhées. Les traitements anti-cancéreux présentent de manière générale une toxicité résiduelle, similaire à celle observée dans le cas des antagonistes des Récepteurs des endothélines. Pour les antagonistes mixtes, bosentan et macitentan), certains patients ont présenté des effets secondaires plus sévères tels qu'une anémie, ce qui a constitué un facteur aggravant et pour lequel une grande surveillance a été exigée. Malgré ces effets indésirables, ces deux thérapies ont été approuvées par la *Food & Drug Administration* (FDA) dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire, car le ratio bénéfice/risque a été estimé comme étant favorable <sup>158,159</sup>.

La distribution de ces antagonistes au sein de l'organisme a été étudiée <sup>157-161</sup>. Classiquement, les médicaments sont excrétés de deux façons :

- **Par les reins** : La plupart des médicaments sont éliminés par filtration rénale. En effet, le plasma atteint le glomérule rénal qui filtre les molécules possédant un poids inférieur à 60 kDa grâce aux pores présents au niveau de son endothélium. L'eau filtrée peut-être réabsorbée par la circulation, mais les composés polaires, et donc la majorité des médicaments, ne peuvent pas rediffuser dans le plasma. Il existe cependant des transporteurs spécifiques au niveau glomérulaire permettant la réabsorption de certaines molécules hydrophiles telles que le glucose. Afin d'être excrétés, les antagonistes des Récepteurs des endothélines doivent être libres et non liés à des protéines plasmatiques. Il est à noter que la voie d'excrétion rénale nécessite un apport énergétique important et cette voie d'élimination peut, dès lors, être bloquée par certains inhibiteurs métaboliques.
- **Par la voie hépatobiliaire** : Certains médicaments peuvent aussi être éliminés dans la bile. Au niveau physiologique, la voie biliaire correspond à des canaux qui collectent la bile synthétisée dans le foie et excrétée dans l'intestin grêle. Les médicaments peuvent

## Introduction générale

soit se retrouver intact au niveau biliaire soit être métabolisés au niveau hépatique avant de rejoindre la bile.

Tandis que le macitentan et le zibotentan sont tous deux excrétés par voie rénale, le bosentan est, quant à lui, éliminé par la voie biliaire.

Ces antagonistes bien tolérés par l'organisme présentent une biodistribution tout à fait classique. Cependant, ceux-ci ont démontré une efficacité clinique mitigée. Tout d'abord, une étude clinique de phase II a mis en évidence une stabilisation de 6 patients atteints d'un cancer de mélanome métastatique après administration de bosentan (injection par voie orale et n cohorte = 32 patients) <sup>154</sup>. La même équipe a publié 3 ans plus tard une étude avec l'utilisation combinée du bosentan et d'une chimiothérapie ne présentant pas d'amélioration de survie par rapport à la chimiothérapie administrée seule <sup>162</sup>. En ce qui concerne le macitentan, l'atrasentan ou le zibotentan, leur efficacité clinique durant les études de phase III ne s'est pas avérée équivalente aux résultats obtenus en préclinique, les principaux critères de jugement étant la progression tumorale et la survie globale moyenne des patients. Durant ces études les antagonistes ont été administrés seuls ou en combinaison avec un autre agent de chimiothérapie. Ces études n'ont pas démontré de supériorité thérapeutique des antagonistes des Récepteurs des endothélines comparativement au placebo, malgré des résultats de régression tumorale très encourageants en préclinique <sup>163-165</sup>. Cette divergence de résultats peut être en partie expliquée par l'absence de sélection des patients inclus dans l'étude. En effet, les antagonistes évalués agissant sur les ETR, la surexpression des ETR à la surface des cellules tumorales est indispensable à leur efficacité. La stratification des patients présentant une tumeur exprimant des ETR devrait être considérée pour l'inclusion des patients au sein des études cliniques afin de pouvoir déterminer leur éligibilité au traitement par antagonistes des ETR <sup>166</sup>. Il est à noter que l'efficacité thérapeutique des antagonistes aux Récepteurs des endothélines repose sur leur faculté à entrer en compétition avec l'endothéline (ET-1, ET-2, ET-3). Cependant, dans le cadre d'une suractivation de la voie de l'endothéline, de fortes concentrations d'ET-1 sont retrouvées au sein du microenvironnement tumoral. En plus de sa concentration élevée au niveau tumoral, l'ET-1 possède une forte affinité pour son récepteur, de l'ordre du pM <sup>167</sup>. Ainsi, dans ces conditions, le déplacement du ligand endogène des Récepteurs des endothélines par les antagonistes s'avère plus complexe et peu probable. Afin de cibler les ETR et agir sur l'axe endothéline, suractivé au niveau tumoral, l'exploration d'autres alternatives thérapeutiques que les antagonistes ETR semble être plus judicieux, l'efficacité de ceux-ci pouvant souffrir de la présence en forte concentration du ligand endogène dans la tumeur.

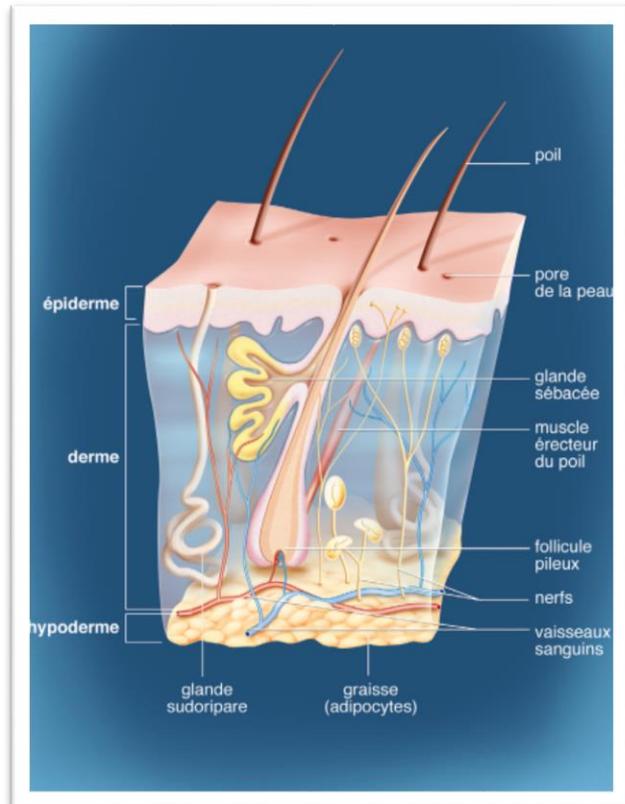
## Introduction générale

L'axe endothéline joue un rôle prépondérant dans une grande variété de types tumoraux. Parmi ces cancers, on retrouve le mélanome métastatique et le glioblastome qui ont été sélectionnés comme modèles d'étude dans la suite de ce manuscrit.

### 3) *Le récepteur des endothélines B, une cible potentielle pour le traitement du mélanome de grade IV*

#### a. Généralités

Le mélanome correspond à l'une des formes graves de tumeur de la peau. La peau, barrière protectrice entre l'organisme et l'environnement, est constituée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Figure 18**). L'épiderme est composé principalement de kératinocytes et de mélanocytes. C'est cette couche qui est en contact direct avec l'environnement. Le derme, quant à lui, a pour rôle d'assurer la nutrition de la peau et d'héberger les terminaisons nerveuses ainsi que les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Enfin, l'hypoderme correspond à la couche la plus profonde. Il est constitué de cellules graisseuses et est en contact avec le muscle (<https://www.e-cancer.fr>).



**Figure 18 : Schéma des différentes couches de la peau et de ses constituants (INCA : e-cancer.fr).**

De par son exposition permanente aux produits chimiques toxiques ainsi qu'aux rayonnements UV du soleil, sources de dommages à l'ADN, l'épiderme constitue le berceau des cancers cutanés. Le cancer de la peau est une maladie multifactorielle qui peut être favorisée par des paramètres environnementaux et/ou par des facteurs génétiques et/ou physiques. En ce qui concerne les facteurs physiques pouvant influencer sur l'occurrence du cancer de la peau, la pigmentation de la peau a été identifiée comme jouant un rôle important dans le développement de cette pathologie. En effet, il a été mis en évidence qu'une personne issue d'une population

## Introduction générale

caucasienne, présentant une peau claire, aura une plus forte probabilité de développer un cancer de la peau à la suite d'expositions répétées aux rayonnements du soleil qu'une personne possédant une peau plus foncée. Cependant, il est à noter que des expositions solaires trop importantes induisent le développement de tumeurs cutanées, quel que soit le type de peau. Le mélanome peut également être favorisé par des mutations génétiques transmises de façon héréditaire. Par exemple, le gène suppresseur de tumeur *CDKN2A*, est souvent retrouvé muté chez des patients dont la famille entière a développé un mélanome. Il ne faut pas confondre ce type de mutation avec des mutations génétiques ponctuelles qui apparaissent au cours de la vie du patient et qui peuvent également provoquer l'apparition de mélanome, comme c'est le cas pour les protéines mutantes BRAF et ERK retrouvées dans plus de 50 % des mélanomes diagnostiqués.

En France, 100 000 nouveaux cas de cancers de la peau sont diagnostiqués annuellement (<https://www.e-cancer.fr>)<sup>168</sup>. Il existe quatre types de cancers cutanés, les carcinomes basocellulaires, les carcinomes épidermoïdes, le carcinome à cellule de Merkel et les mélanomes. **Les carcinomes basocellulaires** représentent 70 % de ces cancers. Ils sont issus d'une prolifération incontrôlée des kératinocytes se localisant dans la couche basale de l'épiderme. Il apparaît généralement sous forme de nodule rosé et granuleux et se retrouve fréquemment au niveau du visage. Le diagnostic est établi en moyenne à 66 ans. Il est rare que cette tumeur évolue sous forme de métastases. **Le carcinome épidermoïde ou spinocellulaire** se développe à partir de lésions pré-existantes telles que des cicatrices au niveau de l'épiderme et majoritairement au dans des zones exposées au soleil. Sans prise en charge, ce type de tumeur se propage jusqu'au ganglion lymphatique pour métastaser et essaimer à distance de la tumeur initiale. En moyenne, ces tumeurs sont diagnostiquées aux alentours de 75 ans. **Le carcinome à cellule de Merkel** constitue le cancer de la peau le plus rare mais le plus agressif. Il se développe au niveau de zones exposées au soleil et est diagnostiqué chez des personnes âgées en moyenne de 76 ans avec une peau claire. Enfin, **le mélanome** est une pathologie généralement diagnostiquée vers l'âge de 56 ans pour la femme et 58 ans pour l'homme. Il apparaît au niveau de zones exposées régulièrement au soleil ou au niveau de grains de beauté (<https://www.e-cancer.fr>)<sup>168</sup>.

On peut distinguer quatre sous-types de mélanome qui se différencient par leurs caractéristiques physiques (taille, couleur, forme), leur localisation (visage, extrémité du corps.) ou leur gravité. **Le mélanome superficiel extensif** représente entre 60 % et 70 % des cas. Il apparaît au niveau de zones exposées au soleil chez des personnes âgées de 50 ans environ. **Le**

**mélanome de Dubreuilh ou lentigo malin** représente 10 % à 15 % des cas et survient chez des patients âgés d'environ 80 ans toujours au niveau de zones exposées au soleil. **Le mélanome nodulaire** qui représente moins de 5 % des cas est l'une des formes de tumeur qui évolue le plus rapidement. Il se présente sous forme de polypoïde, une lésion saillante qui prend masse à la surface de la peau, et peut s'accompagner d'ulcères. Enfin, **le mélanome acral lentigineux** est sensiblement différent des autres types de mélanome puisqu'il apparaît au niveau de zones particulières telles que la paume de la main, les ongles, les pieds... (<https://www.e-cancer.fr>)<sup>168</sup>.

Au niveau cellulaire, le mélanome est issu d'une prolifération incontrôlée des mélanocytes. Lorsque les mélanocytes anormaux et tumoraux se propagent au niveau du derme, ils vont, au travers des vaisseaux lymphatiques, se disséminer dans tout le corps et coloniser de nouveaux organes. C'est ce qu'on appelle le mélanome métastatique (<https://www.fondation-arc.org/>). Le mélanome est l'un des cancers dont la mortalité et l'incidence ne cessent d'augmenter ces 40 dernières années. En 2018, selon l'agence nationale de la santé publique, 15 500 nouveaux cas ont été diagnostiqués et environ 2 000 décès ont été recensés en France. La survie nette à 5 ans de la tumeur *in situ* est de l'ordre de 90 %<sup>168</sup>. Enfin, les patients atteignant le stade de mélanome métastatique (stade III) présentent un très mauvais pronostic. Selon le programme américain *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) et l'Institut National du Cancer (INCA), dans le cas du mélanome, la survie globale observée à 5 ans pour une tumeur qui s'étend localement passe de 90 % à 62 % puis à seulement 15 % pour les patients atteints de formes métastatiques. (<https://www.e-cancer.fr>, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2009\\_pops09/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/)). Jusqu'à très récemment, aucune alternative thérapeutique n'était efficace pour contrôler la maladie dans le cas du mélanome métastatique. Le développement des dernières années d'immunothérapies ciblées ont permis l'amélioration de la survie des patients.

Seul un essai clinique a mis en évidence la stabilisation du mélanome métastatique chez quelques patients après traitement par bosentan, antagoniste mixte des ETR<sup>154</sup>.

#### *b. Prise en charge des patients*

### **Détermination du type de tumeur et classification**

Concernant le diagnostic, généralement le patient voit apparaître une lésion suspecte et prend rendez-vous chez le dermatologue. Ce spécialiste réalise un premier examen clinique en analysant l'aspect de l'anomalie selon les critères ABCDE (Asymétrie, Bordure, Couleur,

## Introduction générale

Diamètre, Évolution). S'il y a suspicion de mélanome, alors l'ablation de la totalité de la lésion est effectuée. En parallèle, la tumeur réséquée est analysée par anatomopathologie en laboratoire. Cet examen consiste à regarder l'intégrité du tissu à l'échelle microscopique et permet d'établir un premier diagnostic quant au type de mélanome. Afin d'affiner ce diagnostic et de définir le degré de la pathologie du patient un examen TNM (Tumeur, Ganglion (Nodes en anglais), Métastases) est envisagé. Ce système international permet de stratifier les tumeurs en fonction de leur taille, de l'invasion ganglionnaire des cellules tumorales et de la présence de métastases. Le **Tableau 4** définit les caractéristiques établies par l'AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) de cette classification TNM.

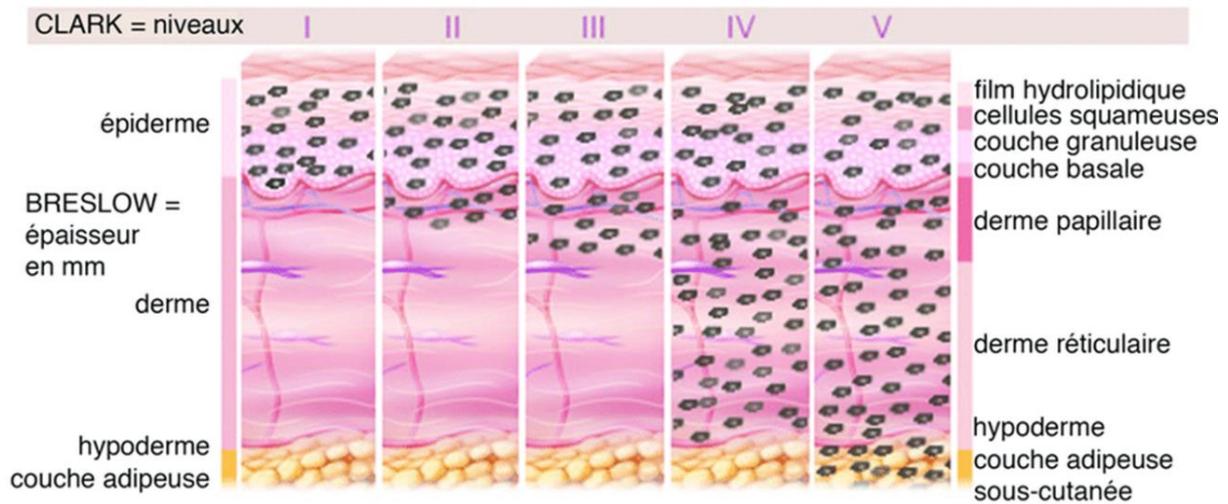
**Tableau 4 : Classification TNM** selon la 7<sup>ème</sup> édition de l'*American Joint Committee on Cancer*.

Tumeur primitive (Taille)		
classification	Epaisseur (mm)	Ulcération et mitose
T1	≤ 1 mm	<b>a:</b> Pas d'ulcère et mitoses <1.mm <sup>-2</sup> <b>b:</b> Ulcère et/ou mitoses ≥1.mm <sup>-2</sup>
T2	[ 1,01 - 2 mm ]	<b>a:</b> Pas d'ulcère <b>b:</b> Ulcère
T3	[ 2,01 – 4 mm ]	<b>a:</b> Pas d'ulcère <b>b:</b> Ulcère
T4	> 4,01 mm	<b>a:</b> Pas d'ulcère <b>b:</b> Ulcère
Ganglions lymphatiques régionaux (Nodes)		
classification	Nombre de ganglions métastatique	Masse métastatique
N1	N = 1 ganglions	<b>a:</b> micrométastase <b>b:</b> macrométastase
N2	N = 2 à 3 ganglions	<b>a:</b> micrométastase <b>b:</b> macrométastase <b>c:</b> métastase satellite
N3	N ≥ 4 ganglions	
Métastases à distance (Métastases)		
Classification	Site métastatique	Taux de LDH sérique
Ma	Métastases cutanées ganglionnaires à distance	Normal
Mb	Métastases pulmonaires	Normal
Mc	Autre métastases viscérales, ou autre localisation	Elevé

Il existe également la classification de Clark qui différencie cinq stades de mélanome en les répertoriant du grade I au grade V (**Figure 19**). Les tumeurs de stade I et II sont des tumeurs *in situ* et localisées. Elles peuvent être ou non un ulcérisées. Le mélanome de grade III commence à se propager jusque dans les ganglions et souvent plus profondément dans le derme. Enfin le mélanome de haut grade (stade III ou IV) ou mélanome métastatique, désigne des

## Introduction générale

tumeurs métastasées qui envahissent des tissus à distance. Dans le cas de tumeurs de grade V, les cellules malignes ont atteint les tissus adjacents sous cutanés et la couche adipeuse. Dans cette classification, le grade tumoral est fonction de la profondeur d'atteinte des tissus (selon le guide du traitement du mélanome de la peau de l'INCA) <sup>169</sup>.



**Figure 19 : classification de clark (Domingues *et al.*, 2014)** qui classifie le grade tumorale en fonction de la mesure de l'épaisseur de la tumeur, aussi appelé indice de Breslow.

## Diagnostic

Pour aider au diagnostic des patients, plusieurs modalités d'imagerie sont utilisées. En premier lieu, l'échographie des ganglions lymphatiques au voisinage de la tumeur permet de visualiser des potentielles métastases au niveau ganglionnaire. Ensuite, un scanner, aussi appelé examen tomодensitométrie (TDM), du thorax, de l'abdomen, du pelvis et du cerveau peut être réalisé en complément de l'échographie s'il y a suspicion de métastases. Ce type d'imagerie repose sur l'absorption des rayons X qui est fonction des caractéristiques intrinsèques du tissu telles que sa densité. Il en résulte une image en trois dimensions (3D) des structures anatomiques du tissu permettant ainsi de voir si ce-dernier présente un aspect sain ou anormal. L'injection d'un produit de contraste par voie intraveineuse peut aussi permettre une meilleure visualisation des organes et des vaisseaux. Parmi les techniques d'imagerie qui peuvent aider au diagnostic, la tomographie à émission de positons (TEP) connaît actuellement un essor considérable. Cette technique d'imagerie moléculaire permet de suivre l'évolution de mélanome de grade III à l'aide de radio-isotopes. Par exemple, le fluorodésoxyglucose (<sup>18</sup>F-FDG) est un analogue du glucose métabolisable par la tumeur et contenant le fluor 18 émetteur

$\beta^+$ . Ce type de traceur permet de localiser des potentielles métastases et est souvent couplé à un examen TDM. (selon le guide du traitement du mélanome de la peau de l'INCA) <sup>169</sup>.

### Thérapie

En fonction du type et de l'avancée du cancer, plusieurs schémas thérapeutiques sont envisagés. Les thérapies de référence dans le traitement du mélanome sont en premier lieu la chirurgie. En traitement adjuvant, le recours à l'interféron alpha (IFN- $\alpha$ ) qui active le système immunitaire et stimule une réponse antitumorale peut être envisagé <sup>170</sup>. Dans certains cas la chirurgie est combinée avec de la chimiothérapie conventionnelle, qui consiste à éliminer les cellules tumorales par des mécanismes non spécifiques. Lorsqu'elle est envisageable, la radiothérapie externe peut également être complémentaire à la chirurgie. Cette technique repose sur l'exposition de tissus tumoraux à des rayonnements de haute énergie, ces rayonnements provoquant des lésions au sein des cellules tumorales menant à la mort cellulaire. Enfin, certains patients peuvent être éligibles à des thérapies ciblées (selon le guide du traitement du mélanome de la peau de l'INCA) <sup>169</sup>. Par exemple, l'utilisation d'ipilimumab (Yervoy<sup>®</sup>) ou de nivolumab (Opdivo<sup>®</sup>), anticorps ciblant des molécules inhibitrices du système immunitaire, a permis l'amélioration de la survie et parfois même la guérison totale de patients atteints de mélanome. Néanmoins, tous les patients ne sont pas éligibles à ce type de traitements <sup>171</sup>.

### Limitations des thérapies conventionnelles

Les traitements conventionnels actuels dont la chirurgie, la chimiothérapie, et la radiothérapie externe, ont permis la survie de nombreux patients et parfois même l'éradication totale de la tumeur. Cependant, ces thérapies présentent plusieurs limitations. D'une part, en fonction de la localisation de la tumeur, l'ablation de la tumeur par chirurgie n'est pas toujours possible. D'autre part, la chirurgie, lorsqu'elle est réalisable, est souvent assez peu précise puisque le chirurgien ne voit que les lésions visibles à l'œil nu et donc superficielles. Par conséquent, le soignant peut passer à côté de cellules tumorales localisées en périphérie de la masse principale ou dans des tissus adjacents. C'est pourquoi la chirurgie est souvent accompagnée de séances de chimiothérapie ou de radiothérapie. Ces thérapies, bien que très efficaces dans la plupart des cancers, s'avèrent considérablement toxiques. En effet, la radiothérapie externe consiste en l'irradiation de tissus tumoraux. Cependant, cette méthode n'étant pas spécifique, le rayonnement incident peut engendrer des lésions létales au sein des tissus sains adjacents à la masse tumorale. De plus, les tissus tumoraux en profondeur sont difficilement accessibles, rendant le traitement par radiothérapie plus complexe. Enfin, la chimiothérapie constitue une thérapie non ciblée qui présente une très forte toxicité puisqu'elle touche aussi les cellules

## Introduction générale

saines. L'importante toxicité de ce type de traitements se manifeste par l'occurrence de nombreux effets secondaires difficilement supportables. Les traitements ciblés tels que les immunothérapies, peuvent permettre une vectorisation des molécules cytotoxiques au niveau tumoral et ainsi de s'affranchir de leurs effets toxiques liés à leur action non spécifique. Les inhibiteurs des *immuno-checkpoints*, tels que l'ipilimumab et le nivolumab, représentent une nouvelle classe prometteuse dans la thérapie des cancers. Cependant, la restriction de leur utilisation aux patients n'exprimant que certains biomarqueurs ne permet pas la couverture intégrale des patients atteints de tumeurs hétérogènes telles que le mélanome métastatique. Dès lors, afin d'améliorer la prise en charge des patients, il convient de développer de nouveaux anticorps capables de cibler de nouvelles cibles thérapeutiques.

### *c. L'axe endothéline, une opportunité thérapeutique du mélanome*

Il est connu depuis les années 2000 qu'une forte expression du gène *EDNRB* est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du mélanome <sup>172</sup>. Il a également été démontré que la présence de variants du gène *EDNRB* constituait un facteur de risque pour l'apparition de mélanome <sup>173,174</sup>. L'isoforme 3 d'*EDNRB* jouerait notamment un rôle dans l'échappement des cellules tumorales au temozolomide, chimiothérapie de référence dans le mélanome. Ces études mettent en avant l'implication des variants du gène *EDNRB* dans la progression tumorale et la chimiorésistance des cellules tumorales.

Par ailleurs, le récepteur ET<sub>B</sub> a été retrouvé surexprimé dans plusieurs lignées de mélanome humain <sup>95</sup>. Dans le mélanome, cette surexpression du récepteur de type B a été associée à une augmentation de l'incidence de métastases cérébrales <sup>142</sup>.

Au niveau signalisation, le rôle clé de ET<sub>B</sub> dans la progression tumorale du mélanome a été démontré. Par exemple, dans des lignées de mélanome humain, l'axe ET<sub>B</sub> avec ET-1 permet la transactivation du *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3* (VEGFR-3) <sup>104,175</sup>. Les voies de signalisation de l'endothéline et celles du VEGF présentent un effet synergique permettant une meilleure vascularisation de la tumeur, facilitant, dès lors, la formation de métastases. Dans le mélanome métastatique, un dialogue étroit entre la signalisation de l'endothéline et celle de l'hypoxie est instauré. L'ET-1 et l'ET-3 inhibent la protéine PHD2, ce qui a pour conséquence de stabiliser le facteur HIF-1 $\alpha$  dans de nombreuses lignées de mélanome métastatique <sup>108,176</sup>. Ainsi, les cellules tumorales dans des conditions de normoxie stimulent la voie de l'hypoxie, ce qui induit la transcription de gènes tels que le VEGF, un facteur de l'angiogénèse. Cette signalisation peut conférer à la tumeur une

## Introduction générale

augmentation de l'apport de nutriments et donc d'énergie par angiogenèse. Dans le mélanome, les deux ligands, ET-1 et ET-3, ont par ailleurs montré un effet pro-prolifératif par le biais de la signalisation ET<sub>B</sub><sup>177</sup>.

L'endothéline est aussi capable d'induire la TEM en perturbant les jonctions cellulaires dans le cas du mélanome. En effet, dans le mélanome métastatique, ET-1 induit l'expression de protéines impliquées dans la mobilité cellulaire telles que les cadhérines et les intégrines. Le ligand perturbe aussi la communication intercellulaire en phosphorylant les connexines<sup>107</sup>. De plus, ET-1 promeut l'expression des protéines *Melanoma Cell Adhesion Molecule* (MCAM) au niveau des mélanocytes. Ce biomarqueur est exprimé dans plus de 70 % des mélanomes métastatiques et n'est pas retrouvé au niveau des cellules saines<sup>178</sup>. ET-1 *via* le récepteur ET<sub>B</sub> est impliquée dans la mobilité des cellules de mélanome, nécessaire au développement de métastases.

Dans des modèles de mélanome précliniques, les antagonistes comme le bosentan (mixte) ou le BQ788 (spécifique d'ET<sub>B</sub>) ont permis *in vitro* et *in vivo* de diminuer la croissance tumorale en provoquant l'apoptose des cellules tumorales et en inhibant leur prolifération cellulaire.<sup>118,179</sup> Comme commenté dans la partie précédente, le seul succès clinique obtenu avec les antagonistes des Récepteurs des endothélines, concernait le mélanome métastatique avec 20 % des patients qui ont présenté une stabilisation de la pathologie<sup>154</sup>. Cependant, lors d'une deuxième étude clinique la combinaison avec un agent de chimiothérapie n'a pas mis en évidence d'efficacité supplémentaire et d'effet synergique<sup>162</sup>. L'axe endothéline constitue très clairement un axe moteur dans le processus de croissance tumorale et les Récepteurs des endothélines représentent, dès lors, une cible potentielle prometteuse pour la thérapie des mélanomes métastatiques. Cependant, au vu des résultats mitigés des antagonistes des ETR, les efforts se sont concentrés sur le développement de nouvelles molécules et macromolécules capables de cibler cet axe majeur.

Parmi les alternatives thérapeutiques en plein essor, les anticorps monoclonaux (AcM) occupent désormais une place importante dans l'arsenal thérapeutique antitumoral. La société Roche Genentech a développé un anticorps ciblant le récepteur de type B des endothélines, jouant un rôle incontestable dans de nombreuses tumeurs telles que celles précédemment évoquées. Cet anticorps, nommé 5E9, a pour principales caractéristiques : sa haute spécificité et affinité pour le récepteur ET<sub>B</sub> et sa rapide internalisation<sup>180</sup>. De par son fort potentiel d'internalisation au niveau cellulaire, les auteurs ont décidé d'utiliser cet anticorps en tant que vecteur de molécules cytotoxiques ou ADC (*Antibody Drug Conjugate*). Un ADC est un

## Introduction générale

anticorps qui est conjugué à une molécule cytotoxique active après internalisation cellulaire. Jusqu'en 2009, seul un ADC été approuvé par la FDA mais en 2019, quatre autres ont été mis sur le marché et plus de 80 sont en essais cliniques <sup>181</sup>. L'efficacité de cette approche thérapeutique a été démontrée sur des modèles précliniques de cellules de mélanome métastatique humain *in vitro* et *in vivo* <sup>180</sup>. À la suite de ces résultats encourageants, un essai clinique de phase I a été lancé et le rapport a été rendu public en 2019 <sup>182</sup>. Sur la base de la sécurité et de la tolérance du DEDN6526A (anti-ET<sub>B</sub>-ADC) observées dans cette étude, la dose recommandée a été estimée à 2,4 mg/kg chez les patients atteints de mélanome métastatique. Malgré les résultats prometteurs durant les études précliniques *in vivo* et la bonne tolérance du DEDN6526A, cet essai clinique de phase I a pris fin prématurément puisque l'ADC n'a pas eu l'effet escompté, ne permettant pas une régression tumorale significative ainsi que l'amélioration de la survie globale des patients.

Tout comme les antagonistes des ETR, les patients n'ont pas été stratifiés par rapport à l'expression du biomarqueur ET<sub>B</sub> durant l'essai clinique. Le traitement par DEDN6526A constituant une thérapie ciblée, l'absence de stratification en fonction de la présence au niveau tumoral de la cible d'action représente une réelle limitation de l'essai clinique. Pour savoir si les patients sont éligibles à ces thérapies ciblées, il est nécessaire d'avoir recours à une médecine personnalisée. Pour cela, l'utilisation d'imagerie moléculaire visant à améliorer de manière fine et non invasive la stratification des patients constituerait une réelle amélioration dans leur prise en charge. Dans le cadre de l'étude du mélanome, les Récepteurs des endothélines de type B ont été étudiés en profondeur. Les Récepteurs des endothélines de type A ont, quant à eux, été approuvés par la FDA en tant que cible potentielle dans le traitement du glioblastome, comme le montrent les essais cliniques des molécules antagonistes présentés dans le **Tableau 3** (NCT02254954, NCT01499251).

### *4) Le récepteur des endothélines A, un candidat biomarqueur pour le diagnostic et la thérapie des glioblastomes*

#### *a. Généralités*

Le cerveau est composé en grande partie de cellules gliales et de neurones. Les cellules gliales représentent environ 90 % du cerveau et ont pour rôle de nourrir et de soutenir les neurones. Cette famille de cellules est composée d'astrocytes, d'oligodendrocytes, d'épendymocytes et de cellules microgliales. Lorsque ces cellules dérivent, elles induisent une tumeur appelée gliome. Les gliomes sont les tumeurs les plus fréquentes du système nerveux

central (SNC), elles sont catégorisées comme maladie rare du fait de leur faible prévalence (1/100 000) ([Orphanet.net](http://Orphanet.net)). Les gliomes présentent de très mauvais pronostics, 95 % des patients atteints de gliome meurent au bout de cinq ans <sup>183</sup>. Les patients consultent tardivement à la suite de troubles neurologiques provoqués par un développement déjà important des tumeurs, tels que des maux de tête, une perte d'équilibre, des troubles de la mémoire et de la vision, ou encore des crises d'épilepsie... Les gliomes sont des tumeurs très hétérogènes puisqu'elles peuvent posséder différentes origines cellulaires telles que les cellules épendymaires (épendymomes), les astrocytes (astrocytomes) ou les oligodendrocytes (oligodendrogliomes). Cependant, la cellule à l'origine de ces tumeurs reste généralement inconnue <sup>184</sup>. La classification de ces tumeurs reste difficile puisqu'elles diffèrent d'un point de vue de leur localisation, de leur type cellulaire, de leur degré d'agressivité et de leur signature moléculaire. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a tout de même tenté de les classer par groupe homogène, ce système étant le plus pertinent jusqu'alors afin d'établir un pronostic et de déterminer les réponses aux traitements. Selon l'OMS, il existe <sup>184</sup> :

- Des gliomes de grade I tels que les astrocytomes qui présentent de meilleurs pronostics et sont propres à l'enfant. Ils se caractérisent par une évolution lente de la tumeur, celle-ci pouvant même se résorber d'elle-même.
- Des gliomes « malins » nécessitant le recours à la chirurgie et chimiothérapie, tels que les gangliogliomes ou les astrocytomes infiltrants de grade II.
- Des gliomes anaplasiques de haut grade ou encore des glioblastomes (GBM), de grade IV qui sont des tumeurs très agressives de mauvais pronostic avec une prolifération cellulaire importante et une infiltration du tissu cérébral. Le glioblastome représente le type histologique le plus fréquent parmi les gliomes.

Le glioblastome constitue la tumeur cérébrale primitive la plus fréquente et la plus agressive chez l'adulte. Au niveau histopathologique, plusieurs facteurs sont analysés tels que la nécrose et la prolifération des cellules endothéliales. Il existe peu de facteurs de risque connus associés au GBM. Au niveau génétique, la Neurofibromatose de type 1 (NF1) a été identifiée comme pouvant favoriser l'apparition de GBM primaire <sup>185</sup>. Il existe également un grand nombre de mutations ponctuelles existantes au niveau de protéines impliquées dans des voies de signalisation qui peuvent impacter le développement de GBM. C'est le cas de PI3K, la protéine p53 et la protéine du rétinoblastome (RB). L'âge représente aussi un facteur influençant sur l'occurrence de cette pathologie <sup>186</sup>. Selon l'INCA, l'exposition répétée à des substances chimiques reconnues comme cancérogènes ou à des champs électromagnétiques peuvent

également être à l'origine de tumeurs cérébrales. Il existe également des glioblastomes dits secondaires qui représentent une minorité de GBM établie à partir de gliomes de grades inférieurs <sup>187</sup>. Ces GBM secondaires peuvent également être dus à des altérations génétiques. Par exemple, des mutations ponctuelles peuvent apparaître comme dans le cas de l'Isocitrate Déshydrogénase (IDH), assez fréquemment retrouvée dans ce type de GBM.

### *b. Prise en charge des patients*

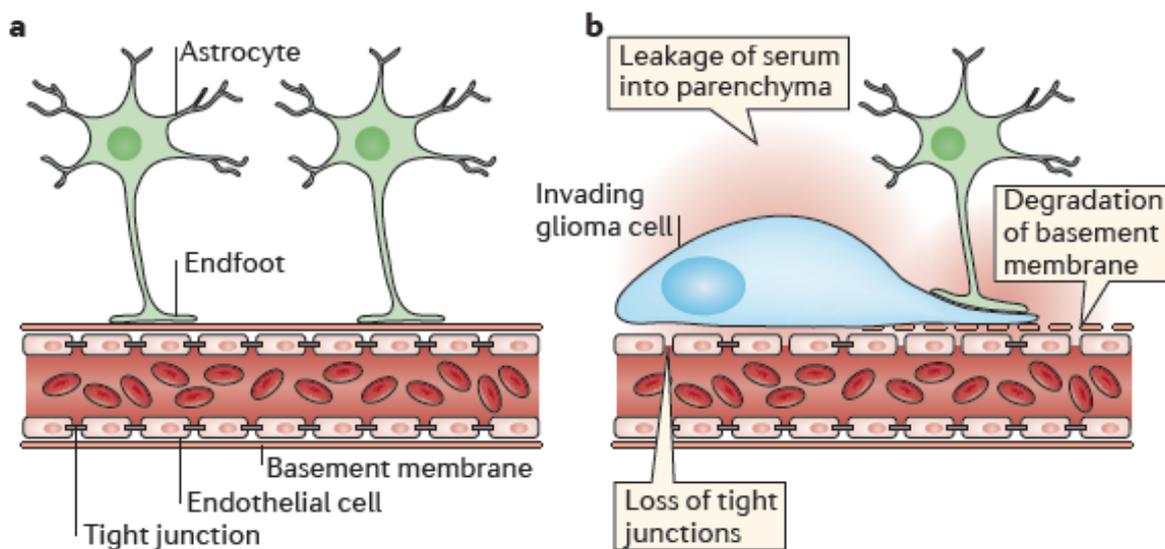
Souvent, le patient expérimente des symptômes pouvant paraître bénins tels que des nausées, vomissements, migraines. Parfois, les signes cliniques peuvent être plus avancés tels que des troubles de la parole, des crises d'épilepsie et des moments de confusion soudains. Dans tous les cas, le patient prend rendez-vous chez son médecin qui mène un examen clinique approfondi. La prise en charge du patient est initiée par un diagnostic par imagerie avec, soit un scanner à rayons X, soit une Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). L'imagerie permet d'obtenir des informations quant au degré d'avancement de la pathologie de manière non invasive. Si un gliome est suspecté suite aux résultats de l'IRM, un avis neurochirurgical est pris d'urgence. Le neurochirurgien évalue si l'exérèse de la masse tumorale est envisageable en fonction de sa localisation et de son infiltration. Si la chirurgie est possible alors le protocole de soins standard est appliqué au patient <sup>188</sup>, comprenant de la chirurgie pour une exérèse de la tumeur et/ou une biopsie pour établir le diagnostic anatomo-pathologique et moléculaire. La chirurgie peut se faire sur patient éveillé. En France, ce type d'opération est pratiqué par le Pr Hugues Duffau <sup>189</sup>. Cela lui permet en temps réel et à l'aide d'une cartographie cérébrale préalablement établie, d'améliorer la sécurité du patient et de limiter de potentielles séquelles. La biopsie analysée en laboratoire permettra alors le diagnostic final avec le grade tumoral et le pronostic du patient. Le traitement est adapté en fonction de ce diagnostic. Lorsque la chirurgie n'est pas possible, la radiothérapie est alors considérée comme traitement principal pour réduire le volume tumoral. Souvent, elle est concomitante à la chirurgie pour éliminer les cellules tumorales résiduelles. Pour les tumeurs dites chimiosensibles, une chimiothérapie sera utilisée en complément de la chirurgie et de la radiothérapie <sup>190</sup>. La chimiothérapie la plus couramment utilisée pour des tumeurs cérébrales est le temozolomide <sup>191</sup>. Récemment, une nouvelle thérapie, le bévécizumab, est apparue dans l'arsenal thérapeutique permettant de lutter contre le GBM. Cet anticorps anti-VEGF aurait permis une amélioration de la survie sans progression tumorale du patient mais pas de sa survie globale <sup>191</sup>.

Bien que des progrès considérables pour le traitement des cancers aient été réalisés, l'arsenal thérapeutique pour lutter contre les glioblastomes reste très restreint. La difficulté d'ablation de l'entièreté des cellules cancéreuses, en particulier les cellules souches cancéreuses associées au glioblastome ou gliome (CSG), constitue une réelle limitation aux traitements dans la prise en charge du GBM.<sup>117,192</sup> En effet, les CSG représentent une sous population cellulaire au sein du gliome qui possèdent la capacité d'initier le processus tumoral. Ces cellules se divisent de façon asymétrique (i) en cellules avec un phénotype "cellule souche" aussi appelées « initiatrices de tumeurs » (CSC) (ii) et en cellules différenciées. Elles expriment l'antigène CD133<sup>+</sup> et se caractérisent par leur capacité d'auto-renouvellement et d'initiation d'une croissance tumorale. Les CSC sont considérées comme responsables de la résistance de certains types de cancer vis-à-vis d'une grande variété de molécules thérapeutiques en raison, entre autres, de leur pompe d'efflux et de leur quiescence<sup>89,193</sup>. Dans la littérature, il a été mis en évidence que ces cellules souches de glioblastome (CSG) ne constituent pas des unités autonomes et sont en partie contrôlées par le microenvironnement tumoral. Bien que celui-ci soit remodelé par le biais des CSG, il peut aussi permettre la transmission de signaux d'entretien propices au bon développement des cellules souches<sup>192</sup>. Afin d'optimiser au maximum les chances de guérison de patients atteints de GBM, il devient nécessaire d'éradiquer les cellules souches au sein de la tumeur en parallèle des thérapies conventionnelles. Afin de cibler les CSG, le recours aux anticorps monoclonaux semble constituer une stratégie judicieuse. Pour ce faire, l'identification de nouveaux biomarqueurs à la surface des cellules souches est indispensable.

Dans les pathologies du SNC, la délivrance des molécules thérapeutiques représente un réel défi. En effet, le SNC est isolé de la circulation sanguine par une barrière physiologique, la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE). Elle permet la séparation entre le sang et le parenchyme cérébral. La BHE régule l'homéostasie du SNC en formant une unité neurovasculaire étroitement régulée, qui comprend des cellules endothéliales, des péricytes et des pieds astrocytaires. Les cellules endothéliales du capillaire sanguin qui constituent la principale composante de la BHE sont reliées par des jonctions dites "serrées". Ces dernières permettent la filtration des molécules en fonction de leur taille et de leur hydrophobicité. Cette BHE est également caractérisée par son absence de fenestration et par sa faible présence de vésicules de pinocytose. Seuls quelques transporteurs sont exprimés à la surface de la BHE, permettant l'apport en nutriments pour les cellules cérébrales<sup>194,195</sup>. Dans des conditions pathologiques

avancées telles que les glioblastomes, la BHE voit ses propriétés de barrière sélective altérées (**Figure 20**)<sup>183,196,197</sup> facilitant l'utilisation de biomédicaments comme le bevacizumab<sup>188</sup>.

Il a été démontré que les cellules de gliome se localisent autour des vaisseaux sanguins, au voisinage des pieds astrocytaires (**Figure 20**). Ils enlèvent les astrocytes qui y sont accrochés et dégradent la membrane périvasculaire. Ce phénomène induit la détérioration de la barrière hémato-encéphalique ainsi que de la neuro-vascularisation et aboutit à l'apparition d'une fuite entre les deux compartiments<sup>183,196</sup>.



**Figure 20 : Perturbation de la fonction de la BHE causé par les cellules gliales invasives** (Cuddapah *et al.*, 2014).

Cette perméabilité de la BHE dans des tumeurs du SNC a été extrêmement discutée pendant de nombreuses années. À présent, cette porosité est reconnue au sein de la communauté mais s'est avérée très hétérogène en fonction des patients et du grade tumoral. Il a également été mis en lumière que la BHE était altérée au niveau de certaines zones de la tumeur mais pas de façon homogène sur toute la surface tumorale<sup>197-199</sup>. Dès lors, de nombreuses stratégies innovantes visant à contourner la BHE, même altérée, pour une meilleure administration de molécules et macromolécules thérapeutiques sont en cours d'investigation<sup>200</sup>. Ainsi, l'ingénierie d'anticorps permettant la réduction de leur poids moléculaire ainsi qu'une amélioration de leur hydrophobicité constitue une stratégie prometteuse pour outrepasser les limitations inhérentes

à la BHE <sup>201</sup>. En général, les thérapies sont administrées par voie intraveineuse permettant des injections répétées de façon contrôlée, rapide et précise. Cependant la BHE limite la distribution de ces thérapies dans le cerveau. C'est pourquoi, des médecins privilégient parfois la voie d'administration intrathécale où le produit est administré directement dans le liquide céphalorachidien *via* le canal rachidien <sup>202</sup>. En oncologie, ces injections sont à très haut risque puisqu'elles sont difficiles à contrôler et qu'une erreur est souvent irrécupérable <sup>203</sup>. Étant donné que la résection chirurgicale de la tumeur fait partie du protocole standard pour le traitement du GBM, une administration intra-crâniale *per opérative* des agents thérapeutiques est envisageable, permettant une meilleure distribution au niveau cérébral <sup>204</sup>. Étant une méthode très invasive, l'administration intra-crâniale est réalisée une seule fois. La voie intranasale est également en cours d'exploration pour la délivrance d'agents thérapeutiques au travers de la BHE. Cette voie non invasive et prometteuse pourrait permettre l'injection intracérébrale répétée de médicaments <sup>205</sup>. Enfin, l'utilisation d'ultrasons focalisés pour induire la porosité de la BHE de façon transitoire, permettant une augmentation de la délivrance d'agents thérapeutiques tels que des anticorps, connaît un réel essor dans le domaine de l'oncologie <sup>206</sup>. Cette stratégie, puisqu'elle induit de la neuro-inflammation, pourrait être combinée à l'administration parallèle de lymphocytes et/ou macrophages modifiés génétiquement pour reconnaître et éliminer les cellules cancéreuses aussi appelées CAR-T ou CAR-M <sup>207</sup>.

### *c. L'axe endothéline comme biomarqueur des cellules de GBM et des CSG*

Depuis les années 2000, l'axe endothéline, est connu comme jouant un rôle majeur dans la propagation tumorale <sup>208</sup>. ET<sub>A</sub> est surexprimé par l'endothélium vasculaire à proximité du glioblastome <sup>209,210</sup> et ET<sub>B</sub> est surexprimé à la surface des cellules tumorales <sup>117,211</sup>. Même si ce dogme a été établi dans la littérature, les lignées de GBM sont extrêmement hétérogènes. Il n'est donc pas étonnant de retrouver à la surface des cellules tumorales une surexpression de ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> dépendante du patient <sup>212</sup>. Toutefois, l'exploration des modifications d'expression des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> en fonction du grade tumoral reste à caractériser. L'ET-1 sécrétée par les cellules endothéliales agit en tant que facteur de survie pour les cellules tumorales de glioblastome, mais également dans d'autres sous types de gliome tels que les oligodendrogliomes et les astrocytomes diffus <sup>213,214</sup>.

Plus récemment, de nombreux articles décrivent l'implication de l'axe endothéline dans le glioblastome. Par exemple, en 2018, une étude a démontré que les patients atteints de glioblastome sujets à une augmentation du nombre de récepteurs ET<sub>B</sub> présentaient un mauvais pronostic associé à une plus faible survie <sup>215</sup>. En préclinique l'utilisation de macitentan,

## Introduction générale

antagoniste mixte des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>, en combinaison avec le temozolomide a permis la régression de glioblastome induit dans un modèle murin <sup>155</sup>. Les auteurs ont mis en évidence que les cellules endothéliales protègent les cellules tumorales du temozolomide *via* une voie de signalisation dépendante des Récepteurs des endothélines. Enfin, en 2014, <sup>216</sup> la suractivation du système endothéline (récepteurs et ligands) au niveau de cellules endothéliales, astrocytaires, et tumorales a été identifiée comme permettant leur chimio-protection en induisant une surexpression de gènes anti-apoptotiques (Bcl2) ou impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TWIST). D'autres molécules antagonistes telles que le bosentan, antagoniste mixte des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>, le BQ788 ou l'A192621, antagoniste spécifique d'ET<sub>B</sub>, ont permis l'induction de l'apoptose de cellules de glioblastome en préclinique <sup>208,212</sup>. Enfin, deux études ont proposé l'utilisation du biomarqueur ET<sub>A</sub>, surexprimé au niveau des capillaires tumoraux, comme cible thérapeutique afin de lutter contre le glioblastome <sup>209,217</sup>. L'utilisation du BQ123 a permis d'améliorer la vascularisation tumorale et d'augmenter la délivrance de molécules thérapeutiques au niveau cérébral, telles que des nanoparticules ou encore le paclitaxel <sup>217</sup> et a mis en évidence une amélioration significative de la survie chez le modèle murin.

En 2011, une étude préclinique a identifié que l'axe endothéline médié par l'ET-3 *via* le récepteur des endothélines B permettait la maintenance des CSG et pouvait contrôler leur migration, leur survie ainsi que leur caractère souche. *In vitro*, l'utilisation du BQ788, antagoniste d'ET<sub>B</sub>, induit une invalidation de la formation de sphéroïdes cellulaire tumoraux, typiques des cellules souches. De plus, *in vivo*, cet antagoniste entraîne la perte du potentiel d'initiation de tumeur des CSG lors de leur réimplantation chez l'animal. Ce papier souligne le rôle prépondérant de l'axe endothéline dans le processus de développement de cellules souches tumorales associées au glioblastome <sup>117</sup>.

L'ensemble de ces résultats expose le rôle clé de l'axe endothéline dans le processus tumoral du glioblastome. Il est désormais admis que les Récepteurs des endothélines agissent comme de véritables "drivers" pro-tumoraux. Ainsi, un essai clinique de phase 1 a été conduit sur l'évaluation de la sécurité de l'antagoniste mixte, le macitentan, combiné au temozolomide, la chimiothérapie de référence du GBM, pour le traitement des GBM récurrents. Malgré le fait que l'administration journalière de macitentan à des doses pouvant atteindre 300 mg/jour s'est avérée bien tolérée, l'essai clinique a pris fin prématurément. Bien que l'étude n'ait pas été conçue pour établir l'efficacité du traitement, la publication de données précliniques aurait dû conduire, selon les auteurs, à une efficacité plus importante que celle observée. Cependant,

plusieurs éléments ont été avancés afin d'expliquer l'efficacité diminuée, comparativement aux études précliniques. En effet, le macitentan n'a pas été identifié comme traversant la BHE chez l'homme malgré son fort potentiel lipophile. Ensuite, le faible nombre de patients inclus dans l'étude et le manque de stratification par rapport aux biomarqueurs ET<sub>A</sub> et/ou ET<sub>B</sub> ne permettent pas d'affirmer l'efficacité du traitement (NCT01499251) <sup>218</sup>.

Pour conclure concernant cette partie, les Récepteurs des endothélines représentent des cibles thérapeutiques et/ou diagnostiques incontestables dans le traitement du mélanome métastatique et du glioblastome. Malgré la bonne tolérance des thérapeutiques visant ces Récepteurs des endothélines, telles que les antagonistes des ETR, les essais cliniques n'ont pas pu démontrer d'efficacité clinique significative. Ces résultats peuvent être, entre autres, expliqués par l'absence de stratification des patients inclus au sein des études, mais aussi par l'aspect compétitifs de ces molécules qui dans ce contexte est peu propice à l'élimination des cellules tumorales. Dès lors, il devient impératif de pouvoir (i) stratifier les patients selon leur profil moléculaire des tumeurs (ii) proposer une thérapie adaptée au contexte tumoral et à son microenvironnement en plus des thérapies conventionnelles, autrement dit une médecine personnalisée. Dans ce domaine, l'une des thérapies ciblées qui a déjà fait ses preuves dans l'univers de l'oncologie est le recours aux anticorps monoclonaux (AcM) qui permettent le diagnostic des patients et leur thérapie.

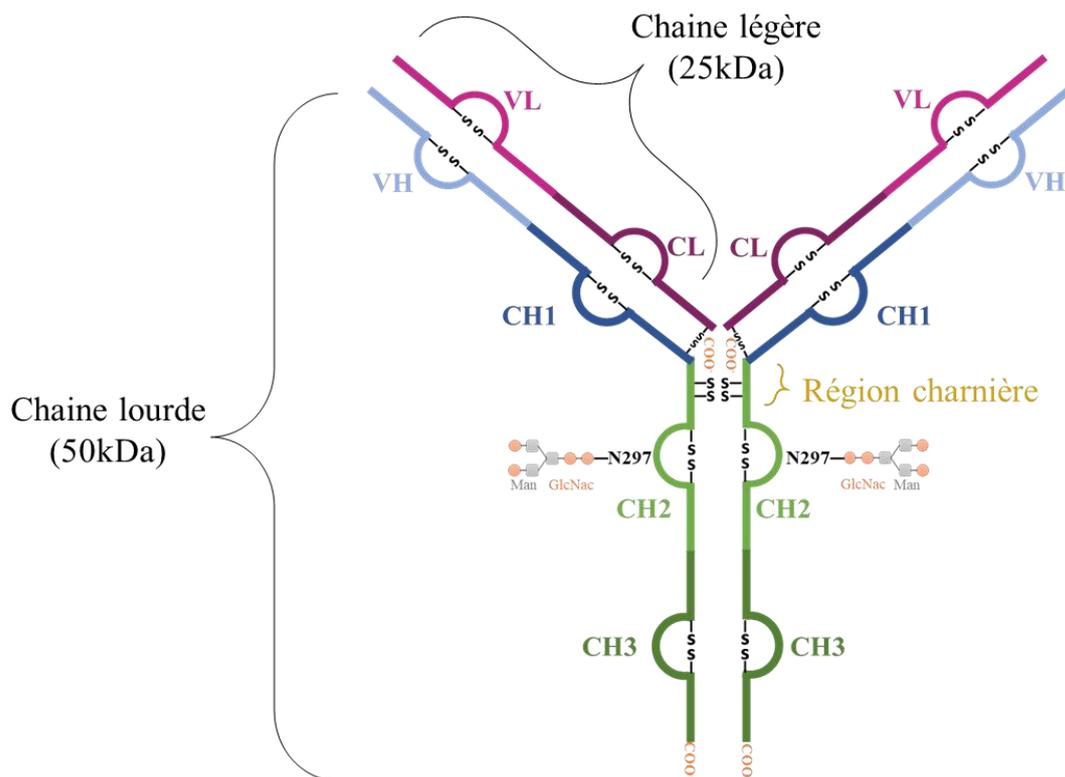
### **III. Les anticorps ciblant les Récepteurs des endothélines, un outil de choix pour le théranostique**

#### *1) Généralités sur les anticorps*

Les anticorps ou immunoglobulines ont plusieurs fonctions, d'une part, ils se lient à un antigène, d'autre part ils jouent un rôle essentiel dans l'activation du système immunitaire contre les molécules ou cellules reconnues comme du « non soi ». Ces protéines bifonctionnelles sont produites par des lymphocytes B, appelés plasmocytes. Est appelé antigène toute molécule reconnue par un anticorps. Il peut se retrouver à la surface de cellules, de virus ou de bactéries. Les immunoglobulines (Ig) peuvent être, soit sécrétées dans le milieu extracellulaire, soit fixées à la membrane par un domaine transmembranaire.

a. *Structure des Immunoglobulines*

Les Ig sont des hétérodimères, constituées de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères structurées et stabilisées par des ponts disulfures provenant des fonctions thiols de cystéines. Classiquement, ces liaisons covalentes se situent soit sur la même chaîne, appelée pont intrachaîne, soit entre les chaînes, appelé pont interchaîne. Une chaîne légère a pour masse molaire totale environ ~25 kDa et est composée de deux régions : une région variable (*Variable Light chain* : VL) et une région constante (*Constant Light chain* : CL). Une chaîne lourde présente un poids moléculaire de ~50 kDa et comporte de quatre à cinq régions comprenant une région variable (*Variable heavy chain* : VH) et trois à quatre régions constantes (*Constant heavy chain* : CH1, CH2, CH3, CH4). (**Figure 21**) Par conséquent, un anticorps complet présente un poids moléculaire d'environ 150 kDa.



**Figure 21 : Représentation schématique de la structure d'une IgG1** inspiré de Shang *et al.*, 2012. VL : région variable de la chaîne légère ; VH : région variable de la chaîne lourde ; CL : région constante de la chaîne légère ; CH : région constante de la chaîne lourde.

## Introduction générale

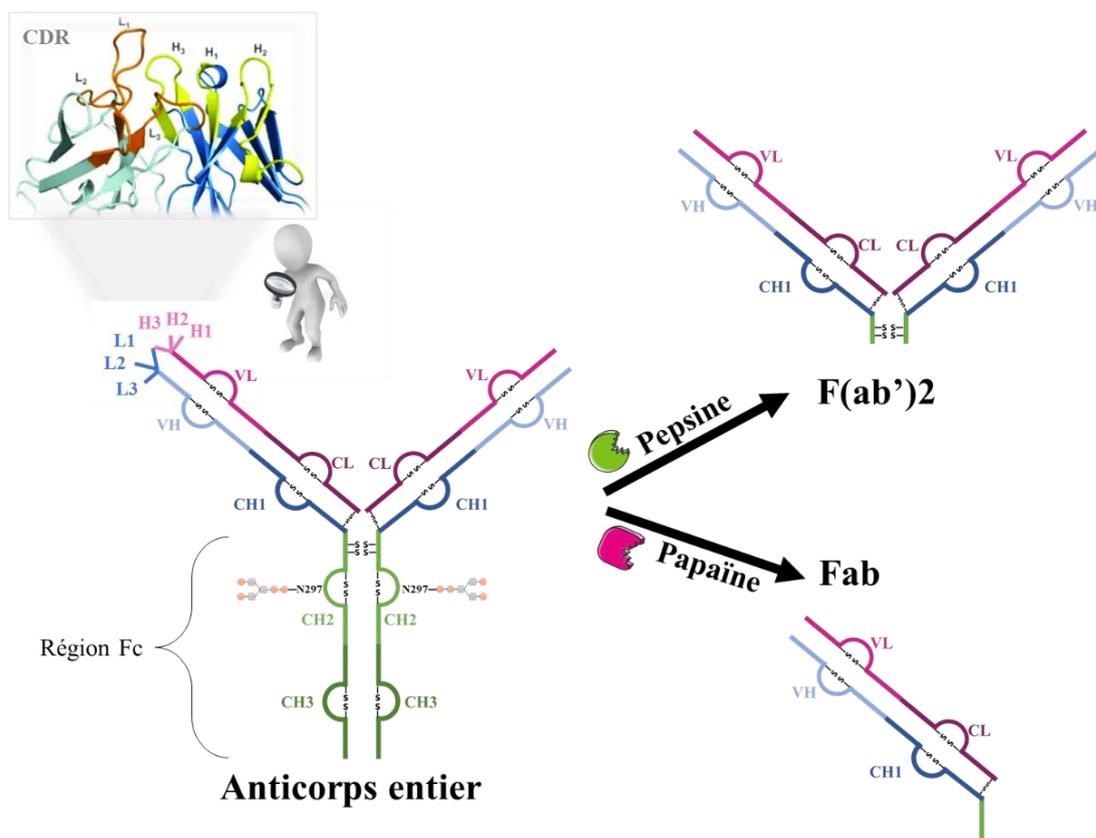
Il existe cinq sous-types de chaînes lourdes ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ) chacun composé de 450 à 600 acides aminés. Concernant les sous-types de chaînes légères, il y en a deux ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ), composé d'une centaine d'acides aminés. Les Ig sont structurées par des boucles polypeptidiques formées grâce à des feuilletts beta et des ponts disulfures intrachaine. Différents domaines sont présents au sein d'une Ig : les domaines constants (IgC) et les domaines variables (IgV). Les régions constantes sont extrêmement conservées au sein d'une espèce et d'un même isotype, à l'inverse des régions variables. En effet, les anticorps sont groupés en différentes classes et sous-classes d'anticorps sur la base d'analogie structurale, c'est ce qu'on appelle des isotypes. Dans la grande famille des Ig humaines, il existe 5 classes d'anticorps : les IgG, IgM, IgA, IgD et IgE. Par exemple, la classe des IgG est composée de 4 sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (**Tableau 6**). En plus des isotypes, il existe des déterminants allotypiques qui correspondent à des variations des gènes codant pour l'Ig d'une même espèce. Les anticorps présentent également des structures conformationnelles et propres à chaque individu au niveau des régions variables appelées idiotypes reconnues par des anticorps anti-idiotypes. L'ensemble des idiotypes est alors appelé idiotope. Ces idiotypes sont impliqués dans les problèmes de réponses chez l'homme, lors d'injections d'anticorps. Cette théorie des réseaux idiotypiques a valu l'obtention du prix Nobel de physiologie ou de médecine à l'immunologiste Niels Kaj Jerne en 1984 <sup>219</sup>.

**Tableau 5 Les différentes classes d'anticorps :** L'IgM correspond à un pentamère très efficace pour l'activation cytotoxique médiée par le complément. L'IgD est principalement retrouvé au niveau des LB matures. L'IgA joue un rôle prépondérant dans la protection des membranes des muqueuses. Cette classe est souvent la première ligne de défense sécrétée lors de l'apparition de toxines. Enfin l'IgE est la seule classe capable de se lier aux mastocytes. Ce type d'Ig peut être la cause de réactions d'hypersensibilités comme l'asthme.

Classe et sous-classes IgG humains	IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE	IgD
<b>Légende Schéma</b>	<b>IgM</b>	<b>IgG1,2,4</b>	<b>Idem IgG1</b>	<b>IgG3</b>	<b>Idem IgG1</b>	<b>IgA</b>	<b>IgE</b>	<b>IgD</b>
Domaine chaîne lourde								
Domaine chaîne légère								
N-glycosylation								
N-glycosylation-mannose								
O-glycosylation								
Chaîne lourde	μ	γ1	γ2	γ3	γ4	α	ε	δ
Nombre domaine chaîne lourde	5	4	4	4	4	4	5	4
Nombre de paratope (format fréquent)	10 (Pentamère)	2	2	2	2	4 (Dimère)	2	2
Poids moléculaire	970 kDa	146 kDa	146 kDa	170 kDa	146 kDa	160 kDa	185 kDa	184 kDa
CDC	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
ADCC Fc	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui

*b. Fonctions des Immunoglobulines*

Les anticorps peuvent être clivés par des enzymes, telles que la papaïne ou la pepsine, qui libèrent alors respectivement deux fragments appelé Fab (*Fragment antigen Binding site*) ou un fragment appelé F(ab')<sub>2</sub>, correspondants aux deux Fab reliés par des ponts disulfures, avec à chaque fois un fragment appelé Fc (Fragment cristallisable) (**Figure 22**)<sup>220</sup>. Ces protéases clivent l'Ig au niveau de sa chaîne lourde dans une région dite charnière (*Hinge*) (**Figure 21**). Cette dernière contient des ponts disulfures et confère à l'immunoglobuline sa grande flexibilité.



**Figure 22 : Structure schématique d'une IgG.** Représentation des fragments d'IgG, F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fc, après digestion de l'anticorps par la pepsine ou la papaïne. En haut de la figure est représenté un zoom des CDR correspondant aux 6 régions hypervariables dans l'espace. H: Chaîne lourde ; L : Chaîne légère.

La région Fab contient le paratope de l'anticorps qui assure la fonction de reconnaissance de l'antigène. La partie antigénique reconnue par l'anticorps est appelé épitope. L'interaction paratope-épitope permet le blocage biologique de l'antigène. Un des anticorps est

## Introduction générale

couramment schématisé sous forme de « Y » du fait de sa bimodalité avec la présence des deux paratopes ainsi que de la région Fc. Les composantes principales du paratope de l'anticorps, classiquement mises en jeu lors de la reconnaissance de l'épitope antigénique, sont les 6 régions hypervariables aussi appelées *Complementary Determining Regions* (CDR) (**Figure 22**). Trois d'entre elles sont retrouvées sur la région VH et les 3 autres sur la région VL. Elles sont composées de 5 à 15 acides aminés et sont encadrées des régions appelées charpentes ou *Framework* (FR).

La reconnaissance paratope-épitope est établie par des liaisons non-covalentes avec l'engagement de 6 à 20 acides aminés. Cette interaction se caractérise par des liaisons faibles de type Van der Waals, des groupements hydrophobes, des liaisons hydrogènes ou électrostatiques<sup>221</sup>. Principales responsables de la reconnaissance des antigènes, les CDR sont très variables, peu conservées et leur séquence en AA, ainsi que leur agencement spatial, est l'origine de la spécificité d'un anticorps.

Outre ses fragments Fab, l'Ig est composée du fragment Fc (**Figure 22**), qui permet également l'élimination de l'entité portant l'antigène au travers de différents mécanismes. En effet, la région Fc permet d'interagir avec des cellules de l'immunité innée, telles que des macrophages *via* leur *Récepteur aux Fragments constant gamma* (RFc $\gamma$ ) par un mécanisme nommé : fonction effectrice cytotoxique ou encore *Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity* (ADCC)<sup>222</sup>. L'engagement de ces récepteurs active des voies de signalisation permettant la destruction de l'antigène étranger, grâce à des domaines transmembranaires activateur *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) ou inhibiteur *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM). Par exemple, les macrophages interagissent *via* leur récepteur RFc $\gamma$  avec l'anticorps lui-même, fixé sur l'antigène. Cette interaction RFc $\gamma$ -Fc provoque une cascade de signalisations activatrices par leurs domaines transmembranaires ITAM, qui enclenchent la phagocytose du complexe anticorps-antigène exogène. La phagocytose n'est pas la seule cytotoxicité existante médiée par la région Fc. En effet, une fois fixée, la région Fc recrute les lymphocytes NK qui, en retour, stimulent la libération de molécules cytotoxiques à partir de leur granule. Enfin, la région Fc d'un anticorps module la cytotoxicité dépendante du complément ou *Complement Dependent Cytotoxicity* (CDC)<sup>223</sup>. La CDC permet, *via* la protéine C1q du complément, la formation du complexe d'attaque membranaire induisant la lyse cellulaire. Ce type de mécanisme est en particulier médié par les anticorps de type IgG.

### *c. Les Immunoglobulines de type G (IgG) et leur modification post traductionnelles*

Les IgG sont les Ig majoritaires du sérum et constituent entre 70 à 80 % des anticorps présents dans le sang d'un individu. Au cours de la réponse immunitaire secondaire, c'est cette classe d'anticorps qui est mobilisée contre la plupart des antigènes. La diversité structurale des 4 sous-classes d'IgG (IgG1, 2, 3, 4) réside dans le nombre et la localisation des ponts disulfures (**Tableau 5**)<sup>224</sup>. A l'exception de l'IgG4, les IgG1, 2 et 3 permettent la fixation de la protéine du complément C1q permettant l'activation de sa voie de signalisation et la lyse des cellules étrangères<sup>225</sup>. Les IgG en se fixant sur plusieurs motifs antigéniques favorisent l'ADCC *via* des macrophages ou des cellules NK, un processus appelé opsonisation. Les IgG sont les plus prometteuses pour la formulation de nouvelles thérapies ciblées pour la vectorisation de molécules cytotoxique.

Les IgG portent des modifications post traductionnelles telles que des glycosylations au niveau du fragment Fc. Ces glycosylations jouent un rôle important sur les propriétés pro ou anti-inflammatoires ou le recrutement de molécules du complément, médiées par les Ig<sup>226</sup>. En effet, la N-glycosylation permet l'interaction entre les IgG et le RF $\gamma$ c<sup>227</sup>. Par ailleurs, il a été montré que l'ingénierie des fragments Fc, au niveau des sites de glycosylation, peut améliorer la modulation des fonctions effectrices d'anticorps thérapeutiques contre le cancer<sup>228,229</sup>. Le nombre et la localisation des glycosylations sur les IgG sont dépendants des classes isotypiques. Dans le cas de la sous-classe IgG1, 2 et 4, il existe deux sites de N-glycosylations sur les domaines CH2 (**Tableau 5**). Ces IgG se voient ajouter un bloc composé de N-acétylglucosamine suivi de mannose au niveau de l'asparagine 297 (N297). Des ajouts successifs de motifs tels que du galactose ou du fucose peuvent être retrouvés sur ce bloc, résultant d'une multitude de combinaisons possibles. Concernant les IgG3, elles contiennent la même N-glycosylation en position N297 mais en comptent une autre en position N392. De plus, l'IgG3 étant riche en site sérines et thréonines au niveau de sa région charnière, elles sont le lieu de O-glycosylation. Cette modification est généralement constituée d'une N-acétylgalactosamine suivie d'un groupement galactose ou de N-acétylglucosamine.

### *d. Mesure des interactions antigènes membranaires et anticorps*

L'intérêt de l'utilisation des anticorps réside dans la très haute avidité et spécificité pour leur antigène. L'affinité peut être représentée par la constante d'équilibre qui décrit l'interaction antigène-anticorps. L'avidité dépend de la valence de l'anticorps en termes d'unité fonctionnelle reconnaissant l'antigène. Dans le cas d'un antigène membranaire, il n'est pas

toujours possible de mesurer son affinité par des mesures de vitesse d'association ( $k_{on}$ ) et de dissociation ( $k_{off}$ ) nécessitant la présentation d'un épitope linéaire sur un support solide. La cytométrie en flux devient une alternative pour évaluer l'avidité de différents formats d'anticorps<sup>230</sup>. Quant à la spécificité, elle peut être mise en évidence, *in vitro*, par l'utilisation de différentes lignées cellulaires en montrant la fixation spécifique de l'anticorps seulement sur des cellules exprimant sa cible dans le cas d'une protéine membranaire.

Depuis leur découverte, les AcM n'ont eu de cesse d'être utilisés à des fins diagnostiques puis thérapeutiques. Le premier AcM thérapeutique, appelé Muromonab, a été approuvé par la FDA en 1986 pour limiter l'inflammation lors de rejets de transplantations d'organe<sup>231</sup>. De nombreux travaux ont porté sur les modifications de ces biomolécules à visée thérapeutiques constituant l'ingénierie des anticorps.

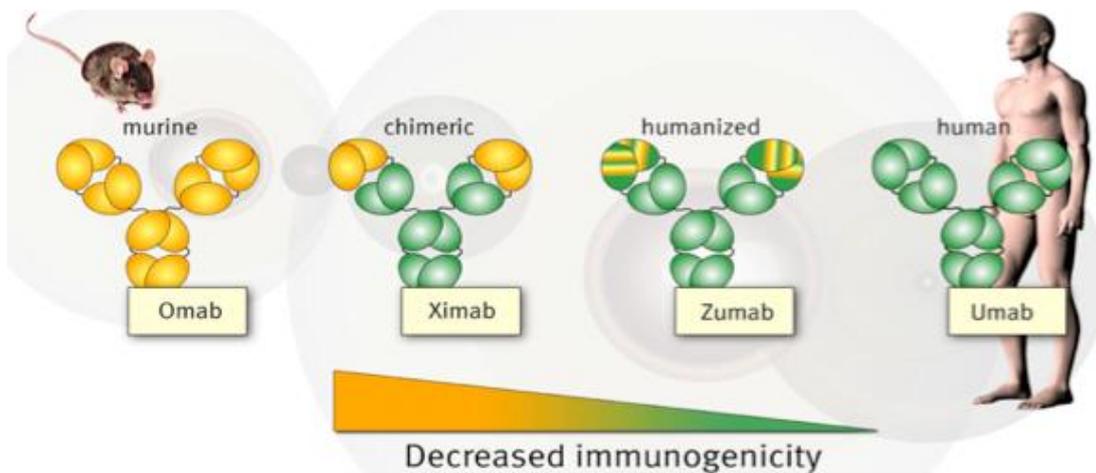
### 2) Ingénierie des anticorps et leur caractéristique pharmacologique

La révolution des hybridomes a permis le succès et l'introduction de nouveaux anticorps thérapeutiques pour les patients atteints de diverses pathologies et en particulier de cancer. Leur haute affinité et leur haute spécificité ont déclenché un fort enthousiasme dans le monde de la recherche pour leur utilisation dans des applications thérapeutiques et/ou diagnostiques. Les premiers résultats cliniques ont rapidement soulevé la problématique de l'immunogénicité des anticorps murins. Par définition, une molécule est dite immunogène lorsqu'elle induit une réaction du système immunitaire. L'ingénierie des anticorps a permis l'obtention d'anticorps dits chimériques (**Figure 23**) dans lesquels, les régions constantes murines ont été remplacées par des régions constantes humaines<sup>232</sup>. L'anticorps est alors à 75% humain. En 1994, l'abciximab (Réopro™) devient le premier anticorps chimérique mis sur le marché. Actuellement, sur les 150 anticorps approuvés par la FDA, 9% sont des anticorps chimériques et d'autres continuent d'être acceptés avec la mise sur le marché de 3 nouveaux anticorps thérapeutiques en 2020 (<https://www.antibodysociety.org>)<sup>233-235</sup>. De nombreuses études présentent la sécurité des anticorps chimériques avec une faible immunogénicité lors des essais cliniques<sup>236</sup>. Parfois, leur utilisation en clinique induit une immunogénicité de type *Human Anti-Chimeric Antibodies* (HACA), responsable d'effets indésirables fréquents chez les patients<sup>237</sup>. Ainsi il est apparu en 1986 des anticorps dits « humanisés » composés de 90% de séquences humaines<sup>238</sup>. Les CDR murins sont greffés sur des régions variables humaines. Dès lors, l'enjeu est de conserver l'affinité, la haute spécificité, la stabilité de l'anticorps murin initial, ce qui n'est pas toujours possible lors de ce processus d'humanisation. Les anticorps humanisés

## Introduction générale

représentent une grande part du marché des AcM thérapeutiques partagés avec des anticorps humains.

Ces anticorps humains seraient, en termes d'immunogénicité, des candidats idéaux pour le diagnostic ou la thérapie de patients atteints de cancer (**Figure 23**). Ils peuvent être obtenus par (i) la technique du phage display, (ii) *via* des souris transgéniques ou (iii) directement à partir de LB mémoires issus de patients. En oncologie, l'obtention de ces AcM humains par cette dernière approche reste complexe. En effet, il existe des mécanismes de tolérance qui éliminent une partie des clones LB auto-réactifs qui auraient pu avoir des propriétés intéressantes<sup>239</sup>. Ainsi, le répertoire des LB contre des épitopes tumoraux est restreint à certains clones.



**Figure 23 : de l'anticorps murins vers un anticorps humanisé** (Source : Thèse Bertrand Allard, 2012, Université Paris-Sud). Les anticorps murins, trop immunogène, ont été transformés au fur et à mesure en anticorps « plus humains » et de moins en moins reconnus par le système immunitaire. Les anticorps ont une nomenclature spécifique : (i) les anticorps monoclonaux ont une dénomination qui se termine par mab pour *Monoclonal AntiBodies* et (ii) un suffixe permet l'identification de leur type -o (murin), -xi (chimérique), -zu (humanisé), -U (humain).

Cependant des anticorps humanisés ou humains peuvent présenter des risques d'immunogénicité non négligeables. Du fait de leur variabilité, les régions CDR peuvent porter des épitopes T, des stratégies de de-immunisation consistant à éliminer ces épitopes existent, l'enjeu étant de conserver l'activité biologique des anticorps<sup>240</sup>. Cependant, l'induction d'une réponse ADA (Anti-Drug Antibody) chez un patient traité par un biomédicament reste une

donnée difficilement prédictible car multifactorielle dû à la fois à la nature de l'anticorps, sa cible, la durée du traitement, l'état du patient entre autres <sup>241</sup>.

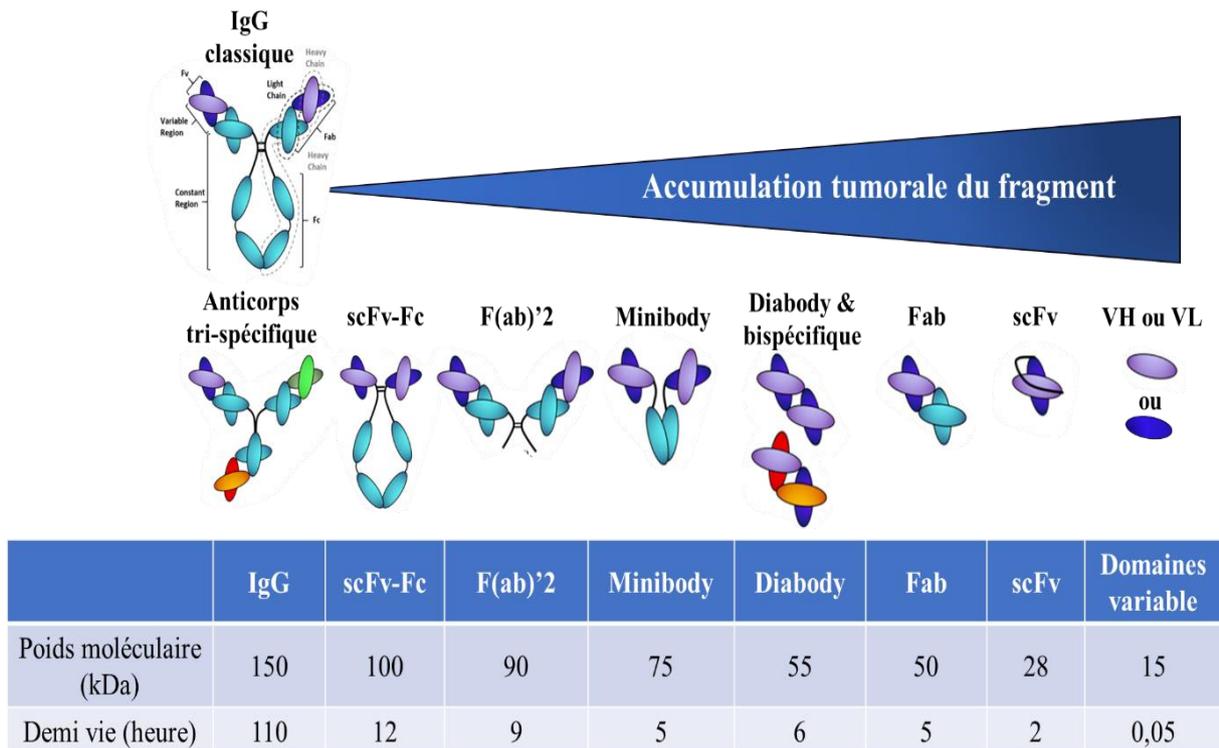
### *a. Optimisation des AcM pour une efficacité thérapeutique accrue*

Le défi majeur que représentait l'immunogénicité a permis des progrès considérables quant aux techniques de biologie moléculaire et cellulaire appliquées à l'immunologie. La séquence de l'anticorps connue, la production d'anticorps recombinant devient possible. Parmi les systèmes de production d'AcM, on compte des bactéries, des levures, des cellules *Chinese Hamster Ovary* (CHO), des cellules humaines *Human Embryonic Kidney* (HEK). Ainsi, la possibilité d'optimiser les propriétés d'affinité, de spécificité, de fonction, de pharmacocinétique, de biodistribution et de toxicologie des AcM est devenue possible. <sup>242,243</sup>. L'amélioration de la liaison de l'AcM à son antigène a déjà été exemplifiée dans le cadre de l'immunogénicité des AcM précédemment décrite.

Les anticorps sont optimisés de façon rationnelle pour s'adapter au mieux au contexte pathologique et à ses contraintes. Dans ce manuscrit, l'ingénierie des anticorps aura pour principaux objectifs : (i) l'amélioration de leur passage au travers la BHE, (ii) leur optimisation pour une distribution tissulaire et une pharmacocinétique adaptée, et (iii) la mutagenèse du site de glycosylation de la chaîne lourde pour une stratégie de conjugaison ciblée optimale de molécules cytotoxiques et/ou diagnostiques, en vue d'applications thérapeutiques contre le mélanome métastatique ou le GBM.

### *b. Modification des propriétés pharmacocinétiques et biodistribution :*

Ces vingt dernières années, divers fragments d'AcM ont été générés pour de nombreuses applications (**Figure 23**). Il existe quelques grandes règles à respecter concernant leur ingénierie. Tout d'abord, il est primordial de **ne pas altérer leur haute affinité et leur forte spécificité**. Cependant, leur bivalence peut, quant à elle, être modifiée en générant des fragments d'anticorps monovalents (Fab, scFv, nanobody...) pour mieux pénétrer des tissus plus difficiles à atteindre pour un Ac. En effet, seuls 20% de la dose administrée d'un AcM thérapeutique atteignent les antigènes de surface des tumeurs solides <sup>244</sup>. Des petits fragments bivalents, conservant l'avidité de l'Ac, ont également été décrits dans la littérature comme, les diabody, les minibody, F(ab)'2 (**Figure 24**). L'utilisation ces fragments constitue un champ de recherche important pour contourner des barrières biologiques telles que la BHE limitant le passage des biomédicaments<sup>201</sup>.

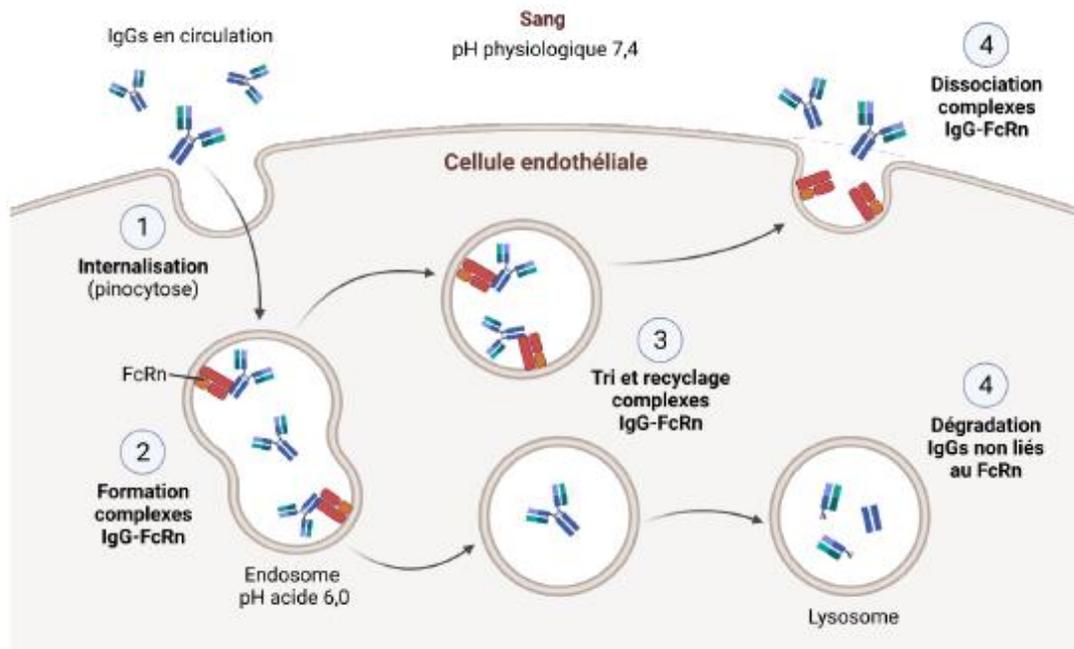


**Figure 24 : Représentation schématique de différents formats d'anticorps et leur demi vie associée** inspiré de Duranti *et al.*, 2019. Fab: Fragment Antigen Binding, scFv: Single-chaî variable fragment, Fc: fragment cristallisable.

Chez l'homme, les IgG ont une longue demi-vie plasmatique de l'ordre de 21 jours<sup>243</sup>. Leur poids moléculaire (~150 kDa) empêche leur élimination par la filtration rénale. De plus, leur région Fc les protège du catabolisme cellulaire grâce à leur recyclage au niveau des cellules endothéliales *via* le récepteur Fc néonatal (FcRn) (**Figure 25**). Ces propriétés pharmacocinétiques jouent un rôle déterminant dans la voie d'administration et la posologie donnée au patient. En effet, une administration élevée d'AcM peut raccourcir la demi-vie plasmatique de l'anticorps en saturant les FcRn et limitant leur recyclage (**Figure 25**). Une partie des anticorps internalisés dans la cellule sera dégradée dans le lysosome. Ainsi, l'emploi d'AcM n'est pas toujours adapté pour certaines d'applications médicales. C'est pourquoi l'imagerie moléculaire effectuée par Tomographie à Emission de Positons utilise des radioéléments qui ont des demi-vies plus ou moins longues et pour lesquels le format d'anticorps est à adapter. La longue persistance de l'IgG dans le sang et sa lente diffusion tissulaire implique qu'il faut plusieurs jours à cette biomolécule pour atteindre une accumulation maximale dans la tumeur avec une élimination suffisante pour diminuer le bruit

## Introduction générale

de fond des autres organes. Ainsi, plusieurs équipes ont opté pour l'optimisation et la génération de fragments d'anticorps permettant de générer un meilleur contraste tumeur/bruit de fond en quelques heures plus approprié à l'imagerie TEP<sup>245,246</sup>. Ce point sera principalement abordé dans la prochaine partie de ce manuscrit.



**Figure 25 : Recyclage cellulaire des IgG orchestré par l'interaction FcRn et région Fc des anticorps** (source : thèse Alizée Bouleau, 2021, Université Paris-Saclay). Les anticorps circulants sont pris en charge par des cellules endothéliales et internalisés par des mécanismes d'endocytose tel que la pinocytose. Une fois dans l'endosome, l'anticorps se fixe au FcRn par sa région Fc. Ainsi, ils sont relargués à la surface et se libèrent du FcRn grâce au pH physiologique sanguin. Lorsque les FcRn sont saturés, les IgG sont pris en charge et dégradé par le lysosome.

Le passage d'anticorps thérapeutique dans le SNC est très faible et plusieurs travaux montrent l'efflux d'AcM du parenchyme cérébral vers le compartiment périphérique sanguin médié par le FcRn des cellules endothéliales constituant la Barrière Hémato-Encéphalique<sup>247</sup>. Afin d'éviter cet écueil, il convient de supprimer cette interaction FcRn-Fc. Une des options possibles est l'utilisation de fragments d'anticorps dépourvus de région Fc.

La demi-vie d'un anticorps est étroitement liée à ses voies d'élimination qui jouent un rôle dans la toxicologie de l'anticorps. Une molécule inférieure à 60 kDa sera rapidement éliminée par les reins alors qu'une molécule dont le poids moléculaire est supérieur à ce seuil se verra

## Introduction générale

excrétée par la voie hépatobiliaire. Les anticorps suivent cette seconde voie d'élimination, cas favorable pour des thérapies nécessitant un temps de circulation sanguine important pour la bonne pénétration de l'anticorps dans la tumeur. Cependant, cette voie d'élimination biliaire peut s'avérer néfaste lorsque l'anticorps est conjugué à une molécule cytotoxique puisque le foie est un organe dit « fenestré », qui augmente le temps de rétention de l'IgG-cytotoxique. Ainsi, il est parfois plus approprié de réduire le poids moléculaire de l'anticorps, pour une excrétion rénale afin de diminuer sa demi-vie dans la circulation sanguine. Ces formats d'anticorps sont à concevoir en fonction de l'application médicale. En effet, il peut arriver que les petits fragments d'anticorps n'aient pas le temps de diffuser correctement dans la tumeur, diminuant ainsi l'effet pharmacologique attendu<sup>248</sup>. Une augmentation de leur demi-vie permet l'amélioration de l'efficacité thérapeutique, la diminution des doses administrées ou de leurs fréquences<sup>249</sup>. La balance bénéfice/risque est à adapter selon la toxicité du traitement mais aussi en fonction du service rendu au patient. Autrement dit, certaines chimiothérapies extrêmement toxiques procurent une augmentation significative de la survie. Le bénéfice pour le patient étant supérieur aux effets secondaires, le traitement bénéficie d'une autorisation de mise sur le marché.

### *c. Anticorps multi spécificités*

Outre la meilleure pénétration ou la bonne distribution des anticorps, il peut être intéressant d'utiliser l'ingénierie des anticorps pour concevoir des anticorps bi- ou tri-spécifiques. Un anticorps bi- ou tri-spécifique est un anticorps avec plus de deux sites de liaison, dirigés contre deux épitopes différents. En oncologie, les effets thérapeutiques des anticorps bi ou tri-spécifique auraient eu un effet thérapeutique synergique avec une amélioration de l'efficacité thérapeutique<sup>250</sup>. Au-delà de l'association de fonctions cytotoxiques et dans le cas de passage de la BHE, un double format associant deux Fab recombinants a été imaginé pour augmenter la translocation au travers le passage de la BHE, tout en gardant un épitope anti-cellules-tumorales<sup>251</sup>. Actuellement, 7 anticorps bi-spécifiques ont été approuvés par la FDA pour de nombreuses applications (<https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>). L'unité fonctionnelle de base de ces anticorps à minima bi-spécifiques sont soit des fragments variables à chaîne unique (scFv) soit une structure complète d'anticorps. Les enjeux pour ces structures artificielles sont leur production en grande quantité, leur qualité et leur stabilité<sup>252</sup>. Dans ce manuscrit, nous ne discuterons pas de ces approches. Cependant, il pourrait être intéressant de coupler des anticorps anti-endothéline avec des anticorps permettant le

recrutement du système immunitaire, ou avec un épitope permettant un meilleur franchissement de la BHE.

### *d. Ingénierie des anticorps, ingénierie cellulaire : CAR-T, CAR-M*

Une récente approche thérapeutique nommée CAR-T cell connaît un réel essor dans le monde de l'oncologie. Elle consiste en l'expression de récepteurs antigéniques chimériques (*chimeric antigenic receptor* CAR), principalement issus de scFv d'AcM, à la surface de lymphocyte T. Ainsi, ces cellules du système immunitaire, guidées par un fragment d'anticorps peuvent directement actionner leur fonction cytotoxique au niveau de la tumeur. La dénomination CAR-T est utilisée lorsqu'il s'agit de lymphocytes et les CAR-M lorsque l'on parle de macrophages<sup>253,254</sup>. Cette dernière approche est à l'étude dans notre laboratoire.

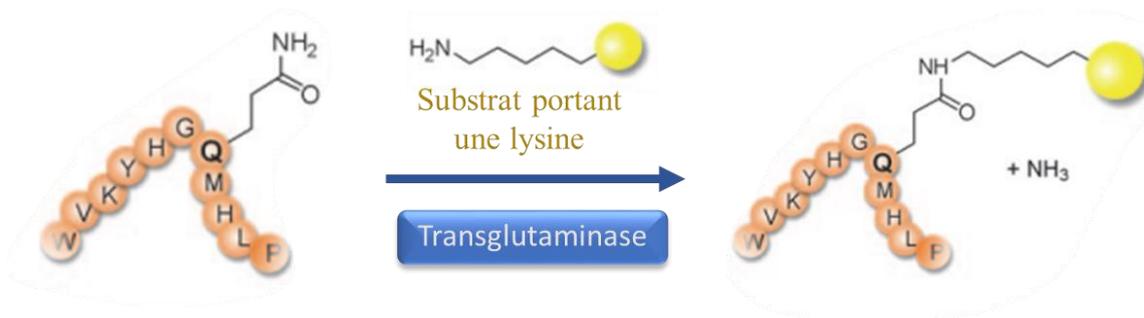
### *e. Stratégies de conjugaison des anticorps*

L'utilisation d'anticorps porteur de molécule cytotoxique comme une nouvelle approche thérapeutique antitumorale a été inspirée par le concept de « magic bullets » postulé dès le début du 20<sup>ème</sup> siècle par Paul Erlich<sup>181,255</sup>. Générer un anticorps armé (*Antibody-Drug Conjugate*, ADC) nécessite de nombreuses compétences dans des domaines scientifiques variés alliant la biologie cellulaire avec la biologie moléculaire et la connaissance du niveau d'expression de l'antigène membranaire reconnu par l'anticorps. Il est tout aussi important de connaître les processus d'internalisation du complexe antigène-ADC permettant de délivrer la cytotoxine à l'intérieur de la cellule. Parfois, les cellules tumorales peuvent exprimer des isoformes de l'antigène cible différentes de l'isoforme dite de « référence » exprimée majoritairement en conditions physiologiques. Par ailleurs, les cellules tumorales peuvent développer des mécanismes de résistance limitant la concentration de la cytotoxine dans le cytoplasme. Dès lors, des compétences principalement en biochimie, ingénierie des anticorps et chimie viennent compléter les connaissances nécessaires à la mise en œuvre des ADC. Après un démarrage difficile dans les années 2000 avec le gemtuzumab ozogamicine (Mylotarg<sup>®</sup>), 13 ADC seront approuvés en 2023 par les autorités de santé européenne (European Medicines Agency) et/ou américaine (Food and Drug Administration) (<https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>). Concernant les approches de conjugaison du complexe chimique portant la cytotoxine, des progrès considérables ont été faits permettant de passer par une approche non ciblée sur l'anticorps générant une hétérogénéité et un manque de reproductibilité à des approches ciblées. La stratégie la plus couramment utilisée pour conjuguer un agent cytotoxique, et par extension à un agent de

## Introduction générale

contraste pour l'imagerie, sur un anticorps repose sur une conjugaison d'un chélateur ou d'un linker principalement sur des lysines. Cependant, cette approche génère une population d'anticorps hétérogènes contenant à la fois des anticorps nus, compétiteurs des conjugués, et des anticorps conjugués à différents degrés (*Drug Antibody Ratio DAR* ou *Degree Of Labeling DOL*) sur les lysines. Ces dernières sont réparties sur l'ensemble de l'Ig, en cas de conjugaison sur les régions variables, la fonctionnalité de l'anticorps peut être altérée. De plus, un DOL très élevé, peut modifier drastiquement la pharmacocinétique *in vivo* de l'anticorps qui compte en moyenne 40 lysines <sup>256</sup>.

Différentes approches ont été décrites pour parer à ces immunoconjugués hétérogènes <sup>181,257</sup>. L'introduction d'agent chélatant ou de linker, permettant la bio-conjugaison avec une stoechiométrie équivalente, peut être obtenue grâce à la transglutaminase (TG, E.C. 2.3.2.13). Ayant développée cette stratégie de conjugaison pendant ma thèse, je me focaliserai sur cette dernière. Cette enzyme catalyse la réaction entre des résidus de lysine, présentant des groupes amines libres avec des résidus de glutamine qui ont un groupe gamma-carboxamide, aboutissant à la formation d'une liaison covalente cataboliquement stable (**Figure 26**) <sup>258</sup>. Plusieurs études ont utilisé la transglutaminase pour préparer des immunoconjugués au niveau des sites de glycosylation accolés à une glutamine (Q295) <sup>259,260</sup>.

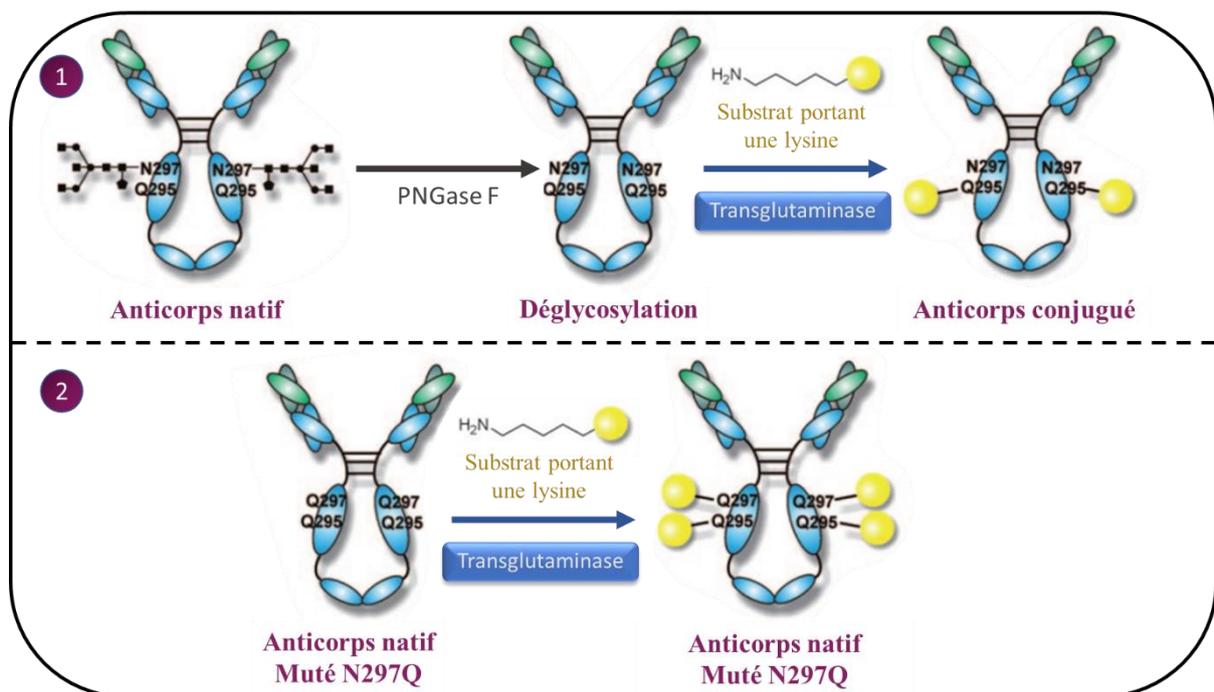


**Figure 26 : Réaction de la transglutaminase avec un substrat contenant une lysine pour l'immunoconjugaison d'un peptide** (inspiré de Jeger *et al.*, 2010).

Pour qu'une glutamine puisse être le lieu de ce type d'interaction, elle doit être située dans une région flexible et être accolée à certains acides aminés. La déglycosylation des anticorps a permis une plus grande flexibilité et une meilleure disponibilité dans l'espace de la glutamine 295, permettant alors une augmentation de bio conjugaison <sup>259</sup>. L'hypothèse d'une amélioration de l'indice thérapeutique, à mesure que le nombre d'entités cytotoxiques ou diagnostiques

conjuguées à l'anticorps augmente, est assez intuitif. Pourtant une étude a démontré chez la souris qu'un rapport molaire cytoxique/anticorps de 4 : 1 donnait un rapport optimal entre cytotoxicité et efficacité <sup>261</sup>. Dans ce contexte, des mutagénèses dirigées ont été effectuées pour rajouter une glutamine proche du premier site spécifique de conjugaison. Puisque la glycosylation a été présentée comme problématique pour ce type de conjugaison en site spécifique, la mutagénèse dirigée N297Q (**Figure 27**) a permis d'une part, l'ajout d'une glutamine et d'autre part la déglycosylation de l'AcM. Ainsi, l'obtention d'immunoconjugué homogène avec un meilleur DOL ou DAR de 4 biomolécules conjuguées a été rendu possible.

259.

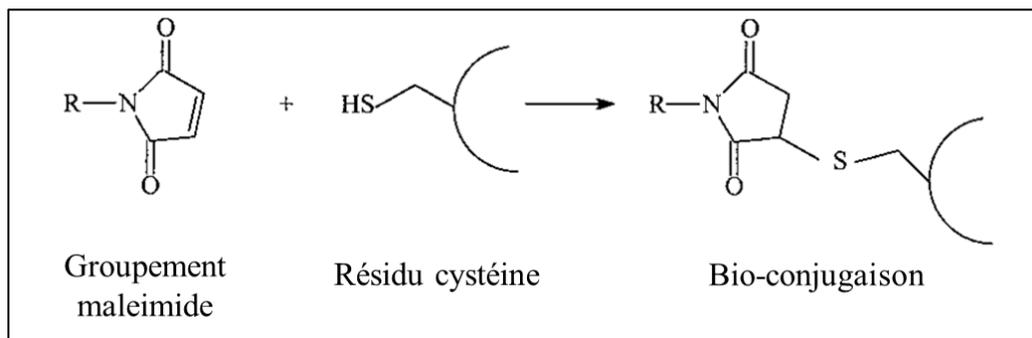


**Figure 27 : conjugaison site spécifique des anticorps par la transglutaminase** (inspiré de Jeger et al., 2010). (1) Déglycosylation des anticorps et conjugaison par la transglutaminase (2) Mutagénèse dirigée N297Q pour une cio-conjugaison DOL de 4 biomolécules par anticorps .

Les conjugaisons site-spécifiques des IgG se sont avérées être avantageuses par rapport aux approches non ciblées. De nos jours, la difficulté majeure persiste dans la conjugaison de molécules sur des petits fragments d'anticorps (Fab, scFv, nanobody...). La probabilité d'altérer leur fonctionnalité par modification des régions variables ou par encombrement stérique devenant très élevée.

## Introduction générale

Dans ce contexte, l'introduction ciblée d'agent chélatant ou de linker permettant la bio-conjugaison avec une stœchiométrie équivalente, peut être obtenue grâce à l'ajout d'une cystéine sur les fragments d'anticorps. Les cystéines, porteuses de fonction thiols, forment des ponts disulfures indispensables à la structure de l'anticorps. Elles peuvent également être couplés avec une grande sélectivité, grâce à des fonctions réactives au thiol comme le groupement maleimide très utilisé (**Figure 28**)<sup>262</sup>.



**Figure 28 : réaction chimique groupement thiol-maleimide** (Van Geest *et al.*, 2000).

Les cystéines, par la constitution de ponts disulfures, jouent un rôle essentiel dans la conformation et la stabilité des protéines. L'ajout de groupement chimique *via* cette fonction peut déstabiliser, limiter voire inhiber la fonctionnalité de l'anticorps. Une stratégie pour contourner cet écueil a été d'ajouter par mutagenèse dirigée de nouvelles cystéines et donc des fonctions thiols libres disponibles à une conjugaison ciblée. Néanmoins, ces thiols libres peuvent également générer des ponts disulfures artéfactuelles avec les cystéines « naturelles » nécessaires à la bonne structuration de l'anticorps mais également former des ponts disulfures avec d'autres protéines créant ainsi des oligomères de protéines<sup>263</sup>. Les chercheurs de la société Genentech ont exploré les conséquences et l'accessibilité d'une cystéine additionnelle à différentes positions d'un fragment Fab. Une position du domaine CH1 de la chaîne lourde, a été identifiée pour l'ajout d'une cystéine sans conséquence mesurable pour la fonctionnalité du fragment Fab<sup>262</sup>. Néanmoins, cette approche n'est pas applicable pour des fragments d'anticorps plus petits sans régions constantes comme les scFv, les diabody ou les nanobodys. Durant ma thèse, j'ai identifié une position dans la région variable des chaînes lourdes permettant l'introduction d'une cystéine additionnelle que nous avons conjuguée avec des groupements chimiques sans conséquence pour la fonctionnalité du Fab. Ces travaux sont décrits dans ce manuscrit.

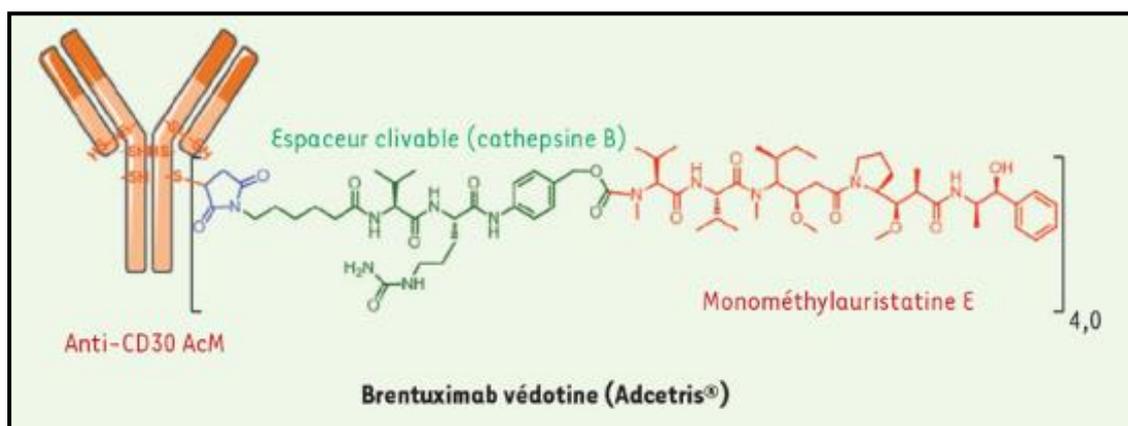
Les stratégies de conjugaison « site spécifique » sont très reproductibles. Elles permettent la maîtrise du nombre de molécules ajoutées tout en minimisant une altération de la fonctionnalité de l'anticorps et en favorisant la conservation de leur paramètre pharmacocinétique.

En conclusion de ce chapitre, les anticorps se sont vus réimaginés et modifiés au cours de plusieurs décennies de recherche, afin d'optimiser leur efficacité thérapeutique. De nombreux travaux de recherche ont porté sur leur structure, leur fonctionnalité pour cibler l'antigène mais également pour élucider leurs mécanismes d'activation du système immunitaire. Ils ont permis de positionner les anticorps comme des molécules thérapeutiques majeures pour lutter contre de nombreuses pathologies.

### 3) La bioconjugaison des anticorps un enjeu majeur pour la médecine ciblée : de l'approche thérapeutique à la stratification des patients par l'imagerie in vivo

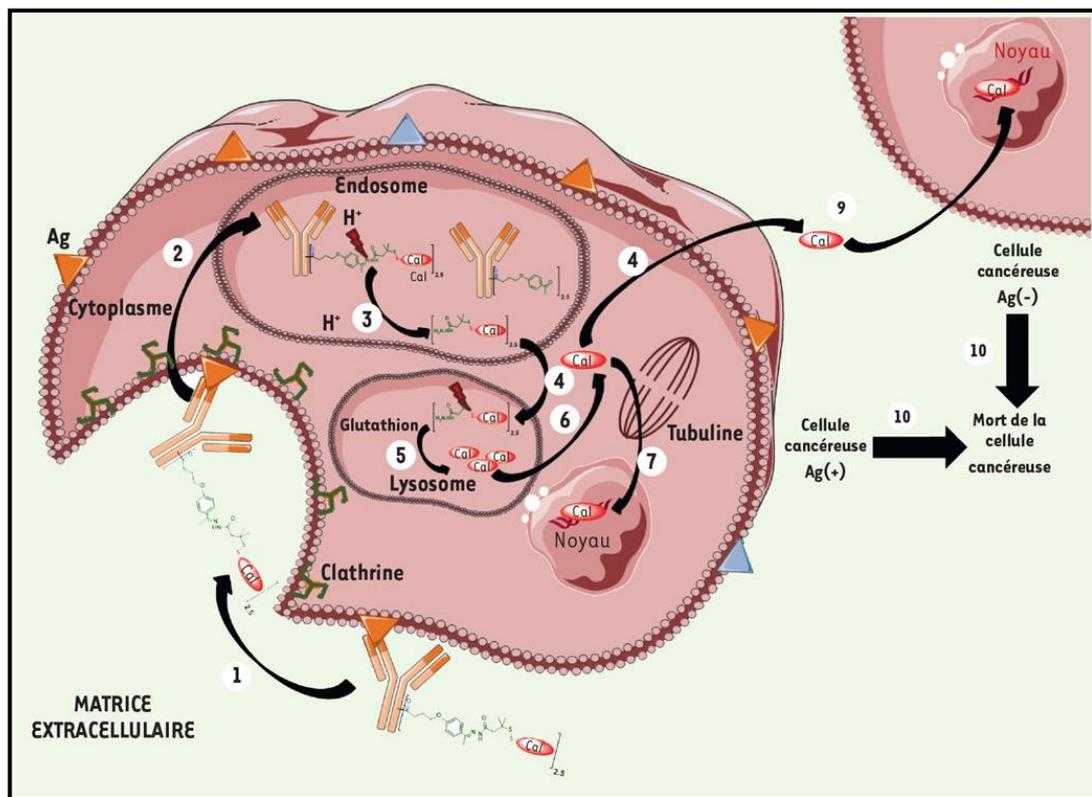
#### a. L'essor des ADC

Ces vingt dernières années, l'immunothérapie a fait des progrès considérables et l'émergence des ADC se concrétise avec la multiplication des essais cliniques évaluant les ADC et l'augmentation de leur autorisation de mise sur le marché (AMM). La très haute affinité et spécificité d'un anticorps permet de délivrer dans des cellules tumorales des molécules extrêmement toxiques qui ne peuvent pas être utilisées seules. Un ADC résulte de la conjugaison d'un agent cytotoxique fixé sur un AcM par l'intermédiaire d'un bras espaceur aussi appelé linker. (**Figure 29**).



**Figure 29 : Représentation schématique d'un anticorps conjugué à une drogue (ADC)** (selon Beck *et al.*, 2019). Exemple du brentuximab védotine (Adcetris®), l'un des ADC approuvée par la FDA. L'anticorps est conjugué à un bras espaceur ou linker clivable par des protéases nommées cathepsines B, elle-même, lié à une molécule cytotoxique anti-tubuline MMAE.

Dans la première génération des ADC, la drogue toxique est inactive lorsqu'elle est liée à l'anticorps. Cependant, après reconnaissance de sa cible, l'anticorps se voit internalisé dans la cellule au travers des complexes membranaires, appelés endosomes, puis orienter dans la voie de dégradation des protéines dans une structure sub-cellulaire appelée lysosome dont le pH est acide [pH 5- pH 6,5]. La cathepsine B en milieu acide va dégrader le bras clivable et libérer le MMAE qui en se transloquant dans le cytoplasme bloquera la polymérisation de la tubuline et induira la mort cellulaire en bloquant la division de la cellule <sup>264</sup>. D'autres stratégies conduisent à la libération d'une partie du cytotoxique à l'extérieure de la cellule ciblée par l'anticorps pour diffuser dans les cellules cancéreuses voisines pour obtenir un effet dit « bystander » cytotoxique (Figure 30).



**Figure 30 : Fonctionnement classique d'un ADC** (selon Beck *et al.*, 2019). (1) interaction anticorps-cellules tumorales, (2) endocytose de l'ADC, (3) clivage du linker sensible à un pH acide, (4 et 5) transfert et libération de la drogue dans le lysosome, avec si nécessaire un clivage des ponts disulfures, (6) transport de la molécule cytotoxique dans le cytoplasme cellulaire, (7) translocation et activation de la fonction cytotoxique de la molécule dans le noyau, (9) diffusion et pénétration de la drogue dans les cellules tumorales adjacentes, aussi appelé effet « bystander ».

En 2019, 5 ADC sont approuvés par la FDA <sup>181</sup> : Gemtuzumab ozogamicine (Mylotarg®), Inotuzumab ozogamicine (Besponsa®), Brentuximab védotine (Adcetris®), Polatuzumab

védotine-piiq (Polivy®), Ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla®). En 2023, on dénombre 413 essais cliniques avec le terme « Antibody Drug Conjugate » sur le site Clinical Trials de la FDA (<https://clinicaltrials.gov/>) dont 32 en phase III d'essai clinique. Les progrès réalisés dans la conception des ADC au cours de ces dix dernières années génèrent d'ores et déjà des résultats cliniques encourageants. La stratification des patients éligibles à ces thérapies sera essentielle pour adapter au mieux le service médical rendu aux patients.

### *b. Le diagnostic des tumeurs médié par des immuno-conjugués*

Malgré des réponses cliniques remarquables avec les ADC, l'hétérogénéité tumorale entraîne une réponse inefficace pour certains patients à ce type de traitement. La stratification des patients éligible à un traitement devient un enjeu majeur d'une médecine ciblée, en délivrant une stratégie thérapeutique adaptée au patient à un moment donné. L'imagerie moléculaire *in vivo* non invasive devient un outil de prédilection pour répondre à cet objectif et assister les cliniciens dans le choix de la meilleure stratégie thérapeutique. Pour les raisons précédemment décrites, les AcM et leurs fragments constituent des candidats idéaux pour réaliser cette imagerie moléculaire <sup>265</sup>.

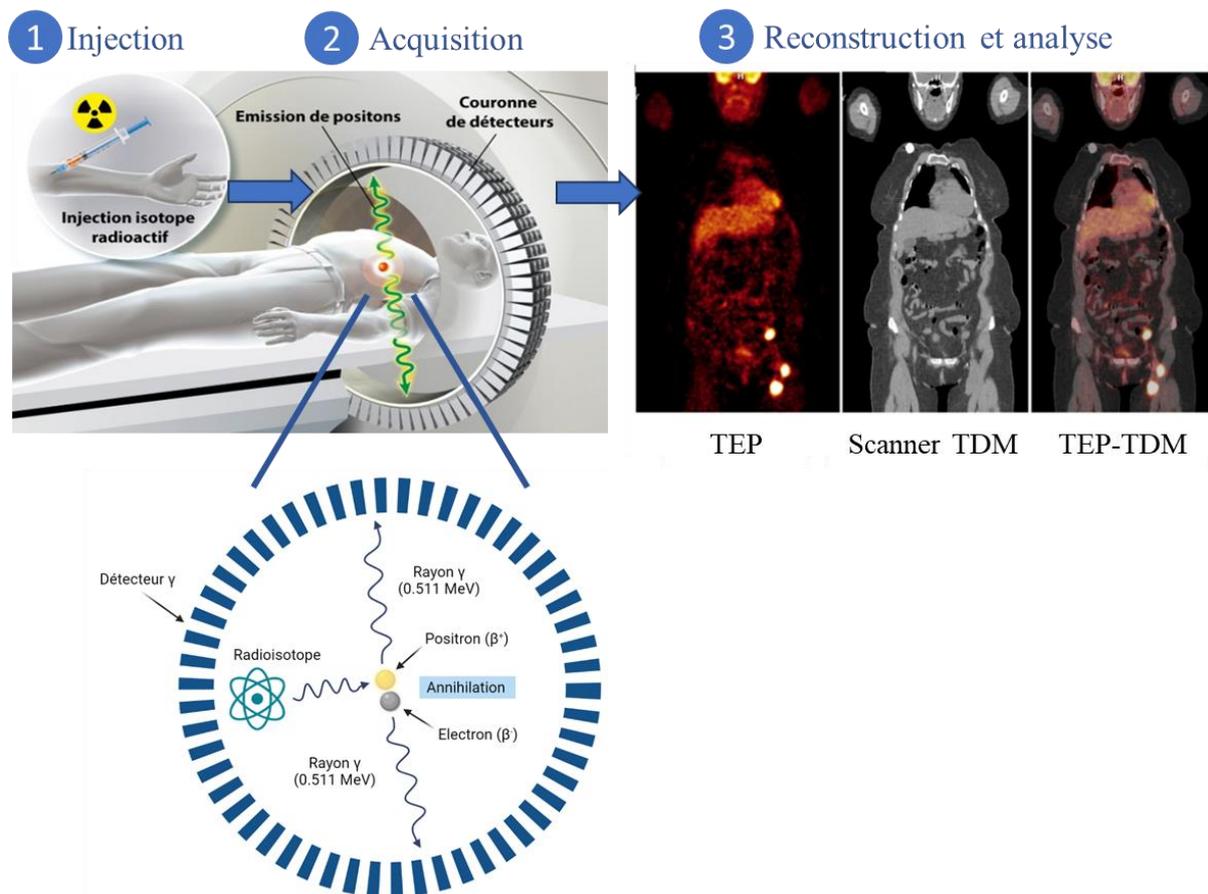
Classiquement, l'ImmunoHistoChimie (IHC) réalisées sur les biopsies tumorales de patient permet l'évaluation du grade tumorale et l'expression d'un certain nombre de biomarqueurs comme la prédiction d'une réponse à l'immunothérapie anti-PDL1 en quantifiant l'expression de PD-L1 (Programmed death-ligand 1) au niveau des cellules tumorales <sup>266</sup>. Néanmoins, ces méthodes d'évaluation d'expression présentent plusieurs inconvénients. Tout d'abord, l'IHC est une méthode peu robuste et difficilement reproductible en l'absence de certains contrôles. Ensuite, la tumeur primaire parfois résécable n'est pas forcément le reflet de l'hétérogénéité tumorale de ses métastases. Enfin, le statut d'expression par IHC donne une indication sur l'expression du biomarqueur, à un temps défini, et ne peut pas permettre la prédiction de son statut en temps réel.

Ainsi, les techniques d'imagerie moléculaire non invasives sont prometteuses pour caractériser certains biomarqueurs tumoraux de la tumeur en temps réel. La TEP permet la visualisation de la tumeur primaire et de ses métastases dans le corps entier à l'aide du <sup>18</sup>F-FDG (2-désoxy-2-fluoro-D-glucose) du fait de la consommation élevée de glucose par les cellules tumorales. On peut alors imaginer la quantification en temps réel de l'expression de différents biomarqueurs, tel que ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub>, à l'aide d'immuno-traceurs TEP. Ce suivi pourrait être réalisé à différentes étapes de la prise en charge du patient, à savoir précocement au niveau du

## Introduction générale

diagnostic et également pendant le traitement pour évaluer l'efficacité de la stratégie thérapeutique mise en œuvre sur l'évolution tumorale.

L'imagerie TEP utilise des radioéléments appelés radioisotopes capables d'émettre des positrons  $\beta^+$ . Ces derniers, en rentrant en collision avec des électrons  $\beta^-$ , entraînent une réaction d'annihilation générant 2 photons  $\gamma$  colinéaires de 511 keV émis à  $180^\circ$  l'un de l'autre. L'image est reconstituée grâce à la détection simultanée des photons  $\gamma$  par une couronne composée de photodétecteurs (**Figure 31**). Par la suite, une reconstruction 3D de la distribution spatiale du radioélément est réalisée grâce à un algorithme mathématique. Souvent, l'examen TEP est combiné avec un examen tomodensitométrie (TDM), aussi appelé scanner, donnant des indications anatomiques structurelles, superposables à l'imagerie nucléaire.



**Figure 31 : Etapes d'un examen TEP** inspiré de la thèse de Sophia Godel, 2022, Université Paris-Saclay. Le patient se voit injecter un radioélément permettant l'évaluation et la quantification de manière non invasive de phénomènes biochimiques et/ou physiologiques. Ce type d'imagerie est appelée imagerie fonctionnelle. Après reconstruction en 3D, l'examen TEP-TDM peut être superposé permettant d'avoir les données fonctionnelles et structurelles.

## Introduction générale

Généralement, le radioélément ou radionucléide émetteur de positrons ( $e^+$ ) est conjugué à un traceur ciblant une protéine ou un phénomène biologique comme une voie métabolique d'intérêt. L'immunoTEP utilise un anticorps ciblant un biomarqueur d'intérêt conjugué à un radioélément. Cette imagerie permet alors l'étude du devenir de cette macromolécule, donnant ainsi l'accès à ses paramètres pharmacocinétiques et à sa biodistribution dans le temps en fonction de l'expression du biomarqueur étudié.

Différents radionucléides peuvent être associés aux fragments d'anticorps pour les études TEP. En préclinique, les radionucléides fréquemment utilisés sont : le carbone-11 ( $^{11}\text{C}$  ;  $t_{1/2} = 20$  minutes), le gallium-68 ( $^{68}\text{Ga}$  ;  $t_{1/2} = 68$  minutes), le fluor-18 ( $^{18}\text{F}$  ;  $t_{1/2} = 110$  minutes), le cuivre-64 ( $^{64}\text{Cu}$  ;  $t_{1/2} = 12,7$  heures), le Zirconium-89 ( $^{89}\text{Zr}$  ;  $t_{1/2} = 3,3$  jours) et l'iode-124 ( $^{124}\text{I}$  ;  $t_{1/2} = 4,2$  jours) <sup>267</sup>. Classiquement, un radioélément est choisi en fonction de sa demi-vie ( $t_{1/2}$ ) qui doit être correspondre à la pharmacocinétique de son traceur. Par exemple, pour l'utilisation d'anticorps entier, il est préférable d'y greffer du zirconium-89 ou du cuivre-64 avec des demi-vies longues qui permettront de générer le meilleur signal par rapport au bruit de fond sur la tumeur. A l'inverse, le fluor-18 ou le galium-68 sont plus appropriés pour des petits fragments d'anticorps tel que des Fab ou des scFv qui diffuseront plus rapidement vers la tumeur mais qui seront rapidement éliminés <sup>268</sup>.

### Résumé de l'état de l'art :

La partie introductive permettant de faire l'état de l'art de ce manuscrit est terminée. Pour rappel, il a été mis en exergue le rôle pléiotropique de l'axe endothéline dans différentes fonctions physiologiques et son rôle en tant qu'axe « *driver* » dans 12 fonctions majeures permettant le développement tumoral selon la dernière publication de 2022 du Dr Douglas Hanahan. Plus précisément, il a été présenté l'implication de l'axe endothéline dans le développement et la progression tumorale du mélanome et du glioblastome. Ces cancers serviront de modèle d'étude tout au long du manuscrit. Dans une approche thérapeutique, nous avons évalué l'efficacité antitumorale d'un anticorps chimérique couplé au MMAE issu de notre laboratoire, le Rendomab-B49 (xiRB49), ciblant le récepteur humain de type B des endothélines, dans un modèle préclinique de tumeur de mélanome que je décrirai dans ce manuscrit. Pour une approche théranostique, nous avons développé un anticorps chimérique également issu de notre laboratoire, le Rendomab-A63 (xiRA63), ciblant le récepteur humain de type A des endothélines. Il a été couplé à des isotopes radioactifs et /ou des fluorochromes en vue d'une première utilisation qui serait l'imagerie moléculaire en TEP pour diagnostiquer et stratifier les patients atteints de GBM sur-exprimant ET<sub>A</sub>. Ces derniers seraient donc éligibles à un traitement par un ADC à base de xiRA63. La seconde application serait d'injecter le xiRA63 doublement conjugué avec un radionucléide et un fluorochrome pour (i) visualiser par TEP la tumeur et ses métastases dans leur ensemble avant l'opération, (ii) permettre une exérèse guidée par la fluorescence afin d'éliminer le maximum de tissu tumoral tout en préservant le tissu sain. Des résultats sur un modèle préclinique permettant d'exemplifier ces approches seront présentés.

**Le dernier paragraphe de mon introduction portera sur les anticorps ciblant les Récepteurs des endothélines A et B développés par notre laboratoire : Les Rendomabs.**

#### 4) Les rendomabs : nouveaux anticorps ciblant les Récepteurs des endothélines

Actuellement, environ 34% des médicaments classiques (hors biomédicaments) approuvés par la FDA ciblent des RCPG du fait de leur rôle essentiel dans la communication cellulaire et de leur implication majeure dans diverses pathologies <sup>269</sup>. Pourtant, le nombre d'AcM thérapeutiques approuvés contre ces RCPG sur le marché reste anecdotique malgré leur fort potentiel. En effet, en 2022, seul deux anticorps thérapeutiques ciblant les RCPG sont approuvés par la FDA : l'erenumab (Aimovig®) et le mogamulizumab (Poteligeo®) <sup>270,271</sup>. Ce faible nombre souligne la difficulté d'obtenir des AcM ciblant les RCPG ayant une efficacité thérapeutique. Une explication vient du caractère allostérique des RCPG et leur conformation tridimensionnelle fortement contrainte par leurs 7 domaines transmembranaires.

Entre 2011 et 2022, quelques anticorps ciblant les Récepteurs des endothélines ont été décrits (**Tableau 6**). Parmi eux, l'anticorps DEDN6526A (également nommé 5E9), ciblant le récepteur ET<sub>B</sub>, développé par Roche-Genentech a été évalué en phase clinique I contre le mélanome sous un format ADC. Malgré des résultats prometteurs, il n'y a pas eu d'autre développement pour cet anticorps <sup>182</sup>, qui a vu l'émergence à la même période des anticorps ICI (*Immune Checkpoint Inhibitors*).

**Tableau 6 : Anticorps ciblant les Récepteurs des endothélines dans différentes pathologies**

Type d'anticorps ciblant les ETR	Récepteur	Phase clinique	Antagoniste / agoniste	Pathologie	Kd	Ref
Nanobody - 2020	ETB	Préclinique	antagoniste	mélanome	nM	<a href="https://doi.org/10.1007/s11033-020-05313-w">https://doi.org/10.1007/s11033-020-05313-w</a>
Anticorps - 2021	ETA	Préclinique	antagoniste	Cancer colorectal	nM	<a href="https://doi.org/10.1038/s12276-021-00678-9">https://doi.org/10.1038/s12276-021-00678-9</a>
Anticorps - 2019 Getagozumab	ETA	Préclinique	antagoniste	Hypertension artérielle pulmonaire	nM	<a href="https://doi.org/10.1124/jpet.118.252700">https://doi.org/10.1124/jpet.118.252700</a>
Anticorps - 2019 ETRQβ-002	ETA	Préclinique	Modification des voies de signalisation	Hypertension artérielle pulmonaire	nM	<a href="https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.02.067">https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.02.067</a>
Anticorps - 2020 GMA301	ETA	Clinique fin phase I → phase I b	Pas d'information	Hypertension artérielle pulmonaire		<a href="http://www.gmaxbiopharm.com/pipeline3.html">http://www.gmaxbiopharm.com/pipeline3.html</a> , <a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04503733">https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04503733</a>
Anticorps – 2011 5E9	ETB	Préclinique	Non compétiteur de l'ET-1	mélanome	nM	<a href="https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-10-2340">https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-10-2340</a>
DEDN6526A – 2020 essais clinique du 5E9	ETB	Clinique fin phase I	<i>Idem</i> 5E9	mélanome	nM	<a href="https://doi.org/10.1007/s10637-019-00832-1">https://doi.org/10.1007/s10637-019-00832-1</a>

Nos travaux de recherche, nous ont permis de publier plusieurs articles portant sur des anticorps anti ETR <sup>272-274</sup> obtenus par une approche d'immunisation génique <sup>275</sup>. L'originalité

## Introduction générale

de cette approche est de présenter les Récepteurs des endothélines dans une conformation native dans un contexte *in vivo*.

L'ensemble des anticorps ciblant les Récepteurs des endothélines de type B a été classifié par groupe en fonction de leur reconnaissance de différentes lignées de mélanome ET<sub>B</sub><sup>+</sup> (UACC257, WM-266-4 et SLM8) (**Tableau 7**). Tous les anticorps présentent bien une spécificité pour ET<sub>B</sub> exprimé par les CHO-ET<sub>B</sub> et sont négatifs pour les CHO-WT. Cependant, de manière inattendue, tous ne reconnaissent pas l'ensemble des lignées de mélanome ET<sub>B</sub><sup>+</sup>. Dans le groupe 1, sont positionnés les AcM reconnaissant toutes les lignées cellulaires. Dans le groupe 2, les AcM ne reconnaissent que le récepteur ET<sub>B</sub> exprimé par CHO-ET<sub>B</sub>. Dans les groupes 3, 4, 5 et 6 l'interaction des AcM pour le récepteur ET<sub>B</sub>, exprimés par les différentes lignées de mélanome, varie en fonction de la lignée cellulaire tumorale utilisée. Ces résultats soulignent l'existence d'isoformes conformationnelles d'ET<sub>B</sub> reconnues par ces AcM. Ils constituent de précieuses sondes moléculaires pour étudier et mieux comprendre les isoformes allostériques d'ET<sub>B</sub>.

**Tableau 7 : classification des Rendomabs-B selon leur reconnaissance de lignées de mélanomes métastatiques (Herbet *et al.*, 2018)**

Les Rendomabs	Nombre d'anticorps	CHO-ET <sub>B</sub>	UACC-257	WM-266-4	SLM8
Groupe 1	9 AcM (RB4, RB49)	+	+	+	+
Groupe 2	5 AcM (RB1)	+	-	-	-
Groupe 3	3 AcM	+	+	+	-
Groupe 4	2 AcM	+	+	-	+
Groupe 5	3 AcM	+	+	-	-
Groupe 6	2 AcM	+	-	-	+

Les propriétés biologiques de quatre anticorps ayant retenu notre attention au cours de ces dernières années ont été répertoriées dans le **Tableau 8**.

**Tableau 8: caractéristiques des AcM RB1, RB4, RB49 et RA63**

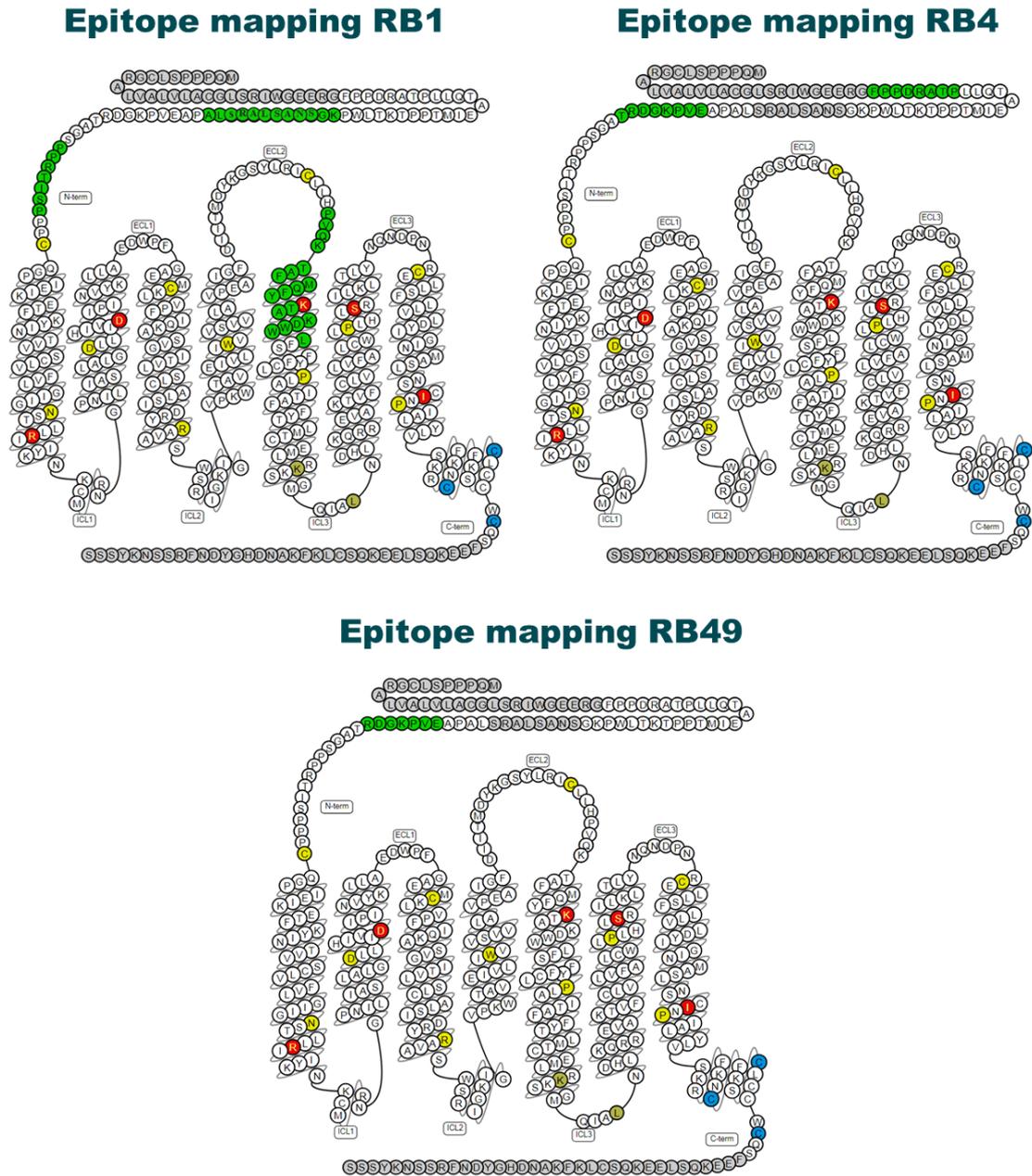
Les Rendomabs	Isotype	Récepteur	Antagoniste / Agoniste	Compétition Avec l'ET-1	Internalisation	Contexte oncologique	Kd apparent
Rendomab-B1	IgG2b/κ	ETB	antagoniste	Oui	Oui	Mélanome	nM
Rendomab-B4	IgG2b/κ	ETB	Activation PLC mais pas ERK	Non	Oui	Mélanome	nM
Rendomab-B49	IgG1/κ	ETB	Aucun effet	Non	Oui	Mélanome	nM
Rendomab-A63	IgG2b/κ	ETA	Aucun effet	Non	Oui	Glioblastome	nM

## Introduction générale

Le Rendomab-B1 (RB1) présente des propriétés antagonistes inégalées<sup>3,274,276</sup>. De ce fait, il paraissait être un candidat thérapeutique idéal pour cibler les tumeurs ET<sub>B</sub><sup>+</sup>. Cependant, nos résultats non publiés, tout comme les résultats cliniques négatifs obtenus avec les petites molécules antagonistes, n'ont pas permis d'observer de réponse antitumorale<sup>154,162,277</sup>. Notre hypothèse pour expliquer ces résultats est l'affinité exceptionnelle, de l'ordre du pM, voire décrite parfois comme quasi irréversible de l'ET-1 pour ET<sub>B</sub><sup>45</sup>. Dans ce cas, il est difficile pour des antagonistes d'atteindre des concentrations suffisantes et nécessaires pour déplacer la fixation d'ET-1 sur ET<sub>B</sub> dans un microenvironnement tumoral riche en ET-1 de par sa sécrétion par voie endocrine ou paracrine des cellules tumorales. Néanmoins des essais cliniques de phase I avec du Bosentan, antagoniste mixte de ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>, sont en cours de recrutement pour les tumeurs solides avancées et les cancers pancréatiques non opérables (NCT04158635, NCT05072106). La classification présentée dans le tableau 7 montre que le RB1 reconnaît pas ou peu ET<sub>B</sub> exprimé à la surface des lignées de mélanomes suggérant que ET<sub>B</sub> est déjà occupé par ET-1 ou/et que la conformation de ET<sub>B</sub> à la surface de ces lignées tumorales ne permette pas sa fixation.

En revanche, le Rendomab-B4 tout comme le Rendomab-B49 sont capables de se fixer sur ET<sub>B</sub> exprimé par les différentes lignées de mélanome et cela même en présence concentration élevée d'ET-1 (100 nM). Afin d'identifier les épitopes reconnus sur ET<sub>B</sub> par RB1, RB4 et RB49 un épitope mapping a été réalisé par une approche de Pepscan. Cette technique repose sur la reconnaissance de nos anticorps par hybridation avec un peptide linéaire. La partie extracellulaire, la région N-terminale et les domaines extracellulaires (e1, e2, e3) d'ET<sub>B</sub> ont été synthétisés sur un support solide. Les régions extracellulaires sont représentées par des peptides linéaires de 12 aa décalés à chaque fois d'un résidu. Après hybridation, l'anticorps se fixe sur le ou les peptides épitopiques. Les épitopes d'ET<sub>B</sub> reconnus par RB1, RB4 et RB49 ont été schématisés sur la **Figure 32**.

Ces résultats indiquent que le RB49 reconnaît un peptide localisé dans le domaine N-terminal de ET<sub>B</sub>. En l'occurrence, ce peptide épitopique est partagé par le RB4 et a pour séquence « EVPKGDRT ». Le RB4 entre également en interaction avec un second peptide toujours situé dans le domaine N-terminal dont le motif est : « ERGFPPDRATP ». Concernant le RB1 il comporte trois sites de reconnaissance différents : « KGSNASLARSLA », « PPRITISP » « PVQKTAFMQFYKTAKDWWL ».

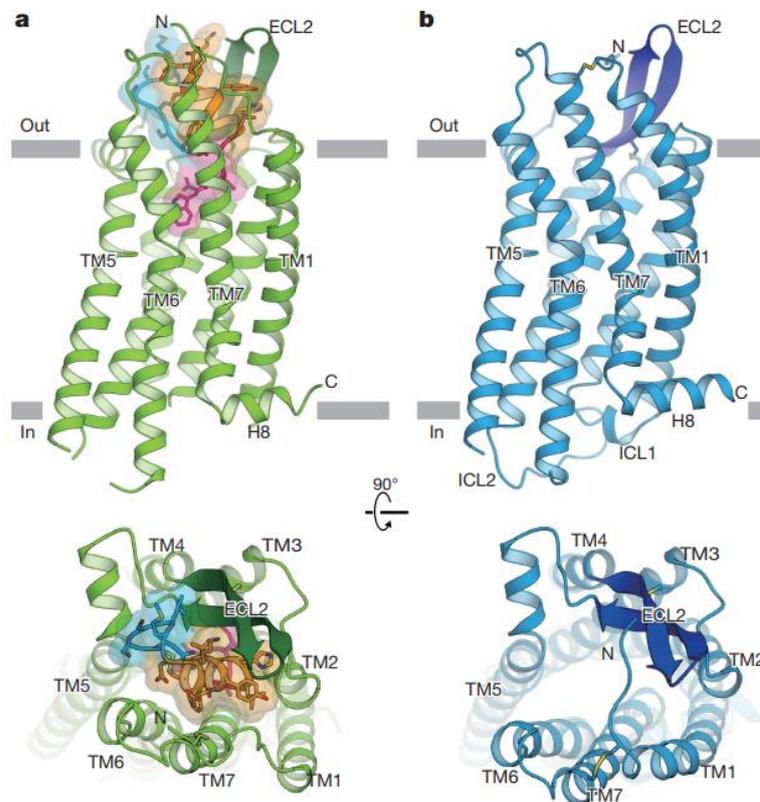


**Figure 32 : épitope mapping du récepteur ET<sub>B</sub> du RB1, RB4 et RB49.** Les acides aminés des épitopes reconnus par RB1, RB4 et de RB49 sont entourés coloriés en vert.

Les travaux de cristallisation de ET<sub>B</sub>, réalisés par le Dr. Shihoya, en absence ou en présence de ET-1 montrent des modifications structurales de ET<sub>B</sub> en présence d'ET-1 illustrant le caractère allostérique de ce récepteur commun à l'ensemble des RCPG<sup>45,278,279</sup>. Lors de sa fixation, ET-1 provoque un déplacement du domaine N-terminal enfoui dans la cavité du récepteur vers les domaines extracellulaires l'exposant au milieu extracellulaire. Cette exposition du domaine N-terminal dans l'espace extracellulaire le rend particulièrement

## Introduction générale

accessible aux RB4 et RB49. (**Figure 33**). Du fait de la sécrétion par voie autocrine de ET-1 par de nombreuses cellules tumorales dont les mélanomes, il est raisonnable de penser que la conformation d'ET<sub>B</sub> « activée » est majoritaire à la surface des cellules de mélanome.<sup>14,45,280</sup>



**Figure 33 : Crystallisation du récepteur ET<sub>B</sub>** (Shihoya *et al.*, 2016). (a) structure globale d'ET<sub>B</sub> complexée avec ET-1. (b) Structure d'ET<sub>B</sub> sans liaison avec son ligand. Les représentations du haut montrent le récepteur ancré dans sa membrane et celle du bas une vue depuis le côté extracellulaire présentant la cavité du récepteur vide et l'ancrage de la région N-terminale à l'intérieur.

Notre laboratoire, a breveté deux anticorps aux propriétés particulièrement intéressantes : le Rendomab-B49 (RB49) dirigé contre ET<sub>B</sub> et le rendomab-A63 (RA63) dirigé contre ET<sub>A</sub>. Très affins, de l'ordre du nanomolaire, et très spécifiques, ils s'internalisent après fixation sur leur récepteur respectif, leur fixation n'est pas déplacée en présence de 100 nM ET-1.<sup>273,281,282</sup> RA63 reconnaît les récepteur ET<sub>A</sub> exprimés à la surface de cellules souches humaines de glioblastome (CSG)<sup>273</sup>.

---

## Objectifs des travaux de thèse

---

L'objectif de ma thèse a été d'utiliser les anticorps RA63 et RB49 dans des approches diagnostiques et/ou thérapeutiques comme la stratification des patients atteints de tumeurs  $ET_A^+$  ou  $ET_B^+$  et éligibles à des immunothérapies par des ADC RA63 et/ou RB49.

La première étape de mon travail de thèse présentée dans le chapitre I a consisté en l'ingénierie des anticorps RA63 et RB49 et, en particulier, leur chimérisation. Pour cela, j'ai modifié des vecteurs d'expression eucaryotes pour permettre la chimérisation de tout anticorps et/ou fragment d'anticorps, et implanté, au laboratoire, un protocole d'expression et de purification de différents formats d'anticorps dans les cellules expiCHO en vue des applications théranostiques qui seront décrites dans les chapitres suivants de ce manuscrit.

Les propriétés des anticorps RA63 et RB49 permettaient de développer une stratégie ADC pour traiter les tumeurs  $ET_A^+$  et  $ET_B^+$ . Aussi, pendant mon travail de thèse, j'ai eu l'opportunité de développer l'ADC xiRB49-MMAE afin d'évaluer son efficacité thérapeutique antitumorale dans un modèle préclinique de mélanome. Le chapitre II présente l'ensemble de ces résultats.

Dans les essais cliniques des thérapies ciblées, la problématique de sélection des patients éligibles à un traitement est souvent évoquée. En effet, chaque tumeur ayant son profil moléculaire, tous les patients ne sont pas éligibles aux mêmes thérapies ciblées. Aussi, la stratification des patients devient une étape essentielle pour le succès thérapeutique d'un ADC. Dans ce contexte, l'imagerie moléculaire *in vivo* ouvre la possibilité d'améliorer cette stratification des patients. « Le bon traitement, au bon patient, au bon moment ».

Une première évaluation de ces approches a été réalisée avec le xiRA63 et son ThioFab radiomarqués au zirconium 89 par imagerie TEP. Leur pharmacocinétique ainsi que leur biodistribution *in vivo* ont été comparés dans un modèle préclinique orthotopique de CSG  $ET_A^+$ . Ces résultats sont présentés dans le Chapitre III.

Enfin, dans une approche théranostique bimodale, le xiRA63 a été conjugué à une plateforme bi-fonctionnelle permettant l'incorporation d'un fluorochrome et d'un radioélément. L'injection de ce traceur bimodal permet la détection et la quantification de la tumeur  $ET_A^+$  par une imagerie TEP préopératoire suivi d'une chirurgie guidée par fluorescence. Dans le cas des glioblastomes, une meilleure résection de la tumeur améliore la survie des patients. La qualité de l'ablation tumorale guidée par fluorescence a été investiguée et la spécificité du signal généré par l'immuno-traceur a été validé puis quantifié par imagerie TEP. L'ensemble de ces résultats constitue le dernier chapitre de la partie résultats.



---

## Résultats des travaux de thèse

---

La suite de ce manuscrit comportera 4 chapitres dont 3 d'entre eux (chapitre I, II, III) ont fait l'objet d'un article dont je suis première auteur. L'article 3 a été soumis et accepté en mai 2023. Concernant l'article 1, il a été soumis en mai 2023. L'article 2 est en cours de finalisation et sera soumis d'ici quelques mois. Un brevet évoqué dans le chapitre I et III a également été déposé le 09 février 2023.

Les trois premiers chapitres de ce manuscrit suivront le plan suivant :

### **I. Exemple chapitre 1**

- (1) Introduction de l'étude et de l'article dans le contexte de la thèse.
- (2) Article 1 dans son format initial de soumission.
- (3) Partie optionnelle : études complémentaires en lien avec l'article 1.
- (4) Discussion et perspective.

La partie « matériel et méthode » non décrite dans les articles sera mise en annexe.

Le chapitre 4 décrira mes résultats obtenus en fin de thèse qui feront également l'objet de deux autres publications.



## I. Chapitre I : Ingénierie des anticorps

### 1) Introduction de l'étude

L'immunogénicité des premiers anticorps thérapeutiques murins administrés en clinique humaine a provoqué des effets secondaires importants pouvant être létaux<sup>237</sup>. Cette réponse du système immunitaire dirigée principalement contre les régions constantes a conduit à l'ingénierie de nouvelles générations d'anticorps thérapeutiques chimériques dans un premier temps, puis humanisés. Ces approches ont permis de réduire l'immunogénicité induite par les régions non humaines de l'anticorps murin et peuvent s'avérer nécessaires une utilisation de l'anticorps en clinique humaine.

La chimérisation consiste en l'échange des régions constantes murines en humaines. Dès lors, 75 % des séquences de l'anticorps sont d'origine humaine. En fonction des applications thérapeutiques et/ou diagnostiques, un anticorps chimérique peut être utilisé en clinique humaine. Actuellement, ils représentent 9 % des anticorps autorisés et 3 nouveaux anticorps chimériques ont été approuvés en 2020 (<https://www.antibodysociety.org>)<sup>233-235</sup>. Même si cette discussion autour de l'immunogénicité des anticorps reste d'actualité, de nombreux essais cliniques ont mis en évidence la biosécurité et l'immunogénicité acceptable de cette classe d'anticorps<sup>236,283</sup>.

Ces vingt dernières années, les anticorps thérapeutiques (mAb) représentent le principal groupe de biomédicaments avec plus de 150 anticorps autorisés dans l'Union Européenne ou aux États-Unis (<https://www.antibodysociety.org>). Environ 80 mAb sont approuvés en immunothérapies des cancers (<https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>). Comme décrit dans l'introduction, les anticorps reconnaissent de manière spécifique certains biomarqueurs d'intérêt. Ces biomarqueurs sont principalement des protéines membranaires exprimées à la surface des cellules tumorales. Contrairement à la chimiothérapie traditionnelle qui cible les cellules en division sans distinction, les anticorps thérapeutiques ont révolutionné les pronostics de certains cancers et par leurs spécificités réduits les effets secondaires associés au traitement. Ces molécules sont à présent essentielles dans l'arsenal thérapeutique de la médecine de précision.

L'axe endothéline est constitué des récepteurs GPCR ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> et de ses trois ligands, ET-1,2,3. ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> sont impliqués dans le processus de tumorigenèse notamment dans la survie, la

prolifération et la migration des cellules tumorales, comme présenté précédemment <sup>3</sup>. Il est à noter que la dérégulation et la surexpression d'ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> ont été démontrés dans un grand nombre de cancers <sup>73</sup>. Ces GPCR ont été directement ciblés par des antagonistes et leurs efficacités thérapeutiques dans le traitement du cancer de la prostate, du poumon, du mélanome du glioblastome ont été évalués au travers différents essais cliniques (NCT02254954, NCT00050297) <sup>154,163</sup>. Si l'utilisation de petites molécules antagonistes n'ont pas donné les résultats escomptés, ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> représentent des biomarqueurs d'intérêt pour de nouvelles approches thérapeutiques.

Notre laboratoire a développé différents anticorps monoclonaux murins par immunisation génétique ciblant ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub>: les Rendomabs B1, B4, B49, A62 et A63 <sup>272-275</sup>. Ces anticorps présentent des propriétés remarquables en termes d'affinité (nM) et de spécificité pour leur récepteur cible. Parmi ceux-ci, les Rendomabs B49 (RB49) et A63 (RA63) présentent toutes les caractéristiques indispensables pour être conjugués à un agent cytotoxique (voir chapitre 2). Leur comportement vis-à-vis de leur cible dans un contexte tumoral a été étudié *in vitro* ce qui a permis de valider la haute affinité du RB49 et du RA63 pour des cellules de mélanome et de glioblastome, confirmant leur intérêt dans le cadre d'une thérapie anti-cancéreuse.

L'ingénierie des anticorps RA63 et RB49 a été nécessaire pour leur développement en tant qu'agent thérapeutique transférable en clinique. Des modifications de leur séquence en acides aminés ont été effectuées en réponse à diverses problématiques. Dans un premier temps, plusieurs formats d'anticorps ont été créés (**Figure 34**) :

- Durant ma thèse, les anticorps ont tout d'abord été **chimérisés** (Article 1). Les chaînes légère et lourde IgG1-Kappa du Trastuzumab ont été utilisées, la faible immunogénicité de cet anticorps très utilisé ayant déjà été mise en évidence <sup>284</sup>. L'isotype IgG1 permet une mobilisation des mécanismes effecteurs de l'anticorps en clinique humaine.
- Des **fragments d'anticorps de type Fab** ont également été produits (Article 1 et 3). En effet, les Rendomabs sont capables de reconnaître des cellules de glioblastome humain <sup>273</sup>. Dans le cadre d'une stratégie diagnostique ou thérapeutique pour traiter cette tumeur primaire cérébrale, il est nécessaire d'anticiper une limitation consécutive de la diffusion et de l'accumulation des anticorps sur la tumeur médiée par la barrière hématoencéphalique. Cependant, en fonction du contexte tumoral, il est fréquent que cette BHE soit altérée permettant alors une diffusion des anticorps dans le parenchyme cérébral.

Comme évoqué dans l'introduction, lors de la conception d'ADC, un manque d'homogénéité et de reproductibilité des lots peut être observé. Il est alors nécessaire de pouvoir conjuguer les biomolécules de manière dite site-spécifique, permettant un contrôle optimal de la production. Ainsi, des mutagenèses dirigées, permettant l'ajout de sites sélectifs de liaison ont été effectuées sur les différents formats d'anticorps RA63 et RB49. La mutation N297Q a été utilisée afin de greffer des plateformes chimiques bi-fonctionnelles, permettant ainsi la conjugaison de diverses molécules. Cette stratégie sera détaillée dans le chapitre 4.

La mutation N297Q est seulement réalisable sur des anticorps entiers. Dans le cas des fragments de type Fab, une cystéine en position 121 a été insérée à la place d'une alanine (mutation A121C) afin d'introduire un site de liaison pour la conjugaison site-spécifique. Ces anticorps ont alors été nommés ThioFab. Cette mutagenèse dirigée a été effectuée sur l'anticorps Fab-xiRA63 et Fab-xiRB49, donnant ainsi les ThioFab-xiRA63 et ThioFab-xiRB49. La conjugaison « site spécifique » sur ce thiol libre en position 121 ayant apporté un avantage de sélectivité, de reproductibilité, d'homogénéité de lots ainsi qu'un meilleur rendement lors de la conjugaison, les fragments dits ThioFab ont fait l'objet d'un **dépôt de brevet le 9 février 2023 s'intitulant « Fragment Fab mutant pour l'obtention de conjugués mono- ou bi-fonctionnalisés site-spécifiques »**. Dans la partie 1 - résultats complémentaires, les résultats du fragment ThioFab-xiRB49-P125T sont commentés. La production et la validation du ThioFab-xiRA63 ne sont pas

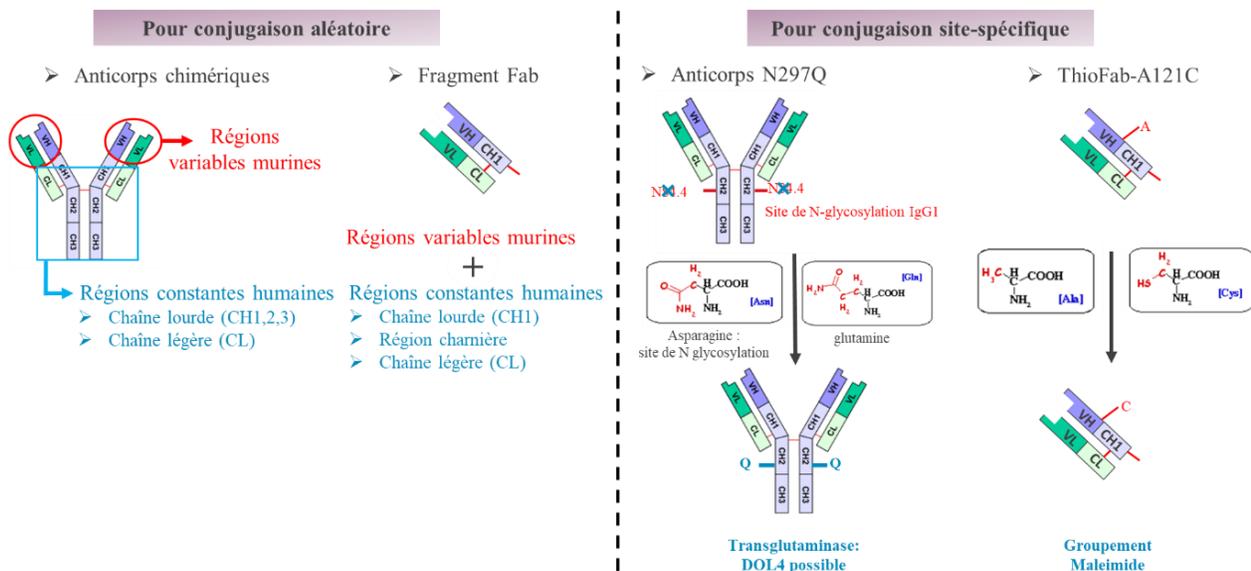


Figure 34 : Différents formats d'anticorps produits et caractérisés au cours de la thèse.

présentés dans ce manuscrit mais a été utilisé pour une étude préclinique qui a fait l'objet d'un article (*cf.* chapitre III).

Ces différents formats d'anticorps, présentés en **Figure 34**, ont tous été obtenus, produits et caractérisés selon le même procédé détaillé pour le xiRB49 dans l'article 1.

L'article 1 porte sur la chimérisation du RB49, le xiRB49, car de manière inattendue, le xiRB49 est devenu non fonctionnel. A l'inverse, la chimérisation du RA63 n'a posé aucun problème et le xiRA63 a conservé toutes les caractéristiques de l'anticorps murin.

Les études *in silico* décrit dans cet article, ont mis en évidence que la proline, inhabituelle, en position 125 de la région variable du RB49 pouvait induire un repliement de la région variable différent lors de sa chimérisation. Les CDR3 de la chaîne lourde et légère entrant en contact prolongé, les rendant non disponibles pour une interaction avec l'antigène de ET<sub>B</sub>. La mutation de la P125 par une thréonine canonique a permis de rétablir la fonctionnalité du xiRB49. Des résultats complémentaires non publiés dans l'article portant sur le ThioFab-xiRB49 suggérant des conformations particulières du xiRB49 sont également commentés et présentés dans cette partie (*cf* chapitre I.3).

2) *Article en cours de soumission dans mAbs (date prévisionnelle : fin mars / début avril 2023)*



**A non-conserved proline in the variable region of a chimeric mAb abolishes its functionality but is fully restored by its mutation to threonine. *In silico* interpretations.**

Marie Hautiere<sup>a†</sup>, Irene Maffucci<sup>b,c,\*†</sup>, Narciso Costa<sup>a</sup>, Amaury Herbet<sup>a</sup>, Sosthene Essono<sup>d</sup>, Séverine Padiolleau-Lefevre<sup>b,c</sup>, Didier Boquet<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> *Université Paris-Saclay, CEA, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France*

<sup>b</sup> *CNRS UMR 7025, Génie Enzymatique et Cellulaire. Centre de Recherche de Royallieu. CS 60319, 60203, Compiègne Cedex, France.*

<sup>c</sup> *Sorbonne Universités, Université de Technologie de Compiègne, Génie Enzymatique et Cellulaire. Centre de Recherche de Royallieu. CS 60319, 60203, Compiègne Cedex, France.*

<sup>d</sup> *Medical Biotechnology Engineering LLC. 32 Clinton St, Malden, 02148, Massachusetts, USA.*

† The authors are joint first authors.

\* Corresponding authors: Didier Boquet (RB49 antibody) [didier.boquet@cea.fr](mailto:didier.boquet@cea.fr), Irene Maffucci (In silico datas) [irene.maffucci@utc.fr](mailto:irene.maffucci@utc.fr).

**A non-conserved proline in the variable region of a chimeric mAb abolishes its functionality but is fully restored by its mutation to threonine. *In silico* interpretations.**

**Abstract**

mAbs play an essential role in the therapeutic arsenal available to patients. Our laboratory has patented the Rendomab-B49 mAb targeting the endothelin B receptor (ET<sub>B</sub>). This G protein-coupled receptor play a driving role in the progression of numerous cancers. We chimerized our mAb (xiRB49) to evaluate its preclinical therapeutic efficacy in different ET<sub>B</sub><sup>+</sup> tumors models with an antibody drug conjugate approach. Surprisingly, chimerization resulted in the full loss of xiRB49 functionality. *In silico* mAbs modelling and *in vitro* experiments were performed for a better understanding of xiRB49 structure function relationships. Our results showed that the proline in position 125 on the heavy chain alters the xiRB49 CDR3 light chain conformation and its mutation into threonine allowed a complete functional recovery.

Keywords: Monoclonal Antibody; Rendomab B49; chimerization; Proline; *In silico* modelling

## Introduction:

The endothelin axis, composed of two G-protein-coupled receptors (GPCRs), ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>, and three ligands, ET-1, -2 and -3, is involved in many physiological functions including cardiovascular homeostasis. Deregulation of this axis is associated with a large variety of diseases<sup>1,2</sup>. In a tumoral context, several works have demonstrated that ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> signaling pathways are involved in several hallmarks of tumoral progression as cancer cell survival, proliferation and migration. ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> overexpressions in many cancers are now well documented<sup>1-4</sup>. Thus, endothelin receptors have become a major targets for cancer treatments as illustrated by numerous clinical trials including some currently being recruited NCT04205227, NCT04158635, NCT05072106<sup>5-7</sup>.

We have already published different antibodies targeting ET<sub>A</sub> or ET<sub>B</sub>, named Rendomabs, displaying remarkable properties, high affinity and specificity for their receptor, and competing or not with endothelins. Concerning ET<sub>B</sub>, we described the Rendomab B1 as one of the most effective ET-1 antagonists. However, in a tumour microenvironment rich in ET-1, it is more appropriate to consider an antibody, such as Rendomab B49 (RB49), whose binding will not be impaired by the high endothelin concentrations. Recently, we have obtained a potent anti-melanoma activity induced by the therapeutic antibody drug conjugate RB49 directed against ET<sub>B</sub> (Herbet *et al.* in preparation)<sup>8-10</sup>. We described, in this communication, the RB49 chimerization step on the human IgG1-Kappa isotypes (xiRB49)<sup>11</sup>. We assessed the xiRB49 physicochemical parameters, namely its hydrodynamic radius, molecular weight, temperature curve, inflection temperature, specificity, and affinity. Very surprisingly, the xiRB49 had totally lost its functionality while its murine recombinant version was fully active. We investigated the RB49, xiRB49 and xiRB49-P125T structures by *in silico* approaches combined to *in vitro* experiments. These highlighted that the proline at the position 125 on the heavy chain of xiRB49 alters the CDRs relative conformation, while its mutation to threonine allows their restoration producing a fully functional xiRB49-P125T.

## MATERIALS AND METHODS

### *Cell culture:*

Three established Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines were used: CHO-ET<sub>B</sub>, and CHO-WT. As previously described<sup>8,10</sup>, cells were cultured in HAM-F12 medium (Gibco-21765) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma-F5724), 1 mM pyruvate (Gibco-11360), 1% non-essential amino acids (Gibco-11140), 2 mM glutamine (Sigma-G7513), 100 U.mL<sup>-1</sup> penicillin and 100 µg.mL<sup>-1</sup> streptomycin (Sigma-P0781). The stable expression of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors were maintained with 0.5mg.mL<sup>-1</sup> of geneticin (G6168). Cells were incubated at 37°C with 5% humidified atmosphere.

### *Antibody recombinant expression and purification*

RB49-VH (Variable Heavy) and RB49-VL (Variable Light) were respectively fusionned with the IgG1/Kappa constant regions. RB49, xiRB49 and xiRB49-P125T and mAb expression were obtained from mammalian expression pTT5 vector<sup>12</sup> co-transfected in ExpiCHO-S cells according to the manufacturer's instructions (ThermoFisher-A29127). Production was purified on a HiTrap Protein A HP column (GE Healthcare-17-0402-03) following the instructions. Sequences are indicated in SI.

### *Fluorescent Flow cytometry experiments*

We used the protocol from **Herbet et al., 2018** or **Borull et al., 2016**<sup>8,10</sup>. We performed binding experiments with 3.10<sup>6</sup> living cells per sample resuspended in a saturation buffer (PBS-1X, 5% NGS, 0.1%-BSA) from 0.01 nM to 100 nM in the saturation buffer. Each range point was incubated with cells at 4°C overnight. For revelation, we used an Alexa-Fluor-488<sup>TM</sup> conjugated with goat anti-mouse IgG (Invitrogen-A10684) or with F(ab')<sub>2</sub>-goat anti-Human IgG Fc (Invitrogen-H10120) diluted 1/500 and incubated during 4 hours at 4°C. Three washes with PBS 1X (pH = 7.4) was performed between each step. Experiments were read with the FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, USA). Then, the Mean Fluorescence Intensity (MFI) was calculated by the cytometer software and datas were analyzed with GraphPad Prism.

We normalized the MFI data from 0% up to 100% and we fitted curves with the function “one site specific binding”. The fitting binding curves allowed the determination of the apparent  $K_d$  and the  $B_{max}$ . GraphPad Prism software (v9.0.1) was used for statistical analyzes. Student t test (two-tailed) were carried out to compared two data group (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ).

### ***Thermic denaturation experiments***

The samples were centrifuged 10 minutes at 13000 rpm. Then 10  $\mu\text{L}$  at 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  of the antibody solution surface was drawn into capillary. The Tycho NT6 instrument (Nanotemper) was used to determine the antibodies denaturation temperature curves. The ratio  $A_{350\text{nm}}/A_{330\text{nm}}$  was then calculated by the Tycho instrument. Ratio first derivative gave us an inflection temperature ( $T_i$ ) corresponding to a structural transition in one protein domain folding states during the heating.

### ***Dynamic light scattering***

Prior to the Dynamic Light Scattering (Dynapro Plate Reader III, Wyatt technology) measurements, samples were diluted at a final concentration of 1 $\text{mg}/\text{mL}$  and centrifugated 15 minutes at 16000 rpm to remove the dust. Then, 20 $\mu\text{L}$  of the antibody solution was dropped into the cuvette and measured at 830nm using the Dynamics V6.3.40 software. These measurements allowed us to validate the absence of sample's aggregates and to evaluate the protein's hydrodynamic radius.

### ***Fabs in silico modeling***

The variable regions of RB49 were modelled using the Rosie web-server<sup>13</sup> by asking to model also the H3 loop. To further validate the obtained results, the light and heavy chains variable regions were independently submitted to a BLAST search (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), using the PDB database as search set. For the light chain, we found a 100% coverage and 100% identity with the variable region of the light chain of the Tau5 antibody Fab (PDB ID: 4TPR), whilst for the variable region of the

heavy chain we found a 100% coverage and 87.3% identity with the heavy chain variable region of the N1G9 Fab fragment (PDB ID 1NGP). This allowed to confirm the quality of the variable regions modeling by Rosie.

Analogously, we repeated the BLAST search on the constant regions of the light and heavy chains for both RB49 and xiRB49. For what concerns the RB49, for the light chain constant region we found 100% coverage and 100% identity with a kappa constant region of a catalytic antibody (PDB ID: 1FIG), while for the heavy chain constant region we found 100% coverage and 94.38% identity with the same region of a mouse IgG1 (PDB ID: 1IGY).

Similarly, we found a 100% coverage and 100% identity between the xiRB49 light chain constant region and the same region of a human Fab HCV3 (PDB ID: 6U8K), and a 100% coverage and 99.09% identity between the heavy chain constant region and that of a human IgG (PDB ID: 1HZH).

Since a 100% identity was found for the light chains constant regions of both RB49 and xiRB49, we used the 1FIG and 6U8K kappa constant regions as they are for the mouse and chimeric RB49 modeling. Conversely, for the heavy chains constant regions, we performed an homology modeling with the SwissModel web-server <sup>14</sup> using 1IGY and 1HZH as templates. The obtained models were evaluated in terms of reliability of the model and geometrical features.

The RB49 and xiRB49 Fabs were finally reconstructed by joining the variable and constant regions with PyMol <sup>15</sup>. For what concerns the heavy chains constant regions, we only kept the constant region I. The xiRB49 P125T mutant was obtained by manually mutating the concerned residue. Finally, the protonation states of the amino acids of the obtained models were computed with the H++ server in physiological conditions.

### ***Molecular dynamics simulations on RB49 Fabs***

The three modelled Fabs have been successively submitted to classical molecular dynamics (cMD) simulations. These were performed with the *pmemd.cuda* module of Amber20 package <sup>16</sup> using the ff14SB

force field<sup>17</sup>. For each Fab, the total charge was neutralized by including an adequate number of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> ions and the systems were embedded in an octahedral TIP3P water box added up to a distance of 10 Å from the solute. Each system was then submitted to a classic molecular dynamics procedure involving minimization, heating and NVT/NPT equilibration steps followed by a 10 ns production step (details of the simulations protocols are reported in the S.I.). These simulations were used to collect average potentials for the following accelerated MD (aMD) simulations.

For RB49 and xiRB49 Fabs 3 independent aMD runs of 1 μs each were run, for a total of 3 μs. Conversely, in order to better take into account for the single point mutation, for the xiRB49-P125T Fab 3 independent aMD runs of 1.5 μs each were run, for a total of 4.5 μs. Cluster analyses were performed with the *cpptraj* Amber20 module using the average-linkage algorithm, requesting 10 clusters and setting the pairwise mass-weighted RMSD on the Cα backbone atoms as a metric. The same module was used to compute the distances between the centers of mass of the heavy and light chains CDRs and the inter- and intrachain hydrogen bonds by requesting 3.5 Å and 130° as distance and angle cutoffs, respectively.

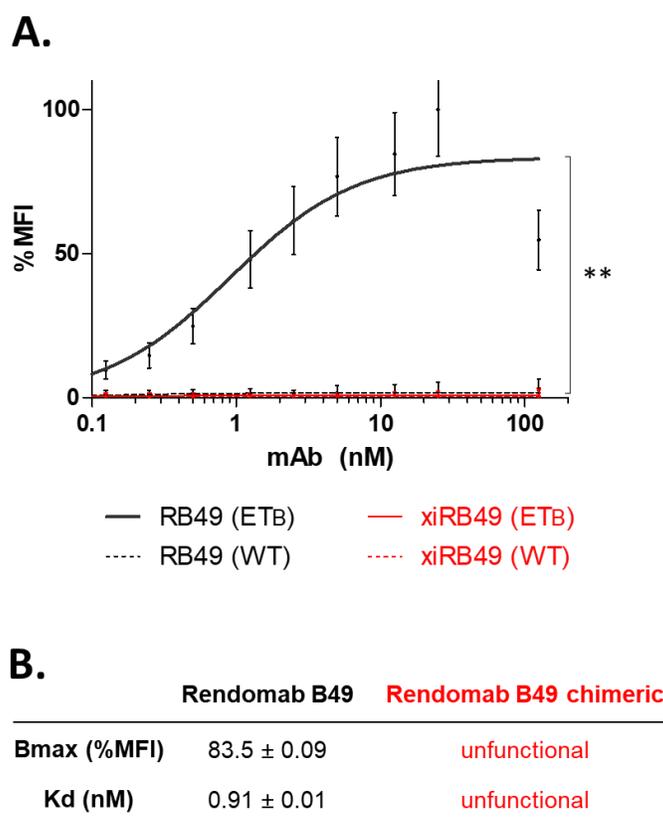
The R bio3D package<sup>18</sup> was used to compute the contact maps on the aMD trajectories. The upper threshold to consider two atoms in contact was set to 12 Å. The contact maps obtained for the 3 independent runs of each systems were averaged.

## Results

### *xiRB49 expression and functionality*

xiRB49 were encoding by two expressions pTT5 vectors, co-transfected in a ExpiCHO<sup>TM</sup> expression system as presented in [supplemental Figure 1](#). The first encoding the heavy chain RB49-VH-human IgG1 and the second RB49-VL-human Kappa. xiRB49 were well expressed and purified on protein A column suggesting a correct refolding of the constant IgG1 domain which interacted with the A protein column ([supplemental Figure 2A](#)). Moreover, we detected on the SDS PAGE a classical mAb profil i.e. in no reducing conditions, a band at 150kDa, and in reduced conditions, two bands corresponding to the heavy

and the light chains 50 kDa and 25 kDa respectively ([supplemental Figure 2B](#)). We determined a hydrodynamic radius (Rh) of  $5.2 \pm 0.4$  nm no aggregation was observed ([supplemental Figure 2C](#)). Identical results were obtained with our positive control, the chimeric Rendomab A63, xiRA63, already described for theranostic applications with  $ET_A^+$  tumors (Hautière *et al.* submitted). We assessed the functionality of xiRB49 by binding curves on CHO- $ET_B$  cells compared to CHO-WT cells (Wild Type no human  $ET_B$  expression). Unexpectedly, xiRB49 showed no functionality for  $ET_B$ , **Figure 1**, in contrast, murine RB49 was fully functional with an apparent  $K_d = 0.91 \pm 0.01$  nM and a  $B_{max}$  value of  $83.5 \pm 0.09$  %MFI. No cross-reaction was detected on CHO-WT highlighting its specificity.



**Figure 1. FACS binding curves of murine and chimerized RB49.** (A.) Binding curve with RB49 (black) and xiRB49 (red). Mabs specificity were assessed on CHO- $ET_B$  (solid line) and CHO-WT (dotted line). (B.) Table of apparent  $K_d$  (nM) and  $B_{max}$  (%MFI) for RB49 and xiRB49. Data are presented as mean  $\pm$  SD. MFI: Median Fluorescence Intensity.

As RB49 was purified from hybridoma, we decided to produce it in ExpiCHO cells, called “recombinant RB49” (reRB49) to evaluate its functionality. After all the cloning, expression, purification and physico-chemical characterisation processes completed (data not shown) FACS binding curves were performed. The results indicated that reRB49 was fully functional with identical RB49 results (Supplemental Figure 3). In conclusion, it was definitely the chimerization process with human IgG1Kappa isotype which abolished the ET<sub>B</sub> recognition by RB49 variable regions.

A careful analysis of variable sequences allowed us to identify an unusual proline at position 125 according to the IMGT numbering (Figure 2). This apolar amino acid was already pointed out as causing trans-cis conformational issues on antibodies, as previously described by [Madiero et al.,2020](#)<sup>19</sup>. As the

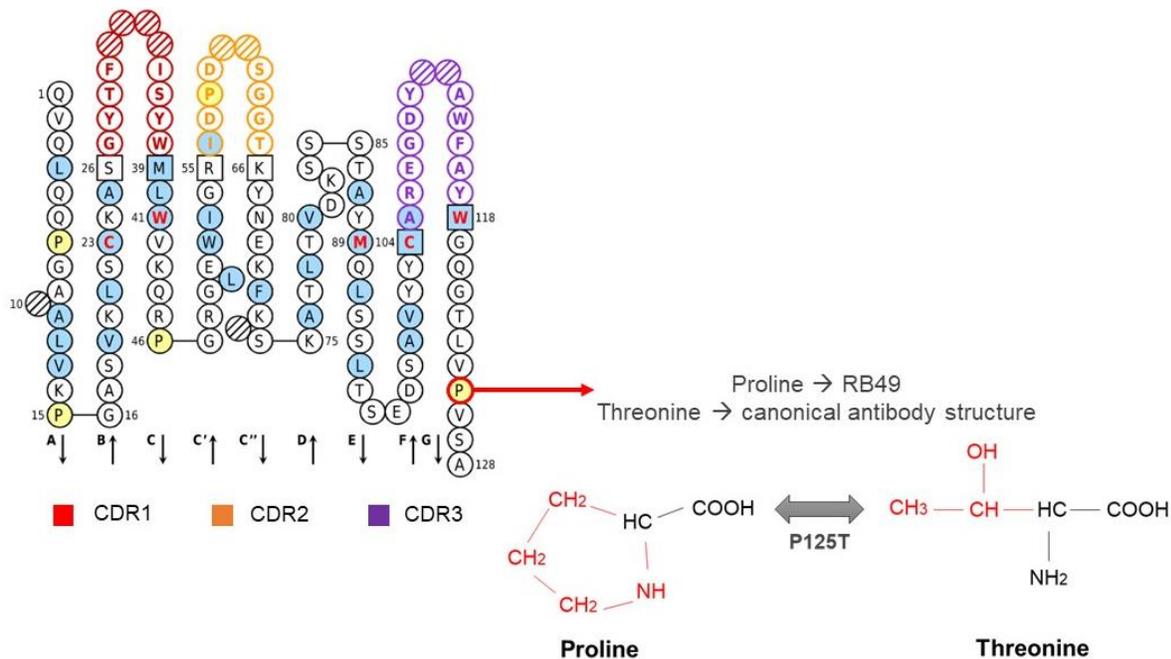


Figure 2. **RB49 VH domain IMGT Collier de perles representation.** a) Amino acid hydrophobic are in blue and conserved positions in red. Squares represent the anchor positions which delimit the CDR-IMGT and framework IMGT region. Unique numbering for V domain are hatched and direction of the beta strands are represented by black arrows. B) Proline and Threonine chemical structure are also presented.

canonical amino acid at this position is a threonine, we decided to explore the functionality of the xiRB49-P125T mutant. A fully functional xiRB49-P125T was restored as confirmed by its binding curves with a similar apparent affinity to RB49. As expected, no binding to CHO-WT cells was observed (**figure 3**).

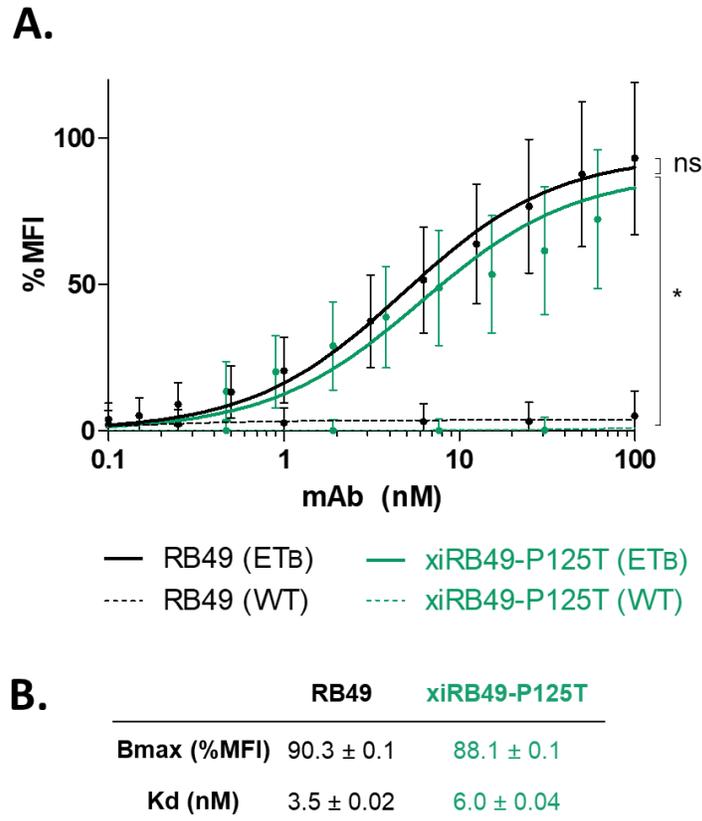


Figure 3. **FACS binding curves of murine and chimerized RB49-P125T.** Binding curves comparison of xiRB49-P125T (green) and RB49 (black) performed on CHO-ET<sub>B</sub> (solid line) and CHO-WT (dashed line) by flow cytometer. Apparent K<sub>d</sub> (nM) and B<sub>max</sub> (%MFI) were represented in the summary table. Data are presented as mean ± SD. A two-tailed paired Student t test was used for data comparison. MFI: Median Fluorescence Intensity.

*Study of the disruptive role of proline in the RB49 chimerization process*

Thermic denaturation studies

To understand the influence of proline in the stability of RB49, we performed thermal denaturation experiments. We obtained two inflection temperatures  $T_{i1}$  and  $T_{i2}$  for xiRB49 and xiRB49-P125T reflecting two transition states in protein unfolding. (Figure 4A). For  $T_{i1}$ , reflecting the CH2/CH3 domain denaturation, no difference was observed between xiRB49  $T_{i1} = 74.4^{\circ}\text{C}$  and xiRB49-P125T  $T_{i1} = 74^{\circ}\text{C}$ . In contrast, for  $T_{i2}$ , reflecting the Fab denaturation, a marked difference of  $4.1^{\circ}\text{C}$  was observed between the xiRB49,  $T_{i2}=85.7^{\circ}\text{C}$  and the xiRB49-P125T,  $T_{i2}=89.8^{\circ}\text{C}$ . These results underlined that P125 induced a structural instability in chimeric Fab domain (Figure 4B)<sup>20</sup>. Thermal denaturation experiment was also performed on RB49 and presented in Supplemental Figure 4. Because of its different amino acid composition, it is however difficult to compare it to chimerics antibodies formats.

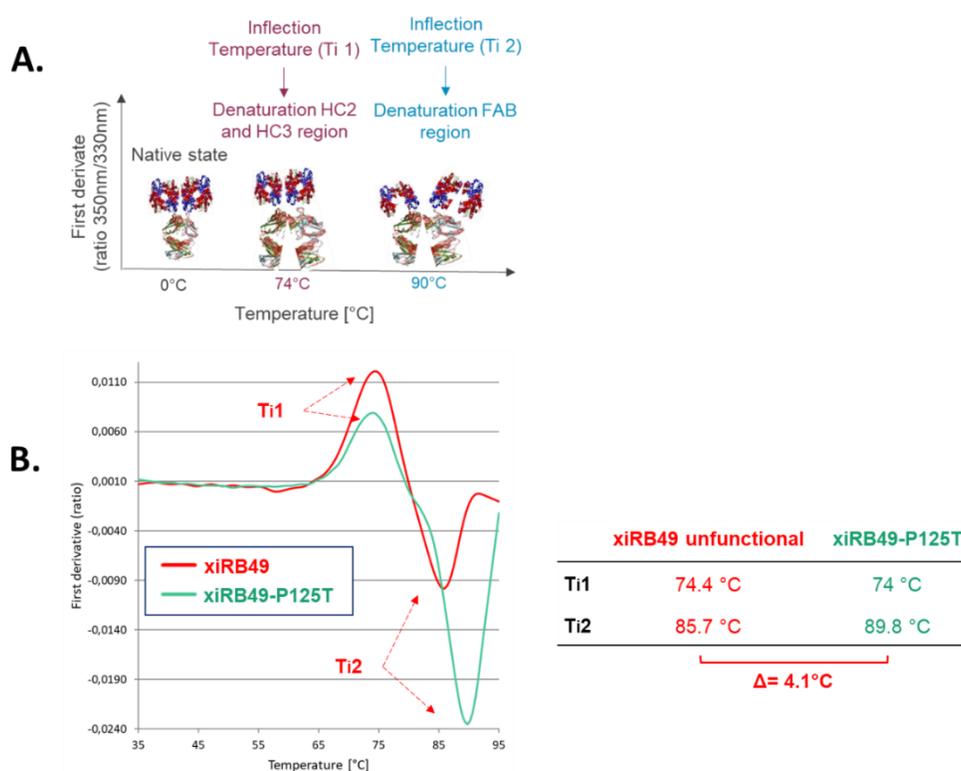
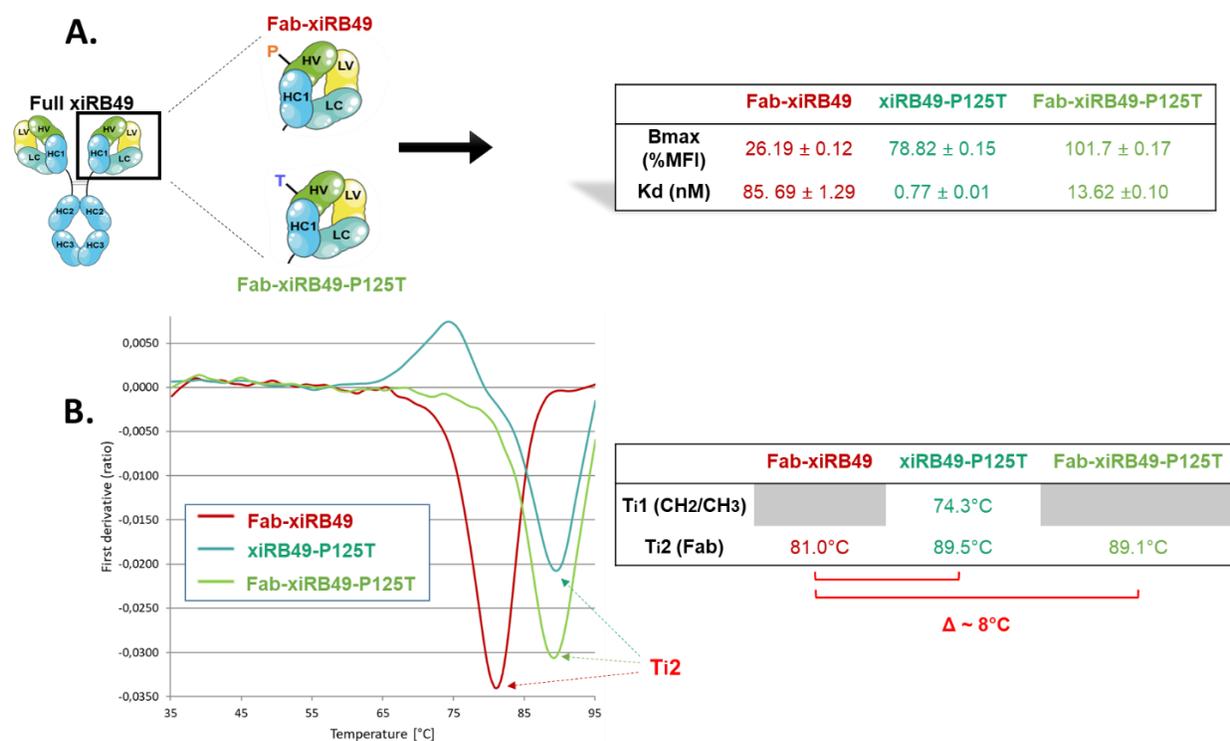


Figure 4. **Temperature curve comparison of the xiRB49 and the xiRB49-P125T by Tycho NT.6:** (A.) Schematic representation of the inflection temperature and the corresponding denatured protein region. (B.) First derivated (ratio A350nm/A330nm) of the first xiRB49 (red) and the xiRB49-P125T (green) and its summary inflection temperature ( $T_i$ ) table obtained by Tycho NT.6. HC: Heavy Constant Chain;  $T_i$ : inflection temperature.

## Fab format studies

To explore the Fab domains, we produced both Fab-xiRB49 and Fab-xiRB49-P125T fragments. As expected, the Fab-xiRB49-P125T was fully functional displaying a high affinity, 13.6 nM, a Bmax value of 101.7 %MFI and a Ti2 89.1°C in correlation with the full-length mAb xiRB49-P125T values. Surprisingly, whereas one would expect it to be non-functional, Fab-xiRB49 displayed a reduced functionality with an affinity of 85.7 nM, a low Bmax of 26.2 and a Ti2 81.0°C. The Ti2 of Fab exhibited an increase difference of 8°C pointing to increased instability in the unmutated chimeric Fab (**Figure 5**).



**Figure 5. Flow cytometer and temperature curve comparison of the Fab-xiRB49 and the Fab-xiRB49-P125T:** (A.) Kd and Bmax summary table of the Fab-xiRB49 (red), Fab-xiRB49-P125T (green) and positive xiRB49-P125T (green/blue) (B.) First derivated (ratio A350nm/A330nm) of the first Fab-xiRB49 (red), the Fab-xiRB49-P125T (green), the xiRB49-P125T (green/blue) and its summary inflection temperature (IT).

## *Molecular insights from in silico studies*

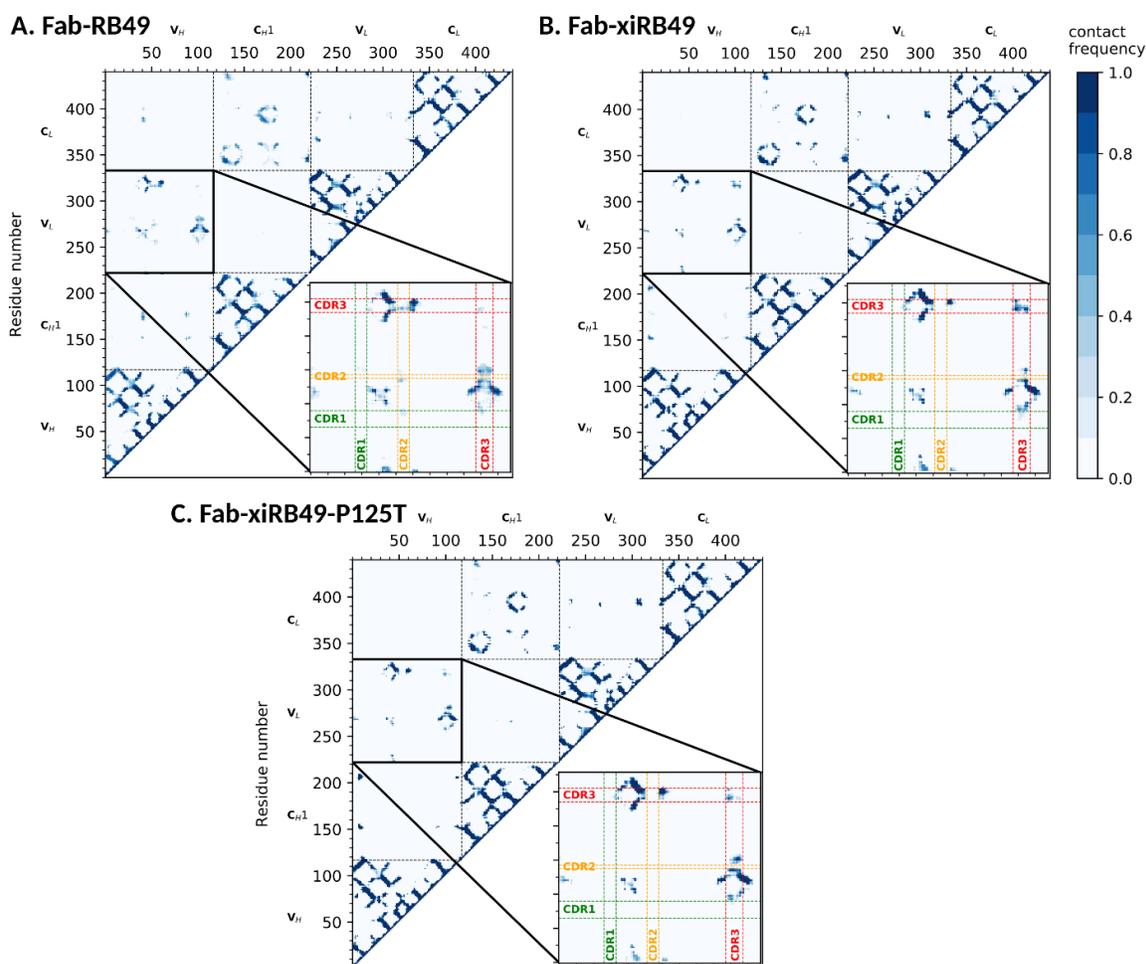
### *In silico* studies

In order to investigate the relationship between the activity loss of xiRB49 and its structure, we performed accelerated molecular dynamics (aMD) simulations on the RB49, xiRB49 and xiRB49-P125T Fabs, for a total of 10.5  $\mu$ s of simulation.

For each system, average contact maps using a C $\alpha$  distance threshold of 12 Å (see Materials and Methods section) were computed. **Figure 6** shows that, although the contact maps for the three systems are pretty similar, there are some relevant differences in the contacts between the variable regions of the heavy and light chains. In particular, we can observe that the Fab-xiRB49 heavy and light chains CDR3 (H-CDR3 and L-CDR3, respectively) are in contact during most of the simulation time (**Figure 6 B**), while these contacts are absent during the simulations of the Fab-RB49. For what concerns the Fab-xiRB49-P125T (**Figure 6 C**), we could observe a residual contact between H-CDR3 and L-CDR3. However, it does not involve the whole CDR3s as for the Fab-xiRB49 and its contact frequency is lower than that of this latter, indicating a less stable contact. This is also visible in [supplemental Figure 5](#), showing the probability distributions of the H-CDR3 and L-CDR3 center of mass (c.o.m) distances for the three considered systems. For the three systems, we observed a bimodal distribution of the distance between H-CDR3 and L-CDR3 centers of mass, indicating two relative conformations for these CDRs. However, for Fab-RB49 the two CDR3 are quite distant, with one major conformation showing an average c.o.m. distance of  $\sim 25$  Å and the second one with a  $\sim 18$  Å distance. Conversely, Fab-xiRB49 has a prevalent conformation where the two CDRs are quite close, with a c.o.m. distance of  $\sim 11$  Å. Finally, Fab-xiRB49-P125T has a high probable conformation with a c.o.m. distance of  $\sim 17$  Å, and only a minor conformation where the two CDRs are in contact.

In addition, the Fab-RB49 H-CDR3 seems to be closer to residues close to the L-CDR2 for half of the simulation time, while this contact has a lower frequency for Fab-xiRB49. The P125T mutation seems to increase the stability of this contact, suggesting that thanks to the mutation the Fab-xiRB49-P125T CDRs assume a conformation closer to those of Fab-RB49.

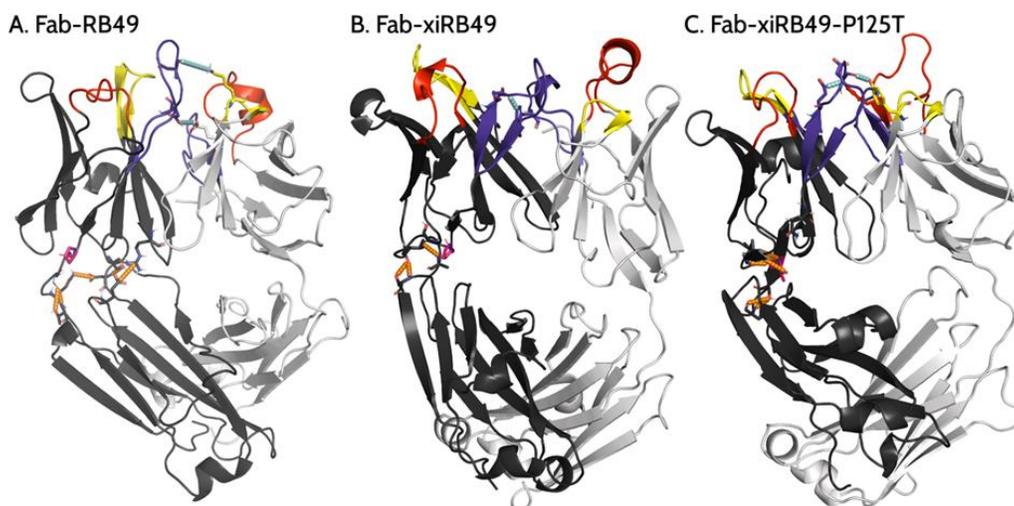
These results indicate that the chimerization of Fab-RB49 induces a structural change that affect the relative conformations of the heavy and light chains CDR3, which might be responsible of the loss of the affinity of xiRB49 for ET<sub>B</sub>. Indeed, it is known that CDR3 play a fundamental role in the antigen recognition. Conversely, the P125T mutation on xiRB49 alters the xiRB49 inactive conformation, switching to a structure closer to that of RB49.



**Figure 6. Average contact maps for A) RB49 Fab, B) xiRB49 Fab and C) xiRB49-P125T Fab.** The contact maps were obtained by averaging over the three aMD runs performed for each system and by imposing a C $\alpha$  distance threshold of 12 Å. The heavy and light chains CDRs are highlighted in green (CDR1), yellow (CDR2) and red (CDR3). The numbering of amino acids does not correspond to the IMGT one, but it follows the simulation package sequential numbering (heavy chain variable region: res. 1-118; heavy chain CH1: res. 119-220; light chain variable region: res. 221-332; light chain constant region: res. 333-440.).

We further investigated how the chimerization can lead to the observed structural change and, more interestingly, how a single point mutation might be able to restore the affinity for ET<sub>B</sub>. Thus, we performed an analysis of the hydrogen bonds network on the simulations performed on the three considered Fabs (see Materials and Methods section for details). This analysis highlighted the presence of a network of stable hydrogen bonds involving the heavy chain variable region (where the P125 is located) and the heavy chain constant regions (**Figure 7** and **Table S1**) of Fab-RB49. In details, we could observe a highly stable (occupancy > 70 %) hydrogen bond between S96 and D188, a stable (occupancy > 40 %) hydrogen bond between A128 and T131, and a poorly stable (occupancy ~ 20%) hydrogen bond between S127 and A129 or K130 (**Figure 7A**, in orange). In addition, for this Fab we observed a stable hydrogen bond (occupancy ~ 60 %) between H-CDR3 E107 and light chain E40, which is immediately after the L-CDR1, and an additional interaction between H-CDR3 D109 and L-CDR2 K56, whose stability depends on the simulation (in cyan in **Figure 7A**). This, together with globally stabilizing the relative conformation of these regions, might allow to properly orient the H-CDR3, which involves residues C104-W118, ultimately allowing the recognition of ET<sub>B</sub>. On the contrary, this same analysis performed on the simulations on Fab-xiRB49 (**Table S2**) showed that the hydrogen bonds network surrounding P125 is significantly reduced as compared to Fab-RB49, except for two highly unstable (occupancy ~ 20 %) hydrogen bonds between the heavy chain variable region V13 and the heavy chain constant region S208, only present in one out of the three simulations, and between the heavy chain variable region S127 and the heavy chain constant region A129 (**Figure 7B**, in orange). This is probably due to the fact that most of the sequence differences between the chosen mouse and human heavy chain constant regions are localized at their N-termini: for example the hydrogen bond between S96 and D188 cannot be established in xiRB49, because at this position there is a glycine instead of an aspartate (**supplemental Figure 6**). Moreover, conversely to this latter, for Fab-xiRB49 we observed the presence of a stable hydrogen bond (occupancy > 50%, in cyan in **Figure 7B**) between H-CDR3 (E107) and L-CDR3 (W116), further confirming the proximity of these two regions and the alteration of their relative conformation. The P125, which is an amino acid known to have a relevant effect on peptides and proteins structures, and the changes within the hydrogen bonds networks, might be responsible of the

observed Fab-xiRB49 conformational change as compared to Fab-RB49, leading to the loss of the ET<sub>B</sub> recognizing capabilities. Conversely, the P125T mutation on Fab-xiRB49 allows at some extent to recover some stable interactions in the region structurally close to the mutation (**Table S3**): a highly stable interaction (occupancy of ~ 70 %) between S127 and A129, and an extremely stable interaction (occupancy > 90 %) involving T125 and A11 and, in one simulation, an additional one between T125 and V13, respectively (**Figure 7C**, in orange). Moreover, for Fab-xiRB49-P125T, although in two out of the three simulations the hydrogen bond between the H-CDR3 E107 and the L-CDR3 W116 is still observable, we could notice hydrogen bonds between H-CDR3 and L-CDR2 or L-CDR1 similar to those observed for the Fab-RB49, for example the interaction between H-CDR3 D109 and L-CDR2 Y55 or K56 and between H-CDR3 E107 and L-CDR1 Y38 (E40 in Fab-RB49) in one simulation (**Figure 7C**, in cyan), or that between H-CDR3 R106 (E107 in Fab-RB49) and the light chain E40 in the two simulations. Altogether, this alters the xiRB49-P125T H-CDR3 orientation and the might influence the recovery of the binding affinity for ET<sub>B</sub>.



**Figure 7. Representative structures of the most populated cluster of (A) Fab-RB49, (B) Fab-xiRB49, and (C) Fab-xiRB49-P125T.** The heavy chain and the light chain are represented in dark and light grey, respectively. CDR1, CDR2 and CDR3 are colored in red, yellow and purple, respectively. The residue in position 125 (either proline or threonine) is represented as ball and sticks and colored in magenta. The hydrogen bond network within the region between the heavy chain variable and constant regions is indicated as orange dotted lines, while the interactions involving the H- and L-CDRs mentioned in the manuscript are indicated as cyan dotted lines. The indicated hydrogen bonds come from the analysis of the 3 simulations for each system.

It should be underlined that the simulations on the Fab-xiRB49-P125T were started from the manually mutated Fab-xiRB49, and they share the same constant regions. Therefore, it is not surprising that some of the Fab-xiRB49 contacts and structural features might persist during the simulations of the Fab-xiRB49-P125T. Nevertheless, it is remarkable that the structural effects of a single point mutation are already visible in the generated trajectories.

In addition, the presence of an additional hydrogen bond network in Fab-xiRB49-P125T might also explain its  $T_{i2}$  increase as compared to xiRB49  $T_{i2}$ . Indeed, it is known that the thermostability of proteins is positively affected by weak interactions: the higher the number of stable interactions are, the higher is the melting temperature (10.1006/jmbi.1997.1042).

## **Discussion**

As demonstrated in the present study, chimerization is not always an obvious process. Indeed, xiRB49, resulting from the coupling of the human IgG1 and Kappa isotypes to the RB49 variable regions, completely lost its capacity to bind ET<sub>B</sub>. Interestingly, Fab-xiRB49 presented a residual activity with apparent affinity 85.69 nM and a reduced Bmax 26.19 nM. We could observe that the stability of xiRB49 and its Fab are altered, as showed by their significant temperature shift in the  $T_{i2}$  (4°C and 8°C), which corresponds to the Fab denaturation. The amino acid composition analysis of the variable regions identified an unusual P125 in heavy variable region. The presence of a proline has a strong effect on the secondary structures of proteins<sup>19,21,22</sup>, because of the proline cis-trans isomerisation and the impossibility of this amino acid of forming hydrogen bonds involving the backbone nitrogen. No proline was detected in mouse germlines *IGHJ1*, *IGHJ2*, *IGHJ3*, *IGHJ4* encoding the framework 4. Our robust cloning strategy of RB49-encoding cDNAs confirms the presence of this P125, fully validated by the identical functionality of recombinant

RB49 and hybridoma-derived RB49<sup>23</sup>. As the RB49 was obtained by *in vivo* through genetic immunization, P was probably introduced by the affinity maturation process<sup>24</sup>. In order to further investigate this observation, we performed a single P125T mutation, since the threonine is the canonical amino acid in this position. This allowed both Fab and mAb formats to fully recover their ET<sub>B</sub> binding properties, indicating that P125 not only does not play an essential role, but it is even detrimental for the ET<sub>B</sub> recognition.

In addition, the dramatic impact of P125 on the RB49 stability and functionality is also evidenced by the inflection temperatures of xiRB49, xiRB49-P125T, Fab-xiRB49 and Fab-xiRB49-P125T. Indeed, Fab fragment Ti2 showed an impressive variation of 8°C between mutated and unmutated fragments.

In order to have a molecular picture explaining the structural role played by the P125, we performed accelerated molecular dynamics (aMD) simulations on the different Fabs for a total of 10.5 μs. Residues contact maps obtained from the analysis of the aMD trajectories showed the proximity of the CDR3 from the heavy and the light chain for the unfunctional Fab-xiRB49. This contact is not present for the functional Fab-RB49 and almost completely lost for the Fab-xiRB49-P125T. These results suggest a structural change affecting the conformations of the CDR3 from heavy and light chains during the chimerization process of RB49 resulting in its loss of affinity for ET<sub>B</sub>. The P125T mutation reestablish a structure closer to RB49 allowing xiRB49-P125T to recover its entire affinity for ET<sub>B</sub>. In order to understand how P125 is able to have this long range effect, we analyzed the simulations of the three systems by performing an analysis of the hydrogen bonds network around this position. We observed that Fab-RB49 is characterized by stable hydrogen bonds connecting the heavy chain constant and the variable regions, which might contribute to the relative orientation of the CDRs. Conversely, Fab-xiRB49 showed a significantly

weakened hydrogen bond network, since most of the sequence differences between the used mouse and human heavy chain constant regions are located at their N terminus.

Threonine within the Fab-xiRB49-P125T seems to re-establish a hydrogen bonds network between the amino acids surrounding the mutation and reorient the CDRs. This correlates well also with the thermostability curve. Indeed, the presence of weak interactions can also increase the proteins thermostability.

To conclude, we showed that RB49's isotype switch was inefficient because of a single amino acid. It could be interesting to explore if other antibodies may have a proline in the herein considered position and lose their affinity during a chimerization process. If so, this mutation could be helpful for the chimerization process of other antibodies. Indeed, we showed here that a single point mutation of P125 to threonine could be sufficient for a successful chimerization. This achievement opens the doors for future study around the xiRB49 humanization process.

## References

1. Rosanò, L., Spinella, F. & Bagnato, A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* **13**, 637–651 (2013).
2. Rosanò, L. & Bagnato, A. Endothelin therapeutics in cancer: Where are we? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **310**, R469–R475 (2016).
3. Weigert, A. *et al.* Fibrocytes boost tumor-supportive phenotypic switches in the lung cancer niche via the endothelin system. *Nat Commun* **13**, 6078 (2022).
4. Barton, M. & Yanagisawa, M. Endothelin: 30 Years From Discovery to Therapy. *Hypertension* **74**, 1232–1265 (2019).
5. Clozel, M. *et al.* Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* **365**, 759–761 (1993).
6. Kappes, L. *et al.* Ambrisentan, an endothelin receptor type A-selective antagonist, inhibits cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Sci Rep* **10**, 15931 (2020).
7. Tocci, P. *et al.* Targeting tumor-stroma communication by blocking endothelin-1 receptors sensitizes high-grade serous ovarian cancer to PARP inhibition. *Cell Death Dis* **14**, 5 (2023).
8. Herbet, A. *et al.* Antibodies Targeting Human Endothelin-1 Receptors Reveal Different Conformational States in Cancer Cells. *Physiol Res* S257–S264 (2018) doi:10.33549/physiolres.933848.
9. Allard, B. *et al.* Generation and characterization of rendomab-B1, a monoclonal antibody displaying potent and specific antagonism of the human endothelin B receptor. *mAbs* **5**, 56–69 (2013).
10. Borrull, A. *et al.* Rendomab B4, a monoclonal antibody that discriminates the human endothelin B receptor of melanoma cells and inhibits their migration. *mAbs* **8**, 1371–1385 (2016).
11. Kilany, L. A. A., Gaber, A. A. S., Aboulwafa, M. M. & Zedan, H. H. Trastuzumab immunogenicity development in patients' sera and in laboratory animals. *BMC Immunology* **22**, 15 (2021).

12. Durocher, Y., Perret, S. & Kamen, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res* **30**, E9 (2002).
13. Lyskov, S. *et al.* Serverification of Molecular Modeling Applications: The Rosetta Online Server That Includes Everyone (ROSIE). *PLOS ONE* **8**, e63906 (2013).
14. Waterhouse, A. *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* **46**, W296–W303 (2018).
15. Support | pymol.org. <https://pymol.org/2/support.html?#citing>.
16. Contributors to Amber. <https://ambermd.org/contributors.html>.
17. Maier, J. A. *et al.* ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3696–3713 (2015).
18. Grant, B. J., Rodrigues, A. P. C., ElSawy, K. M., McCammon, J. A. & Caves, L. S. D. Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics* **22**, 2695–2696 (2006).
19. Masiero, A. *et al.* The impact of proline isomerization on antigen binding and the analytical profile of a trispesific anti-HIV antibody. *mAbs* **12**, 1698128 (2020).
20. Voynov, V. *et al.* Dynamic Fluctuations of Protein-Carbohydrate Interactions Promote Protein Aggregation. *PLOS ONE* **4**, e8425 (2009).
21. Initiation of prolyl cis-trans isomerisation in the CDR-H3 loop of an antibody in response to antigen binding | Scientific Reports. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-16766-8>.
22. Propensity for cis-Proline Formation in Unfolded Proteins - Alderson - 2018 - ChemBioChem - Wiley Online Library. <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbic.201700548>.
23. Essono, S. *et al.* Peptide mass-assisted antibody cloning strategy for accurate characterization of potential therapeutic monoclonal antibodies against neurodegenerative diseases. *Protein Engineering, Design and Selection* **23**, 203–210 (2010).

24. Allard, B. *et al.* Electroporation-Aided DNA Immunization Generates Polyclonal Antibodies Against the Native Conformation of Human Endothelin B Receptor. *DNA and Cell Biology* **30**, 727–737 (2011).

## MATERIALS AND METHODS SUPPLEMENTAL DATA

### *Expression of RB49, xiRB49 and xiRB49-P125T:*

The remomab B49, targeting ET<sub>B</sub> receptor, was obtained by a novel gene immunization approach according to the laboratory protocol published in 2011<sup>1</sup>. The originality of this approach is to present endothelin receptors in a native conformation in an *in vivo* preclinical context. Thus, antibodies recognize native conformational receptor forms<sup>1-3</sup>.

Gene synthesis encoding the constant and variable sequences were synthesized by Eurofins Genomics Company. Then, sequences were subcloned into the pTT5 vector<sup>4</sup> by Sequence and Ligation Independent Cloning (SLIC) PCR described in Mamie *et al.*, 2012<sup>5</sup>.

Then, the DNA products were transformed in 1 mL of chemically competent TOP10 bacteria by a 30 seconds thermic shock at 42°C. Transformed bacteria were plated on LB containing ampicillin and incubated at 37°C overnight. Plasmids were extracted of the positives clones and purified using a minipreparation kit (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System A1340). DNA sequencing was performed.

The different constructions RB49, xiRB49, xiRB49-P125T, Fab-xiRB49 and Fab-xiRB49-P125T were expressed in ExpiCHO-S cells according to the manufacturer's instructions (ThermoFisher Cat # A29127). We followed the instructions of the "Max Titer Protocol" with the addition of 300µL of ExpiFectamin™-CHO-Enhancer and 8mL of ExpiCHO™-feed on day 1 and day 5 post-transfection. Cells were shifted to 32°C on day 1 post transfection. To clarify the cell culture supernatant day 12 post transfection, we centrifuged it at 4000 – 5000 x g for 30 minutes at 4°C and filtered the supernatant through a 0.22µm filter.

We purified the antibody production on a HiTrap Protein A HP column (GE Healthcare, Cat.17-0402-03). Following elution, we dialysed the antibody solution with Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette (Thermoscientific 66030) into 1L of 1X PBS.

### ***SDS-PAGE:***

To assess the quality and the purification of the proteins, we analyzed sample using the 4-15% mini protean® precast TGX™ (Tris-Glycine eXtended) Gels (BIORAD #4561083). Samples were treated in a different way, either with a non-reduced-buffer (Laemmli 2X REF) either with a reduced-buffer (Laemmli 2X REF and β-mercaptoethanol #161-0710). Samples were denatured at 95°C during 10 minutes and their migration on precast gels were performed at a constant voltage of 200 V during 15 minutes. Protein molecular weight was determined using the Precision Plus Protein™ Markers (Biorad #1610363).

### ***Protein sequences***

#### **Fab-RB49**

HC-RB49-Fab

QVQLQPGAALVKPGASVKLSCKASGYTFISYWMLWVKQRPGRGLEWIGRIDPDSGGTKYNEKFKSKATLTVDKSSST  
AYMQLSSLTSEDSAVYYCAREGDYAWFAYWGQGLVPSAAKTTTPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPV  
TVTWNQSGLSGGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDDKI

LC-RB49

DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKIS  
RVEAEDLGYYCFQGSHPWTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQ  
NGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

#### **Fab-xiRB49**

HC-xiRB49-Fab

QVQLQPGAALVKPGASVKLSCKASGYTFISYWMLWVKQRPGRGLEWIGRIDPDSGGTKYNEKFKSKATLTVDKSSST  
AYMQLSSLTSEDSAVYYCAREGDYAWFAYWGQGLVPSAAKTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV  
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKV

LC-xiRB49

DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKIS  
RVEAEDLGYYCFQGSHPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
QSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

#### **Fab-xiRB49-P125T**

HC-xiRB49-Fab

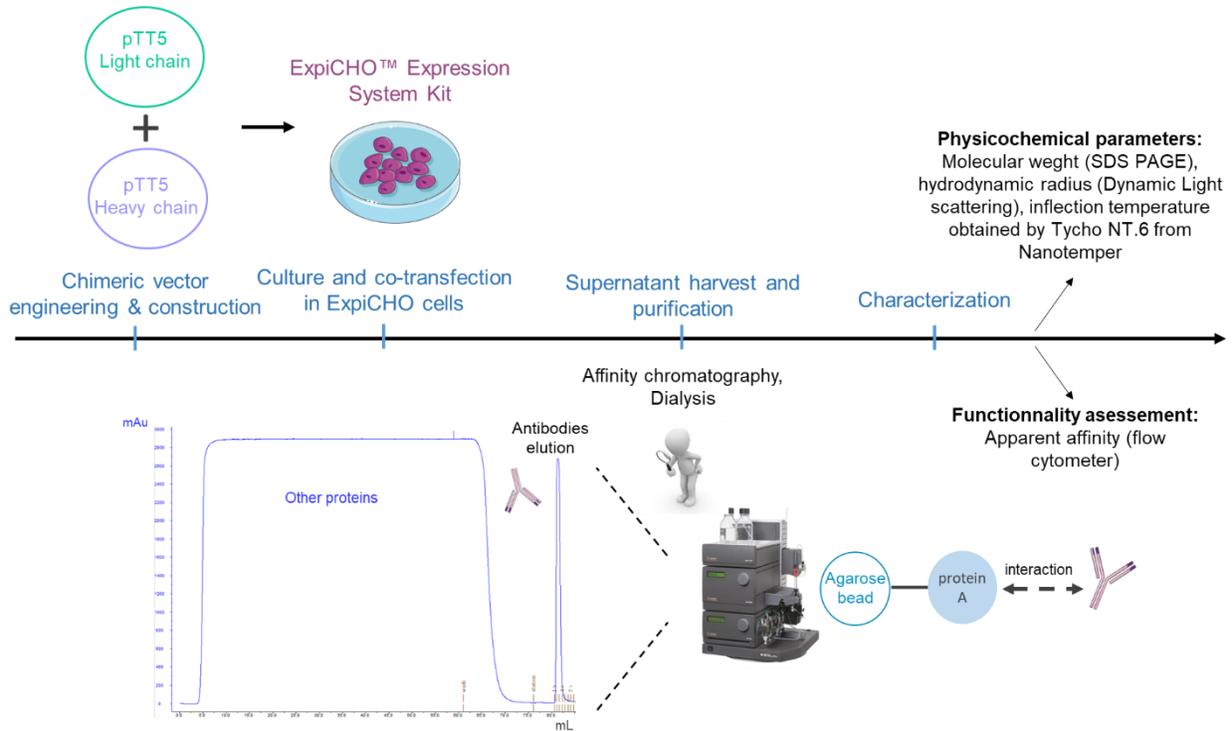
QVQLQQPGAALVKPGASVKLSCKASGYTFISYWMLWVKQRPGRGLEWIGRIDPDSGGTKYNEKFKSKATLTVDKSSST  
AYMQLSSLTSEDSAVYYCAREGDYAWFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  
VSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV  
LC-xiRB49  
DVLMTQTPLSLPVSLGDAQISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS  
RVEAEDLGYYCFQGSHPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

### ***Molecular dynamics simulations on RB49 Fabs***

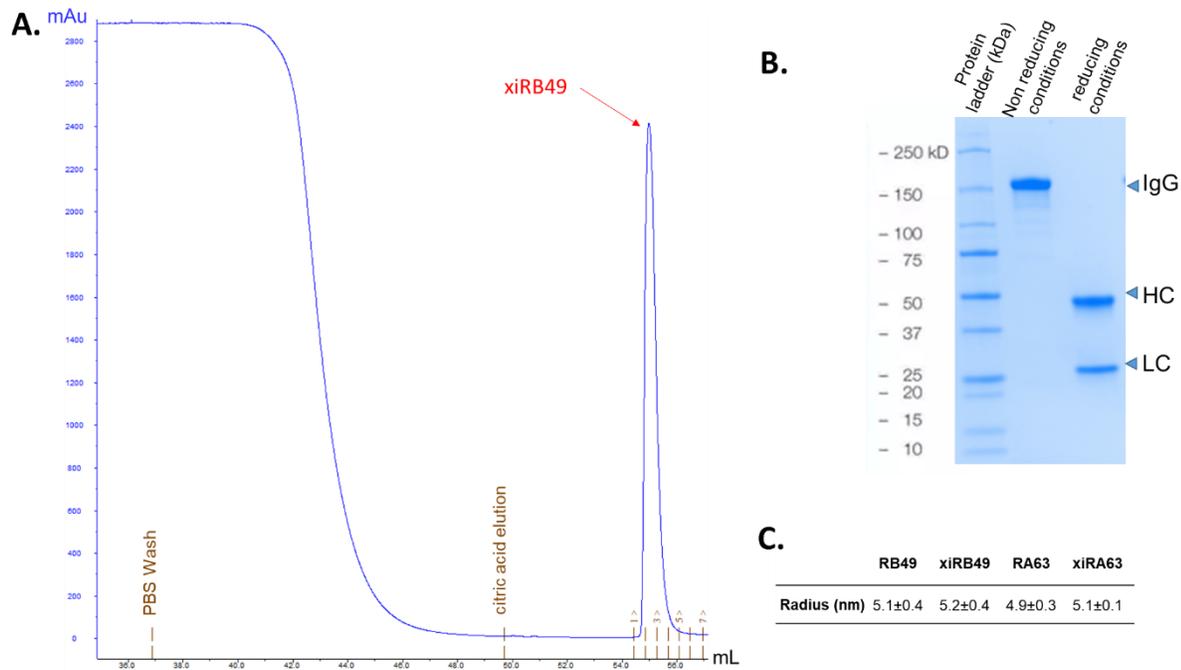
The modelled mouse, chimeric and mutated chimeric RB49 Fabs have been successively submitted to classical molecular dynamics (cMD) simulations. These were performed with the *pmemd.cuda* module of Amber20 package <sup>6</sup> using the ff14SB force field <sup>7</sup>. For each Fab, the total charge was neutralized by including an adequate number of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> ions and the systems were embedded in an octahedral TIP3P water box added up to a distance of 10 Å from the solute. Each system was then relaxed by optimizing the hydrogens geometry (1000 cycles of steepest descent and 5000 cycles of conjugated gradient), ions and water molecules (2000 cycles of steepest descent and 5000 cycles of conjugated gradient). The water box was equilibrated at 300 K by 100 ps of NVT and 100 ps of NPT simulation using a Langevin thermostat with a collision frequency of 2.0 ps<sup>-1</sup>. Then, we performed a minimization of side chains, water and ions by applying backbone restraints of 25 kcal/mol and a total minimization with backbone restraints of 10 kcal/mol (2500 cycles of steepest descent and 5000 cycles of conjugated gradient). Each system was then gradually brought to 300K in 6 steps of 5 ps each with an temperature increase step of 50 K, while backbone restraints were progressively reduced from 10 to 5 kcal/mol. A 100 ps NVT equilibration step followed by a 200 ps NPT equilibration step (backbone restraints = 5 kcal/mol) were performed. Successively, the backbone restraints were gradually removed by 100 ps NPT equilibration steps. Finally, 10 ns of unrestrained production at 300 K were performed to collect average potentials for the following accelerated MD (aMD) simulations. During the cMD simulations an electrostatic cutoff of 8.0 Å, a Berendsen barostat, PME for long-range electrostatic interactions and the SHAKE algorithm were applied.

Finally, for RB49 and xiRB49 Fabs 3 independent aMD runs of 1  $\mu$ s each were run, for a total of 3  $\mu$ s. Conversely, in order to better take into account for the single point mutation, for the p125t-xiRB49 Fab 3 independent aMD runs of 1.5  $\mu$ s each were run, for a total of 4.5  $\mu$ s.

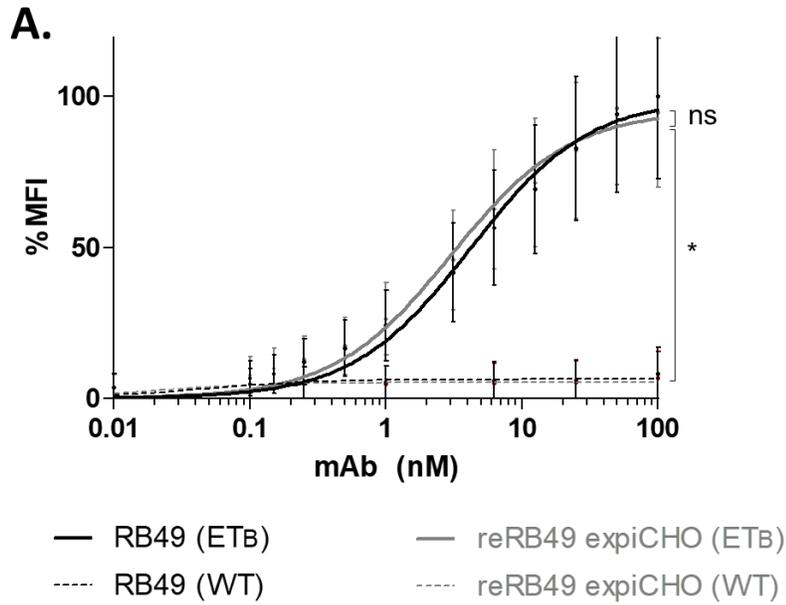
## SUPPLEMENTAL FIGURES AND TABLE



**Supplemental figure 1. Implemented protocol for antibody chimerization, production and validation.** To generate the xiRB49 Human the human constant light (Kappa) and heavy (IgG1) chain sequences of the trastuzumab were selected in the Drugbank and subcloned with a kozak sequence and the artificial signal peptide IL2 in the pTT5 expression vector <sup>5</sup>. Then, heavy and light variable chain regions of RA63 or RB49 were added to these expression plasmids. Vectors were cotransfected into ExpiCHO-S cells. Day 12 post transfection, supernatant was clarified and filtered. The harvest of the mAb was purified on a HiTrap Protein A HP column. Following elution, antibodies solutions were dialyzed into PBS. Samples purity and quality were assessed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), dynamic light scattering (DLS), denaturation thermic Tycho NT.6 from Nanotemper and by flow cytometry.



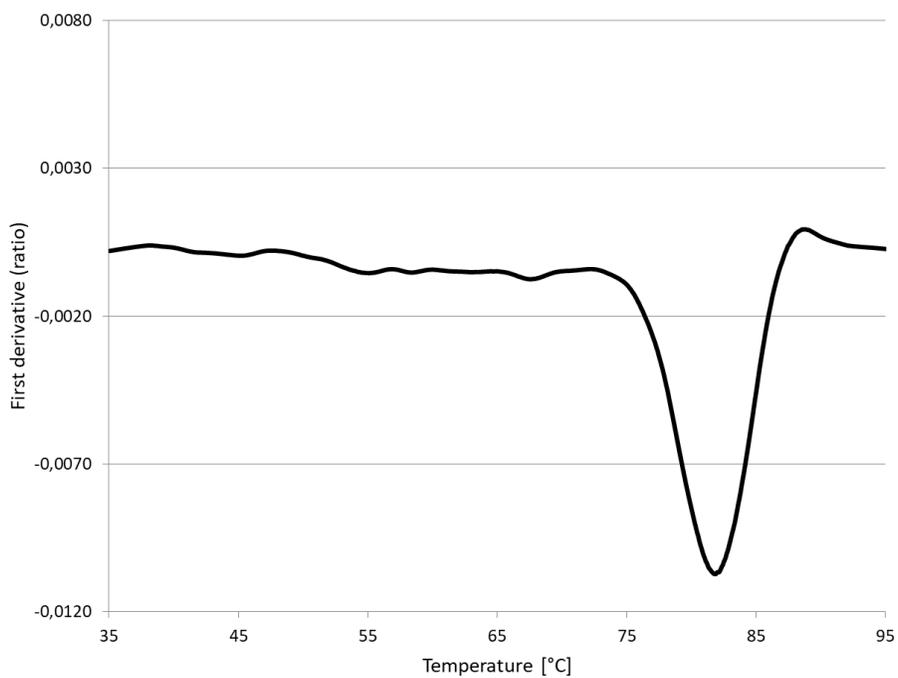
**Supplemental Figure 2. Assessment of the xiRB49 physicochemical parameters.** (A.) xiRB49 purification UV chromatogram (280nm) on A protein column. First signal corresponds to the whole nonspecific proteins due to the PBS wash. The second peak corresponds to the xiRB49 antibody elution caused by citric acid. (B.) SDS PAGE of the xiRB49 in native condition heated at 95°C during 5 minutes (left) and in reduced condition by  $\beta$ mercaptoethanol (right). We used the 1kb plus protein ladder on the left of the figure to compare the different molecular weights. (C.) Hydrodynamic radius of the xiRB49, RB49, xiRA63 RA63 obtained by DLS (n=3). Data are presented as mean  $\pm$  SD.



**B.**

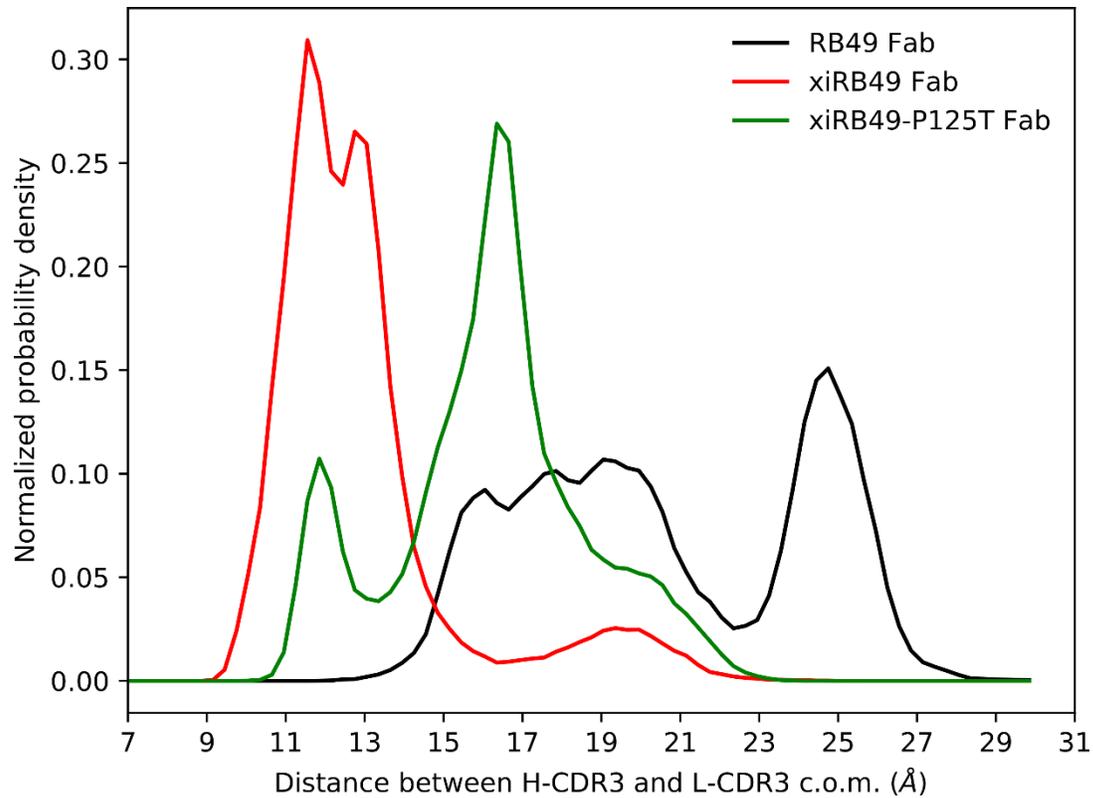
	Rendomab B49	Recombinant RB49 (reRB49)
<b>Bmax (%MFI)</b>	99.7 ± 0.1	95.7 ± 0.1
<b>Kd (nM)</b>	4.19 ± 0.02	3.04 ± 0,02

**Supplemental Figure 3. FACS binding curve of murine and recombinant RB49.** to exclude errors in the RB49 variable regions, we produced it in ExpiCHO cells. The binding curve of RB49 (black) and RB49 recombinant (reRB39) product in our system (grey) are similar. Both mAbs were ET<sub>B</sub> specific (solid line) as no signal was detected on CHO-WT (dotted line). Data presented as mean ± SD. MFI: Median Fluorescence Intensity.



RB49	
Ti1 (full antibody)	81.8°C
Ti2	

**Supplemental Figure 4. Temperature curve of the Rendomab B49 obtained by Tycho NT.6:** First derivated (ratio A350nm/A330nm) of the RB49 and its summary inflection temperature (Ti) table obtained by Tycho NT.6 . Ti: inflection temperature.



**Supplemental Figure 5. Probability distributions of the RB49 (black), xiRB49 (red) and xiRB49-P125T (green) H-CDR3 and L-CDR3 center of mass distances.**

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment
Fab-RB49 heavy chain      QVQLQQPGAALVKPGASVKLSCKASGYTFISYWMLWVKQRPGRGLEWIGRIDPDSGGTKY 60
Fab-xiRB49 heavy chain   QVQLQQPGAALVKPGASVKLSCKASGYTFISYWMLWVKQRPGRGLEWIGRIDPDSGGTKY 60
*****
Fab-RB49 heavy chain      NEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREGDYAWFAYWGQGLVPSAAK 120
Fab-xiRB49 heavy chain   NEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREGDYAWFAYWGQGLVPSAAS 120
*****
Fab-RB49 heavy chain      TTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQS-DL 179
Fab-xiRB49 heavy chain   TKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL 180
*.:***:***:*.:...:*****:*****:***:*.*****:*****.*
Fab-RB49 heavy chain      YTLSSSVTVPSSTWPSQTVCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC 220
Fab-xiRB49 heavy chain   YLSSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC 221
*:** *****: :** ** * *.*****: *:.
  
```

**Supplemental Figure 6. Sequence alignment of the Fab-RB49 and Fab-xiRB49 heavy chains.** The alignment has been obtained by Clustal Omega 1.2.4. \* indicate identical amino acids, highly conserved amino acids and . poorly conserved amino acids.

**Table S1. Fab-RB49 hydrogen bonds occupancies.**

Residue No.	Residue No.	Occ % (run 1)	Occ % (run 2)	Occ % (run 3)
S96 (heavy chain)	D188 (heavy chain)	72.2	76.4	
A128 (heavy chain)	T130 (heavy chain)	44.9	38.0	56.8
S127 (heavy chain)	A129/K130 (heavy chain)	35.4	24.0	27.7
E107 (heavy chain)	E40 (light chain)	60.0	58.6	
D109 (heavy chain)	K56 (light chain)	41.2	24.3	

**Table S2. Fab-xiRB49 hydrogen bonds occupancies.**

Residue No.	Residue No.	Occ % (run 1)	Occ % (run 2)	Occ % (run 3)
V13 (heavy chain)	S208 (heavy chain)	24.8	nd	nd
S127 (heavy chain)	A129 (heavy chain)	23.4	29.9	20.7
E107 (heavy chain)	W116 (light chain)	62.0	49.7	51.7

**Table S3. Fab-xiRB49-P125T**

Residue No.	Residue No.	Occ % (run 1)	Occ % (run 2)	Occ % (run 3)
S127 (heavy chain)	A129 (heavy chain)	68.3	72.9	70.8
A11 (heavy chain)	T125 (heavy chain)	97.0	97.4	97.3
V13 (heavy chain)	T125 (heavy chain)	93.8	nd	nd
E107 (heavy chain)	W116 (light chain)	65.1	59.2	nd
D109 (heavy chain)	Y55 (light chain)	31.7	nd	nd
D109 (heavy chain)	K56 (light chain)	29.8	nd	nd
E107 (heavy chain)	Y38 (light chain)	nd	nd	38.5

R106 (heavy chain)	E40 (light chain)	50.0	86.3	nd
--------------------	-------------------	------	------	----

## REFERENCE Supplemental data

1. Allard, B. *et al.* Electroporation-Aided DNA Immunization Generates Polyclonal Antibodies Against the Native Conformation of Human Endothelin B Receptor. *DNA and Cell Biology* **30**, 727–737 (2011).
2. Borrull, A. *et al.* Rendomab B4, a monoclonal antibody that discriminates the human endothelin B receptor of melanoma cells and inhibits their migration. *mAbs* **8**, 1371–1385 (2016).
3. Herbet, A. *et al.* Antibodies Targeting Human Endothelin-1 Receptors Reveal Different Conformational States in Cancer Cells. *Physiol Res* S257–S264 (2018) doi:10.33549/physiolres.933848.
4. Durocher, Y., Perret, S. & Kamen, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res* **30**, E9 (2002).
5. Li, M. Z. & Elledge, S. J. SLIC: A Method for Sequence- and Ligation-Independent Cloning. in *Gene Synthesis: Methods and Protocols* (ed. Peccoud, J.) 51–59 (Humana Press, 2012). doi:10.1007/978-1-61779-564-0\_5.
6. Contributors to Amber. <https://ambermd.org/contributors.html>.
7. Maier, J. A. *et al.* ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3696–3713 (2015).

### 3) *Études complémentaires*

Des expériences complémentaires de l'article discutant de la chimérisation de l'anticorps xiRB49 et de l'impact surprenant de la proline en position 125 ont été réalisées. Outre la perte d'affinité résultant de cette proline non canonique, les résultats obtenus suggèrent que la conformation de la région constante kappa du ThioFab-xiRB49-P125T est modifiée.

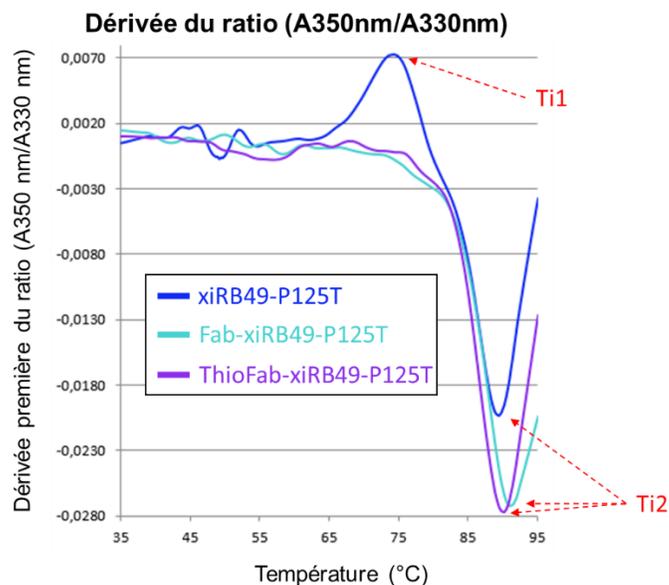
#### *a. Contexte du ThioFab-xiRB49-P125T*

Nous avons généré des formats d'anticorps brevetés appelés ThioFab. Ces fragments Fab portent une cystéine à la place d'une Alanine en position 121 située dans la région variable (mutation A121C).

#### *b. Paramètres physico-chimiques du ThioFab-xiRB49-P125T*

Après la construction des vecteurs nécessaires à sa production et sa purification, les propriétés physico-chimiques du ThioFab-xiRB49-P125T ont été déterminées. Le fragment ThioFab-xiRB49-P125T, comme le fragment ThioFab-xiRA63, présentait un poids moléculaire attendu de 50kDa avec une pureté tout à fait acceptable (> 95 %) évaluée par SDS PAGE. Le rayon hydrodynamique obtenu par DLS était d'environ  $2,6 \text{ nm} \pm 0,1 \text{ nm}$  et identique à celui de l'ensemble des Fabs obtenus (résultats non présentés).

Nous avons étudié la stabilité thermique des anticorps et obtenu des courbes de dénaturation thermique (Tycho NT, Nanotemper). Dans la **Figure 35** est présentée la dérivée première du ratio  $A_{350 \text{ nm}}/A_{330 \text{ nm}}$  des anticorps xiRB49-P125T, Fab-xiRB49-P125T et ThioFab-xiRB49-P125T, permettant l'obtention des températures d'inflexion ( $T_i$ ). Sans surprise, les trois anticorps montrent une même  $T_i$ , reflétant le domaine Fab de l'ordre de  $90^\circ\text{C}$ . Après avoir confirmé les propriétés physico-chimiques des différents fragments, leur fonctionnalité a été évaluée.

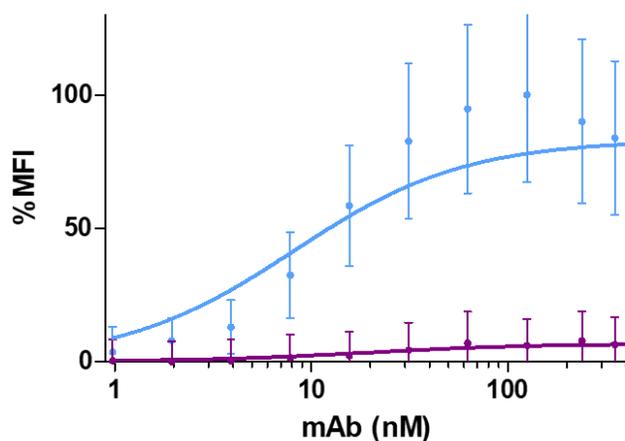


	xiRB49-P125T	Fab-xiRB49-P125T	ThioFab-xiRB49-P125T
Ti1 (CH2/CH3)	74°C		
Ti2 (Fab)	89.8°C	91,1°C	90,1°C

**Figure 35 :** Courbes de dénaturation thermique et températures d'inflexion  $T_{i1}$  et  $T_{i2}$  des anticorps xiRB49-P125T, Fab-xiRB49-P125T, et ThioFab-xiRB49-P125T.

*c. Etudes fonctionnelles des anticorps : détermination des courbes de liaison des anticorps sur  $ET_B$*

La fonctionnalité des anticorps Fab-xiRB49-P125T et ThioFab-xiRB49-P125T a été évaluée en réalisant des courbes de liaison par cytométrie en flux sur des cellules CHO- $ET_B$  (**Figure 36**). Nous avons montré, dans la **Figure 36**, que le Fab-xiRB49-P125T présente une forte affinité apparente de l'ordre du nanomolaire et un  $B_{max}$  proche de 83% MFI. De manière surprenante, aucune courbe de liaison n'a été obtenue pour le ThioFab-xiRB49-P125T alors que sa  $T_{i2}$  indique que son domaine Fab semble être replié de la même manière que l'anticorps et le Fab correspondants suggérant que le ThioFab devrait être fonctionnel. L'hypothèse que le ThioFab-xiRB49-P125T n'était pas reconnu par l'anticorps secondaire a été émise. En effet, dans cette expérience de liaison, les Fab sont révélés par un anticorps secondaire de chèvre polyclonal anti-Kappa-humain-AlexaFluor 488 (ref A18854). Il est possible d'envisager que la cystéine ajoutée en fin de région variable, position A121C, ait pu modifier cette interaction nécessaire à sa détection.



- Fab-xiRB49-P125T
- ThioFab-xiRB49-P125T

	Fab-xiRB49-P125T	ThioFab-xiRB49-P125T
<b>Kd (nM)</b>	8,17 ± 0,07	19,08 ± 0,7 → non fonctionnel?
<b>Bmax (%MIF)</b>	83,16 ± 0,13	6,75 ± 0,05 → non fonctionnel?

**Figure 36 : Courbes de liaison obtenue en cytométrie en flux des anticorps Fab-xiRB49-P125T, et ThioFab-xiRB49-P125T permettant la détermination de leur Kd apparent et de leur Bmax.**

#### *d. Validation fonctionnelle du ThioFab-xiRB49-P125T*

Afin de vérifier cette hypothèse, un test de compétition entre le xiRB49-P125T et le Fab-xiRB49-P125T ou le ThioFab-xiRB49-P125T a été élaboré (*cf.* Annexe-Partie matériel et méthode supplémentaire). Les cellules CHO-ET<sub>B</sub> ont été pré-incubées une nuit en présence de fragments Fab-xiRB49-P125T ou ThioFab-xiRB49-P125T à une concentration de 500 nM. Le lendemain et après lavage, le xiRB49-P125T est ajouté à des concentrations croissantes. Ainsi, 3 conditions sont testées (**Figure 37**) :

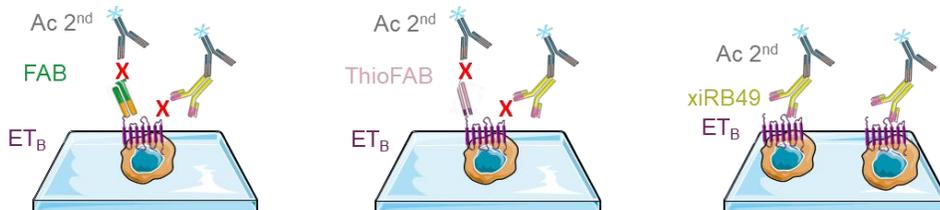
- Une condition de référence (témoin positif) avec les cellules CHO-ET<sub>B</sub> pré-incubées en présence de PBS (véhicule) et donc sans déplacement de signal lors de l'ajout de xiRB49-P125T à différentes concentrations.

- Une condition de témoin de validité du test de compétition. Le fragment Fab-xiRB49-P125T étant fonctionnel, il devrait interférer avec la fixation du xiRB49-P125T sur ET<sub>B</sub>. Ainsi, une plus forte concentration d'anticorps xiRB49-P125T sera nécessaire pour déplacer ce signal, ce qui aura pour conséquence la modification d'un Kd apparent.
- Une condition test avec le fragment ThioFab-xiRB49-P125T. Si l'effet observé avec la condition Fab-xiRB49-P125T est similaire à celui obtenu avec le ThioFab-xiRB49-P125T alors cet anticorps est fonctionnel mais non reconnu par l'anticorps secondaire anti-Kappa-humain.

#### Conditions test de compétition

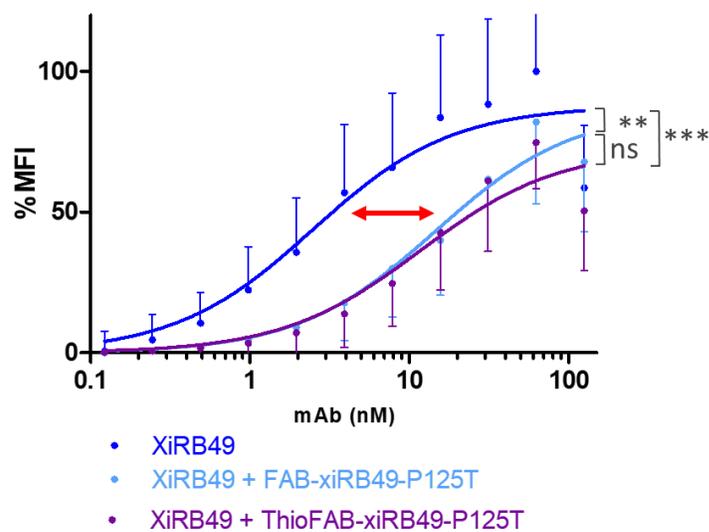
Protocole:

- ❖ incubation des Fabs (500nM) overnight 4°C
  - ❖ 3 lavages PBS
  - ❖ Ajout de la gamme xiRB49-P125T, incubation 4h – 4°C
  - ❖ 3 lavages PBS
  - ❖ Révélation anticorps secondaire de chèvre polyclonal anti-human-IgG-AF488 (H10120) 3h – 4°C
- [Fab-xiRB49 + xiRB49](#)   ➤ [ThioFab-xiRB49 + xiRB49](#)   ➤ [xiRB49](#)



**Figure 37 : Protocole du test de compétition.** Les cellules ont été pré-incubées toute une nuit à 4°C en présence d'un excès molaire (500nM) de fragments d'anticorps Fab-xiRB49-P125T ou ThioFab-xiRB49-P125T. Par la suite, la gamme témoin d'anticorps xiRB49-P125T a été ajoutée à chaque point de cellule. Les gammes lues par cytométries en flux ont été révélées par l'anticorps secondaire polyclonal de chèvre anti-IgG-humain couplé à l'Alexa Fluor488 (H10120) ne ciblant que les région Fc des anticorps. Dans l'ensemble de cette expérience, trois lavages au PBS 1X (pH :7,4) ont été réalisés entre chaque étape pour éliminer le signal non spécifique.

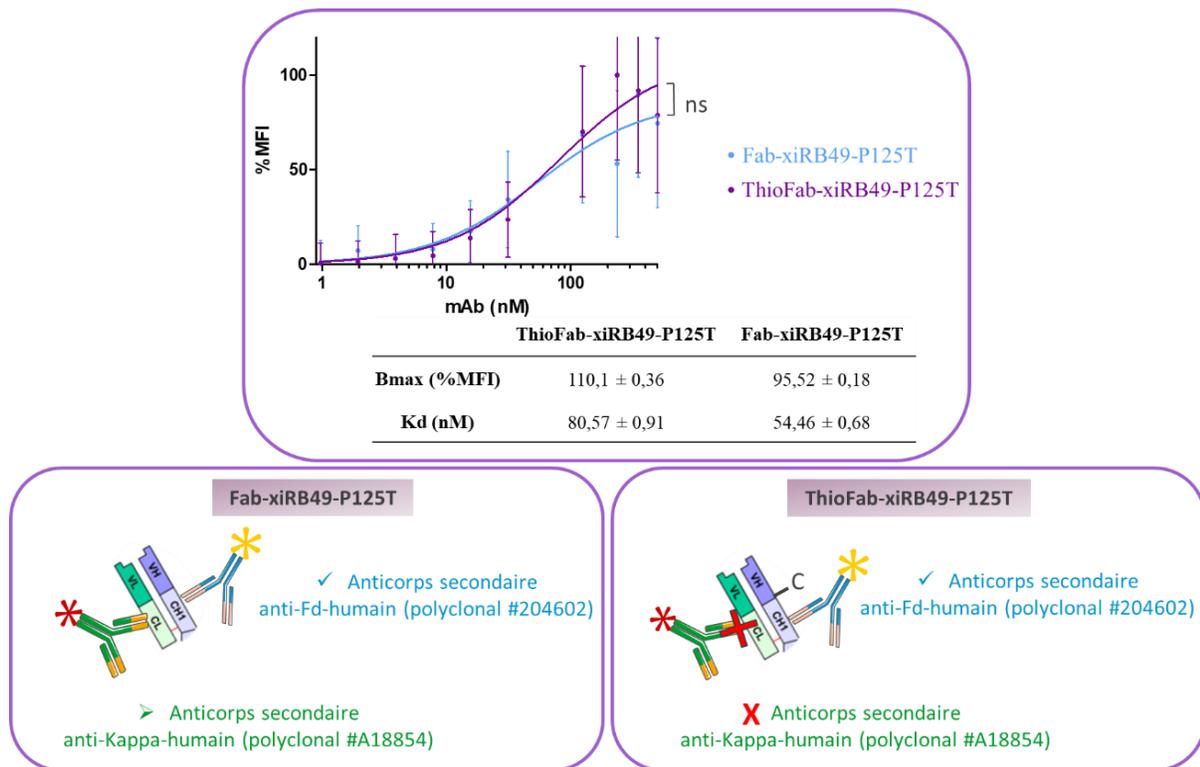
La **Figure 38** présente les résultats des courbes de liaison obtenues avec le test de compétition. Comme attendu, le Fab-xiRB49-P125T déplace bien le signal émis par le xiRB49-P125T avec une affinité apparente passant alors de 2,49 nM à 16,62 nM. De même, le ThioFab-xiRB49-P125T induit un déplacement équivalent du signal émis par le xiRB49-P125T avec un Kd apparent passant alors à 11,69 nM. Aucune différence significative n'est observée entre les deux conditions de compétition mettant en jeu le Fab-xiRB49-P125T et le ThioFab-xiRB49-P125T. Ce résultat prouve que l'anticorps ThioFab-xiRB49-P125T est bien fonctionnel comme le suggérait sa courbe de dénaturation thermique et sa température d'inflexion  $T_{i2}$ . Indirectement, l'absence de reconnaissance du ThioFab-xiRB49-P125T par un anticorps secondaire anti-Kappa-Humain-polyclonal suggère fortement que l'ajout de la cystéine modifie la conformation de la région constante Kappa. Il est important de noter que ce résultat n'est pas retrouvé pour le ThioFab-xiRA63.



	xiRB49	Fab-xiRB49-P125T	ThioFab-xiRB49-P125T
<b>Bmax (%MFI)</b>	87,78 ± 0,15	86,62 ± 0,21	72,62 ± 0,19
<b>Kd (nM)</b>	2,49 ± 0,02	16,62 ± 0,11	11,69 ± 0,09

**Figure 38 : Courbes de liaison obtenues par cytométrie en flux du test de compétition entre le xiRB49-P125T et le Thio-Fab-xiRB49-P125T ou le Fab-xiRB49-P125T.**

Un nouvel anticorps secondaire ciblant cette fois-ci la région Fd des anticorps (CH1+VH) a été utilisé pour valider la fonctionnalité du ThioFab-xiRB49-P125T. Cette fois-ci, le fragment d'anticorps initialement déstructuré est bien fonctionnel **Figure 39** avec un Kd apparent et un Bmax similaires au Fab-xiRB49-P125T. L'ensemble de ces résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle la Cystéine en position 121 modifie la région Kappa, qui n'est alors plus reconnue par un anticorps secondaire anti-Kappa-Humain-polyclonal.

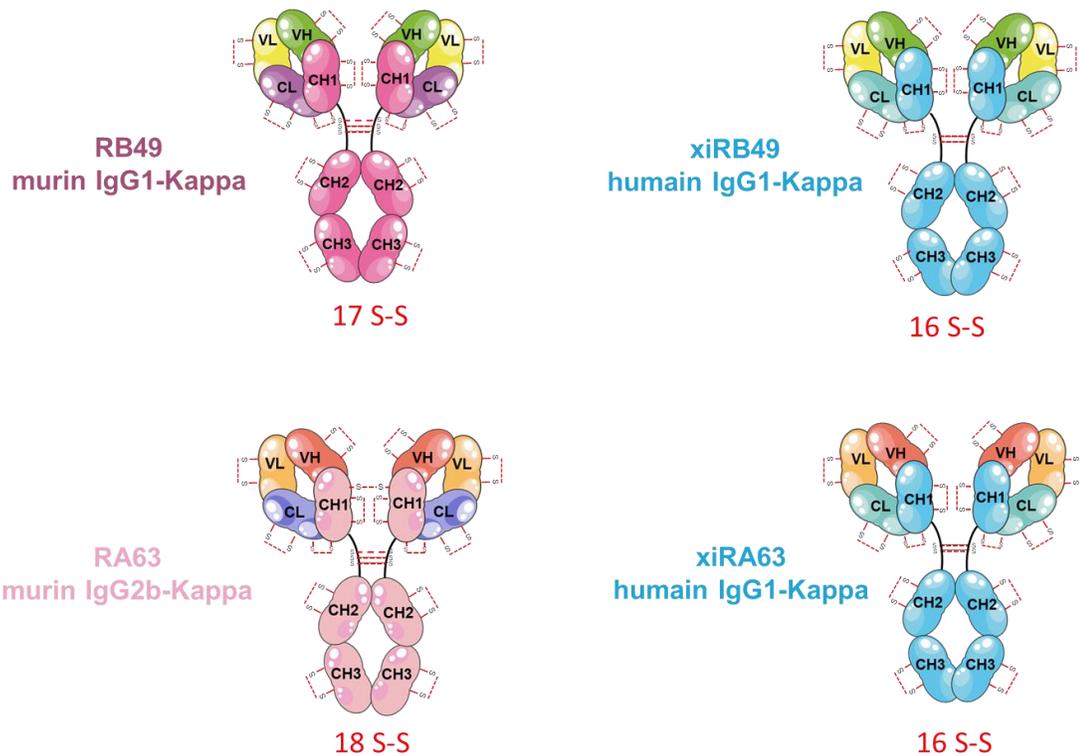


**Figure 39 : Courbes de liaison obtenues par cytométrie en flux avec un anticorps secondaire anti-Fd.** Schéma récapitulatif des anticorps secondaires reconnaissant les Fab-xiRB49-P125T et ThioFab-xiRB49-P125T

#### 4) Discussion et perspectives

La chimérisation d'un anticorps peut altérer voire abolir sa fonctionnalité comme observé pour xiRB49.

Les principaux problèmes structurels protéiques identifiés résident dans une liaison disulfure anormale<sup>224</sup>. Etrangement, le RB49 a un isotype murin IgG1 ayant des homologies structurelles avec l'IgG1 humaine supérieures à celles du RA63 dont l'isotype murin est IgG2b (**Figure 40**). Pourtant, le chimérique xiRA63 est fonctionnel. Les caractéristiques physico-chimiques du xiRB49 sont celles attendues en particulier le profil de dénaturation thermique, ne laissant préjuger en rien d'une modification des ponts disulfures.



**Figure 40 : Représentation schématique des anticorps RB49, xiRB49, RA63 et xiRA63 et de leurs isotopes.** La région constante de la chaîne lourde murine (CH) et la région constante de la chaîne légère murine (CL) sont représentées en rose et violet. Les régions constantes humaines sont, quant à elles, représentées en bleu et vert. Les liaisons disulfures sont représentées en rouge. RB49 : Rendomab B49 ; xiRB49 : Rendomab B49 chimérique; RA63 : Rendomab A63 ; xiRA63 : Rendomab A63 chimérique; VL : région variable légère ; VH : région variable lourde ; CL : Chaîne Constante Légère ; CH : chaîne constante lourde.

En s'intéressant aux acides aminés canoniques de la région variable de la chaîne lourde, la présence d'une proline en position 125, position normalement occupée par une thréonine, a été mise en évidence. Les prolines sont des acides aminés avec une géométrie atypique et pouvant perturber les structures secondaires des anticorps telles que les hélices alpha et feuilletts bêta des protéines<sup>285</sup>. C'est également le seul acide aminé qui n'est pas un accepteur de liaison hydrogène et qui peut subir une isomérisation *cis-trans*<sup>286,287</sup>. Nous avons remplacé la P125 par son acide aminé canonique à savoir une thréonine (P125T). Les anticorps chimériques ainsi modifiés : xiRB49-P125T et Fab-xiRB49-P125T redevenant pleinement fonctionnels.

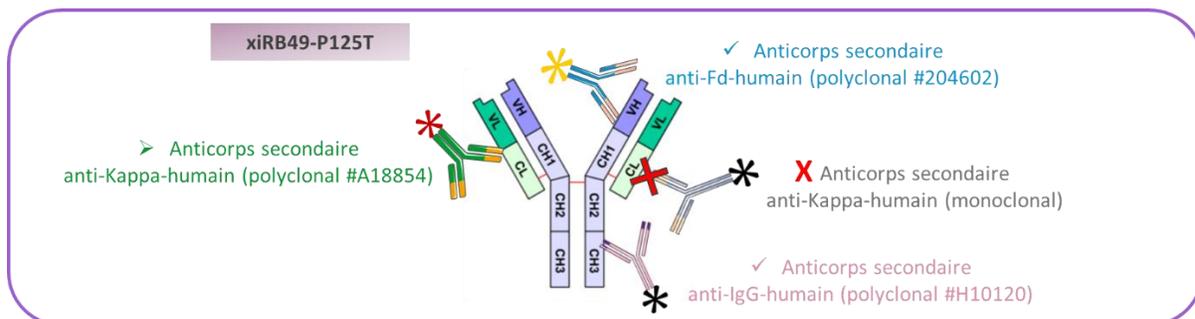
Les rendomabs résultent d'une stratégie d'immunisation génique *in vivo* permettant aux anticorps générés de subir les processus de maturation d'affinité<sup>275</sup>. Nous avons constaté l'absence de P à la position T125 dans les gènes *IGHJ1*, *IGHJ2*, *IGHJ3*, *IGHJ4* codant pour le Framework 4 des anticorps. Aussi, plusieurs hypothèses ont été formulées quant à la présence atypique de la P125 non répertoriée au sein des bases de données. Parmi ces hypothèses, le rôle important que pourrait jouer cette P125 dans la reconnaissance spécifique d'ET<sub>B</sub> a été investigué. La comparaison des séquences d'acides aminés du RB49 avec celles de deux autres anticorps associés au brevet<sup>281</sup>, à savoir le RB36 et le RB41, a été réalisée. Ces deux anticorps présentent des caractéristiques de reconnaissance de ET<sub>B</sub> très proches du RB49 mais ne possèdent pas de P125. RB49 présentant une affinité supérieure pour ET<sub>B</sub>, il est possible qu'elle contribue à l'affinité supérieure du RB49 pour ET<sub>B</sub>.

Afin de mieux comprendre le rôle structural joué par la proline, des simulations par dynamique moléculaire accélérée (DMA) des différents Fabs ont été effectuées. La différence majeure observée entre le Fab-RB49 et le Fab-xiRB49 non fonctionnel est la très grande proximité des CDR3 de la chaîne lourde et légère dans la version chimérique. Une seule mutation P125T reverse cette interaction des CDR3. Ces résultats suggèrent qu'au cours du processus de chimérisation du RB49, un changement structurel induit par la proline affecte la conformation initiale des CDR3 de la chaîne lourde et légère entraînant ainsi la perte de fonctionnalité du xiRB49 pour ET<sub>B</sub>.

Le réseau des liaisons hydrogène des trois fragments Fabs a été analysé. Le Fab-RB49 est caractérisé par un réseau de liaisons hydrogène stables semblant permettre une interaction entre la région constante de la chaîne lourde et les régions variables (VH et VL). Inversement, le réseau de liaisons hydrogènes du Fab-xiRB49 se voit complètement altéré et significativement affaibli

expliquant le potentiel impact de la proline sur l'orientation des CDR. La thréonine du Fab-xiRB49-P125T semble rétablir un réseau de liaisons hydrogènes entre les acides aminés entourant la mutation. Ainsi, il est possible d'envisager que ce réseau d'interaction puisse réorienter correctement les CDR. Ces résultats corrélerent ceux obtenus dans les expériences de dénaturation thermique car la thermo stabilité des protéines est en grande partie dépendante des interactions faibles établies entre les différents domaines protéiques.

Concernant le ThioFab-xiRB49-P125T, les résultats obtenus démontrent que l'ajout de la cystéine déstructure partiellement la région Kappa qui n'est alors plus reconnu par un anticorps secondaire polyclonal anti-Kappa-humain. Etrangement, cette déstructuration de la région Kappa n'est pas retrouvée pour le ThioFab-xiRA63 suite à l'insertion de la C121 suggérant un phénomène propre aux régions variables du RB49. L'hypothèse d'une conformation particulière de la région Kappa de l'anticorps xiRB49 a été explorée. D'autres expériences de cytométrie en flux ont été menées en utilisant différents anticorps secondaires polyclonaux ou monoclonaux. La **Figure 41** résume avec un schéma simplifié les résultats obtenus. Les anticorps secondaires polyclonaux reconnaissent l'anticorps xiRB49-P125T. Cependant, l'anticorps anti-Kappa-Humain-monoclonal ne reconnaît plus l'anticorps xiRB49-P125T confirmant ainsi une modification conformationnelle de sa région Kappa. Autrement dit, xiRB49-P125T est redevenu pleinement fonctionnel mais avec des modifications conformationnelles persistantes notamment dans la région constante Kappa. Finalement, ces résultats corroborent ceux présentés dans l'article 1. L'analyse de la carte de contact des anticorps de l'article 1 montrent un profil intermédiaire pour le xiRB49-P125T, se situant entre le profil du RB49 (fonctionnel) et celui du xiRB49 non fonctionnel. Il est important de noter que le xiRA63 est, quant à lui, reconnu par l'anticorps secondaire anti-Kappa-humain-monoclonal.



**Figure 41 : Schéma récapitulatif des anticorps secondaires reconnaissant xiRB49-P125T.**

Au regard de la position de la cystéine insérée, il n'est pas étonnant que celle-ci puisse amplifier des modifications conformationnelles de la chaîne Kappa sans altérer l'affinité du Fab pour le récepteur ET<sub>B</sub>.

Pour conclure, ces résultats soulignent la complexité structurelle du xiRB49-P125T qui sera à prendre en compte dans la projection d'une stratégie d'humanisation de ce dernier. Dans la partie 2 des résultats, nous présentons la remarquable efficacité thérapeutique du xiRB49-P125T couplé à un cytotoxique contre le développement du mélanome.

## II. Chapitre II : L'anticorps xiRB49-MMAE, un nouveau et puissant anticorps thérapeutique contre le mélanome

### 1) Introduction de l'étude

Ces dernières années, l'incidence des cas de mélanome et la mortalité associée à ce cancer n'ont cessé d'augmenter. En 2018, selon l'agence nationale de la santé publique, les patients atteignant le stade de mélanome métastatique (stade III et IV) présentent un très mauvais pronostic. Au niveau cellulaire, le mélanome se traduit par une prolifération incontrôlée des mélanocytes. Lorsque les mélanocytes anormaux et tumoraux se propagent au niveau du derme, ils vont, au travers des vaisseaux lymphatiques et sanguins, se disséminer dans tout le corps et coloniser de nouveaux organes. C'est ce qu'on appelle le mélanome métastatique. Selon les données de l'institut américain SEER et de l'Institut National contre le Cancer, l'INCA, dans le cas du mélanome, la survie globale observée à 5 ans pour une tumeur qui s'étend localement passe de 90 % à 62 % puis à seulement 15 % pour les patients atteints de formes métastatiques qui jusqu'à peu ne connaissait aucune solution thérapeutique<sup>288,289</sup>.

Récemment, des nouvelles immunothérapies inhibitrices des *immune-checkpoints* ont émergé donnant ainsi un nouvel essor à la lutte antitumorale et plus particulièrement contre le mélanome. L'utilisation de cette nouvelle classe prometteuse d'anticorps thérapeutiques, tels que l'ipilimumab et le nivolumab, est restreinte aux patients n'exprimant que certains biomarqueurs et ne développant pas d'auto-immunité délétère. Ces limitations ne permettent pas une couverture intégrale des patients atteints de tumeurs hétérogènes telles que le mélanome métastatique. On estime qu'environ 30 à 40% des patients sont éligibles aux immune checkpoints et environ 13% sont répondeurs<sup>171</sup>. Dès lors, il convient de développer de nouveaux anticorps capables de cibler de nouveaux biomarqueurs afin d'améliorer la survie d'un maximum de patients.

Il s'avère que le récepteur ET<sub>B</sub> a été retrouvé surexprimé dans plusieurs lignées de mélanome humain<sup>95</sup>. Par exemple, la surexpression du récepteur de type B a été associée à une augmentation de l'incidence de métastases cérébrales<sup>142</sup>. De plus, une forte expression du gène *EDNRB* est généralement associée à un mauvais pronostic pour les patients atteints de mélanome<sup>172,290</sup>.

Ce biomarqueur alors considéré comme une cible thérapeutique majeure du mélanome a fait l'objet de nombreuses études précliniques et cliniques. Par exemple, l'utilisation des antagonistes

mixtes tels que le bosentan (antagoniste mixte ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>) ou le BQ788 (antagoniste spécifique de ET<sub>B</sub>) ont permis *in vitro* et *in vivo* de diminuer la croissance tumorale en provoquant l'apoptose des cellules tumorales et en inhibant leur prolifération cellulaire.<sup>179,291</sup> Un essai clinique a mis en évidence la stabilisation du mélanome métastatique chez 20 % des patients après traitement au bosentan<sup>154</sup>. Cependant, lors d'une deuxième étude clinique, la combinaison du bosentan avec un agent de chimiothérapie n'a pas mis en évidence d'efficacité supplémentaire et d'effet synergique<sup>162</sup>. Au vu des résultats mitigés obtenus avec les antagonistes ciblant les ETR, les efforts se sont concentrés sur le développement de nouvelles macromolécules capables de cibler les récepteurs de l'axe endothéline.

Les anticorps monoclonaux (AcM) occupent désormais une place conséquente dans l'arsenal thérapeutique antitumoral. Dans ce contexte, notre laboratoire a développé et breveté un anticorps monoclonal ciblant l'ET<sub>B</sub> : le Rendomab B49 (RB49) aux caractéristiques remarquables en termes d'affinité (de l'ordre du nanomolaire), de haute spécificité pour ET<sub>B</sub> et de cinétique d'internalisation au sein de la cellule<sup>273,281</sup>. L'ensemble de ces propriétés a permis de développer un ADC correspondant à un anticorps conjugué à une molécule cytotoxique active après son internalisation cellulaire. Cet ADC va cibler spécifiquement la cellule tumorale à savoir le mélanome pour déclencher sa mort cellulaire.

Dans ce contexte, le Rendomab B49 (RB49) a été conjugué à la molécule cytotoxique Monométhyl Auristatine E (MMAE). Cette molécule cytotoxique est un puissant antimétabolite dérivé de la Dolastatine et qui agit en inhibant l'assemblage des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  en microtubules. Dans notre cas, la MMAE est portée par le bras décrit par la société Seattle Genetics et déjà largement utilisé en clinique<sup>264</sup>. Il comporte un bras espaceur portant le site peptidique Valine-Citrulline (ValCit), et clivable par des protéases lysosomales de type cathepsine B. Ainsi la MMAE n'agit qu'au niveau cytoplasmique dans la cellule ciblée par l'anticorps et ne risque pas de se retrouver libre dans la circulation, ce qui limite de manière significative les effets indésirables. La conjugaison du MMAE sur l'anticorps est réalisée par le groupement maléimide réagissant sélectivement avec les fonctions thiols des cystéines<sup>262</sup>.

Comme évoqué dans la partie précédente, le RB49 a été chimérisé donnant alors le xiRB49-P125T. Dans l'article et la suite du manuscrit, la nomenclature a été simplifiée et le xiRB49-P125T correspond désormais au xiRB49 pour faciliter la lecture. Dans cet article, nous avons évalué

l'efficacité thérapeutique du xiRB49-MMAE dirigé contre une conformation d'ET<sub>B</sub> particulièrement présente à la surface des cellules tumorales du mélanome.

2) *Article pour soumission dans Journal for Immunotherapy of cancer ~ avril 2023*

Etat de la publication : En cours de soumission (estimation de la soumission en Avril 2023) dans Journal for Immunotherapy of cancer (IF :13.75)



**« Potent anti-melanoma activity induced by an antibody drug conjugate targeting the activated allosteric endothelin B receptor »**

\*<sup>1</sup>Marie Hautiere, \*<sup>1</sup>Amaury Herbet, <sup>1</sup>Frederic Jean-Alphonse, Delphine Vivier, Christophe Leboeuf, Narciso Costa, Aloïse Mabondzo, Guilhem Bousquet, Franck Denat, Eric Reiter, Didier Boquet

Corresponding author: [didier.boquet@cea.fr](mailto:didier.boquet@cea.fr)

## ABSTRACT

**Background** Endothelin type A (ET<sub>A</sub>) and B (ET<sub>B</sub>) receptors are one of the drivers of tumor progression in many cancers. Inhibiting their signaling pathways with antagonistic drugs has been the subject of numerous clinical trials, unfortunately without success probably due to the high endothelin concentrations in the tumor microenvironment and their unusual high affinity for their receptors. In this context, we have developed a monoclonal antibody targeting ET<sub>B</sub>: randomab B49 (RB49) with remarkable characteristics to develop a therapeutic antibody conjugated to monomethyl auristatin E (MMAE). In this article, we characterized and evaluated the therapeutic efficacy of the chimeric antibody drug conjugated xiRB49-MMAE with high preferential affinity for the activated conformation of human ET<sub>B</sub>, obtained after binding its ligands, and displayed on the surface of melanoma tumor cells.

**Methods** We assembled the chimeric RB49 (xiRB49) and compared to RB49 its binding properties and pharmacological properties. We then conjugated monomethyl auristatin E (MMAE) with xiRB49 (xiRB49-MMAE) and evaluated its therapeutic potential on cellular model and on xenografted preclinical model. At last, for clinical applications, its use for patient stratification analyzed, in a first stage approach, by immunohistochemical (IHC) analysis of melanoma patient biopsies.

**Results** xiRB49 retains all the properties of the RB49 antibody. Namely, i) a very high affinity for the ET<sub>B</sub> conformation present on melanoma tumor cells, ii) a high specificity for ET<sub>B</sub>; iii) no displacement of xiRB49 binding even in the presence of very high endothelins concentration, iv) an ability to be internalized in cells, v) no major pharmacological properties. XiRB49-MMAE exhibited remarkable efficacy against human melanoma cell line and ET<sub>B</sub> positive xenograft tumor models. Moreover, IHC studies shown that 100 % on lymph nodes biopsies melanoma patient were positive and no labelling was observed on healthy tissues.

**Conclusion** xiRB49-MMAE is a very promising drug candidate currently in development for future clinical applications for patients with ET<sub>B</sub> positive tumors as metastatic melanoma.

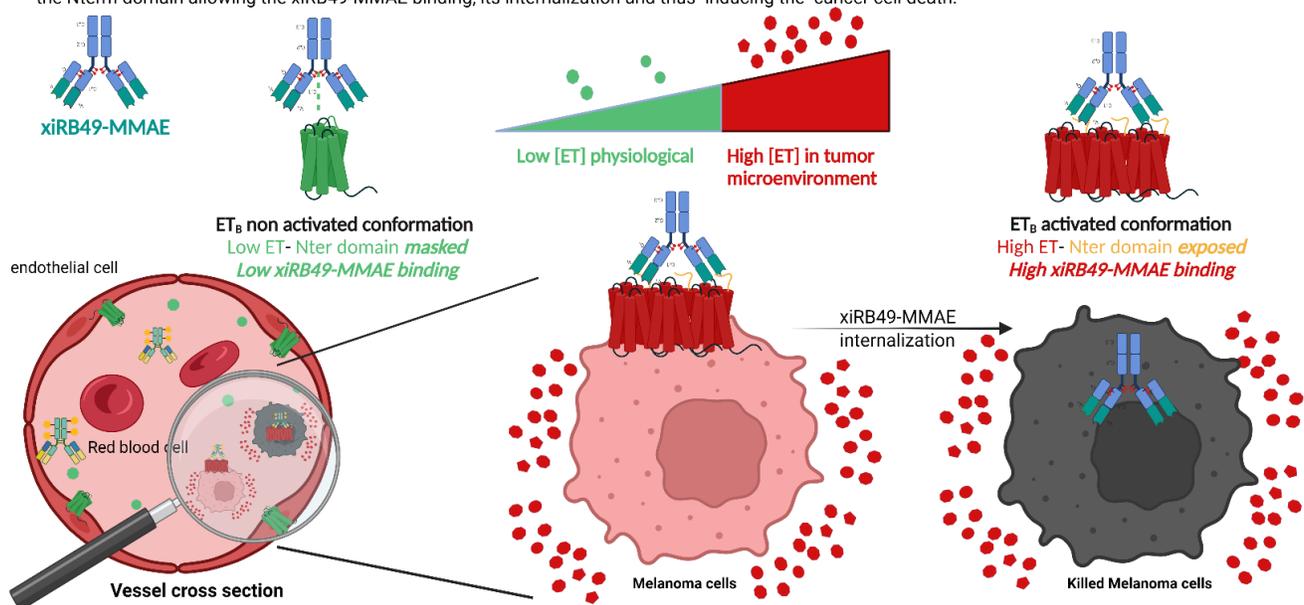
# Potent anti-melanoma activity induced by an antibody drug conjugate targeting the allosteric endothelin B receptor

**Authors** Amaury Herbet, Marie Hautière, Frédéric Jean-Alphonse, Delphine Vivier, Christophe Leboeuf, Narciso Costa, Aloïse Mabondzo, Guilhem Bousquet, Franck Denat, Eric Reiter and Didier Boquet

**Correspondence** didier.boquet@cea.fr

## In Brief

The endothelin B receptor (ET<sub>B</sub>) activates signaling pathways that promote tumor progression. Endothelin (ET) ligand binding triggers a conformational change in ET<sub>B</sub>. Under physiological conditions, at low concentrations of endothelins, ET<sub>B</sub> is mostly ligand-free (green receptor) or is rapidly recycled after endothelin binding. Its N-terminal domain, containing the RB49 epitope, is masked, explaining the lack of xiRB49-MMAE recognition. In a ET abundant tumor microenvironment, ET<sub>B</sub> is overexpressed at the surface of melanoma cells mainly in an activated multimeric conformation (red receptors) revealing the Nterm domain allowing the xiRB49-MMAE binding, its internalization and thus inducing the cancer cell death.



## **BACKGROUND**

In progress

## **Methods**

### **RB49 chimerization**

A batch of endotoxin-free RB49 (IgG1, Kappa) was produced from hybridoma and purified on protein A by the Biotem company (Apprieu, France). For chimeric expression of RB49, the nucleotide sequence of VH and VL RB49 have been previously determined by RT-PCR (Ref brevet). RB49-VH sequence were inserted in a pTT5 vector encoding the human IgG1 constant heavy chain and the RB49-VL sequence in a pTT5 vector encoding the human kappa constant light chain. The two vectors transfected in ExpiCHO-S cells (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA - Cat # A29127) and expression induced according to the manufacturer's instructions "ExpiCHO™ Expression System User Guide" ((ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA - Cat # MAN0014337). Recombinant chimeric RB49 (xiRB49) purified on a HiTrap Protein A HP column (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA - Cat # Cat.17-0402-03) and dialysed at the final step against Phosphate Buffer Saline (Gibco™, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA - PBS, pH 7.4- Cat # 806552-500ML).

### **Physico-chemical properties**

The analytical tests consist of the concentration control by absorbance determination using Spectramax M3® (Molecular Devices, San José, California, USA); the measurement of the hydrodynamic radius of molecular species in solution using DLS using Dynapro nanostar® (Santa Barbara, California, USA), and by the measurement of antibody stability using the Tycho NT.6 instrument (Nanotemper, München, Germany) corresponding to thermic denaturation curves. Briefly, we realized a spectrum absorbance (wavelengths 220 nm to 750nm). The absorbance measured at the wavelength of 280 nm allows to determine the concentration of the antibody. The DynaPro® is used for the analysis of proteins. The instrument is a combination Dynamic Light Scattering (DLS) and Static Light Scattering (SLS) instrument. The DLS detector to measure the size distribution of the hydrodynamics radius, whereas the independent SLS detector, can measure the molecular weight of small molecules. Tycho™ NT.6® study the functionality and similarity in a single experiment. It does this all by examining the protein's structural integrity or foldedness in a label-free way. The system measures the fluorescence of intrinsic tryptophan and tyrosine residues detected at both 350 nm and 330 nm as a specific defined temperature ramp is applied. Tycho generates thermal unfolding profiles and identifies the inflection temperature (Ti) that represent unfolding transition(s) or discrete changes in a protein's structural integrity. It records these unfolding profiles so we can study the protein in real-time or use the data as a reference to compare and validate the quality of the sample to any batches. For hydrodynamic Radius (Rh) and Temperature inflexion (Ti) determinations, all samples were used at a final antibody concentration of 0.5 mg/ml in PBS buffer pH7.4. For Rh determination, samples were centrifuged 10 min at 10 000 g at room temperature and determined by Dynamic Light

Scattering. All experiments were realized in triplicates.  $T_i$  determined with the Tycho instrument (NanoTemper Technologies GmbH, München Germany) following the manufacturer's instructions.

### **xiRB49 MMAE conjugation**

To a solution of xiRB49 (1 mg/mL in PBS pH 7.4) was added a solution of tris (2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP; 10mM, 10 equivalents) and the reaction was stirred at 37°C for 1 hour. After removal of TCEP using a centrifugal filter (Millipore Corp., Billerica, MA - Cat # UFC201024), a solution of MaleimidoCaproyl-Valine-Citrulline-ParaAminoBenzyloxycarbonyl-Monomethyl Auristatin E, MC-VC-PAB-MMAE (10mM, 15 equivalents) was added to the reduced antibody. The reaction was carried out at 37°C for 30 minutes, purified with a size exclusion column (Cytiva, Danaher Corporation Washington, USA - Cat # 17085101) and concentrated with a centrifugal filter. Before MS analysis, a small sample of xiRB49-MMAE (20 µg) was deglycosylated using PNGaseF enzyme (New England BioLabs, Ipswich, MA - Cat # P0704L) at 37°C for 1 hour. The Drug-to-Antibody Ratio (DAR) was estimated using mass spectrometry in denaturing conditions. Briefly, a small amount of the ADC was deglycosylated and reduced before analysis by reverse phase HPLC coupled to a high-resolution Orbitrap mass spectrometry (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA- Cat # Exploris 240) using an ESI source (positive mode). A comparison between native and conjugated heavy and light chains allowed us to determine the number of cargos attached. An average DAR of 8 was obtained. Aggregation of xiRB49-MMAE was evaluated by size exclusion chromatography (SEC) with an AdvanceBio SEC column (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA - Cat # XXXXXX). The column was eluted at 25°C with 200 mM ammonium acetate (pH 6.9) at a flow rate of 0.5 mL/min.

### **Cell culture**

Melanoma cell line UACC-257  $ET_B^+$ , purchased at DCTD Tumor Repository (Frederick, Maryland, USA), were cultured in RPMI-1640 (Gibco™, ThermoFisher Thermo Fisher Scientific Gibco, Waltham, MA USA- Cat # 12633012). All media were supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco™, ThermoFisher - Cat # A4736401), 1 mM pyruvate, 1% nonessential amino acids, 2mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Gibco™, ThermoFisher - Cat # 11530396, Cat # 11350912, Cat # 11539876, Cat # 11548876) ThermoFisher Scientific Gibco, Waltham, MA USA) and cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

### **Flow cytometry analysis**

To determine the apparent dissociation constant ( $K_d$ ) of RB49, xiRB49 or xiRB49-MMAE, binding experiments were performed. For flow cytometry analysis (FACS), cells, were harvested at 90% confluence using a versene solution, washed once in PBS and suspended in a saturation buffer (0.5 % BSA, 5 % normal goat serum NGS, D-PBS) at a concentration of  $3 \cdot 10^6$  cells/mL. UACC-257 cells were incubated overnight at 4°C with different concentrations of antibodies. 300µl of cells and 300µl of rising concentration antibody (0.005 to 100 nM), diluted in saturation buffer, were added in 15 mL Falcon tubes. Then, cells were washed 3 times in cold PBS, suspended with 200 µl of saturation buffer containing the secondary antibody F(ab')<sub>2</sub>-

Goat anti-Mouse IgG, IgM (H+L)Alexa Fluor™ 488 (Thermofisher - Cat # A10684) or F(ab')<sub>2</sub>-Goat anti-human IgG Fc, AlexaFluor™ 488, (Thermofisher - Cat # H10120) and incubated for 2 hours at 4°C. Melanoma cells, PBS washed 3 times, were suspended in 200 µl of FACS buffer and fluorescence intensity of 10 000 cells were quantified with a FACS Calibur (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). For the competition experiments, UACC-257 cells were incubated with RB49, XiRB49 or xiRB49-MMAE as described before, except that for each point in the range, an excess of 300 nM of endothelins is added 100 nm of each ET-1 (Sigma Cat # E7764), ET-2 (Sigma Cat #E9012) and ET-3, (Sigma Cat # E9137). Incubations were performed at 4°C to limit receptors internalization during an overnight incubation allowing equilibrium to be reached. The data were analyzed using Prism 9.4 (GraphPad Software San Diego, CA, USA) to determine the apparent K<sub>d</sub> and B<sub>max</sub> using a non-linear regression fit: site-specific linkage after checking that we had a normal distribution of these data by a D'Agostino & Pearson test. The results are expressed as percent mean fluorescence intensity (MFI) after normalizing to a high and a low value. Statistical significance between two groups of unpaired data was assessed by a parametric t-test. P value symbol : ns P > 0.05, \* P ≤ 0.05, \*\* P ≤ 0.01, \*\*\* P ≤ 0.001 and \*\*\*\* P ≤ 0.0001.

### **Internalization studies**

UACC-257 cells were seeded on glass coverslips at a density of 100,000 cells per cm<sup>2</sup> and incubated with 5 nM RB49, xiRB49 or xiRB49-MMAE for 2 hours at 4°C for membrane labelling. After three PBS washes, xiRB49 mAbs were recognized by the F(ab')<sub>2</sub>-Goat anti-Mouse IgG, IgM (H+L) secondary antibody coupled with Alexa Fluor 488 (Thermofisher - Cat # A10684) and incubated either 2 hours at 4°C for membrane labelling or for 1 hour at 37°C to observe the mAb-ET<sub>B</sub> complex internalization. After three PBS washes, one drop of ProLong Gold Antifade Mountant ((ThermoFisher Scientific Gibco, Waltham, MA USA- ref: Cat # P10144) was deposited on each slide and a cover glass slide was applied. Observations were performed at 40 fold magnification with the Apotome fluorescent microscope (ZEISS, Oberkochen, Germany).

### **Signaling Pathways**

In progress

### **Cytotoxic assay**

Monitoring cell cytotoxicity was effected using a specific assay (Abcam, Cambridge, UK- Cat # 112118). Briefly, UACC-257 cells were plated at 1500 cells / wells in 100 µl culture medium. The following day, 100 µl of increasing concentration of xiRB49-MMAE or xiRB49, diluted in culture medium, were added to each wells. Cells were incubated 96h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Cells viability was determined according to the instructions. After 6 h of incubation at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator, the absorbance change at 570nm and 605nm was monitored using spectramax M3®. The ratio of OD<sub>570</sub>/OD<sub>605</sub> nm was used to determine cell viability in each well as described in Abcam's protocol. Reaction were performed in triplicates. The data

were analyzed using Prism 9.4 (GraphPad Software San Diego, CA, USA) to determine the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) using the variable slope model after checking that we had a normal distribution of these data by a D'Agostino & Pearson test.

### ***Immunohistochemistry***

Using immunohistochemistry, endothelin receptor B expression was assessed in 10 melanoma metastatic lymph nodes. Immunohistochemical analyses were carried out on 5- $\mu$ m-paraffin sections with an indirect immunoperoxidase method, using mouse anti-human antibody RB49 directed against endothelin receptor B) and DABMap detection kit (Roche diagnostics, Meylan, France). Systematic controls with an irrelevant primary antibody of the same isotype were assessed. A CHO cell line overexpressing endothelin receptor B was used as positive control, and normal liver and skin as negative controls. Tissue sections were analyzed using an Olympus AX 70 microscope, with a 0.344-mm<sup>2</sup> field size at X400 magnification (Olympus, Tokyo, Japan).

### ***In vivo experiments***

Ten-week-old female athymic nude mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were kept in a specific pathogen-free animal facility. All animal experiments complied with French animal experimentation regulations and ethical principles. Subcutaneous xenografted was performed by injection of UACC-257 cells ( $5 \cdot 10^6$  in 100  $\mu$ L) in mice anesthetized (3 % isoflurane). After one month post-grafting, tumor sizes were measured at approximately 100 mm<sup>3</sup> and the therapeutic protocol was started. Animals were randomized into 4 groups of 8 mice: i) the control vehicle group 1, ii), the control group 2 treated with naked xiRB49 at 4mg/kg, iii) the group 3 treated with xiRB49-MMAE at 1mg/kg and iiiii) the group 4 -treated with xiRB49-MMAE at 4 mg/kg. All groups have received one injection by intraperitoneal way at Day 47 and Day 80. Tumors size were measured two times weekly using caliper. The greatest longitudinal diameter (L) and the greatest transverse diameter (W) of the tumor were determined and its volume (V) was calculated according to the following equation:  $V = 1/2(L \times W^2)$ . Measurements were effected until day 136; end of the study. All mice of group vehicle and group xiRB49 were euthanized at day 108 excepted 1 mouse of group vehicle euthanized at day 96 for ethical raisons. All other mice were euthanized when the tumor sizes have reached the limit point 1 500 mm<sup>3</sup> or when ulcerations were detected. For group xiRB49-MMAE-4mg/kg, one mouse was found dead in the cage at day 90 and another one euthanized at day 122 for high tumor size and ulceration. All other mice in treated groups survived to the end of the study day 136.

### ***Statistics***

EC<sub>50</sub> values were determined by nonlinear regression analysis of concentration response curves using GraphPad Prism 9.4. Data from experiments in vivo were analyzed using the two-way ANOVA with post-hoc Bonferroni correction for TGImax, and the Mantel-Cox logrank test for TGD (GraphPad Prism, GraphPad Software, La Jolla, CA).

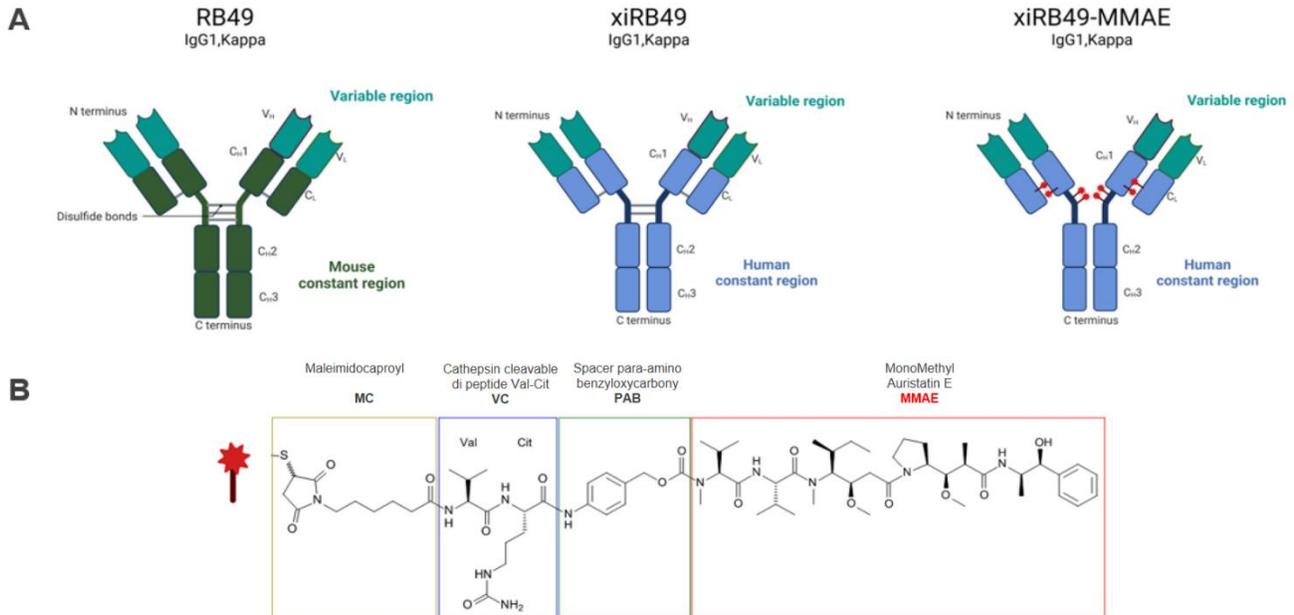
## Results

### xiRB49 retained the same conformational binding properties as RB49

#### *A nanomolar affinity for ET<sub>B</sub> and a fixation not abolished by endothelins*

The RB49 mAb (IgG1, Kappa) obtained by genetic immunization against the human ET<sub>B</sub> was chimerized with the human IgG1 and Kappa isotypes and named xiRB49 (figure 1A).

**Figure 1: A** Schematic representation of RB49, xiRB49 and xiRB49-MMAE antibodies. **B** Structure of linker MMAE

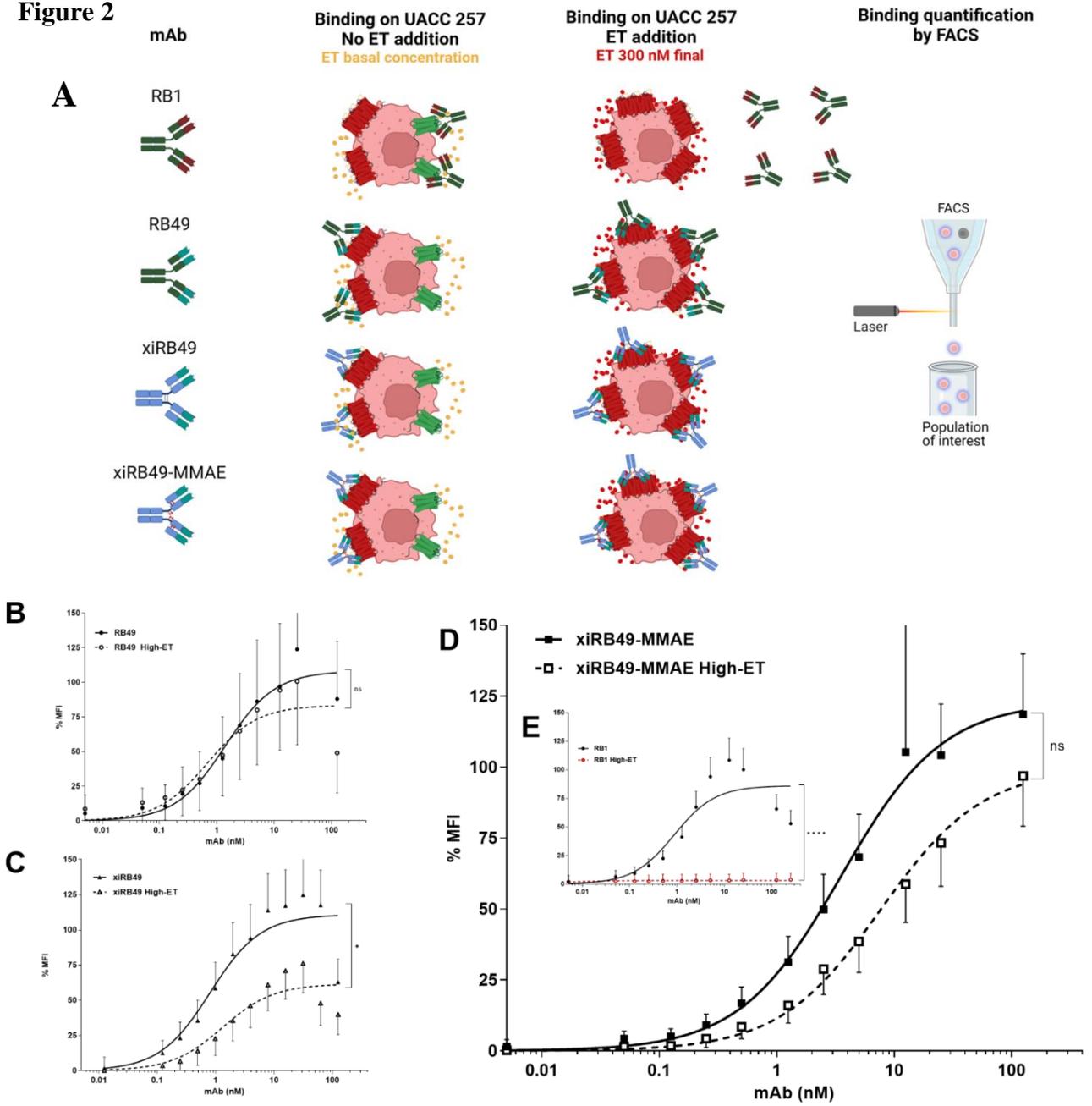


To determine whether the unique conformational binding properties of RB49 were not altered after its chimerization, we performed different binding experiments on ET<sub>B</sub>+ UACC-257 cells (figure 2A) with ET addition at 300 nM final or not. As shown on figure 2B, the RB49 binding curves (black curve) or with high ET concentrations (dotted line) are similar. The apparent affinity K<sub>d</sub> and B<sub>max</sub> for RB49, K<sub>d</sub>=1.4±0.02 nM and B<sub>max</sub>=108.1±0.5 were very close to those obtained for RB49 High-ET even in the presence of a very high concentration of the three endothelins (300 nM final): K<sub>d</sub>=0.7±0.02 nM and B<sub>max</sub>=83.3±0.4 (table S2A in supplementary material). On figure 2C, we determined the values for xiRB49 binding (black curve) and with xiRB49 high-ET concentrations

(dotted line). Either respectively,  $K_d=0.8\pm0.01$  nM and  $B_{max}=110.7\pm0.2$  and  $K_d=1.3\pm0.02$  nM and  $B_{max}=61.5\pm0.2$  (table S3A in supplementary material). We confirmed that xiRB49 retained nanomolar affinity and, the major point, its binding to ET<sub>B</sub> was maintained even in the presence of extra physiological endothelin concentration. This very large excess of endothelin may explain that the B<sub>max</sub> can be lowered under these conditions as observed for xiRB49 High-ET. We investigated the influence of each endothelins separately on the RB49 and xiRB49 binding. Competition binding of RB49 and xiRB49 with 100nM of ET1 or ET2 or ET3 are presented in supplementary material figure S1, S2, table S2B and S3B. For RB49 and xiRB49, none of them had any significant effect in terms of affinity nor in terms of B<sub>max</sub>. This is not the case for all antibodies developed by our laboratory against human ET<sub>B</sub>, as the Rendomab B1 (RB1). Indeed, its high affinity binding,  $K_d=0.9\pm0.02$  nM is fully abolished even in presence of low ET level (figure 2E and table S4A-S4B in supplementary material) as previously described (Ref B Allard). In conclusion, *xiRB49 conserves the RB49 properties in terms of affinity (nM), specificity, no binding on ET<sub>A</sub>+CHO cells (data not shown) and its binding not abolished even in presence of high ET concentration.*

**Figure 2 :** (A) Schematic representation of mAb binding curves with or without ET on ET<sub>B</sub>+ human melanoma UACC-257 cells. For all experiments, Mean Fluorescence Intensity (MFI) for each mAb concentrations measured on 10 000 cells by flow cytometry. Binding curves generated by plotting the normalized mean fluorescence intensity (%MFI) versus mAb concentration without or with high ET concentrations, ET1, ET2 and ET3 at 100 nM each. (B) RB49 binding curves, without ET, black dot and solid black line, or with high ET concentrations, empty circles and black dotted line. The calculated  $K_d$  was  $1.4\pm0.02$  nM for RB49 and  $0.7\pm0.02$  nM for RB49 with ET. No significance difference observed between both conditions. (C) xiRB49 binding curves without ET, black triangle and solid black line, or with high ET concentrations, empty triangle and black dotted line. The calculated  $K_d$  was  $0.8\pm0.01$  nM for xiRB49 and  $1.3\pm0.02$  nM for xiRB49 with ETs. A slight decrease in xiRB49 binding is observed. (D): xiRB49-MMAE binding curves without ET, black square and solid black line, or with high ET concentrations, empty square and black dotted line. The calculated  $K_d$  was  $3.5\pm0.05$  nM for xiRB49-MMAE and  $7.7\pm0.15$  nM for xiRB49-MMAE with ETs. No significance difference observed between both conditions. E: RB1 binding curve without ET, black dot and solid black line, had a  $K_d$   $0.9\pm0.02$  nM. RB1 binding is fully abolished in presence of low ET level empty dot and red dotted line.

**Figure 2**



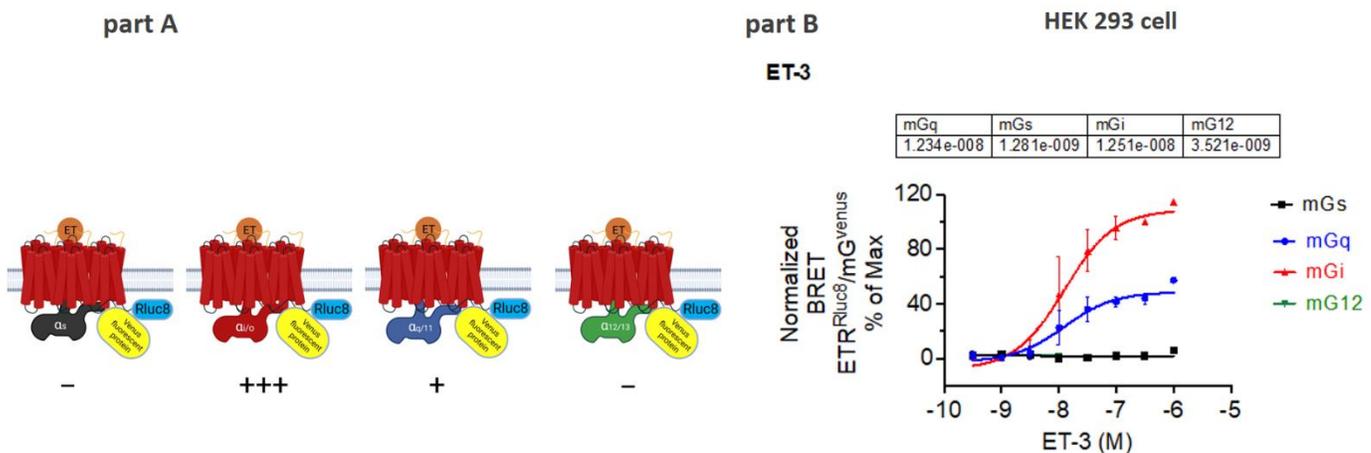
*A preferential binding of RB49 and xiRB49 on activated ET<sub>B</sub> conformation.*

Waiting for results in progress

## *RB49 or xiRB49 pharmacological and internalization studies.*

We investigated the consequences of RB49 or xiRB49 binding to activated ET<sub>B</sub> on the G-protein coupling by the Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) approach. For this purpose, we expressed ET<sub>B</sub> fused to the bioluminescent enzyme Renilla luciferase Rluc8 (ET<sub>B</sub>-Rluc8) in HEK293 cells and studied its coupling to the four subfamilies of heterotrimeric G proteins, namely G $\alpha_{q/11}$ , G $\alpha_s$ , G $\alpha_{i/o}$  and G $\alpha_{12/13}$ . For this coupling study, mini G proteins, coupled to the fluorescent protein venus (mGv) were co-transfected into HEK293 cells (figure 4A-partA). After addition of ET-3, the ET found in the melanoma microenvironment (REF), mGv $\alpha_{i/o}$  and mGv $\alpha_{q/11}$ , in order of activation, engaged while mGv $\alpha_s$  and mGv $\alpha_{12/13}$  did not generate detectable luminescence in accordance with previous literature results (Figure 4A-part B) (voir REF FJA).

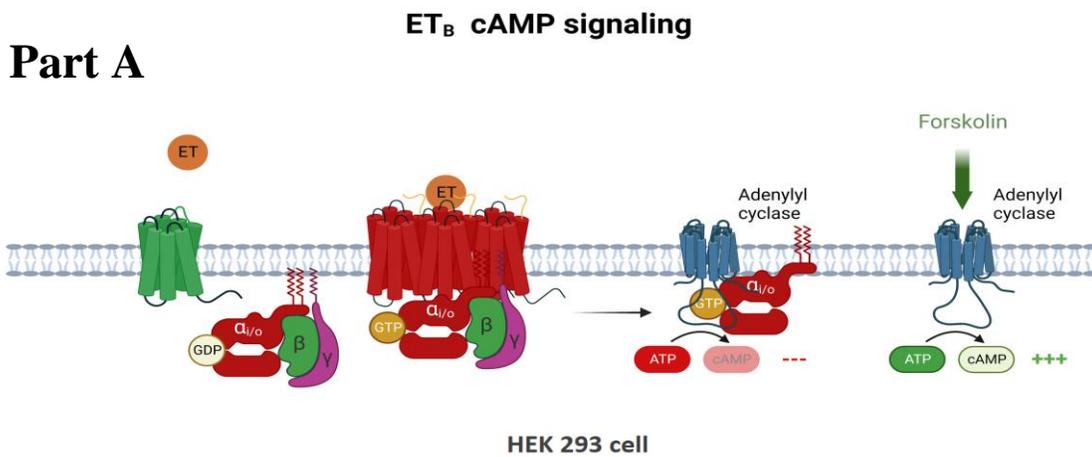
**Figure 4A: part A.** Schematic representation of mini G-proteins coupled to the fluorescent protein venus mobilization with ET<sub>B</sub> fused to the bioluminescent enzyme Renilla luciferase Rluc8. **Figure 4A.part B.** Intensity of the bioluminescent signal in function of the ET-3 concentration in HEK 293 cells for the different mini G-proteins.



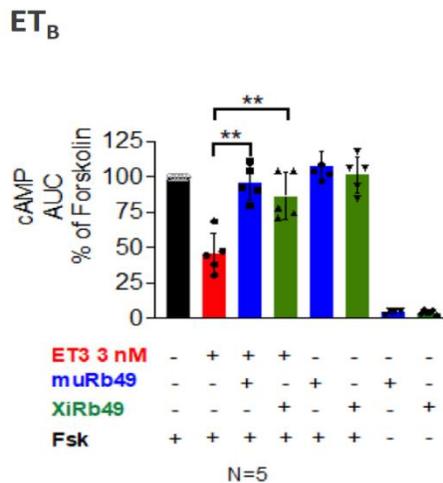
We then investigated the consequences of RB49 or xiRB49 binding on mGv $\alpha_{i/o}$  and ET<sub>B</sub> coupling induced by ET-3 binding. As a negative control, we used ETA-Rluc8, which also generated a high BRET signal with mGv $\alpha_{i/o}$  after ET-3 binding but was unable to bind RB49 or xiRB49 (Figure 4B part A). Our results clearly demonstrated that there was no significant difference in the curves

generated by ET<sub>B</sub>-Rluc8/ mGv $\alpha_{i/o}$  after binding to a range of ET-3 concentrations with or without RB49 or xiRB49. The curves generated by activated ET<sub>A</sub>-Rluc8/ mGv $\alpha_{i/o}$  are quite similar suggesting that RB49 or xiRB49 binding on ET<sub>B</sub> did not alter the coupling of the heterotrimeric G-protein G $\alpha_{i/o}$  (figure 4B-part A-part B).

**Figure 4B. part A.** Schematic results of mini G $\alpha_{i/o}$ -protein activation by ET-3 in presence or not of RB49 or xiRB49 on ET<sub>B</sub> or on negative control ET<sub>A</sub>. **Figure 4B. part B** Intensity of the bioluminescent signal generated by interaction of the mini G $\alpha_{i/o}$ -protein with ET<sub>B</sub> or ET<sub>A</sub> after ET3 activation at different concentrations in presence or not of RB49 or xiRB49.



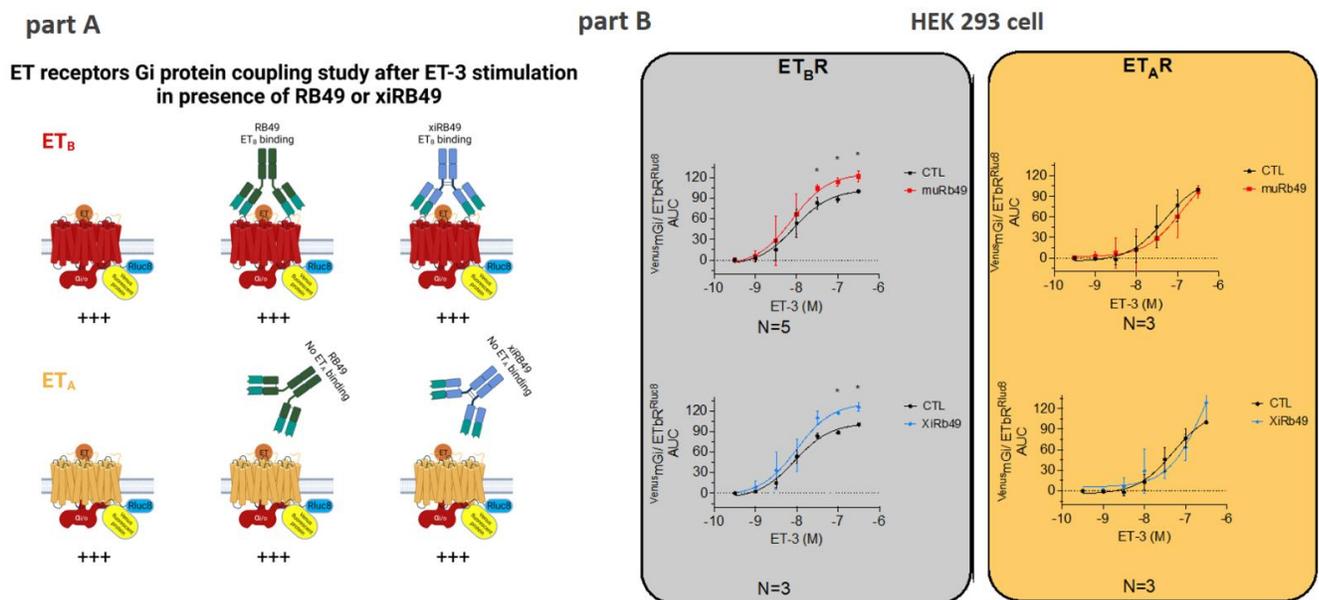
**Part B**



We also investigated the effects of RB49 or xiRB49 binding on the inhibition of adenylyl cyclase (AC) by G $\alpha_{i/o}$  protein after ET<sub>B</sub> activation by ET-3 (Figure 4C part A). For this purpose, we directly activated the AC with 5 $\mu$ M of forskolin and then measured the production of cAMP by BRET. In

these conditions, the Area Under the Curve (AUC) measured was our 100% of cAMP production (figure 4C-part A and part B). Then, we studied ET-3 effects on forskolin-induced cAMP production at different concentrations (figure S4 in supplementary material). The maximal antagonistic effect was observed at 3 nM ET-3 inhibiting forskolin-induced cAMP production by close to 60% (figure 4C- part B). Surprisingly, RB49 and xiRB49 were able to reverse the antagonistic effect of ET-3 to return to near 100% cAMP production suggesting an  $ET_B$  conformational change blocking the  $G\alpha_{i/o}$  protein and preventing it to inhibit AC. As expected, no reverse effect of RB49 or xiRB49 on  $ET_A$  was observed (figure S4 in supplementary material). In contrast, no effect was observed on forskolin-induced cAMP production when RB49 and xiRB49 were added to not-activated  $ET_B$  *i.e* without ET-3. Similarly, if only RB49 or xiRB49 are added on non-activated  $ET_B$  no effect is observed on cAMP production. The latter two experiments strengthened the fact that RB49 or xiRB49 did not bind to unactivated  $ET_B$ .

**Figure 4C. part A.** Schematic representation of adenylyl cyclase inhibition by the heterotrimeric  $G\alpha_{i/o}$ -protein and its constitutive activation by forskolin. **Figure 4C. part B.** Effects on the inhibition of adenylyl cyclase (AC) by  $G\alpha_{i/o}$  protein after  $ET_B$  activation by ET-3 in presence or not of RB49 or xiRB49 and with or without forskolin. Without forskolin and no ET-3 activation no effect were detected after addition of RB49 or xiRB49. With forskolin and no ET-3 activation RB49 or xiRB49 had no effect on the production of cAMP induced by forskolin. With forskolin and ET-3 activation, cAMP production a dramatic decrease (60%) is noted. In these conditions, addition of RB49 or xiRB49 restored the cAMP production.

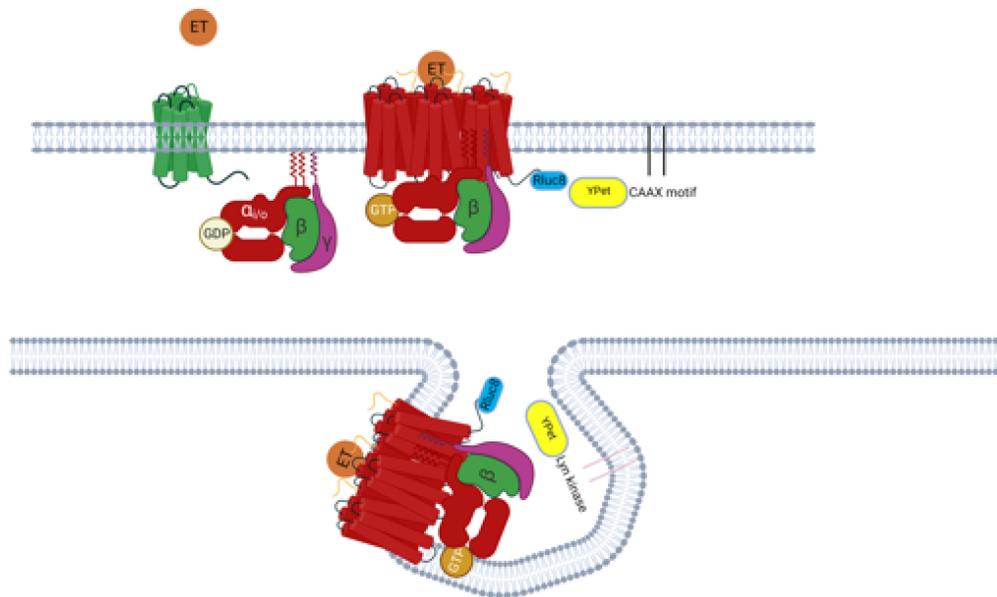


We studied the internalization of ET<sub>B</sub> by BRET by measuring the interaction, at the membrane level, between ET<sub>B</sub>-Rluc8 and the YPet-CAAX motif or, at the caveolae level, with the YPet Lyn kinase motif (Figure 4D-part A). At the membrane and calveolar level, we showed that after ET-3 binding, ET<sub>B</sub> was well internalized as expected (Figure 4D-part B). Internalization of ET-3 activated ET<sub>B</sub> is also observed and slightly enhanced by the binding of RB49 (or xiRB49). However, without ET-3, non-activated ET<sub>B</sub> is not internalized by RB49 (xiRB49) alone. We also observed the internalization of RB49 or xiRB49-bound to ET<sub>B</sub> by an immunofluorescence approach on the melanoma cell line UACC-257. Due to ET-3 production by UACC-257 cells (data not shown), ET<sub>B</sub> was in its activated conformation. At 4°C, RB49 or xiRB49 were fixed to activated ET<sub>B</sub> and fluorescent labeling was observed at the membrane. At 37°C, fluorescent labeling shifted to the cytoplasm due to internalization of activated ET<sub>B</sub> bound by RB49 or xiRB49. (figure S5A-S5B in supplementary material).

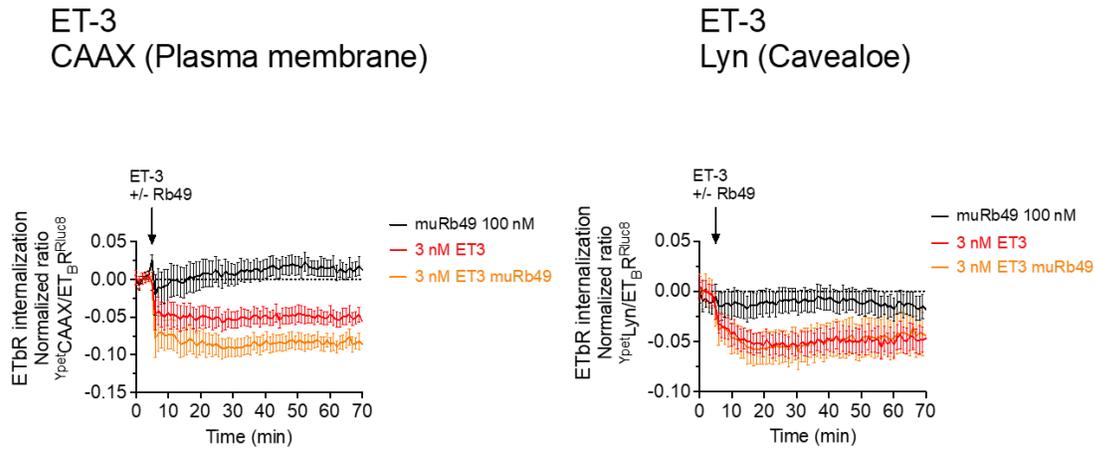
**Figure 4D. part A.** Schematic representation of internalisation studies by BRET at the membrane level or at the caveolae level with respectivelley CAAX motif or Lyn kinase motif fused with the fluorescent protein YPet. **Figure 4D. part B** Kinetic curves of ETB internalisation monitored by BRET signal. An ET<sub>B</sub> internalisation is measured at 3nM ET3 without or with 100 nM RB49. No or very low of ETB internalisation is observed when RB49 is added alone without ET3 on HEK 293 cells.

## Part A

### ET<sub>B</sub> Trafficking with or without RB49



## Part B Effect of Rb49 on ET3-induced ET<sub>B</sub>R internalisation



In summary, without ET-3, ET<sub>B</sub> was in its non-activated conformation, so no effect on cAMP was observed in presence of RB49 or xiRB49. When ET-3 was added, ET<sub>B</sub> switched to its activated conformation and binding of RB49 or xiRB49 resulted in loss of inhibition of cAMP production. As, the addition of RB49 or xiRB49 to tumor cells had no effect on their development as observed in in vitro or in vivo experiments (see below) and *xiRB49 displayed all properties to develop an Antibody Drug Conjugated (ADC), i.e. high affinity, high specificity, no major pharmacological property, ability to be internalized after its fixation on activated ET<sub>B</sub>*, we decided to conjugate it with the cytotoxic MonoMethyl Auristatin E (*xiRB49-MMAE*) (figure 1A-1B).

### xiRB49-MMAE display a potent anti melanoma activity

#### *xiRB49-MMAE characterizations.*

After xiRB49 conjugation, the DAR was analyzed by LC-MS and determined three MMAE per heavy chain and one per light chain generating a final DAR of 8 indicating that all cysteine were coupled with MMAE. No aggregation was detected by SEC analysis (figure S6 A-B in supplementary material) and by DLS. Indeed, for RB49, we obtained a Rh value of  $4.6 \pm 0.2$  nm and for RB49-MMAE:  $6.8 \pm 0.1$  nm (figure S6 C and table S6 in supplementary material). These values were in agreement with a moderate increase in Rh of xiRB49-MMAE due to the addition of 8 drugs on xiRB49 (DAR = 8). We determined the Ti in the thermal denaturation experiments (figure S6 D and table S7 in supplementary material). For xiRB49, Ti#1 was  $74.1 \pm 0.08^\circ\text{C}$  and Ti#2  $89.4^\circ\text{C} \pm 0.13^\circ\text{C}$  and for xiRB49-MMAE, no Ti#1 was determined and Ti#2 was  $88.5 \pm 0.17^\circ\text{C}$ . xiRB49-MMAE. Ti#1 is associated with the constant domains and Ti#2 with the Fab

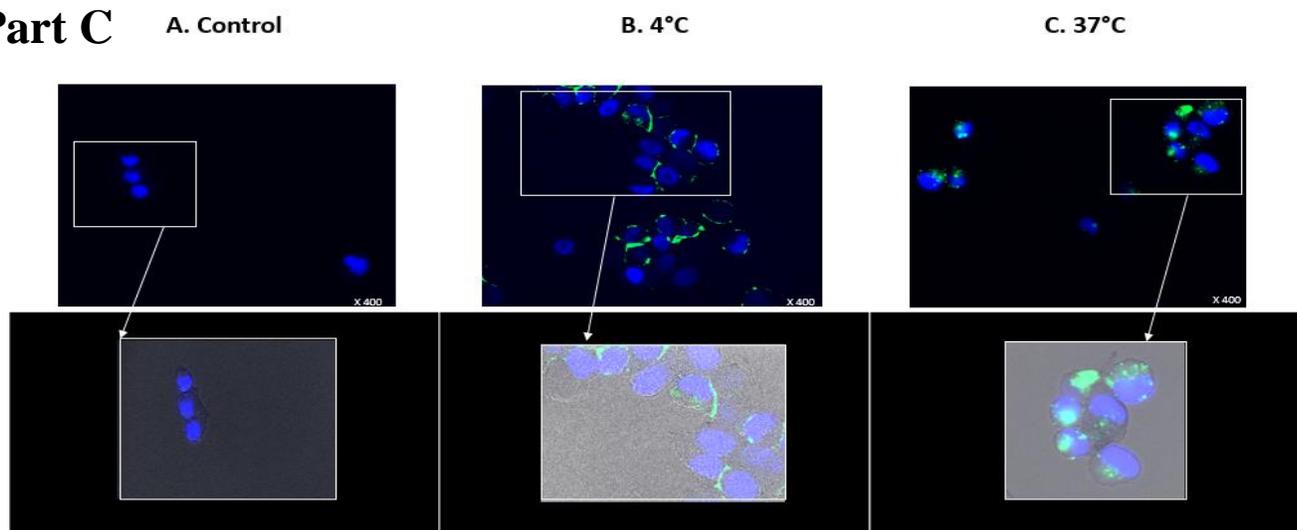
domain of the antibody. For the Fab domain, Ti#2 was unchanged unlike Ti#1 reflecting a destabilization of the constant domain following the conjugation of 8 MMAE groups on xiRB49 but without altering its binding properties affinity for ET<sub>B</sub> (figure 2D, figure S3 and table S5A S5B in supplementary material).

*xiRB49-MMAE internalization and in vitro cytotoxicity study.*

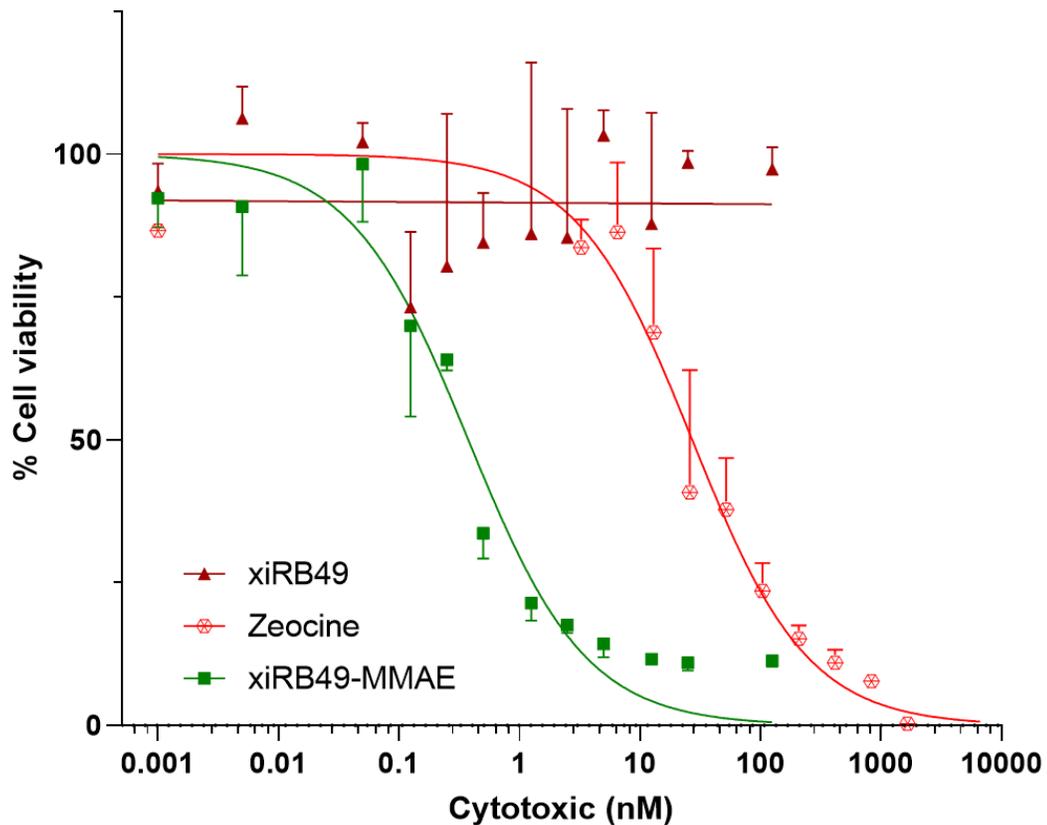
As expected, internalization of xiRB49-MMAE was observed on UACC-257 cells by immunofluorescence as for RB49 and xiRB49 (Figure 4D part C) and evaluated its cytotoxicity using a viability cell assay. We compared the toxicity of xiRB49-MMAE with the highly effective cytotoxic Zeocin™. For Zeocin, we obtained an IC<sub>50</sub> 27,1 ± 7.2 nM, for xiRB49-MMAE an IC<sub>50</sub> 0,4 ± 7.2 nM and no toxicity for xiRB49 (figure 4E and table S8 in supplementary material). These results demonstrated the very high efficacy of xiRB49-MMAE in eradicating melanoma cells more than fifty times more effective than zeocin and the lack of effects on cancer cell death of xiRB49.

**Figure 4D. part C. xiRB49-MMAE is internalized at 37°C in UACC-257 cells.** Cells were incubated with 5 nM xiRB49-MMAE for 2 hours at 4°C for membrane labelling. After three PBS washes, xiRB49-MMAE was recognized by the F(ab')<sub>2</sub>-Goat anti-Mouse IgG, secondary antibody coupled with Alexa Fluor 488. The secondary antibody was incubated either 2 hours at 4°C for membrane labelling or for 1 hour at 37°C for study the mAb-ET<sub>B</sub> complex internalization. **Control picture** no labelling at 488 is detected, only blue staining of cell nuclei was observed. **At 4°C**, only cell membrane was labelled with xiRB49-MMAE and blue staining of cell nuclei. **At 37°C**, cytoplasmic fluorescence is mainly observed due to internalization of xiRB49-MMAE, picture is merged with green cell labelling with xiRB49-MMAE revealed by a secondary antibody coupled with AF488 fluorochrome and blue staining of cell nuclei at 37°C.

## Part C



**Figure 4E.** Monitoring cell cytotoxicity was effected using a specific assay monitoring cell viability. UACC-257 cells were plated at 1500 cells / wells in 100  $\mu$ l culture medium. The following day, 100  $\mu$ l of increasing concentration of Zeocine, xiRB49-MMAE or xiRB49, diluted in culture medium, were added to each wells. Cells were incubated 96h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Cells viability was determined according to the instructions. The ratio of OD570/OD605 nm was used to determine cell viability in each well. The data were analyzed using Prism 9.4 to determine the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) using the variable slope model after checking that we had a normal distribution of these data by a D'Agostino & Pearson test. For Zeocin, we obtained an IC<sub>50</sub> 27,1  $\pm$  7.2 nM, for xiRB49-MMAE an IC<sub>50</sub> 0,4  $\pm$  7.2 nM and no toxicity for xiRB49.

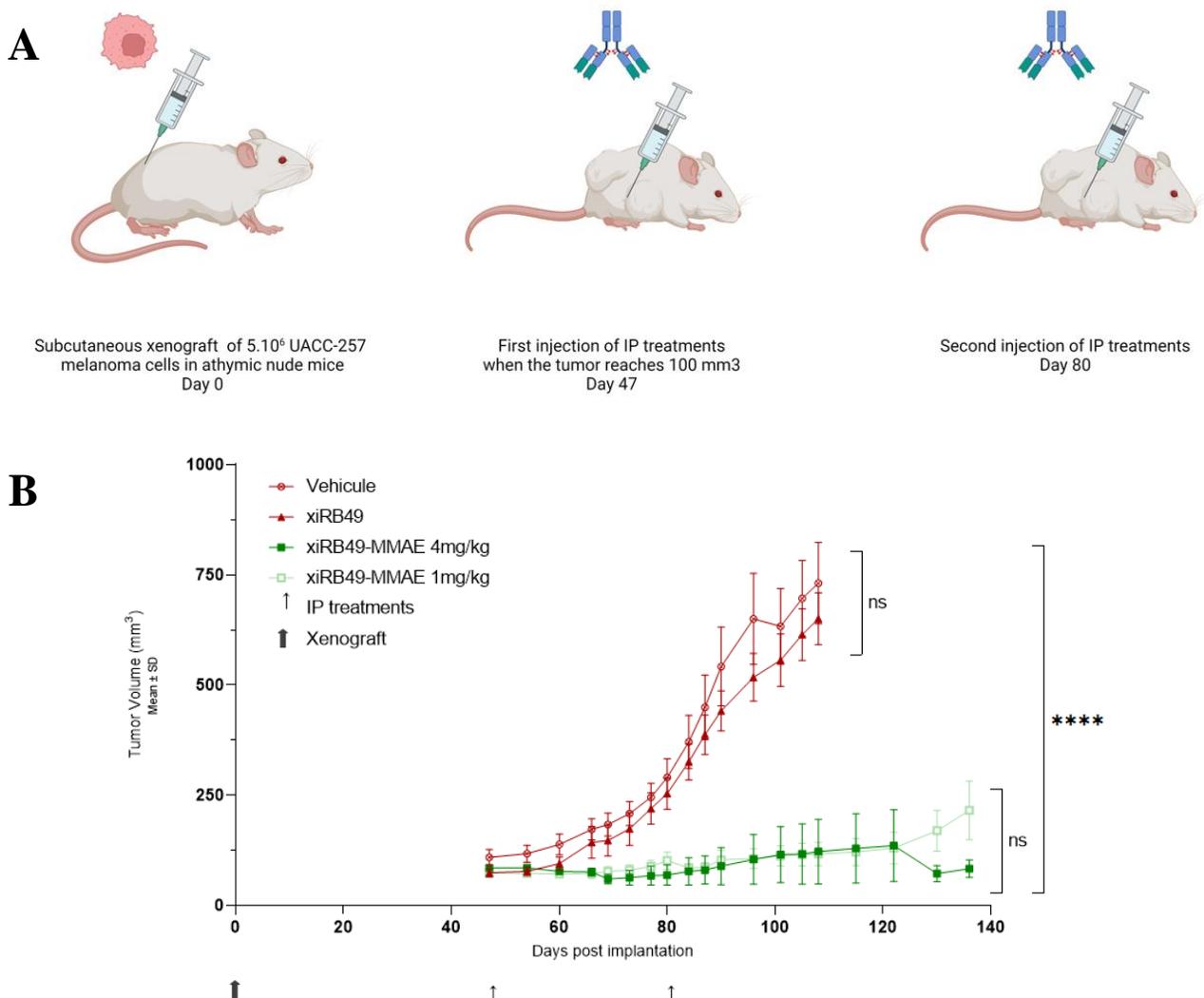


*xiRB49-MMAE display a potent anti melanoma activity in vivo*

For *in vivo* studies, mice were xenografted with melanoma UACC-257 cell line and treatment was initiated once tumor volumes reached an average size of approximately 100 mm<sup>3</sup>. Then, animals were randomized into groups of 8 each, with each group receiving two intraperitoneal injections of the vehicle or xiRB49 or xiRB49-MMAE. Post xenograft (Day 0), injections were realized at day 47 and at day 80 corresponding at about five half-life of antibodies in mice (figure 5A).

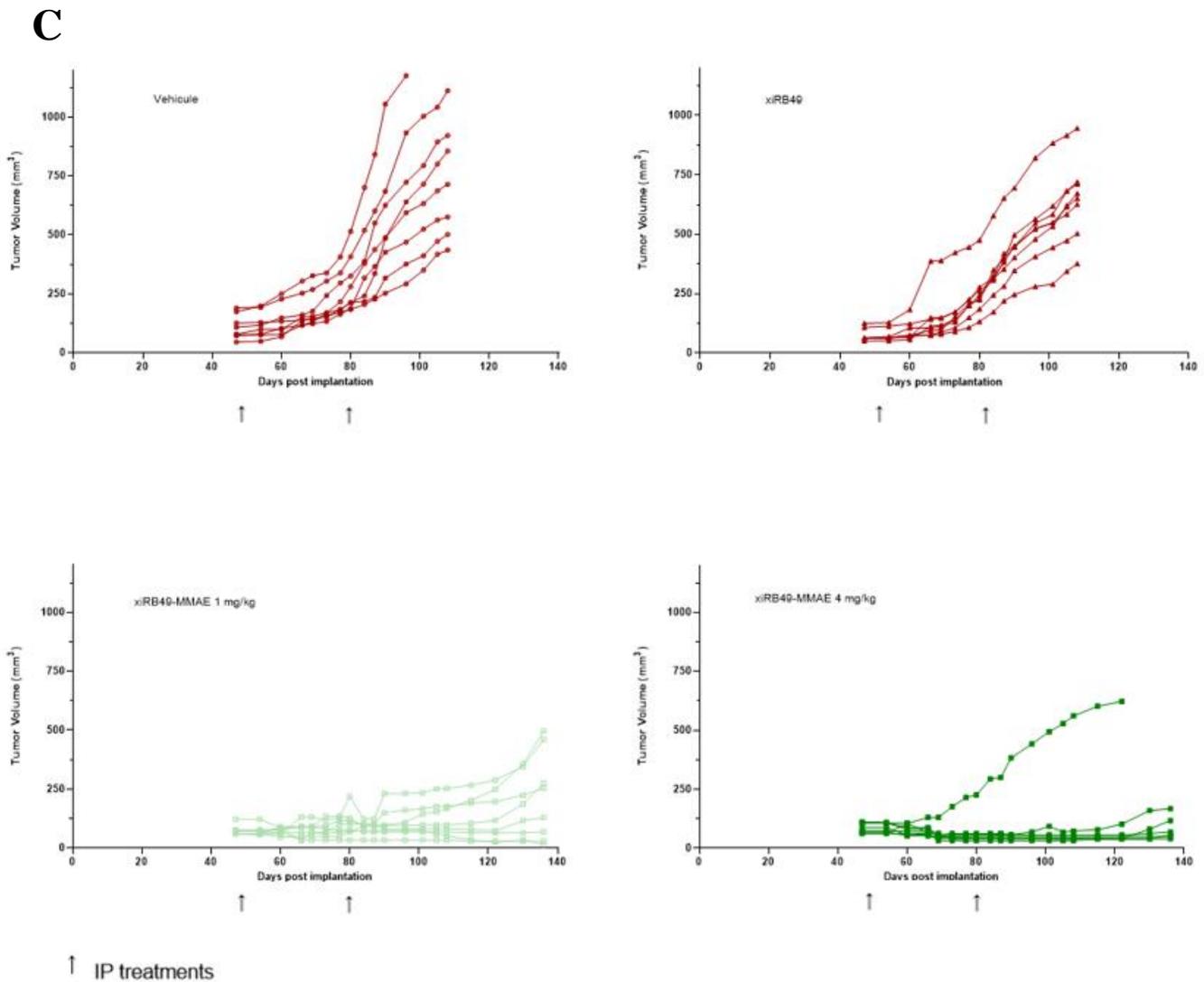
Treatments of 1 or 4 mg/kg of xiRB49-MMAE or 4 mg/kg of xiRB49 or vehicle were administered to animals bearing UACC-257 tumors. Consistent with *in vitro* cell cytotoxicity results, the UACC-257 xenograft tumors were highly responsive to the xiRB49-MMAE and had a dramatic inhibition of tumoral progression during the long period of the study 136 days (figure 5B). Differences in tumor growth between the group of mice treated with the vehicle or xiRB49 alone and the groups of mice treated with either 4 mg/kg or 1 mg/kg are very significant ( $p < 0.0001$ ). During days following treatments none of the animals showed side effects even at the highest dose of treatment (4mg/kg). Vehicle or xiRB49 treatments have no effect on tumoral regression.

**Figure 5: A Schematic representation of the course of the in vivo experiments.** The xenografts took place at day 0, mice were injected at day 47 and at day 80 post xenograft. **B Antitumor activity of xiRB49-MMAE** is represented by growth curves of tumors. Values represent the mean  $\pm$ SEM derived from groups of  $n = 8$  animals. Large black arrow indicated the day of xenografted and light dark arrow indicated the xiRB49-MMAE administrations. All treatment groups were significantly different from the control group ( $p < 0.0001$ ) as determined by Mann-Whitney test.



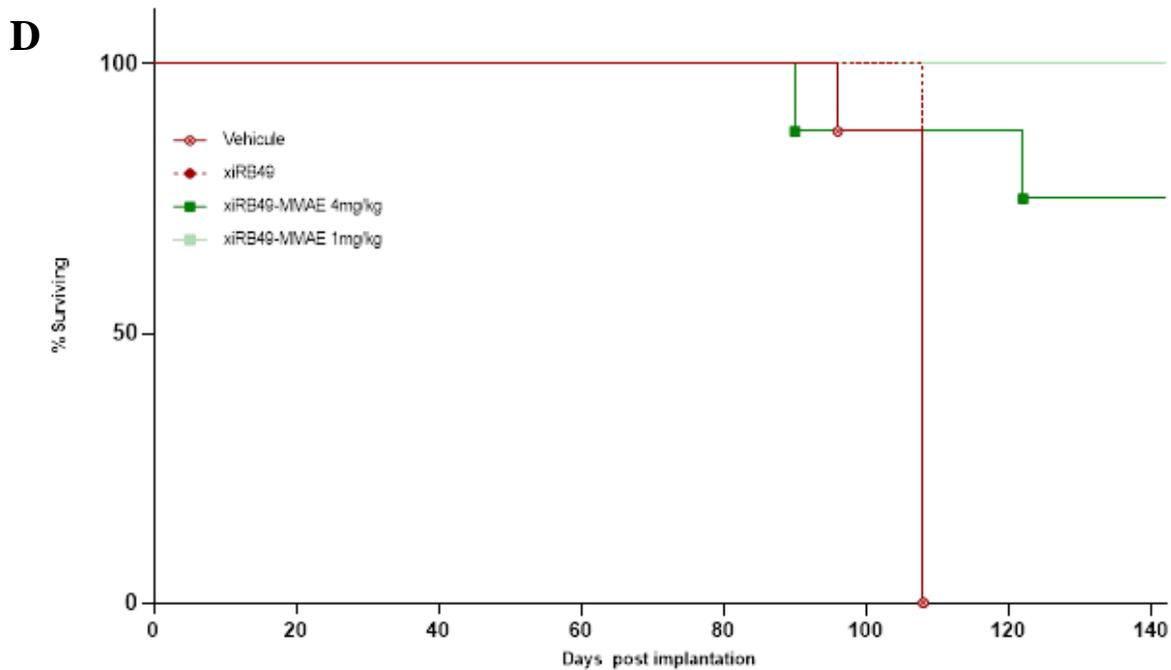
When individual mouse data were analyzed, each line represent an individual mouse (figure 5C). All treated groups were significantly different from the control group ( $p < 0.0001$ ) as determined by Mann-Whitney test ( $n = 8$  mice/group). No significant difference was observed between the vehicle group and the xiRB49 group. For the mice treated at 4mg/kg, we observed that 60% of the mice had no tumor progression (tumor size less than or equal to 100 mm<sup>3</sup>). Two mice in this group died, one died prematurely at day 90 with a tumor size of 55 mm<sup>3</sup>. The second, with a tumor that escaped treatment. For the mice treated at 1 mg/kg, 50% did not have tumor progression. Two mice had a slow recovery from day 90, one mouse from day 100, and one mouse from day 120, so there was clearly an effect of the injected dose on tumor development (Figure 5C).

**Figure 5: C Antitumor activity from each animal per groups.**



In terms of survival, 100% of the mice treated with 1mg/kg were alive at the end of the study and 75% for the mice treated with 4mg/kg. The latter result is probably underestimated due to the premature death of one mouse in this group that did not show clinical signs related to the implanted tumor. If the latter is excluded, the survival rate would reach 90% during the two months of treatment, i.e. an estimated five years for a patient (figure 5D).

**Figure 5: D xiRB49-MMAE administrations promotes long-term survival.** Picture depicting survival in mice (time for a tumor to reach an end point or death) compared to untreated controls.



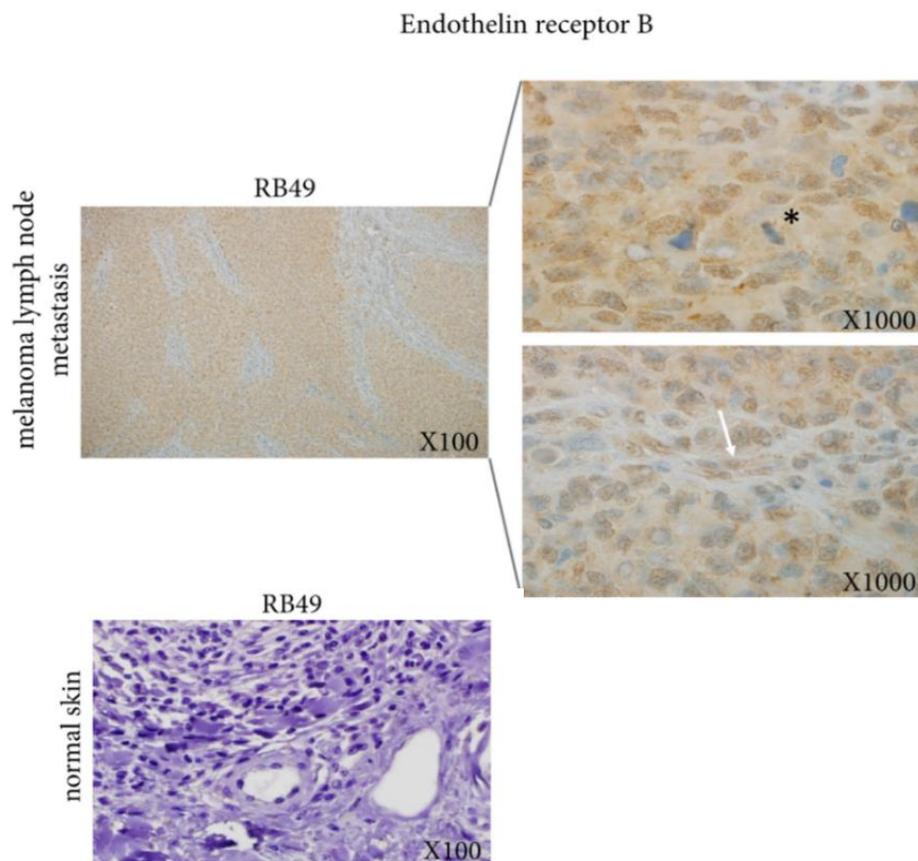
These *in vivo* results underline the very high efficacy of xiRB49-MMAE to treat ET<sub>B</sub>+ melanoma with no notable side effects on the mice.

### IHC approach for patient stratification.

In order to know if RB49 could be used as a companion test to stratify ET<sub>B</sub>+ melanoma patients who might be eligible for possible treatment with RB49-MMAE, we performed an exploratory immunohistochemistry (IHC) screening study. Ten melanoma metastatic lymph nodes were analyzed after IHC treatment. *All biopsies were positive with a RB49 immunostaining.* A

representative result is shown in the figure 6. An intense and complete staining of the lymph node with RB49 was observed. ET<sub>B</sub> was expressed both in melanoma cancer cells (black star) and tumor endothelial cells (white arrow). Very interestingly, no staining was observed on normal skin, including normal vessels. This is an additional evidence for recognition by RB49 of a particular conformation of the ET<sub>B</sub> receptor expressed at the melanoma cell surface. This first screening validates the possibility to study whether RB49 can be used as a companion test to stratify patients eligible or not for future xiRB49-MMAE treatment.

**Figure 6. IHC for xiRB49-MMAE eligible patients.** An intense and complete staining of the lymph node with RB49 was observed. ET<sub>B</sub> was expressed both **in melanoma cancer cells (black star) and tumor endothelial cells (white arrow)**. No staining was observed on normal skin, including normal vessels.



## Discussion

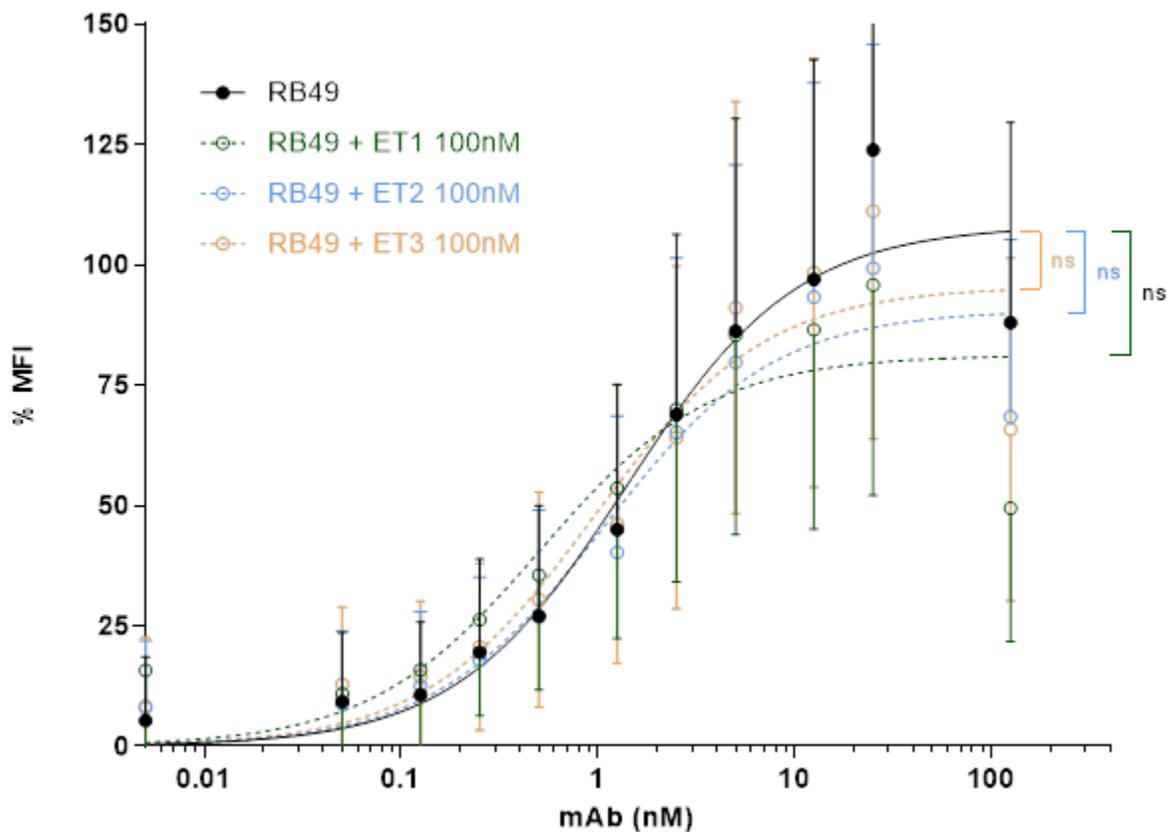
In progress

## References

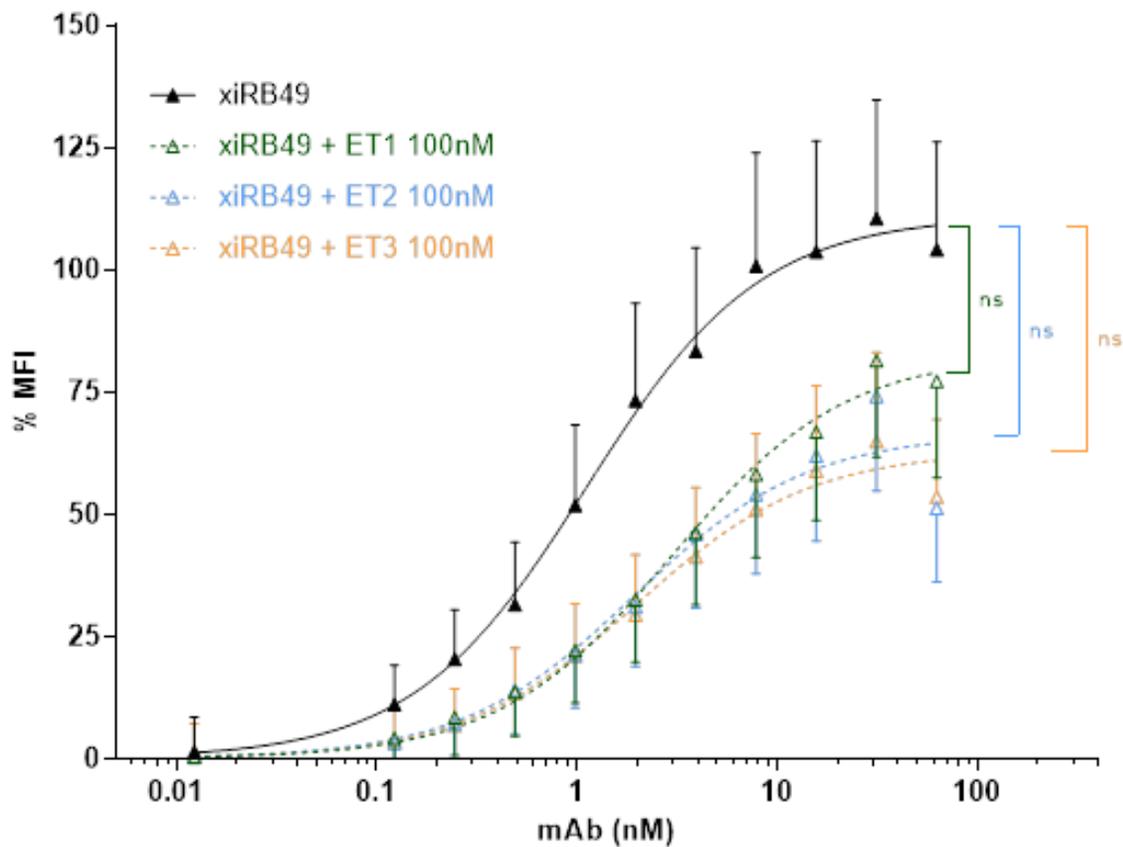
In progress

## Supplementary Datas

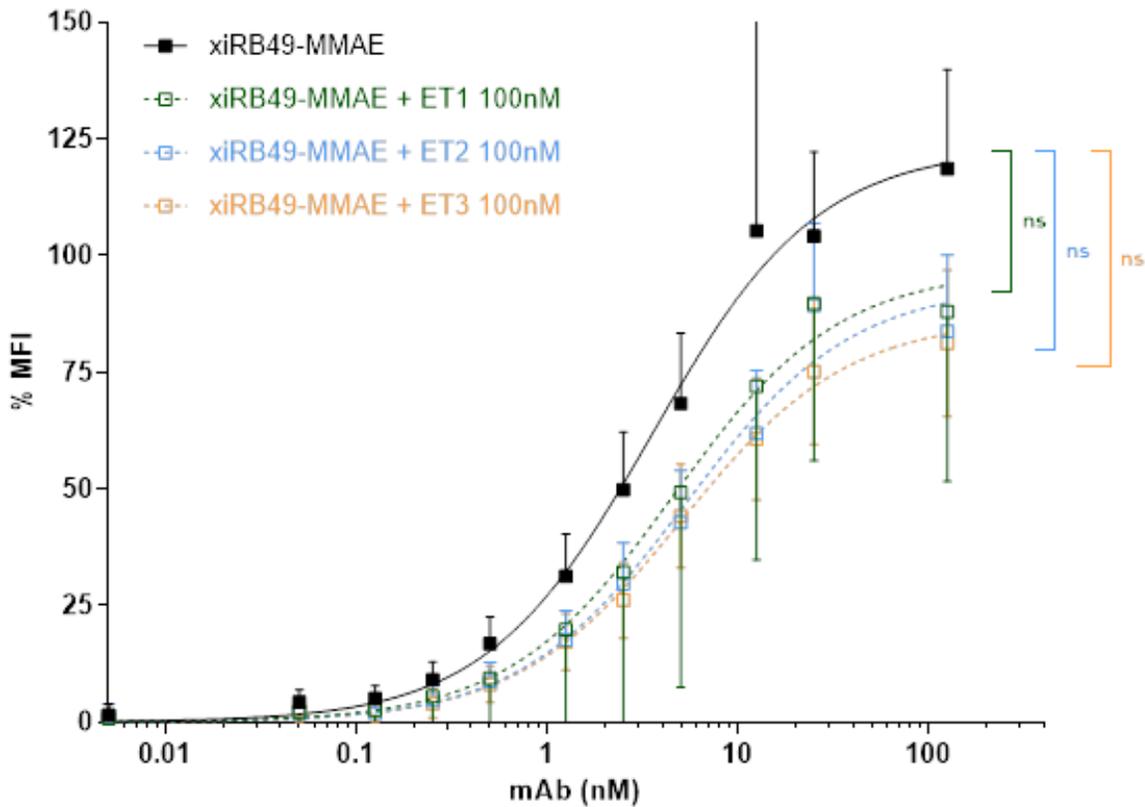
**FigureS1 RB49 ET1-ET2-ET3:** RB49 binding curves on ET<sub>B</sub>+ human melanoma UACC-257 cells. Mean fluorescence intensity (MFI) for each RB49 concentrations measured on 10 000 cells by flow cytometry. Binding curves generated by plotting the normalized MFI (%MFI) versus RB49 concentration. Without ET, black dot and black line, or with high ET1, green dotted line, or ET2, blue dotted line, or ET3, orange dotted line, concentrations, at 100 nM each. The calculated K<sub>d</sub> and B<sub>max</sub> are described in table S2B.



**Figure S2 xiRB49 ET1-ET2-ET3** : xiRB49 binding curves on ET<sub>B</sub>+ human melanoma UACC-257 cells. Mean fluorescence intensity (MFI) for each xiRB49 concentrations measured on 10 000 cells by flow cytometry. Binding curves generated by plotting the normalized MFI (%MFI) versus xiRB49 concentration. Without ET, black triangle and black line, or with high ET1, green dotted line, or ET2, blue dotted line, or ET3, orange dotted line, concentrations, at 100 nM each. The calculated K<sub>d</sub> and B<sub>max</sub> are described in table S3B.

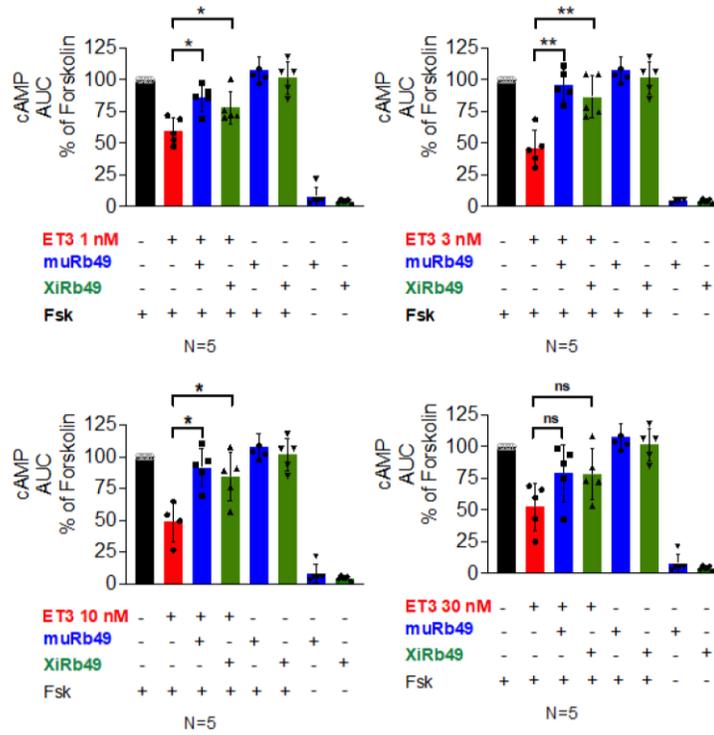


**Figure S3 xiRB49-MMAE ET1-ET2-ET3** : xiRB49-MMAE binding curves on ET<sub>B</sub>+ human melanoma UACC-257 cells. Mean fluorescence intensity (MFI) for each xiRB49-MMAE concentrations measured on 10 000 cells by flow cytometry. Binding curves generated by plotting the normalized MFI (%MFI) versus xiRB49-MMAE concentration. Without ET, black square and black line, or with high ET1, green dotted line, or ET2, blue dotted line, or ET3, orange dotted line, concentrations, at 100 nM each. The calculated K<sub>d</sub> and B<sub>max</sub> are described in table S5B.

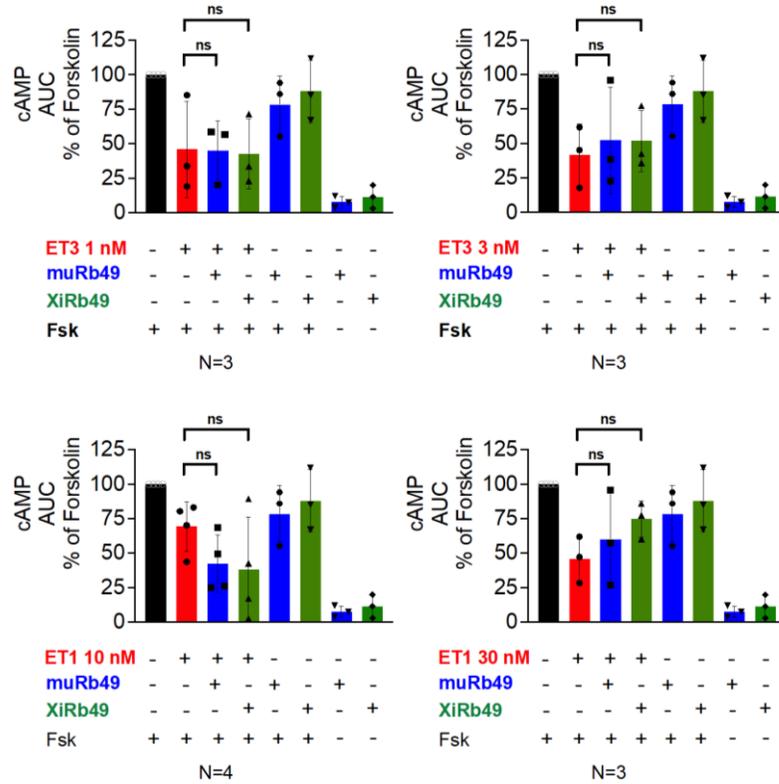


**Figure S4 inhibition of cAMP production induced by Forskolin after ET ligands binding on ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>**

**ET<sub>B</sub>**

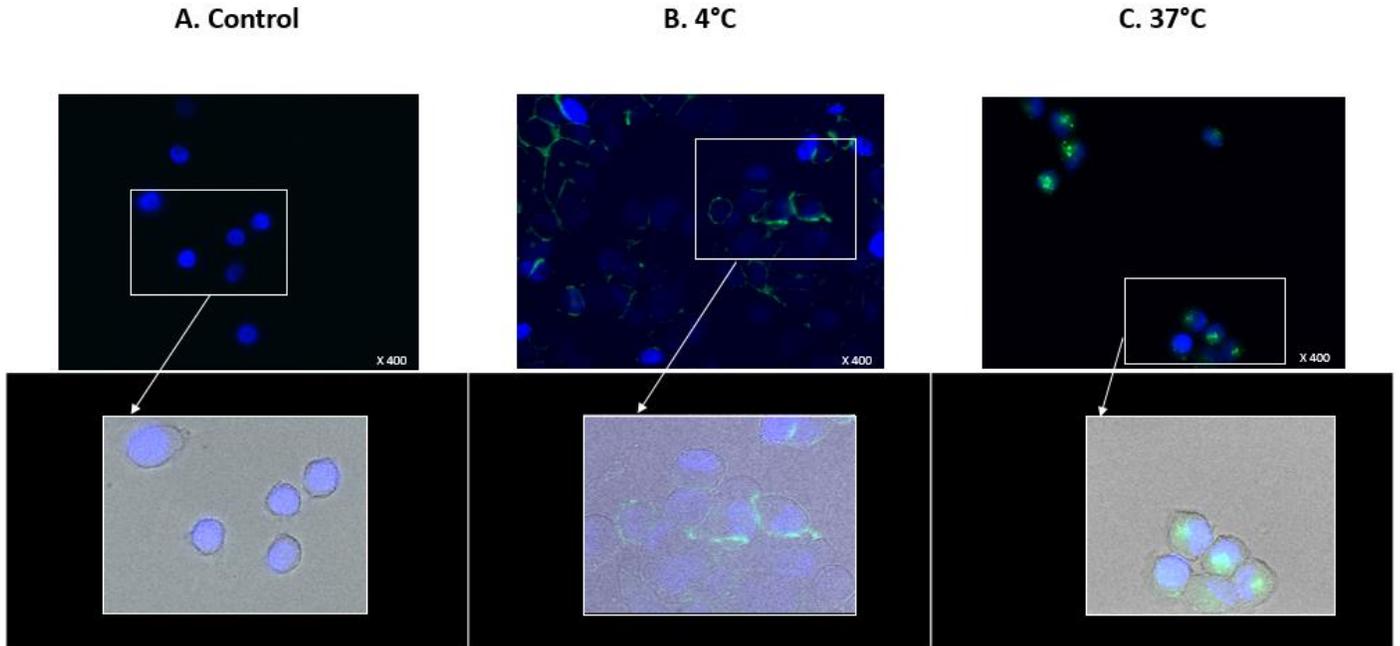


**ET<sub>A</sub>**



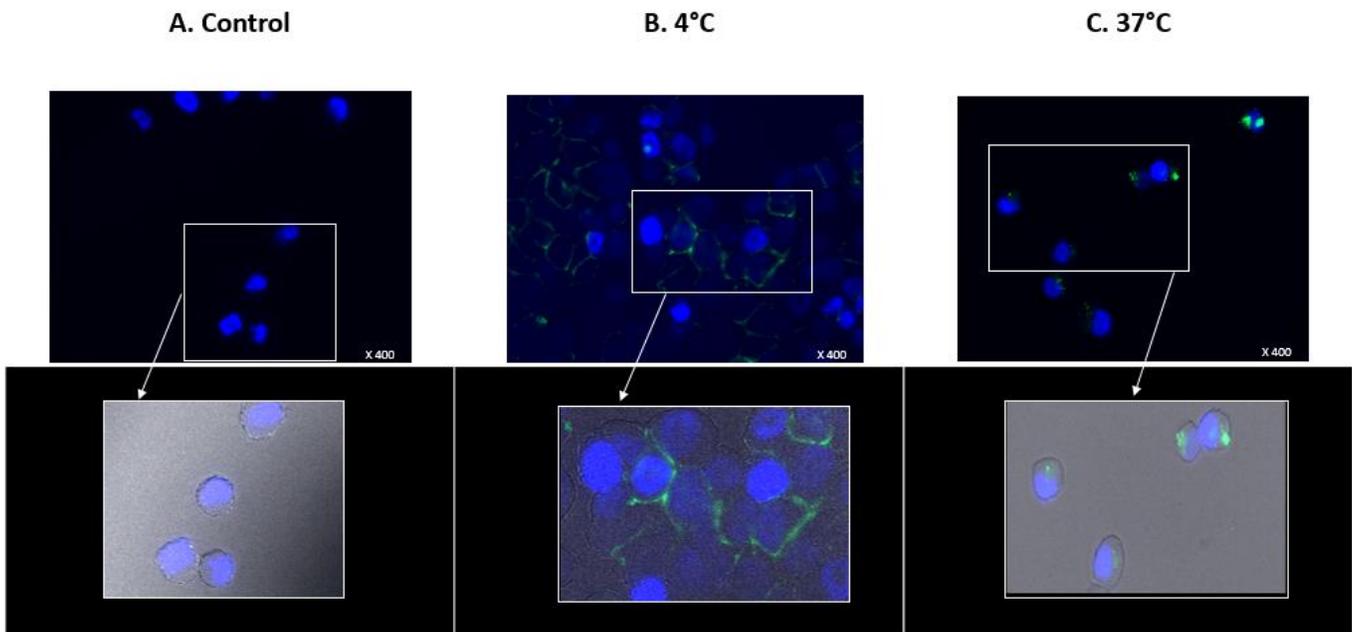
**Figure S5 A. RB49 is internalized at 37°C in UACC-257 cells.** Cells were incubated with 5 nM RB49 for 2 hours at 4°C for membrane labelling. After three PBS washes, RB49 was recognized by the F(ab')<sub>2</sub>-Goat anti-Mouse IgG, secondary antibody coupled with Alexa Fluor 488 (ThermoFisher - ref H10120). The secondary antibody was incubated either **2 hours at 4°C** for membrane labelling or for **1 hour at 37°C** for study the mAb-ET<sub>B</sub> complex internalization. **Control** picture no labelling at 488 is detected, only blue staining of cell nuclei was observed. **At 4°C**, only cell membrane was labelled with RB49 and blue staining of cell nuclei was observed. **At 37°C**, cytoplasmic fluorescence is mainly observed due to internalization of RB49, picture is merged with green cell labelling with RB49 revealed by a secondary antibody coupled with AF488 fluorochrome and blue staining of cell nuclei at 37°C.

**Figure S5A RB49 internalization**



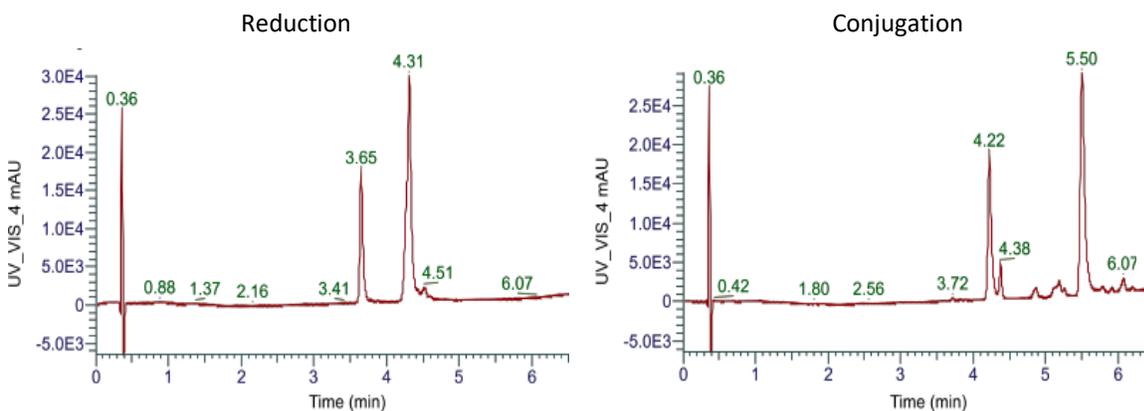
**Figure S5 B. xiRB49 is internalized at 37°C in UACC-257 cells.** Cells were incubated with 5 nM RB49 for 2 hours at 4°C for membrane labelling. After three PBS washes, xiRB49 was recognized by the F(ab')<sub>2</sub>-Goat anti-Mouse IgG, secondary antibody coupled with Alexa Fluor 488 (ThermoFisher - ref H10120). The secondary antibody was incubated either **2 hours at 4°C** for membrane labelling or for **1 hour at 37°C** for study the mAb-ET<sub>B</sub> complex internalization. **Control** picture no labelling at 488 is detected, only blue staining of cell nuclei was observed. **At 4°C**, only cell membrane was labelled with xiRB49 and blue staining of cell nuclei. **At 37°C**, cytoplasmic fluorescence is mainly observed due to internalization of xiRB49, picture is merged with green cell labelling with RB49 revealed by a secondary antibody coupled with AF488 fluorochrome and blue staining of cell nuclei at 37°C.

**Figure S5B xiRB49 internalization**

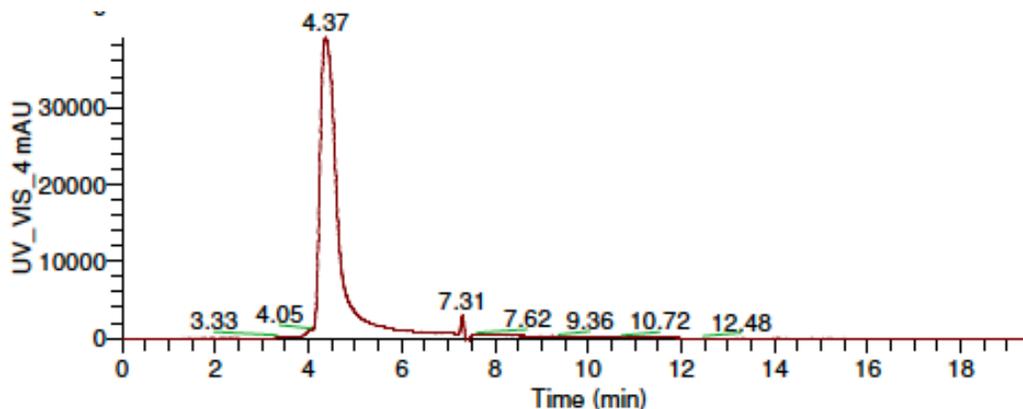


## Figure S6 xiRB49-MMAE characterizations

**A** Reduction and conjugation steps of xiRB49-MMAE were followed by reverse phase HPLC coupled to a high-resolution Orbitrap mass spectrometry.



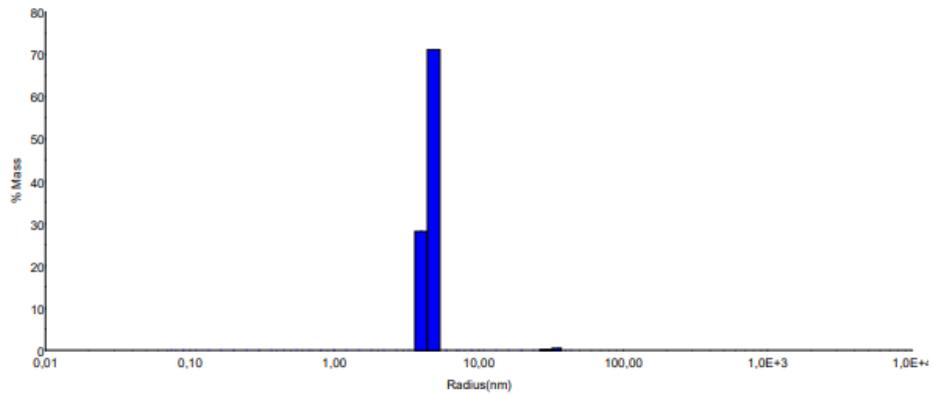
**B** Aggregation of the final ADC was evaluated by size exclusion chromatography (SEC) with an AdvanceBio SEC column.



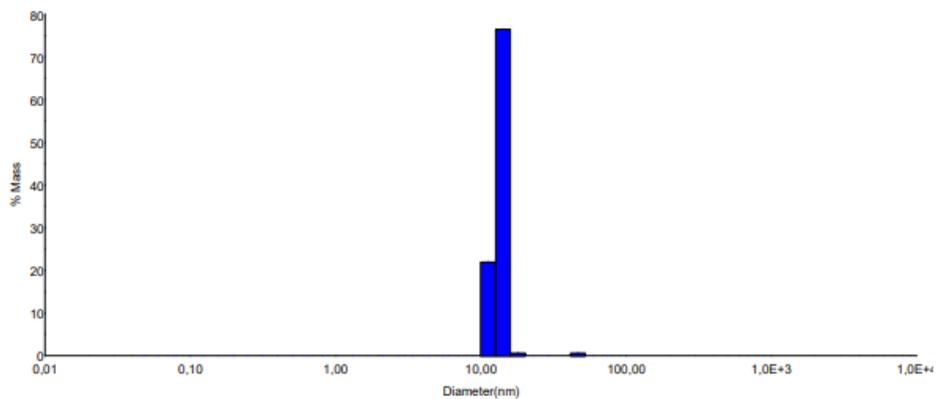
## Figure S6 xiRB49-MMAE characterizations

C DLS experiments realized at 25°C and at a final concentration of antibody of 0.5 mg/ml in PBS pH7.4 after a centrifugation during 10 minutes at 10.000 g (see table S6 for results).

Regularization Results: xiRB49

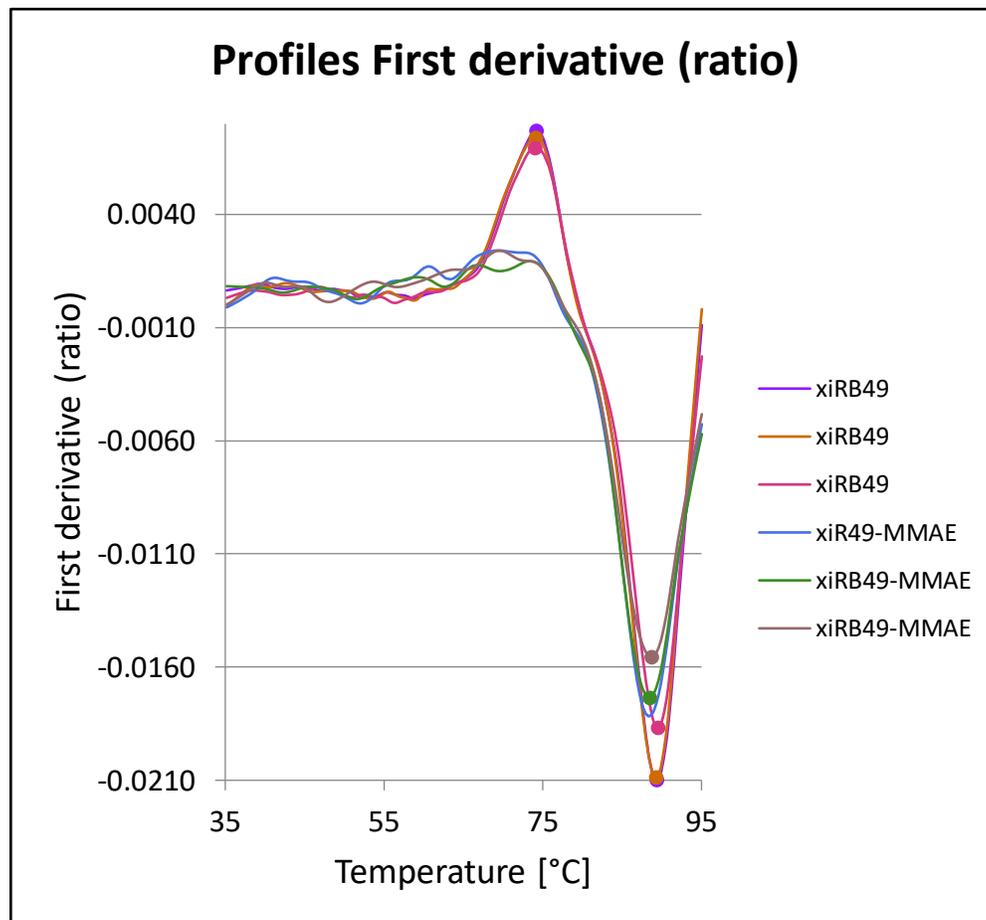


Regularization Results: xiRB49\_MMAE\_



## Figure S6 xiRB49-MMAE characterizations

**D** Thermic denaturation experiments realized in PBS buffer pH7.4 with an antibody concentration of 0.5 mg/ml (see table S7 for results).



## Tables

**Table S2A RB49 binding**

Mab	RB49	RB49 High ET
<b>Bmax</b>	108.1	83.3
<b>Kd (nM)</b>	1.4	0.7
<b>Std. Error</b>		
Bmax ±	0,5	0,4
Kd ± (nM)	0,02	0,02
<b>Unpaired T test</b>		
Significantly different (P < 0.05)?		no
P value summary		ns

**Table S2B RB49 binding**

Mab	RB49	RB49 + ET1 100nM	RB49 + ET2 100nM	RB49 + ET3 100nM
<b>Bmax</b>	108.1	81.2	90.6	95.5
<b>Kd (nM)</b>	1,4	0,5	1,1	1,0
<b>Std. Error</b>				
Bmax ±	0.5	0.3	0.4	0.4
Kd ± (nM)	0,02	0,01	0,02	0,02
<b>Unpaired T test</b>				
Significantly different (P < 0.05)?	no	no		
P value summary	ns	ns		
Significantly different (P < 0.05)?	no		no	
P value summary	ns		ns	
Significantly different (P < 0.05)?	no			no
P value summary	ns			ns

**Table S3A xiRB49 binding**

Mab	xiRB49	xiRB49 High ET
<b>Bmax</b>	110.7	61.5
<b>Kd (nM)</b>	0.8	1.3
<b>Std. Error</b>		
Bmax ±	0.2	0.2
Kd ± (nM)	0,01	0,02
<b>Unpaired T test</b>		
Significantly different (P < 0.05)? P value summary	Yes 0.042 *	

**Table S3B xiRB49 binding**

Mab	xiRB49	xiRB49 + ET1 100nM	xiRB49 + ET2 100nM	xiRB49 + ET3 100nM
<b>Bmax</b>	110.7	82.7	66.5	63.0
<b>Kd (nM)</b>	0.8	2.9	1.9	2.0
<b>Std. Error</b>				
Bmax ±	0.2	0.2	0.2	0.2
Kd ± (nM)	0.01	0.03	0.02	0.02
<b>Unpaired T test</b>				
Significantly different (P < 0.05)? P value summary	no ns	no ns		
Significantly different (P < 0.05)? P value summary	no ns		no ns	
Significantly different (P < 0.05)? P value summary	no ns			no ns

**Table S4A RB1 binding**

Mab	RB1	RB1 High ET
<b>Bmax</b>	86.0	3.0
<b>Kd (nM)</b>	0.9	NA
<b>Std. Error</b>		
Bmax ±	0.2	0.2
Kd ± (nM)	0,02	NA
<b>Unpaired T test</b>		
Significantly different (P < 0.05)?	Yes 0.0007	
P value summary	***	

**Table S4B RB1 binding**

Mab	RB1	RB1+ ET1 100nM	RB1+ ET2 100nM	RB1+ ET3 100nM
<b>Bmax</b>	86.0	4.8	9.4	5.3
<b>Kd (nM)</b>	9	NA	NA	NA
<b>Std. Error</b>				
Bmax ±	0.2	0.03	0.03	0.03
Kd ± (nM)	0.02	NA	NA	NA
<b>Unpaired T test</b>				
Significantly different (P < 0.05)?	Yes 0.0010	Yes 0.0010		
P value summary	**	**		
Significantly different (P < 0.05)?	Yes 0.0015		Yes 0.0015	
P value summary	**		**	
Significantly different (P < 0.05)?	Yes 0.0007			Yes 0.0007
P value summary	***			***

**Table S5A xiRB49-MMAE binding**

Mab	xiRB49-MMAE	xiRB49-High ET
<b>Bmax</b>	123.2	99.7
<b>Kd (nM)</b>	3.5	7.7
<b>Std. Error</b>		
Bmax ±	0.5	0.5
Kd ± (nM)	0,05	0,15
<b>Unpaired T test</b>		
Significantly different (P < 0.05)?		no
P value summary		ns

**Table S5B xiRB49-MMAE binding**

Mab	xiRB49-MMAE	xiRB49-MMAE + ET1 100nM	xiRB49-MMAE + ET2 100nM	xiRB49-MMAE + ET3 100nM
<b>Bmax</b>	123.2	97.0	93.7	86.5
<b>Kd (nM)</b>	3.5	4.6	5.3	5.1
<b>Std. Error</b>				
Bmax ±	0.5	1.0	0.5	0.5
Kd ± (nM)	0.05	0.16	0.09	0.10
<b>Unpaired T test</b>				
Significantly different (P < 0.05)?	no	no		
P value summary	ns	ns		
Significantly different (P < 0.05)?	no		no	
P value summary	ns		ns	
Significantly different (P < 0.05)?	no			no
P value summary	ns			ns

**Table S6 Rh determination by DLS**

Mab	xiRB49	xiRB49-MMAE
Radius (nm)	4.6	6.8
Std. Error		
Radius (nm) ±	0.2	0.1

**Table S7 Ti determination by thermic denaturation curves**

Mab	xiRB49	xiRB49-MMAE
Ti#1 (°C)	74.1	-
Ti#2 (°C)	89.4	88.5
Std. Error		
Ti#1 (°C) ±	0.08	-
Ti#2 (°C) ±	0.13	0.17

**Table S8 IC50 determination by viability cell assay**

Mab	xiRB49	xiRB49-MMAE	Zeocin
IC50 (nM)	NA	0.4	27.1
Std. Error			
IC50 (nM) ±	NA	0.1	7.2

### 3) Discussion et perspectives

Dans cette étude, le xiRB49-MMAE révèle son haut potentiel thérapeutique pour la régression des mélanomes. L'intense marquage par Immuno Histo Chimie (IHC) des ganglions sentinelles de patients métastasés par les mélanomes a mis en évidence la reconnaissance par xiRB49 de la conformation activée d'ET<sub>B</sub> par ET-1. Inversement, xiRB49 ne marque pas les tissus sains et particulièrement les vaisseaux sanguins dont les cellules endothéliales expriment ET<sub>B</sub> mais qui sont pour l'essentiel au repos sans ET-1. Ces résultats sont appuyés par les travaux de cristallisation d'ET<sub>B</sub> du Dr. Shihoya *et al.*<sup>45</sup>. Ces derniers montrent que la fixation d'ET-1 sur ET<sub>B</sub> génère des modifications conformationnelles du récepteur. Ces propriétés allostériques des GPCR sont bien connues<sup>279</sup>. Dans cette conformation « active », l'extrémité N-terminale du récepteur ET<sub>B</sub>, portant l'épitope du xiRB49, est exposée au milieu extracellulaire et accessible à xiRB49. En l'absence d'ET-1, l'extrémité N terminale plonge dans la cavité du GPCR devenant peu accessible au xiRB49.

D'autres explications peuvent rendre compte de ces résultats. Une première hypothèse serait l'expression d'isoformes différentes de l'isoforme « physiologique » d'ET<sub>B</sub> présentes dans les cellules tumorales préférentiellement reconnues par xiRB49. Ces isoformes tumorales seraient codées par des variants du gène *EDNRB* codant ET<sub>B</sub>. La présence de variants du gène *EDNRB* est décrite comme pouvant constituer un facteur de risque pour l'apparition de mélanome<sup>173,174</sup>. L'implication des variants du gène *EDNRB* ayant été reportée dans la progression tumorale et la chimiorésistance des cellules tumorales<sup>55</sup>. L'analyse des transcrits par qPCR ne nous a pas permis d'identifier les variants exprimés dans nos lignées de mélanomes aussi des études de séquençage de l'ARN (RNAseq) sont en cours. Cependant, l'épitope du xiRB49 est présent sur l'ensemble des variants d'ET<sub>B</sub> identifiés à ce jour ne permettant pas *a priori* de les distinguer par xiRB49.

Une seconde hypothèse serait une conformation générée par la dimérisation d'ET<sub>B</sub> qui exposerait l'extrémité N terminale la rendant accessible à xiRB49. En effet, une fois ET-1 fixée sur son récepteur des processus de dimérisation voire même d'oligomérisation ont été décrits pour ces récepteurs<sup>60</sup>.

La régression tumorale a été obtenue avec seulement deux injections de xiRB49-MMAE sans observation d'effets secondaires chez les souris. Plusieurs semaines après la dernière injection, quelques souris présentaient une reprise de la croissance tumorale. Nous n'avons pas prolongé les traitements dans le cadre de cette étude préclinique dépassant les 140 jours. Un

protocole d'injection de l'ADC plus fréquent aurait peut-être suffi à éliminer les cellules tumorales et empêcher la reprise de la croissance tumorale. Cependant des phénomènes d'échappement au traitement ne sont pas à exclure. Ceux-ci peuvent être causés par l'apparition de pompes d'efflux au niveau des cellules tumorales rejetant la molécule cytotoxique hors de la cellule tumorale. Il est également possible qu'une mutation au niveau du gène *EDNRB* bloque l'expression d'ET<sub>B</sub> rendant inefficace le xiRB49-MMAE.

Les mélanomes métastatiques sont extrêmement agressifs et connus pour échapper à de nombreux traitements. Dans ce contexte, d'autres modalités cytotoxiques pourraient éliminer rapidement la tumeur en vue de limiter les rechutes. On peut citer, la radiothérapie interne vectorisée par des anticorps de plus en plus utilisés dans les stratégies thérapeutiques antitumorales :

- L'anticorps anti-CD20 a été approuvé en Europe pour le traitement des lymphomes folliculaires en rechute radiomarqué à l'yttrium 90, l'ibritumomab tiuxetan (Zevalin®) (seul le Zevalin® a été mis sur le marché en Europe). Ce produit a montré sa capacité à induire des réponses cliniques et à augmenter la survie <sup>292</sup>.
- Des résultats encourageants ont été obtenus, avec un anticorps humanisé anti-PSMA (antigène membranaire spécifique de la prostate ou *prostate-specific membrane antigen*) marqué au lutétium 177 dans le cancer de la prostate métastatique <sup>293</sup>.

L'anticorps xiRB49-MMAE a permis dans un modèle préclinique de mélanome une forte régression tumorale. Ces résultats prometteurs et encourageants sont à rapprocher de ceux obtenus par Roche Genentech qui a développé un anticorps ciblant ET<sub>B</sub> nommé 5E9 mais ne présentant pas les caractéristiques de reconnaissance du RB49 <sup>180</sup>. Un essai clinique de phase I a été lancé avec cet anticorps et dont les résultats ont été publiés <sup>182</sup>. Malgré des résultats anti tumoraux clairs 32% des patients ont été stabilisés pendant plus de 6 mois avec une bonne tolérance, le développement clinique de cet anticorps n'a pas été poursuivi.

Les conclusions de cet article recommandaient de mieux sélectionner les patients éligibles à ce traitement en fonction du niveau d'expression d'ET<sub>B</sub>. L'absence de stratification en fonction de la présence au niveau tumoral de la cible représente une réelle limitation de l'essai clinique. La mise en place de l'imagerie moléculaire *in vivo* constituerait une réelle amélioration de la prise en charge des patients en permettant leur stratification.

## Résultats des travaux de thèse

Dans la prochaine partie de mon manuscrit, je mets en œuvre cette approche au niveau préclinique en utilisant l'anticorps xiRA63, reconnaissant ET<sub>A</sub>, radiomarké au zirconium 89. Ce travail ayant pour application potentielle la stratification de patients atteints de GBM ET<sub>A</sub><sup>+</sup> par imagerie immunoTEP. Ces travaux font l'objet d'une publication soumise à EJNMMI (*European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*).



### **III. Chapitre III : Validation préclinique par immunoTEP du [<sup>89</sup>Zr]-xiRA63 et de son fragment [<sup>89</sup>Zr]-ThioFab-xiRA63 comme outil diagnostique du glioblastome humain**

#### *1) Introduction de l'étude*

Malgré des résultats cliniques remarquables chez certains patients traités par les ADC, l'hétérogénéité tumorale entraîne une absence d'efficacité de cette approche thérapeutique pour d'autres malades. L'évaluation de leur profil de biomarqueurs tumoraux pourraient permettre la délivrance de solutions thérapeutiques plus adaptées aux patients. Leur stratification pour un traitement donné devient un enjeu majeur de la médecine de précision.

Ainsi, l'imagerie moléculaire non invasive, permettant la détermination d'un profil tumoral, constitue une approche majeure pour la stratification des patients et dans l'aide au diagnostic par le clinicien. L'imagerie moléculaire permet la visualisation, la caractérisation et la mesure de processus biologiques au niveau moléculaire et cellulaire par des agents de contraste. En raison de leur haute spécificité et de leur forte affinité, les anticorps monoclonaux et leurs fragments sont les candidats idéaux pour générer de tels agents d'imagerie <sup>265</sup>.

La Tomographie par Émission de Positons représente l'une des modalités d'imagerie moléculaire la plus couramment utilisée en clinique. En effet, depuis sa création et sa démocratisation dans la pratique clinique, la TEP a considérablement amélioré la prise en charge des patients, que ce soit pour le diagnostic de la maladie ou pour la stratification des patients. Cependant, la TEP présente certaines limitations comme des difficultés de ciblage de la tumeur. Afin d'améliorer la visualisation de la tumeur et d'optimiser la stratification des patients, la combinaison de l'imagerie TEP à des molécules ciblant des biomarqueurs est prometteuse. Ainsi, le concept d'immunoTEP guidé par des anticorps est né. L'immunoTEP a suscité un intérêt considérable ces dernières années, comme en témoignent les multiples approbations de mise sur le marché d'anticorps thérapeutiques <sup>294-296</sup>. Pour illustrer ce propos, en 2018, une étude a démontré, concernant l'expression de PD-L1 au niveau tumoral, qu'il existait une meilleure corrélation entre la réponse thérapeutique observée en clinique et l'imagerie obtenue par immunoTEP *via* l'atezolizumab (anti-PD-L1) radiomarqué au zirconium qu'avec l'évaluation préalablement réalisée, comprenant de l'IHC ou du séquençage de la tumeur <sup>294</sup>, mettant en évidence l'intérêt diagnostique de l'immunoTEP pour la stratification des patients <sup>248</sup>. De plus, La production accrue de radionucléides à demi-vies longues a facilité

l'essor de cette approche <sup>297</sup>. Dès lors, des agents diagnostiques reposant sur l'emploi d'anticorps ou de leurs fragments afin de détecter l'expression de certains biomarqueurs chez des patients atteints de cancers ont vu le jour <sup>294-296</sup>. L'immunoTEP a également rendu possible l'étude du profil pharmacocinétique et de la biodistribution d'anticorps thérapeutiques destinés à être injectés chez les patients, procurant de précieuses informations pour l'optimisation des immunoconjugués. En effet, comme expliqué dans l'introduction, les anticorps présentent un temps de résidence dans la circulation sanguine important avec des demi-vies de l'ordre de plusieurs jours. Ainsi, le bruit de fond permanent médié par ces anticorps circulants n'est pas propice à une imagerie tumorale de haute qualité. Afin de répondre à cette problématique, de nombreux fragments d'anticorps, éliminés rapidement de la circulation sanguine, ont émergé dans l'arsenal diagnostique des agents d'imagerie par immunoTEP, permettant une amélioration du ratio signal/bruit <sup>248,296</sup>.

L'imagerie TEP utilise des radioéléments appelés radioisotopes, capables d'émettre un positon  $\beta^+$  lors de leur désexcitation. Dans le cas de l'immunoTEP, le radioélément ou radionucléide émetteur de positons est conjugué à un anticorps ciblant une protéine ou une molécule marqueur d'un phénomène biologique d'intérêt. Différents radionucléides peuvent être associés aux fragments d'anticorps pour les études TEP. En préclinique, les radionucléides fréquemment utilisés sont : le carbone-11 ( $^{11}\text{C}$  ;  $t_{1/2} = 20$  minutes), le gallium-68 ( $^{68}\text{Ga}$  ;  $t_{1/2} = 68$  minutes), le fluor-18 ( $^{18}\text{F}$  ;  $t_{1/2} = 110$  minutes), le cuivre-64 ( $^{64}\text{Cu}$  ;  $t_{1/2} = 12,7$  heures), le Zirconium-89 ( $^{89}\text{Zr}$  ;  $t_{1/2} = 3,3$  jours) et l'iode-124 ( $^{124}\text{I}$  ;  $t_{1/2} = 4,2$  jours) <sup>267</sup>. Classiquement, un radioélément est choisi en fonction de sa demi-vie ( $t_{1/2}$ ) qui doit, elle aussi, être proche de la demi-vie biologique de son traceur. Par exemple, pour l'utilisation d'anticorps entier, il est préférable d'y greffer du zirconium-89 ou du cuivre-64, possédant tous deux des demi-vies longues compatibles avec la demi-vie des anticorps. À l'inverse, le fluor-18 ou le gallium-68 sont plus appropriés pour des petits fragments d'anticorps tels que des Fab ou des scFv qui sont rapidement éliminés <sup>268</sup>.

Le recours à l'immuno TEP peut avoir lieu à différentes étapes de la prise en charge du patient, précocement au niveau du diagnostic, ou pendant le traitement du patient pour évaluer la réponse tumorale à l'immunothérapie. Ainsi, la TEP sert d'imagerie prédictive de l'efficacité d'une approche thérapeutique mais aussi d'imagerie pour un suivi longitudinal, en fonction de l'évolution de la tumeur.

Le glioblastome constitue la tumeur cérébrale primitive la plus fréquente et la plus agressive chez l'adulte. Comme présenté dans l'introduction, les glioblastomes sont des pathologies difficilement classifiables du fait de leur haute hétérogénéité. Le profil moléculaire de ces tumeurs dépend généralement de leur génétique, de leur localisation, des facteurs ayant participé à leur développement, du type cellulaire à l'origine de la tumeur et de son historique de tumeur secondaire récurrente ou de tumeur primaire. De ce fait, et sans diagnostic médié par une imagerie moléculaire préalable, il est difficile de trouver un traitement adapté aux patients atteints de GBM. Dès lors, l'immunoTEP permet l'étude de la présence de biomarqueurs tumoraux en temps réel et donc la prédiction de la réponse thérapeutique clinique de manière non invasive.

Bien que des progrès considérables pour le traitement des cancers aient été réalisés, l'arsenal thérapeutique pour lutter contre les glioblastomes reste très restreint. La difficulté d'éliminer efficacement la totalité des cellules cancéreuses, en particulier les cellules souches cancéreuses associées au glioblastome (CSG), constitue une réelle limitation aux traitements dans la prise en charge du GBM<sup>117,192</sup>. En effet, les CSG représentent une sous population cellulaire au sein des GBM, qui possèdent la capacité d'initier le processus tumoral. Dans la présente étude, une lignée cellulaire appelée Gli7 a été utilisée et exprime l'antigène CD133<sup>+</sup>. Les CSG sont considérées comme responsables de la résistance de certains types de cancer vis-à-vis d'une grande variété de molécules thérapeutiques à cause, entre autres, de leur pompe d'efflux<sup>89,298,299</sup>. Les nouvelles approches thérapeutiques se doivent d'identifier puis d'éradiquer les cellules souches au sein de la tumeur, en parallèle des thérapies conventionnelles. Ainsi, le recours à des anticorps monoclonaux ciblant les CSG constitue une stratégie thérapeutique judicieuse. Pour ce faire, l'identification de nouveaux biomarqueurs à la surface des CSG est indispensable.

Depuis les années 2000, l'axe endothéline, est connu comme jouant un rôle majeur dans la propagation tumorale du glioblastome<sup>208</sup>. ET<sub>A</sub> est surexprimé par l'endothélium vasculaire à proximité du glioblastome et ET<sub>B</sub> est surexprimé à la surface des cellules tumorales. Les lignées de GBM présentant une hétérogénéité conséquente, le taux d'expression de ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> peut ainsi être différent en fonction des lignées cellulaires de glioblastome considérées<sup>212</sup>.

Les Récepteurs des endothélines, de par leur potentiel de biomarqueurs thérapeutiques, ont suscité un intérêt conséquent au sein de la communauté scientifique et plusieurs molécules antagonistes de ces récepteurs ont été développées, telles que le macitentan, un double antagoniste des ETR, et l'atrasentan, un antagoniste ET<sub>A</sub>. Ces molécules ont fait l'objet de deux

essais cliniques (NCT01499251 et NCT00017264). Malheureusement, ces études n'ont pas mis en évidence d'augmentation de la survie chez les patients atteints de GBM. Comme expliqué précédemment, le micro-environnement tumoral étant extrêmement riche en endothéline, qui présente une affinité remarquable pour ses récepteurs, il paraît alors peu probable que les molécules antagonistes puissent entrer en compétition avec l'endothéline endogène et interagir avec les ETR. De plus, leur passage à travers la BHE n'a pas été démontré, malgré leur fort potentiel lipophile (NCT01499251) <sup>218</sup>. Néanmoins, ces essais cliniques soulignent la pertinence de cibler ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> dans une approche thérapeutique du GBM et, avant tout, la nécessité de stratifier les patients vis-à-vis de la présence de ces biomarqueurs.

Dans la partie suivante, les anticorps chimériques développés au laboratoire, le xiRA63 et le xiRB49, ont été testés par cytométrie en flux sur une lignée de CSG appelée Gli7 (Résultats complémentaires à l'article). Le marquage par xiRA63 étant plus intense que celui du xiRB49, nous l'avons sélectionné pour étudier l'expression d'ET<sub>A</sub> dans un modèle de GBM humain par imagerie immunoTEP.

Le taux de délivrance de molécules thérapeutiques au travers la BHE reste de nos jours un écueil compromettant l'efficacité de la majorité des traitements. Cependant, dans des conditions pathologiques avancées telles que dans les glioblastomes, la BHE voit ses propriétés de barrière sélective altérées permettant d'envisager le passage d'un anticorps thérapeutique comme le xiRA63 ou de son fragment le ThioFab-xiRA63. De plus ce type de fragments ayant une demi-vie plus courte, cela permettra une imagerie de plus haute qualité, de par la limitation significative du bruit de fond.

Dans l'article suivant les anticorps xiRA63 et ThioFab-xiRA63 ont été radiomarqués au zirconium 89, [<sup>89</sup>Zr], permettant l'évaluation de leur biodistribution tissulaire et de leur paramètres pharmacocinétiques. Cette étude a mis en évidence la capacité du [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 à traverser la BHE tumorale et sa meilleure absorption tumorale comparativement au [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63. Cette étude souligne le fort potentiel du [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 pour le ciblage spécifique des glioblastomes ET<sub>A</sub><sup>+</sup>, ouvrant ainsi des possibilités diagnostiques et thérapeutiques par immunoTEP.

2) Article soumis dans EJNMMI en février 2023



Etat de la publication: accepté en mai 2023 dans  
EJNMMI : European Journal of Nuclear Medicine &  
Molecular Imaging (IF :9.23)

**« ImmunoPET imaging-based pharmacokinetic profiles of an antibody and  
its Fab targeting endothelin A receptors on glioblastoma stem cells in a  
preclinical PDOX model**

Marie Hautiere <sup>1,4</sup>, Delphine Vivier <sup>2</sup>, Donovan Pineau <sup>3</sup>, Caroline Denis <sup>4</sup>,  
Dimitri Kereselidze <sup>4</sup>, Amaury Herbert <sup>1</sup>, Narciso Costa <sup>1</sup>, Victor Goncalves <sup>2</sup>,  
Erwan Selingue <sup>5</sup>, Benoit Larrat <sup>5</sup>, Jean Philippe Hugnot <sup>3</sup>, Franck Denat <sup>2</sup>,  
Didier Boquet <sup>1\*,+</sup>, Charles Truillet <sup>4,\*,+</sup> »

**ImmunoPET imaging-based pharmacokinetic profiles of an antibody and its Fab targeting endothelin A receptors on glioblastoma stem cells in a preclinical orthotopic model**

Marie Hautiere <sup>1,4</sup>, Delphine Vivier <sup>2</sup>, Donovan Pineau <sup>3</sup>, Caroline Denis <sup>4</sup>, Dimitri Kereselidze <sup>4</sup>, Amaury Herbert <sup>1</sup>, Narciso Costa <sup>1</sup>, Victor Goncalves,<sup>2</sup> Erwan Selingue,<sup>5</sup> Benoit Larrat,<sup>5</sup> Jean Philippe Hugnot <sup>3</sup>, Franck Denat <sup>2</sup>, Didier Boquet <sup>1\*\*</sup>, Charles Truillet <sup>4,\*+</sup>

**Author affiliations**

<sup>1</sup> Université Paris-Saclay, CEA, DMTS, SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France

<sup>2</sup> Université de Bourgogne, ICMUB UMR CNRS 6302, Dijon, France

<sup>3</sup> Université de Montpellier, IGF, INSERM U 1191 - CNRS UMR 5203, Montpellier, 34094, France

<sup>4</sup> Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Inserm, BioMaps, Orsay, 91401, France

<sup>5</sup> Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, NeuroSpin/BAOBAB, Gif sur Yvette, France

\* The authors are joint last authors.

+ Corresponding authors: Charles Truillet (ImmunoPET and Pharmacokinetic)

[charles.truillet@universite-paris-saclay.fr](mailto:charles.truillet@universite-paris-saclay.fr) & Didier Boquet (Endothelin A receptor and antibody)

[didier.boquet@cea.fr](mailto:didier.boquet@cea.fr)

**Short running title**

ImmunoPET imaging of ET<sub>A</sub> in glioblastoma

**Word count**

5240

## ABSTRACT

**Background.** The resistance of glioblastoma stem cells (GSCs) to treatment is one of the causes of glioblastoma (GBM) recurrence. Endothelin A receptor (ET<sub>A</sub>) overexpression in GSCs constitutes an attractive biomarker for targeting this cell subpopulation, as illustrated by several clinical trials evaluating the therapeutic efficacy of endothelin receptor antagonists against GBM. In this context, we have designed an immunoPET radioligand combining the chimeric antibody targeting ET<sub>A</sub>, chimeric-Rendomab A63 (xiRA63), with <sup>89</sup>Zr isotope and evaluated the abilities of xiRA63 and its Fab (ThioFab-xiRA63) to detect ET<sub>A</sub><sup>+</sup> tumors in a mouse model xenografted orthotopically with patient-derived Gli7 GSCs.

**Results.** Radioligands were intravenously injected and imaged over time by μPET-CT imaging. Tissue biodistribution and pharmacokinetic parameters were analyzed, highlighting the ability of [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 to pass across the brain-tumor barrier and achieve better tumor uptake than [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63.

**Conclusions.** This study shows the high potential of [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 in specifically targeting ET<sub>A</sub><sup>+</sup> tumors, thus raising the possibility of detecting and treating ET<sub>A</sub><sup>+</sup> GSCs, which could improve the management of GBM patients.

**Keywords:** positron emission tomography (PET), Endothelin A (ET<sub>A</sub>), Glioblastoma, pharmacokinetics.

## INTRODUCTION

Diffuse gliomas are highly invasive and aggressive tumors, typically graded in three degrees of malignancy, from II to IV, which include glioblastoma (GBM; grade IV) (1). GBM is characterized as the most biologically heterogeneous, infiltrative and diffuse high-grade subtype of glioma (2). Clinical symptoms appear when the brain is already invaded by highly infiltrating GBM tumor cells rendering these tumors incurable due to their considerable resistance against standard-of-care treatment, i.e. radio- and chemotherapy as well as surgical resection (3-5). GBM typically contains sub-populations of highly tumorigenic glioblastoma stem cells (GSCs) displaying significant levels of differentiation. GSCs are poorly sensitive to current anti-mitotic treatments, which accounts for the resurgence of this cancer in patients (6). A better understanding of GBM propagation at the cellular and molecular levels is a major scientific challenge today in the development of new therapeutic approaches.

The endothelin (ET) axis, consisting of three ligands (ET1, ET2, and ET3) and two receptors ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>, is recognized as a driver of tumor progression in several cancers, in particular, in glioma where the ET axis is deregulated (7-11). Gliovis Brain tumor transcriptomic dataset analysis from the TCGA GBM and the Ivy Glioblastoma Atlas Project clearly showed ET<sub>A</sub> overexpression in GBM patient biopsies and particularly in the GBM vascular endothelium, while ET<sub>B</sub> seems to be expressed more on GBM tumor cells (see SI Supplemental Results from GBM databases) (9,12). As ET receptors are relevant therapeutic and diagnostic biomarkers for GBM, the drugs, Macitentan a dual ET receptor antagonist, and Atrasentan an ET<sub>A</sub> antagonist, were evaluated in two clinical trials (NCT01499251 and NCT00017264). Unfortunately, these drugs did not increase survival in GBM patients, probably due to the high concentration of ET<sub>1</sub> in the tumor microenvironment. Nevertheless, these clinical trials highlight the relevance of targeting ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> in a therapeutic approach to GBM (13,14) and, importantly, the need to stratify patients for the presence of these biomarkers.

In this context, we have developed an antibody named randomab A63, RA63, against the human ET<sub>A</sub> receptor. Unlike previous antagonist drugs, RA63 is not displaced in the presence of high ET concentrations, thus hinting at a high therapeutic and diagnostic potential in human subjects (15). To explore ET<sub>A</sub> expression in the GBM tumor microenvironment and for patient stratification, we used an highly sensitive and whole body imaging technic with immuno-positron emission tomography (immunoPET) imaging in an original mouse preclinical model based on orthotopic xenografts with an

ET<sub>A</sub><sup>+</sup> GBM stem cell line, Gli7. This cell line, from a patient diagnosed with grade IV GBM, is highly infiltrative (16). Detection of ET<sub>A</sub><sup>+</sup> GSC in the whole GBM volume was achieved with two unique platforms: a full-length monoclonal antibody (xiRA63) and its ThioFab fragment conjugated to DFO and radiolabeled with zirconium-89 (<sup>89</sup>Zr, t<sub>1/2</sub> = 3.3 days).

### MATERIALS AND METHODS

**Antibody production.** We generated a chimeric version of RA63 called xiRA63. Heavy and light chains encoding IgG-xiRA63 and ThioFab-xiRA63 were subcloned into the pTT5 expression plasmid (17). Vectors were co-transfected into ExpiCHO-S cells (ThermoFisher Scientific) with the ExpiCHO Expression System Kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions (MAN0014337 ThermoFisher Scientific). Day 12 post-transfection, supernatant was clarified by centrifuging at 4000-5000xg for 30 min at 4°C and filtered through a 0.22 µm filter. xiRA63 was purified on a HiTrap Protein A HP column (GE HealthCare) and ThioFab-xiRA63 on the HiTrap KappaSelect (GE HealthCare). Following elution, antibody solutions were dialyzed with Slide-A-Lyzer™G2 Dialysis Cassette (ThermoFisher Scientific) into 1 L of phosphate-buffered saline (PBS).

**Flow cytometry.** We used the protocol of Herbet et al. (18). Briefly, two cell lines were used to assess the apparent affinity of xiRA63 or ThioFab-xiRA63: Chinese hamster ovary wild-type (CHO-WT) cells and CHO cells stably transfected with human ET<sub>A</sub> (CHO-ET<sub>A</sub>). Apparent affinity was determined with a dilution range from 0.001 nM to 100 nM for ThioFab-xiRA63 and 0.001 nM to 10 nM for xiRA63. The binding was revealed by an FITC-conjugated goat anti-human IgG Fd (CliniSciences) or an Alexa-Fluor 488™ conjugated with F(ab')<sub>2</sub>-goat anti-human IgG Fc (Invitrogen) and incubated for 4 hours at 4°C. Samples were washed three times with PBS between each step. Sample fluorescence was measured at 488 nm with the FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and expressed as a percentage of the mean fluorescence intensity per sample. The "one site specific binding" function of GraphPad was applied to fit the binding curve and determined the B<sub>max</sub> and the apparent K<sub>d</sub> values (Figure 1.1, Supplemental figure 1.2).

**Synthesis of ThioFab-xiRA63-DFO.** Bioconjugation was performed on a specific thiol inserted at the C-TER of the fragment to avoid perturbing the affinity. ThioFab-xiRA63 (500 µg) was reduced with 30.8 µL of TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) at 37°C for 1 hour. After purification, reoxidation of the native interchain disulfide bond was carried out with dehydroascorbic acid for 1 hour at 37°C. After

## Résultats des travaux de thèse

purification *via* centrifugation filter units, deferoxamine-maleimide was added and the reaction mixture was stirred at 37°C for 2 hours. The conjugate was then purified by size-exclusion chromatography (Superdex 75 10/300 GL) to remove potential dimers (Figure 1.1). Reduction, reoxidation and conjugation steps were followed by reverse phase HPLC (Vanquish, ThermoFisher Scientific) coupled to high-resolution Orbitrap mass spectrometry (Exploris 240, ThermoFisher Scientific) using an ESI source (Figure 1.1, Supplemental figure 1.2). Data were analyzed with FreeStyle and BioPharma Finder 4.1 software (ThermoFisher Scientific). High-resolution mass spectra were deconvoluted using the Xtract function for reduced fragments (25 kDa) and ReSpect function for intact ThioFab (50 kDa). The chelator-to-antibody ratio was determined by comparison of native and conjugated ThioFab masses.

**Synthesis of xiRA63-DFO.** The DFO conjugation was performed following a conventional random lysine conjugation (19). xiRA63 antibody (776 µg) was dissolved in PBS (pH 7.4) and the pH of the solution was adjusted to 8.8 with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.1 M). DFO-NCS (10.4 µL) was added and the solution was incubated at 37°C for 1 hour. The modified antibody was then purified *via* size-exclusion chromatography (Sephadex G-25 M, PD-10 column, GE HealthCare) and concentrated using centrifugal filter units with a 50 kDa cut off (Millipore Corp) and PBS (pH 7.4) to give 643 µg of xiRA63-DFO. The degree of labeling was measured by mass spectrometry (MALDI-ToF, DOL = 1.7 ± 0.2) (Figure 1.1, Supplemental figure 1.2).

**Cell culture Gli7.** Human GBM stem cells, Gli7 (ET<sub>A</sub><sup>+</sup>), were cultured in DMEM-F12 (Gibco) supplemented with 1% glutamine (Gibco), 1% N2 (Gibco), 1% B27 (Gibco), 0.6 µg/mL glucose (Sigma), 20 µg/mL insulin (Sigma), 0.2 µg/mL bFGF (Preprotech), 0.2 µg/mL EGF (Preprotech), 2 µg/mL ciprofloxacin (Euromedex) and 2 µg/mL heparin (Sigma). Cells were incubated at 37°C in a 5% humidified atmosphere.

**Mouse nude model orthotopically implanted.** Twelve female 4 weeks old NMRI nude mice (Janvier Labs) were orthotopically implanted with 5.10<sup>5</sup> Gli7 cells, into the striatum (2 mm on the right from the bregma and 2.5 mm depth from the dura). Animal anesthesia was performed with isoflurane in oxygen associated with local xylocaine anesthesia.

**Antibody radiolabeling with <sup>89</sup>Zr.** To radiolabel antibodies with Zirconium-89 (PerkinElmer), we followed the protocol described in Bouleau et al, 2021 (20). On the day prior to injection (Supplemental figure 1.1), 0.75 mg of xiRA63-DFO and 0.65 mg of ThioFab-xiRA63-DFO, pH adjusted to 7.2, were

incubated in a solution containing [ $^{89}\text{Zr}$ ][Zr-(oxalate) $_4$ ] $^{4-}$  for 1 hour at 37°C, 300 rpm. The oxalic acid of the  $^{89}\text{Zr}$  solution (200  $\mu\text{L}$ , 413 MBq) was neutralized with 90  $\mu\text{L}$  of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2 M) before addition to the antibody solution. [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-xiRA63-DFO and [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-ThioFab-xiRA63-DFO were purified on a PD-10 column with a gentisic acid solution (pH 5.4-5.6) as a mobile phase and concentrated by Vivaspin® ultrafiltration tubes (Sartorius) with a 10 kDa cutoff for the ThioFab and a 50 kDa cutoff for the mAb. Radiochemical purity of [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-xiRA63-DFO and [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-ThioFab-xiRA63-DFO was assessed by size-exclusion high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a UV (UVD 170U UV/VIS) and scintillation gamma detector (Packard). Measurements were performed using a bioZen 1.8  $\mu\text{m}$  SEC-2 LC column (Phenomenex) and a DIONEX System (Thermo-Fisher). A linear-gradient elution was carried out with a solution of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50 mM) and KCl (250 mM) (pH 6.8), at a flow rate of 0.2 mL/min (Supplemental Figure 1.3).

**Antibody injection.** 78 days after GBM cell implantation, according to the tumor development described by Herbet et al. (18), 12 mice were randomized into 2 groups (Supplemental Figure 1.1): n=6 mice that received intravenously [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-xiRA63-DFO (150  $\mu\text{C}\pm 5 \mu\text{C}$ ) and n=6 mice injected with [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-ThioFab-xiRA63-DFO (3.7 Mbq $\pm 0.185$  Mbq). Specific activities injected are presented in supplementary Figure 1.4.

**PET-CT image acquisition.** A 60-minute dynamic acquisition using an Inveon microPET scanner or an Inveon microPET/CT scanner (Siemens) was performed immediately after injection of the  $^{89}\text{Zr}$  radiolabeled conjugates. Then, a 20-minute PET acquisition was performed at 5 h, 24 h, 48 h, 72 h and 7 days post injection (p.i.) (Supplemental Figure 1.1).

**PET-CT analysis.** Acquisition analysis was performed with PMOD software (Version3.9). Spherical volumes of interest (VOI) with a fixed size of 8 mm $^3$  were created in several organs: heart, liver, kidneys, spleen and muscle. For bone and the brain tumor, VOI were drawn with the “iso-contour” tool. We applied the same tumor’s VOI to the contralateral side and the brain opposite side (used as a negative control). The activity concentration in each VOI was corrected according to the half-life of  $^{89}\text{Zr}$  and presented as a percentage of injected dose per volume of tissue (%ID.cm $^{-3}$ ) (Supplemental Figure Table 1.7).

**Pharmacokinetic analysis.** To determine the pharmacokinetics, we plotted the plasma time-activity curves (TAC) (Supplemental Figure 1.11) and applied a two-compartment model (Figure 1.2 and

Supplemental Figure 1.12.A) using PKIN software (version 4.2). In order to determine the specific (irreversible) and the nonspecific (reversible) brain tumor uptake, we applied a Patlak graphical evaluation of transfer constants (21). PKIN software was used to calculate the irreversible ( $K_i$ ) and reversible ( $V_t$ ) constant. An  $r$  value more than 0.9 was considered acceptable. The reversible and irreversible contributions to the uptake of the  $^{89}\text{Zr}$  radiolabeled conjugates were calculated following the mathematical formula in Figure 1.3 and Supplemental Figure 3.1.

**Biodistribution *ex vivo*.** 7 days p.i., mice were sacrificed and key organs were collected: blood, liver, spleen, intestine, heart, kidney, muscle and bones. Specific activity in each organ was counted with a gamma counter (Cobra gamma counter, Packard). The activity concentration in each organ is presented as a percentage of the injected dose per volume of tissue ( $\%ID.g^{-1}$ ) (Supplemental Figure Table 1.7). A Pearson correlation was applied between biodistribution *ex vivo* and *in vivo* derived from PET images 7 days p.i. (Supplemental Figure Table 1.8).

**Immunofluorescence labeling.** Coronal brain sections (10  $\mu\text{m}$ ) were fixed with neutral buffer formalin 10% (Sigma) for 15 minutes. Slides were incubated for 5 minutes in 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -PBS and permeabilized for 5 minutes in PBS-Triton 0.1% buffer. A mixture of 5% bovine serum albumin (BSA) (ThermoFisher Scientific) with 0.5% Tween-80 was incubated with sections for 1 hour. To label  $\text{ET}_A$ , we used the xiRA63 antibody ( $0.1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) for 1 hour at RT. This antibody was revealed with a  $\text{F(ab')}_2$ -goat anti-human IgG Fc (1:500, Invitrogen) for 1 hour at RT. On the adjacent slide, a mouse anti-human-mitochondria Alexa Fluor® 488 (Sigma-Aldrich) was incubated for 1 hour at RT. Sections were mounted using Prolong Diamond Antifade Mounting medium with DAPI. Slides were washed three times with PBS buffer between each step. An Axio Observer Z1 microscope (Zeiss) was used with a 20x objective to scan the full sections (Supplemental Figure 2.5, 2.6) and a 40x objective for the regions of interest (Figure 2.2). Post-processing qualitative analysis was performed with ZEN software (v2.6, Zeiss). Harris hematoxylin and Eosin Y alcoholic (Sigma-Aldrich) were used according to the manufacturer's instructions to confirm the presence of the tumor. The Axio Observer Z1 microscope and ZEN were also used with a 20x objective to scan the full sections (Figure 2.2 and Supplemental Figure 2.5, 2.6).

**Statistics.** GraphPad Prism software (v9.0.1) was used for statistical analyses. Student's  $t$  test (two-tailed) was used to compare two data groups (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ).

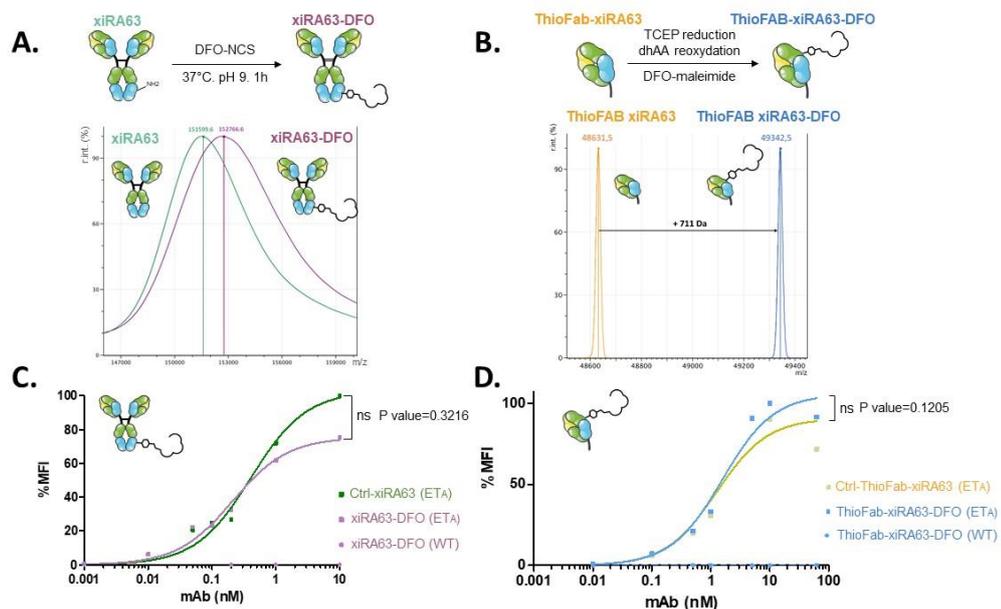
## RESULTS

### *In vitro* characterization and *in vivo* biodistribution of the innovative immunoPET-radioligand (xiRA63) and its fragment Fab (ThioFab-xiRA63) targeting ET<sub>A</sub>

Mass spectrometry analysis demonstrated the successful conjugation of the xiRA63 with DFO-NCS and the ThioFab-xiRA63 with DFO-maleimide, with a degree of labeling of 1.7 and 1.0, respectively (Figure 1.1 A-B). This also allowed us to validate the absence of ThioFab dimer after conjugation which could have been an issue with this antibody fragment (Supplemental Figure 1.2).

We compared the functionalities of the DFO conjugates with their native forms by flow cytometry (Figure 1.1 C-D). The xiRA63-DFO and ThioFab-xiRA63-DFO binding curves were similar to those of their unconjugated format, showing that both conjugates retain high affinities (nM) for ET<sub>A</sub>, and confirming the low impact of DFO conjugation (p value >0.1). Their specificity was preserved with the CHO-WT negative control generating signals below 2% MFI and high signals on CHO-ET<sub>A</sub><sup>+</sup> control cells. Then, the two conjugates were radiolabeled with <sup>89</sup>Zr and radiochemical purity was estimated at 100% after purification steps by SE-HPLC (Supplemental Figure 1.3).

**Figure 1.1: Validation of DFO conjugation and the functionality of xiRA63 and ThioFab-xiRA63 immunotracers.** **A.** Schema of DFO conjugation to mAb-xiRA63 validated by MALDI-TOF mass spectrometry (green line: native xiRA63, purple line: random-xiRA63-DFO). **B.** DFO conjugation to the ThioFab-fragment and its deconvoluted high-resolution Orbitrap mass spectrum (orange line: native ThioFab-xiRA63, blue line: ThioFab-xiRA63-DFO). Binding curve comparison by flow cytometry **C.** between the native xiRA63 (green) and xiRA63-DFO (purple) and **D.** between the native ThioFab-xiRA63 (orange) and ThioFab-xiRA63-DFO (blue). The conjugates were tested on CHO-ET<sub>A</sub> and CHO-WT. Data are presented as mean ± SEM. A two-tailed paired Student's t test was used for data comparison. MFI: median fluorescence intensity.

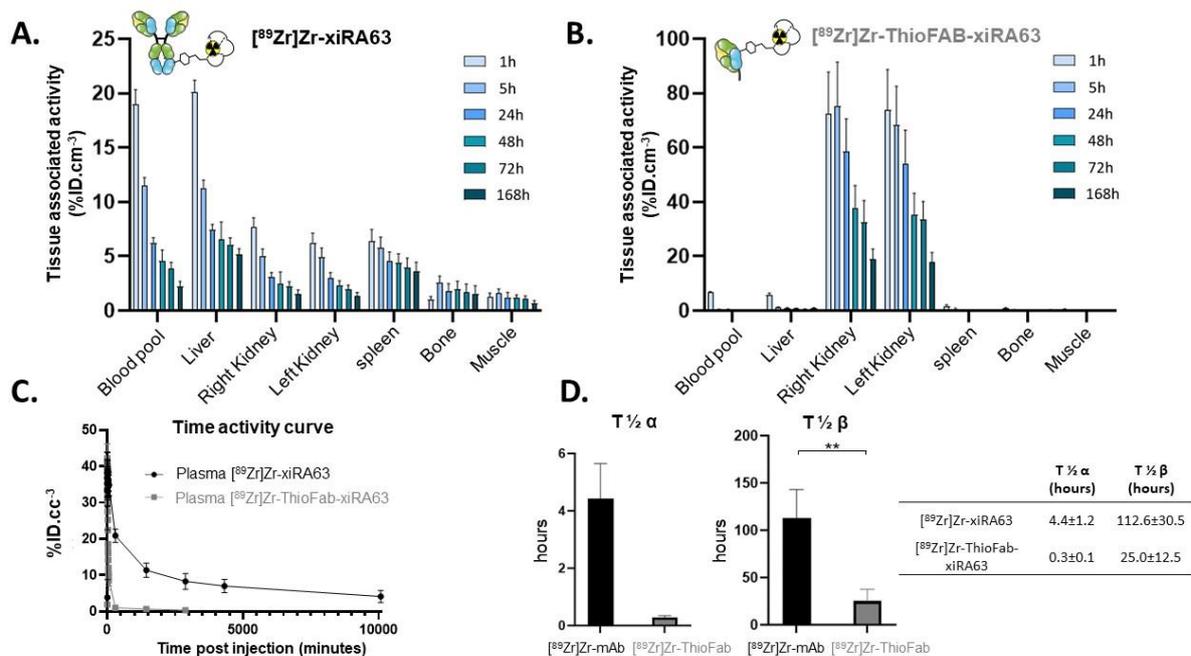


Female nude mice were orthotopically implanted with Gli7 and validated as expressing ET<sub>A</sub> recognized by xiRA63 using flow cytometry (Supplemental Figure 1.4). After about three months, mice were imaged by MRI (Supplemental Figure 1.5). Then, they were injected with [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 and [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 (5.1±0.13 MBq, 3.3± 0.1 nmol) (Supplemental Figure 1.6) and whole-body imaged by microPET/CT at different time points, which gave the tissue distribution of the two radiolabeled conjugates up to a week p.i.. As expected, xiRA63 and the ThioFab-xiRA63 gave two different biodistribution profiles (Figure 1.2 A-B). [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 was mostly found in the blood and liver during the first hour p.i. (20%ID.cm<sup>-3</sup>) due to its high molecular weight (>60 kDa). This antibody is clearly excreted by the hepato-biliary system (Supplemental Figure 1.10). At 48 h p.i., the main activity decreased (close to 5%ID.cm<sup>-3</sup>) and was found in blood, liver and spleen. IgG1 are known to recognize the FcγRI expressed in the liver, the spleen and on immune cells. Conversely, [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 (<60 kDa) followed the renal elimination pathway (70%ID.cm<sup>-3</sup> accumulation in the kidneys the first hour p.i.). Indeed, small molecules are rapidly cleared from blood because of glomerular filtration and renal excretion (Supplemental Figure 1.9). In each case, the two conjugates followed the classical elimination pathways without targeting nonspecific organs such as muscle and bone.

Major organ uptake determined by [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 and [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 PET imaging correlated with values obtained by *ex-vivo* analysis performed 7 days p.i. ( $r = 0.69$  or  $r = 0.98$ ,  $p < 0.001$  (\*\*\*)) (Supplemental Figure 1.8).

To determine the half-time distribution ( $t_{1/2\alpha}$ ) and elimination phases ( $t_{1/2\beta}$ ) of the conjugates, we used a two-compartmental model analysis based on the time plasma-activity curve (Figure 1.2 & Supplemental Figure 1.12). [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 presented a longer half-life elimination ( $t_{1/2\beta}=112.6$  h) compared to [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 ( $t_{1/2\beta} = 25$  h). Concerning the half-time distribution within other tissues, the full mAb spread slower ( $t_{1/2\alpha} = 4.4$ h) than the ThioFab ( $t_{1/2\alpha} = 0.3$ h). Consistent with previous results, systemic clearance of the ThioFab antibody fragment (1.3 mL.h<sup>-1</sup>) was faster than that of the full antibody (0.05 mL.h<sup>-1</sup>) (data not shown).

**Figure 1.2: Kinetic distribution of  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-xiRA63}$  and  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-ThioFab-xiRA63}$  radioligands over time in a human GSC (Gli7) orthotopic xenograft in a nude mouse model.** Biodistribution extrapolated from PET imaging at different times in key organs of **A.**  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-xiRA63}$  and **B.**  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-ThioFab-xiRA63}$ . **C.** plasma time-activity curve (TAC) of the two  $\text{ET}_A$  radioligands. **D.** radioligand half time distribution ( $T_{1/2\alpha}$ ) and elimination ( $T_{1/2\beta}$ ) derived from a two-compartment plasma model, presented as mean $\pm$ SD.  $n = 6$  mice  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-xiRA63}$ ,  $n = 5$  mice  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-ThioFab-xiRA63}$ , %ID.cm $^{-3}$ : percentage injected dose per volume of tissue.

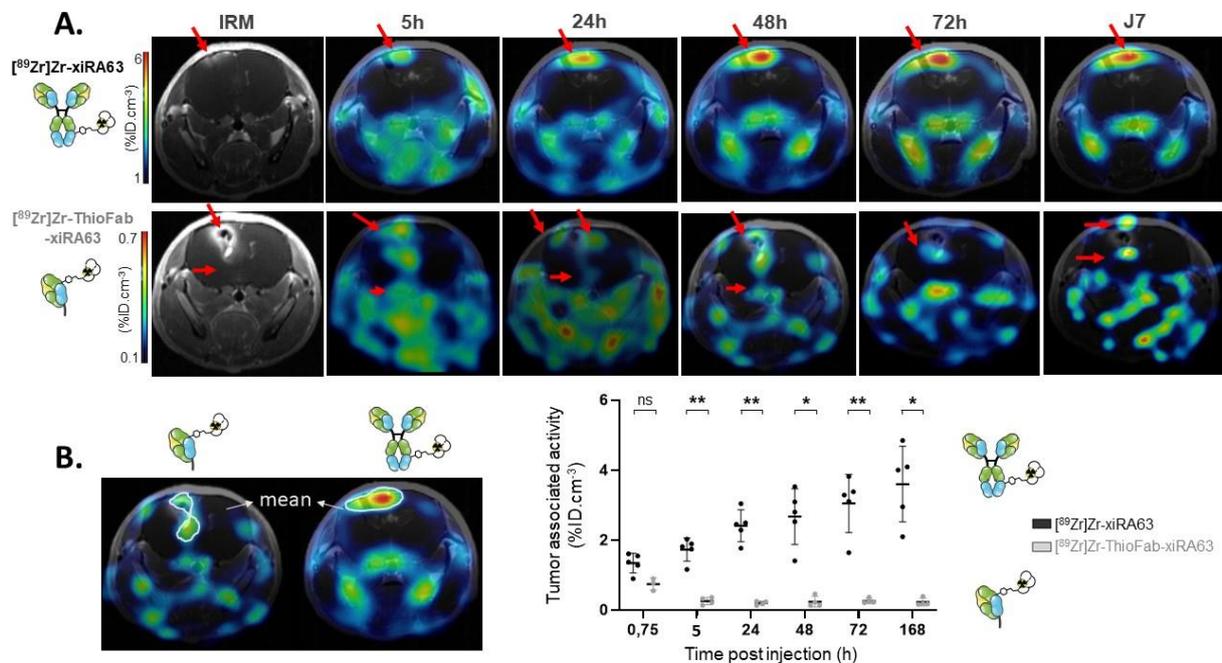


### $\text{ET}_A$ expression from glioblastoma stem cells PDOX tumor assessed by $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-ThioFab-xiRA63}$ and $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-xiRA63}$ specific uptake

One hour p.i., the two antibody formats were able to target the Gli7 brain tumor with a tumor activity uptake of  $0.74 \pm 0.18\% \text{ID.cm}^{-3}$  for the ThioFab-xiRA63 fragment and  $1.34 \pm 0.28\% \text{ID.cm}^{-3}$  for the full antibody (Figure 2.1). However, after 5 hours p.i.,  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-xiRA63}$  exhibited a higher effectiveness and a better uptake ( $1.72 \pm 0.33\% \text{ID.cm}^{-3}$ ) than  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-ThioFab-xiRA63}$  ( $0.26 \pm 0.1\% \text{ID.cm}^{-3}$ ). As mentioned before, the short fragment was quickly cleared from the circulation, giving it no time to spread throughout the tumor (ThioFAB-xiRA63:  $k_{12} = 1.9 \text{ h}^{-1}$ ). Concerning  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-xiRA63}$ , tumor uptake kept increasing up to 168 hours p.i., reaching a value of  $3.6 \pm 1.1\% \text{ID.cm}^{-3}$ . The prolonged presence of  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-xiRA63}$  in the circulation, as shown by its biodistribution ( $2.27 \pm 0.41\% \text{ID.cm}^{-3}$ ), may explain why the tumor uptake did not reach a saturation phase.

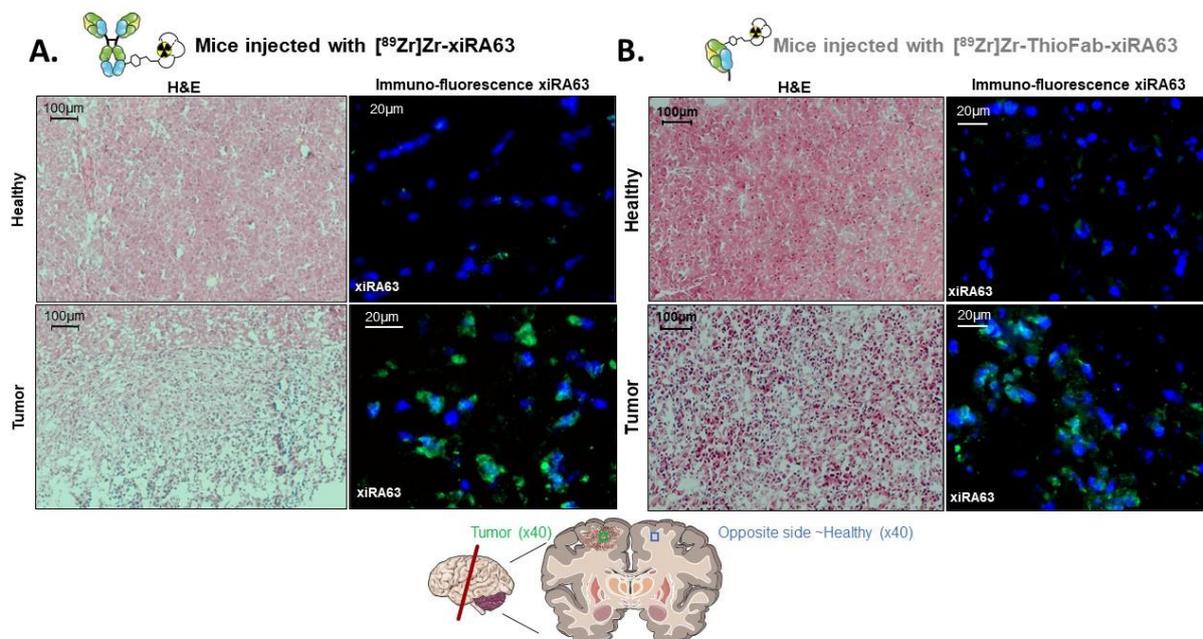
Regarding the tumor/background ratio (Supplemental Figure 2.1), the best contrast was obtained with [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab at the first time point (0.75 h) because of its short pharmacokinetic parameters. After 5 hours p.i., no significant difference was observed between the two formats and the [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 showed a maximal tumor/background ratio of 2.5 at 168 h p.i..

**Figure 2.1: Tumor uptake of [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 and [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63.** **A.** brain tumor PET imaging over time (4 h, 24 h, 48 h, 72 h, day 7 p.i.) layered with the initial MR imaging with contrast agent performed ten days before PET imaging. Red arrows show the tumor signal by PET imaging. **B.** quantitative uptake of [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 (black) and [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 (grey) in the Gli7 model. Data are presented as mean ± SD; comparison was done with a two-tailed paired Student's t test. \*\* = P < 0.01; \* = P < 0.05; ns= no significant; N mice injected with [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 = 4 ; N mice injected with [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 = 5.



H&E and immunofluorescence (IF) of brain slices allowed us to explore the specificity of our immuno-conjugates to ET<sub>A</sub> in the tumors (Figure 2.2). First, tumor localization was determined by H&E staining. Then, we compared the cellular density area with the hematoxylin blue staining in the ipsilateral and contralateral regions, where we expected to see no tumor infiltration. The anti-human mitochondria confirmed the tumor localization by IF in the ipsilateral side and no tumor cell was observed in the contralateral region, which was used as reference (Supplemental Figure 2.5, 2.6). Finally, the presence of ET<sub>A</sub> receptor in the tumor region previously determined by H&E and anti-mitochondria-IF was confirmed using the xiRA63 by IF on the adjacent slide.

**Figure 2.2: ET<sub>A</sub> distribution in Gli7 tumors by immunofluorescence.** H&E (left) and IF with xiRA63-anti-humanAF488 (right) staining on healthy and tumor brain sections **A.** from mice injected with [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 and **B.** from mice injected with [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63. H&E scale bar: 100 μm; H&E objective: x20; IF scale bar: 20 μm; microscope objective: x40.

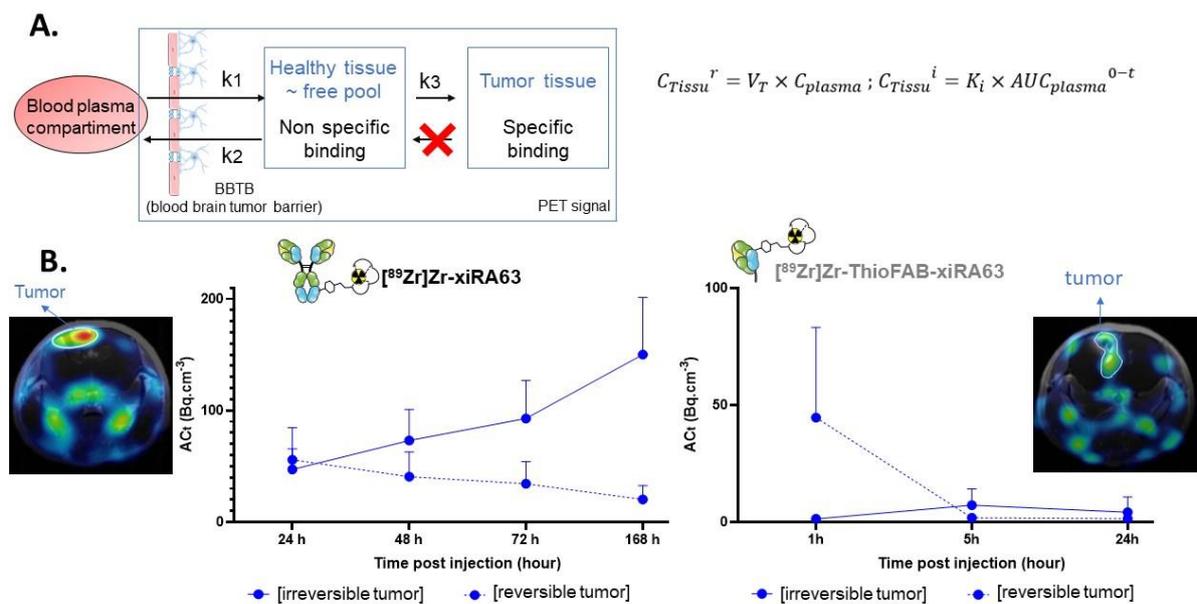


### [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63, a gold candidate targeting ET<sub>A</sub> receptor for *in vivo* immunPET imaging of glioblastoma

Following the Patlak linearization model for immunPET imaging data (21), the irreversible and reversible contributions of the two radioligands were extrapolated. The Patlak model uses the graphical evaluation of transfer constants within the tumor tissues (Figure 3.1). The irreversible contribution can be considered as the target engagement, called the “specific uptake” to ET<sub>A</sub> in our case, and the reversible contribution can be related to the nonspecific part that includes the blood vessel activity or the remaining radioligands in the tumor interstices which did not interact with the target and has no pharmacologic effects (21). *K<sub>i</sub>* and *V<sub>t</sub>* values are presented in Supplemental table 3.1. For [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63, only the three earlier time points (1 h, 5 h and 24 h p.i.) were used because of its quick elimination from the blood volume fraction and its fast accumulation in the tumor (highest tumor activity obtained 1 h p.i.). Conversely, the last four times points were used for [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63, because of its low elimination from blood and its slow accumulation in the tumor (higher tumor activity obtained 168 h p.i.). The transition time to discriminate the nonspecific signal from the specific tumor signal began at

72 h p.i. for the full mAb and at 5 h p.i. for the ThioFab fragment. The greatest irreversible and specific signal in the tumor obtained with  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -ThioFab-xiRA63 was reached at 5 h p.i., while the  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -xiRA63 irreversible signal continued to increase after 168 h p.i..

**Figure 3.1: Determination of specific binding via the Patlak pharmacokinetic model.** **A.** Schematic representation of the Patlak 2-tissue compartment model with  $k_4=0$ . (21).  $V_T$ = Distribution volume in the reversible compartment ( $\text{mL}\cdot\text{cm}^{-3}$ ),  $K_i$  = net influx rate of mAb radiolabeling from plasma to tissue ( $\text{mL}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{min}^{-1}$ ), AUC: area under the curve ( $\text{Bq}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); r=reversible; i= irreversible **B.** The solid line shows the irreversible and specific uptake (calculated according to  $K_i$ ,  $\text{AUC}_{\text{plasma}}^{0-t}$ ) and the dashed line represents the reversible and nonspecific uptake (calculated according to  $V_T\cdot C_{\text{plasma}}$ ). Left side: results of  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -xiRA63 uptake in the tumor (blue) and in the background (orange). Right side:  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -ThioFab-xiRA63 results. Mice injected with  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -ThioFab-xiRA63 = 4; Mice injected with  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -xiRA63 = 5.



## DISCUSSION

ET<sub>A</sub> is clearly a promising GBM biomarker and is of interest for therapeutic purposes. In order to select patients who overexpress this biomarker, we developed an immunoPET radioligand based on xiRA63 mAb to enable specific targeting of ET<sub>A</sub><sup>+</sup> GBM, as demonstrated in the Gli7 mouse model.

The major limitation for radioligand design is directly related to brain delivery due to the existence of the blood-brain barrier (BBB), which constitutes both a physical and biochemical barrier between the bloodstream and the brain. Glioblastomas are highly angiogenic tumors where the formation of new blood vessels promotes tumor growth (22). This primary tumor contains functional and nonfunctional vessels in which BBB is altered. However, despite overproduction of proangiogenic factors, the barrier at the proximity of the tumor proliferation is highly heterogeneous, leading to production of a permeable blood-tumor barrier (BTB) which is often assumed to allow the extravasation of small and large molecules such as antibodies, and a restricted BBB (23,24). Previous results, recorded using RA63 conjugated with Alexa Fluor 680 fluorochrome injected and imaged in mice bearing GBM stem cells, have already suggested the ability of the full IgG to cross the BTB/BBB and target the ET<sub>A</sub><sup>+</sup> GBM (18). Nonetheless, we hypothesized that ThioFab, which does not contain the Fc region and has a reduced molecular weight (50 kDa), might more readily cross the BBB/BTB and target ET<sub>A</sub>. Despite controversy, the role of the neonatal Fc receptor (FcRn) in passage of the antibody into the brain may contribute to the low mAb brain uptake (25). Fast clearance of xiRA63-ThioFab (50 kDa) from the plasma *via* glomerular filtration and renal excretion (protein clearance threshold is ~60 kDa) has logically been observed, resulting in a maximum concentration of the radioligand in the tumor five hours p.i., as described for several Fab pharmacokinetics (26). Remarkably, in our high infiltrative GBM model as characterized by IF, full xiRA63 mAb seems to present a better tumor uptake than ThioFab-xiRA63, thanks certainly to its prolonged half-life. These results could be explained in two ways: i) Gli7 may present a favorable disrupted barrier that facilitates the passage of full-length mAb (currently under investigation); ii) ET<sub>A</sub> is merely confined to tumor endothelial cells in an altered vascular environment, thus allowing labeling with xiRA63 (27). Patlak pharmacokinetic linearization for immunoPET based on antibody ligands can distinguish irreversible uptake, which corresponds mostly to specific binding, from the reversible uptake, which may be related to blood flow and the so-called EPR effect (enhanced permeability retention effect) (28). Thanks to this model, we have demonstrated that the signal observed at 3 to 7 days corresponds merely to the specific uptake of the full mAb allowing a high tumor-to-

background ratio. xiRA63 immunoPET uptake can be correlated to strong GBM ET<sub>A</sub> scoring. The GBM primary culture Gli7 used in the project is the most relevant model since it is derived directly from patients diagnosed with a grade IV glioma. The Gli7 model, which has a highly infiltrative component, has shown excellent xiRA63 uptake.

### **CONCLUSION**

We have developed a potent immunoPET ligand (<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63) able to detect ET<sub>A</sub>, a GBM biomarker, in a relevant preclinical model. Using Patlak linearization especially applied to immunoPET analysis, we have demonstrated that [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 uptake is highly specific to ET<sub>A</sub> and that the remaining uptake at 7 days p.i. is directly related to ET<sub>A</sub> binding. Ultimately, [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 immunoPET could be used to stratify GBM patients, particularly those with ET<sub>A</sub><sup>+</sup> tumors.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Céline Chevaleyre for her expertise on the pharmacokinetic model with Patlak and Benoit Jego for his support *on ex vivo* processing.

### **FUNDING**

This work was funded by the ANR (ANR-19-CE18-0013, DualMab) and performed at an imaging platform supported by the France Life Imaging network (ANR-11-INBS-0006).

### **CONFLICT OF INTEREST**

All the authors declare that they have no conflict of interest.

### **ETHICAL APPROVAL**

All animal experiments were performed according to the European Directive 2010/63/EU and to its transposition into the French law (Decree No. 2013-118). This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

## REFERENCES

1. Yang K, Wu Z, Zhang H, et al. Glioma targeted therapy: insight into future of molecular approaches. *Molecular Cancer*. 2022;21:39.
2. Rodríguez-Camacho A, Flores-Vázquez JG, Moscardini-Martelli J, et al. Glioblastoma Treatment: State-of-the-Art and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23:7207.
3. Noch EK, Ramakrishna R, Magge R. Challenges in the Treatment of Glioblastoma: Multisystem Mechanisms of Therapeutic Resistance. *World Neurosurgery*. 2018;116:505-517.
4. Steponaitis G, Tamasauskas A. Mesenchymal and Proneural Subtypes of Glioblastoma Disclose Branching Based on GSC Associated Signature. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22:4964.
5. Venkataramani V, Yang Y, Schubert MC, et al. Glioblastoma hijacks neuronal mechanisms for brain invasion. *Cell*. 2022;185:2899-2917.e31.
6. Auffinger B, Spencer D, Pytel P, Ahmed AU, Lesniak MS. The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. *Expert Rev Neurother*. 2015;15:741-752.
7. Rosanò L, Spinella F, Bagnato A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:637-651.
8. Davenport AP, Kuc RE, Southan C, Maguire JJ. New Drugs and Emerging Therapeutic Targets in the Endothelin Signaling Pathway and Prospects for Personalized Precision Medicine. *Physiol Res*. May 2018:S37-S54.
9. Vasaikar S, Tspiras G, Landázuri N, et al. Overexpression of endothelin B receptor in glioblastoma: a prognostic marker and therapeutic target? *BMC Cancer*. 2018;18:154.
10. Egidy G, Eberl LP, Valdenaire O, et al. The endothelin system in human glioblastoma. *Lab Invest*. 2000;80:1681-1689.
11. Sone M, Takahashi K, Totsune K, et al. Expression of Endothelin-1 and Endothelin Receptors in Cultured Human Glioblastoma Cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2000;36:S390.
12. Bowman RL, Wang Q, Carro A, Verhaak RGW, Squatrito M. GlioVis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets. *Neuro Oncol*. 2017;19:139-141.
13. Weathers S-P, Rood-Breithaupt J, de Groot J, et al. Results of a phase I trial to assess the safety of macitentan in combination with temozolomide for the treatment of recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncology Advances*. 2021;3:vdab141.
14. Phuphanich S, Carson KA, Grossman SA, et al. Phase I safety study of escalating doses of atrasentan in adults with recurrent malignant glioma. *Neuro Oncol*. 2008;10:617-623.
15. Herbet A, Costa N, Leventoux N, et al. Antibodies targeting human endothelin-1 receptors reveal different conformational states in cancer cells. *Physiol Res*. 2018;67:S257-S264.
16. Guichet P-O, Bieche I, Teigell M, et al. Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors. *Glia*. 2013;61:225-239.
17. Durocher Y, Perret S, Kamen A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:E9.
18. Herbet A, Costa N, Leventoux N, et al. Antibodies Targeting Human Endothelin-1 Receptors Reveal Different Conformational States in Cancer Cells. *Physiol Res*. May 2018:S257-S264.

19. Bouleau A, Nozach H, Dubois S, et al. Optimizing immunoPET imaging of tumor PD-L1 expression: pharmacokinetics, biodistribution and dosimetric comparisons of 89Zr-labeled anti-PD-L1 antibody formats. *Journal of Nuclear Medicine*. December 2021.
20. Bouleau A, Lebon V, Truillet C. PET imaging of immune checkpoint proteins in oncology. *Pharmacol Ther*. 2021;222:107786.
21. Jauw YWS, O'Donoghue JA, Zijlstra JM, et al. 89Zr-Immuno-PET: Toward a Noninvasive Clinical Tool to Measure Target Engagement of Therapeutic Antibodies In Vivo. *J Nucl Med*. 2019;60:1825-1832.
22. Ahir BK, Engelhard HH, Lakka SS. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Mol Neurobiol*. 2020;57:2461-2478.
23. Razpotnik R, Novak N, Čurin Šerbec V, Rajcevic U. Targeting Malignant Brain Tumors with Antibodies. *Front Immunol*. 2017;8:1181.
24. Cuddapah VA, Robel S, Watkins S, Sontheimer H. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15:455-465.
25. Kouhi A, Pachipulusu V, Kapenstein T, Hu P, Epstein AL, Khawli LA. Brain Disposition of Antibody-Based Therapeutics: Dogma, Approaches and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22:6442.
26. Ruiz-López E, Calatayud-Pérez J, Castells-Yus I, et al. Diagnosis of Glioblastoma by Immuno-Positron Emission Tomography. *Cancers*. 2022;14:74.
27. Lange F, Kaemmerer D, Behnke-Mursch J, Brück W, Schulz S, Lupp A. Differential somatostatin, CXCR4 chemokine and endothelin A receptor expression in WHO grade I–IV astrocytic brain tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;144:1227-1237.
28. Wijngaarden JE, Huisman MC, Pouw JEE, Menke-van der Houven van Oordt CW, Jauw YWS, Boellaard R. Optimal imaging time points considering accuracy and precision of Patlak linearization for 89Zr-immuno-PET: a simulation study. *EJNMMI Research*. 2022;12:54.

**ImmunoPET imaging-based pharmacokinetic profiles of an antibody and its Fab targeting endothelin A receptors on glioblastoma stem cells in a preclinical orthotopic model**

Marie Hautiere, Delphine Vivier, Donovan Pineau, Caroline Denis, Dimitri Kereselidze, Amaury Herbet, Narciso Costa, Victor Goncalves, Erwan Selingue, Benoit Larrat, Jean Philippe Hugnot, Franck Denat, Didier Boquet, Charles Truillet

**MATERIALS AND METHODS SUPPLEMENTAL DATA**

**Antibodies production**

IgG-xiRA63 and ThioFab-xiRA63 heavy and light chains were cloned into the pTT5 expression plasmid (Durocher et al.,2002). Vectors were cotransfected at a final concentration of 0.8µg plasmid/mL culture into ExpiCHO-S cells (ThermoFisher Cat # A29127) with the ExpiCHO Expression System Kit (ThermoFisher Cat # A29129) according to the manufacturer's instructions "ExpiCHO™ Expression System User Guide" (MAN0014337 ThermoFisher Scientific). Cells were cultured in ExpiCHO™ Expression Medium (ThermoFisher Cat # A29100-02) in a humidified 8% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C and 120 ± 5 rpm. Day 12 post transfection, supernatant was clarified by centrifuging at 4000-5000xg for 30 min at 4°C and filtered through 0.22µm filter. The harvest of the full mAb xiRA63 was purified on a HiTrap Protein A HP column (GE Healthcare, Cat.17-0402-03) and the Fab fragment xiRA63 on the HiTrap KappaSelect (GE Healthcare, Cat. 17-5458-11). Following elution, antibodies solutions were dialysed with Slide-A-Lyzer™G2 Dialysis Cassette (Thermoscientific 87731) into 1L of PBS. Samples purity and quality were assessed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), dynamic light scattering (DLS), and by Tycho NT.6 from Nanotemper.

**Flow cytometry**

We used the protocol from Borull et al.,2016 and Herbet et al.,2018. Two control cells lines were used to assess the apparent affinity of xiRA63 of thioFab-xiRA63: Chinese Hamster Ovary Wild Type (CHO-WT) and Chinese Hamster Ovary stably transfected with human ET<sub>A</sub> (CHO-ET<sub>A</sub>) provided by Dr. M. Iglarz (Actelion). Cells were resuspended in a saturation buffer (PBS 1X, 5% goat normal serum, 0.1% bovine serum albumin) and 3.10<sup>6</sup> living cells were loaded into each sample. Apparent affinity was determined with a dilution range from 0.001nM to 100nM for the ThioFab fragment and 0.001 to 10nM for the full-mAb. Samples were incubated at 4°C overnight. Next day, the system was revealed by an FITC conjugated with

Goat Anti-Human IgG Fd (CliniSciences 2046-02) or an Alexa-Fluor 488<sup>TM</sup> conjugated with F(ab')<sub>2</sub>-goat anti-Human IgG Fc (Invitrogen H10120) diluted 1/500 and incubated during 4 hours at 4°C. Samples were washed three times with PBS between each step. Sample's fluorescence was measured at 488nm wavelength with the FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and expressed as a percentage of the mean fluorescence intensity per sample. The function "one site specific binding" on GraphPad was applied to get the binding curve, the Bmax and the apparent Kd (Figure 1.1, Supplemental figure 1.2).

#### **Antibodies-DFO synthesis and validation by mass spectrometry:**

**Synthesis of ss-ThioFab-xiRA63-DFO.** ThioFab-xiRA63 bearing the mutation A121C (IMGT nomenclature) contains a cysteine amino acid at an original position allowing us to conjugate a desferoxamin in a site specific manner. ThioFab-xiRA63 (500 µg, 459 µL at 1.1 g/L) was reduced with 30.8 µL of TCEP (20mM) at 37°C for 1 hour. After purification using centrifugal filter units with a 10,000 Da molecular weight cut off, reoxidation of the native interchain disulfide bond was carried out with 6.75 µL of dehydroascorbic acid (dhAA, 20 equiv., 50 mmol/L in carbonate/bicarbonate buffer pH 9) for 1 hour at 37°C. After removal of the excess dhAA with centrifugal filter units, 3.62 µL of Deferoxamine-maleimide (10 equiv., 15 mmol/L in DMSO) were added to the reaction mixture and stirred at 37°C for 2 hours. The conjugate was then purified by size exclusion chromatography (Superdex 75 10/300 GL) to remove potential dimers (Figure 1.1).

**Characterization of ss-ThioFab-xiRA63-DFO.** Reduction, reoxidation and conjugation were followed by reverse phase HPLC (Vanquish, Thermo Fisher Scientific) coupled to a high-resolution Orbitrap mass spectrometry (Exploris 240, Thermo Fisher Scientific) using an ESI source (positive mode) (Figure 1.1, Supplemental figure 1.2). **HPLC:** A MabPac RP column (2.1 mm x 100 mm, 4µm, Thermo Fisher Scientific) was used at 80°C (denaturing conditions), with a flow rate of 0.5 mL/min and a gradient 20-45% B in 6 min (eluent A: H<sub>2</sub>O + 0.02% TFA + 0.08% FA and B: ACN + 0.02% TFA + 0.08% FA). **Mass:** Full scan data were acquired at resolving power 30000 at m/z 200 in the m/z range 1000–4 000. Data were analyzed with FreeStyle and BioPharma Finder 4.1 software (both Thermo Fisher Scientific). High-resolution mass spectra were deconvoluted using the Xtract function for reduced fragments (≈ 25 kDa) and ReSpect function for intact thioFab (≈ 50 kDa). The degree of labeling was determined by comparison of native and conjugated antibody masses (DOL = 1). The presence of dimers was

evaluated by size exclusion chromatography (SEC) with an AdvanceBio SEC column (Agilent Technologies). The column was eluted at 25°C with 200 mM ammonium acetate (pH 6.9) at a flow rate of 0.5 mL/min (Supplemental figure 1.2).

**Synthesis of rd-xiRA63-DFO.** xiRA63 antibody (776 µg, 242µL at 3.2 mg/mL) was dissolved in 135 µL of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), and the pH of the solution was adjusted to 8.8-9.0 with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.1 M). To this solution was added 10.4 µL of DFO-NCS (10 equiv., 5 mmol/L in DMSO) in small aliquots while gently shaking. The resulting solution was incubated at 37°C for 1 hour. The modified antibody was then purified via size exclusion chromatography (Sephadex G-25 M, PD-10 column, GE Healthcare) and concentrated using centrifugal filter units with a 50,000 Da molecular weight cut off (Amicon™ Ultra 2 mL Centrifugal Filtration Units, Millipore Corp., Billerica, MA) and phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) to give 643 µg of DFO modified antibody. The degree of labeling was measured by mass spectrometry (MALDI-ToF, DOL = 1.7 ± 0.2) (Figure 1.1, Supplemental figure 1.2).

#### **Cells culture gli7:**

Human glioblastoma stem cells, named gli7 (Guichet et al., 2012) provided by Dr. J.P. Hugnot was used as a real human tumor model expressing ETA. Cells were cultured in DMEM-F12 (21331 GIBCO®) supplemented with 1% glutamine (25030 Gibco®), 1% N2 (17502 Gibco™), 1% B27 (17504 Gibco™), 0.6µg/mL glucose (G8769 Sigma®), 20µg/mL insuline (91077 Sigma®), 0.2µg/mL bFGF (100-18b Preprotech ®), 0.2µg/mL EGF (AF-100-15 preprotech®), 2µg/mL ciprofloxacin (UC5074 Euromedex) and 2 µg/mL Heparin (H3149 Sigma®). Cells were incubated at 37°C with 5% humidified atmosphere. Mycoplasma absence was confirmed using MycoAlert™ kit (Lonza, USA).

#### **Mouse nude model orthotopically implanted:**

All animal experiments were performed according to the European Directive 2010/63/EU and to its transposition into the French law (Decree No. 2013-118). Twelve four-week-years-old female NMRI nude mice (Janvier Labs) were orthotopically implanted with 5.10<sup>5</sup> Gli7 cells, contained in 2.5µL, into the striatum (2mm on the right from the bregma and 2.5mm depth from the dura). Animal anesthesia was performed with isoflurane in oxygen (4% for induction and 2% to 3% for maintenance) associated with xylocaïne in local. A 10µL

Hamilton syringe was used with a flow rate of 0.25 $\mu$ L/min. During the injection, 0.05mg.kg<sup>-1</sup> of buprenorphine was administered subcutaneously. Mice were housed by four in ventilated cages with a 40% humidity and a 22°C temperature-controlled room. After 78 days post grafting (Supplemental figure 1.1), mice were intravenously injected with xiRA63 or ThioFab-xiRA63 conjugated with the DFO and radiolabeled with Zirconium-89.

#### **ThioFab-xiRA63-DFO and xiRA63-DFO radiolabeling with <sup>89</sup>Zr:**

To radiolabel antibodies with Zirconium-89 (PerkinElmer), a previously described protocol from Vosjan et al.,2010 was used. On the day prior injection (Supplemental figure 1.1), 0.75mg of xiRA63-DFO and 0.65mg of ThioFab-xiRA63-DFO, pH adjusted to 7.2, was incubated in a solution containing [<sup>89</sup>Zr][Zr(oxalate)<sub>4</sub>]<sup>4-</sup> for 1 h at 37°C, 300 rpm. The oxalic acid of the <sup>89</sup>Zr solution (200  $\mu$ L, 430MBq) was neutralized with 90 $\mu$ L of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 M) before adding them to the mAb solution. [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-DFO and [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63-DFO were purified on a PD-10 column with a gentisic acid solution (5 mg/mL in 0.25 M sodium acetate, pH 5.4-5.6) as a mobile phase and concentrated by Vivaspin ® ultrafiltration tubes (Satorius) with a 10kDa cutoff for the ThioFab fragment and 50kDa cutoff for the mAb.

#### **Conjugates radiochemical purity assessment:**

Radiochemical purity of [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-DFO and [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63-DFO was assessed by size-exclusion high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a UV (UVD 170U UV/VIS) and scintillation gamma detector (Packard). Measurements was performed using a bioZen 1.8  $\mu$ m SEC-2 LC column (Phenomenex) and a DIONEX System (Thermo-Fisher). A linear-gradient elution was carried out with a solution of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM) and KCl (250 mM) (pH 6.8), at a flow rate of 0.2 mL/min (Supplemental Figure 1.3).

#### **Radiolabeled conjugates injection:**

78 days after glioblastoma cells implantation (according to the tumor development described by Herbet et al.,2018), a total of 12 mice were randomized into 2 groups (Supplemental Figure 1.1): n=6 mice that received an intravenous bolus of [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63

( $150\mu\text{C}\pm 5\mu\text{C}$ ) and  $n=6$  mice that received [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-ThioFab-xiRA63 ( $100\mu\text{C}\pm 5\mu\text{C}$ ). Specific activities injected are presented in the supplementary Figure 1.4.

#### **Longitudinal PET-CT acquisitions and reconstruction:**

**PET-CT image acquisitions.** A 60 minutes dynamic acquisition using an Inveon microPET scanner or an Inveon microPET/CT scanner (Siemens) was performed immediately after injection of the  $^{89}\text{Zr}$  radiolabeled conjugates. Then, a 20 minutes PET acquisitions was performed at 5h, 24h, 48h, 72h and 7days post-injection (Supplemental Figure 1.1, 1.9, 1.10). Mice imaging sessions were done under anesthesia with isoflurane (4.0% for induction, 2%-3% for maintenance) in 100%  $\text{O}_2$ .

**PET-CT image reconstruction.** After each PET imaging acquisition, a 6.6-min transmission scan or a 11-min CT scan was performed for the photon attenuation correction. PET images were reconstructed with a three-dimensional ordinary Poisson ordered-subset expectation-maximization (3D OSEM), a fast-statistical algorithm using the Inveon Acquisition Workspace software (2.1).

**PET-CT analysis.** Acquisition analysis was performed with the PMOD software (Version3.9). Spherical volume of interests (VOI) with a fixed size of  $8\text{mm}^3$  were created in several organs: heart, liver, kidneys, spleen and muscle. For the bone and the brain tumor, VOI were drawn with the “iso-contour” tool. We applied the same VOI tumor’s into the contralateral side and the brain opposite side (used as a negative control). The mean activity concentration ( $\text{kBq}/\text{cm}^3$ ) in each VOI was corrected according to the half-life of  $^{89}\text{Zr}$  ( $t_{1/2}=3.3$  days). Then, to quantify antibodies uptake, we divided it by the total injected activity to obtain the percentage of injected dose per volume of tissue ( $\%ID.\text{cm}^{-3}$ ) (Supplemental Figure Table 1.7).

**Pharmacokinetics analysis.** First, plasma activity concentration of the two immuno-radioligands was calculated from the blood pool activity concentration derived from PET imaging. Joscilin M et al., 2021 shows that the plasma constitutes 55% of total blood so we used a blood-to-plasma concentration ratio of 0.55. In this theory, antibodies didn’t go into the red blood cells and are restricted to the plasma. To determine the pharmacokinetics parameters ( $t_{1/2\alpha}$ ,  $t_{1/2\beta}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{10}$ ,  $k_{12}$ ) we plot the plasma time activity curves (TAC) of each mice group and we applied a two-compartment model with an intravenous bolus input and a first-order elimination (Figure 1.2 and Supplemental Figure 1.11, 1.12) using pkin software (version 4.2).

In order to determine the specific (irreversible) and the nonspecific (reversible) brain tumor uptake we applied a patlak graphical evaluation of transfer constants (Yvonne W.S. Jauw et al., 2019). Pkin software was used to calculate the irreversible ( $K_i$ ) and reversible ( $V_t$ ) constant. An  $r$  value more than 0.9 was considered acceptable when  $r$  value of less than 0.9 were excluded from the analysis. The reversible and irreversible contributions to the uptake of the  $^{89}\text{Zr}$  radiolabeled conjugates at each time point were calculated following the mathematical formula in the Figure 1.3 and plotted (Supplemental Figure 3.1).

### **Biodistribution *ex vivo*:**

After the last imaging acquisition, seven days p.i., mice were sacrificed by cervical dislocation under isoflurane (5 %). Key organs were collected: blood, liver, spleen, intestine, heart, kidney, muscle and bones. Specific activity in each organ was counted with a gamma counter (Cobra gamma counter, Packard). The mean activity concentration ( $\text{kBq}/\text{cm}^3$ ) in each organ was corrected according to the half-life of  $^{89}\text{Zr}$  ( $t_{1/2}=3.3$  days) and normalized with the weight of each organ. Then, to quantify the antibodies uptake, we divided it by the total injected activity to obtain the percentage of injected dose per volume of tissue ( $\%ID.\text{cm}^{-3}$ ) (Supplemental Figure Table 1.7). A Pearson correlation was applied between biodistribution *ex vivo* and *in vivo* derived from PET images 7 days post injection (Supplemental Figure Table 1.8).

### **Immunocytochemistry:**

**Brain frozen and section.** In the same time than *ex vivo* biodistribution, brains were removed, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Then coronal brain sections were cryo-sectioned into  $10\mu\text{m}$  thick slices using the cryostat (Leica CM3050 S, Leica biosystems). Sections will be used for immunofluorescence labeling and Hematoxylin eosin staining. In the meantime, sections were stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

**Immunofluorescence labeling.** First, sections were fixed with neutral buffer formalin 10% (Sigma-Aldrich # HT501128-4L) during 15 minutes at room temperature (RT). To stop the reaction, an ammonium chloride solution (50 mM in PBS) was used during 5minutes. After that, slides were incubated 5 minutes in PBS Triton 0.1% buffer to permeabilized the tissue. A mixture of 5% bovine serum albumin (BSA) (Thermo-Fisher) with Tween-80 0.5% was prepared and incubated with sections during 1 hour to block all the nonspecific sites. To label

ETAR, we used the xiRA63 antibody at a final concentration of 0.1mg/mL during 1 hour at room temperature (RT). This antibody was revealed with a F(ab')<sub>2</sub>-goat anti-Human IgG Fc (Invitrogen H10120) diluted 1/500 during 1 hour at RT. On the adjacent slide, a mouse anti-human-mitochondria Alexa Fluor® 488 (Sigma-Aldrich, clone 113, MAB1273A4) (dilution 1/100<sup>e</sup>) was used and incubated during 1 hour at RT. Sections were mounted using Prolong Diamond Antifade Mountain with DAPI to label cell's nucleus. Slides were washed three times with PBS buffer between each step. An Axio Observer Z1 microscope (Zeiss, Germany) was used with a 20x objective to scan the full sections (Supplemental Figure 2.5, 2.6) and a 40x objective for the regions of interest (Figure 2.2). Post processing qualitative analysis was performed with ZEN software (v2.6, Zeiss).

**Hematoxylin & Eosin (H&E).** Harris hematoxylin and Eosin Y alcoholic (Sigma-Aldrich) were used to confirm the presence of the tumor. As in the immunofluorescence protocol, neutral buffer formalin 10% was used to fixed the sections. Then, slices were incubated 2 minutes in Harris hematoxylin (Sigma-Aldrich) and wet in a 70% ethanol solution with 0.25% hydrochloric acid (HCl). After that, sections were colored with Scott substitute (2g NaHCO<sub>3</sub>, 20g MgSO<sub>4</sub>) during 1 minute. Slides were incubated 30 seconds in 50% ethanol solution, then in 70% ethanol solution and 1.5 minutes in Eosin Y alcoholic (Sigma-Aldrich). Sections were left 3 times during 3 minutes in 95% ethanol solution, then 100% ethanol solution and in toluene (VWR Chemicals). At the end, sections were mounted using Eukitt Quick-hardening mounting medium (Fluka Analytical). 3 water washes were performed between each step. Axio Observer Z1 microscope (Zeiss, Germany) was used with a 20x objective to scan the full sections (Figure 2.2 and Supplemental Figure 2.5, 2.6). Post processing qualitative analysis were carried out with ZEN software (v2.6, Zeiss).

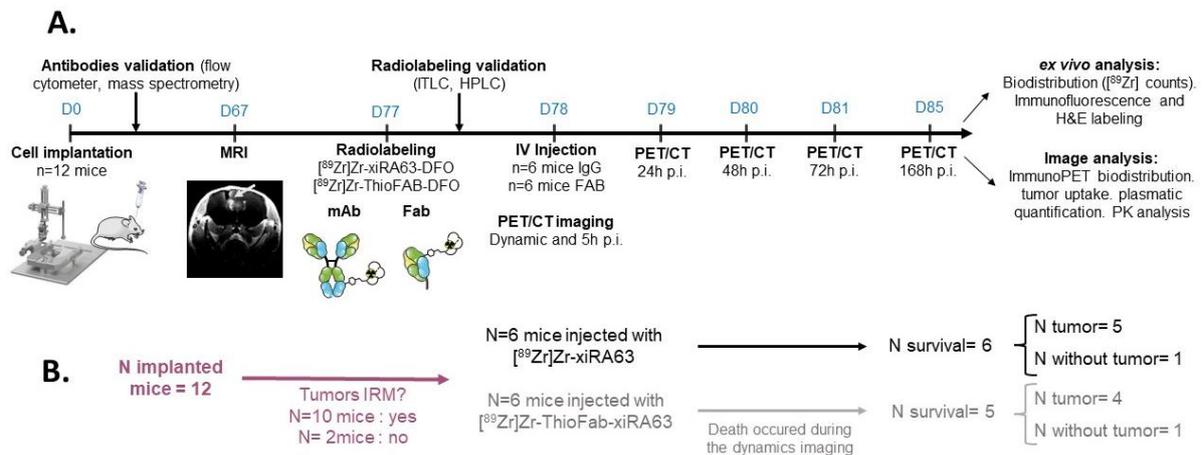
### **Statistics:**

GraphPad Prism software (v9.0.1) was used for statistical analyzes. Student t test (two-tailed) were carried out to compared two data group (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001, \*\*\*\* P < 0.0001).

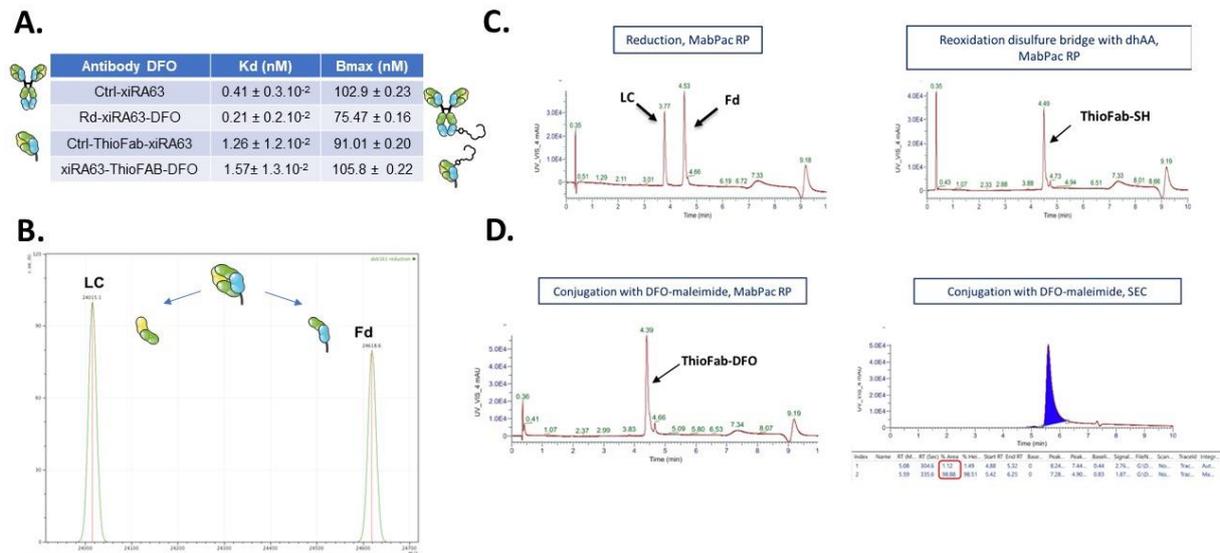
**SUPPLEMENTAL FIGURES AND TABLE**

**Supplemental figure 1.1: Implemented protocol for longitudinal PET evaluation of [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 and [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 in mice with human glioblastoma model.**

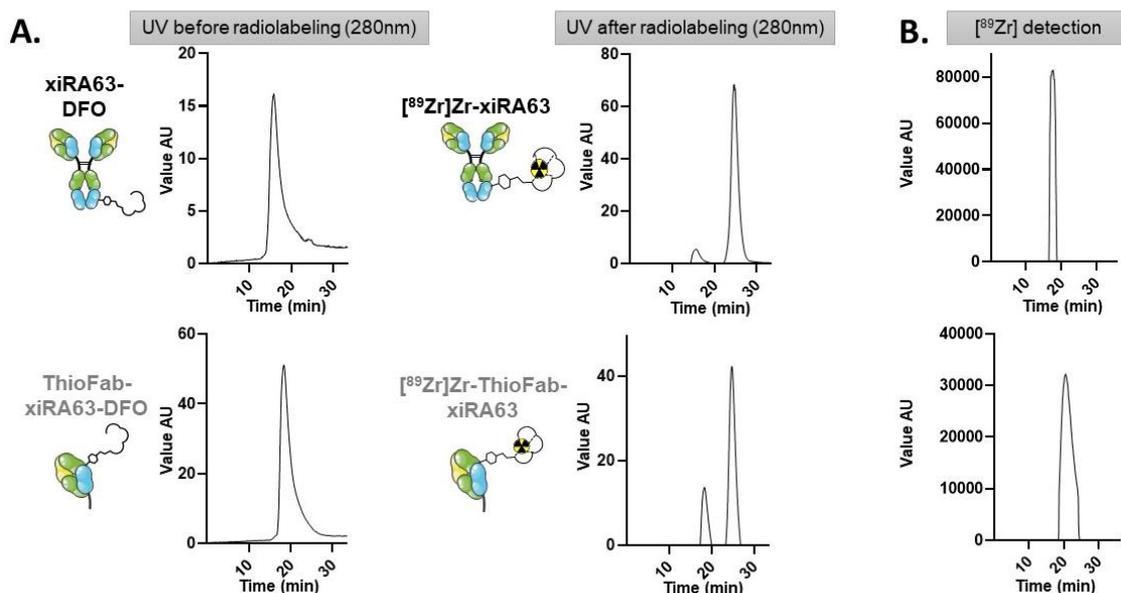
(A.) Experiments timeline. Human-GSC was implanted (Gli7, 5.10<sup>5</sup>) in the brain of nude mouse and DFO-conjugates were validated by flow cytometry and mass spectrometry. At day 67 post implantation MRI was used to validate the tumor presence. Ten days later, DFO-conjugates were radiolabeled with <sup>89</sup>Zr. The radiochemical purity of the radiolabeled conjugates was assessed by HPLC. The radiolabeled conjugates were intravenously injected. PET acquisition was performed immediately after injection, 5h, 24h, 48h, 72h and 7day p.i.. At the end of the last imaging *ex vivo* analysis was carried out. (B.) animal experiments and sacrifice. 12 mice were implanted and subdivided into 2 randomized groups: mice injected with [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 (n=6) and mice injected with [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 (n=6). One mouse from the [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 group was excluded during experiment and two mice didn't show any tumor by MRI. At the end, 5 mice with tumor were injected with [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 and 4 mice with tumor were injected with [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63. Concerning biodistribution analysis, all the mice were used including those without tumor.



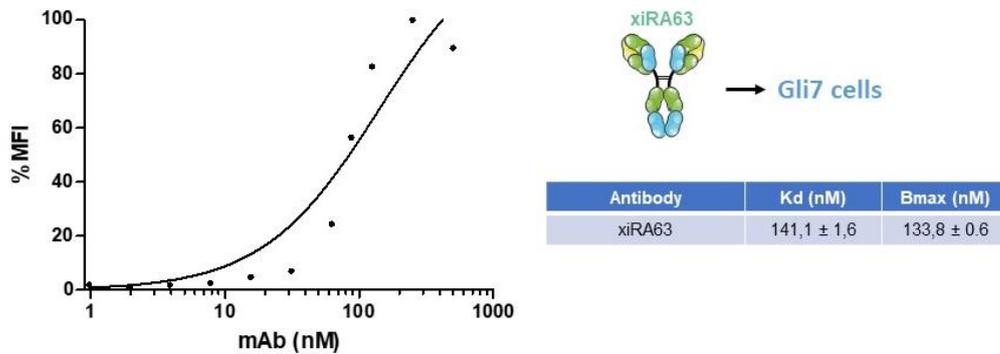
**Supplemental figure 1.2: *In vitro* characterization of the DFO conjugation to xiRA63 and its ThioFab-fragment.** (A.) Apparent affinity constant and Bmax (nM) measured by flow cytometry for the full-length antibody and ThioFab fragment with or without the DFO (10000 event counting) obtained on CHO-ET<sub>A</sub>. (B.) Deconvoluted mass spectrum of the reduced ThioFab-xiRA63 (LC and Fd) followed by (C.) UV chromatograms after the reduction and the reoxidation steps. (D.) represents the reverse phase (left) and size exclusion (right) chromatography of the final DFO-ThioFab-xiRA63 construct.



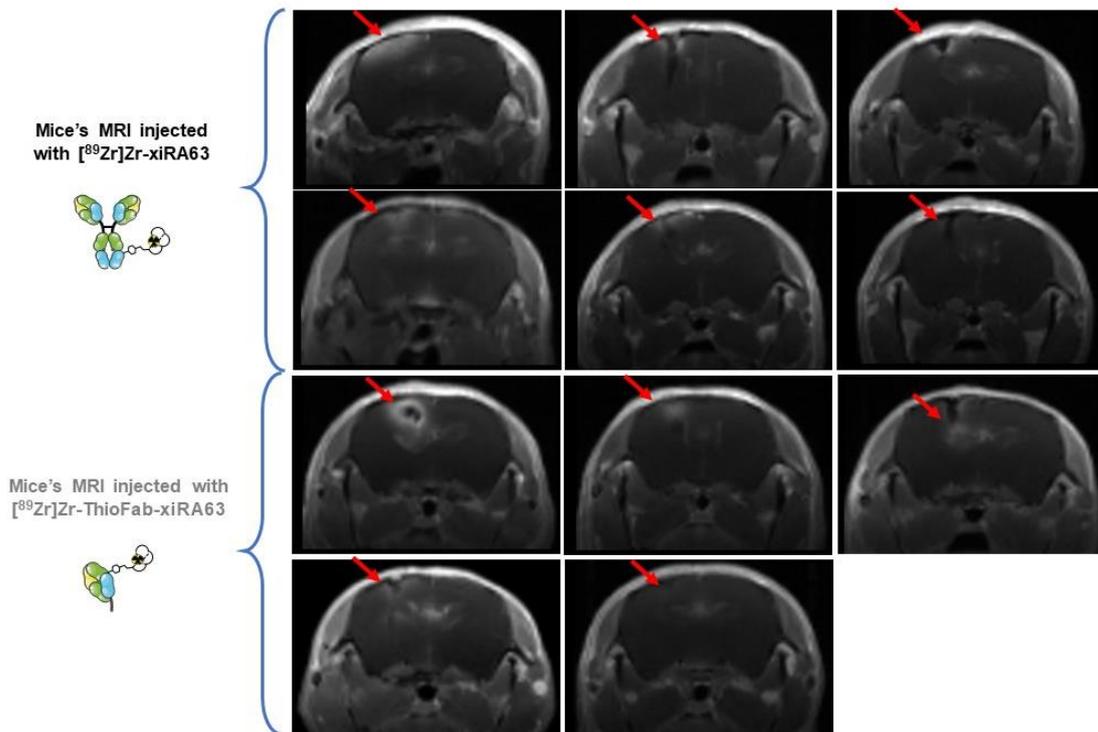
**Supplemental figure 1.3: <sup>89</sup>Zr radiolabeling assessment of [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-DFO and [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63-DFO.** (A.) HPLC-UV chromatograms of xiRA63-DFO and ThioFab-xiRA63-DFO detected at 280nm before and after <sup>89</sup>Zr radiolabeling with a retention time of 15 minutes for xiRA63-DFO and 18 minutes for ThioFab-xiRA63-DFO. The second pic after radiolabeling at 25 minutes corresponds to gentisic acid. (B.) HPLC-radio chromatograms of [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 and [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 have also been detected. AU:Arbitrary Unit.



**Supplemental figure 1.4: binding curve of Gli7 (ET<sub>A</sub><sup>+</sup>) obtained with the xiRA63.** Binding curve obtained by flow cytometry of the the native xiRA63 on gli7 cell line. Data are presented as mean ± SEM; MFI: Median Fluorescence Intensity.



**Supplemental figure 1.5: MRI imaging overtime of mice injected with [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 or [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63.** Transverse sections of MRI imaging, using a contrast agent called Dotarem, of mice bearing human glioblastoma brain tumor 11 days before PET-experiments



**Supplemental figure 1.6: Overview table for the longitudinal PET experiments on mice bearing human glioblastoma tumor injected with [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 and [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63.** Data are presented as mean ± SD.

Tumor model	Antibody label [ <sup>89</sup> Zr]	Specific activity (MBq/nmol)	Injected activity (MBq)	Injected quantity (nmol)	Number of mice
Gli7	[ <sup>89</sup> Zr]Zr-xiRA63	15.1	5.1 ± 0.13	0.34 ± 0.01	6
	[ <sup>89</sup> Zr]Zr-xiRA63-ThioFab	6.2	3.3 ± 0.10	0.54 ± 0.01	5

**Supplemental figure 1.7: Raw data table of the [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 and [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 biodistribution in different key organs.** (A.) Raw data extrapolated by PET imaging at day 7 post injection. (B.) Raw data obtained by *ex vivo* experiments. %ID.cm<sup>-3</sup>: percentage injected dose per volume of tissue; %ID.g<sup>-1</sup>: percentage injected dose per gram of tissue; data are presented as mean ± SD.

**A.** > Raw datas PET imaging

[ <sup>89</sup> Zr]Zr-ThioFab-xiRA63	0.75h	5h	24h	48h	72h	J7
Heart (%ID.cm <sup>-3</sup> )	6.68±0.35	0.51±0.09	0.50±0.10	0.27±0.08	0.26±0.09	0.23±0.11
Liver (%ID.cm <sup>-3</sup> )	5.86±0.58	1.20±0.19	1.11±0.14	0.84±0.14	0.57±0.15	0.86±0.24
Right Kidney (%ID.cm <sup>-3</sup> )	72.44±15.37	75.32±16.13	58.55±12.02	37.90±8.15	32.53±7.98	19.02±3.71
Left Kidney (%ID.cm <sup>-3</sup> )	73.91±14.83	68.37±14.19	54.18±12.18	35.49±7.73	33.60±6.59	17.89±3.59
Spleen (%ID.cm <sup>-3</sup> )	1.80±0.40	0.79±0.16	0.30±0.08	0.22±0.07	0.17±0.08	0.31±0.18
Bone (%ID.cm <sup>-3</sup> )	1.11±0.09	0.40±0.11	0.36±0.11	0.35±0.06	0.25±0.10	0.40±0.12
Muscle (%ID.cm <sup>-3</sup> )	0.56±0.12	0.26±0.07	0.19±0.06	0.10±0.04	0.11±0.07	0.11±0.09

[ <sup>89</sup> Zr]Zr-xiRA63	0.75h	5h	24h	48h	72h	J7
Heart (%ID.cm <sup>-3</sup> )	18.97±1.36	11.51±0.72	6.25±0.48	4.57±1.01	3.86±0.59	2.27±0.41
Liver (%ID.cm <sup>-3</sup> )	20.14±1.06	11.29±0.73	7.41±0.53	6.58±1.57	6.10±0.60	5.22±0.48
Right Kidney (%ID.cm <sup>-3</sup> )	7.68±0.88	5.01±0.66	3.11±0.40	2.53±1.02	2.23±0.42	1.52±0.37
Left Kidney (%ID.cm <sup>-3</sup> )	6.26±0.88	4.91±0.85	2.98±0.52	2.32±0.43	1.96±0.38	1.38±0.30
Spleen (%ID.cm <sup>-3</sup> )	6.36±1.11	5.79±0.96	4.54±0.87	4.41±0.82	4.00±0.85	3.64±0.83
Bone (%ID.cm <sup>-3</sup> )	1.01±0.30	2.58±0.60	1.80±0.69	1.99±0.72	1.67±0.78	1.58±0.73
Muscle (%ID.cm <sup>-3</sup> )	1.32±0.29	1.62±0.38	1.21±0.48	1.17±0.27	1.09±0.27	0.64±0.28

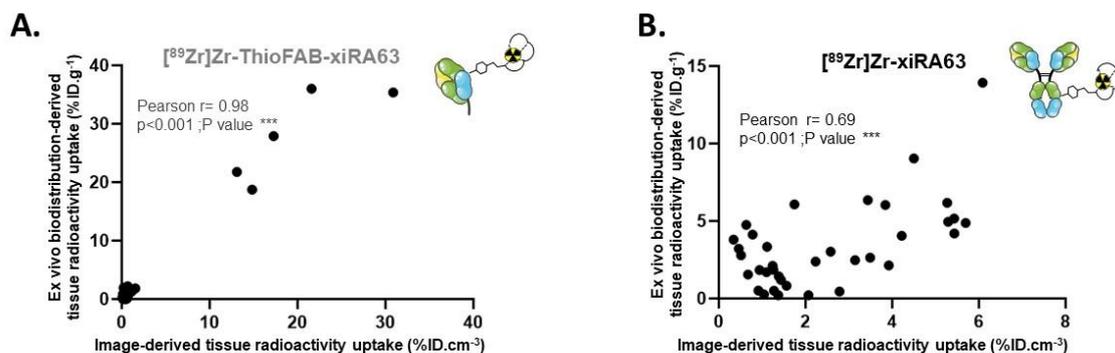
**B.** > Raw datas *ex vivo*

[ <sup>89</sup> Zr]Zr-ThioFab-xiRA63	Heart (%ID.g <sup>-1</sup> )	Liver (%ID.g <sup>-1</sup> )	Right Kidney (%ID.g <sup>-1</sup> )	Spleen (%ID.g <sup>-1</sup> )	Bone (%ID.g <sup>-1</sup> )	Muscle (%ID.g <sup>-1</sup> )
Day 7	0±0	0.37±0.19	10.21±5.02	0.37±0.23	0.15±0.09	0.03±0.01

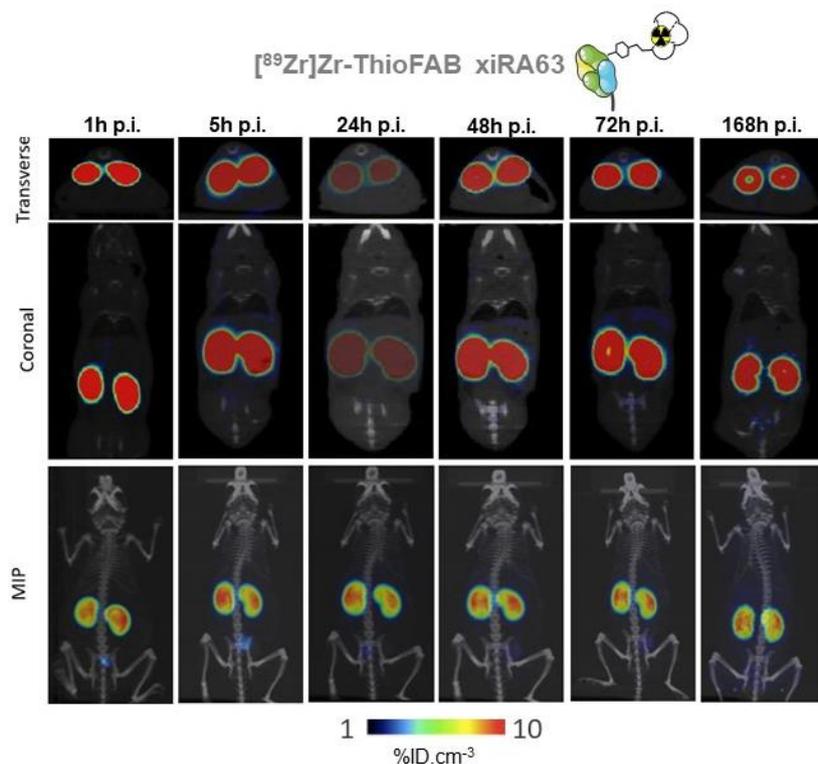
  

[ <sup>89</sup> Zr]Zr-xiRA63	Heart (%ID.g <sup>-1</sup> )	Liver (%ID.g <sup>-1</sup> )	Right Kidney (%ID.g <sup>-1</sup> )	Spleen (%ID.g <sup>-1</sup> )	Bone (%ID.g <sup>-1</sup> )	Muscle (%ID.g <sup>-1</sup> )
Day 7	1.06±1.05	2.45±1.77	0.94±0.72	2.98±1.70	1.71±1.02	0.18±0.14

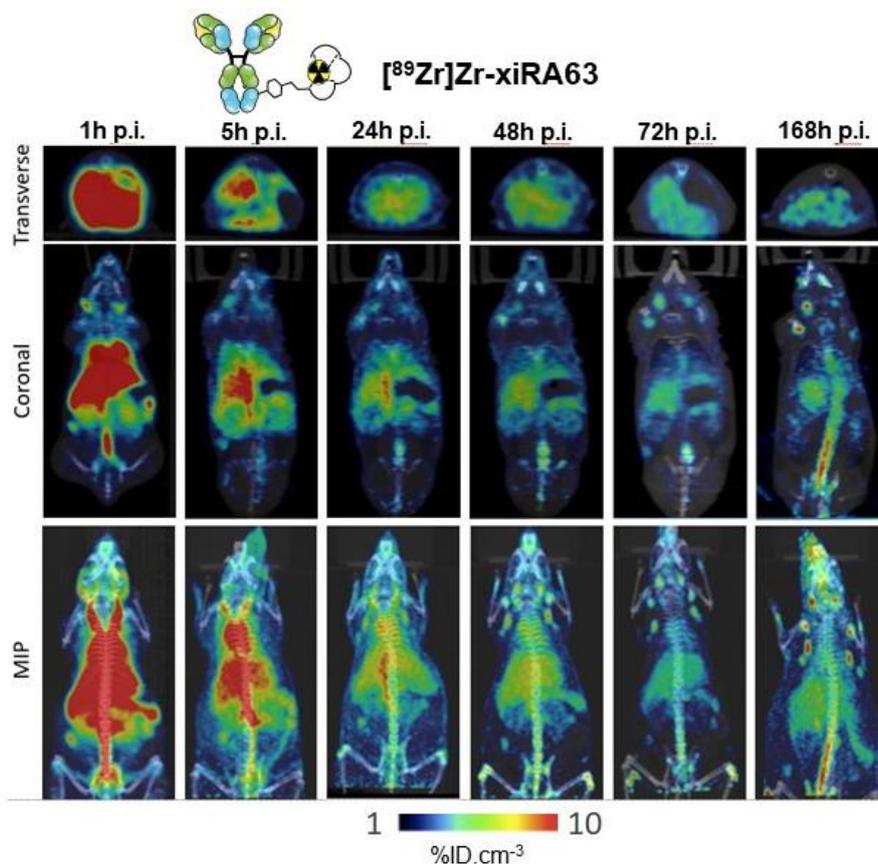
**Supplemental figure 1.8: Correlation between the biodistribution *ex vivo* and extrapolated by PET imaging 7-day p.i.:** We applied a Pearson correlation for each organ between the biodistribution *ex vivo* and the PET imaging biodistribution end point for the two conjugates ( $r$ -ThioFab= 0.98 ;  $p > 0.001$ ;  $n=5$ ; and  $r$ -xiRA63= 0.69;  $p < 0.001$ ;  $n=6$ ). %ID.cm<sup>-3</sup>: percentage injected dose per volume of tissue; %ID.g<sup>-1</sup> : percentage injected dose per gram of tissue; data are presented as mean  $\pm$  SD.



**Supplemental figure 1.9: Example of a whole-body PET imaging overtime with [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63.** Transverse, coronal and MIP sections of PET-CT imaging at different times post injection (1h, 5h, 24h, 48h, 72h and 168h p.i.) of [<sup>89</sup>Zr]Zr--ThioFab-xiRA63 in mice bearing human glioblastoma brain tumor. MIP: Maximum Intensity Projection; ID.cm<sup>-3</sup>: percentage injected dose per volume of tissue.



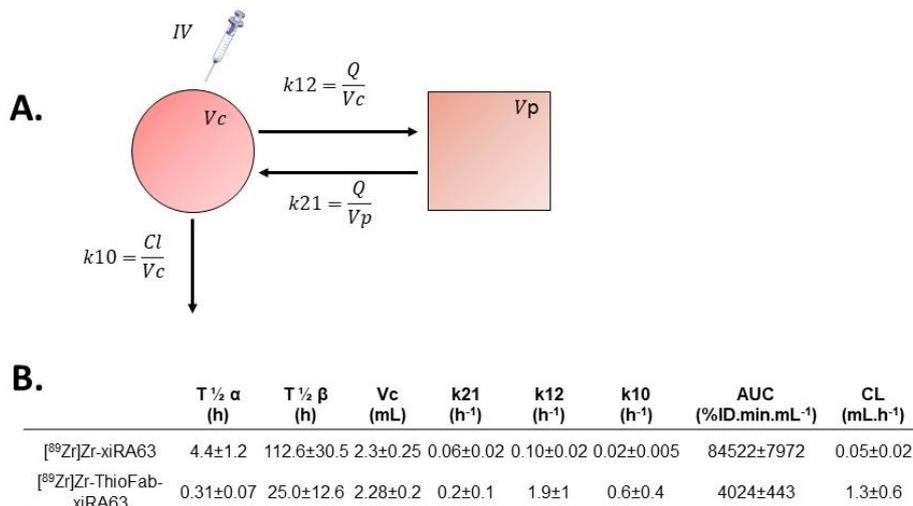
**Supplemental figure 1.10: Example of a whole-body PET imaging overtime with [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63.** Transverse, coronal and MIP sections of PET-CT imaging at different times post injection (1h, 5h, 24h, 48h, 72h and 168h p.i.) of [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 in mice bearing human glioblastoma brain tumor. MIP: Maximum Intensity Projection; ID.cm<sup>-3</sup>: percentage injected dose per volume of tissue.



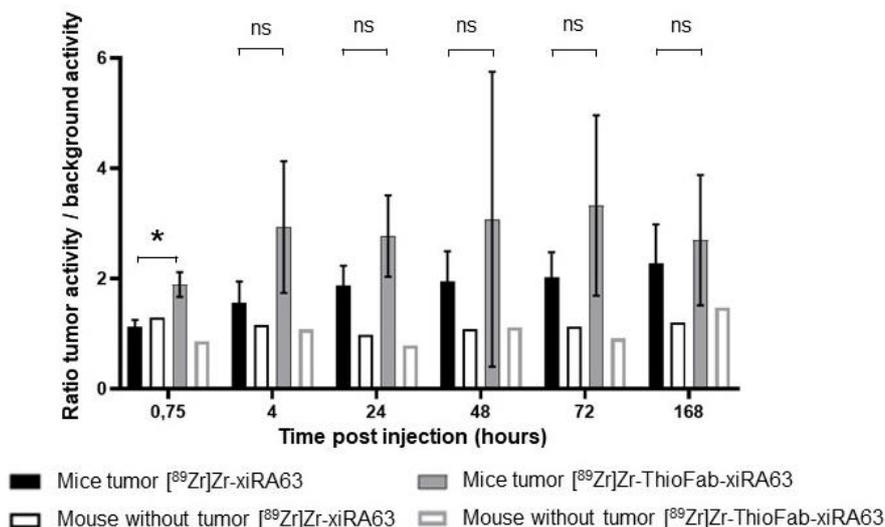
**Supplemental figure 1.11: Raw data table of the [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 and [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 plasma concentration Time Activity Curve (TAC).** For each experiment, activities were decay-corrected to the injection time and divided by the total injected activity to obtain the percentage of injected dose per volume of tissue (%ID.cm<sup>-3</sup>). N mice injected with [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63= 6; N mice injected [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63= 5. Data are presented as mean ± SD.

Temps (minutes)	[ <sup>89</sup> Zr]Zr-xiRA63 (kBq.cm <sup>-3</sup> ) n=6 mice	[ <sup>89</sup> Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 (kBq.cm <sup>-3</sup> ) n=5 mice
0.25	200.20 ± 255.75	66.14 ± 81.72
0.75	1701.98 ± 565.38	1274.23 ± 199.92
1.25	1955.68 ± 272.03	1406.68 ± 132.14
2	1804.94 ± 194.06	1367.64 ± 179.57
3	1718.21 ± 227.55	1286.83 ± 153.64
4	1799.16 ± 243.08	1334.62 ± 55.07
5	1877.48 ± 283.31	1285.55 ± 125.33
6	1797.36 ± 335.82	1164.83 ± 76.64
7.5	1803.74 ± 219.40	1211.95 ± 126.20
9.5	1890.95 ± 187.01	1115.34 ± 63.18
11.5	1889.58 ± 161.70	1044.74 ± 79.82
13.5	1935.18 ± 195.47	996.25 ± 51.64
15.5	1869.24 ± 119.72	916.34 ± 77.17
18	1877.98 ± 200.76	843.03 ± 65.41
21	1809.29 ± 184.48	747.59 ± 31.37
24	1855.59 ± 162.85	558.79 ± 198.09
27.5	1839.15 ± 196.11	626.22 ± 23.96
31.5	1833.71 ± 138.00	542.79 ± 49.85
35.5	1802.91 ± 168.23	479.35 ± 70.72
40	1845.59 ± 157.85	407.67 ± 70.63
45	1835.96 ± 145.30	354.58 ± 112.03
50	1768.23 ± 166.20	323.93 ± 81.70
55	1773.07 ± 137.74	290.45 ± 90.21
57.5	1785.73 ± 147.58	295.74 ± 56.97
300	1068.18 ± 88.71	34.24 ± 9.84
1440	580.55 ± 101.36	24.67 ± 11.48
2880	424.42 ± 112.01	12.00 ± 8.97
4320	358.73 ± 93.74	0
10080	210.81 ± 88.42	0

**Supplemental figure 1.12: Pharmacokinetics blood parameters of [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 and [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63.** (A.) Schematic representation of a two-compartment model. (B.) Estimated pharmacokinetics parameters of the [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 and [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63. IV: Intravenous injection; V<sub>c</sub>: Volume of central compartment; V<sub>p</sub>: Volume of peripheric compartment; Q: Clearance from peripheric compartment to the central compartment; Cl: Central compartment clearance; k<sub>12</sub>: Distribution speed constant from central to peripheral compartment; k<sub>21</sub>: Distribution speed constant from peripheral to central compartment; k<sub>10</sub>: Elimination speed constant from central compartment; T<sub>1/2α</sub>: Biological distribution half-life; T<sub>1/2β</sub>: Biological elimination half-life; AUC plasma: Area Under Curve of the plasmatic exposure.



**Supplemental figure 2.1: tumor/background ratio comparison between [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 and [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63.** (A) Ratio between the tumor activity and the background (opposite side) activity. Mice without tumor on MRI were used as a negative control. N mice-tumor-GLI7 injected with [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 = 4; N mice-tumor-GLI7 injected with [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 = 5; N mice-without-tumor-MRI injected with [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 = 1; N mice-without-tumor-MRI injected with [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 = 1. Comparison was done with a two-tailed paired student's t test. \*\* = P < 0.01; \* = P < 0.05; ns= no significant; Data are presented as mean ± SD.



**Supplemental figure 2.2: Raw data table of the  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-xiRA63}$  and  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-ThioFab-xiRA63}$  tumor activity.**

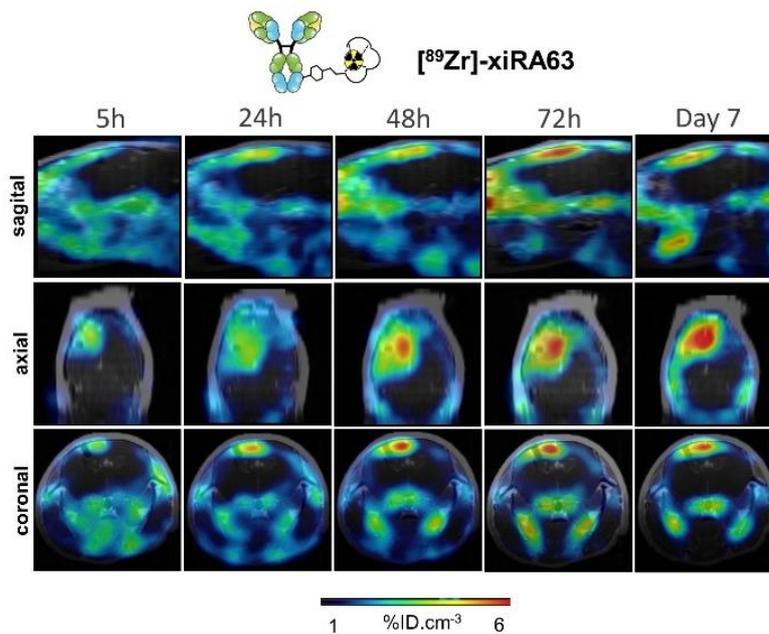
For each experiment, activities were decay-corrected to the injection time and divided by the total injected activity to obtain the percentage of injected dose per volume of tissue (%ID.cm<sup>-3</sup>). N mice-tumor injected with  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-xiRA63}$ =5; N mice-tumor injected with  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-ThioFab-xiRA63}$ =4.

**Tumor activity uptake datas**

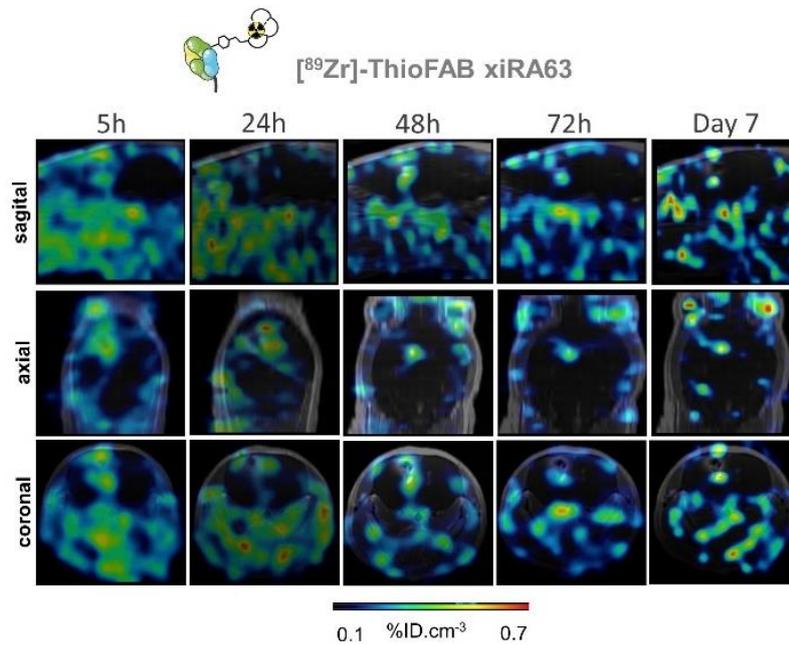
Temps (minutes)	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-xiRA63}$ (%ID.cm <sup>-3</sup> ) n=5 mice					$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-xiRA63-ThioFab}$ (%ID.cm <sup>-3</sup> ) n=4 mice			
	Souris 1	Souris 2	Souris 3	Souris 4	Souris 6	Souris 5	Souris 7	Souris 10	Souris 11
0.75 h	1.28	0.90	1.61	1.37	1.55	0.90	0.77	0.55	
5h	2.03	1.16	1.89	1.74	1.81	0.33	0.36	0.21	0.14
24h	2.49	1.77	2.29	2.45	3.04	0.24	0.25	0.18	0.13
48h	2.80	1.41	3.09	2.53	3.53	0.22	0.46	0.14	0.14
72h	3.11	1.64	3.38	3.29	3.81	0.24	0.36	0.21	0.22
168h	4.09	2.10	4.85	2.95	4.00	0.16	0.39	0.18	0.17

**Supplemental figure 2.3: Example of a brain tumor mouse PET imaging overtime with  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-xiRA63}$ .**

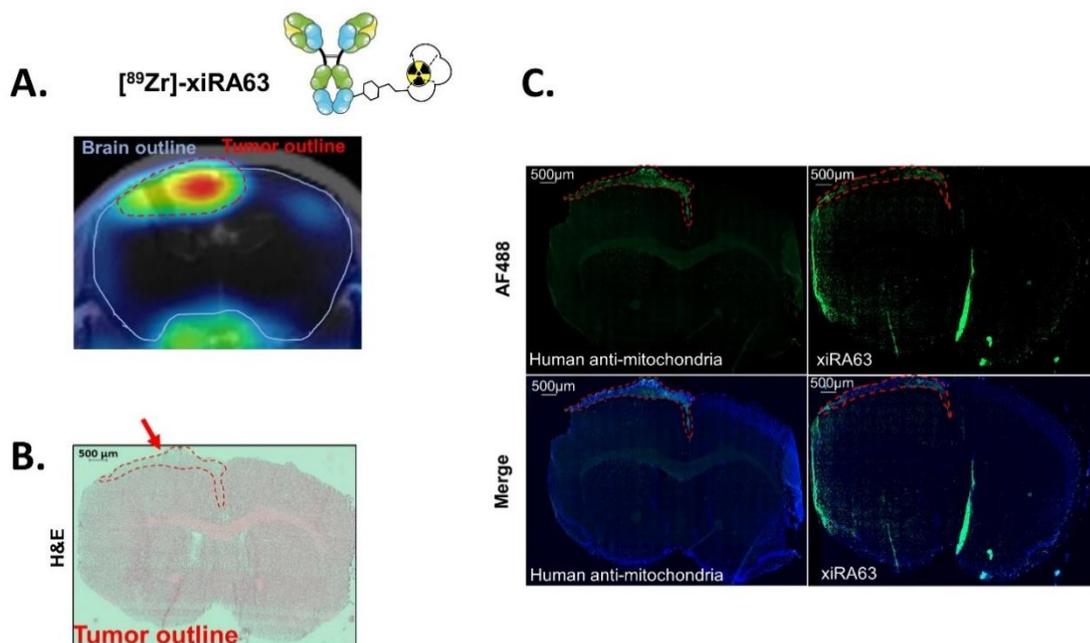
Transverse, axial and coronal sections of PET imaging with the initial MRI at different times post injection (1h, 5h, 24h, 48h, 72h and 168h p.i.) of  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-xiRA63}$  in mice bearing human glioblastoma brain tumor. ID.cm<sup>-3</sup>: percentage injected dose per volume of tissue.



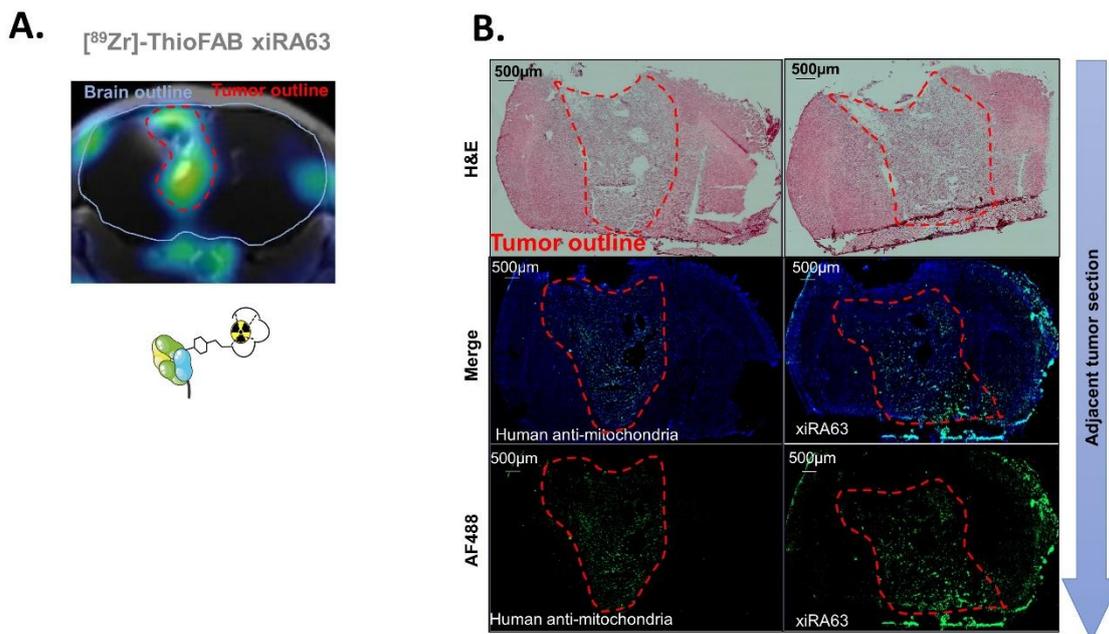
**Supplemental figure 2.4: Example of a brain tumor mouse PET imaging overtime with [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63.** Transverse, axial and coronal sections of PET imaging with the initial MRI at different time post injection (1h, 5h, 24h, 48h, 72h and 168h p.i.) of [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63 in mice bearing human glioblastoma brain tumor. ID.cm<sup>-3</sup>: percentage injected dose per volume of tissue



**Supplemental figure 2.5: Histological *ex vivo* analysis obtained on tumor brain adjacent slices and PET imaging 7-day p.i. of [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63.** (A.) PET analysis, with the brain (in blue) and the tumor (in red) contouring (B.) H&E staining; (C.) immunofluorescence was performed on 10µm adjacent section. Endothelin A receptor has been revealed with xiRA63 immunolabeled by an anti-human AF488. Human cells were recognized by a directly coupled anti-human-mitochondria AF488 (Alexa 488; clone 113-1, MAB1273A4). The tumor is contouring in red thanks to the different labeling. H&E and immuno-fluorescence scale bar: 500µm. microscope objective immunofluorescence: x20.



**Supplemental figure 2.6: Histological *ex vivo* analysis obtained on tumor brain adjacent slices and PET imaging 7-day p.i. of [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63.** (A.) PET analysis, with the brain (in blue) and the tumor (in red) contouring (B.) H&E staining and immunofluorescence were performed on 10µm adjacent section. Endothelin A receptor has been revealed with xiRA63 immunolabeled by an anti-human AF488. Human cells were recognized by a directly coupled anti-human-mitochondria AF488 (Alexa 488; clone 113-1, MAB1273A4). The tumor is contouring in red thanks to the different labeling. H&E and immuno-fluorescence scale bar: 500µm. microscope objective immunofluorescence: x20

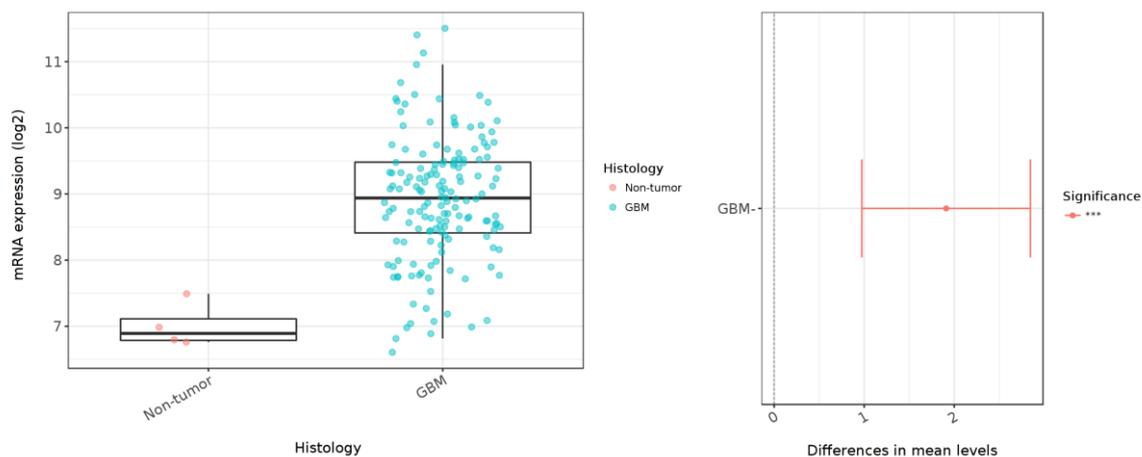


**Supplemental figure 3.1: Raw data table of the predicted transfer constants.** At least 3 time points were used for the patlak linearization ( $r > 0.95$ ) which allow us to calculate the constant transfer.  $V_T$  = Distribution volume in the reversible compartment ( $\text{mL} \cdot \text{cm}^{-3}$ ),  $K_i$  = net influx rate of conjugates radiolabeling from plasma to tissue ( $\text{mL} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Data are presented as mean  $\pm$  SD, (n/point for  $V_T$  and  $K_i$  [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63=5; n/point for  $V_T$  and  $K_i$  [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63=4).

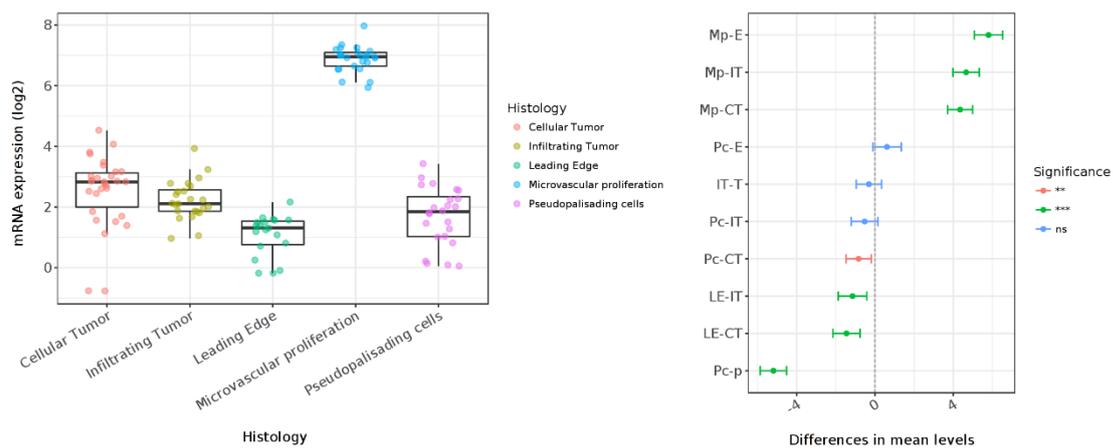
	Flux ( $K_i$ )	Intercept ( $V_t$ )
[ <sup>89</sup> Zr]-xiRA63 tumor	$3.61302 \cdot 10^{-5} \pm 1.6731 \cdot 10^{-5}$	$0.0938 \pm 0.0475$
[ <sup>89</sup> Zr]-xiRA63 opposite side	$1.46189 \cdot 10^{-5} \pm 0.057132 \cdot 10^{-6}$	$0.0571 \pm 0.026$
[ <sup>89</sup> Zr]-ThioFab-xiRA63 tumor	$4.90343 \cdot 10^{-5} \pm 4.10481 \cdot 10^{-5}$	$0.0473 \pm 0.0376$

**SUPPLEMENTAL RESULTS FROM GLIOBLASTOMA DATABASES**

**GlioVis EDNRA expression TCGA GBM dataset RNA seq Platform Histology Plot type:** Data are presented as mean  $\pm$  CI95%. (\*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.01$ ;  $p < 0.5$ ; ns, not significant).

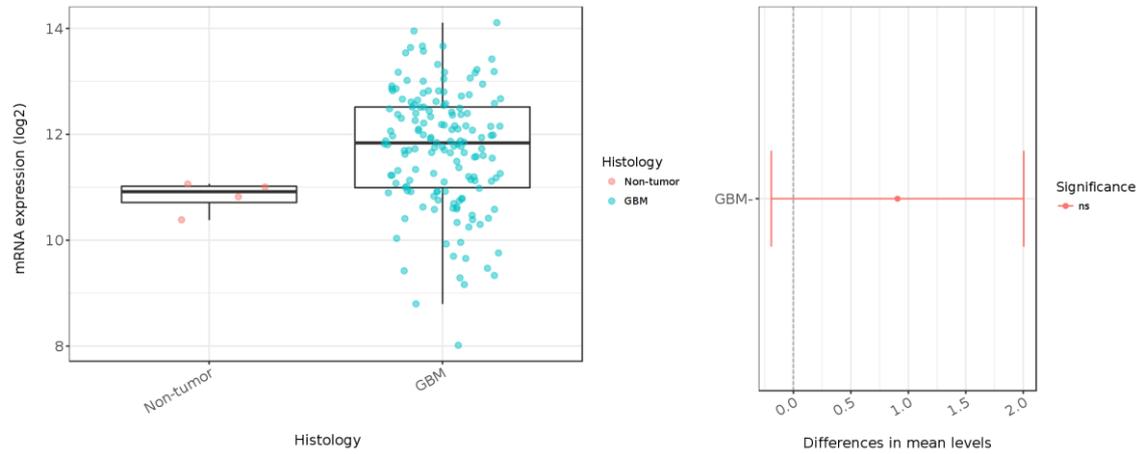


**GlioVis EDNRA expression Ivy GAP dataset RNA seq Platform Histology Plot type:** Data are presented as mean  $\pm$  CI95%. (\*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.01$ ;  $p < 0.5$ ; ns, not significant).

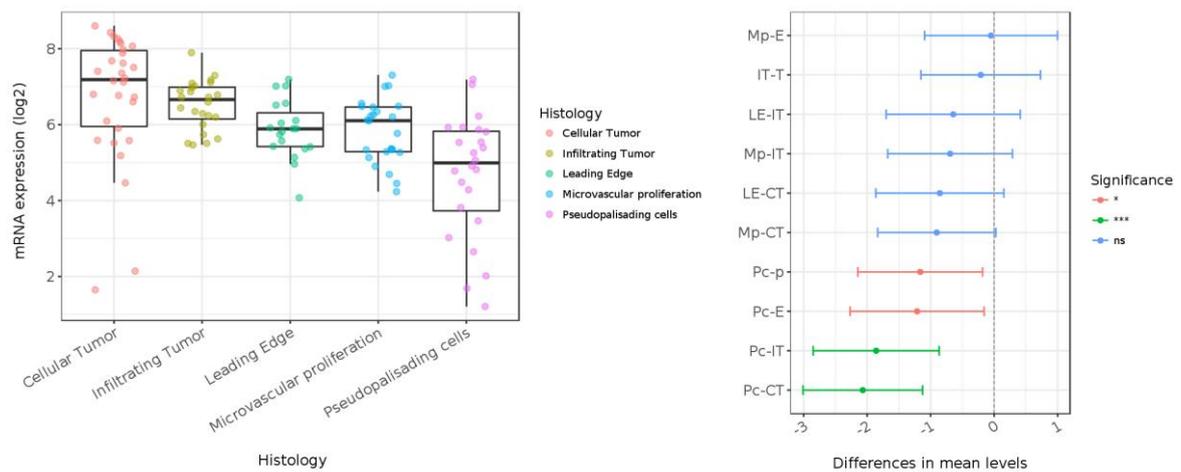


## Résultats des travaux de thèse

**GlioVis EDNRB expression TCGA GBM dataset RNA seq Platform Histology Plot type:** Data are presented as mean  $\pm$  CI95%. (\*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.01$ ;  $p < 0.5$ ; ns, not significant).



**GlioVis EDNRB expression Ivy GAP dataset RNA seq Platform Histology Plot type:** Data are presented as mean  $\pm$  CI95%. (\*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.01$ ;  $p < 0.5$ ; ns, not significant).



### 3) Étude complémentaire

L'axe endothéline est connu pour son rôle majeur dans la propagation tumorale du glioblastome. L'ensemble des données de transcriptomique (Gliovis & Ivy Glioblastoma Atlas) et de la littérature <sup>117,210,211,300</sup> ont mis en évidence une expression privilégiée d'ET<sub>A</sub> au niveau de l'endothélium vasculaire, à proximité du glioblastome et une expression majoritaire d'ET<sub>B</sub> à la surface des cellules de GBM. Cependant, les lignées de GBM étant extrêmement hétérogènes, il est possible que cette expression puisse varier en fonction des tumeurs. Dans ce contexte, une expérience *in vitro* de cytométrie en flux sur les CSG Gli7, complémentaire à l'article, a été réalisée pour choisir le meilleur candidat entre l'anticorps xiRB49 et xiRA63 et pour visualiser les futures tumeurs Gli7 qui seront implantées dans un modèle préclinique murin de manière orthotopique (**Figure 42**). Après analyse des résultats, le xiRA63 présente un profil de liaison supérieur sur les CSG Gli7 à celui du xiRB49. En effet, le B<sub>max</sub>, correspondant au nombre maximum de sites de liaison accessibles, obtenu avec le xiRA63 est de  $134 \pm 0,64$  nM alors que celui du xiRB49 est de  $25,05 \pm 0,2$  nM. Ce résultat conforte la pertinence de l'emploi du xiRA63 dans le modèle de GBM humain d'intérêt (Gli7) comparativement au xiRB49. Ainsi, l'étude de la reconnaissance du récepteur humain ET<sub>A</sub> par l'anticorps xiRA63 a, par la suite, été réalisée au sein du modèle de glioblastome Gli7.

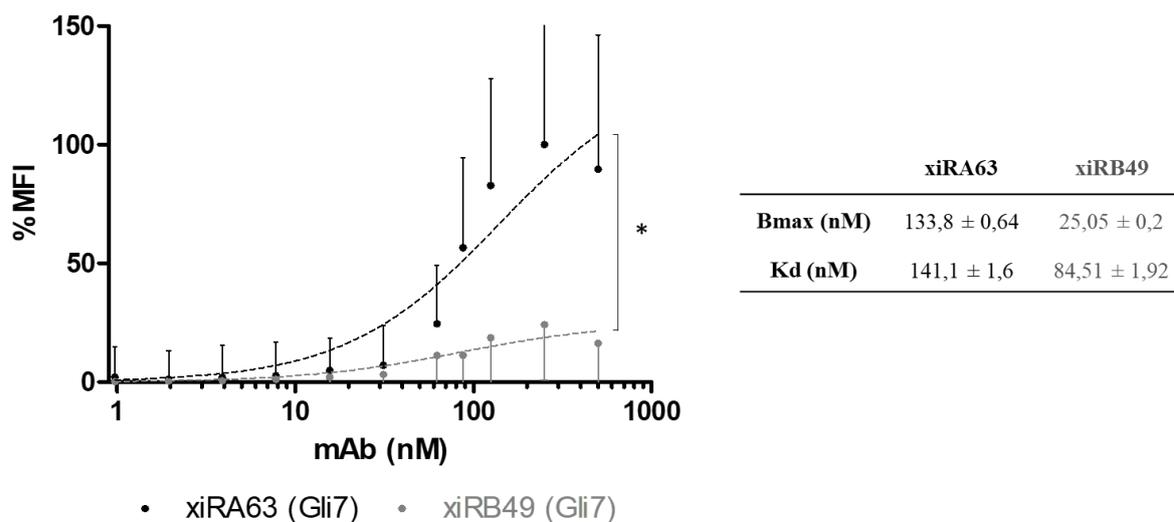


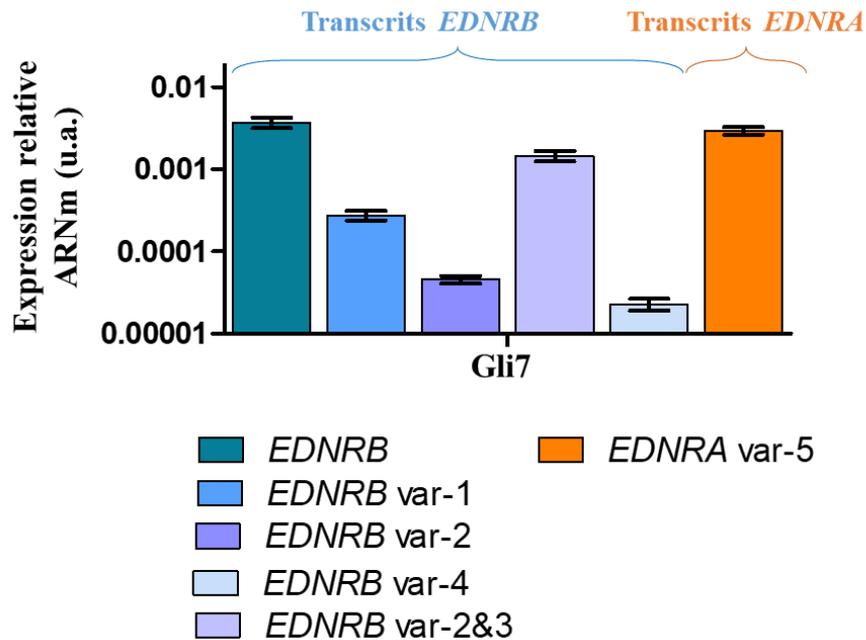
Figure 42 : Courbe de liaison comparant les anticorps xiRA63 et xiRB49 obtenue sur des cellules CSG Gli7 par cytométrie en flux et détermination de leur K<sub>d</sub> apparent et de leur B<sub>max</sub>.

#### 4) *Discussion et perspectives*

Les CSG sont la principale cause de résistance des cellules tumorales vis-à-vis des chimiothérapies<sup>298</sup>. Afin d'optimiser les chances de survie des patients, il apparaît essentiel de pouvoir cibler ce type cellulaire pour (i) les diagnostiquer efficacement, (ii) adapter le traitement en fonction des biomarqueurs exprimés et (iii) les éradiquer. Dans ce contexte, la recherche de nouveaux biomarqueurs est capitale pour cibler au mieux ces CSG.

Les Récepteurs des endothélines ont été rapidement identifiés comme biomarqueurs d'intérêts des cellules de glioblastome. Néanmoins, leur localisation au sein de la tumeur fait débat. Dans la littérature, il est majoritairement décrit que les cellules tumorales de glioblastome surexprimaient ET<sub>B</sub> alors qu' ET<sub>A</sub> était surexprimé par l'endothélium vasculaire proche de la tumeur. Ce résultat est cohérent avec l'aspect physiologique de la biodistribution des Récepteurs des endothélines où le type B est majoritairement retrouvé dans le cerveau, en comparaison avec le type A. Cependant, l'anticorps xiRA63 reconnaît d'avantage les cellules Gli7 par rapport à l'anticorps xiRB49. Ainsi, cette expérience pourrait nous amener à penser que ET<sub>A</sub> est plus exprimé que ET<sub>B</sub> au niveau de cette lignée cellulaire. Cependant, comme énoncé dans l'article xiRB49-MMAE du chapitre II, il existe une subtilité concernant la reconnaissance du xiRB49 pour le récepteur ET<sub>B</sub>. En effet ce dernier reconnaît préférentiellement des conformations « actives » d'ET<sub>B</sub> présentes en majorité au niveau des cellules tumorales mais ne reconnaît pas tous les récepteurs ET<sub>B</sub> exprimés à la surface des cellules. Aussi, il est donc possible qu'ET<sub>B</sub> soit exprimé à la surface des CSG mais que l'anticorps xiRB49 ne les reconnaissent pas. Pour valider cette hypothèse, les ARNm de la lignée cellulaire Gli7 ont été testés par RT-qPCR avec des amorces criblant au mieux les différents transcrits existants selon NCBI, la banque de données américaine de référence des séquences d'ARN (**Figure 43**). Sur cette figure, seuls les variants considérés comme transcrits ont été représentés. Ces résultats préliminaires indiquent bien la présence de transcrits codant pour ET<sub>B</sub> et ET<sub>A</sub>. Toutefois, il semblerait que le variant majoritaire retrouvé sur cette lignée cellulaire, tous Récepteurs des endothélines confondus, soit le variant 5 de l'*EDNRA* codant pour l'isoforme D d'ET<sub>A</sub>. Par définition, une isoforme correspond à des formes différentes de protéines issues d'un même gène. Pour rappel, l'isoforme d'ET<sub>A</sub> majoritairement retrouvée dans les différents tissus et décrite dans l'introduction est l'isoforme A. Il est à noter que l'isoforme D est composée d'une région N-terminale et d'une boucle extracellulaire ECL1 identique à l'isoforme A d'ET<sub>A</sub> mais avec une partie tronquée au niveau de sa région C-terminale (*cf* Figure 6 - Introduction). La surexpression d'isoformes tronquées du récepteur ET<sub>A</sub>

a déjà été décrite dans un contexte de tumoral telles que des cellules de neuroblastome, de mélanome et du sarcome d'Ewing<sup>52,301</sup>. Les résultats préliminaires obtenus par RT-qPCR sont donc en adéquation avec la littérature. Néanmoins, ces résultats restent à confirmer et de nouvelles amorces englobant ou discriminant les variants supplémentaires décrits dans la banque de données de RNA-seq européenne « Ensembl » devront être utilisées.



**Figure 43 : Expression relative des ARNm des transcrits issus des gènes *EDNRA* et *EDNRB* obtenus par RT-qPCR sur la lignée de CSG humaines *Gli7* implantées dans le modèle préclinique.**

Outre la discussion autour des transcrits du gène *EDNRA*, il est important de noter que l'étude commentée dans ce chapitre porte sur des cellules sélectionnées avec un marqueur de pluripotence CD133<sup>+</sup>. Dès lors, la comparaison entre les biomarqueurs exprimés à la surface de ces cellules et ceux à la surface de cellules tumorales proliférantes semble peu judicieuse *in vitro*. En effet, de par leur caractère pluripotent, ces cellules ne prolifèrent pas de la même façon que des cellules tumorales classiques. Ainsi, il est possible que ces cellules n'expriment pas les mêmes biomarqueurs. L'affirmation selon laquelle ces cellules conservent leur caractère de « cellules souches pluripotentes », même après implantation *in vivo*, est soutenue par la longue durée de pousse des cellules *Gli7* implantées dans le striatum de souris *nude*. En effet, à 3 mois post-implantation, aucune souris ne présentait de signes cliniques apparents. Cette longue durée de pousse souligne que ces cellules ne prolifèrent pas de la même façon que des cellules

tumorales classiques, suggérant une continuité de la pluripotence *in vivo*. Néanmoins, il est tout de même probable qu'une partie de la population cellulaire se différencie pour donner des sous-populations particulières tout en conservant un lot de cellules pluripotentes. C'est d'ailleurs ce qui est observé puisque ces cellules prolifèrent de façon complètement invasive dans différentes régions cérébrales (Pr Hugnot communication personnelle)<sup>302</sup>.

Passée la limite des 3 mois post implantation, les souris commencent à perdre drastiquement du poids, présentent des signes d'une forte déshydratation ainsi que de désorientation sévère. Ce modèle préclinique semble transposable à ce qui est observé en clinique. En effet, les patients présentant des symptômes cliniques tels qu'un mal de tête et qui sont soumis à des examens pour suspicion de tumeur cérébrale se voient souvent diagnostiquer une tumeur à un stade avancé et pour laquelle le pronostic vital est engagé.

Le taux d'expression d'ET<sub>A</sub> et d'ET<sub>B</sub> dans les glioblastomes représente une problématique majeure, étudiée par le Pr. Jean-Philippe Hugnot, localisé à l'Institut de génomique fonctionnel de Montpellier il collabore étroitement avec le Pr Hugues Duffau, un expert dans le domaine de la neurochirurgie. Cette collaboration permet au Pr. Hugnot d'accéder à des lignées tumorales cérébrales de patients atteints de grades divers. Ainsi, il sélectionne des lignées cellulaires très variées, puis étudie l'expression des Récepteurs des endothélines de type A et B par immunohistologie, western blot et RNA seq. Ces premières observations ont montré une tendance d'expression du récepteur ET<sub>A</sub> chez les tumeurs de bas grades, alors que ET<sub>B</sub> semble être majoritairement exprimé sur les gliomes de hauts grades (résultats non présentés dans ce manuscrit). Le grade tumoral des gliomes est intimement lié avec le phénotype cellulaire tumorale. Dès lors, l'expression des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> en fonction du phénotype cellulaire a été investiguée. Durant cette étude, des informations précieuses issues de la banque de données Gliovis, contenant des données de transcriptomique provenant du projet TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) ont été utilisées. Elles ont permis de mettre en évidence une surexpression significative d'ET<sub>A</sub> sur les cellules microvasculaires proliférantes possédant un phénotype d'avantage mésenchymateux, tandis que les cellules tumorales proneurales sembleraient plutôt exprimer ET<sub>B</sub> (*cf Figure - Supplementary Data - de l'article du chapitre III*). Dans le modèle préclinique utilisé, il est tout à fait envisageable d'imaginer une division asymétrique des Gli7 permettant le maintien de la population cellulaire de CSG et la différenciation en cellules microvasculaires proliférantes et invasives permettant l'apport de nutriments à la masse tumorale. Toutes ces observations sont à confirmer mais fournissent des

pistes essentielles à l'étude du GBM de son microenvironnement et de ses biomarqueurs cellulaires

La BHE constitue un frein majeur au diagnostic et à l'éradication des CSG en limitant drastiquement l'accès des bio-médicaments au cerveau. En plus de cette barrière physiologique, des études ont mis en évidence une clairance rapide des anticorps du compartiment cérébral vers le compartiment sanguin médiée par le récepteur néonatal Fc (FcRn) qui interagit avec les régions Fc des anticorps. Dans ce contexte, l'anticorps xiRA63 ainsi que son fragment ThioFab-xiRA63 ont été radiomarqués au  $[Zr^{89}]$  puis injectés dans le modèle préclinique de glioblastome humain, Gli7, pour déterminer leur biodistribution tissulaire, leurs paramètres pharmacocinétiques ainsi que leur accumulation cérébrale dans le temps. L'hypothèse selon laquelle le  $[^{89}Zr]Zr$ -ThioFab-xiRA63, de faible poids moléculaire (50 kDa) ne contenant pas de région Fc, présenterait une meilleure accumulation tumorale en traversant plus facilement la BHE sans subir d'efflux médié par les FcRn comparativement au  $[^{89}Zr]$ -xiRA63 a été émise. Comme décrit dans l'article, les résultats obtenus ont finalement montré l'effet inverse. En effet, l'anticorps  $[^{89}Zr]Zr$ -xiRA63 présente une meilleure accumulation tumorale par rapport au  $[^{89}Zr]Zr$ -ThioFab-xiRA63. En effet, le fragment d'anticorps étant éliminé très rapidement du plasma par filtration glomérulaire et excrétion rénale ( $t_{1/2}$  élimination = 25 h  $\pm$  12,6 h), il ne s'accumule que de façon suboptimale au niveau tumoral, avec un temps d'absorption tumorale spécifique maximale de 0,26 %DI.cm<sup>-3</sup>  $\pm$  0,1 %DI.cm<sup>-3</sup> 5 h post-injection calculé avec le modèle Patlak. Malgré une faible accumulation spécifique tumorale, ce fragment semble tout de même présenter un intérêt en imagerie immunoPET puisque sa rapide élimination permet l'obtention d'un ratio activité tumorale sur bruit de fond attractif (figure 2.1 des résultats supplémentaires de l'article). Aussi, ces résultats suggèrent que ce radioligand pourrait servir à la stratification des patients. De plus, du fait de sa courte demi-vie, il serait envisageable de le conjuguer avec un radioélément tel que le Fluor-18 ( $t_{1/2}$  = 110 minutes) couramment utilisé en clinique pour la détection de tumeur.

Bien que l'accumulation tumorale du fragment  $[^{89}Zr]Zr$ -ThioFab-xiRA63 ait finalement été de faible intensité, le  $[^{89}Zr]Zr$ -xiRA63 a, quant à lui, démontré une accumulation tumorale significative. Selon le modèle Patlak, une activité spécifique obtenue dès 72 h a été observée pour ce fragment avec une accumulation tumorale d'environ 3 %DI.cm<sup>-3</sup>  $\pm$  0,8 %DI.cm<sup>-3</sup> à 72 h p.i.. Il est à noter qu'en IRM, l'emploi de certains agents de contraste tels que le gadolinium chélaté, permet de rendre compte de l'état de la BHE, celle-ci étant plus perméable à l'agent de contraste une fois altérée. Il a ainsi été prouvé que plus la BHE était perméable, mis en évidence

par une augmentation de l'accumulation cérébrale de l'agent de contraste, plus l'accumulation tumorale du [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 était élevée. Ce résultat suggère que l'accumulation tumorale de l'anticorps entier dans cette étude est dépendante de l'intégrité de la barrière hématoencéphalique. En effet, les glioblastomes sont des tumeurs très infiltrantes et peuvent, parfois, altérer les propriétés sélectives de la BHE. Cette altération de la barrière hématoencéphalique tumorale reste, toutefois, très hétérogène et n'est pas retrouvée chez tous les patients.

Néanmoins, lorsque le signal obtenu par TEP est superposé à celui obtenu par IRM, on remarque que le signal radioactif est plus étendu que celui obtenu par IRM. Ces résultats pourraient s'expliquer de deux manières : i) Le modèle de tumeur Gli7 a continué de s'étendre pendant les 10 jours qui se sont écoulés entre l'imagerie IRM et l'imagerie TEP perturbant ainsi d'avantage la BHE ce qui a pour conséquence une accumulation du [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 sur un volume plus large de tumeur, ii) le récepteur ET<sub>A</sub> est exprimé au niveau des cellules endothéliales tumorales dans un environnement vasculaire altéré, permettant ainsi le marquage avec le [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 sur des zones où la BHE conserve ses propriétés de barrière physiologique.

Le modèle préclinique *in vivo* nous a donné de précieuses informations. Néanmoins, l'anticorps xiRA63, comme le xiRB49 décrits dans les 2 premiers chapitres, reconnaissent les formes humaines des Récepteurs des endothélines et non les formes murines. Leur comportement vis-à-vis de la BHE a été étudié sur modèle murin. Dès lors, il pourrait être pertinent de valider le passage de ces anticorps à travers la BHE humaine, celle-ci pouvant présenter des caractéristiques différentes de son homologue murin. De plus, il est connu que les Récepteurs des endothélines sont exprimés au niveau des cellules endothéliales de la BHE. Ainsi, il est possible qu'un phénomène de transcytose puisse être responsable du passage actif des anticorps à travers la BHE *via* ces récepteurs. Afin de déterminer le profil de passage de la BHE des anticorps xiRA63 et xiRB49 et de leur fragment respectif, un modèle *in vitro* artificiel de BHE humaine issue de cellules IPSCs (*induced pluripotent stem cells*) a été utilisé<sup>303</sup>. Ces futures expériences fourniront des indications précieuses concernant le xiRA63 et le xiRB49 pour leur future utilisation en clinique.

Pour conclure, le radioligand [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 a été capable de détecter un GBM dans un modèle préclinique pertinent. Dès lors, son utilisation pour la stratification de patients atteints de GBM ET<sub>A</sub><sup>+</sup> par immunoTEP permettrait d'adapter au mieux les traitements nécessaires à la guérison des patients. Les résultats encourageants obtenus dans le cadre de cette

## Résultats des travaux de thèse

étude nous ont incités à utiliser le xiRA63 pour (i) diagnostiquer et stratifier un modèle préclinique atteints de GBM ET<sub>A</sub><sup>+</sup>, (ii) assister le geste chirurgical pour l'ablation de ce GBM en associant l'anticorps à une modalité fluorescente, permettant une visualisation de la tumeur.



## **IV. Chapitre IV : Evaluation du xiRA63 pour une approche de chirurgie guidée par fluorescence précédée d'une imagerie préopératoire TEP dans un modèle préclinique de glioblastome humain.**

### *1) Introduction de l'étude*

Lors d'une suspicion d'un glioblastome après un IRM, un neurochirurgien évalue si l'exérèse de la masse tumorale est envisageable en fonction de sa localisation et de son infiltration. Si la chirurgie est possible, cette première approche thérapeutique est souvent cruciale pour le pronostic du patient et peut s'avérer extrêmement efficace<sup>304,305</sup>. Un résidu tumoral suite à l'opération pourrait être la cause de récurrence. Cependant, distinguer la marge entre les tissus tumoraux et les tissus sains peut s'avérer complexe. La possibilité de rendre fluorescent les tissus tumoraux afin d'assister le geste chirurgical et d'éliminer des tissus tumoraux qui seraient alors non détectables permet une exérèse plus complète de la tumeur favorisant ainsi la survie des patients tout en leur appliquant le protocole du traitement standard<sup>188,306</sup>.

Une étude clinique de phase III (NCT00241670), dont les résultats ont été publiés en 2006, notait une augmentation de la survie globale de 6 mois chez des patients atteints de gliomes malins ayant bénéficié d'une résection tumorale plus complète sous chirurgie guidée par fluorescence suite à l'administration de l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) comparé au groupe témoin. Cette étude souligne l'intérêt d'améliorer et d'affiner la neuro-chirurgie, l'un des piliers de l'arsenal thérapeutique antitumoral<sup>307,308</sup>. Depuis 2019, le 5-ALA est approuvé par la FDA en tant qu'agent d'imagerie optique *per-operative* chez les patients suspectés de gliomes de haut grade. Le 5-ALA est un précurseur biochimique naturel de l'hème qui, une fois métabolisé par les cellules, est transformé en porphyrine fluorescente (PPIX). Après administration du 5-ALA, l'accumulation de porphyrines fluorescentes au sein du tissu cancéreux permet sa visualisation après excitation par la lumière bleue. La différence d'accumulation de PPIX entre les tissus sains et cancéreux peut s'expliquer par (i) une modification de l'expression ou de l'activité des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'hémoglobine dans les cellules tumorales, (ii) une atteinte de la BHE par la tumeur ou une augmentation de la néovascularisation dans le tissu du gliome permettant l'augmentation de l'apport du PPIX au niveau tumoral. Toutefois les résultats du 5-ALA sont largement discutés. En effet, une revue récente de 2022 a analysé, de nouveau, les cas cliniques des patients traités

ou non par le 5-ALA<sup>309</sup>. Leurs conclusions montrent l'absence d'amélioration de la survie post-opératoire suite à la chirurgie guidée par fluorescence des patients. Les auteurs expliquent que la forte hétérogénéité de fluorescence émise au sein des différentes tumeurs ne permet pas de conclure quant à l'efficacité du traitement. Néanmoins, et comme expliqué dans cette étude, une stratification des patients pouvant bénéficier d'une chirurgie guidée par fluorescence médiée par le 5-ALA pourrait, dans le cas de certaines tumeurs métastatiques cérébrales, permettre une amélioration de la survie globale.

Aussi, la quête de nouveaux biomarqueurs pour une médecine de précision devient un enjeu majeur. Plusieurs essais cliniques prometteurs avec des biomolécules d'intérêt sont en cours. C'est le cas du SGM-101 développé par la société SurgiMab<sup>310,311</sup>. Le SGM-101 est un anticorps monoclonal chimérique ciblant l'antigène carcinoembryonnaire (ACE), présent à la surface de cellules tumorales et conjugué à un fluorochrome qui émet dans le proche infrarouge, le BM104<sup>312</sup>. Une étude de phase I/II a été conçue pour déterminer la dose optimale d'injection du SGM-101 afin d'obtenir la chirurgie guidée par fluorescence la plus optimale possible sur des patients atteints de cancer colorectal<sup>311</sup>. Leurs résultats prometteurs ont conduit au lancement de plusieurs essais cliniques de phase III (NCT03659448, NCT04642924) et à de nouvelles études de phase I pour investiguer l'intérêt de leur outil thérapeutique sur des métastases cérébrales issues de cancer colorectal qui devraient, théoriquement, conserver ce biomarqueur (NCT04755920).

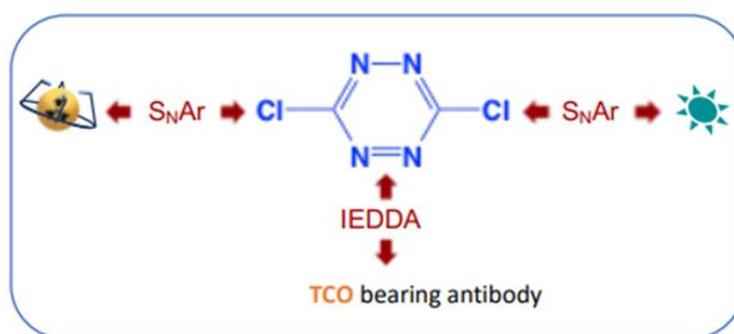
Il est à noter que les gliomes traités par chirurgie après administration de 5-ALA ou les tumeurs métastatiques ciblées par le SGM-101 sont très différentes d'un glioblastome, tant au niveau des biomarqueurs moléculaires exprimés à la surface des cellules tumorales qu'au niveau de leur localisation très diffuse dans le système nerveux central (SNC). Aussi, la publication décrivant l'utilisation du cetuximab, anticorps anti-EGFR, conjugué à un fluorochrome émettant dans le proche infrarouge, l'IRDye800, pour réséquer efficacement les masses tumorales de glioblastome sous fluorescence démontre la faisabilité de cette approche chez les patients<sup>313-315</sup>.

Les glioblastomes étant extrêmement hétérogènes, la stratification des patients devient essentielle pour déployer ces nouvelles approches de thérapies ciblées. Le recours à des traceurs d'imagerie bimodaux permettant la stratification des patients pour déterminer leur éligibilité à une chirurgie guidée par fluorescence est une étape essentielle. Une première étude clinique a évalué une sonde bimodale couplée d'une part avec un fluorochrome pour la chirurgie guidée et d'autre part un radioélément permettant de préciser la localisation tumorale par imagerie TEP

afin d'évaluer la faisabilité de la résection chez des patients atteints de GBM <sup>316</sup>. Cette preuve de concept a mis en lumière l'intérêt de l'imagerie bimodale *via* le même récepteur moléculaire pour une visualisation préopératoire par TEP du GBM et *per-opératoire* sous fluorescence.

Suite aux résultats prometteurs précliniques du xiRA63 comme immuno-traceur, nous l'avons évalué comme vecteur d'imagerie bimodale afin de (i) diagnostiquer et stratifier les patients atteints de GBM ET<sub>A</sub><sup>+</sup> à l'aide d'un radioélément par imagerie immuno-TEP (ii) et pour éliminer un maximum de cellules tumorales par exérèse grâce à la conjugaison d'un fluorochrome permettant la visualisation de la tumeur par fluorescence.

Dans ce contexte, le xiRA63 a été conjugué à une plateforme multimodale appelée MOMIP (*MonO*molecular *Multimodal* *Imaging* *Probes*) basée sur la tétrazine brevetée par l'un de nos collaborateurs de l'Institut de Chimie Moléculaire de Bourgogne (ICMUB) <sup>317</sup>. La plateforme fonctionnalisable est une dichlorotétrazine. L'un des atomes de chlore est alors utilisé pour lier un chélateur portant une amine *via* une substitution nucléophile aromatique et le second permettra l'introduction d'un thiol portant un fluorophore. Cette plateforme tétrazine a été ensuite conjuguée à des anticorps préalablement modifiés par un groupement chimique Trans-cyclooctène (TCO). La conjugaison de la plateforme tétrazine sur le TCO se faisant par « click chemistry » par la réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse (IEDDA) (**Figure 44**).



**Figure 44** : schéma de la plateforme fonctionnalisable appelée MOMIP (*MonO*molecular *Multimodal* *Imaging* *Probes*) et basée sur la tétrazine.

Cette plateforme permet de (i) contrôler le rapport chélateur/fluorochrome, (ii) simplifier le processus de conjugaison, (iii) minimiser la perte d'affinité de l'anticorps causé par les conjugaisons aléatoires, (iv) contrôler l'homogénéité et la reproductibilité de lot d'immunoconjugués. Enfin, l'introduction de la fonction TCO permettant la bio-conjugaison

avec une stœchiométrie équivalente entre chaque lot a été réalisée grâce à la transglutaminase (TG, E.C. 2.3.2.13). Cette enzyme, dont la réaction est décrite dans la partie introductive de ce manuscrit, permet la liaison d'immunoconjugués sur la glutamine (Q295) de l'IgG1 humaine. Comme, chaque anticorps est porteur de 2 sites spécifiques de conjugaison. L'ajout de nouvelles glutamines en position N297Q permet de passer de 2 à 4 sites spécifiques de conjugaison.

Les derniers résultats de ma thèse seront décomposés en deux parties :

➤ La première présente la conjugaison de l'anticorps xiRA63 avec la plateforme MOMIP fluorescente sans radioactivité. Cela permet la validation de la spécificité de l'anticorps conjugué *in vitro* puis *in vivo* sur un modèle sous-cutané de tumeurs CHO-WT et CHO-ET<sub>A</sub>, confirmant la faisabilité de la résection tumorale guidée par fluorescence en s'affranchissant des problématiques de passage de la BHE. Cette même expérience a également été effectuée avec le xiRB49 sur un modèle sous-cutané de tumeurs CHO-WT et CHO-ET<sub>B</sub>.

➤ La seconde partie porte uniquement sur l'anticorps xiRA63. Elle a consisté, sur un modèle préclinique xéno greffé avec la lignée Gli7 en position orthotopique, à réaliser l'imagerie diagnostique pré-opérative par immunoTEP d'un GBM humain (Gli7) exprimant le biomarqueur ET<sub>A</sub><sup>+</sup>, puis, à son ablation *post mortem* guidée par fluorescence. Comme précédemment, le zirconium 89 a été choisi comme radioélément et L'IRDye800CW, comme fluorochrome émettant dans le proche infrarouge. Très utilisé dans les études précliniques pour l'imagerie *in vivo* proche infrarouge, il génère un meilleur contraste en temps réel du fait d'une faible autofluorescence cellulaire et une meilleure pénétration tissulaire<sup>318</sup>.

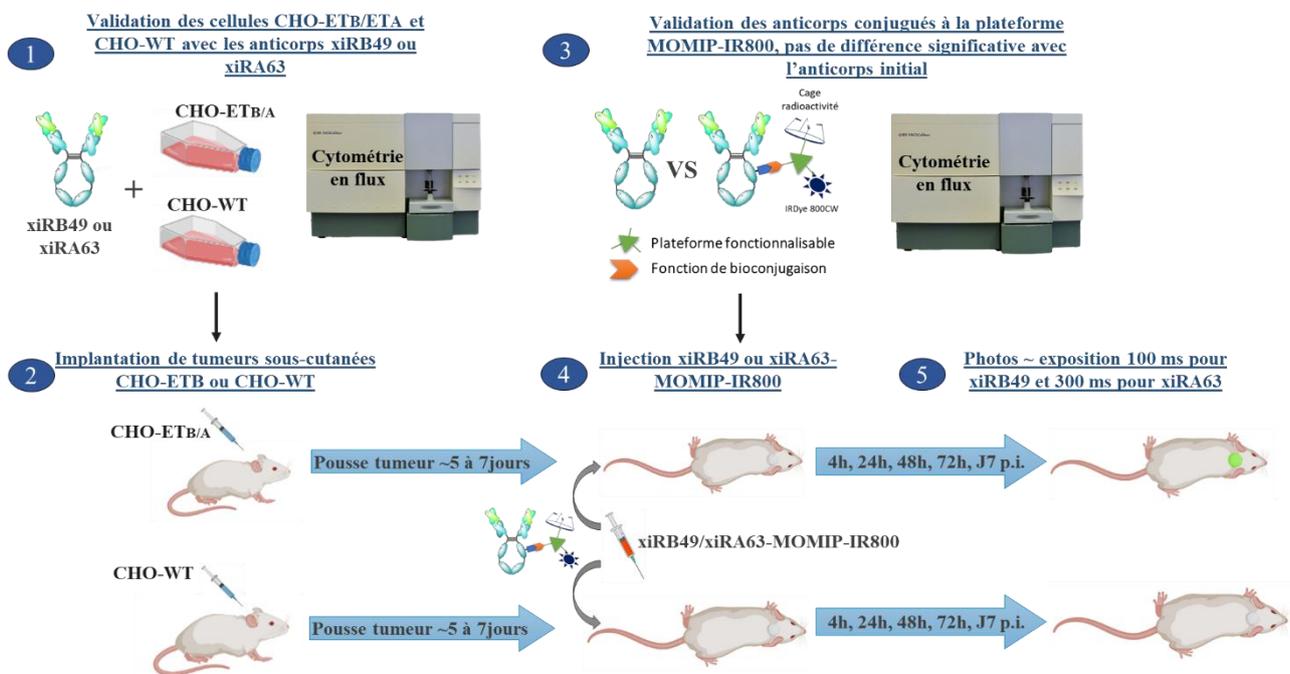
Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence que la résection guidée par fluorescence d'un GBM humain dans un modèle préclinique était possible. De plus, l'imagerie TEP pré-opérative permettant de définir la localisation et l'infiltration du GBM corrèle parfaitement avec le signal fluorescent obtenu validant ainsi l'imagerie bimodale médiée par l'anticorps.

## 2) Résultats

### a. Validation de la chirurgie guidée par fluorescence médiée par les anticorps ciblant les Récepteurs des endothélines sur un modèle préclinique de tumeurs sous-cutanées

#### Déroulement et objectifs de l'étude

L'objectif de cette première partie a été de valider la faisabilité de la résection de tumeur sous-cutanée guidée par les anticorps xiRA63 ou xiRB49 fluorescents en utilisant le système d'imagerie KIS800 de Kaer Labs. Ces anticorps ont été conjugués à la plateforme MOMIP bi-fonctionnelle portant sur une fonction l'IRDye800CW et sur l'autre une « cage » desferrioxamine (DFO) qui pourra, dans un second temps, permettre la chélation du  $^{89}\text{Zr}$ . La **Figure 45** récapitule les manipulations effectuées.



**Figure 45 : Schéma de l'étude de la faisabilité de la résection tumorale guidée par fluorescence des tumeurs sous-cutanées.** (1) La première étape consiste à valider les cellules témoins exprimant ou non les Récepteurs des endothélines A ou B par cytométrie en flux (CHO-WT, CHO-ET<sub>A</sub>, CHO-ET<sub>B</sub>). (2) Par la suite, ces mêmes cellules sont implantées en sous-cutanée au niveau des flancs des souris. (3) En parallèle, la fonctionnalité des anticorps conjugués avec la plateforme bi-fonctionnelle portant le fluorochrome a été validée. (4) 5 à 7 jours post-implantation, l'anticorps xiRA63-MOMIP-IR800 a été injecté par voie intraveineuse dans des souris CHO-ET<sub>A</sub> et CHO-WT et l'anticorps xiRB49-MOMIP-IR800 a été injecté en i.v. dans des souris porteuses de tumeurs CHO-ET<sub>B</sub> et CHO-WT. (5) Enfin, les tumeurs des souris ont été imagées au cours du temps grâce à l'appareil KIS800 de Kaer Labs, puis une ablation tumorale guidée par fluorescence a été effectuée sur les tumeurs exprimant les ETR.

Tout d'abord des cellules CHO surexprimant les récepteurs A ou B des endothélines (CHO-ET<sub>A</sub> et CHO-ET<sub>B</sub>) ou n'exprimant aucun récepteur (CHO-WT) ont été implantées en sous-cutanée au niveau des flancs des souris. Une fois les tumeurs ayant atteint un volume d'environ 64,45 mm<sup>3</sup>, environ 5 à 7 jours post-implantation, les souris ont été injectées par voie intraveineuse avec l'anticorps conjugué à la plateforme MOMIP et au fluorochrome sans radioactivité. Au préalable, ces anticorps conjugués ont fait l'objet d'une validation de leur degré de conjugaison, de leur pureté, ainsi que de leur fonctionnalité.

Enfin, le système d'imagerie KIS800 de KaerLabs a été utilisé pour obtenir des images des tumeurs par fluorescence en temps réel. Le système est conçu de façon à permettre au manipulateur de pratiquer une chirurgie avec une imagerie simultanée de la fluorescence. L'appareil est constitué d'un laser dont la longueur d'onde d'excitation est de 785 nm et d'un filtre de collection qui peut détecter la fluorescence émise à partir de 810 nm permettant de travailler dans le proche infrarouge. Pour chaque image obtenue, différentes acquisitions sont réalisées puis traitées *in silico* afin d'augmenter la sensibilité de l'image finale et de prendre en compte la lumière ambiante. Ainsi, trois images brutes sont acquises : l'image fluorescente obtenue *via* l'excitation de la plateforme fonctionnalisée à l'aide du laser à 785 nm et la collection des émissions de longueur d'onde supérieure à 810 nm, l'image du bruit de fond correspondant seulement à tout ce qui émet à plus de 810 nm sans excitation préalable et une image appelée « *bright* » obtenue à l'aide d'une LED infrarouge qui permet de détecter l'animal. A partir de ces trois acquisitions, plusieurs images sont alors créées avec le logiciel de Kaer Labs :

- Une image « corrigée » qui correspond à l'image obtenue après soustraction du signal de bruit de fond à l'image fluorescente.
- Une image dite « superposée » qui correspond à l'image « corrigée » sur l'image « *bright* ». Cette image superposée a souvent été utilisée pour présenter les résultats obtenus.

Comme pour de nombreux appareils de fluorescence, différents temps d'exposition du laser peuvent être appliqués pour obtenir une fluorescence plus ou moins importante. Dans le cas de cette expérience, un même temps d'excitation a été appliqué pour les groupes de souris injectées soit avec le xiRA63-MOMIP-IR800 soit avec le xiRB49-MOMIP-IR800. Les souris ont été imagées 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et J7 post-injection de l'anticorps fluorescent. À J7 post-injection, une résection *post mortem* de la tumeur fluorescente a été effectuée. Enfin, une fois l'ablation

de la tumeur réalisée, une étude de biodistribution *ex vivo* a été conduite chez les souris CHO-ET<sub>A</sub> ou CHO-ET<sub>B</sub> à l'aide de l'appareil KIS800 en prélevant les organes représentatifs.

### Validation des anticorps xiRA63-MOMIP-IR800 et xiRB49-MOMIP-IR800

Les anticorps xiRA63 et xiRB49 ont été conjugués à la plateforme MOMIP bi-fonctionnelle couplé à l'IRDye800CW (IR800) et couplé au bras DFO capable de chélater le zirconium 89.

Pour une reproductibilité du procédé ainsi qu'une homogénéité des lots, les anticorps ont été conjugués de manière site-spécifique. Ils ont, dans un premier temps, été déglycosylés par une PNGase F. Cette amidase élimine les N-oligosaccharides en clivant les résidus GlcNAc (N-acétylglucosamine) liés aux asparagines. Après la déglycosylation, les anticorps ont été conjugués à un *trans*-cyclooctène (TCO) à l'aide d'une transglutaminase dont l'action a été décrite dans la partie introductive de la thèse. Enfin, la conjugaison de la plateforme MOMIP (DFO-Tz-IR800) est réalisée par réaction de Diels-Alder inverse. Dans ce chapitre, les différentes étapes de conjugaison des anticorps ont été validées par chromatographie liquide et spectrométrie de masse. Les anticorps résultant de cette chimie *click* possèdent un DOL (degree of labeling) de MOMIP compris entre 1,6 et 1,9 (moyenne UV :  $1,9 \pm 0,1$ ) pour le xiRA63-MOMIP-IR800 et 1,6 et 1,9 (moyenne UV :  $1,8 \pm 0,1$ ) pour le xiRB49-MOMIP-IR800. Ce DOL a été mesuré par spectroscopie UV et confirmé en spectrométrie de masse.

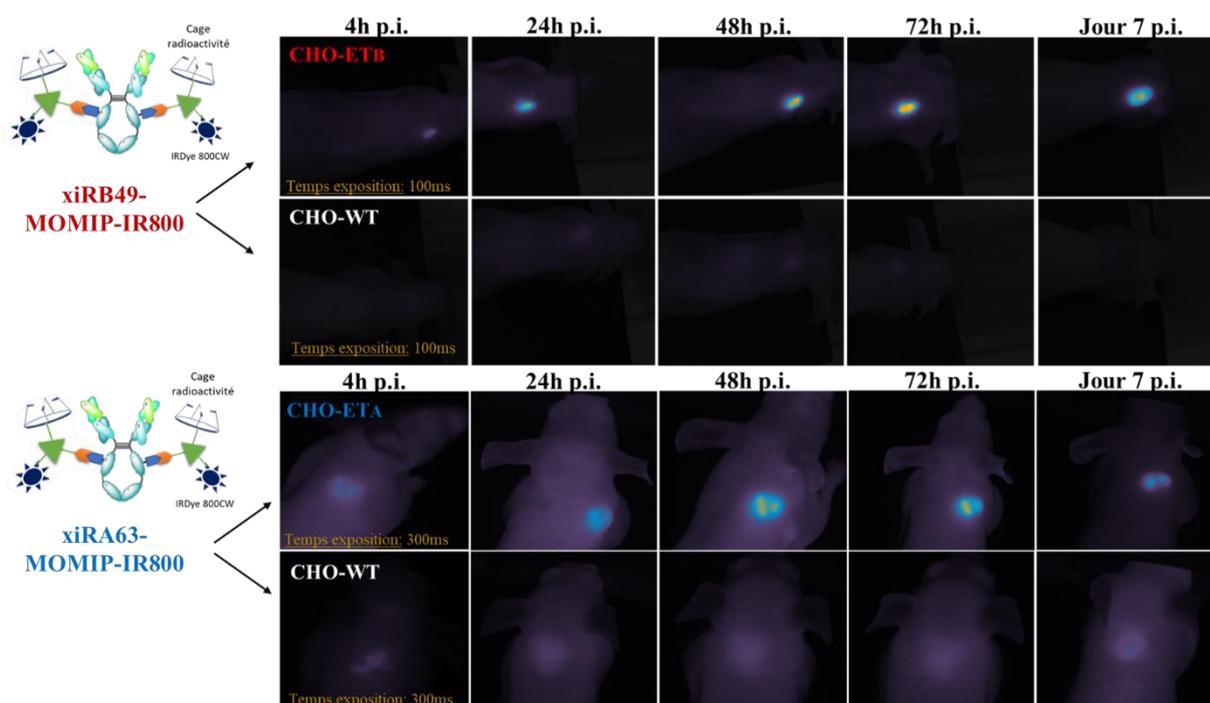
Après confirmation de la pureté et de la conjugaison optimale des anticorps, leur fonctionnalité a été évaluée par cytométrie en flux. La fonctionnalité des anticorps xiRA63-MOMIP-IR800 ou xiRB49-MOMIP-IR800 a été comparée à celle des anticorps xiRA63 ou xiRB49 non conjugués sur les cellules CHO-ET<sub>A</sub> ou CHO-ET<sub>B</sub>, respectivement. Les résultats de leur constante d'affinité apparente (K<sub>d</sub>) et de leur B<sub>max</sub> ont été reportés dans le **Tableau 9**. Aucune différence significative n'a été observée entre les anticorps nus et conjugués. Néanmoins, un léger écart au niveau du B<sub>max</sub> a été observé. Cette différence de plateau de saturation peut s'expliquer par une intensité de signal diminuée à cause d'une reconnaissance biaisée de l'anticorps primaire par l'anticorps secondaire. En effet, sa région Fc est probablement encombrée stériquement par la cage MOMIP et le fluorochrome IRDye800CW, limitant sa reconnaissance par l'anticorps secondaire. Malgré cette différence de profils, les anticorps conjugués ont été validés pour leur utilisation future *in vivo* puisqu'ils conservent leur affinité apparente (de l'ordre du nanomolaire) et un B<sub>max</sub> considéré comme normal puisque aucune différence significative n'est observée.

**Tableau 9 : Comparaison de l’affinité apparente et des Bmax entre les anticorps conjugués et nus. Données obtenues par cytométrie en flux**

	xiRB49	xiB49-MOMIP-IR800	xiRA63	xiRA63-MOMIP-IR800
<b>Bmax (%MFI)</b>	76,72 ± 0,11	62,89 ± 0,11	88,88 ± 0,24	74,97 ± 0,20
<b>Kd (nM)</b>	0,19 ± ±0,002	0,14 ±0,002	0,26 ± 0,0045	0,025 ± 0,001

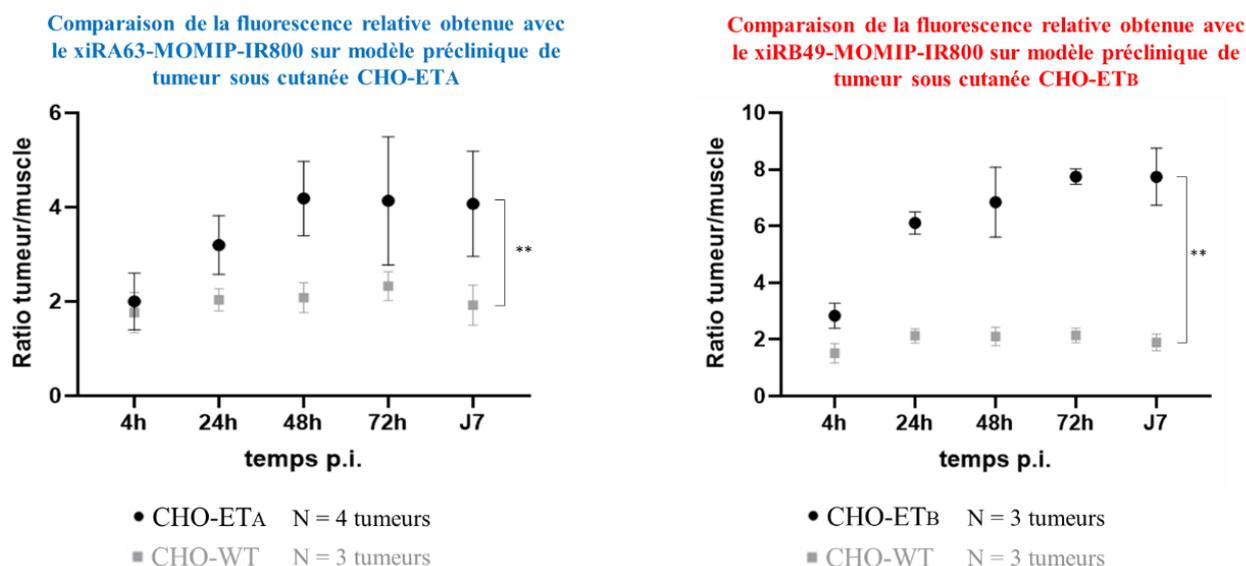
**Résultats de la fluorescence *in vivo* émise par les anticorps xiRA63-MOMIP-IR800 et xiRB49-MOMIP-IR800 sur un modèle préclinique de tumeurs sous-cutanées**

Les anticorps conjugués et validés ont été injectés par voie i.v. dans des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées. Ces souris ont été imagées au cours du temps. Les données de fluorescence *in vivo* des souris implantées avec les CHO-WT et CHO-ET<sub>A</sub> ou CHO-ET<sub>B</sub> obtenues respectivement avec le xiRA63-MOMIP-IR800 ou le xiRB49-MOMIP-IR800 sont présentées dans la **Figure 46**.



**Figure 46 : Etude longitudinale de la fluorescence émise par les anticorps xiRA63-MOIP-IR800 ou xiRB49-MOIP-IR800 sur un modèle préclinique de tumeurs sous-cutanées CHO-ET<sub>A</sub>, CHO-ET<sub>B</sub> et CHO-WT. Panel du haut : Images superposées de la fluorescence corrigée et du « bright » des souris portant des tumeurs CHO-ET<sub>B</sub> ou CHO-WT et injectées avec l’anticorps xiRB49-MOMIP-IR800. Panel du bas : Images superposées de la fluorescence corrigée et du « bright » des souris portant des tumeurs CHO-ET<sub>A</sub> ou CHO-WT et injectées avec l’anticorps xiRA63-MOMIP-IR800.**

Comme observé sur cette figure, les tumeurs CHO-ET<sub>A</sub> et CHO-ET<sub>B</sub> sont nettes et bien visibles par fluorescence. Inversement, les tumeurs CHO-WT sont à peine détectables après injection des deux anticorps conjugués. Ces résultats confirment la conservation de la spécificité des anticorps xiRA63-MOMIP-IR800 et xiRB49-MOMIP-IR800 pour leur récepteur *in vivo*. Il est à noter que le temps d'exposition utilisé pour imager les tumeurs est de 100 ms pour les CHO-ET<sub>B</sub> et de 300 ms pour les CHO-ET<sub>A</sub>. Ces mêmes temps d'exposition ont été utilisés pour imager les souris CHO-WT injectées avec le xiRA63-MOMIP-IR800 et xiRB49-MOMIP-IR800. Ainsi, il est possible de comparer le signal de fluorescence obtenu entre les groupes de tumeurs CHO-ET<sub>A/B</sub> et CHO-WT avec le xiRA63-MOMIP-IR800 ou le xiRB49-MOMIP-IR800. Une quantification relative du ratio tumeur/muscle a alors été réalisée pour chaque groupe de souris à l'aide du logiciel Image J (**Figure 47**).

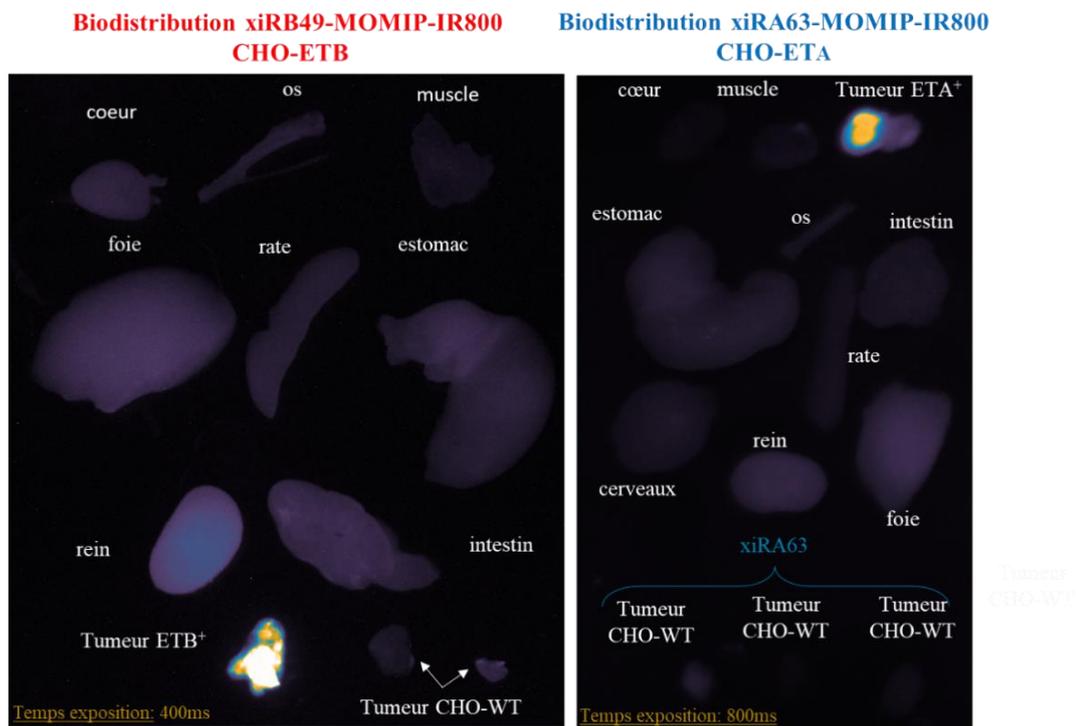


**Figure 47 : Quantification relative de la fluorescence émise par les anticorps xiRA63-MOMIP-IR800 ou xiRB49-MOIP-IR800 au niveau des tumeurs.** À gauche est représenté le ratio tumeur CHO-ET<sub>A</sub>/ bruit de fond obtenu avec l'anticorps xiRA63-MOMIP-IR800 et à droite, la même quantification avec le ratio tumeur CHO-ET<sub>B</sub>/ bruit de fond obtenu avec l'anticorps xiRB49-MOMIP-IR800. (les données sont représentées en moyenne ± écart type)

Cette quantification relative a permis de mettre en évidence une différence significative observée entre le signal obtenu sur les tumeurs témoins positives, CHO-ET<sub>A</sub> ou CHO-ET<sub>B</sub>, et celui des tumeurs négatives, CHO-WT. Outre la spécificité d'action des anticorps, cette

expérience a permis de démontrer une limitation de l'accumulation passive des anticorps au niveau tumoral par effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*). En effet, il est connu que les macromolécules telles que les nanoparticules peuvent s'accumuler préférentiellement au sein du stroma tumoral en exploitant les propriétés intrinsèques de la vasculature tumorale ainsi qu'en tirant profit du système lymphatique défaillant. Toutefois, dans notre cas, les anticorps ne s'accumulent pas dans les tumeurs CHO-WT. Par ailleurs, cet effet EPR est largement discuté au sein de la communauté scientifique. L'expérience conduite permet donc d'écarter la possibilité d'une accumulation tumorale médiée par l'effet EPR puisque sur les cellules CHO-WT, un faible signal a été retrouvé, mettant en avant la nécessité de la présence de Récepteurs des endothélines pour l'accumulation des anticorps conjugués xiRA63-MOMIP-IR800 et xiRB49-MOMIP-IR800. Enfin, le temps d'accumulation maximal du xiRA63-MOMIP-IR800 dans la tumeur a été obtenu dès 48h p.i.. Ce temps d'accumulation maximum sera utilisé dans la seconde partie pour définir le temps post-injection de l'anticorps nécessaire à l'obtention d'une fluorescence suffisante pour faire la résection tumorale d'un glioblastome guidée par fluorescence.

A la fin de l'expérience, 7 jours post-injection., la résection *post-mortem* des tumeurs sous-cutanées guidée par fluorescence a été un succès. Par la suite, différents organes clés d'une souris de chaque groupe CHO-ET<sub>A</sub> et CHO-ET<sub>B</sub> ont été prélevés pour valider la biodistribution de l'anticorps fluorescent à 7 jours p.i. (**Figure 48**). En dehors des tumeurs positives CHO-ET<sub>A</sub> ou CHO-ET<sub>B</sub>, aucun organe ne semble contenir de fluorescence apparente. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans le chapitre 3. En effet, à 7 jours post-injection, le [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 ne semblait être retenu dans aucun organe particulier. Dans le cas de la présente étude, seules les tumeurs CHO-ET<sub>A</sub> ou CHO-ET<sub>B</sub> semblent émettre de la fluorescence.



**Figure 48 : Biodistribution *ex vivo* de la fluorescence dans des organes clés.** À gauche est représentée la biodistribution d’une souris injectée avec le xiRB49-MOMIP-I800. À droite est représentée la biodistribution d’une souris injectée avec le xiRA63-MOMIP-I800. Dans les deux cas, un exemple de tumeur CHO-WT est présenté pour montrer l’absence de fluorescence.

Pour conclure, ces résultats confirment la pertinence de l’utilisation des anticorps xiRA63-MOMIP-IR800 et xiRB49-MOMIP-IR800 dans un contexte d’assistance de la résection tumorale. Ces anticorps peuvent ainsi être considérés comme des vecteurs plateformes, capables de prendre en charge différents agents d’imagerie telles que des molécules fluorescentes ou des radioisotopes émetteurs de positon. Face au succès de cette étude de fluorescence et à celui du diagnostic d’un GBM médié par immunoTEP, le xiRA63 a été, par la suite, employé pour réaliser l’ablation d’un glioblastome humain guidée par fluorescence dans un modèle préclinique orthotopique Gli7 avec une imagerie préopératoire obtenue par immunoTEP.

*b. Preuve de concept in vivo de la chirurgie guidée par fluorescence d'un glioblastome humain et planifiée par une imagerie isotopique pré-opératoire à l'aide de l'anticorps xiRA63*

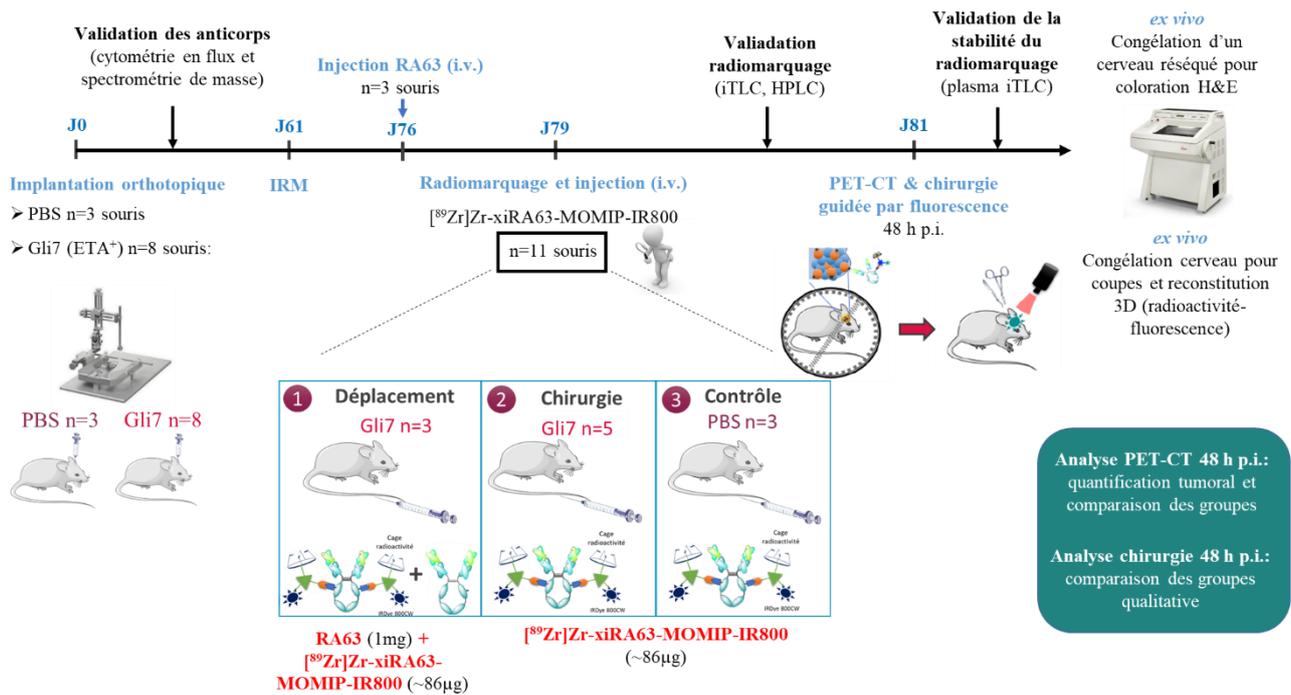
**Organigramme de manipulation**

L'objectif de cette seconde partie consiste à utiliser l'anticorps [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-MOMIP-IR800 pour (i) réaliser une imagerie pré-opérative du GBM humain par immunoTEP permettant la quantification du signal émis par le radioligand au niveau de la tumeur et (ii) de valider la faisabilité de la résection guidée par fluorescence d'un glioblastome humain dans un modèle préclinique murin.

La **Figure 49** récapitule les manipulations effectuées durant cette étude. Dans cette étude, trois groupes de souris ont été constitués. Le premier groupe, comprenant 5 souris implantées avec les CSG-Gli7, est dédié à la chirurgie guidée par fluorescence. Le second groupe, formé de 3 souris implantées avec des CSG-Gli7, a subi l'injection d'un compétiteur froid par voie intra-veineuse à savoir le Rendomab A63 murin (RA63) 72 h auparavant de l'injection de l'anticorps chaud [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-MOMIP-IR800 afin d'observer un effet de déplacement entre les deux anticorps. En effet, si le signal au niveau tumoral obtenu à l'aide du [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-MOMIP-IR800 est bien lié à l'expression du biomarqueur ET<sub>A</sub>, alors la pré-injection du RA63 devrait induire une diminution significative du signal fluorescent et radioactif, du fait de la liaison de RA63 sur ET<sub>A</sub>. Ce groupe témoin, appelé « groupe de déplacement » ou de « compétition » permettra de prouver *in vivo* que le signal observé dans les tumeurs des souris du premier groupe émis par le [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-MOMIP-IR800, est bien corrélé à l'expression du biomarqueur ET<sub>A</sub>. Enfin, le dernier groupe est composé de 3 souris ayant subi le geste opératoire d'implantation avec du PBS sans CSG-Gli7. Après injection de l'anticorps [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-MOMIP-IR800, ce groupe permettra, d'une part, de valider que le signal obtenu par imagerie TEP n'est pas dû à une inflammation induite par la stéréotaxie, et d'autre part, de valider l'intégrité de la BHE post opératoire par IRM.

Toutes les souris ont été imagées par TEP et fluorescence 48 h post-injection par voie intraveineuse de l'anticorps [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-MOMIP-IR800. Pour rappel, ce temps a été choisi puisqu'il correspond au temps d'accumulation maximal du xiRA63-MOMIP-IR800 dans le modèle tumoral sous-cutané précédemment détaillé.

## Résultats des travaux de thèse



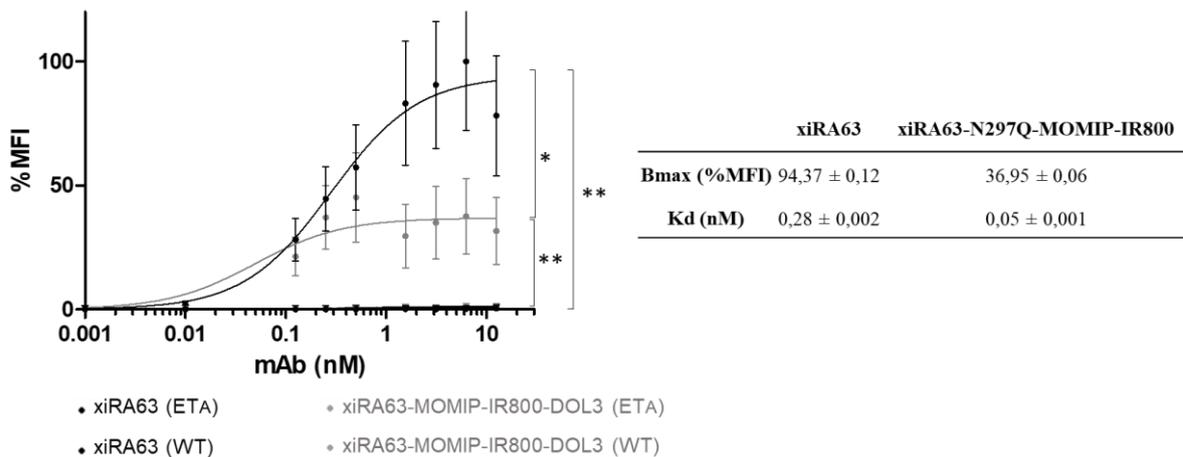
**Figure 49 : Schéma de l'étude de la faisabilité de la résection tumorale guidée par fluorescence d'un GBM humain prélocalisé par immunoTEP.** Les souris ont été imagées par IRM 61 jours post-implantation des cellules tumorales. Le groupe de déplacement s'est vu recevoir un bolus intraveineux de RA63 à 76 jours post-implantation et l'injection de l'anticorps [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 a été réalisée 79 jours post-implantation. En parallèle, le radiomarquage de l'anticorps a été validé par HPLC. Toutes les souris ont été imagées par immunoTEP 48 h après injection de l'anticorps chaud. Une fois l'imagerie TEP réalisée, une ponction intracardiacque a été effectuée sur plusieurs souris pour un prélèvement sanguin puis les souris ont été sacrifiées. L'activité radioactive au niveau du sang a permis de valider la stabilité de l'anticorps *in vivo*. Ensuite, une chirurgie *post mortem* guidée par fluorescence a été effectuée à l'aide de l'appareil KIS800 de Kaer Labs sur les souris. Un des cerveaux a été congelé post-résection pour vérifier la présence de cellules tumorales à l'aide d'un marquage H&E. Un des cerveaux du groupe chirurgie a été préservé de l'ablation tumorale et a été congelé. Il a été utilisé pour faire une reconstitution 3D du cerveau total avec le signal fluorescent et radioactif.

Comme l'indique la **Figure 49**, les différents groupes de souris ont été imagés par IRM et TEP-scan. Plusieurs études *ex vivo* ont été réalisées. Afin de mettre en évidence la corrélation entre les deux modalités d'imagerie, un cerveau du « groupe chirurgie » n'a pas été réséqué directement congelé. Par la suite, ce cerveau a été entièrement coupé au cryostat. Chaque coupe a été imagée avec l'appareil KIS800 permettant l'obtention d'une reconstruction 3D du signal fluorescent émis dans le cerveau entier. Des coupes réparties sur l'ensemble du cerveau ont été sélectionnées pour être autoradiographiées. Ainsi, il a été possible de montrer la co-

localisation du signal fluorescent et du signal radioactif. Enfin, pour valider la qualité de l'ablation tumorale, un des cerveaux du « groupe de résection tumorale » a été congelé après l'exérèse de la tumeur. Une coloration H&E a ensuite été effectuée sur les coupes de ce cerveau réséquée afin de visualiser l'existence de potentielles cellules tumorales restantes.

### Résultats de la validation de l'immunoconjugué xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800

Compte tenu du temps d'excitation important (300 ms) nécessaire pour imager les tumeurs sous-cutanées CHO-ET<sub>A</sub> avec le xiRA63-MOMIP-IR800, il a été décidé d'augmenter le DOL de la plateforme multimodale MOMIP pour intensifier le signal de fluorescence. Le xiRA63-N297Q, contenant deux sites spécifiques de conjugaison supplémentaires *via* l'action de la transglutaminase, a été utilisé. Le DOL a été estimé par spectroscopie UV à  $3,1 \pm 0,1$ . La fonctionnalité de cet anticorps a été évaluée par cytométrie en flux et les résultats sont présentés en **Figure 50**.



**Figure 50 2: Comparaison des courbes de liaison du xiRA63 et du xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 obtenues par cytométrie en flux.** Courbe de liaison de l'anticorps xiRA63 (trait plein noir) et du xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 (trait plein gris) sur des cellules CHO-ET<sub>A</sub> (lignes pleines) et CHO-WT (ligne en pointillés). Les données sont présentées sous forme de valeur moyenne ± écart-type; MFI : Intensité Médiane de Fluorescence. La comparaison statistique a été effectuée avec le test t de Student bilatéral apparié (\*\* p < 0,01 ; \* p < 0,05 ; ns : pas de différence significative).

Le xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800, présente un Kd similaire à l'anticorps natif mais un Bmax significativement différent. Ce résultat peut être expliqué par une perte de la reconnaissance par l'anticorps secondaire du fait de l'encombrement stérique lié à l'ajout de fluorophores sur la structure protéique de l'anticorps xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800.

Dans un deuxième temps, la pureté ainsi que le rendement de radiomarquage de l'anticorps [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 ont été validés par HPLC et iTLC (résultats de contrôle qualité non présentés). Il est important de noter que l'ajout de nouveaux sites spécifiques de conjugaison permettant d'augmenter le DOL de plateforme bi-fonctionnalisable MOMIP augmente également le nombre de DFO présent à la surface de l'anticorps. Aussi, dans un souci de limitation de la dose d'exposition, une dose maximale limite de 120 µCi par souris a été déterminée. Les doses injectées et les quantités d'anticorps administrées aux animaux sont répertoriées dans le **Tableau 10**.

**Tableau 10 : Informations de l'injection du [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 pour la résection tumorale d'un GBM humain prélocalisé par imagerie TEP.**

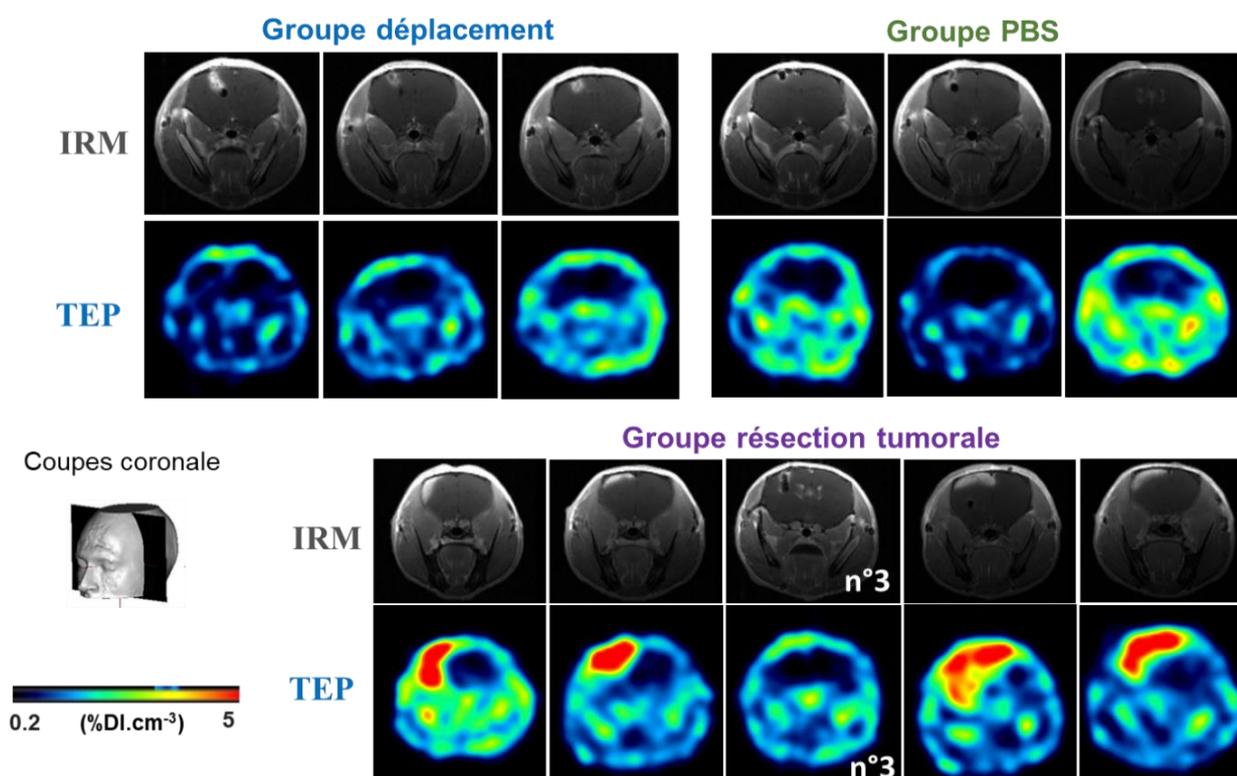
Cellules	Anticorps radiomarqué [ <sup>89</sup> Zr]	Activité spécifique (MBq/nM)	Activité injectée (MBq)	Quantité injectée (nM)	Nombre de souris
Gli7	[ <sup>89</sup> Zr]Zr-xiRA63-MOMIP-IR800	0,008 ± 0.0006	4,3 ± 0,1	555 ± 12,8	11

### Traitement des images *in vivo* du GBM prédéfini par immunoTEP et IRM

Environ 86 µg d'anticorps radiomarqués [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 ont été injectés par voie intraveineuse. Ensuite, l'imagerie TEP a été effectuée sur chaque souris 48 h après injection de l'anticorps radioactif. Les images TEP obtenues après traitement pour chaque souris et les IRM correspondants sont représentés en **Figure 51**.

Les IRM fais par des partenaires de Neurospin, obtenus grâce au Dotarem® (acide gadotérique MM 559), un produit de contraste à base de gaolinium, ont mis en évidence une altération de la BHE pour quasiment toutes les souris implantées avec des cellules tumorales incluses dans le « groupe de déplacement » et dans le « groupe de résection tumorale ». Ce résultat conforte celui obtenu dans le chapitre 3 concernant ce même modèle tumoral. Toutefois dans cette nouvelle étude, la souris n°3 du « groupe de résection tumorale » ne semble pas présenter d'altérations de la BHE (**Figure 51**). La perméabilisation de la BHE caractérisait jusqu'alors la prise tumorale de ce modèle cellulaire. Cependant, un développement tumoral avec préservation de l'intégrité de la BHE n'étant pas impossible, la souris en question n'a pas été exclue de l'étude et a été considérée comme ayant développé une tumeur, sans modification de la structure de la BHE. Sur les trois souris du « groupe contrôle PBS », tandis que deux souris ne semblent pas présenter d'altération de la BHE, mis en évidence par une absence de

passage du DOTAREM, un biomarqueur de l'intégrité de la BHE <sup>319</sup>, au niveau cérébral, une souris semble posséder une BHE légèrement altérée puisque chez cette souris, un signal est observable au niveau cérébral par IRM suite à l'injection de DOTAREM. Ce signal pourrait être, entre autres, causé par une inflammation au niveau du site d'injection induite par la stéréotaxie.

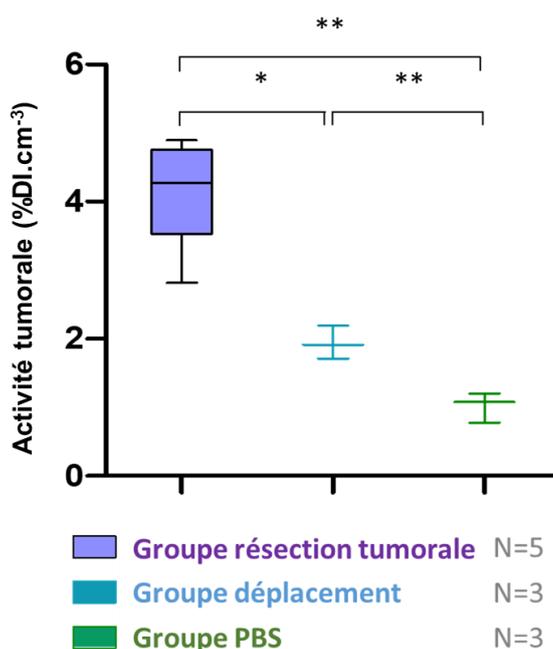


**Figure 51 :** Exemple d'imagerie IRM ou TEP des cerveaux de souris implantées avec des tumeurs ou du PBS 48 h p.i. du xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800. Les souris appartenant au « groupe de déplacement » et au « groupe de résection tumorale » ont été implantées avec des CSG-Gli7-ET<sub>A</sub><sup>+</sup> alors que les souris du « groupe PBS » n'ont été implantées avec du PBS. Les IRM ont été obtenues 61 jours post-implantation des cellules tumorales. Toutes les souris sont injectées avec le même bolus intraveineux de xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 79 jours après implantation. Les imageries TEP ont été obtenues à 48 h p.i. du radioligand. %DI.cm<sup>-3</sup> : Pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu.

Comme mis en avant sur les images TEP (**Figure 51**), le radioligand [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 est capable de détecter efficacement la tumeur Gli7-ET<sub>A</sub><sup>+</sup> chez le « groupe de résection tumorale ». En effet, le radioligand a démontré d'une accumulation significative du signal au niveau de la tumeur intracérébrale, avec pour certaines souris, jusqu'à

plus de 5 %DI.cm<sup>-3</sup> de la dose injectée retrouvée au niveau tumoral 48 h post-injection (signal rouge).

À l'inverse, les tumeurs des souris du « groupe de déplacement » sont difficilement observables. Ces résultats confirment la spécificité de l'anticorps [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 pour ET<sub>A</sub> et donc la spécificité du signal observé vis-à-vis de la présence du biomarqueur ET<sub>A</sub>. Enfin, aucun signal n'a été observé au niveau du point d'injection chez le « groupe contrôle PBS ». Cette absence de signal dans les conditions contrôle permet de valider que l'acte invasif de la stéréotaxie n'induit pas une inflammation responsable du signal obtenu avec le [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 chez le « groupe de résection tumorale ». En effet, un phénomène inflammatoire issu de l'implantation par stéréotaxie pourrait induire un signal non spécifique qui serait observable aussi dans le « groupe contrôle PBS ». Afin de mettre en évidence une différence significative entre les groupes, une quantification de l'activité intra-tumorale a été réalisée pour chaque groupe de souris et est représentée dans la **Figure 52**.



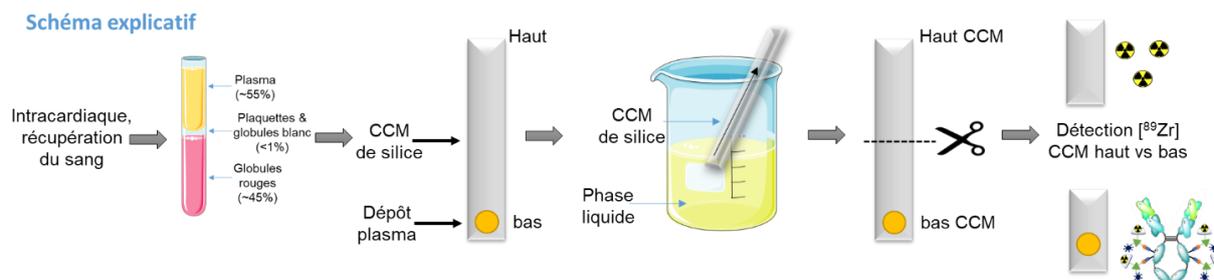
**Figure 52 : Quantification de la concentration du xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 au niveau du site d'implantation des cellules (ou du PBS pour le groupe contrôle) 48 h p.i. dans les 3 différents groupes de souris extrapolée de l'imagerie immunoTEP.** Les données sont présentées sous forme de valeur moyenne ± écart-type. La comparaison statistique a été effectuée avec le test t de Student bilatéral apparié (\*\* p < 0,01 ; \* p < 0,05 ; ns : pas de différence significative). %DI.cm<sup>-3</sup> : Pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu.

La quantification de l'activité intra-tumorale par unité de volume du xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 confirme l'existence d'une différence significative entre les différentes conditions testées. Tout d'abord, une différence significative (\*\* ;  $p < 0,01$ ) a été observée entre le « groupe de résection tumorale » ( $4,2 \%DI.cm^{-3} \pm 0,8 \%DI.cm^{-3}$ ) et les souris du « groupe contrôle PBS » ( $1 \%DI.cm^{-3} \pm 0,2 \%DI.cm^{-3}$ ). De même, une différence significative (\* ;  $p < 0,05$ ) a été mise en évidence entre le « groupe de résection tumorale » et le « groupe de déplacement » ( $1,9 \%DI.cm^{-3} \pm 0,2 \%DI.cm^{-3}$ ). Il est à noter que la quantification dérivée de l'analyse des images d'immunoTEP a mis en avant une différence significative (\*\* ;  $p < 0,01$ ) entre les souris issues du « groupe de déplacement » et celles du « groupe contrôle PBS ». Cette observation permet de mettre en évidence que le déplacement du signal n'est pas total dans le « groupe de déplacement », malgré une diminution du signal conséquente (de l'ordre de 50 %). Ce signal résiduel dans le « groupe de déplacement » permet de mettre en lumière la fixation de l'anticorps xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 malgré la grande majorité de sites de liaison occupés par le rendomab A63. Au vu de la dynamique des GPCR et de leur internalisation permanente, ce résultat n'est pas étonnant et était attendu, le recyclage des GPCR permettant un renouvellement continu au niveau de la membrane tumorale. Pour conclure, le radioligand [ $^{89}Zr$ ]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 a été identifié comme capable de détecter efficacement l'expression d'ET<sub>A</sub> dans un modèle préclinique de CSG-Gli7.

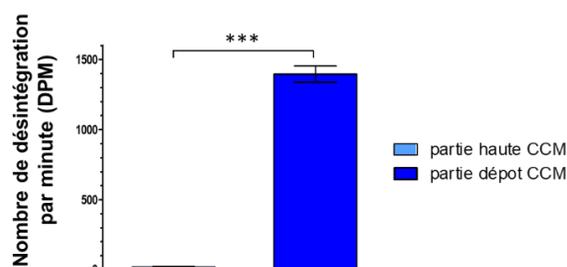
### **Biodistribution de l'anticorps et stabilité 48 h p.i.**

Pour s'assurer de la stabilité de l'anticorps 48 h p.i., un prélèvement de sang a été effectué chez plusieurs souris. Les anticorps possédant une longue demi-vie, le radioligand xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 devrait être retrouvé dans le plasma 48 h après son injection par voie intraveineuse. Ainsi, après prélèvement, une centrifugation des échantillons obtenus a permis de séparer le plasma des globules rouges. Dans le but de déterminer la stabilité de la conjugaison du radioligand xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 au zirconium 89, le plasma a été déposé sur une plaque de chromatographie sur couche mince de silice (iTLC). L'iTLC a été éluée à l'aide d'une phase mobile (acide citrique), connue pour chélater le zirconium 89. Ainsi, dès lors qu'il existe du zirconium 89 libre dans l'échantillon, il sera pris en charge par la phase mobile chélatante et migrera de la zone de dépôt (**Figure 53**). Inversement, si le zirconium 89 est encore complexé au radioligand, aucun zirconium libre ne sera détecté en front de solvant, le signal du zirconium conjugué au radioligand se concentrant au niveau de la ligne de dépôt. Après migration, la CCM est alors divisée en deux parties : la partie basse (ligne de dépôt) et la partie haute (front de solvant). Les deux parties sont lues séparément par un compteur gamma

Wizard2 (PerkinElmer). La **Figure 53** présente le schéma du principe de la manipulation effectuée, ainsi que les résultats obtenus. Ici, le signal radioactif se concentre sur la partie basse de la CCM attestant de la stabilité de la conjugaison du zirconium à l'anticorps xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800. L'anticorps radioconjugué s'est donc avéré stable dans le plasma 48 h post-injection



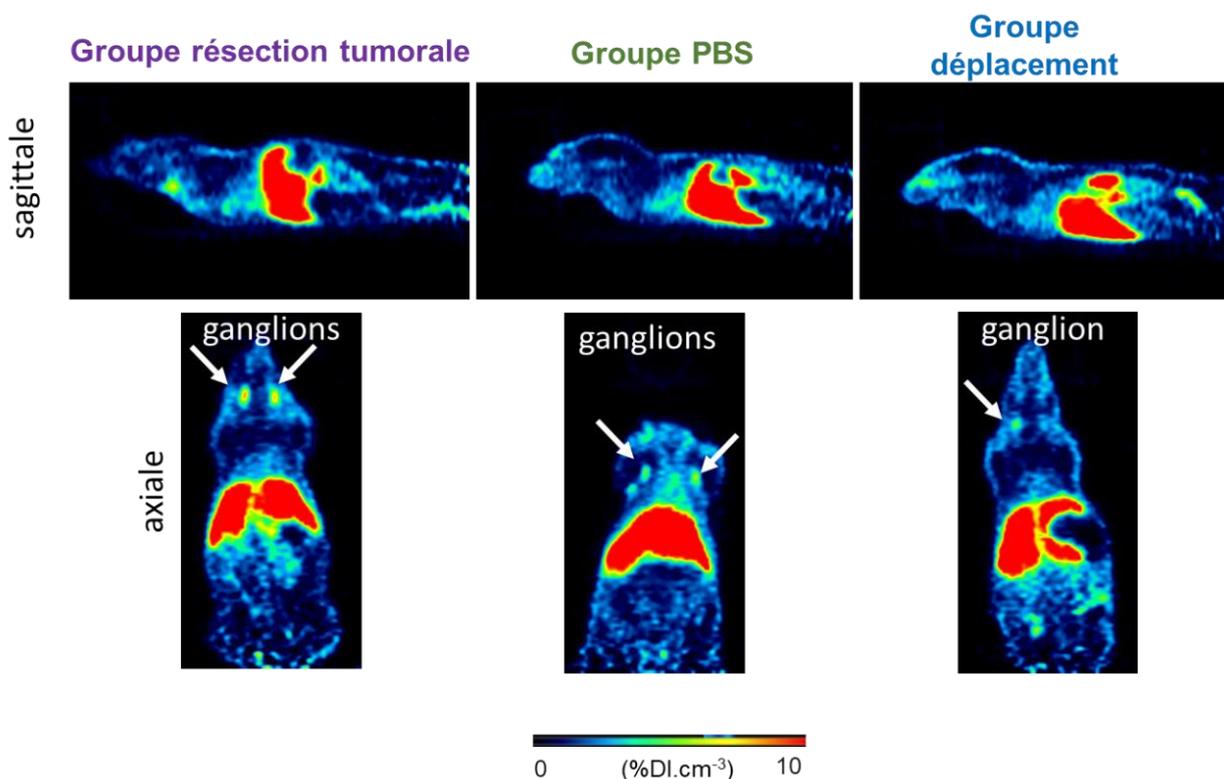
**Résultats stabilité de l'anticorps 48h p.i. obtenu après comptage de l'iTLC**



**Figure 53 : Stabilité de l'anticorps dans le plasma xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 48 h p.i.** Le panel du haut représente le schéma de l'expérience conduite pour valider la stabilité plasmatique de l'anticorps *via* une chromatographie sur couche mince après prélèvement sanguin et dissociation du plasma. Le panel du bas représente les résultats de la stabilité plasmatique de l'anticorps à 48 h p.i. validés par iTLC. Les données sont présentées sous forme de valeur moyenne  $\pm$  écart-type. La comparaison statistique a été effectuée avec le test t de Student bilatéral apparié (\*\*\*) ;  $p < 0,001$  ;  $n=4$  souris ; DPM : nombre de désintégration par minute.

Outre l'accumulation tumorale de l'anticorps radiomarqué, l'immunoTEP permet d'accéder au profil de biositribution de l'anticorps au sein de l'organisme entier. Dans le cadre de cette étude, l'évaluation du profil de biodistribution de l'anticorps [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 n'a pas été envisagée, celle-ci ayant déjà été réalisée pour l'anticorps [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63. Aussi, l'accumulation de l'anticorps au sein des différents organes n'a pas été quantifiée. Cependant, à titre d'exemple, une image du corps entier d'une souris de chaque groupe est présentée dans la **Figure 54**. En ce qui concerne son processus d'élimination,

l'anticorps [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 semble majoritairement excrété par la voie hépatobiliaire, ce qui est en accord avec les données de la littérature. Il est à noter que l'anticorps est aussi retrouvé au niveau des ganglions. Ce phénomène est particulièrement observé sur des coupes axiales volontairement sélectionnées afin de mettre en évidence le signal accumulé dans les ganglions. L'anticorps étant chimérique, il est composé de régions constantes humaines. Il est donc possible que celui-ci soit pris en charge par les cellules du système immunitaire, tels que des lymphocytes B, qui l'acheminent ainsi au niveau du système lymphatique et donc des ganglions. Le fluorochrome ainsi que la plateforme MOMIP peuvent également être la cause d'une interaction avec le système immunitaire et donc une explication probable de la présence de l'anticorps radiomarqué au niveau ganglionnaire.



**Figure 54 : Biodistribution de l'anticorps xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 48 h p.i.** Les souris ont été imagées par TEP à 48 h p.i.. Les images ont été traitées et l'accumulation de l'anticorps radiomarqué dans les organes est exprimée en % DI.cm<sup>-3</sup>(échelle : de 0 à 10 % DI.cm<sup>-3</sup>) Seules les images sagittale et axiale sont présentées.

Pour conclure, l'immunoTEP a permis l'accès à des informations essentielles quant à la distribution de l'anticorps dans l'organisme ainsi que sur son efficacité diagnostique. Cette approche permettrait, à terme, une amélioration de la prise en charge du patient au travers un

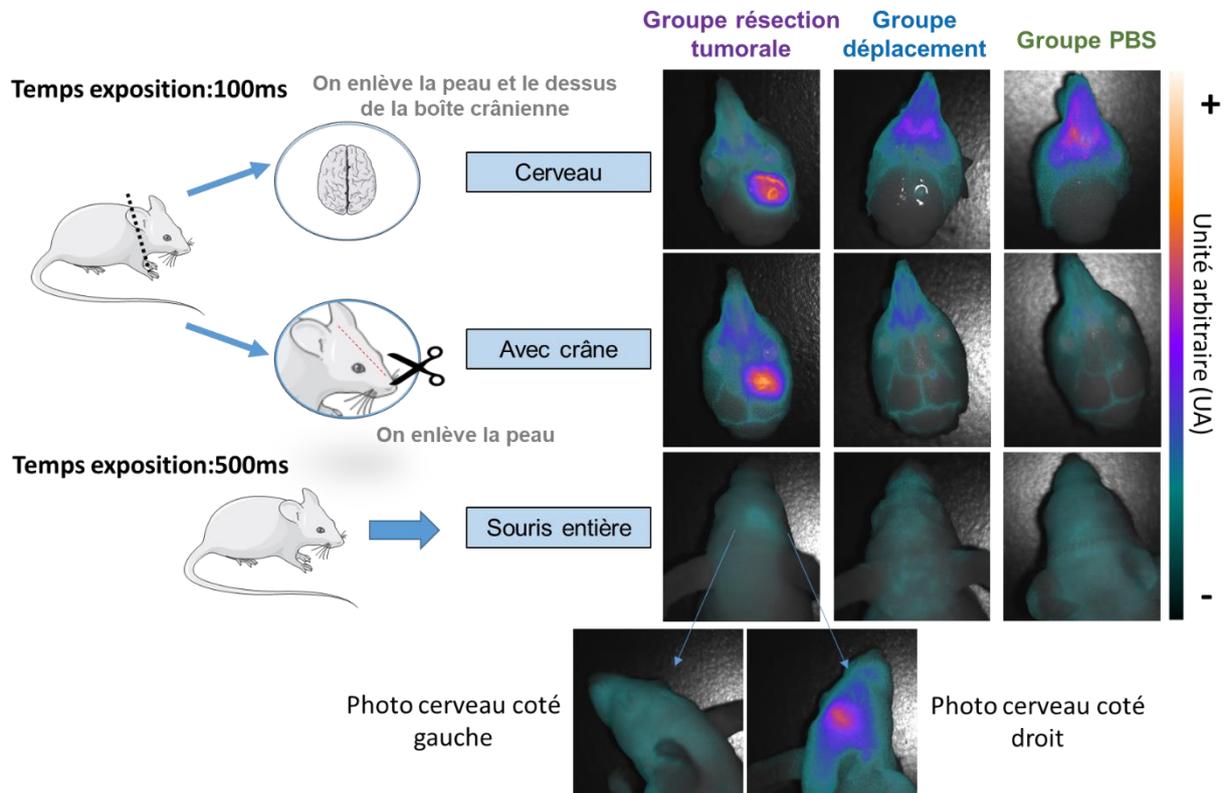
diagnostic personnalisé des tumeurs ET<sub>A</sub><sup>+</sup>. Néanmoins, il est à noter que l'anticorps dans cette configuration ne constitue pas un outil thérapeutique visant l'éradication de la masse tumorale mais seulement un agent d'imagerie à visée diagnostique.

### Traitement des images *in vivo* du GBM prédéfini par la fluorescence

La première approche thérapeutique envisageable lorsqu'un GBM est suspecté suite aux résultats de l'IRM est la chirurgie pour l'exérèse de la tumeur. Souvent cruciale pour le pronostic du patient, elle peut s'avérer extrêmement efficace. Malheureusement, dans le cadre du glioblastome, il est parfois extrêmement difficile de distinguer les zones tumorales des zones saines. Dès lors, la chirurgie guidée par fluorescence permet au chirurgien une assistance à la délimitation entre le tissu tumoral et le tissu sain pour (i) optimiser l'élimination des cellules tumorales et (ii) éviter au mieux de résectionner le tissu sain environnant avec les risques cognitifs associés.

La détection d'un GBM ET<sub>A</sub><sup>+</sup> par TEP ainsi qu'une chirurgie guidée par fluorescence, 48 h post-injection, ont été réalisées grâce au [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800. La **Figure 55** présente les résultats d'imageries fluorescentes obtenues à différents moments de l'intervention chirurgicale. Tout d'abord, une image appelée « souris entière » de la tête de la souris et comprenant la peau, le crâne et le cerveau a été prise. Comme observée sur la figure, aucune fluorescence apparente, au niveau cortex cérébral, est détectée pour les souris du « groupe de déplacement » ou pour les souris du « groupe contrôle » (PBS). Pour le « groupe de résection tumorale », une masse légèrement fluorescente apparaît. Dès lors, une image de la souris retournée du côté de la tumeur et du côté controlatéral sain a été acquise. Ces résultats ont mis en lumière une différence de fluorescence conséquente, observable à l'œil nu. La tumeur est clairement visualisable à travers le crâne et la peau, même si le signal diffus semble atténué par l'épaisseur de la peau de la souris. Par la suite, une image appelée « avec crâne » comprenant le crâne et le cerveau de la souris a également été prise. Cette fois-ci, le signal fluorescent du « groupe de résection tumorale » est intense et permet de distinguer clairement le contour de la tumeur. Aucune fluorescence apparente n'a été observée chez le « groupe de déplacement » ni chez le « groupe contrôle » (PBS). Enfin, la dernière étape chirurgicale a consisté à ôter la boîte crânienne supérieure. Ces images appelées « cerveau » présentent des résultats similaires à ceux observés avec les images « avec crâne ». En effet, les « groupe de déplacement » et « groupe contrôle » (PBS) n'émettent presque aucun signal de fluorescence. À l'inverse, chez le « groupe de résection tumorale », la tumeur est parfaitement délimitée sur

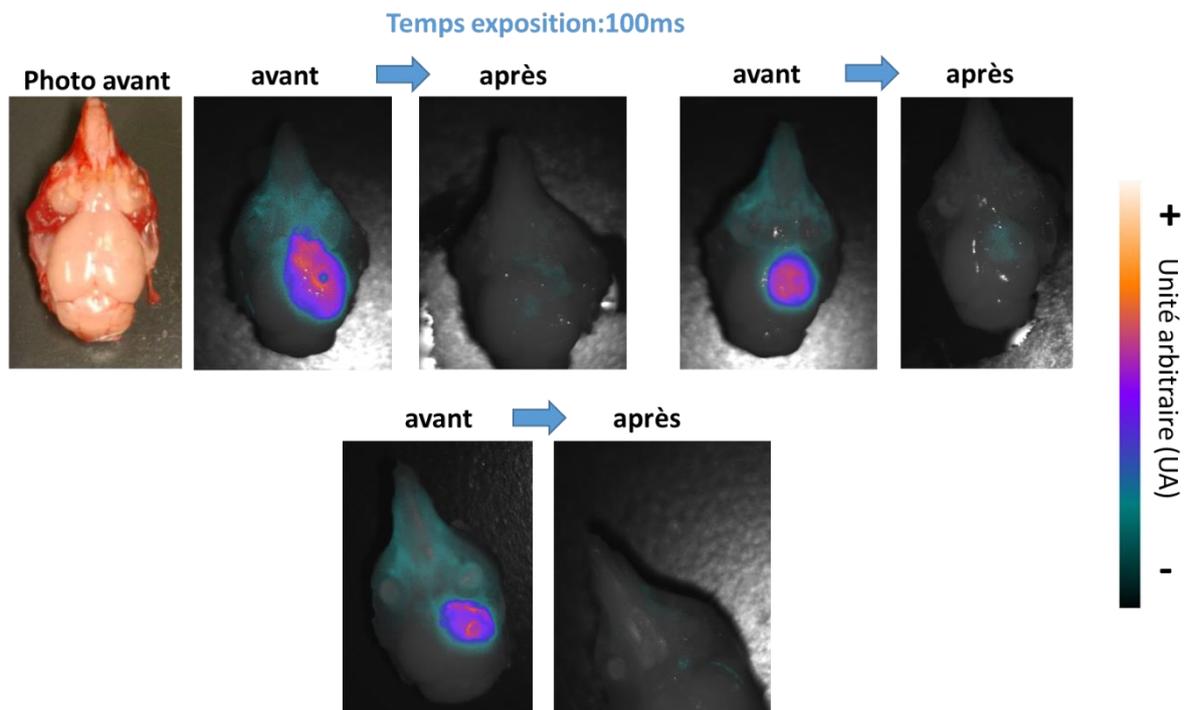
les images dites « cerveau », validant, dès lors, le potentiel de cet anticorps dans le cadre de l'exérèse tumorale.



**Figure 55 : Exemples d'images fluorescentes des trois groupes de souris obtenues post mortem lors des différentes étapes de chirurgie à 48 h p.i. du  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800}$ .** Trois temps de chirurgie ont été imagés à l'aide de l'appareil KIS 800. Le premier, appelé « souris entière » comprend une image de la tête de la souris avec la peau, le crâne et le cerveau. Un temps d'exposition de 500 ms a été nécessaire pour l'obtention de ces images. Ensuite une image de la tête de la souris ne comportant plus que le crâne et le cerveau appelée « avec crâne » a été effectuée sur les trois groupes de souris. Enfin, après suppression de la boîte crânienne supérieure, une image appelée « cerveau » a été prise. Les deux dernières conditions ont nécessité un temps d'exposition de 100ms.

Au vu de ces résultats très encourageants, il a été décidé de réaliser l'ablation du GBM humain guidée par fluorescence chez ce modèle préclinique *post mortem*. La **Figure 56**, présente les expériences d'ablation tumorale guidée par fluorescence qui ont été réalisées. Deux images représentatives sont montrées : une image prise avant et une image post-chirurgie. La différence de fluorescence entre ces deux images est intense et homogène au sein du groupe, mettant en évidence une résection presque complète de la masse tumorale. Cette expérience a ainsi permis la validation de la faisabilité de la résection tumorale guidée par fluorescence sur

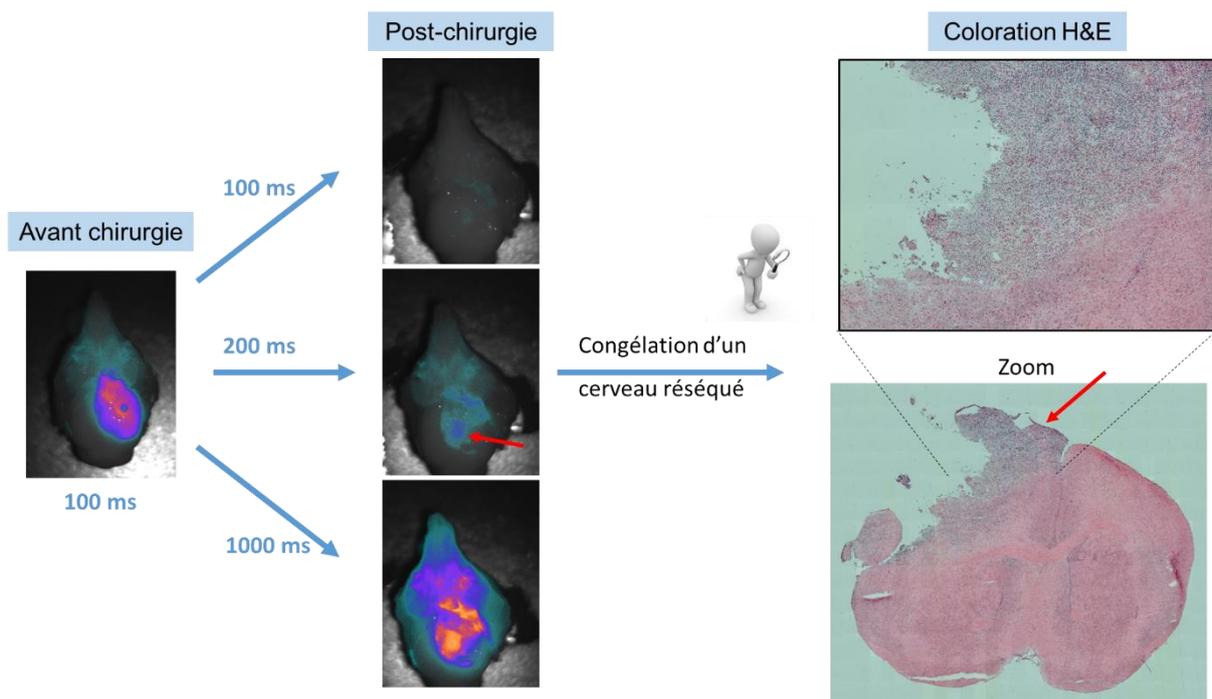
un modèle préclinique de CSG-Gli7 humain *via* l'anticorps [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800. Une photographie du cerveau avant résection a également été prise montrant ce que le chirurgien visualise en l'absence de fluorescence (**Figure 56**). Sur cette photographie, la distinction entre le tissu tumoral et le tissu sain s'avère très difficile à l'œil nu soulignant l'intérêt d'assister le geste chirurgical par un guidage fluorescent.



**Figure 56 : Images des cerveaux de souris avant et après ablation tumorale guidée par fluorescence obtenues à l'aide de l'appareil KIS800 de Kaer Labs.**

L'ablation tumorale a été réalisée avec succès pour chacune des souris. Néanmoins un signal résiduel de fluorescence persistait, synonyme d'un reste de cellules tumorales au niveau de l'os ou de régions difficilement résécables du cerveau. Dès lors, pour confirmer la présence de ce signal résiduel, un des cerveaux réséqués a été sélectionné pour mieux étudier ce phénomène. Des images plus fines ont été obtenues *via* une augmentation du temps d'exposition du laser dans le but d'améliorer l'intensité du signal. Les résultats obtenus, présentés en **Figure 57**, confirment la présence d'un signal fluorescent résiduel conséquent lorsque le temps d'exposition passe à 200 ms. Ce dernier semble encore être localisé au niveau du tissu tumoral alors qu'un temps d'exposition de 1000 ms semble être trop puissant et augmente considérablement le bruit de fond. Aussi, pour valider la qualité de la résection tumorale et

déterminer si la présence de cette fluorescence est due à l'existence de cellules tumorales résiduelles et non à un signal non spécifique, le cerveau réséqué puis congelé a été coupé au niveau de la tumeur à l'aide d'un microtome. Après résection, les coupes coronales ont été soumises à une coloration H&E et les résultats sont présentés en **Figure 57**. Cette étape de coloration a permis de confirmer la persistance de cellules tumorales après résection et de corrélérer ce signal à celui observé par fluorescence.



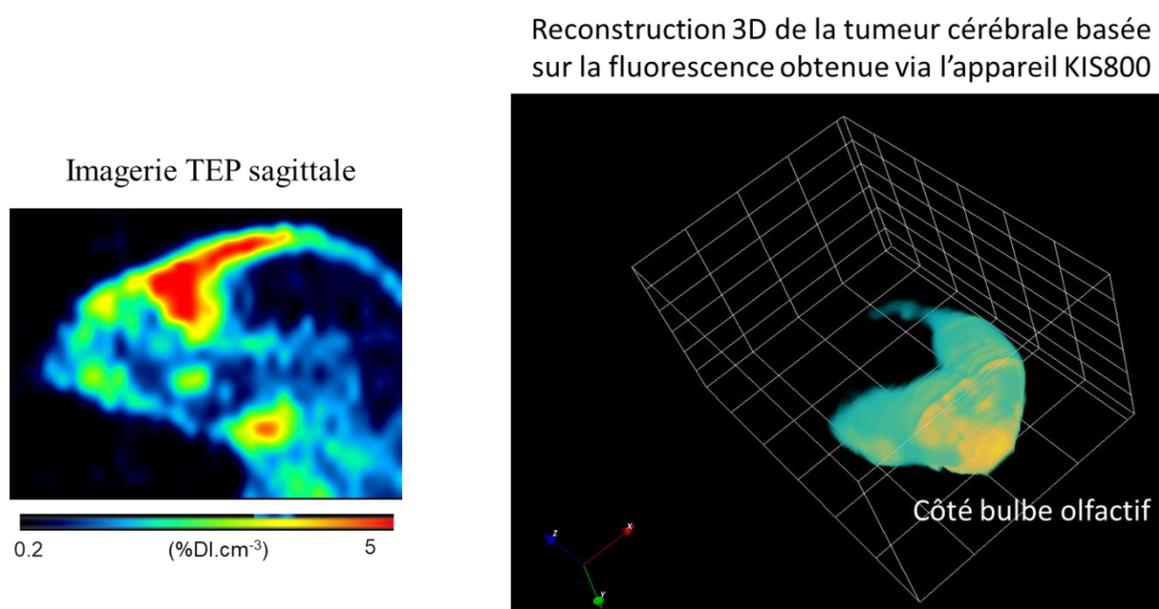
**Figure 57 : Résidus fluorescents de la tumeur imagés par l'appareil KIS800 à 100 ms, 200 ms et 1000 ms et coloration H&E de coupe de cerveaux correspondants à ces résidus.**

Pour conclure, la fluorescence émise par l'anticorps [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 a permis de réaliser, d'une part, une imagerie pré-opératoire et, d'autre part, la résection guidée par fluorescence d'un GBM humain.

L'anticorps ainsi conçu porte une sonde bimodale permettant la conjugaison d'un radioélément émetteur de positon et d'un fluorophore. La co-localisation des signaux issus des deux modalités d'imagerie a par la suite été investiguée.

### Co-localisation du signal de fluorescence et de radioactivité

Après la chirurgie, plusieurs examens *ex vivo* ont été réalisés. Afin de montrer la corrélation entre les deux modalités d'imagerie, un cerveau du « groupe de résection tumorale » n'a pas été réséqué et a directement été congelé. Par la suite, ce cerveau a été entièrement coupé au cryostat. Chaque coupe a été imagée avec l'appareil KIS800 permettant l'obtention d'une reconstruction 3D du signal fluorescent émis dans l'entièreté du cerveau (**Figure 58**). Le signal obtenu par immunoTEP (axe sagittal) et le signal fluorescent du cerveau total reconstruit en 3D ont été comparés et possèdent une géométrie ainsi qu'un profil similaire.



**Figure 58** : Comparaison du signal obtenu par immunoTEP et du signal fluorescent reconstruit en 3D représentant la tumeur cérébrale.

Afin de définitivement corréler ces signaux, des coupes pré-imaginées par l'appareil KIS800 ont également été sélectionnées et soumises à une autoradiographie. Dans l'optique de valider l'homogénéité du signal sur l'ensemble de la tumeur, les coupes ont été réparties sur l'intégralité de la masse tumorale. Comme observé dans la **Figure 59** présentant les résultats, le signal obtenu par autoradiographie est géographiquement identique à celui obtenu par fluorescence. Cette expérience a permis de mettre en évidence la co-localisation du signal fluorescent avec le signal radioactif.

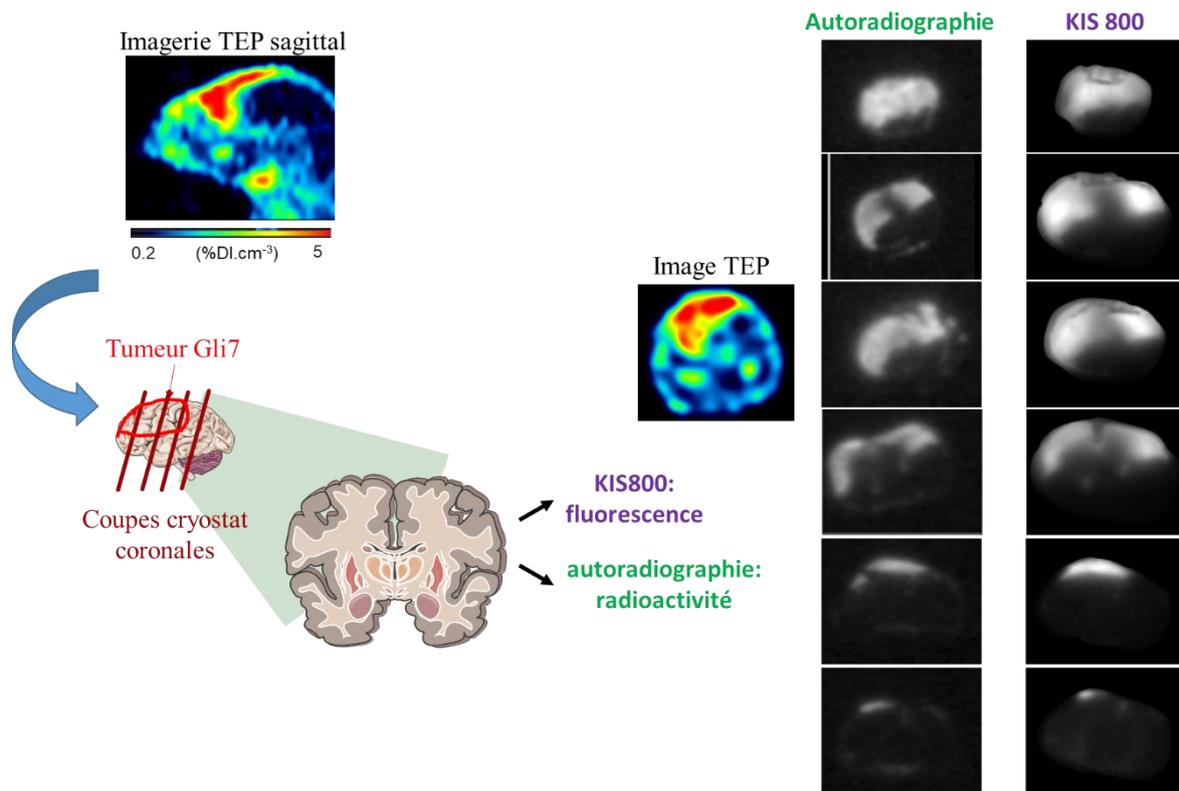


Figure 59 : Comparaison du signal obtenu par autoradiographie et du signal fluorescent sur des coupes de tumeur cérébrale.

### 3) Discussion et perspectives

La première partie des résultats présentés au cours de ce chapitre a permis la validation *in vivo* de la faisabilité de la résection de tumeurs sous-cutanées guidée par fluorescence à l'aide des anticorps xiRA63-MOMIP-IR800 et xiRB49-MOMIP-IR800. Ce dernier a présenté un meilleur ratio tumeur/muscle dans le cas des tumeurs CHO-ET<sub>B</sub> (ratio tumeur/muscle 48 h p.i.=  $6,8 \pm 1,2$ ) que le xiRA63-MOMIP-IR800 dans le cas des tumeurs CHO-ET<sub>A</sub> (ratio tumeur/muscle 48 h p.i.=  $4,2 \pm 0,8$ ). Il a été observé que les tumeurs CHO-ET<sub>B</sub> étaient plus irriguées par la vascularisation sanguine que les tumeurs CHO-ET<sub>A</sub>. Les anticorps résidant longtemps dans la circulation sanguine, si la perfusion sanguine des tumeurs est différente, la comparaison des deux systèmes n'est alors plus possible, l'irrigation de la tumeur jouant un rôle prépondérant dans l'accumulation de l'anticorps. Outre l'irrigation des tumeurs, le nombre de récepteurs présents à la surface des cellules n'a pas été quantifié et pourrait constituer un facteur déterminant. Il est donc possible que les tumeurs CHO-ET<sub>B</sub> expriment davantage de récepteurs ET<sub>B</sub> que les cellules CHO-ET<sub>A</sub> et le récepteur ET<sub>A</sub>.

Néanmoins, la quantification relative de la fluorescence du ratio tumeur/muscle a permis de mettre en évidence une différence significative observée entre le signal obtenu sur les tumeurs témoins positives, CHO-ET<sub>A</sub> (ratio de 4) ou CHO-ET<sub>B</sub> (ratio de 8), et celui des tumeurs négatives, CHO-WT mettant en évidence la spécificité d'action des anticorps utilisés. Cette expérience a également permis de valider le haut potentiel et la pertinence de l'emploi des anticorps xiRA63-MOMIP-IR800 et xiRB49-MOMIP-IR800 dans le cadre de la résection de tumeurs à l'aide de la fluorescence. Ainsi, l'anticorps xiRA63-MOMIP-IR800 a été utilisé pour réaliser l'ablation d'un glioblastome humain guidée par fluorescence dans un modèle préclinique orthotopique Gli7 avec une imagerie pré-opératoire médiée par immunoTEP.

Les principales caractéristiques pour l'obtention d'une molécule fluorescente optimale et adaptée dans l'assistance au geste chirurgical sont (i) une sensibilité et une spécificité élevées, et (ii) un ratio tumeur/ bruit de fond élevé. Aussi, pour obtenir la meilleure intensité de signal fluorescent possible, l'anticorps xiRA63 a été muté N297Q. La glutamine a été introduite afin d'augmenter son DOL de MOMIP (xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800-DOL3). Outre la fluorescence, la maîtrise de la dose de zirconium chélatée sur le lot d'anticorps conjugué a été capitale afin d'éviter une surexposition non nécessaire aux souris traitées. À l'avenir, une étude dosimétrique visant à définir en détails les doses absorbées par les tissus et les potentiels risques de radiotoxicité associés à l'injection du radioligand devra être réalisée.

Dans l'étude présentée en seconde partie, l'anticorps xiRA63-N297Q résultant de la conjugaison du MOMIP et de la radioconjugaison au Zirconium 89 est appelé : [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800. Cet anticorps a permis l'ablation du GBM guidée par fluorescence. La tumeur étant peu visible à l'œil nu, la fluorescence a contribué à une résection presque totale de la tumeur. Le signal fluorescent émis par [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 a, en effet, permis une délimitation exacte de la tumeur, facilitant grandement le geste chirurgical. Néanmoins, la résection tumorale n'a pas été totale. En effet, un signal fluorescent résiduel après ablation de la tumeur a été observé. Afin d'investiguer la présence de cellules tumorales justifiant de cette émission résiduelle, après chirurgie, un des cerveaux a été conservé afin d'estimer le degré de résection et corrélérer l'existence du signal résiduel avec la présence de cellules tumorales par coloration H&E. Comme présenté dans les résultats, il semble bien y avoir une corrélation entre le signal de fluorescence résiduel post-chirurgie et la présence de cellules tumorales au niveau cérébral. Afin d'optimiser cette technique de chirurgie, il serait nécessaire de réaliser une première résection avec un temps d'exposition du laser de 100 ms, puis, dans un second temps, d'utiliser un temps d'exposition de 200 ms pour affiner cette résection tumorale.

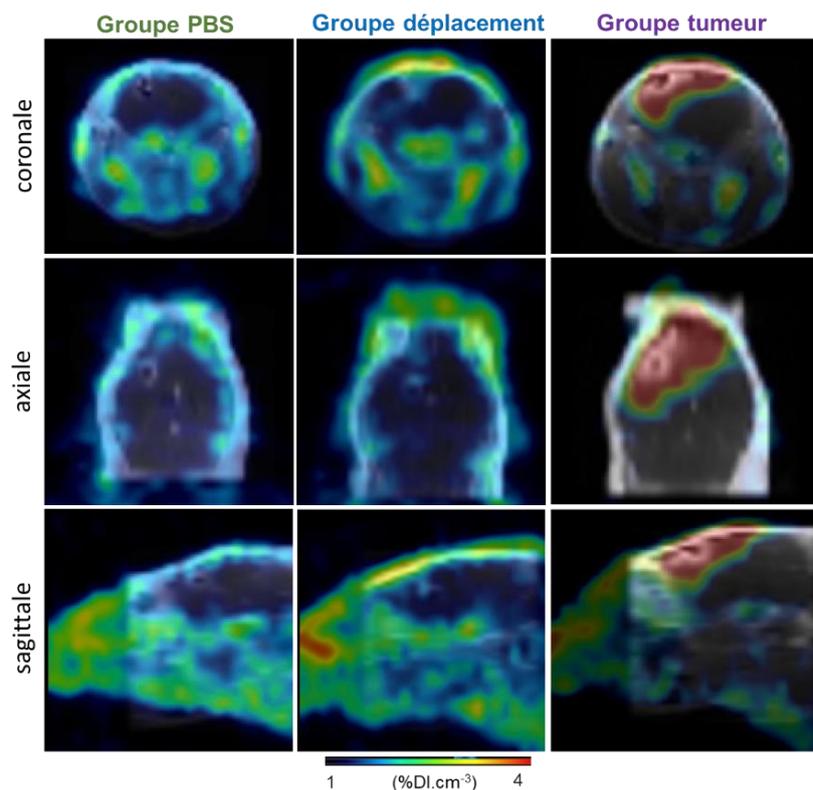
Il est à noter que, de manière inattendue, un signal fluorescent permettant la visualisation de la masse tumorale au travers la boîte crânienne et la peau a pu être observé lors de ces expériences. Ce résultat souligne l'intérêt de l'utilisation de fluorochrome émettant dans le domaine du proche infrarouge qui permet une pénétration en profondeur des tissus aboutissant à une détection des cellules tumorales à distance. À ce jour, aucun moyen rapide, efficace et peu coûteux ne permet de déterminer si le modèle tumoral Gli7 s'est développé ou non au niveau cérébral. Dès lors, une approche permettant la détection efficace de la tumeur cérébrale apparaîtrait comme un réel avantage et aurait été, à titre d'exemple, d'une grande utilité au cours de cette thèse. Ainsi, le xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 et son potentiel de détection des tumeurs Gli7 permettrait de diagnostiquer rapidement, à un coût modéré, le modèle préclinique orthotopique Gli7.

Une quantification du signal accumulé au niveau de la tumeur a été réalisée grâce à l'immunoTEP sur les différents groupes étudiés (« groupe de résection tumorale », « groupe de déplacement » et « groupe contrôle, PBS »). Cette quantification a permis de mettre en lumière la remarquable spécificité du radioligand pour la tumeur CSG-Gli7 avec une différence significative du signal observée entre les 3 groupes de souris. En effet, 48 h p.i., un signal d'environ 4 %DI.cm<sup>-3</sup> a été observé pour les souris implantées avec les cellules tumorales alors

que seulement 2 %DI.cm<sup>-3</sup> ont été retrouvés pour le « groupe de déplacement » et 1 %DI.cm<sup>-3</sup> pour le groupe contrôle (PBS). La région controlatérale du groupe contrôle (PBS) a également été analysée et le signal associé à cette région a été comparé au signal obtenu au niveau du site d'injection du PBS. Il est à noter qu'aucune différence significative n'a été observée. Ces résultats attendus démontrent l'absence de phénomène inflammatoire au niveau du point d'injection et confirment la spécificité du signal de l'anticorps radiomarqué. Enfin, le « groupe de déplacement » a permis de mettre en évidence la spécificité d'interaction de l'anticorps radiomarqué avec le récepteur ET<sub>A</sub> exprimé à la surface des CSG.

L'ensemble des résultats *in vivo* et *ex vivo* corrèlent parfaitement entre l'imagerie médiée par immunoTEP ou par fluorescence. Il est à noter que la résection tumorale guidée par fluorescence d'une des souris du « groupe de résection tumorale » n'a pas été réalisable. Celle-ci ne présentait aucune tumeur apparente par IRM. Toutefois, 48 h après injection du [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800, une quantification du signal émis par l'anticorps radiomarqué a pu être réalisée par immunoTEP chez cette souris. Ce résultat met en avant la haute sensibilité de l'imagerie TEP et l'intérêt de cette technique d'imagerie dans la détection de tumeurs peu développées tout de même éligibles à une chirurgie « classique ».

Ces expériences ont aussi permis de comparer l'intensité du signal lié à la tumeur observée par imagerie par TEP et par IRM. La **Figure 60** présente un exemple pour une souris de chaque groupe de la superposition des images obtenues par TEP et IRM. Dans un premier temps, une différence significative du volume tumoral est observable entre ces deux modalités d'imagerie. Ce phénomène peut être dû soit à un développement de la tumeur conséquent durant les 15 jours de latence entre les deux séances d'imagerie soit et/ou à un passage de la BHE plus important dans le cas de l'anticorps [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800, comparativement au DOTAREM. Il est important de notifier que l'anticorps [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 présente à sa surface le fluorochrome IRDye800CW qui constitue une molécule hydrophobe. Dès lors, la conjugaison du fluorochrome hydrophobe à la surface de l'anticorps a peut-être favorisé le passage de la BHE. Une étude approfondie concernant le passage de l'anticorps à travers un modèle *in vitro* et artificiel de BHE humaine est en cours de réalisation<sup>303</sup>. Ces futures expériences fourniront des indications précieuses concernant le comportement de l'anticorps mais aussi une réponse préliminaire concernant cette différence de signal observée par TEP et IRM.



**Figure 60 : Exemple pour une souris de chaque groupe de l'imagerie IRM et TEP superposées.** Les souris appartenant au « groupe de déplacement » et « de résection tumorale » ont été implantées avec des CSG-Gli7-ET<sub>A</sub><sup>+</sup> alors que les souris du groupe contrôle (PBS) ont été implantées avec du PBS. Les IRM ont été obtenus 61 jours post-implantation. Toutes les souris se sont été injectées avec le même bolus intraveineux de xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 79 jours après implantation. Les images TEP ont été obtenues 48 h p.i. du radioligand. %DI.cm<sup>-3</sup> : Pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu.

Pour conclure, l'anticorps [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 a permis la résection d'un GBM humain par guidage fluorescent dans un modèle préclinique murin. L'imagerie pré-opérative obtenue par TEP a permis la quantification du signal intra-tumoral et la validation de la spécificité du radioligand pour ET<sub>A</sub> (présent à la surface des CSG). Aussi cet immunoconjugué innovant permettrait (i) l'assistance au geste chirurgical médiée par fluorescence, (ii) l'imagerie pré-opérative facilitant la stratification des patients éligibles à ce type de traitement.

---

## Conclusion Générale

---

## Conclusion Générale

## Conclusion Générale

Le développement d'anticorps reconnaissant spécifiquement les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) par des approches *in vivo* ou *in vitro* est un véritable défi. Cette famille de protéines membranaires est responsable de 60 % des communications cellulaires. Leurs dérégulations sont associées à de nombreuses pathologies justifiant que 30% des molécules de la pharmacopée ciblent des RCPG <sup>269</sup>. A ce jour, seul deux anticorps ciblant les RCPG sont autorisés sur le marché du médicament <sup>270,271</sup>. L'expertise des équipes du CEA dans la conception d'anticorps monoclonaux par immunisation génique a été appliquée pour les Récepteurs des endothélines de type A ou B <sup>275</sup>. Cette approche *in vivo* a permis l'obtention d'anticorps dirigés contre une conformation native des Récepteurs des endothélines. Dans une stratégie thérapeutique et diagnostique pour traiter les tumeurs ET<sub>A</sub><sup>+</sup> et ET<sub>B</sub><sup>+</sup>, deux anticorps ont été brevetés : le rendomab A63 et B49. Comme décrit dans ce manuscrit, l'axe endothéline est moteur dans la progression tumorale de certains cancers comme le mélanome et le glioblastome justifiant de nombreux essais cliniques utilisant des antagonistes des Récepteurs des endothélines <sup>154,218</sup>. Nos travaux antérieurs avaient montré le ciblage de cellules souches humaines de glioblastome par RA63 et de lignées de mélanome par RB49 <sup>273</sup>. Ces modèles tumoraux ont été mis en œuvre pendant ma thèse.

Dans ce contexte, les chimérisations du rendomab A63 et B49, les xiRA63 et xiRB49, a été la première étape déterminante de ma thèse. Le premier article présenté dans le chapitre I décrit la chimérisation du RB49, le xiRB49, qui de manière inattendue, génère une conformation non fonctionnelle du fait de la présence de la proline en position 125 (P125). A l'inverse, la chimérisation du RA63 n'a posé aucun problème, le xiRA63 conservant toutes les caractéristiques de l'anticorps murin. L'analyse *in silico* suggère un changement conformationnel du xiRB49 induisant un contact prolongé des CDR3 de la chaîne lourde et légère, les rendant indisponibles pour une interaction avec ET<sub>B</sub>. La fonctionnalité de xiRB49 a été rétablie par la mutation de la P125 en une thréonine canonique (P125T). Ces données montrent le repliement protéique particulier du xiRB49, également souligné par des résultats complémentaires, non publiés dans l'article portant sur le ThioFab-xiRB49-P125T, prouvant une conformation particulière de son domaine constant Kappa. Ces résultats, exemplifiant la relation étroite entre la structure et la fonction de cet anticorps, sont essentiels dans une stratégie d'humanisation du xiRB49 pour conserver ses caractéristiques fonctionnelles de reconnaissance ET<sub>B</sub>.

Dans le second chapitre des résultats, l'efficacité antitumorale du xiRB49-P125T couplée à une molécule cytotoxique a été évaluée dans un modèle préclinique de mélanome et consigné

## Conclusion Générale

dans un second article. L'anticorps chimérique xiRB49 a été conjugué au Monométhyl Auristatine E (xiRB49-MMAE), et bloque très efficacement la progression du mélanome. Au-delà de son haut potentiel thérapeutique, l'étude par IHC des biopsies de ganglions lymphatiques de patients montre un très fort marquage des cellules tumorales par le RB49. En revanche, aucun marquage des tissus sains n'a été observé confortant notre l'hypothèse que le RB49 reconnaît une conformation particulière de ET<sub>B</sub> « activée » par ET-1. En effet, les travaux de cristallisation d'ET<sub>B</sub> du Dr. Shihoya *et al.* 2016<sup>45</sup> indiquent que, dans son état inactif, la région N-terminale du récepteur est enfouie dans une poche formée par les 7 domaines TM de ET<sub>B</sub>. Après fixation de l'ET-1, la région N-terminale de ET<sub>B</sub>, comprenant l'épitope du RB49, se retrouve exposée au milieu extracellulaire permettant la fixation de l'anticorps. Le microenvironnement tumoral étant riche en ET-1, la forme « active » de l'ET<sub>B</sub> est majoritaire au niveau des cellules tumorales. La co-cristallisation du récepteur avec l'anticorps validerait cette hypothèse. Les résultats présentés dans ce manuscrit sur l'utilisation du xiRB49 en tant qu'agent thérapeutique de type ADC seront prochainement publiés.

Un enjeu majeur de la médecine de précision réside dans la stratification des patients éligible à une immunothérapie<sup>182</sup>. L'imagerie moléculaire *in vivo*, thème du chapitre III de mon manuscrit, est une approche prometteuse pour cette problématique. Il décrit la modification du xiRA63 pour son utilisation en imagerie TEP compatible pour une stratification de patients atteints de GBM ET<sub>A</sub><sup>+</sup>. L'évaluation de la pharmacocinétique et de la biodistribution du xiRA63 et du ThioFab-xiRA63 radiomarqués au zirconium 89 par immunoTEP ont fait l'objet d'un troisième article soumis dans EJNM. De façon inattendue, l'absorption tumorale du [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 a été meilleure à celle du [<sup>89</sup>Zr]Zr-ThioFab-xiRA63. Cette étude a permis de souligner le fort potentiel du [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 pour le marquage des glioblastomes ET<sub>A</sub><sup>+</sup>, ouvrant ainsi des possibilités de stratification des patients par immunoTEP. Ces résultats ont mis en lumière que la Barrière Tumorale Cérébrale permettait un franchissement important de l'anticorps entier dans le parenchyme cérébral, qui, en condition physiologique, ne devrait pas traverser la BHE. Toutefois, le comportement de franchissement de l'anticorps xiRA63 au travers la BHE physiologique humaine reste à explorer. Afin de déterminer le profil de passage des anticorps xiRA63 et xiRB49 et de leurs fragments au travers de la BHE, un modèle *in vitro* de BHE de cellules humaines iPSCs (*induced pluripotent stem cells*) est disponible au CEA<sup>303</sup>. Ces futures expériences fourniront des indications précieuses concernant le xiRA63 et le xiRB49 pour leur future utilisation en clinique.

## Conclusion Générale

Généralement, la chirurgie est un geste thérapeutique usuel suite à la détection d'une tumeur<sup>304,305</sup>. Dans le cas du glioblastome, il est souvent difficile d'atteindre le stade d'une « résection complète » du fait de la difficulté à délimiter les zones tumorales des zones saines et de la forte infiltration de la tumeur dans le parenchyme cérébral<sup>306</sup>. Dans ce contexte, la chirurgie guidée par fluorescence peut permettre une meilleure délimitation des marges du tissu tumoral facilitant son exérèse tout en préservant le tissu sain. Fort des précédents résultats positifs, le xiRA63 a été modifié pour permettre une imagerie bimodale théranostique pour (i) diagnostiquer et stratifier les modèles précliniques GBM ET<sub>A</sub><sup>+</sup> par imagerie TEP, (ii) assister, sous fluorescence, le geste chirurgical dans l'exérèse de la masse tumorale. La structure chimique permettant la conjugaison entre l'anticorps, le fluorochrome et le radioélément, est appelée MOMIP<sup>317</sup>. Elle a permis de contrôler précisément le rapport chélateur/fluorochrome qui a été conjugué à l'anticorps de façon site spécifique en n'impactant pas la fonctionnalité de l'anticorps. Cette approche assure une grande homogénéité et reproductibilité des différents lots de [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 ainsi conjugué. Ce nouveau traceur d'imagerie a permis de délimiter parfaitement la tumeur et de réaliser l'ablation guidée par fluorescence du GBM. Outre la quantification, l'imagerie TEP a permis de mettre en lumière la remarquable spécificité de ce traceur pour ET<sub>A</sub> exprimé à la surface des cellules tumorales CSG-Gli7 à l'aide de différents groupes contrôles de souris. Par la suite, la corrélation du signal observé par immunoTEP et par fluorescence a été mise en évidence grâce à des études *ex vivo*. Cette corrélation souligne bien la faisabilité d'une stratification médiée par immunoTEP afin d'identifier les patients éligibles à l'assistance au geste chirurgical médiée par fluorescence. Ces résultats feront l'objet d'une quatrième publication. Toutefois, il sera important de déterminer le seuil de détection minimum de fluorescence visualisable grâce au laser et de le comparer au signal obtenu par TEP. En effet, un signal faible obtenu par TEP, qui est une modalité d'imagerie hautement sensible, pouvant être causé par une tumeur peu développée, pourrait ne pas être perceptible par fluorescence. Le seuil de fluorescence minimum détectable est alors à déterminer afin d'éviter de déduire une stratification faussement positive pour l'éligibilité des patients à la chirurgie guidée par fluorescence.

Enfin, une étude ultérieure sera nécessaire pour investiguer les sites de reconnaissance du xiRA63 chez l'homme. En effet, le xiRA63 reconnaît le récepteur ET<sub>A</sub> humain mais pas le récepteur murin. Afin de déterminer le profil de biodistribution du xiRA63, il serait intéressant d'injecter une faible dose de [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63 chez un primate non humain dont les récepteurs sont identiques. Cette étude non invasive médiée par immunoTEP permettra l'obtention

## Conclusion Générale

d'informations précieuses sur la localisation des récepteurs ET<sub>A</sub> reconnus par l'anticorps. Au niveau cérébral, il serait attendu qu'aucun signal ne soit retrouvé puisque le récepteur ET<sub>B</sub> est majoritairement exprimé par le système nerveux central.

Pour conclure, nous avons développé les anticorps xiRA63 et xiRB49 pour des applications cliniques et diagnostiques innovantes. Cependant, le transfert en clinique de ces approches thérapeutiques ou diagnostiques devra relever de nombreux challenges, en premier lieu celui de la radioprotection. La prise en charge logistique des patients pourra être contraignante tant pour les soignants que pour les patients du fait de la longue demi-vie associée à un anticorps entier <sup>296,320</sup>. Aussi, l'utilisation de format d'anticorps différents, tel que des minibody, alliant un temps de circulation suffisamment long pour pénétrer les tumeurs et une élimination plus rapide qu'un anticorps, associé à un meilleur ratio tumeur/bruit de fond pour l'imagerie immunoTEP pourrait être une stratégie intéressante pour faciliter un passage en clinique pour ces traitements prometteurs <sup>295</sup>.

## Communications scientifiques

---

### I. Communications orales

1. Marie Hautiere, Narciso Costa, Amaury Herbet, Delphine Vivier, Charles Truillet, Franck Denat, Didier Boquet. Engineering an immuno-tracer for medical imaging applications. 8th Antibody Industrial Symposium November 2020, Montpellier, France. Poster.
2. Marie Hautiere, Delphine Vivier, Donovan Pineau, Amaury Herbet, Narciso Costa, Caroline Denis, Dimitri Kereselidze, Anne-Cécile Guyot, Aloïse Mabondzo, Jean Philippe Hugnot, Franck Denat, Charles Truillet, Didier Bouquet. Biodistribution and pharmacokinetic evaluation of different mAb formats, targeting endothelin A receptor-positive glioblastoma stem cells using in vivo immunoPET imaging. 35th Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine on October 15-19, 2022 in Barcelona, Spain. Oral communication & poster.
3. Marie Hautiere, Delphine Vivier, Donovan Pineau, Amaury Herbet, Narciso Costa, Caroline Denis, Dimitri Kereselidze, Anne-Cécile Guyot, Aloïse Mabondzo, Jean Philippe Hugnot, Franck Denat, Charles Truillet, Didier Boquet. Preclinical evaluation of novel <sup>89</sup>Zr-labelled immunoPET tracer targeting the endothelin A receptor in glioblastoma patient-derived orthotopic xenograft model. New Modalities in Cancer Imaging and Therapy". 15th international edition workshop Cancéropole Grand Ouest, 2022 October 5th-8th-Erquy, France. Oral communication.
4. Marie Hautiere, Delphine Vivier, Pierre-Alix Dancer, Donovan Pineau, Dimitri Kereselidze, Amaury Herbet, Narciso Costa, Victor Goncalves, Jean Philippe Hugnot, Didier Boquet, Charles Truillet, Franck Denat. ImmunoPET combined with fluorescence imaging targeting endothelin A receptors in glioblastoma to visualize and guide surgery: an encouraging preclinical proof of concept. World Molecular Imaging Congress (WMIC) 5-9/10/2023 in Prague, République tchèque. Oral communication & poster.
5. JP Hugnot, D Pineau, A Herbet, M Hautiere, D Boquet, V Rigau, L Bauchet, H Duffau Endothelin signaling in diffuse low grade glioma and glioblastomas. Oral communication, 8th AIS Montpellier November 2020, Montpellier, France.
6. The Endothelin signaling pathway in Diffuse Low-Grade and High-Grade Gliomas D PINEAU, A HERBET, M HAUTIERE, D BOQUET, V RIGAU, L BAUCHET, H DUFFAU, JP HUGNOT. 17th Annual Meeting Canceropole Grand Sud Ouest - Carcassonne November 17-19- 2021.

7. The Endothelin signaling pathway in Diffuse Low-Grade and High-Grade Gliomas D PINEAU, A HERBET, M HAUTIERE, D BOQUET, V RIGAU, L BAUCHET, H DUFFAU, JP HUGNOT. European Glia Meeting, Marseille 2021.

8. The role of endothelin signaling pathway in diffuse IDH1 mutant low-grade and high-grade gliomas cell proliferation and fate. Donovan PINEAU, Marie HAUTIERE, Amaury HERBET, Didier BOQUET, Valérie RIGAU, Chantal RIPOLL, Salomé ROUX, Philippe RONDARD, Luc BAUCHET, Hugues DUFFAU, Jean-Philippe HUGNOT. 4th International conference on stem cells, development and Cancer – Lyon, France May 16-17 2022.

9. The role of endothelin signaling pathway in diffuse IDH1 mutant low-grade and high-grade gliomas cell proliferation and fate, Donovan PINEAU, Marie HAUTIERE, Amaury HERBET, Didier BOQUET, Valérie RIGAU, Chantal RIPOLL, Salomé ROUX, Philippe RONDARD, Luc BAUCHET, Hugues DUFFAU, Jean-Philippe HUGNOT. 4th SUNRiSE Meeting-Paris, France June 8-9 2022.

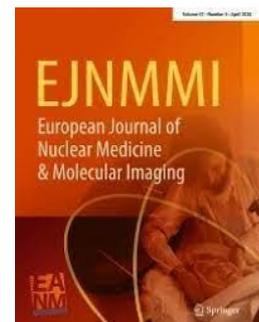
10. The role of endothelin signaling pathway in diffuse IDH1 mutant low-grade and high-grade gliomas cell proliferation and fate. Donovan PINEAU Marie HAUTIERE, Amaury HERBET, Didier BOQUET, Valérie RIGAU, Chantal RIPOLL, Salomé ROUX, Philippe RONDARD, Luc BAUCHET, Hugues DUFFAU, Jean-Philippe HUGNOT. 18th Annual Meeting Canceropole Grand Sud Ouest - La Grande Motte November 30-December 2 2022

## II. Publications

### 1) *Accepté*

#### **ImmunoPET imaging-based pharmacokinetic profiles of an antibody and its Fab targeting endothelin A receptors on glioblastoma stem cells in a preclinical orthotopic model**

Marie Hautiere <sup>1,4</sup>, Delphine Vivier <sup>2</sup>, Donovan Pineau <sup>3</sup>, Caroline Denis <sup>4</sup>, Dimitri Kereselidze <sup>4</sup>, Amaury Herbert <sup>1</sup>, Narciso Costa <sup>1</sup>, Victor Goncalves,<sup>2</sup> Erwan Selingue,<sup>5</sup> Benoit Larrat,<sup>5</sup> Jean Philippe Hugnot <sup>3</sup>, Franck Denat <sup>2</sup>, Didier Boquet <sup>1\*\*</sup>, Charles Truillet <sup>4,\*†</sup>



2) *Soumis*

**A non-conserved proline in the variable region of a chimeric mAb abolishes its functionality but is fully restored by its mutation to threonine. In silico interpretations.**

Marie Hautiere <sup>1†</sup>, Irene Maffucci <sup>2\*†</sup>, Narciso Costa <sup>1</sup>, Amaury Herbet <sup>1</sup>, Sosthene Essonod <sup>3</sup>, Séverine Padiolleau-Lefevre <sup>2</sup>, Didier Boquet <sup>1\*</sup>



3) *En cours de rédaction/finalisation*

**Potent anti-melanoma activity induced by an antibody drug conjugate targeting the allosteric endothelin B receptor**

Marie Hautière<sup>1†</sup>, Amaury Herbet<sup>1†</sup>, Delphine Vivier<sup>2</sup>, Christophe Leboeuf<sup>3</sup>, Frédéric Jean-Alphonse<sup>4</sup>, Narciso Costa<sup>1</sup>, Aloïse Mabondzo<sup>1</sup>, Eric Reiter<sup>4</sup>, Guilhem Bousquet<sup>3</sup> Franck Denat<sup>2</sup> and Didier Boquet<sup>1\*</sup>

***In vivo* proof of concept of fluorescence-guided surgery of a human glioblastoma preoperatively imaging by immunoTEP using the antibody xiRA63**

Marie Hautière<sup>2,3\*</sup>, Delphine Vivier<sup>1\*</sup>, Donovan Pineau<sup>4</sup>, Pierre-Alix Dancer<sup>5</sup>, Amaury Herbet<sup>2</sup>, Jean-Philippe Hugnot<sup>4</sup>, Claire Bernhard<sup>1</sup>, Victor Goncalves<sup>1</sup>, Charles Truillet<sup>3</sup>, Didier Boquet<sup>2</sup>, Franck Denat<sup>1\*</sup>

**Synthesis and preclinical evaluation of dually-labeled antibody conjugates targeting endothelin receptors positive tumors**

Marie Hautière<sup>2,3\*</sup>, Delphine Vivier<sup>1\*</sup>, Donovan Pineau<sup>4</sup>, Pierre-Alix Dancer<sup>5</sup>, Amaury Herbet<sup>2</sup>, Jean-Philippe Hugnot<sup>4</sup>, Claire Bernhard<sup>1</sup>, Victor Goncalves<sup>1</sup>, Charles Truillet<sup>3</sup>, Didier Boquet<sup>2</sup>, Franck Denat<sup>1\*</sup>



---

## Bibliographie

---

1. Hickey, K. A., Rubanyi, G., Paul, R. J. & Highsmith, R. F. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **248**, C550–C556 (1985).
2. Yanagisawa, M. *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411–415 (1988).
3. Barton, M. & Yanagisawa, M. Endothelin: 30 Years From Discovery to Therapy. *Hypertension* **74**, 1232–1265 (2019).
4. Inoue, A. *et al.* The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2863–2867 (1989).
5. Yanagisawa, M. & Masaki, T. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci* **10**, 374–378 (1989).
6. Lättig, J., Oksche, A., Beyermann, M., Rosenthal, W. & Krause, G. Structural determinants for selective recognition of peptide ligands for endothelin receptor subtypes ETA and ETB. *J Pept Sci* **15**, 479–491 (2009).
7. Pinet, F. À quoi sert le système endothéline ? *Med Sci (Paris)* **20**, 339–345 (2004).
8. Stojilkovic, S. S. & Catt, K. J. Expression and Signal Transduction Pathways of Endothelin Receptors in Neuroendocrine Cells. *Frontiers in Neuroendocrinology* **17**, 327–369 (1996).
9. Davenport, A. P. *et al.* Endothelin. *Pharmacol Rev* **68**, 357–418 (2016).
10. Miyachi, T. & Masaki, T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* **61**, 391–415 (1999).
11. Busse, R. & Fleming, I. Vascular endothelium and blood flow. *Handb Exp Pharmacol* 43–78 (2006) doi:10.1007/3-540-36028-x\_2.
12. Keaney, J. & Campbell, M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J* **282**, 4067–4079 (2015).
13. Girard, J. P. & Springer, T. A. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* **16**, 449–457 (1995).
14. Rosanò, L., Spinella, F. & Bagnato, A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* **13**, 637–651 (2013).
15. Zhou, S. *et al.* Epigenetic regulation of melanogenesis. *Ageing Research Reviews* **69**, 101349 (2021).
16. Czubryt, M. P. Going the distance: Epigenetic regulation of endothelial endothelin-1 controls cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **82**, 60–62 (2015).
17. Houde, M., Desbiens, L. & D'Orléans-Juste, P. Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity. *Adv Pharmacol* **77**, 143–175 (2016).
18. Stow, L. R., Jacobs, M. E., Wingo, C. S. & Cain, B. D. Endothelin-1 gene regulation. *The FASEB Journal* **25**, 16–28 (2011).
19. Didier, N. *et al.* Secretion of interleukin-1 $\beta$  by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor- $\alpha$  effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *Journal of Neurochemistry* **86**, 246–254 (2003).

## Bibliographie

20. D'Orléans-Juste, P., Gratton, J. P., Leduc, R., Bkaily, G. & Claing, A. L'endothéline : pharmacologie cardiovasculaire et considérations physio-pathologiques. *Endothelin cardiovascular pharmacology and pathophysiology* (1996) doi:10.4267/10608/785.
21. Barton, M. & Yanagisawa, M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy This article is one of a selection of papers published in the special issue (part 2 of 2) on Forefronts in Endothelin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **86**, 485–498 (2008).
22. Inoue, A. *et al.* The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem* **264**, 14954–14959 (1989).
23. Kashiwabara, T. *et al.* Putative precursors of endothelin have less vasoconstrictor activity in vitro but a potent pressor effect in vivo. *FEBS Letters* **247**, 73–76 (1989).
24. Xu, D. *et al.* ECE-1: A membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* **78**, 473–485 (1994).
25. Emoto, N. & Yanagisawa, M. Endothelin-converting Enzyme-2 Is a Membrane-bound, Phosphoramidon-sensitive Metalloprotease with Acidic pH Optimum (\*). *Journal of Biological Chemistry* **270**, 15262–15268 (1995).
26. Hasegawa, H. *et al.* Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Letters* **428**, 304–308 (1998).
27. Takai, S., Shiota, N., Jin, D. & Miyazaki, M. Chymase processes big-endothelin-2 to endothelin-2-(1–31) that induces contractile responses in the isolated monkey trachea. *European Journal of Pharmacology* **358**, 229–233 (1998).
28. Ozaka, T., Doi, Y., Kayashima, K. & Fujimoto, S. Weibel-Palade bodies as a storage site of calcitonin gene-related peptide and endothelin-1 in blood vessels of the rat carotid body. *The Anatomical Record* **247**, 388–394 (1997).
29. Sirviö, M.-L., Metsärinne, K., Saijonmaa, O. & Fyhrquist, F. Tissue distribution and half-life of 125I-endothelin in the rat: Importance of pulmonary clearance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **167**, 1191–1195 (1990).
30. Vijayaraghavan, J. *et al.* The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase). *J Biol Chem* **265**, 14150–14155 (1990).
31. Pan, X. *et al.* Serine Carboxypeptidase SCPEP1 and Cathepsin A Play Complementary Roles in Regulation of Vasoconstriction via Inactivation of Endothelin-1. *PLOS Genetics* **10**, e1004146 (2014).
32. Dupuis, J., Stewart, D. J., Cernacek, P. & Gosselin, G. Human Pulmonary Circulation Is an Important Site for Both Clearance and Production of Endothelin-1. *Circulation* **94**, 1578–1584 (1996).
33. Ling, L., Maguire, J. J. & Davenport, A. P. Endothelin-2, the forgotten isoform: emerging role in the cardiovascular system, ovarian development, immunology and cancer. *Br J Pharmacol* **168**, 283–295 (2013).
34. Sakurai, T. *et al.* Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* **348**, 732–735 (1990).
35. Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H. & Nakanishi, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **348**, 730–732 (1990).
36. Regard, J. B., Sato, I. T. & Coughlin, S. R. Anatomical Profiling of G Protein-Coupled Receptor Expression. *Cell* **135**, 561–571 (2008).

## Bibliographie

37. Kuc, R. & Davenport, A. P. Comparison of endothelin-A and endothelin-B receptor distribution visualized by radioligand binding versus immunocytochemical localization using subtype selective antisera. *J Cardiovasc Pharmacol* **44 Suppl 1**, S224-226 (2004).
38. Clouthier, D. E. *et al.* Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* **125**, 813–824 (1998).
39. Kurihara, H., Kurihara, Y., Nagai, R. & Yazaki, Y. Endothelin and neural crest development. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **45**, 639–651 (1999).
40. Bockaert, J. [G-protein-coupled receptors: general features and activation mechanisms]. *Bull Acad Natl Med* **196**, 1765–1775 (2012).
41. Kooistra, A. J. *et al.* GPCRdb in 2021: integrating GPCR sequence, structure and function. *Nucleic Acids Research* **49**, D335–D343 (2021).
42. Latorraca, N. R., Venkatakrisnan, A. J. & Dror, R. O. GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chem. Rev.* **117**, 139–155 (2017).
43. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Crystal structure of the human  $\beta$ 2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383–387 (2007).
44. Bockaert, J. Les récepteurs couplés aux protéines G - Prix Nobel de chimie 2012 Robert J. Lefkowitz et Brian Kobilka. *Med Sci (Paris)* **28**, 1133–1137 (2012).
45. Shihoya, W. *et al.* Activation mechanism of endothelin ETB receptor by endothelin-1. *Nature* **537**, 363–368 (2016).
46. Bkaily, G., Al-Khoury, J. & Jacques, D. Nuclear membranes GPCRs: implication in cardiovascular health and diseases. *Curr Vasc Pharmacol* **12**, 215–222 (2014).
47. Bkaily, G. *et al.* Nuclear membrane receptors for ET-1 in cardiovascular function. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **300**, R251–R263 (2011).
48. Jules, F. *et al.* Nuclear Membranes ETB Receptors Mediate ET-1–induced Increase of Nuclear Calcium in Human Left Ventricular Endocardial Endothelial Cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **66**, 50 (2015).
49. Bkaily, G. *et al.* Presence of Functional Endothelin-1 Receptors in Nuclear Membranes of Human Aortic Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **36**, S414 (2000).
50. Aubin, J., Létourneau, M., Francoeur, E., Burgeon, E. & Fournier, A. Identification of ETA and ETB binding domains using ET-derived photoprobes. *Biochimie* **90**, 918–929 (2008).
51. Breu, V. *et al.* Separable binding sites for the natural agonist endothelin-1 and the non-peptide antagonist bosentan on human endothelin-A receptors. *Eur J Biochem* **231**, 266–270 (1995).
52. Zhang, Y. F. *et al.* Truncated human endothelin receptor A produced by alternative splicing and its expression in melanoma. *Br J Cancer* **78**, 1141–1146 (1998).
53. Hatae, N. *et al.* Cloning and Functional Identification of Novel Endothelin Receptor Type A Isoforms in Pituitary. *Molecular Endocrinology* **21**, 1192–1204 (2007).
54. Grantcharova, E. *et al.* The Extracellular N Terminus of the Endothelin B (ETB) Receptor Is Cleaved by a Metalloprotease in an Agonist-dependent Process \*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 43933–43941 (2002).
55. Halaka, M. *et al.* Differences in Endothelin B Receptor Isoforms Expression and Function in Breast Cancer Cells. *J Cancer* **11**, 2688–2701 (2020).

## Bibliographie

56. Cramer, H. *et al.* Coupling of endothelin receptors to the ERK/MAP kinase pathway. *European Journal of Biochemistry* **268**, 5449–5459 (2001).
57. Stannard, C., Lehenkari, P. & Godovac-Zimmermann, J. Functional Diversity of Endothelin Pathways in Human Lung Fibroblasts May Be Based on Structural Diversity of the Endothelin Receptors. *Biochemistry* **42**, 13909–13918 (2003).
58. Cramer, H., Müller-Esterl, W. & Schroeder, C. Subtype-Specific Desensitization of Human Endothelin ETA and ETB Receptors Reflects Differential Receptor Phosphorylation. *Biochemistry* **36**, 13325–13332 (1997).
59. Gregan, B., Schaefer, M., Rosenthal, W. & Oksche, A. Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis Reveals the Existence of Endothelin-A and Endothelin-B Receptor Homodimers. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **44**, S30 (2004).
60. Evans, N. J. & Walker, J. W. Endothelin Receptor Dimers Evaluated by FRET, Ligand Binding, and Calcium Mobilization. *Biophysical Journal* **95**, 483–492 (2008).
61. Boesen, E. I. Endothelin ETB receptor heterodimerization: beyond the ETA receptor. *Kidney International* **74**, 693–694 (2008).
62. Planes, N., Digman, M. A., Vanderheyden, P. P. M. L., Gratton, E. & Caballero-George, C. Number and brightness analysis to study spatio-temporal distribution of the angiotensin II AT1 and the endothelin-1 ETA receptors: Influence of ligand binding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1863**, 917–924 (2019).
63. Gregan, B. *et al.* Ligand-dependent Differences in the Internalization of Endothelin A and Endothelin B Receptor Heterodimers \*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 27679–27687 (2004).
64. Klammt, C. *et al.* Functional analysis of cell-free-produced human endothelin B receptor reveals transmembrane segment 1 as an essential area for ET-1 binding and homodimer formation. *The FEBS Journal* **274**, 3257–3269 (2007).
65. Evans, N. J. & Walker, J. W. Sustained Ca<sup>2+</sup> signaling and delayed internalization associated with endothelin receptor heterodimers linked through a PDZ finger This article is one of a selection of papers published in the special issue (part 2 of 2) on Forefronts in Endothelin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **86**, 526–535 (2008).
66. Zhang, Y. *et al.* Impaired Stimulatory Effect of ETB Receptor on D3 Receptor in Immortalized Renal Proximal Tubule Cells of Spontaneously Hypertensive Rats. *KBR* **34**, 75–82 (2011).
67. Hegner, B. *et al.* Autoimmune activation and hypersensitization of the AT1 and ETA receptors contributes to vascular injury in scleroderma renal crisis. *Rheumatology (Oxford)* keac594 (2022) doi:10.1093/rheumatology/keac594.
68. Cabrera-Vera, T. M. *et al.* Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation. *Endocrine Reviews* **24**, 765–781 (2003).
69. Shraga-Levine, Z. & Sokolovsky, M. Functional Coupling of G Proteins to Endothelin Receptors Is Ligand and Receptor Subtype Specific. *Cell Mol Neurobiol* **20**, 305–317 (2000).
70. Kawanabe, Y., Hashimoto, N. & Masaki, T. Characterization of G proteins involved in activation of nonselective cation channels by endothelinB receptor. *British Journal of Pharmacology* **136**, 1015–1022 (2002).
71. Takagi, Y., Ninomiya, H., Sakamoto, A., Miwa, S. & Masaki, T. Structural Basis of G Protein Specificity of Human Endothelin Receptors: A STUDY WITH ENDOTHELINA/BCHIMERAS (\*). *Journal of Biological Chemistry* **270**, 10072–10078 (1995).
72. Chen, Q. & Tesmer, J. J. G. G protein-coupled receptor interactions with arrestins and GPCR kinases: The unresolved issue of signal bias. *Journal of Biological Chemistry* **298**, (2022).

## Bibliographie

73. Rosanò, L. & Bagnato, A. Endothelin therapeutics in cancer: Where are we? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **310**, R469–R475 (2016).
74. Apostolakou, A. E., Baltoumas, F. A., Stravopodis, D. J. & Iconomidou, V. A. Extended Human G-Protein Coupled Receptor Network: Cell-Type-Specific Analysis of G-Protein Coupled Receptor Signaling Pathways. *J. Proteome Res.* **19**, 511–524 (2020).
75. Jiang, H., Galtes, D., Wang, J. & Rockman, H. A. G protein-coupled receptor signaling: transducers and effectors. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **323**, C731–C748 (2022).
76. Salcedo, A., Mayor Jr, F. & Penela, P. Mdm2 is involved in the ubiquitination and degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *The EMBO Journal* **25**, 4752–4762 (2006).
77. Horinouchi, T., Terada, K., Higashi, T. & Miwa, S. Endothelin receptor signaling: new insight into its regulatory mechanisms. *J Pharmacol Sci* **123**, 85–101 (2013).
78. Li, J., Yang, S., Yu, F., Ji, E. & Woodrow Weiss, J. Endothelin-1 enhanced carotid body chemosensory activity in chronic intermittent hypoxia through PLC, PKC and p38MAPK signaling pathways. *Neuropeptides* **74**, 44–51 (2019).
79. Siao, A.-C. *et al.* Endothelin-1 stimulates preadipocyte growth via the PKC, STAT3, AMPK, c-JUN, ERK, sphingosine kinase, and sphingomyelinase pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* **319**, C839–C857 (2020).
80. Chong, T. J., Sadjadi, J., Curran, B. & Victorino, G. P. Endothelin-1 reduces mesenteric microvascular hydraulic permeability via cyclic AMP and protein kinase A signal transduction. *Peptides* **28**, 2036–2041 (2007).
81. Horinouchi, T. *et al.* Adenylate Cyclase/cAMP/Protein Kinase A Signaling Pathway Inhibits Endothelin Type A Receptor-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry Mediated via Transient Receptor Potential Canonical 6 Channels. *J Pharmacol Exp Ther* **340**, 143–151 (2012).
82. Sun, P. & Meng, L. Emerging roles of class I PI3K inhibitors in modulating tumor microenvironment and immunity. *Acta Pharmacol Sin* **41**, 1395–1402 (2020).
83. Yang, Z. & Li, J.-C. Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin via phosphoinositide-3 kinase–glycogen synthase kinase-3 $\beta$  signaling in endothelial cells. *Life Sciences* **82**, 512–518 (2008).
84. Hinsley, E. E., Hunt, S., Hunter, K. D., Whawell, S. A. & Lambert, D. W. Endothelin-1 stimulates motility of head and neck squamous carcinoma cells by promoting stromal–epithelial interactions. *International Journal of Cancer* **130**, 40–47 (2012).
85. Robin, P., Boulven, I., Desmyter, C., Harbon, S. & Leiber, D. ET-1 stimulates ERK signaling pathway through sequential activation of PKC and Src in rat myometrial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **283**, C251–C260 (2002).
86. Nilsson, D. *et al.* PKC and MAPK signalling pathways regulate vascular endothelin receptor expression. *European Journal of Pharmacology* **580**, 190–200 (2008).
87. Khotskaya, Y. B. *et al.* Targeting TRK family proteins in cancer. *Pharmacol Ther* **173**, 58–66 (2017).
88. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
89. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
90. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* **12**, 31–46 (2022).

## Bibliographie

91. Mai, H.-Q. *et al.* [Correlation of endothelin A receptor expression to prognosis of nasopharyngeal carcinoma]. *Ai Zheng* **24**, 611–615 (2005).
92. Lo, K.-W. *et al.* Promoter hypermethylation of the EDNRB gene in nasopharyngeal carcinoma. *International Journal of Cancer* **98**, 651–655 (2002).
93. Gohji, K., Kitazawa, S., Tamada, H., Katsuoka, Y. & Nakajima, M. Expression of endothelin receptor a associated with prostate cancer progression. *J Urol* **165**, 1033–1036 (2001).
94. Nelson, J. B. *et al.* Methylation of the 5' CpG island of the endothelin B receptor gene is common in human prostate cancer. *Cancer Res* **57**, 35–37 (1997).
95. Demunter, A., De Wolf-Peeters, C., Degreef, H., Stas, M. & van den Oord, J. J. Expression of the endothelin-B receptor in pigment cell lesions of the skin. *Virchows Arch* **438**, 485–491 (2001).
96. Pan, D.-S., Feng, S.-Z., Cao, P. & Li, J.-J. Endothelin B receptor promotes the proliferation and immune escape of malignant gliomas. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **46**, 1230–1235 (2018).
97. Bagnato, A. *et al.* Endothelin Receptor Blockade Inhibits Proliferation of Kaposi's Sarcoma Cells. *The American Journal of Pathology* **158**, 841–847 (2001).
98. Tocci, P., Rosanò, L. & Bagnato, A. Targeting Endothelin-1 Receptor/ $\beta$ -Arrestin-1 Axis in Ovarian Cancer: From Basic Research to a Therapeutic Approach. *Front Endocrinol (Lausanne)* **10**, 609 (2019).
99. Moraitis, S., Miller, W. R., Smyth, J. F. & Langdon, S. P. Paracrine regulation of ovarian cancer by endothelin. *European Journal of Cancer* **35**, 1381–1387 (1999).
100. Bagnato, A., Spinella, F. & Rosanò, L. The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy This article is one of a selection of papers published in the special issue (part 2 of 2) on Frontiers in Endothelin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **86**, 473–484 (2008).
101. Lee, Y.-J. *et al.* The EDN1/EDNRA/ $\beta$ -arrestin axis promotes colorectal cancer progression by regulating STAT3 phosphorylation. *International Journal of Oncology* **62**, 1–15 (2023).
102. Bagnato, A., Tecce, R., Di Castro, V. & Catt, K. J. Activation of mitogenic signaling by endothelin 1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* **57**, 1306–1311 (1997).
103. Bagnato, A. *et al.* Autocrine actions of endothelin-1 as a growth factor in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **1**, 1059–1066 (1995).
104. Vacca, F., Bagnato, A., Catt, K. J. & Tecce, R. Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* **60**, 5310–5317 (2000).
105. Papandreou, C. N. *et al.* Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat Med* **4**, 50–57 (1998).
106. Ali, H. *et al.* Stimulation of colorectal cancer cell line growth by ET-1 and its inhibition by ETA antagonists. *Gut* **47**, 685–688 (2000).
107. Bagnato, A. *et al.* Endothelin B Receptor Blockade Inhibits Dynamics of Cell Interactions and Communications in Melanoma Cell Progression. *Cancer Research* **64**, 1436–1443 (2004).
108. Spinella, F. *et al.* Endothelin-1 and Endothelin-3 Promote Invasive Behavior via Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  in Human Melanoma Cells. *Cancer Research* **67**, 1725–1734 (2007).
109. Nelson, J., Bagnato, A., Battistini, B. & Nisen, P. The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 110–116 (2003).
110. Rosanò, L. *et al.* Endothelin A Receptor/ $\beta$ -Arrestin Signaling to the Wnt Pathway Renders Ovarian Cancer Cells Resistant to Chemotherapy. *Cancer Research* **74**, 7453–7464 (2014).

## Bibliographie

111. Bufalo, D. D. *et al.* Endothelin-1 Protects Ovarian Carcinoma Cells against Paclitaxel-Induced Apoptosis: Requirement for Akt Activation. *Mol Pharmacol* **61**, 524–532 (2002).
112. Nelson, J. B., Udan, M. S., Guruli, G. & Pflug, B. R. Endothelin-1 Inhibits Apoptosis in Prostate Cancer. *Neoplasia* **7**, 631–637 (2005).
113. Banerjee, S. *et al.* In vitro and In vivo Molecular Evidence for Better Therapeutic Efficacy of ABT-627 and Taxotere Combination in Prostate Cancer. *Cancer Research* **67**, 3818–3826 (2007).
114. Akhavan, A. *et al.* Endothelin Receptor A Blockade Enhances Taxane Effects in Prostate Cancer. *Neoplasia* **8**, 725–732 (2006).
115. Tocci, P. *et al.* Endothelin-1 axis fosters YAP-induced chemotherapy escape in ovarian cancer. *Cancer Letters* **492**, 84–95 (2020).
116. Cianfrocca, R. *et al.* Blocking endothelin-1-receptor/ $\beta$ -catenin circuit sensitizes to chemotherapy in colorectal cancer. *Cell Death Differ* **24**, 1811–1820 (2017).
117. Liu, Y. *et al.* Autocrine Endothelin-3/Endothelin Receptor B Signaling Maintains Cellular and Molecular Properties of Glioblastoma Stem Cells. *Molecular Cancer Research* **9**, 1668–1685 (2011).
118. Lahav, R., Suvà, M.-L., Rimoldi, D., Patterson, P. H. & Stamenkovic, I. Endothelin Receptor B Inhibition Triggers Apoptosis and Enhances Angiogenesis in Melanomas. *Cancer Research* **64**, 8945–8953 (2004).
119. Bagnato, A. & Rosanò, L. Epithelial-Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer Progression: A Crucial Role for the Endothelin Axis. *CTO* **185**, 85–94 (2007).
120. Spinella, F. *et al.* Endothelin-1 Decreases Gap Junctional Intercellular Communication by Inducing Phosphorylation of Connexin 43 in Human Ovarian Carcinoma Cells \*. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 41294–41301 (2003).
121. Rosanò, L. *et al.*  $\beta$ -arrestin-1 is a nuclear transcriptional regulator of endothelin-1-induced  $\beta$ -catenin signaling. *Oncogene* **32**, 5066–5077 (2013).
122. Najafi, M., Mortezaee, K. & Majidpoor, J. Cancer stem cell (CSC) resistance drivers. *Life Sciences* **234**, 116781 (2019).
123. Ginestier, C. *et al.* La cellule souche cancéreuse - Un pilote aux commandes du cancer du sein. *Med Sci (Paris)* **23**, 1133–1140 (2007).
124. Puglisi, M. A. *et al.* Identification of Endothelin-1 and NR4A2 as CD133-regulated genes in colon cancer cells. *The Journal of Pathology* **225**, 305–314 (2011).
125. Ríos-Arrabal, S. *et al.* Endothelin-1 as a Mediator of Heme Oxygenase-1-Induced Stemness in Colorectal Cancer: Influence of p53. *Journal of Personalized Medicine* **11**, 509 (2021).
126. Polyak, K. & Weinberg, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* **9**, 265–273 (2009).
127. Rosanò, L. *et al.* Acquisition of Chemoresistance and EMT Phenotype Is Linked with Activation of the Endothelin A Receptor Pathway in Ovarian Carcinoma Cells. *Clinical Cancer Research* **17**, 2350–2360 (2011).
128. Sestito, R., Tocci, P., Roman, C., Di Castro, V. & Bagnato, A. Functional interaction between endothelin-1 and ZEB1/YAP signaling regulates cellular plasticity and metastasis in high-grade serous ovarian cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **41**, 157 (2022).
129. Salani, D. *et al.* Role of Endothelin-1 in Neovascularization of Ovarian Carcinoma. *The American Journal of Pathology* **157**, 1537–1547 (2000).

## Bibliographie

130. Spinella, F. *et al.* Endothelin-1 Stimulates Lymphatic Endothelial Cells and Lymphatic Vessels to Grow and Invade. *Cancer Research* **69**, 2669–2676 (2009).
131. Liu, J. *et al.* Metformin and simvastatin synergistically suppress endothelin 1-induced hypoxia and angiogenesis in multiple cancer types. *Cancer Science* **114**, 640–653 (2023).
132. Grimshaw, M. J. Endothelins and hypoxia-inducible factor in cancer. *Endocrine-Related Cancer* **14**, 233–244 (2007).
133. Hubert, S. & Abastado, J.-P. [The early steps of the metastatic process]. *Med Sci (Paris)* **30**, 378–384 (2014).
134. Rosanò, L. *et al.* Integrin-linked kinase functions as a downstream mediator of endothelin-1 to promote invasive behavior in ovarian carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics* **5**, 833–842 (2006).
135. Ha, N.-H. *et al.* Lactoferrin–Endothelin-1 Axis Contributes to the Development and Invasiveness of Triple-Negative Breast Cancer Phenotypes. *Cancer Research* **71**, 7259–7269 (2011).
136. Bagnato, A. & Rosanò, L. Endothelin-1 receptor drives invadopodia: Exploiting how  $\beta$ -arrestin-1 guides the way. *Small GTPases* **9**, 394–398 (2018).
137. Semprucci, E. *et al.* Endothelin A receptor drives invadopodia function and cell motility through the  $\beta$ -arrestin/PDZ-RhoGEF pathway in ovarian carcinoma. *Oncogene* **35**, 3432–3442 (2016).
138. Masi, I. *et al.* Endothelin-1 drives invadopodia and interaction with mesothelial cells through ILK. *Cell Reports* **34**, (2021).
139. Di Modugno, F. *et al.* hMENA is a key regulator in endothelin-1/ $\beta$ -arrestin1–induced invadopodial function and metastatic process. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, 3132–3137 (2018).
140. Maffei, R. *et al.* Macitentan, a double antagonist of endothelin receptors, efficiently impairs migration and microenvironmental survival signals in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* **8**, 90013–90027 (2017).
141. Kim, S.-J. *et al.* Macitentan (ACT-064992), a Tissue-Targeting Endothelin Receptor Antagonist, Enhances Therapeutic Efficacy of Paclitaxel by Modulating Survival Pathways in Orthotopic Models of Metastatic Human Ovarian Cancer. *Neoplasia* **13**, 167-IN12 (2011).
142. Cruz-Muñoz, W. *et al.* Roles for Endothelin Receptor B and BCL2A1 in Spontaneous CNS Metastasis of Melanoma. *Cancer Research* **72**, 4909–4919 (2012).
143. Said, N., Smith, S., Sanchez-Carbayo, M. & Theodorescu, D. Tumor endothelin-1 enhances metastatic colonization of the lung in mouse xenograft models of bladder cancer. *J Clin Invest* **121**, 132–147 (2011).
144. Mohammad, K. S. & Guise, T. A. Mechanisms of Osteoblastic Metastases: Role of Endothelin-1. *Clinical Orthopaedics and Related Research*® **415**, S67 (2003).
145. Buckanovich, R. J. *et al.* Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat Med* **14**, 28–36 (2008).
146. Grimshaw, M. J., Wilson, J. L. & Balkwill, F. R. Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. *European Journal of Immunology* **32**, 2393–2400 (2002).
147. Chen, C.-C. *et al.* The Endothelin-Integrin Axis Is Involved in Macrophage-induced Breast Cancer Cell Chemotactic Interactions with Endothelial Cells \*. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 10029–10044 (2014).

## Bibliographie

148. Tocci, P. *et al.*  $\beta$ -arrestin1/YAP/mutant p53 complexes orchestrate the endothelin A receptor signaling in high-grade serous ovarian cancer. *Nat Commun* **10**, 3196 (2019).
149. Welch, A., Jacobs, M., Wingo, C. & Cain, B. Early progress in epigenetic regulation of endothelin pathway genes. *British Journal of Pharmacology* **168**, 327–334 (2013).
150. Wang, R. *et al.* Epigenetic inactivation of endothelin-2 and endothelin-3 in colon cancer. *International Journal of Cancer* **132**, 1004–1012 (2013).
151. Tsai, C.-H., Huang, P.-J., Lee, I. T., Chen, C.-M. & Wu, M. H. Endothelin-1-mediated miR-let-7g-5p triggers interleukin-6 and TNF- $\alpha$  to cause myopathy and chronic adipose inflammation in elderly patients with diabetes mellitus. *Aging* **14**, 3633–3651 (2022).
152. Alcalde-Estévez, E. *et al.* Endothelin-1 induces cellular senescence and fibrosis in cultured myoblasts. A potential mechanism of aging-related sarcopenia. *Aging* **12**, 11200–11223 (2020).
153. Zhang, Y.-H. *et al.* ECE2 is a prognostic biomarker associated with m6A modification and involved in immune infiltration of lung adenocarcinoma. *Frontiers in Endocrinology* **13**, (2022).
154. Kefford, R. *et al.* A Phase II study of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, as monotherapy in patients with stage IV metastatic melanoma. *Invest New Drugs* **25**, 247–252 (2007).
155. Kim, S.-J. *et al.* Macitentan, a Dual Endothelin Receptor Antagonist, in Combination with Temozolomide Leads to Glioblastoma Regression and Long-term Survival in Mice. *Clin Cancer Res* **21**, 4630–4641 (2015).
156. Spinella, F. *et al.* Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the endothelin axis and downstream signaling pathways in ovarian carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics* **5**, 1483–1492 (2006).
157. Enevoldsen, F. C. *et al.* Endothelin Receptor Antagonists: Status Quo and Future Perspectives for Targeted Therapy. *Journal of Clinical Medicine* **9**, 824 (2020).
158. Clozel, M., Maresta, A. & Humbert, M. Endothelin Receptor Antagonists. in *Pharmacotherapy of Pulmonary Hypertension* (eds. Humbert, M., Evgenov, O. V. & Stasch, J.-P.) 199–227 (Springer, 2013). doi:10.1007/978-3-642-38664-0\_9.
159. Dingemans, J. & van Giersbergen, P. L. M. Clinical Pharmacology of Bosentan, a Dual Endothelin Receptor Antagonist. *Clin Pharmacokinet* **43**, 1089–1115 (2004).
160. Carducci, M. A. *et al.* Atrasentan, an Endothelin-Receptor Antagonist for Refractory Adenocarcinomas: Safety and Pharmacokinetics. *JCO* **20**, 2171–2180 (2002).
161. Tomkinson, H. *et al.* Pharmacokinetics and tolerability of zibotentan (ZD4054) in subjects with hepatic or renal impairment: two open-label comparative studies. *BMC Clin Pharmacol* **11**, 3 (2011).
162. Kefford, R. F. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled study of high-dose bosentan in patients with stage IV metastatic melanoma receiving first-line dacarbazine chemotherapy. *Molecular Cancer* **9**, 69 (2010).
163. Miller, K. *et al.* Phase III, randomized, placebo-controlled study of once-daily oral zibotentan (ZD4054) in patients with non-metastatic castration-resistant prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **16**, 187–192 (2013).
164. Fizazi, K. *et al.* Phase III, Randomized, Placebo-Controlled Study of Docetaxel in Combination With Zibotentan in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *JCO* **31**, 1740–1747 (2013).
165. Quinn, D. I. *et al.* Docetaxel and atrasentan versus docetaxel and placebo for men with advanced castration-resistant prostate cancer (SWOG S0421): a randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **14**, 893–900 (2013).

## Bibliographie

166. Kim, R. *et al.* Phase 2 study of combination SPI-1620 with docetaxel as second-line advanced biliary tract cancer treatment. *Br J Cancer* **117**, 189–194 (2017).
167. Chiou, W. J. *et al.* Dissociation Characteristics of Endothelin Receptor Agonists and Antagonists in Cloned Human Type-B Endothelin Receptor. *Endothelium* **5**, 179–189 (1997).
168. Guizard, A.-V. *et al.* Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2018 MÉLANOME CUTANÉ. (2021).
169. Jeudy, G., Rama, N., Sassolas, B. & Sicard, J. Les traitements du mélanome de la peau. (2016).
170. Rafique, I., Kirkwood, J. M. & Tarhini, A. A. Immune checkpoint blockade and interferon- $\alpha$  in melanoma. *Semin Oncol* **42**, 436–447 (2015).
171. Haslam, A. & Prasad, V. Estimation of the Percentage of US Patients With Cancer Who Are Eligible for and Respond to Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Drugs. *JAMA Network Open* **2**, e192535 (2019).
172. Xu, Y., Mu, Y., Wang, L. & Zhang, X. Detailed Analysis of Molecular Mechanisms in Primary and Metastatic Melanoma. *Journal of Computational Biology* **27**, 9–19 (2020).
173. Soufir, N. *et al.* Association Between Endothelin Receptor B Nonsynonymous Variants and Melanoma Risk. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **97**, 1297–1301 (2005).
174. Spica, T. *et al.* EDNRB gene variants and melanoma risk in two southern European populations. *Clinical and Experimental Dermatology* **36**, 782–787 (2011).
175. Spinella, F. *et al.* Endothelin-1 induces the transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *J Mol Med* **91**, 395–405 (2013).
176. Spinella, F. *et al.* Endothelin-1 Inhibits Prolyl Hydroxylase Domain 2 to Activate Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  in Melanoma Cells. *PLOS ONE* **5**, e11241 (2010).
177. Lin, N. *et al.* The expression of endothelin receptor B in melanoma cells A375 and Sk-mel-1 and the proliferative effects of endothelin 3 on A375 cells. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. [Med. Sci.]* **27**, 611–613 (2007).
178. Mangahas, C. R., Cruz, G. V. dela, Schneider, R. J. & Jamal, S. Endothelin-1 Upregulates MCAM in Melanocytes. *J Invest Dermatol* **123**, 1135–1139 (2004).
179. Berger, Y., Bernasconi, C. C. & Juillerat-Jeanneret, L. Targeting the endothelin axis in human melanoma: combination of endothelin receptor antagonism and alkylating agents. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**, 1111–1119 (2006).
180. Asundi, J. *et al.* An Antibody–Drug Conjugate Targeting the Endothelin B Receptor for the Treatment of Melanoma. *Clinical Cancer Research* **17**, 965–975 (2011).
181. Beck, A., Dumontet, C. & Joubert, N. Les immunoconjugués en oncologie - Les nouvelles stratégies en développement. *Med Sci (Paris)* **35**, 1043–1053 (2019).
182. Sandhu, S. *et al.* Phase I study of the anti-endothelin B receptor antibody-drug conjugate DEDN6526A in patients with metastatic or unresectable cutaneous, mucosal, or uveal melanoma. *Invest New Drugs* **38**, 844–854 (2020).
183. Cuddapah, V. A., Robel, S., Watkins, S. & Sontheimer, H. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci* **15**, 455–465 (2014).
184. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* **131**, 803–820 (2016).

## Bibliographie

185. Baldi, I., Huchet, A., Bauchet, L. & Loiseau, H. Épidémiologie des glioblastomes. *Neurochirurgie* **56**, 433–440 (2010).
186. Woehrer, A., Bauchet, L. & Barnholtz-Sloan, J. S. Glioblastoma survival: has it improved? Evidence from population-based studies. *Current Opinion in Neurology* **27**, 666 (2014).
187. Wirsching, H.-G., Galanis, E. & Weller, M. Chapter 23 - Glioblastoma. in *Handbook of Clinical Neurology* (eds. Berger, M. S. & Weller, M.) vol. 134 381–397 (Elsevier, 2016).
188. Fernandes, C. *et al.* Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. *Exon Publications* 197–241 (2017) doi:10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch11.
189. Duffau, H. Surgery of Insular Gliomas. *Intracranial Gliomas Part I - Surgery* **30**, 173–185 (2018).
190. Stupp, R. *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology* **10**, 459–466 (2009).
191. Rhun, E. L. *et al.* Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treatment Reviews* **80**, (2019).
192. Lathia, J. D., Mack, S. C., Mulkearns-Hubert, E. E., Valentim, C. L. L. & Rich, J. N. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* **29**, 1203–1217 (2015).
193. Barbato, L., Bocchetti, M., Di Biase, A. & Regad, T. Cancer Stem Cells and Targeting Strategies. *Cells* **8**, 926 (2019).
194. Daneman, R. & Prat, A. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a020412 (2015).
195. Kniesel, U. & Wolburg, H. Tight Junctions of the Blood–Brain Barrier. *Cell Mol Neurobiol* **20**, 57–76 (2000).
196. Wolburg, H., Noell, S., Fallier-Becker, P., Mack, A. F. & Wolburg-Buchholz, K. The disturbed blood–brain barrier in human glioblastoma. *Molecular Aspects of Medicine* **33**, 579–589 (2012).
197. Arvanitis, C. D., Ferraro, G. B. & Jain, R. K. The blood–brain barrier and blood–tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* **20**, 26–41 (2020).
198. Sarkaria, J. N. *et al.* Is the blood–brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. *Neuro-Oncology* **20**, 184–191 (2018).
199. Saunders, N. R. *et al.* The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. *Frontiers in Neuroscience* **8**, (2014).
200. Rui, Y. & Green, J. J. Overcoming delivery barriers in immunotherapy for glioblastoma. *Drug Deliv. and Transl. Res.* **11**, 2302–2316 (2021).
201. Ruiz-López, E. & Schuhmacher, A. J. Transportation of Single-Domain Antibodies through the Blood–Brain Barrier. *Biomolecules* **11**, 1131 (2021).
202. Nakagawa, H. *et al.* Clinical Trial of Intrathecal Administration of 5-fluoro-2'-deoxyuridine for Treatment of Meningeal Dissemination of Malignant Tumors. *J Neurooncol* **45**, 175–183 (1999).
203. Abs, R. *et al.* Endocrine Consequences of Long-Term Intrathecal Administration of Opioids. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **85**, 2215–2222 (2000).
204. Jiang, X. *et al.* Nanoparticle engineered TRAIL-overexpressing adipose-derived stem cells target and eradicate glioblastoma via intracranial delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 13857–13862 (2016).

## Bibliographie

205. Sousa, F., Dhaliwal, H. K., Gattacceca, F., Sarmiento, B. & Amiji, M. M. Enhanced anti-angiogenic effects of bevacizumab in glioblastoma treatment upon intranasal administration in polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **309**, 37–47 (2019).
206. Idbaih, A. *et al.* Safety and Feasibility of Repeated and Transient Blood–Brain Barrier Disruption by Pulsed Ultrasound in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Clinical Cancer Research* **25**, 3793–3801 (2019).
207. Rong, L., Li, N. & Zhang, Z. Emerging therapies for glioblastoma: current state and future directions. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **41**, 142 (2022).
208. Egidy, G. *et al.* The Endothelin System in Human Glioblastoma. *Laboratory Investigation* **80**, 1681–1689 (2000).
209. Lange, F. *et al.* Differential somatostatin, CXCR4 chemokine and endothelin A receptor expression in WHO grade I–IV astrocytic brain tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* **144**, 1227–1237 (2018).
210. Tsutsumi, K. *et al.* Enhanced Expression of an Endothelin ETA Receptor in Capillaries from Human Glioblastoma: A Quantitative Receptor Autoradiographic Analysis Using a Radioluminographic Imaging Plate System. *Journal of Neurochemistry* **63**, 2240–2247 (1994).
211. Sone, M. *et al.* Expression of Endothelin-1 and Endothelin Receptors in Cultured Human Glioblastoma Cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **36**, S390 (2000).
212. Paolillo, M., Barbieri, A., Zanassi, P. & Schinelli, S. Expression of endothelins and their receptors in glioblastoma cell lines. *J Neurooncol* **79**, 1–7 (2006).
213. Naidoo, V., Naidoo, S., Mahabeer, R. & Raidoo, D. M. Localization of the endothelin system in human diffuse astrocytomas. *Cancer* **104**, 1049–1057 (2005).
214. Anguelova, E. *et al.* Functional endothelin ETB receptors are selectively expressed in human oligodendrogliomas. *Molecular Brain Research* **137**, 77–88 (2005).
215. Vasaikar, S. *et al.* Overexpression of endothelin B receptor in glioblastoma: a prognostic marker and therapeutic target? *BMC Cancer* **18**, 154 (2018).
216. Kim, S. W. *et al.* Role of the endothelin axis in astrocyte- and endothelial cell-mediated chemoprotection of cancer cells. *Neuro-Oncology* **16**, 1585–1598 (2014).
217. Zhang, B. *et al.* BQ123 selectively improved tumor perfusion and enhanced nanomedicine delivery for glioblastomas treatment. *Pharmacological Research* **132**, 211–219 (2018).
218. Weathers, S.-P. *et al.* Results of a phase I trial to assess the safety of macitentan in combination with temozolomide for the treatment of recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncology Advances* **3**, vdab141 (2021).
219. Heeb, S. R., Schaller, M. & Kremer Hovinga, J. A. Naturally Occurring Anti-Idiotypic Antibodies Portray a Largely Private Repertoire in Immune-Mediated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *The Journal of Immunology* **208**, 2497–2507 (2022).
220. Rousseaux, J., Rousseaux-Prévost, R. & Bazin, H. Optimal conditions for the preparation of Fab and F(ab')<sub>2</sub> fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses. *Journal of Immunological Methods* **64**, 141–146 (1983).
221. Mian, I. S., Bradwell, A. R. & Olson, A. J. Structure, function and properties of antibody binding sites. *Journal of Molecular Biology* **217**, 133–151 (1991).
222. Ward, E. S. & Ghetie, V. The effector functions of immunoglobulins: implications for therapy. *Ther Immunol* **2**, 77–94 (1995).

## Bibliographie

223. Gelderman, K. A., Tomlinson, S., Ross, G. D. & Gorter, A. Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends in Immunology* **25**, 158–164 (2004).
224. Liu, H. & May, K. Disulfide bond structures of IgG molecules. *mAbs* **4**, 17–23 (2012).
225. Bournazos, S. & Ravetch, J. V. Diversification of IgG effector functions. *International Immunology* **29**, 303–310 (2017).
226. Schroeder, H. W. & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, S41–S52 (2010).
227. Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M. & Dwek, R. A. The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annual Review of Immunology* **25**, 21–50 (2007).
228. Liu, R., Oldham, R. J., Teal, E., Beers, S. A. & Cragg, M. S. Fc-Engineering for Modulated Effector Functions—Improving Antibodies for Cancer Treatment. *Antibodies* **9**, 64 (2020).
229. Sibénil, S. *et al.* Molecular aspects of human Fc $\gamma$ R interactions with IgG: Functional and therapeutic consequences. *Immunology Letters* **106**, 111–118 (2006).
230. Cedeño-Arias, M., Sánchez-Ramírez, J., Blanco-Santana, R. & Rengifo-Calzado, E. Validation of a Flow Cytometry Based Binding Assay for Evaluation of Monoclonal Antibody Recognizing EGF Receptor. *Scientia Pharmaceutica* **79**, 569–582 (2011).
231. Cosimi, A. B. *et al.* TREATMENT OF ACUTE RENAL ALLOGRAFT REJECTION WITH OKT3 MONOCLONAL ANTIBODY. *Transplantation* **32**, 535 (1981).
232. Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A. & Oi, V. T. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**, 6851–6855 (1984).
233. Greig, S. L. Obiltoximab: First Global Approval. *Drugs* **76**, 823–830 (2016).
234. Moreau, P. *et al.* Isatuximab, carfilzomib, and dexamethasone in relapsed multiple myeloma (IKEMA): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet* **397**, 2361–2371 (2021).
235. Rugo, H. S. *et al.* Efficacy of Margetuximab vs Trastuzumab in Patients With Pretreated ERBB2-Positive Advanced Breast Cancer: A Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology* **7**, 573–584 (2021).
236. Nepal, G. *et al.* Efficacy and safety of rituximab in autoimmune encephalitis: A meta-analysis. *Acta Neurologica Scandinavica* **142**, 449–459 (2020).
237. Hwang, W. Y. K. & Foote, J. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* **36**, 3–10 (2005).
238. Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. & Winter, G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **321**, 522–525 (1986).
239. Lanzavecchia, A., Corti, D. & Sallusto, F. Human monoclonal antibodies by immortalization of memory B cells. *Current Opinion in Biotechnology* **18**, 523–528 (2007).
240. Harding, F. A., Stickler, M. M., Razo, J. & DuBridge, R. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. *mAbs* **2**, 256–265 (2010).
241. Matucci, A. *et al.* Immunogenicity-unwanted immune responses to biological drugs – can we predict them? *Expert Review of Clinical Pharmacology* **14**, 47–53 (2021).
242. Bézian, J.-H., Moynet, D., Comeau, S. & Chagnaud, J.-L. L'ingénierie des anticorps et ses applications. *Revue Française des Laboratoires* **2000**, 105–109 (2000).

## Bibliographie

243. Paintaud, G. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux. *Med Sci (Paris)* **25**, 1057–1062 (2009).
244. Beckman, R. A., Weiner, L. M. & Davis, H. M. Antibody constructs in cancer therapy. *Cancer* **109**, 170–179 (2007).
245. Bouleau, A., Lebon, V. & Truillet, C. PET imaging of immune checkpoint proteins in oncology. *Pharmacol Ther* **222**, 107786 (2021).
246. Lütje, S. *et al.* Anti-CEA Antibody Fragments Labeled with [<sup>18</sup>F]AIF for PET Imaging of CEA-Expressing Tumors. *Bioconjugate Chem.* **25**, 335–341 (2014).
247. Bousquet, G. *et al.* Intrathecal Trastuzumab Halts Progression of CNS Metastases in Breast Cancer. *JCO* **34**, e151–e155 (2016).
248. A, B. *et al.* Optimizing Immuno-PET Imaging of Tumor PD-L1 Expression: Pharmacokinetic, Biodistribution, and Dosimetric Comparisons of <sup>89</sup>Zr-Labeled Anti-PD-L1 Antibody Formats. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **63**, (2022).
249. Beck, A., Wurch, T., Bailly, C. & Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol* **10**, 345–352 (2010).
250. Chames, P. & Baty, D. Bispecific antibodies for cancer therapy. *mAbs* **1**, 539–547 (2009).
251. Ji, X., Wang, H., Chen, Y., Zhou, J. & Liu, Y. Recombinant expressing angioprep-2 fused anti-VEGF single chain Fab (scFab) could cross blood–brain barrier and target glioma. *AMB Express* **9**, 165 (2019).
252. Wang, Q. *et al.* Design and Production of Bispecific Antibodies. *Antibodies* **8**, 43 (2019).
253. Chen, Y. *et al.* CAR-macrophage: A new immunotherapy candidate against solid tumors. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **139**, 111605 (2021).
254. Miliotou, A. N. & Papadopoulou, L. C. CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **19**, 5–18.
255. Strebhardt, K. & Ullrich, A. Paul Ehrlich’s magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer* **8**, 473–480 (2008).
256. Agarwal, P. & Bertozzi, C. R. Site-Specific Antibody–Drug Conjugates: The Nexus of Bioorthogonal Chemistry, Protein Engineering, and Drug Development. *Bioconjugate Chem.* **26**, 176–192 (2015).
257. Tran, V. L. *et al.* Impact of Radiolabeling Strategies on the Pharmacokinetics and Distribution of an Anti-PD-L1 PET Ligand. *Mol. Pharmaceutics* **19**, 3673–3680 (2022).
258. Lorand, L. & Graham, R. M. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 140–156 (2003).
259. Jeger, S. *et al.* Site-Specific and Stoichiometric Modification of Antibodies by Bacterial Transglutaminase. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 9995–9997 (2010).
260. Schneider, H., Deweid, L., Avrutina, O. & Kolmar, H. Recent progress in transglutaminase-mediated assembly of antibody-drug conjugates. *Analytical Biochemistry* **595**, 113615 (2020).
261. Hamblett, K. J. *et al.* Effects of Drug Loading on the Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody Drug Conjugate. *Clinical Cancer Research* **10**, 7063–7070 (2004).
262. Junutula, J. R. *et al.* Rapid identification of reactive cysteine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs. *Journal of Immunological Methods* **332**, 41–52 (2008).

## Bibliographie

263. Wootton, S. K. & Yoo, D. Homo-Oligomerization of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nucleocapsid Protein and the Role of Disulfide Linkages. *Journal of Virology* **77**, 4546–4557 (2003).
264. Doronina, S. O. *et al.* Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nat Biotechnol* **21**, 778–784 (2003).
265. van Dongen, G. A. M. S., Visser, G. W. M., Lub-de Hooge, M. N., de Vries, E. G. & Perk, L. R. Immuno-PET: A Navigator in Monoclonal Antibody Development and Applications. *The Oncologist* **12**, 1379–1389 (2007).
266. Paver, E. C. *et al.* Programmed death ligand-1 (PD-L1) as a predictive marker for immunotherapy in solid tumours: a guide to immunohistochemistry implementation and interpretation. *Pathology* **53**, 141–156 (2021).
267. Zeglis, B. M. & Lewis, J. S. A practical guide to the construction of radiometallated bioconjugates for positron emission tomography. *Dalton Trans.* **40**, 6168–6195 (2011).
268. Fu, R., Carroll, L., Yahioğlu, G., Aboagye, E. O. & Miller, P. W. Antibody Fragment and Affibody ImmunoPET Imaging Agents: Radiolabelling Strategies and Applications. *ChemMedChem* **13**, 2466–2478 (2018).
269. Hauser, A. S. *et al.* Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets. *Cell* **172**, 41–54.e19 (2018).
270. Mullard, A. FDA approves second GPCR-targeted antibody. *Nature Reviews Drug Discovery* **17**, 613–613 (2018).
271. Dolgin, E. First GPCR-directed antibody passes approval milestone. *Nature Reviews Drug Discovery* **17**, 457–459 (2018).
272. Borrull, A. *et al.* Rendomab B4, a monoclonal antibody that discriminates the human endothelin B receptor of melanoma cells and inhibits their migration. *mAbs* **8**, 1371–1385 (2016).
273. Herbet, A. *et al.* Antibodies Targeting Human Endothelin-1 Receptors Reveal Different Conformational States in Cancer Cells. *Physiol Res* S257–S264 (2018) doi:10.33549/physiolres.933848.
274. Allard, B. *et al.* Generation and characterization of rendomab-B1, a monoclonal antibody displaying potent and specific antagonism of the human endothelin B receptor. *mAbs* **5**, 56–69 (2013).
275. Allard, B. *et al.* Electroporation-Aided DNA Immunization Generates Polyclonal Antibodies Against the Native Conformation of Human Endothelin B Receptor. *DNA and Cell Biology* **30**, 727–737 (2011).
276. Davenport, A. P., Kuc, R. E., Southan, C. & Maguire, J. J. New Drugs and Emerging Therapeutic Targets in the Endothelin Signaling Pathway and Prospects for Personalized Precision Medicine. *Physiol Res* S37–S54 (2018) doi:10.33549/physiolres.933872.
277. Phuphanich, S. *et al.* Phase I safety study of escalating doses of atrasentan in adults with recurrent malignant glioma. *Neuro Oncol* **10**, 617–623 (2008).
278. Ferré, S. *et al.* G Protein–Coupled Receptor Oligomerization Revisited: Functional and Pharmacological Perspectives. *Pharmacol Rev* **66**, 413–434 (2014).
279. Weis, W. I. & Kobilka, B. K. The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annual Review of Biochemistry* **87**, 897–919 (2018).
280. Chiriboga, L. *et al.* Endothelin-1 in the tumor microenvironment correlates with melanoma invasion. *Melanoma Research* **26**, 236 (2016).

## Bibliographie

281. Boquet, D., Ducancel, F., Herbet, A., Costa, N. & Hugnot, J.-P. Anticorps dirige contre le sous-type b des recepteurs aux endothelines et ses utilisations. (2017).
282. Ducancel, F. *et al.* Anticorps dirige contre le sous-type a des recepteurs aux endothelines et ses utilisations. (2019).
283. Mendelsohn, J., Prewett, M., Rockwell, P. & Goldstein, N. I. CCR 20th Anniversary Commentary: A Chimeric Antibody, C225, Inhibits EGFR Activation and Tumor Growth. *Clinical Cancer Research* **21**, 227–229 (2015).
284. Kilany, L. A. A., Gaber, A. A. S., Aboulwafa, M. M. & Zedan, H. H. Trastuzumab immunogenicity development in patients' sera and in laboratory animals. *BMC Immunology* **22**, 15 (2021).
285. Fan, Z. *et al.* Comparison of the three-dimensional structures of a humanized and a chimeric Fab of an anti- $\gamma$ -interferon antibody. *Journal of Molecular Recognition* **12**, 19–32 (1999).
286. Alderson, T. R., Lee, J. H., Charlier, C., Ying, J. & Bax, A. Propensity for cis-Proline Formation in Unfolded Proteins. *ChemBioChem* **19**, 37–42 (2018).
287. Shinoda, K. & Fujitani, H. Initiation of prolyl cis-trans isomerisation in the CDR-H3 loop of an antibody in response to antigen binding. *Sci Rep* **7**, 16964 (2017).
288. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 - Previous Version - SEER Cancer Statistics Review. *SEER* [https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2009\\_pops09/index.html](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2009_pops09/index.html).
289. Epidémiologie des cancers cutanés - Détection précoce des cancers de la peau. <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Depistage-et-detection-precoce/Detection-precoce-des-cancers-de-la-peau/Epidemiologie>.
290. Bittner, M. *et al.* Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* **406**, 536–540 (2000).
291. Lahav, R. Endothelin receptor B is required for the expansion of melanocyte precursors and malignant melanoma. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 173–180 (2003).
292. Goldsmith, S. J. Radioimmunotherapy of Lymphoma: Bexxar and Zevalin. *Seminars in Nuclear Medicine* **40**, 122–135 (2010).
293. Vallabhajosula, S. *et al.* Radioimmunotherapy of Metastatic Prostate Cancer with 177Lu-DOTAhuJ591 Anti Prostate Specific Membrane Antigen Specific Monoclonal Antibody. *Current Radiopharmaceuticals* **9**, 44–53.
294. Bensch, F. *et al.* 89Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer. *Nat Med* **24**, 1852–1858 (2018).
295. Farwell, M. D. *et al.* CD8-Targeted PET Imaging of Tumor-Infiltrating T Cells in Patients with Cancer: A Phase I First-in-Humans Study of 89Zr-Df-IAB22M2C, a Radiolabeled Anti-CD8 Minibody. *Journal of Nuclear Medicine* **63**, 720–726 (2022).
296. Yoon, J.-K., Park, B.-N., Ryu, E.-K., An, Y.-S. & Lee, S.-J. Current Perspectives on 89Zr-PET Imaging. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 4309 (2020).
297. Wei, W. *et al.* ImmunoPET: Concept, Design, and Applications. *Chem. Rev.* **120**, 3787–3851 (2020).
298. Auffinger, B., Spencer, D., Pytel, P., Ahmed, A. U. & Lesniak, M. S. The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. *Expert Rev Neurother* **15**, 741–752 (2015).

## Bibliographie

299. Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756–760 (2006).
300. Harland, S. P., Kuc, R. E., Pickard, J. D. & Davenport, A. P. Expression of EndothelinA Receptors in Human Gliomas and Meningiomas, with High Affinity for the Selective Antagonist PD 156707. *Neurosurgery* **43**, 890 (1998).
301. Berry, P. a., Zhang, Y. f., Carter, N. d., Jeffery, S. & Burchill, S. a. Decreased wild-type full-length Et-A and -B receptors in neuroblastoma and Ewing sarcoma cells. *Medical and Pediatric Oncology* **36**, 142–146 (2001).
302. Guichet, P.-O. *et al.* Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors. *Glia* **61**, 225–239 (2013).
303. Roux, G. L. *et al.* Proof-of-Concept Study of Drug Brain Permeability Between in Vivo Human Brain and an in Vitro iPSCs-Human Blood-Brain Barrier Model. *Sci Rep* **9**, 16310 (2019).
304. Wykes, V. *et al.* Importance and Evidence of Extent of Resection in Glioblastoma. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg* **82**, 075–086 (2021).
305. Brown, T. J. *et al.* Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncology* **2**, 1460–1469 (2016).
306. Gerritsen, J. K. W. *et al.* Safe surgery for glioblastoma: Recent advances and modern challenges. *Neuro-Oncology Practice* **9**, 364–379 (2022).
307. Hadjipanayis, C. G. & Stummer, W. 5-ALA and FDA approval for glioma surgery. *J Neurooncol* **141**, 479–486 (2019).
308. Stummer, W. *et al.* Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet Oncology* **7**, 392–401 (2006).
309. Shah, H. A. *et al.* Utility of 5-ALA for fluorescence-guided resection of brain metastases: a systematic review. *J Neurooncol* **160**, 669–675 (2022).
310. Boogerd, L. S. F. *et al.* Safety and effectiveness of SGM-101, a fluorescent antibody targeting carcinoembryonic antigen, for intraoperative detection of colorectal cancer: a dose-escalation pilot study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **3**, 181–191 (2018).
311. de Valk, K. S. *et al.* Dose-Finding Study of a CEA-Targeting Agent, SGM-101, for Intraoperative Fluorescence Imaging of Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* **28**, 1832–1844 (2021).
312. Gutowski, M. *et al.* SGM-101: An innovative near-infrared dye-antibody conjugate that targets CEA for fluorescence-guided surgery. *Surg Oncol* **26**, 153–162 (2017).
313. Miller, S. E. *et al.* First-in-human intraoperative near-infrared fluorescence imaging of glioblastoma using cetuximab-IRDye800. *J Neurooncol* **139**, 135–143 (2018).
314. Warram, J. M. *et al.* Fluorescence-guided resection of experimental malignant glioma using cetuximab-IRDye 800CW. *British Journal of Neurosurgery* **29**, 850–858 (2015).
315. Sun, R., Cuthbert, H. & Watts, C. Fluorescence-Guided Surgery in the Surgical Treatment of Gliomas: Past, Present and Future. *Cancers* **13**, 3508 (2021).
316. Li, D. *et al.* First-in-human study of PET and optical dual-modality image-guided surgery in glioblastoma using <sup>68</sup>Ga-IRDye800CW-BBN. *Theranostics* **8**, 2508–2520 (2018).
317. Goncalves, V., Denat, F., Bernhard, C. & Canovas, C. Biocompatible Modular Tetrazine Platform. (2018).

## Bibliographie

318. Azhdarinia, A., Ghosh, P., Ghosh, S., Wilganowski, N. & Sevick-Muraca, E. M. Dual-Labeling Strategies for Nuclear and Fluorescence Molecular Imaging: A Review and Analysis. *Mol Imaging Biol* **14**, 261–276 (2012).
319. Brami-Zylberberg, F., Grand, S., Le Bas, J.-F. & Meder, J.-F. IRM des oligodendrogliomes. *Neurochirurgie* **51**, 273–285 (2005).
320. Denis, H. *et al.* Les immunothérapies spécifiques dans le traitement des cancers. *Bulletin du Cancer* **106**, 37–47 (2019).

---

# Annexes

---

## I. Matériel et méthode supplémentaire du chapitre I

Les protocoles suivants ont été décrits dans l'article présenté dans le chapitre I et ne seront par conséquent pas réexpliqués dans cette partie :

- Protocole de SLIC-PCR pour la construction de nouveaux plasmides ;
- Production des anticorps chimériques dans le système expiCHO ;
- Culture cellulaire CHO-ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>/WT ;
- Protocole de cytométrie en flux ;
- Protocole d'obtention des courbes de dénaturation des anticorps par le Tycho ;
- Protocole de DLS ;
- Protocole de SDS PAGE.

### 1) *ThioFab-xiRB49-P125T*

La construction et la production du fragment d'anticorps a été réalisé selon les mêmes protocoles précédemment détaillés dans les articles des chapitres I, II et III. Afin de conjuguer le fragment Fab-xiRB49-P125T, une alanine en position 121 a été remplacée par une cystéine sur le vecteur pTT5 codant pour la chaîne lourde de l'anticorps par mutagenèse dirigée. Le fragment résultat est appelé ThioFab-xiRB49-P125T.

### 2) *Test de compétition pour trouver la fonctionnalité du ThioFab*

Afin de démontrer la fonctionnalité du ThioFab-xiRB49-P125T un test de compétition avec le xiRB49 sur des cellules CHO-ET<sub>B</sub> a été mis en place. Pour cela, 12 tubes contenant  $3.10^5$  cellules CHO-ET<sub>B</sub> ont été pré-incubés avec soit, un excès de 500nM de Fab-RB49-P125T fonctionnel, soit un excès de 500nM de ThioFab-xiRB49-P125T, soit avec du PBS 1X toute une nuit à 4°C. Le lendemain 3 lavages successifs au PBS 1X (pH 7,4) ont été réalisés, puis une gamme de dilution en 12 points de l'anticorps xiRB49 allant de 0 nM à 200 nM a été ajoutée aux cellules pré-incubées en présence des 3 conditions déjà citées. La gamme d'anticorps xiRB49-P125T est incubée avec les cellules CHO-ET<sub>B</sub> pendant 4 heures à 4°C. Pour éliminer

l'anticorps xiRB49-P125T non fixé, une étape de 3 lavages consécutifs au PBS 1X a été réalisé. Par la suite, les cellules ont été incubées 3,5 h avec l'anticorps secondaire F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG-Fc-humain polyclonal couplé à l'Alexa Fluor™ 488nm (H10120) dilué au 1/500. Afin d'éliminer l'excédent d'anticorps secondaire non fixé, 3 lavages au PBS 1X ont été réalisés. Les 3 courbes de liaison ont été lues par le cytomètre en flux FACSCalibur à une longueur d'onde de 488 nm. Les données d'Intensité Moyenne de Fluorescence (MFI) ont été normalisées de 0% à 100% avec le logiciel GraphPad Prism (v9.0.1) et la fonction « one site specific binding » a été appliquée pour obtenir les courbes de liaisons présentées dans la partie résultat. Cette fonction permet l'obtention de la courbe de liaison ainsi que la valeur du Kd apparent et du Bmax. Les données sont représentées en moyenne ± SD.

### Conditions test de compétition

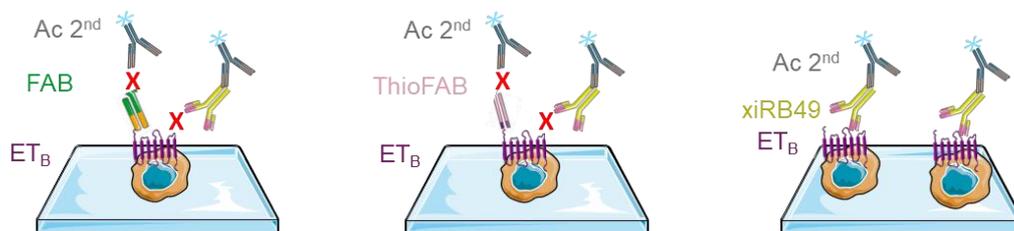
Protocole:

- ❖ incubation des Fabs (500nM) overnight 4°C
- ❖ 3 lavages PBS
- ❖ Ajout de la gamme xiRB49-P125T, incubation 4h – 4°C
- ❖ 3 lavages PBS
- ❖ Révélation anticorps secondaire de chèvre polyclonal anti-human-IgG-AF488 (H10120) 3h – 4°C

➤ Fab-xiRB49 + xiRB49

➤ ThioFab-xiRB49 + xiRB49

➤ xiRB49



### 3) Analyse statistique :

Le logiciel GraphPad Prism (v9.0.1) a été utilisé pour les analyses statistiques. Afin de comparer deux groupes de données, un test t de Student (bilatéral) a été effectué (\* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001, \*\*\*\* P < 0,0001).

## II. Matériel et méthode supplémentaire du chapitre IV

Les protocoles suivants ont déjà été détaillées dans les dernières publications et ne seront par conséquent pas réexpliqués dans cette partie :

- Protocole de cytométrie en flux (**articles chapitre I, II, III**) ;
- Culture cellulaire CHO-ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>/WT (**articles chapitre I, II**) ;
- Culture cellulaire des Gli7 et leur implantation cérébrale de façon orthotopique par stéréotaxie dans des cerveaux de souris nude (**articles chapitre III**) ;
- Production des anticorps chimériques dans le système expiCHO (**articles chapitre I, II, III**) ;
- Protocole de SLIC-PCR pour la construction de nouveaux plasmides (**articles chapitre I**) ;
- Protocole de radio marquage et d'évaluation de sa pureté par HPLC (**articles chapitre III**) ;
- Protocole d'imagerie obtenu par PET-CT et la reconstruction des images (**articles chapitre III**) ;
- Protocole d'analyse des données extrapolées de l'imagerie PET-CT pour la quantification des données (**articles chapitre III**) ;
- Protocole de congélation des cerveaux prélevés et leur manipulation *ex vivo* telles que les coupes faites au cryostat, les colorations à l'hématoxyline éosine (H&E) (**articles chapitre III**)

Un matériel et méthodes de manipulations non détaillés dans les articles a été ajouté dans cette partie. Le matériel et méthode du chapitre IV est détaillé de la même façon que les résultats, c'est-à-dire en deux parties distinctes.

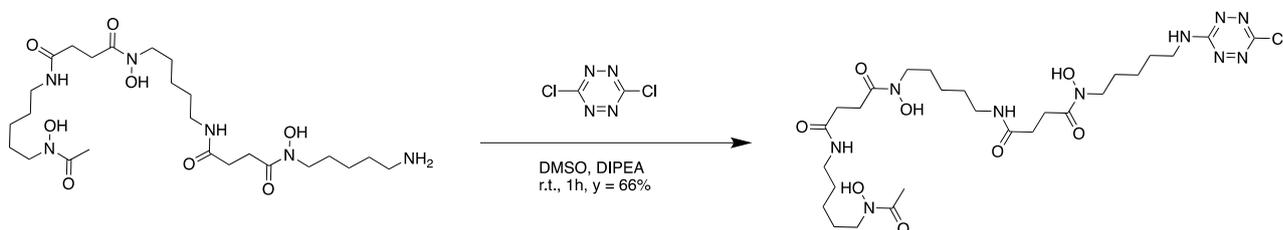
1) *Partie 1 : Validation de la chirurgie guidée par fluorescence médiée par les anticorps ciblant les Récepteurs des endothélines sur un modèle pré-clinique de tumeurs sous-cutanées*

a. *Préparation des immunoconjugués*

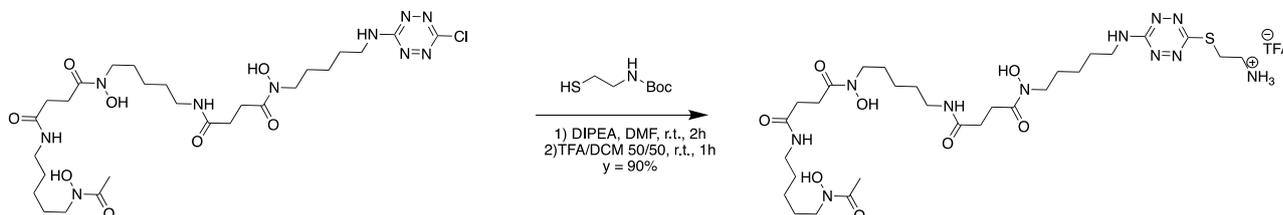
### Synthèse MOMIP

La plateforme *MonOolecular Multimodal Imaging Probes* a été synthétisée par nos collaborateurs de l'ICMUB. Elle a été réalisée en suivant les différentes étapes représentées par les schémas ci-dessous :

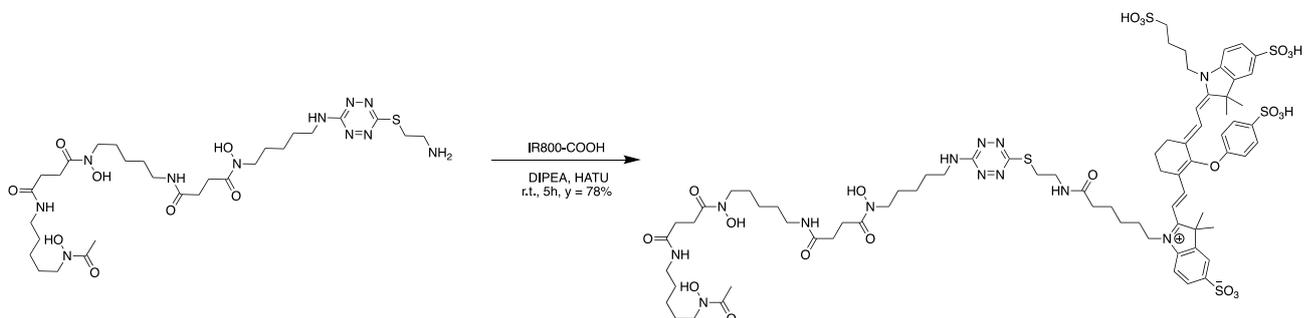
#### Etape 1 : DFO-NH-Tz-Cl



#### Etape 2 : DFO-NH-Tz-Cl



#### Etape 3 : DFO-NH-Tz-S-IR800



La synthèse finale du MOMIP comporte d'une part le DFO et d'autre part le fluorochrome IRDye800CW.

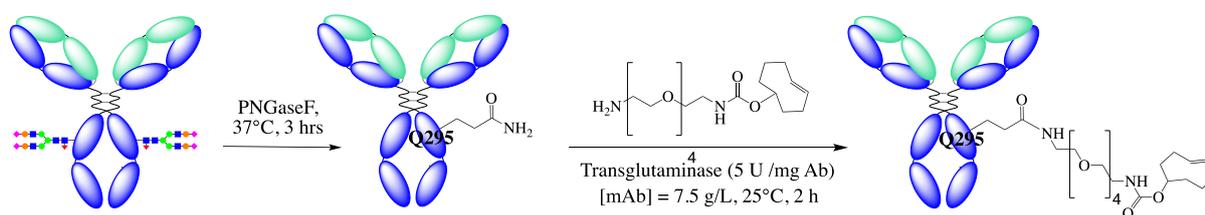
## Préparation des anticorps déglycosylés

Entre chaque étape, les anticorps ont été suivis par HPLC en phase inverse (Vanquish, Thermo Fisher Scientific) couplée à une spectrométrie de masse Orbitrap à haute résolution (Exploris 240, Thermo Fisher Scientific) avec une source ESI. Les spectres de masse et UV ont permis de valider toutes les étapes de conjugaison et de pureté mais ne seront pas présentés puisque les résultats ont été fait par les partenaires de l'ICMUB. Le rapport nombre de molécule greffé/anticorps a été déterminé par comparaison des masses des anticorps natifs et conjugués.

Pour conjuguer cette plateforme synthétisée par l'ICMUB, les anticorps xiRA63 et xiRB49, produits et validés selon les procédures précédemment détaillées, ont été déglycosylés. La déglycosylation du xiRA63 ou du xiRB49 a été réalisée en ajoutant 5 unités d'enzyme PNGaseF recombinante (New England BioLabs, Ipswich, MA) pour 1 µg de mAb tamponné dans 50 mM de phosphate de sodium, pH 7,5 (GlycoBuffer 2 10x de New England Biolabs). La réaction a ensuite été incubée à 37 °C pendant 3 h, puis purifiée par chromatographie d'exclusion de taille (Sephadex G-25 M, colonne PD-10, GE Healthcare). Les anticorps déglycosylés ont été concentrés dans du PBS (pH 7,4) à l'aide d'unités de filtration centrifuge avec un seuil de poids moléculaire de 50 000 Da (Amicon™ Ultra 2 mL Centrifugal Filtration Units, Millipore Corp., Billerica, MA).

## Conjugaison site spécifique des anticorps

Une fois les anticorps déglycosylés, leurs conjugaisons à un groupement TCO a été effectué *via* l'utilisation de la transglutaminase comme l'indique le schéma suivant.

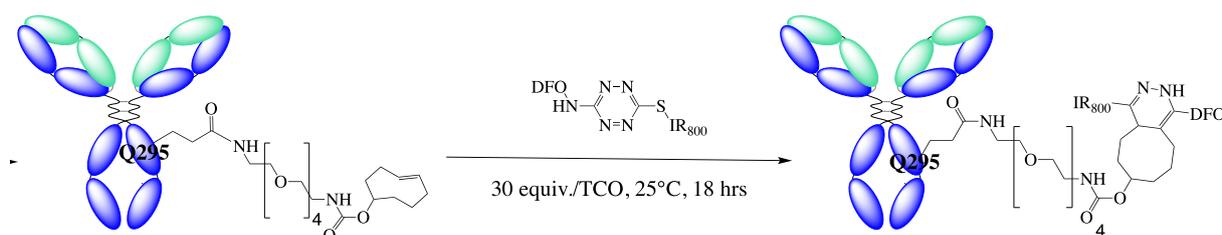


Pour ce faire, l'anticorps xiRA63 ou le xiRB49 déglycosylés ont été incubés avec du TCO-PEG4-NH<sub>2</sub> (60 équiv., à 60mM dans du PBS), de la MTGase (5U/mg d'anticorps). La réaction a été incubée à 25 °C pendant 2 h, puis purifiée par chromatographie d'exclusion de taille (Sephadex G-25 M, colonne PD-10, GE Healthcare) et concentrée en PBS (pH 7,4) à

## Annexes

l'aide d'unités de filtration centrifuge avec une colonne de 50 000 Da (Amicon™ Ultra 2 mL Centrifugal Filtration Units, Millipore Corp., Billerica, MA) pour obtenir le xiRA63-TCO et le xiRB49-TCO. Dans les deux cas un échantillon a été utilisé pour estimer le degré de conjugaison du TCO sur l'anticorps par spectrométrie de masse : DOL = 2.

Après conjugaison du TCO à l'anticorps, la plateforme Tz-IR800 a été conjuguée par réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse (IEDDA).



La plateforme MOMIP DFO-Tz-IR800 (20 équiv. par TCO accessible, 30 mmol/L dans du DMSO) est ajoutée à la solution de xiRA63-TCO ou de xiRB49-TCO. Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant une nuit et purifié par chromatographie d'affinité (colonne Hitrap protein A Mabselect Xtra, Cytiva) donnant dès lors le xiRA63-MOMIP-IR800 et le xiRB49-MOMIP-IR800. Le degré de marquage du xiRA63-MOMIP-IR800 a été mesuré par spectroscopie UV ( $1,9 \pm 0,1$ ) et par spectrométrie de masse ( $\text{DOL} = 0,8 * 2 = 1,6$ ) :  $1,6 \leq \text{DOL} \leq 1,9$ . De même pour le xiRB49-MOMIP-IR800 par UV ( $1,8 \pm 0,1$ ) et par spectrométrie de masse ( $\text{DOL} = 0,8 * 2 = 1,6$ ) :  $1,6 \leq \text{DOL} \leq 1,8$ .

### *b. Expérimentation in vivo*

Des souris nues âgées de 4 semaines se sont vues xéngreffer des tumeurs sous-cutanées des cellules CHO-ET<sub>A</sub>, CHO-ET<sub>B</sub> et CHO-WT. Pour cela, 100  $\mu\text{L}$  contenant  $5 \cdot 10^6$  cellules vivantes ont été injectées pendant que les souris étaient anesthésiées avec 2,5% d'isoflurane. Les souris ont ensuite été injectées avec 100  $\mu\text{g}$  d'anticorps fluorescent xiRB49-MOMIP-IR800 ou xiRA63-MOMIP-IR800 par voie intraveineuse 5 à 7 jours post implantation et dépendamment du volume de la tumeur d'environ 64  $\text{mm}^3$  selon les groupes suivants :

- N=3 souris portant une tumeur CHO-ET<sub>A</sub> injectée avec ou xiRA63-MOMIP-IR800
- N=3 souris portant une tumeur CHO-WT injectée avec ou xiRA63-MOMIP-IR800

## Annexes

- N=3 souris portant une tumeur CHO-ET<sub>B</sub> injectée avec ou xiRB49-MOMIP-IR800
- N=3 souris portant une tumeur CHO-WT injectée avec ou xiRB49-MOMIP-IR800

### *c. Imagerie KIS800 de KaerLabs fluorescente*

Les séquences ont été enregistrées sous forme de séries d'images TIFF pour illustrer nos résultats pendant cette thèse avant d'être exportées sous forme de films. Un même temps d'excitation a été appliqué pour les groupes de souris injectées soit avec le xiRA63-MOMIP-IR800, 300 ms, soit avec le xiRB49-MOMIP-IR800, 100 ms. Les souris ont été imagées à 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et J7 post-injection de l'anticorps fluorescent. À J7 post-injection, une résection *post mortem* de la tumeur fluorescente a été effectuée.

### *d. Biodistribution ex vivo avec KIS800 de KaerLabs*

Une fois l'ablation de la tumeur réalisée, une étude de biodistribution a été conduite chez une des souris CHO-ET<sub>A</sub> une souris CHO-ET<sub>B</sub>. Les organes clés (cœurs, os, muscle, foie, rate, estomac, rein, intestin, cerveaux, tumeurs) ont été prélevés *ex vivo*. Une mesure de la fluorescence résiduelle dans chacun des organes a été réalisée par l'appareil KIS800 avec un temps d'exposition de 800 ms pour les souris injectées avec le xiRA63-MOMIP-IR800 et de 400 ms pour celles injectées avec le xiRB49-MOMIP-IR800.

## *2) Partie 2 : Preuve de concept in vivo de la chirurgie guidée par fluorescence d'un glioblastome humain et prédéfinie par une imagerie nucléaire pré-opérative à l'aide de l'anticorps xiRA63*

### *a. Préparation des immunoconjugués*

#### **Anticorps N297Q**

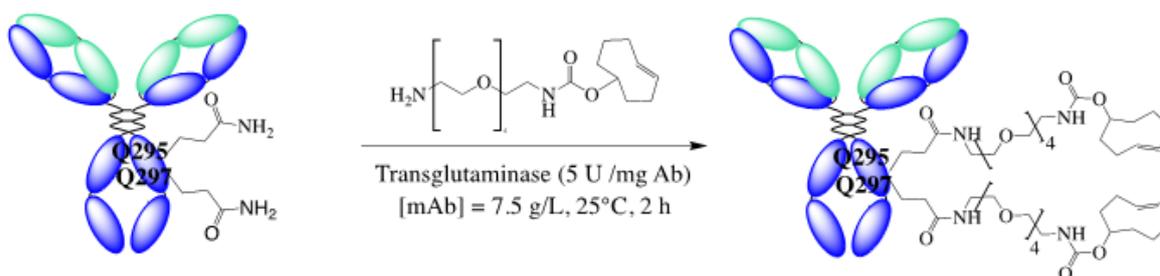
La construction de l'anticorps chimérique a été réalisée selon les mêmes protocoles précédemment détaillés dans les articles des chapitres I, II et III. Afin d'augmenter le degré de conjugaison de notre anticorps avec la cage MOMIP-IR800, l'asparagine en position 297 a été remplacée par une glutamine sur le vecteur pTT5 codant pour la chaîne lourde de l'anticorps par protocole SLIC-PCR.

#### **Synthèse MOMIP**

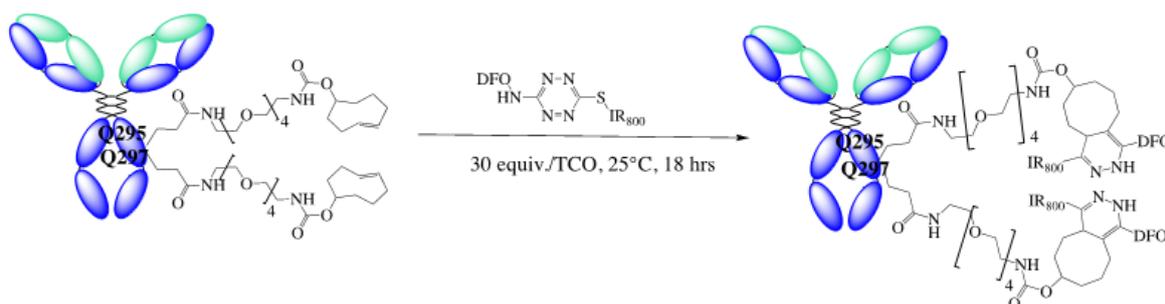
*Idem* à la première partie.

### Conjugaison site spécifique des anticorps

Cette fois-ci, du fait de la présence de la mutation N297Q, aucune déglycosylation n'a été nécessaire puisque l'anticorps n'en porte plus. Aussi l'anticorps xiRA63-N297Q a directement été conjugué au TCO selon le protocole décrit en première partie. Le degré de conjugaison de l'anticorps au TCO a été mesuré par spectrométrie de masse : DOL = 4.



De même qu'en première partie, la plateforme MOMIP DFO-Tz-IR800 (10 équiv. par TCO accessible, 30 mmol/L dans du DMSO) est ensuite ajoutée à la solution de xiRA63-N297Q-TCO. Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant une nuit et purifié par chromatographie d'affinité (colonne Hitrap protéine A Mabsselect Xtra, Cytiva) pour donner du xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800. Le degré de marquage du xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 a été mesuré par spectroscopie UV ( $3,1 \pm 0,1$ ) et par spectrométrie de masse DOL=2,5.



#### b. Expérimentation *in vivo*

L'implantation orthotopique cérébrale de cellules souches de glioblastome Gli7 (ETA<sup>+</sup>) a été effectuée en suivant le protocole décrit dans l'article du chapitre III de ce manuscrit. Dans cette expérience, un groupe de 8 souris ont été implantées avec ces CSG et 3 souris ont été

implantées suivant la même procédure et avec le même matériel mais en remplaçant les cellules par 2.5µL de PBS.

Par la suite, à 76 jours post-implantation des cellules de glioblastome, un total de 3 souris ont reçu un bolus intraveineux de 1mg d'anticorps RA63. Ce groupe est alors appelé groupe de compétition ou de déplacement. Enfin, à 79 jours post-implantation cellulaire, un total de 11 souris ont reçu un bolus intraveineux de [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 (114,9 µC ± 2,6 µC ; 82,7 µg ± 1,9 µg).

### c. iTLC

L'iTLC (*Instant thin layer chromatography*) ou chromatographie sur couche mince (CCM) permet d'évaluer rapidement l'efficacité du radiomarquage de l'anticorps. Notre protocole s'inspire du protocole du Dr. Vosjan *et al* (<https://doi.org/10.1038/nprot.2010.13>). Aussi, 5 µL à 10 µL d'un échantillon de la réaction de radiomarquage est prélevé après 1 h d'incubation à 37 °C et est déposé sur une phase stationnaire composée d'une couche de gel de silice (Agilent Technologies). L'élution s'effectue grâce à par une phase mobile de citrate de sodium (20 mM, pH 5). L'activité sur le papier a été détectée à l'aide d'un scanner d'imagerie Mini-Scan TLC (Eckert & Ziegler, Allemagne) équipé d'un détecteur gamma B-FC-3600 à une vitesse de 1 mm.s<sup>-1</sup>.

### d. iTLC étude de la stabilité

La stabilité *in vivo* à 48h p.i. de la conjugaison du Zirconium 89 à l'anticorps *via* la MOMIP-DFO a été évaluée par iTLC. Dans ce contexte, un prélèvement de sang par intracardiaque, 500 µL à 1 mL de sang, a été effectué sur 5 souris. Le sang prélevé a été centrifugé 10 minutes à 1000g afin de récupérer le plasma. Ensuite, 20µL de plasma ont été déposés sur CCM. Après migration, la CCM est ensuite coupée en 2 bouts, l'une contenant le dépôt de la solution plasmatique et l'autre le front de migration aussi appelé « partie haute » de la CCM. L'activité des deux bouts de CCM sont lus avec un compteur gamma (compteur gamma Cobra, Packard). Si la radioactivité est obtenue au niveau de la partie basse de la CCM, alors l'anticorps est toujours radiomarqué et donc stable 48h p.i. *in vivo*. A l'inverse, si la radioactivité est retrouvée dans la partie haute de la CCM, alors le radioélément ne se localise plus au niveau de l'anticorps mais circule librement dans le plasma signifiant ainsi que notre radioconjugaison n'est pas stable à 48h p.i. *in vivo*.

*e. Autoradiographie et fluorescence ex vivo*

L'un des cerveaux ayant été injecté avec le [<sup>89</sup>Zr]Zr-xiRA63-N297Q-MOMIP-IR800 et présentant une tumeur Gli7, a été congelé à - 80 °C à 48 h p.i. sans être réséqué. Le cerveau congelé a été cryo-sectionné en coupes de 12 µm d'épaisseur et les coupes tumorales résultantes ont été imagées avec l'appareil KIS800 de Kaer Labs. Cette manipulation a permis la reconstruction 3D de la fluorescence. Pour montrer une co-localisation entre la fluorescence et la radioactivité, des coupes localisées sur l'ensemble du cerveau ont été autoradiographiées. Pour confirmer la présence de radioactivité au niveau tumoral, les lames ont été exposées à un film autoradiographique et déposées dans une cassette (Molecular Dynamics) pendant 24 h. La lecture s'effectue dans un imageur Storm 860 Molecular Imager, Molecular Dynamics. Le signal émis par l'écran correspond directement à la radioactivité sur la coupe.

*f. Imagerie KIS800 de Kaer Labs fluorescente*

La résection tumorale guidée par fluorescence a été effectuée à l'aide de l'appareil KIS800 de Kaer Labs avec un temps d'exposition de 100 ms. Ce faible temps d'exposition nous a permis d'obtenir des vidéos en format « .tiff » qui seront présentées lors de la soutenance. L'un des cerveaux sur lequel résidait une fluorescence a également été imagé à un temps d'exposition de 200 ms et 1000 ms.

