



HAL
open science

Développement d'un bio-hybride conjuguant lymphocytes T gamma delta et polymersome : combinaison de la thérapie cellulaire et du drug delivery

Selma Cornillot-Clément

► To cite this version:

Selma Cornillot-Clément. Développement d'un bio-hybride conjuguant lymphocytes T gamma delta et polymersome : combinaison de la thérapie cellulaire et du drug delivery. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0270 . tel-04851213

HAL Id: tel-04851213

<https://theses.hal.science/tel-04851213v1>

Submitted on 20 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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ IMMUNOLOGIE

Par Selma CORNILLOT-CLEMENT

**Développement d'un biohybride conjuguant lymphocytes T $\gamma\delta$ et
polymersomes : combinaison de la thérapie cellulaire et du drug delivery**

Sous la direction de Julie DECHANET-MERVILLE

Soutenue le 25 Novembre 2024

Membres du jury :

M. Emmanuel SCOTET Directeur de Recherche, UMR 1307, NantesPrésident du jury
Mme Mary POUPOT..... Chargée de Recherche, UMR 1037, Toulouse Rapporteur
M. Harm-Anton KLOK..... Professeur des Universités, EPFL, Lausanne Rapporteur
Mme Julie DECHANET-MERVILLE..... Directrice de Recherche, UMR 5164, Bordeaux.....Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tenais à remercier chacun des membres de mon jury, **Mary Poupot**, **Harm-Anton Klok**, **Emmanuel Scotet** et **Sébastien Lecommandoux**, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Un grand merci à toi **Julie** de m'avoir donné l'opportunité de réaliser mes travaux de thèse au sein de ton équipe. J'ai beaucoup appris à tes côtés, et je te remercie pour ta confiance et tes retours qui ont enrichi mes réflexions et m'ont permis de progresser, tant sur le plan scientifique que personnel. Je tenais également à te remercier **Sébastien**. Malgré les difficultés rencontrées tu as toujours été enthousiaste quant au projet et aux résultats que j'ai pu obtenir. Merci pour ton aide, tes réflexions, ta bonne humeur et ta motivation.

Merci à toi **Coline**, ma seconde directrice de thèse. Je ne te le dirai jamais assez mais merci encore et encore pour ta bonne humeur, ton aide, ta bienveillance, ta patience, ton organisation mais aussi ta capacité à dédramatiser toute situation (la liste peut être encore longue mais je vais m'arrêter là). Je n'aurais jamais pu écrire une thèse comme celle-ci sans toi alors encore merci. Ça a été un réel plaisir de passer ces deux années de travail, de congrès, de visites et de bars avec toi et j'espère pouvoir te recroiser autour d'une bière (ou deux) tout au long de mon voyage !

Iris, **Anaïs** et **Pauline** mille mercis d'avoir été là pendant ces trois années, une confiance et un soutien infaillible. Entre l'une qui nous aide à communiquer où que l'on soit, l'autre qui nous organise tout à la minute près et la dernière qui accepte toute proposition tel un électron libre, je trouve que l'on forme un beau quatuor (ne parlons pas de l'organisation du dodo pour que chacune puisse dormir paisiblement, je risque d'en gêner certaines).

Non sans rire, merci **Iris** de m'avoir soutenue. Mon arrivée n'aurait jamais été la même sans toi, les deux pioupiou perdus au milieu de tout ce monde. Faleminderit (pour que pour une fois on te parle dans ta langue maternelle). Merci **Anaïs** d'avoir supporté mon côté beauf quand le tien n'était pas encore assumé. Nos radars à mitos et à ringards sont plus qu'aiguillés maintenant #Bababoy. Et merci à toi **Pauline** d'avoir été un repère ici, de m'avoir canalisée dans certaines situations quand je n'en étais pas capable toute seule et je ne suis pas peu fière

de t'avoir initié au langage « onomatopée », tout est plus simple depuis. Je suis incapable d'en écrire davantage mais vous allez plus que me manquer pendant ce voyage mais je serai vite de retour pour un spritz, un verre de vin ou un diablo.

Merci **Juliette** pour ton sarcasme à toute épreuve qui m'a permis de relativiser sur BEAUCOUP de situations. Merci pour ces matchs de rugby, ces restos, ces verres et tous ces moments qui m'ont permis de sortir la tête de l'eau. Et surtout, merci pour tes réels Instagram qui m'ont fait bien rire bien que j'ai eu beaucoup de mal à tous les regarder en temps et en heure.

Merci à toi, **Doctor Sebastian Lollo** (ne pas oublier l'accent). Un énorme merci pour ton écoute qui est si précieuse, ton soutien et tout simplement d'être la personne que tu es.

Merci à mes partenaires de bringue **Alex, Pauline, Mathilde**. Un vrai bol d'air frais tout au long de cette thèse. Merci pour votre authenticité, votre bonne humeur et surtout votre beauferie à toute épreuve.

Merci **Agathe** d'avoir été le rayon de soleil de notre bureau pendant ces quelques mois. Bientôt notre tour de sourire dans la rue, de faire partie des gens heureux.

Je voulais aussi remercier tous les copains qui ont partagé mon bureau ou les bureaux voisins et qui m'ont accompagnée de près ou de loin pendant ces années, chacun à leur façon : **Eloïse, Charlène, Eoghann, John, Marine, Aurélia** et j'en passe.

Merci vous, **Nathalie** et **Vanja**, de toujours avoir eu le petit mot (un peu bancal) mais réconfortant quand on en avait besoin pendant ces derniers mois.

Je voulais également vous remercier **Maria** et **Nicolas** pour votre confiance et pour m'avoir donné confiance lors des cours que j'ai pu réaliser.

Je voulais aussi remercier toutes les équipes d'ImmunoConcept et plus particulièrement l'équipe 1 (**Maria, Mimi, Johan, Jonathan, Hannah, Vincent** et tous les autres) pour votre aide et vos retours pendant les réunions, pour votre temps. Merci aussi pour l'organisation de ces teams building qui nous ont permis de passer des supers moments entre nous. Merci aussi à toi **Gabriel** pour avoir écrit une thèse aussi claire et complète avec une bibliographie plus que détaillée ! Mais merci surtout pour ta bienveillance et pour m'avoir formée au début de ma thèse.

Merci au Gigo (**Johan, Aurélia, Agathe, Cécile, Katia, Thomas**), sans qui cette merveilleuse retraite n'aurait pas eu lieu. Merci de m'avoir permis de procrastiner sans que ça n'y paraisse et d'avoir fait ressortir ma pâte artistique lors de ces oscars.

Merci à **Atika** et **Jean-Michel** pour toutes nos discussions et pour votre temps pour mes analyses de cytométrie. Ces nanoparticules nous auront donné du fil à retordre !

Merci à vous deux **Anouk** et **Eloïse**, pour m'avoir ramenée en stage d'observation de troisième et d'avoir tenté de former une biologiste à vos techniques basiques de chimie. Merci de m'avoir aidée à avancer ce projet malgré tout ce que vous aviez à faire à côté.

Merci à toi **Emmanuel** pour ton temps pendant toutes ces heures de microscopie confocale et pour ton optimisme en toute circonstance. Merci d'avoir cru en ce projet et d'avoir donné de ta personne pour m'aider à avancer.

A big thank you to you, **Liam**, for your help with this project, for the time you gave me, and all the advice you provided.

Clarisse, je ne saurais que dire ici à par merci mais pas uniquement pour cette période de thèse. Merci d'être la personne que tu es, d'avoir été là dans les moments les plus difficiles depuis maintenant plus de 4ans. Et merci à tous mes autres copains limougeauds, **Milène, Kenza, Camille, Maëlle, Ramazan**. Quand on est plusieurs dans la même panade on se sent moins seuls.

Des milliers de mercis à toi **Léa**. Merci de faire partie de ma vie depuis 20ans maintenant, et d'avoir réussi à supporter mon caractère, mes absences et mes 10 vocaux de 2 minutes tous les 26 du mois pour rattraper le temps.

Et pour finir un énorme merci à ma famille. Merci **Papa** et **Maman** de m'avoir supportée pendant ces trois années, de m'avoir soutenue, écoutée et rassurée. Merci à vous **Isy, Axel, Thib** et **Marie**. Je serais incapable de dire tout ce que j'aimerais dire alors je veux juste vous dire merci pour votre soutien, pour votre écoute, pour votre compréhension. Merci d'avoir été là lors de moments précieux pendant lesquels j'ai pu complètement déconnecter.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|----|
| Liste des abréviations | 1 |
| Table des figures..... | 3 |
| Table des tableaux..... | 6 |
| Introduction..... | 7 |
| Chapitre 1 : Chimie Click et Polymersome : des innovations au service de la thérapie ciblée | 7 |
| 1. Concept de nanotechnologie et nanomédecine | 7 |
| 1.1. Découverte des nanotechnologies..... | 7 |
| 1.2. Des nanotechnologies aux nanomédecines..... | 8 |
| 1.3. Développement des nanoparticules | 10 |
| 1.3.1. Les nanoparticules d'or | 10 |
| 1.3.2. Les nanoparticules lipidiques..... | 11 |
| 2. Les polymersomes : des nanoparticules de choix | 12 |
| 2.1. Une composition modulable | 13 |
| 2.1.1. Sélection du copolymère hydrophobe | 13 |
| 2.1.2. Protection par un copolymère hydrophile..... | 14 |
| 2.2. Contrôle de la biodistribution | 15 |
| 2.2.1. Ciblage passif..... | 15 |
| 2.2.2. Ciblage actif..... | 17 |
| 2.2.3. Libération contrôlée des molécules encapsulées | 19 |
| 3. Association des nanoparticules à la biologie cellulaire | 20 |
| 3.1. Utilisation des cellules immunitaires comme vecteurs de nanoparticules..... | 21 |
| 3.1.1. Erythrocytes | 21 |
| 3.1.2. Leucocytes..... | 22 |
| 3.1.2.1. Neutrophiles..... | 22 |

| | |
|---|----|
| 3.1.2.2. Monocytes et macrophages..... | 23 |
| 3.1.2.3. Lymphocytes T..... | 24 |
| 3.2. Concept de la chimie bio-orthogonale..... | 25 |
| 3.2.1. La liaison de Staudinger | 26 |
| 3.2.2. Copper(I)-catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition : CuAAC | 28 |
| 3.2.3. Strain-promoted azide–alkyne cycloadditions (SPAAC) | 29 |
| 3.2.3.1. Fonctionnalisation des polymersomes avec les cyclooctynes | 30 |
| 3.2.3.2. Développement des cyclooctynes | 30 |
| 3.3. Expression d'un azide organique par les cellules : la modification glycométabolique | 32 |
| 3.3.1. Sélection des azido-sucres | 34 |
| 3.3.1.1. N-azidoacétylglucosamine tétra-acétylée : Ac ₄ GlcNAz..... | 35 |
| 3.3.1.2. N-azidoacétylmannosamine tétra-acétylée : Ac ₄ ManNAz..... | 36 |
| 3.3.1.3. N-azidoacétylgalactosamine tétra-acétylée : Ac ₄ GalNAz | 38 |
| 3.3.2. Couplage des cellules avec les nanoparticules <i>via</i> la chimie click | 39 |
| Chapitre 2 : Les lymphocytes T $\gamma\delta$ humains : de la défense immunitaire à la révolution thérapeutique | 41 |
| 1. Découverte des lymphocytes T $\gamma\delta$ | 41 |
| 2. Développement des lymphocytes T $\gamma\delta$ humains..... | 42 |
| 2.1. Développement thymique des lymphocytes T $\gamma\delta$ | 42 |
| 2.2. Evolution vers deux populations distinctes majoritaires : lymphocytes TV δ 1 et V δ 2..... | 44 |
| 2.3. Localisation en fonction du TCR exprimé | 45 |
| 3. Une multitude de récepteurs exprimés à la surface des lymphocytes T $\gamma\delta$ | 46 |
| 3.1. Le TCR $\gamma\delta$ | 47 |
| 3.2. Les récepteurs de costimulation | 48 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.3. | Les récepteurs de cytokines | 49 |
| 3.4. | Les récepteurs NK..... | 50 |
| 3.5. | Les récepteurs inhibiteurs | 51 |
| 4. | Les fonctions effectrices multiples des lymphocytes $T\gamma\delta$ | 52 |
| 4.1. | Rôle dans l'homéostasie..... | 52 |
| 4.1.1. | Implication dans la maturation et l'activation de divers types cellulaires .. | 53 |
| 4.1.2. | Fonctions régulatrices | 54 |
| 4.1.3. | Homéostasie tissulaire | 55 |
| 4.2. | Ciblage direct des cellules infectées ou transformées | 55 |
| 4.2.1. | Lymphocytes $T\gamma\delta$ et cancer..... | 56 |
| 4.2.1.1. | Rôle anti-tumoral | 56 |
| 4.2.1.1. | Rôle pro-tumoral..... | 57 |
| 4.2.1.2. | Utilisation comme marqueur de pronostic..... | 59 |
| 4.2.2. | Infection virale..... | 60 |
| 4.2.2.1. | Infection par le cytomégalovirus..... | 60 |
| 4.2.2.1. | Autres virus | 62 |
| 4.2.3. | Infection bactérienne..... | 63 |
| 4.2.4. | Infection parasitaire | 64 |
| 5. | Potentiel thérapeutique des lymphocytes $T\gamma\delta$ | 65 |
| 5.1. | Développement d'un protocole d'expansion des lymphocytes T $V\delta 1$ (cellules DOT)..... | 66 |
| 5.2. | Utilisation des lymphocytes $T\gamma\delta$ dans le développement de thérapie ciblée.... | 67 |
| | Objectif | 70 |
| | Matériels et méthodes | 72 |
| 1. | Culture cellulaire..... | 72 |
| 2. | Expansion des DOTS..... | 72 |

| | |
|--|----|
| 3. Phénotypage des DOT après amplification..... | 73 |
| 4. Formulation des polymersomes | 73 |
| 4.1. Electroformation | 73 |
| 4.2. Double émulsion | 74 |
| 4.3. Extrusion..... | 74 |
| 5. Détermination de la taille et de la concentration des polymersomes | 74 |
| 5.1. Détermination de la taille..... | 74 |
| 5.2. Détermination de la concentration | 75 |
| 6. Modification métabolique des cellules et réaction click avec le FAM-DBCO | 75 |
| 7. Phénotypage des PBMC..... | 76 |
| 8. Activation des cellules après la chimie click | 77 |
| 8.1. Activation PMA (phorbol 12-myristate-13-acetate)/Ionomycine | 77 |
| 8.2. Activation DOT..... | 77 |
| 8.3. ELISA | 77 |
| 9. Élaboration du biohybrid cellules-polymersomes | 77 |
| 10. Microscopie confocale | 78 |
| 11. Analyses statistiques | 79 |
| 12. Tableaux des réactifs..... | 79 |
| Résultats..... | 81 |
| 1. Optimisation de la modification métabolique et de la réaction click à l'aide d'un DBCO fluorescent | 81 |
| 1.1. Utilisation d'une lignée cellulaire Jurkat : les JRT3 LES | 81 |
| 1.1.1. Cinétique d'assimilation des trois azido-sucres d'intérêt : l'Ac ₄ GlcNAz, l'Ac ₄ GalNAz et l'Ac ₄ ManNAz..... | 81 |
| 1.1.2. Optimisation de la concentration des azido-sucres | 83 |
| 1.1.3. Vérification de la capacité d'activation des JRT3 LES | 86 |

| | |
|---|-----|
| 1.2. Validation du protocole sur un modèle physiologique : les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) | 88 |
| 1.2.1. Cinétique d'assimilation des deux azido-sucres : l'Ac ₄ GalNAz et l'Ac ₄ ManNAz..... | 89 |
| 1.2.2. Vérification de la capacité d'activation des cellules..... | 91 |
| 1.3. Validation du protocole sur le modèle d'intérêt : les lymphocytes T δ 1 (DOT) . | 93 |
| 1.3.1. Résultats de l'expansion des DOT | 93 |
| 1.3.2. Vérification de l'assimilation des azido-sucres après expansion..... | 94 |
| 1.3.3. Analyse de la stabilité des azido-sucres à la surface des DOT | 96 |
| 1.3.4. Vérification de la capacité d'activation des DOT | 97 |
| 2. Mise en œuvre du biohybride « DOT – polymersomes » | 98 |
| 2.1. Formulation des polymersomes..... | 99 |
| 2.1.1. Production..... | 99 |
| 2.1.2. Comptage | 101 |
| 2.2. Evaluation de l'absence d'internalisation des polymersomes | 104 |
| 2.3. Optimisation du protocole de réaction click | 104 |
| 2.3.1. Optimisation du polymersome | 105 |
| 2.3.2. Optimisation de l'interaction cellule - polymersome | 108 |
| 2.3.3. Optimisation du ratio cellule - polymersomes..... | 112 |
| Discussion et perspectives..... | 116 |
| 1. Optimisation de la modification métabolique et de la réaction click à l'aide d'un DBCO fluorescent | 116 |
| 1.1. Sélection de l'azido-sucre optimal..... | 116 |
| 1.2. Stabilité / Conservation des glycanes modifiés à la surface cellulaire | 117 |
| 1.2.1. Hypothèse d'un recyclage métabolique des glycanes azidés | 118 |
| 1.2.2. Hypothèse de la division cellulaire | 119 |

| | |
|--|-----|
| 2. Mise en œuvre du biohybride « DOT – polymersome » | 120 |
| 3. Perspectives globales du projet..... | 122 |
| 3.1. Perspectives à court terme : validations <i>in vitro</i> avec des polymersomes vides..... | 122 |
| 3.2. Perspectives à moyen terme : Validation <i>in vivo</i> avec des polymersomes vides..... | 124 |
| 3.3. Perspectives à long terme : Validation <i>in vivo</i> avec des polymersomes encapsulant un principe actif | 126 |
| 4. Ouvertures | 128 |
| 4.1. Modification métabolique de diverses cellules..... | 128 |
| 4.2. Utilisation de la SPAAC pour lier d'autres entités chimiques à la surface des cellules..... | 129 |
| Conclusion | 132 |
| Références bibliographiques | 134 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|---|---|
| µm : micromètre | GalNAz : N-azidoacetylgalactosamine |
| µM : micromolaire | GBM : glioblastome |
| Ac ₄ GalNAz : N-azidoacétylgalactosamine-tetraacylated | GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine |
| Ac ₄ GlcNAz : N-azidoacétylglucosamine-tetraacylated | GlcNAc-1-P : N-acétyl-D-glucosamine-1-Phosphate |
| Ac ₄ ManNAz : N-azidoacétylmannosamine-tetraacylated | GlcNAc-6-P : N-acétyl-D-glucosamine-6-Phosphate |
| ACT : Adoptive Cell Transfert | GlcNAz : N-azidoacetylglucosamine |
| ATCC : American Type Culture Collection | GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor |
| BARAC : biarylazacyclooctynone | GNE : UDP-GlcNAc 2-épimérase/ManNAc kinase |
| BCN : bicyclononyne | HBV : Virus de l'Hépatite B |
| BCR : B Cell Receptor | HLA : Human Leukocyte Antigen |
| BTN : butyrophiline | HMBPP : hydroxymethy-but-2-enyl pyrophosphate |
| CAR : Chimeric Antigenic Receptor | HSPC : cellules souches hématopoïétiques/progénitrices |
| CD : Cluster of Differentiation | HSV : Herpes simplex Virus |
| CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité | ICAM : Intercellular Adhesion Molecule |
| CMV : Cytomégalovirus | ICOS : Inducible T-cell COSTimulator |
| CTLA4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 | ICOSL : Inducible T-cell COSTimulator Ligand |
| CuAAC : Copper(I)-catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition | IFN γ : Interféron gamma |
| DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole | Ig : Immunoglobuline |
| DBCO / DIBAC : dibenzocyclooctyne | IL : interleukine |
| DNAM-1 : DNAX accessory molecule-1 | IPP : isopentenyl pyrophosphate |
| DOT : Delta One Tcell | kDa : KiloDalton |
| Doxp : 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate | KIR : K cell Inhibition Receptors |
| EBV : Epstein-Barr Virus | LAG-3 : Lymphocyte Activation gene 3 |
| EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique | LB : lymphocyte B |
| EPCR : Endothelial Protein C Receptor | LCPO : Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques |
| EPR : Enhanced Permeation and Retention | LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1 |
| FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting | LMA : Leucémie Myéloïde Aiguë |
| FAM-DBCO : DBCO couplé à la fluorescéine | LT : lymphocyte T |
| FasL : Fas Ligand | LTh1 : Lymphocytes T helper 1 |
| FVS: Fixable Viability Staining | |
| GalNAc : N-acétyl-D-galactosamine | |

| | |
|--|--|
| LT γ δ : lymphocytes T γ δ | PEG : poly(éthylène glycol) |
| MAIT : mucosa-associated invariant T cells | PLA-PEG : polylactite-b- poly(éthylène glycol) |
| ManNAc : N-acétyl-D-mannosamine | PMA : 12-myristate 13-acétate |
| ManNAz : N-azidoacetylmannosamine | ppGalNAcT : N-acétyl- α -galactosaminyltransférase |
| MDSC : Myeloid Derived suppressor Cell | PPO : poly(oxyde de propylène) |
| MFI : Median of Fluorescence Intensity | PSMA : Prostate-specific membrane antigen |
| MICA : MHC class I-chaîn related proteins A | PTMC : poly(carbonate de triméthylène) |
| MICB : MHC class I-chaîn related proteins B | PVR : Polio Virus Receptor |
| MIP-1 α : Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha | RANTES : Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted |
| MIP-1 β : Macrophage Inflammatory Protein-1 beta | RhoB : Rhodamine B |
| MR1 : MHC class I-related protein | RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium |
| Mtb : <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | RT : Room Temperature |
| N ₃ : azide | SPAAC : Strain-promoted Azide - Alkyne Click Chemistry |
| NANP : Neu5Ac-9-P-phosphatase | TCR : T Cell Receptor |
| NANS : N-acétylneuraminase synthase | TGF β : Tumor Growth Factor beta |
| NCR : Natural Cytotoxicity Receptors | TIGIT : T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains |
| NeuNAc : N-acetylneuramine | TIM3 : T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3 |
| NeuNAz : N- azidoacetylneuroamine | TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha |
| NIH : National Institute of Health | TRAIL : Tumor-Necrosis-Factor related Apoptosis Inducing Ligand |
| NK : Natural Killer | ULBP : UL16-binding protein |
| NKG2A : Natural-Killer Group 2 Member A | VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor |
| NKG2D : Natural-Killer Group 2 Member D | VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine |
| nm : nanomètre | |
| OGA : O-GlcNAcase | |
| O-GlcNAc : O-linked- β -N-acetylglucosamine | |
| OGT : O-GlcNAc transférase | |
| P _{Ag} : Phosphoantigène | |
| PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell | |
| PBO : poly(oxyde de butylène) | |
| PBS : Phosphate Buffered Saline | |
| Pbut : poly(butadiène) | |
| Pbut-PEG : Poly(butadiène)- b-poly(éthylène glycol) | |
| PD-1 : Programmed cell death protein 1 | |
| PD-L1 : Programmed death-ligand 1 | |

TABLE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1: Schéma simplifié représentant les critères importants lors de la production d'un système de transport de principe actif..... | 9 |
| Figure 2 : Chronologie du développement des nanoparticules d'or, lipidiques et polymériques. | 10 |
| Figure 3 : Représentation schématique de différentes formes de nanoparticules lipidiques. | 11 |
| Figure 4 : Représentation schématique d'un polymersome. | 13 |
| Figure 5 : Représentation moléculaire des composants du polymersome. | 14 |
| Figure 6 : Rôle de l'effet EPR sur la biodistribution des polymersomes. | 16 |
| Figure 7 : Exemple de fonctionnalisation des nanoparticules..... | 17 |
| Figure 8 : Fonctionnalisation des nanoparticules à l'aide de différents ligands ou de ligands multivalents..... | 19 |
| Figure 9 : Représentation schématique de différentes chimies bio-orthogonales menant à l'élaboration de la chimie click. | 27 |
| Figure 10 : Représentation moléculaire de différentes cyclooctynes. | 31 |
| Figure 11 : Glycanes retrouvés sur des récepteurs clés de la surface cellulaire. | 33 |
| Figure 12 : Intégration des azido-sucres lors de la modification métabolique des glycanes de surface. | 33 |
| Figure 13 : Représentation moléculaire de trois azido-sucres. | 34 |
| Figure 14 : Voie de la glycosylation par le GlcNAc et intégration du Ac ₄ GlcNAz..... | 36 |
| Figure 15 : Voie de la glycosylation par le ManNAc et intégration du Ac ₄ ManNAz. | 37 |
| Figure 16 : Voie de la glycosylation par le GalNAc et intégration du Ac ₄ GalNAz. | 38 |
| Figure 17 : Représentation schématique du système de transport idéal. | 40 |
| Figure 18 : Le récepteur TCR $\gamma\delta$ humain et son gène codant..... | 42 |
| Figure 19 : Évolution des populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ humains dans le thymus, le sang périphérique et les tissus tout au long de la vie. | 45 |
| Figure 20 : Récepteurs exprimés sur les lymphocytes T $\gamma\delta$ humains au repos ou activés. | 46 |

| | |
|--|----|
| Figure 21 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la maturation et l'activation de divers types cellulaires..... | 53 |
| Figure 22 : Mécanismes ambivalents des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans le développement tumoral. | 58 |
| Figure 23 : Mécanismes moléculaires de détection de l'infection virale du cytomégalo virus (CMV) par les lymphocytes T V δ 1. | 63 |
| Figure 24 : Représentation schématique de l'objectif : Modification métabolique des DOT suivie de la chimie click (SPAAC) avec un polymersome fonctionnalisé avec un DBCO. | 69 |
| Figure 25 : Cinétique d'assimilation des azido-sucres Ac ₄ GlcNAz, Ac ₄ GalNAz et Ac ₄ ManNAz par les JRT3 LES et réaction click avec le FAM-DBCO..... | 83 |
| Figure 26 : Gamme de concentration des trois azido-sucres Ac ₄ GlcNAz, Ac ₄ GalNAz et Ac ₄ ManNAz sur les JRT3 LES et réaction click avec le FAM-DBCO. | 84 |
| Figure 27 : Comparaison d'efficacité de deux concentrations d'Ac ₄ GalNAz et d'Ac ₄ ManNAz (30 et 50 μ M) sur les JRT3 LES et réaction click avec le FAM-DBCO..... | 85 |
| Figure 28 : Comparaison de l'efficacité de la réaction click après incubation en tampon FACS ou en milieu RPMI simple..... | 87 |
| Figure 29 : Quantification de l'expression du CD69 par les JRT3 LES après la réaction click avec le FAM-DBCO. | 88 |
| Figure 30 : Stratégie d'analyse des PBMC par cytométrie en flux..... | 89 |
| Figure 31 : Cinétique d'assimilation des azido-sucres Ac ₄ GalNAz et Ac ₄ ManNAz par les PBMC et réaction click avec le FAM-DBCO..... | 90 |
| Figure 32 : Quantification de l'expression du CD69 par les PBMC après la réaction click avec le FAM-DBCO. | 92 |
| Figure 33 : Phénotypage des DOT avant et après amplification. | 94 |
| Figure 34 : Fonctionnalisation des DOT avec le FAM-DBCO..... | 95 |
| Figure 35 : Cinétique de conservation des azides à la surface des DOT..... | 96 |
| Figure 36 : Quantification de la sécrétion d'IFN γ par les DOT après la réaction click avec le FAM-DBCO..... | 98 |

| | |
|--|-----|
| Figure 37 : Représentation schématique de la réaction click entre un azide libre présent sur l'extrémité des glycanes de surface cellulaire et le DBCO présent à la membrane du polymersome..... | 99 |
| Figure 38 : Représentation schématique des différentes techniques de formulation utilisées. | 101 |
| Figure 39 : Exemple de résultats de comptage des polymersomes à l'aide du NanoFCM..... | 103 |
| Figure 40 : Vérification de la non-internalisation des polymersomes Pbut-PEG-Rhodamine B dans les DOT. | 105 |
| Figure 41 : Fonctionnalisation des DOT avec des polymersomes Pbut-PEG-Fluorescéine avec 10% DBCO-NHS..... | 106 |
| Figure 42 : Schéma expérimental de la vérification de la disponibilité du DBCO sur les polymersomes Pbut-PEG 20% DBCO à l'aide d'un azide fluorescent (N ₃ -fluorescéine). | 107 |
| Figure 43 : Vérification de la disponibilité du DBCO sur les polymersomes Pbut-PEG 20% DBCO à l'aide d'un azide fluorescent (N ₃ -fluorescéine). | 108 |
| Figure 44 : Représentation schématique de la formulation des deux types de polymersomes. | 109 |
| Figure 45 : Fonctionnalisation des DOT avec trois polymersomes Pbut-PEG-Fluorescéine avec 20% DBCO-NHS (200nm ou 1µm) ou DBCO-PEG ₅ -NHS (200nm). | 110 |
| Figure 46 : Fonctionnalisation des DOT avec trois polymersomes Pbut-PEG-Fluorescéine avec 20% DBCO-NHS (200nm ou 1µm) ou DBCO-PEG ₅ -NHS (200nm). | 112 |
| Figure 47 : Fonctionnalisation des DOT avec une gamme de polymersomes Pbut-PEG-Fluorescéine avec 20% DBCO-NHS (200nm). | 115 |
| Figure 48 : Représentation schématique de la modification des anticorps avec un DBCO et incorporation à la membrane cellulaire. | 129 |
| Figure 49 : Schéma de conclusion | 133 |

TABLE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Lymphocytes T $\gamma\delta$ en tant que marqueur pronostic..... | 60 |
| Tableau 2 : Essais cliniques en cours utilisant les lymphocytes T $\gamma\delta$ | 68 |
| Tableau 3 : Optimisations de la modification métabolique et de la réaction click à l'aide d'un DBCO fluorescent. | 76 |
| Tableau 4 : Mise en œuvre du biohybride « DOT – polymersomes. | 78 |
| Tableau 5 : Liste des réactifs..... | 80 |
| Tableau 6 : Tableau récapitulatif du compte des polymersomes en fonction de leur type et de leur technique de formulation. | 103 |

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Chimie Click et Polymersome : des innovations au service de la thérapie ciblée

1. Concept de nanotechnologie et nanomédecine

Le terme « nano- » vient du grec *νάνος* signifiant « nain ». Il correspond à tout matériau retrouvé à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire entre 1 et 1000nm. Bien que nous en n'ayons pas conscience, notre planète est une source importante de nanomatériaux naturels comme la poussière ou les minéraux. L'intérêt pour le domaine du nanométrique s'est développé avec le temps afin d'adapter ces matériaux nanométriques à une potentielle utilisation en physique, en électronique ou encore en médecine.

1.1. Découverte des nanotechnologies

La définition de nanotechnologie repose sur la manipulation ou l'auto-assemblage d'atomes, de molécules ou d'amas moléculaires individuels en structures afin de créer des matériaux et des dispositifs aux propriétés nouvelles ou très différentes de ce qui existe à taille usuelle. L'utilisation de ces objets et matériaux de taille nanométrique peut être retrouvée dans le domaine de l'électronique, de la physique, de la chimie ou de la biologie. Ce concept a été introduit pour la première fois en 1959 par le physicien américain Richard Feynman [1], récompensé par le prix Nobel de physique en 1965 [2]. Il a suggéré qu'il serait possible de manipuler la matière au niveau des atomes individuels pour miniaturiser un moteur électrique ou encore un livre. Toutefois, ce n'est que 15ans plus tard, en 1974 que ce concept a été réellement défini par Norio Taniguchi [3]. Selon l'Institut National de la Santé (NIH), « la nanotechnologie est définie comme la compréhension et le contrôle de la matière à des dimensions d'environ 1 à 100 nanomètres, une échelle à laquelle émergent des propriétés uniques des matériaux qui peuvent être utilisées pour développer de nouvelles technologies et produits ». L'industrie électronique a fait partie des premiers domaines tentant de miniaturiser des objets en créant des outils pour des appareils électroniques plus compacts. Des outils chirurgicaux ont également subi ces miniaturisations afin d'améliorer la précision lors des opérations, de minimiser les traumatismes corporels et d'améliorer le rétablissement des patients [4]. L'objectif des nanotechnologies est donc de développer des nouveaux

dispositifs possédant des propriétés nouvelles ou améliorées comparé à ce qui existe déjà dans le but d'outrepasser les problématiques rencontrées avec les dispositifs actuels.

1.2. Des nanotechnologies aux nanomédecines

La branche des nanotechnologies s'intéressant à la biologie et au domaine du médical est apparentée à la nanomédecine. La nanomédecine offre de nouvelles possibilités en matière de détection, de diagnostic et de traitement par le biais des nanoparticules, c'est-à-dire des particules de taille nanométrique. La « Forward Look on Nanomedicine » de la Fondation Européenne de la Science a défini les nanomédicaments comme des « systèmes complexes à l'échelle nanométrique, composés d'au moins deux composants, dont l'un est l'ingrédient actif » [5]. Ces ingrédients actifs peuvent être des sondes de détection, des fluorochromes ou des molécules thérapeutiques par exemple. Les nanomédecines ont suscité un fort intérêt ces dernières années notamment à propos de l'élaboration de nouvelles nanoparticules ayant pour but d'améliorer le transport de ces « ingrédients actifs ». Divers types, formes et techniques de formulation ont été développés pour répondre aux exigences du domaine d'utilisation qu'il soit à but thérapeutique ou lors d'imagerie. Les nanoparticules sont réputées pour délivrer des principes actifs sur des sites cellulaires spécifiques, améliorant l'efficacité de la molécule choisie tout en réduisant le risque d'effets secondaires associés à cette dernière [6]. En effet, l'un des avantages notables des nanoparticules est leur capacité de protéger la molécule encapsulée d'une dégradation et d'une élimination prématurée en limitant son interaction avec l'environnement biologique. Elles permettent également d'améliorer l'infiltration et la pénétration du composé dans les tissus et donc de mieux contrôler sa pharmacocinétique et sa biodistribution pour obtenir un résultat ciblé aux cellules d'intérêt, limitant donc les effets secondaires potentiels de la molécule sur les cellules adjacentes [7].

Pour répondre à toutes ces exigences de ciblage, de protection du composé mais aussi du système biologique contre une potentielle toxicité, les nanoparticules doivent respecter un certain nombre de critères concernant leur formulation. En effet, ces nanoparticules ne sont pas toujours créées à base de composés naturels ce qui signifie qu'elles peuvent apparaître comme toxiques pour l'environnement biologique dans lequel elles se trouvent. Afin de limiter cette toxicité, il est nécessaire d'utiliser des matériaux biocompatibles. Cela leur

permet donc de circuler pendant un temps suffisamment long dans le système sanguin sans être détectées par le système immunitaire pour avoir le temps de s'accumuler suffisamment et sélectivement sur leur site cible. C'est ce que l'on appelle le contrôle de la biodistribution. Ensuite, elles doivent être capables de contenir une charge élevée de molécules tout en conservant une structure stable afin d'avoir la meilleure efficacité possible. Pour finir, elles doivent être capables de libérer les molécules chargées de manière contrôlée [7].

Pour résumer, le but général des nanoparticules est de transporter des principes actifs sur un site d'intérêt. La conception de ce système idéal correspond alors à (i) un nano-assemblage de composés biocompatibles encapsulant une charge utile d'ingrédients actifs (sondes, fluorochromes, molécules thérapeutiques), (ii) des ligands à la surface de la membrane pour le ciblage spécifique du site et une non-toxicité/non-détection par le système immunitaire, (iii) une membrane modulable qui permet la libération du médicament à la demande sur le site souhaité pour améliorer sa biodistribution. Le design de ce système de transport doit être réfléchi comme une combinaison parfaite entre une nanoparticule de choix encapsulant une molécule spécifique au contexte étudié, un système de ciblage le plus efficace possible et une méthode d'association de ces deux entités biocompatible et pérenne. Les critères de sélection de la nanoparticule, de son vecteur et du système d'association seront discutés dans les chapitres suivants (**Figure 1**).

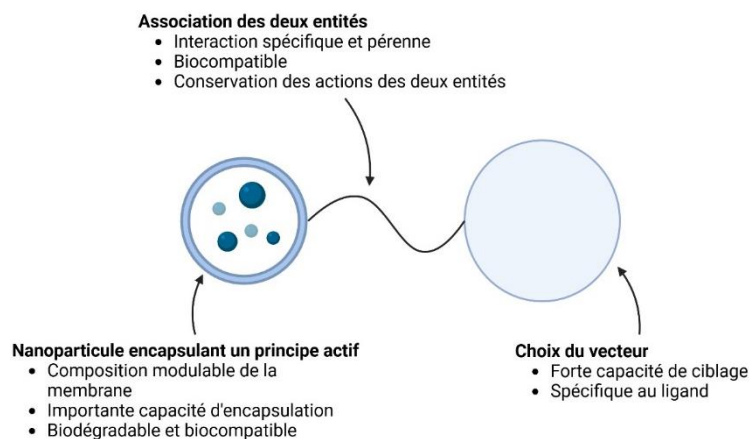


Figure 1: Schéma simplifié représentant les critères importants lors de la production d'un système de transport de principe actif.

Représentation des trois composantes principales du système de transport idéal d'un principe actif avec les critères à respecter. La nanoparticule choisie doit être biodégradable et biocompatible. Elle doit également être capable d'encapsuler une forte concentration de principes actifs ayant des propriétés diverses. Sa membrane doit être modulable que ce soit à propos de son épaisseur, de sa formulation, de sa flexibilité et de sa taille. Le vecteur doit être choisi avec grand intérêt. Il doit être spécifique au ligand ciblé présent sur le site d'intérêt. Pour finir, l'association des deux entités doit être pérenne, spécifique et biocompatible. En outre, cette liaison ne doit en aucun cas modifier ou altérer l'activité des deux entités qu'elle relie. Créée avec BioRender.com

1.3. Développement des nanoparticules

La sélection des matériaux utilisés lors de la formulation a été le premier point de levier dans le développement des nanoparticules. Les premières ont été créées à base de matériaux non organiques comme l'or. Par la suite, l'utilisation de composés organiques s'est développée avec l'utilisation de nanoparticules lipidiques ou polymériques (**Figure 2**).

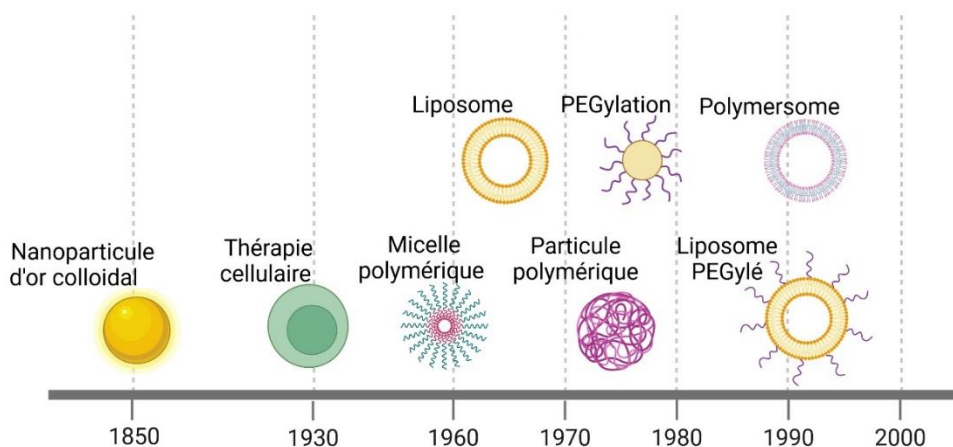


Figure 2 : Chronologie du développement des nanoparticules d'or, lipidiques et polymériques.

Les nanoparticules d'or colloïdales ont été les premières nanoparticules à avoir été utilisées en nanomédecine et ont été longtemps considérées comme une base dans le développement des nouvelles générations. Les nanoparticules lipidiques et polymériques sont apparues bien plus tard et possèdent des propriétés membranaires et d'encapsulation toutes autres. Modifiée d'après [8]. Créée avec BioRender.com

1.3.1. Les nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or colloïdales font partie des premières nanoparticules à avoir été décrites en 1857 [9]. Aujourd'hui, leur utilisation au niveau médical est extrêmement vaste, allant de la génomique à l'administration ciblée de médicaments, d'ADN et d'antigènes tout en passant par la détection et la photothermolyse de micro-organismes et de cellules cancéreuses. C'est grâce à leurs propriétés physico-chimiques uniques qu'elles peuvent répondre aux besoins du diagnostic médical mais aussi de la thérapie, la prévention ou encore l'hygiène [10]. Une de leurs caractéristiques majeures est leur propriété thermique. En raison de la forte absorption optique de l'or, les nanoparticules métalliques se comportent comme des nanosources de chaleur pouvant être contrôlées en modifiant la forme et la taille des particules. C'est pourquoi leur plus grande utilisation concerne le domaine de la thérapie ou

de l'imagerie photothermique [11]. Cependant, l'utilisation de l'or en thérapeutique peut poser de nombreux problèmes de toxicité comme le présente cette revue de Lansdown [12].

1.3.2. Les nanoparticules lipidiques

Le développement de matériaux organiques a permis l'arrivée de nouvelles nanoparticules avec une biocompatibilité plus intéressante que les nanoparticules à base de matériaux non-organiques. Les nanoparticules lipidiques font partie des plus employées et sont déjà approuvées pour une utilisation clinique. Les lipides sont déjà naturellement présents dans le système biologique rendant ces nanoparticules biocompatibles et peu toxiques.

Différents systèmes lipidiques existent et la plupart sont faits à base de phospholipides. Ces derniers sont de nature amphiphile et peuvent s'auto-assembler en une simple couche pour former des micelles ou en double couche pour former des liposomes ou des disques [13] (**Figure 3**).

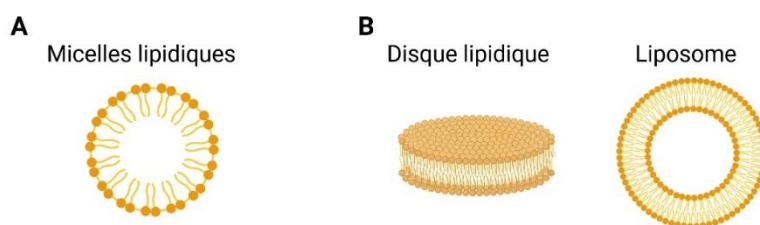


Figure 3 : Représentation schématique de différentes formes de nanoparticules lipidiques.

Les nanoparticules lipidiques possèdent une membrane composée de phospholipides. Ces derniers sont de nature amphiphile et peuvent s'auto-assembler. Ils peuvent ainsi former (A) des micelles lorsqu'ils s'assemblent en simple couche ou (B) des liposomes ou des disques lorsqu'ils s'assemblent en double couche. Créée avec BioRender.com

Les liposomes ont été décrits pour la première fois en 1964 [14] et sont caractérisés pas leur corps aqueux entouré d'une bicouche lipidique contribuant à l'encapsulation et la délivrance de tout type de composé, qu'il soit hydrophile ou hydrophobe ou même les deux en même temps si leur formulation le permet [15]. Cependant, ce système peut présenter divers inconvénients limitant son utilisation lors d'administration de molécules. Ils sont rapidement repérés par le système immunitaire comme du non-soi provoquant leur élimination avant même d'atteindre leur site cible. Ces particules, préparées à partir de matériaux exogènes, vont attirer des composants du plasma, notamment des immunoglobulines et des opsonines,

et former une couronne protéique en très peu de temps après son administration. Les opsonines représentent toutes les molécules capables de se lier à la membrane induisant la phagocytose de la nanoparticule [16]. Cette conformation va augmenter la susceptibilité des nanoparticules à être séquestrées par les cellules du système réticulo-endothélial (ou système de phagocytes mononucléaires) possédant des macrophages spécialisés dans l'élimination du non-soi : les cellules de Kupffer. Une fois absorbées, ces nanoparticules vont être détruites et éliminées, c'est ce que l'on appelle la clairance. Dans la majeure partie des cas, moins de 5% des nanoparticules nues réussissent à atteindre leur cible [17]. C'est pourquoi leur surface peut être modifiée par l'ajout de ligands ou de molécules hydrophiles (Cf 1.3.2.) afin d'améliorer leur demi-vie ainsi que leurs capacités de ciblage des sites d'intérêt [18]. De plus, des études ont montré que ce système pouvait manquer de stabilité chimique, physique et biologique impactant sa capacité d'encapsulation mais également la conservation de la molécule d'intérêt à l'intérieur de la nanoparticule [19].

2. Les polymersomes : des nanoparticules de choix

Le développement de la structure des polymersomes a été basé sur l'élaboration des liposomes. La membrane du polymersome s'appuie sur l'association de copolymères amphiphiles. Comme leur nom l'indique, ces copolymères sont constitués de deux polymères, un hydrophobe et un hydrophile. Les copolymères vont alors pouvoir s'auto-assembler afin de former une bicouche polymérique, entourant un corps aqueux, créant ainsi un polymersome (**Figure 4**). Cette membrane, composée de deux types de polymères distincts, procure une meilleure stabilité, comparé au liposome, avec une membrane plus épaisse ce qui améliore les caractéristiques pharmacocinétiques des molécules encapsulées. De plus, cette structure compartimentée permet le transport d'un grand nombre de composés, qu'ils soient hydrophobes, *via* une liaison directe à l'intérieur de la membrane, ou hydrophiles avec une encapsulation dans le corps aqueux [20] (**Figure 4**). Cette caractéristique permet alors d'incorporer plusieurs molécules ayant des propriétés physiques différentes dans un même polymersome. Dans le cas de transport de composés thérapeutiques, cette administration simultanée peut améliorer l'efficacité du traitement mais également réduire les effets secondaires et limiter le développement de résistances par la multiplication d'injection [21].

2.1. Une composition modulable

Un des plus gros avantages du polymersome est la liberté de composition de sa membrane nous permettant de jouer avec son épaisseur, constante primordiale concernant la libération de la molécule encapsulée, sa fluidité, lui permettant une bonne circulation, mais aussi avec toutes les autres caractéristiques physico-chimiques lui permettant une bonne biocompatibilité [20]. L'importance de ces critères va être discutée dans cette partie.

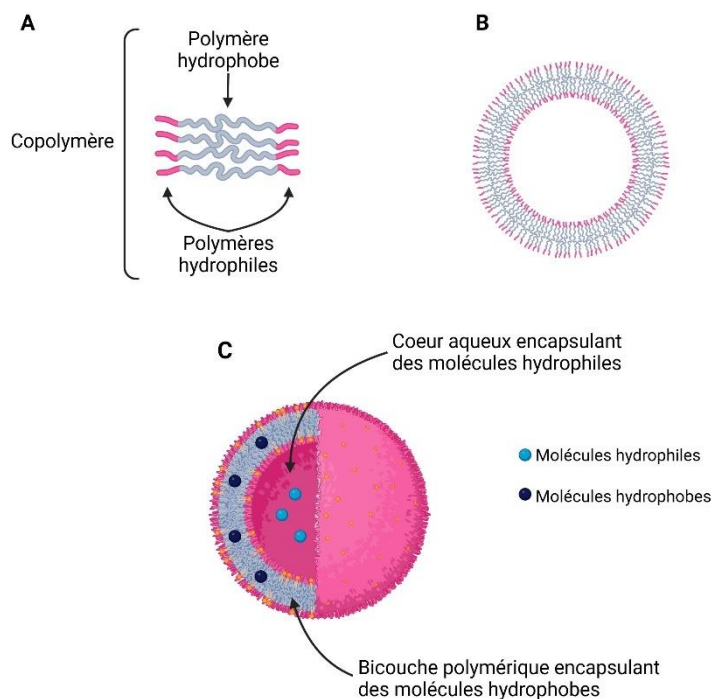


Figure 4 : Représentation schématique d'un polymersome.

Un polymersome s'appuie sur l'association de copolymères amphiphiles, eux-mêmes constitués de deux polymères, un hydrophobe et un hydrophile (A). Cet assemblage va former une bicouche polymérique conférant aux polymersome une membrane flexible, stable et modulable. Le polymersome a la capacité d'encapsuler des molécules hydrophiles à l'intérieur du corps aqueux mais aussi des molécules hydrophobes à l'intérieur de la bicouche lipidique (C). Créée avec BioRender.com

2.1.1. Sélection du copolymère hydrophobe

Divers copolymères hydrophobes sont employés pour la formulation des polymersomes et, ces dernières années, une attention particulière a été accordée aux polymères biodégradables reconnus pour leur faible toxicité *in vivo* tels que le poly(carbonate de triméthylène) (PTMC) [22], le poly(oxyde de propylène) (PPO) ou encore le poly(oxyde de butylène) (PBO). Une étude de 2020 de Wehr *et al.* a montré que le PBO avait une cytocompatibilité ainsi qu'une hydrophobie élevées, une fabrication simple associée à une membrane fluide et flexible ce qui le place comme étant un copolymère hydrophobe très avantageux [23]. Dans le cadre de ce

projet, nous avons utilisé le copolymère commercial Poly(butadiène) : Pbut (**Figure 5**). Ce copolymère a été largement étudié pour mieux comprendre sa morphologie, sa formulation en fonction des techniques utilisées ou encore sa stabilité [24], [25], [26], ce qui a conduit à son utilisation en tant que cargo/vecteur afin de transporter des molécules thérapeutiques lors de traitements anti-cancéreux [27].

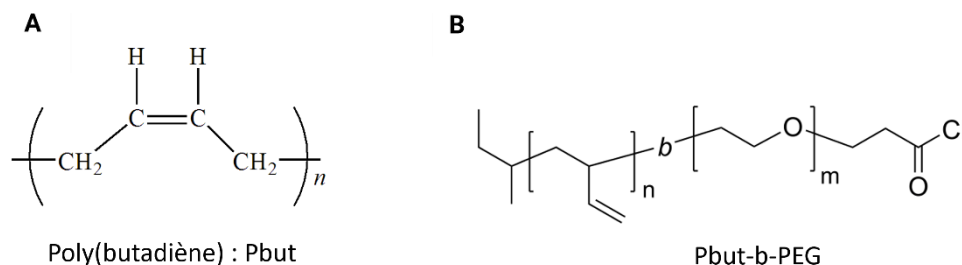


Figure 5 : Représentation moléculaire des composants du polymersome.

La composition de la membrane du polymersome est modulable. Divers polymères hydrophobes peuvent être utilisés et le Poly(butadiène) a été choisi lors de ce travail (A). Son association avec un polymère hydrophile tel que le PEG (B) lui confère une caractéristique de « furtivité » face au système immunitaire prolongeant ainsi la demi-vie de la nanoparticule.

La première génération de nanoparticules n'était simplement qu'un assemblage de copolymères. Son administration par voie intraveineuse entraînait une dégradation et une élimination rapide par le système de clairance du corps du fait de sa reconnaissance par les cellules du système immunitaire comme étant du non-soi (Cf 1.3.2). En 1990, une étude de Chiannikulchai *et al.* [28] a réussi à tirer un avantage de cette clairance par les cellules de Kupffer dans le but d'améliorer le traitement du cancer du foie. Des nanoparticules poly(cyanoacrylate) encapsulant de la doxorubicine ont été injectées chez des souris porteuses de métastases de sarcome. Ils ont alors remarqué une accumulation des nanoparticules dans les cellules de Kupffer, créant une diffusion massive et prolongée du médicament libre vers le tissu néoplasique. Bien que cet exemple illustre un avantage de la clairance dans certaines situations, la plupart des traitements doivent rester indétectables par le système immunitaire afin d'avoir suffisamment de temps pour atteindre leur site cible.

2.1.2. Protection par un copolymère hydrophile

Comme souligné précédemment, une des caractéristiques cruciales pour former une nanoparticule idéale est la furtivité, c'est-à-dire l'échappement au système immunitaire et

donc au système de clairance. Afin de favoriser cette propriété, une seconde génération liant de manière covalente un polymère hydrophile au polymère hydrophobe a été créé. Cette association permet la présentation du composé hydrophile à la surface. Le poly(éthylène glycol) (PEG), décrit pour la première fois en 1977 par Abuchowski et ses collègues [29], [30] et plus fortement développé dans le milieu de années 1990 [31], est l'un des polymères hydrophiles les plus couramment utilisés. L'utilisation de ce composant hydrophile dans la formation des polymersomes est appelée « PEGylation ». Ce polymère, dont la taille est ajustable, peut interférer avec les opsonines par répulsion stérique, rendant les polymersomes plus furtifs face au système immunitaire, prolongeant leur demi-vie et améliorant donc leur efficacité [22], [23], [32].

Dans notre étude, nous avons combiné cette molécule de PEG avec notre copolymère hydrophobe, le Pbut, afin d'obtenir ces avantages de « furtivité ». Cette association nous donnant alors le polymersome Poly(butadiène)- b-poly(éthylène glycol) : Pbut-b-PEG (**Figure 5**).

2.2. Contrôle de la biodistribution

Comme énoncé précédemment, le contrôle de la biodistribution est une des composantes importantes dans l'élaboration de la nanoparticule idéale. Les nanoparticules sont, dans la majeure partie des cas, injectées dans le système sanguin pour transporter les molécules d'intérêt vers les sites cibles. Il est donc nécessaire de contrôler ce transport pour obtenir une efficacité optimale et éviter que ces dernières stagnent dans la circulation sanguine favorisant potentiellement sa détection par le système de clairance et donc son élimination.

2.2.1. Ciblage passif

L'amélioration de la demi-vie des nanoparticules grâce à la PEGylation a mis en évidence leur capacité de ciblage passif et notamment leur accumulation au niveau des sites tumoraux. Lors d'un développement tumoral, des mécanismes d'angiogenèse se mettent en place entraînant une vascularisation anormale et chaotique de la tumeur. Cette architecture irrégulière provoque un élargissement des jonctions entre les cellules endothéliales, facilitant ainsi l'entrée et l'accumulation des polymersomes au site tumoral du fait de leur taille

nanométrique. Une fois accumulés, les polymersomes ne peuvent plus être éliminés en raison d'un système lymphatique restreint. L'utilisation de ces particules dans ce cadre a défini ce que l'on nomme l'effet EPR pour « Enhanced Permeation and Retention » [32], [33] (**Figure 6**). Pour tirer parti de ce phénomène, les polymersomes doivent répondre à quelques critères, tels que ne pas dépasser un poids moléculaire de 40kDa (seuil de clairance rénal) et ne pas être immunogéniques afin d'éviter toute interaction avec les cellules immunitaires [34]. C'est dans ce contexte de non-immunogénicité que la PEGylation devient cruciale, soulignant ainsi l'avantage du développement de cette deuxième génération de polymersomes.

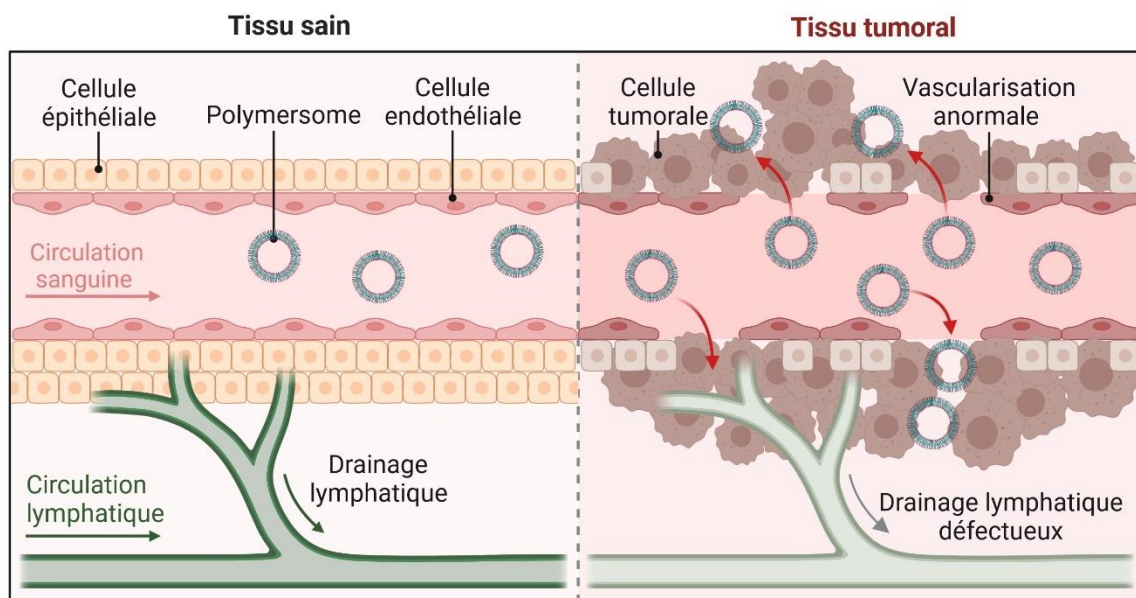


Figure 6 : Rôle de l'effet EPR sur la biodistribution des polymersomes.

Dans un tissu sain (gauche), la vascularisation est organisée et les cellules endothéliales et épithéliales sont jointes. Les polymersomes vont alors circuler dans le sang périphérique de façon continue. Lors d'un développement tumoral (droite), des mécanismes d'angiogenèse se mettent en place développant une vascularisation anormale et chaotique de la tumeur. Cette architecture irrégulière provoque un élargissement des jonctions entre les cellules endothéliales, facilitant ainsi l'entrée et l'accumulation des polymersomes au site tumoral du fait de leur taille nanométrique. Une fois accumulés, les polymersomes ne peuvent plus être éliminés en raison d'un système lymphatique restreint. Ce phénomène correspond à l'effet EPR (« Enhanced Permeation and Retention »). Créée avec BioRender.com

Toutefois, il a été rapporté qu'environ 95% des nanoparticules sont séquestrées puis éliminées par le système réticulo-endothélial avant d'atteindre leur cible [17]. Cela nécessite l'administration de doses élevées afin de maximiser les chances de succès, ce qui peut favoriser une potentielle toxicité.

2.2.2. Ciblage actif

Afin de réduire les doses administrées tout en maintenant une efficacité optimale, une troisième génération de polymersomes a été développée visant à cibler activement les cellules et les sites d'intérêt pour accroître leur accumulation et donc les bénéfices thérapeutiques. Les polymersomes « PEGylés » sont fonctionnalisés, c'est-à-dire que diverses molécules telles que des anticorps, des peptides ou encore des vitamines, vont être ajoutées à leur surface (Figure 7).

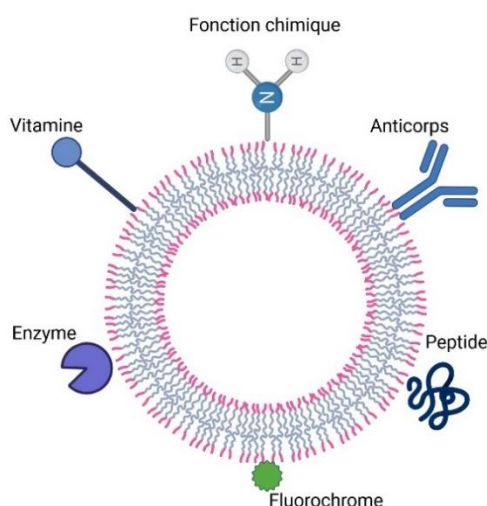


Figure 7 : Exemple de fonctionnalisation des nanoparticules.

Il est possible de fonctionnaliser les nanoparticules afin d'améliorer leur ciblage des sites d'intérêt. Différentes approches peuvent être envisagées en fonction du contexte, de la cible choisie et du degré de spécificité souhaité. Par exemple, il est possible de fonctionnaliser les polymersomes avec des anticorps, des peptides, des fluorochromes, des enzymes, des vitamines ou encore des fonctions chimiques. Ce schéma illustre de manière exhaustive de diverses options. Créée avec BioRender.com

Ces molécules choisies sont capables de reconnaître spécifiquement leurs antigènes, ligands ou récepteurs surexprimés par les cellules cibles, permettant ainsi de diriger les nanoparticules directement vers les sites d'intérêt, tumoraux ou infectieux [35]. Cependant, il est crucial de sélectionner de manière rigoureuse ce couple de molécules. En effet, il est nécessaire que la molécule à la surface des polymersomes soit disposée en quantité suffisante mais aussi que le ligand choisi soit suffisamment exprimé par les cellules cibles afin d'avoir un ciblage efficace tout en limitant les phénomènes non spécifiques. Diverses études ont été menées sur la fonctionnalisation de nanoparticules de polyester (PLA-PEG) et ont montré que la quantité de molécules fonctionnelles à ajouter à la surface des polymersomes était

pleinement dépendante du couple choisi et du contexte pathologique étudié. Par exemple, Mackiewicz *et al.* ont montré qu'une fonctionnalisation des polymersomes de l'ordre de 15 à 20% avec de l'acide folique et de la biotine était suffisante pour obtenir une affinité maximale envers des cellules de carcinome cervical [36] tandis que Nagasaki *et al.* ont trouvé qu'une fonctionnalisation par des molécules de lactose nécessitait un taux de l'ordre de 80% pour que son efficacité soit intéressante pour fixer la lectine [37]. Ceci met en évidence l'importance de la sélection des molécules fonctionnelles en fonction du contexte d'application.

Par ailleurs, il est important de préserver les propriétés biologiques de ces molécules lors de leur liaison à la surface du polymersome et de conserver la stabilité de la nanoparticule [38]. Une des stratégies envisageables pour éviter une surexpression de molécules sur le polymersome, et ainsi prévenir sa saturation et sa déstabilisation, consiste à inclure plusieurs ligands différents ciblant plusieurs récepteurs présents sur des cellules (**Figure 8**). Par exemple, Zheng *et al.* ont montré qu'une double fonctionnalisation de nanoparticules polymériques par les ligands de galactose, de l'acide lactobionique et de l'acide glycyrrhétinique renforçait leur capacité de ciblage ainsi que leur absorption par les cellules cibles [39]. L'utilisation d'un ligand multivalent à faible affinité, capable de cibler différents récepteurs, peut également permettre d'éviter le ciblage des cellules non tumorales exprimant les mêmes récepteurs séparément comme a pu le mettre en évidence l'étude de Acosta-Gutiérrez *et al.* [40] (**Figure 8**). Toutes ces études confirment l'importance du contrôle de la biodistribution à l'aide de molécules fonctionnalisant les nanoparticules pour obtenir un système complet et idéal afin d'avoir la meilleure efficacité possible.

Une autre possibilité de ciblage actif est l'utilisation de cellules immunitaires comme vecteurs des polymersomes. Cette méthode est particulièrement attrayante pour améliorer le ciblage des sites cibles du fait des caractéristiques spécifiques de ces cellules. Leurs avantages ainsi que les mécanismes permettant le couplage de ces deux entités seront présentés plus en détail lors de ce chapitre.

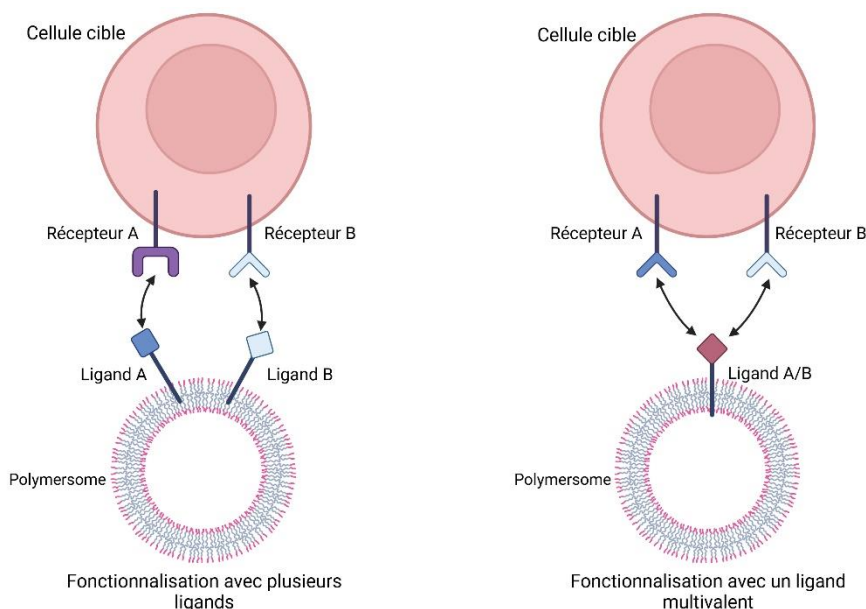


Figure 8 : Fonctionnalisation des nanoparticules à l'aide de différents ligands ou de ligands multivalents.

Il est important d'optimiser le ciblage des sites d'intérêt tout en limitant la saturation ainsi que la déstabilisation de la membrane du polymersome. Pour cela, il est envisageable de fonctionnaliser les nanoparticules à l'aide de différents ligands pouvant reconnaître différentes cibles toutes deux présentes sur les cellules d'intérêt (A). Cette stratégie limite ainsi de potentiels ciblage non spécifiques. Il est également possible d'utiliser des ligands multivalents, c'est-à-dire des ligands pouvant être reconnus par plusieurs récepteurs présents sur une cellule unique (B). Créée avec BioRender.com

2.2.3. Libération contrôlée des molécules encapsulées

Bien que ce nouveau système de ciblage actif des nanoparticules montre des résultats prometteurs, certaines limites doivent encore être surmontées pour montrer un bénéfice indéniable face à l'hétérogénéité des cibles biologiques et la faible accessibilité des tissus avec une grande variabilité de l'effet EPR. Pour améliorer cette accumulation locale, il est pertinent de se concentrer non seulement sur le vecteur, mais aussi sur l'accessibilité et la libération du principe actif. C'est dans cette optique qu'une quatrième génération de polymersomes sensibles à des stimuli externes (température et lumière) ou à des stimuli endogènes, tels que (pH ou enzymes) est développée [20]. Par exemple, une étude menée par Zhou *et al.* a présenté un polymersome multicouche encapsulant de la doxorubicine ainsi que du paclitaxel dans deux compartiments distincts [41]. Cette structure confère au polymersome une double sensibilité à la température et au pH, permettant une libération séquentielle des deux principes actifs prolongeant ainsi la durée du traitement.

Dans cette partie, nous avons résumé les avantages que les polymersomes peuvent procurer lors de leur utilisation comme vecteurs de principes actifs. Tout d'abord, ils possèdent une membrane modulable, que ce soit concernant la composition, l'épaisseur ou la taille, et adaptable au contexte dans lequel ils sont utilisés. De plus, les polymères constituant la membrane sont biocompatibles et donc peu toxiques lors de leur injection dans un système biologique. Ensuite, l'ajout aisé de PEG à leur surface leur permet d'acquérir un critère de « furtivité » auprès du système immunitaire leur procurant une demi-vie plus longue et donc une meilleure efficacité. Pour finir, il est possible d'améliorer leur capacité de ciblage en accrochant des ligands, voire des cellules, à leur membrane considérés comme spécifiques des cellules ou des sites cibles. Nous pouvons donc dire que les polymersomes regroupent de nombreux critères nécessaires à l'élaboration du système idéal décrit plus haut : une membrane modulable, un évitement efficace du système immunitaire et un ciblage spécifique du site cible à l'aide d'une fonctionnalisation aisée.

3. Association des nanoparticules à la biologie cellulaire

Comme expliqué précédemment, le développement d'un système idéal passe par plusieurs critères. Une fois la sélection du polymersome et de sa composition effectuée, il est primordial de choisir correctement l'entité à utiliser pour cibler les sites d'intérêt. Les cellules immunitaires représentent une méthode particulièrement intéressante pour répondre à ce besoin. En effet, lors d'une inflammation tissulaire, d'une lésion ou d'un cancer, un recrutement massif des cellules immunitaires est observé. De plus, l'action synergique entre les cellules immunitaires et les composés thérapeutiques pourrait produire des résultats prometteurs. Leur utilisation comme vecteur pour les nanoparticules constitue donc une approche attrayante pour améliorer le transport actif des molécules thérapeutiques vers les tissus cibles. Deux moyens sont envisageables pour associer les cellules avec les nanoparticules, une internalisation des nanoparticules par la cellule, ou leur liaison, directe ou indirecte à la membrane cellulaire.

3.1. Utilisation des cellules immunitaires comme vecteurs de nanoparticules

Le système immunitaire est composé de beaucoup de cellules différentes ayant des caractéristiques et des modes d'action différents. Nous allons discuter ici des différents modèles utilisables et déjà utilisés, leurs avantages mais également leurs potentiels inconvénients en fonction du contexte étudié.

3.1.1. Erythrocytes

Les érythrocytes, communément appelés globules rouges, représentent le type cellulaire le plus abondant chez les mammifères. Ce sont des cellules concaves, mesurant entre 6 et 8 μ m de diamètre avec une demi-vie relativement longue allant jusqu'à 120 jours chez l'adulte [42]. Leur grande flexibilité leur permet de traverser les capillaires afin de transporter l'oxygène, le dioxyde de carbone, les électrolytes, le glucose et les acides aminés, substances essentielles au métabolisme humain. De plus, ils jouent un rôle dans la phagocytose, l'adhérence immunitaire ou encore dans la défense contre les infections. Une caractéristique intéressante de ce type cellulaire est qu'elles sont dépourvues de noyau et donc de matériel génétique, ce qui les rend insensibles aux dérives génétiques, aux développements anormaux ou cancéreux [43]. Grâce à leur biodistribution étendue, leur longue demi-vie et l'absence de matériel génétique, des études ont été menées pour les utiliser comme vecteurs pour les nanoparticules, pouvant être encapsulées ou attachées à leur surface [44]. La première étude établissant leur potentiel a été menée en 1973 par Ilher et ses collègues [45] dans laquelle ils ont montré que des érythrocytes pouvaient encapsuler de la bêta-glucosidase et de la bêta-galactosidase dans un but de thérapie de remplacement enzymatique. Aujourd'hui, les techniques les plus communément utilisées pour lier les nanoparticules aux érythrocytes sont l'encapsulation par choc hypotonique, la conjugaison chimique, les interactions par affinité, la modification génétique des progéniteurs ou la liaison enzymatique [44].

Bien que les érythrocytes apparaissent comme un type cellulaire prometteur pour le transport des nanoparticules, de nombreuses limites restreignent leur potentiel d'action. Tout d'abord, ces cellules ne sont pas connues pour pénétrer efficacement dans les tissus et ne peuvent donc interagir qu'avec un sous-ensemble de cellules présentes dans le plasma. En outre, l'internalisation des nanoparticules au sein des érythrocytes peut réduire considérablement

leur potentiel thérapeutique. En effet, ces cellules ne libèrent pas spontanément les composés encapsulés ce qui limite leur interaction aux molécules capables de pénétrer les cellules *via* des transporteurs sur la membrane cellulaire. Les érythrocytes contrôlent ainsi étroitement l'entrée et la sortie des molécules extérieures ou de la nanoparticule encapsulée limitant fortement leur accessibilité et donc le potentiel thérapeutique de cette méthode. Or, la conjugaison de ces nanoparticules à la surface ne se révèle pas nécessairement plus probante car elle nécessite un nombre élevé de copies de molécules associées à la surface des globules rouges. Cette abondance peut affecter leur demi-vie car une trop grande modification des composants membranaires peut compromettre l'intégrité de la membrane et accroître la reconnaissance immunitaire, comme l'ont démontré Murciano *et al* [46]. Pour finir, leur capacité de charge de nanoparticules, qu'il s'agisse de charge intracellulaire ou de surface, reste faible comparé aux autres types cellulaires [44].

3.1.2. Leucocytes

Les leucocytes, habituellement appelés globules blancs, regroupent toutes les cellules produites dans la moelle osseuse puis retrouvées dans la circulation sanguine. Ces cellules immunitaires sont essentielles dans le contrôle de diverses pathologies.

3.1.2.1. Neutrophiles

Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants représentant 50 à 70% des globules blancs. Ils sont caractérisés par une transmigration et une mobilité extrêmement rapide avec une capacité de multiplication importante lors d'inflammation, compensant leur faible durée de vie d'environ 7h. Cette réactivité en fait les premières cellules à atteindre les sites d'inflammation, jouant ainsi un rôle primordial dans les mécanismes de réponses immunitaires innées [47], [48]. De plus, ces cellules répondent aux mécanismes de chimiotaxie et possèdent la capacité à traverser des barrières biologiques comme la barrière hémato-encéphalique. Toutes ces propriétés en font des vecteurs intéressants. Xue *et al.* [49] ont pris l'avantage de ces caractéristiques et ont démontré que les neutrophiles étaient capables de transporter une nanoparticule lipidique chargée en chimiothérapie et de limiter la récurrence du glioblastome (GBM) après l'ablation chirurgicale de la tumeur dans des modèles *in vivo*. Ils

répondent aux chimiokines libérées sur les sites d'ablation chirurgicale, emmenant alors les nanoparticules sur le site tumoral.

Cependant, les neutrophiles restent des cellules recrutées suite à une inflammation et activent ainsi une cascade de signalisation importante pour une réaction immunitaire normale. Hors de leur contexte, l'augmentation soudaine du nombre de neutrophiles ainsi que leur modification peut provoquer une expression à leur surface de signaux « find me » et « eat me » menant à une élimination plus rapide par les macrophages du foie et de la rate [50].

3.1.2.2. Monocytes et macrophages

Les monocytes représentent environ 10% des leucocytes et sont des acteurs clés de l'immunité innée. Ces cellules sont capables de circuler dans le système vasculaire ainsi que de cibler les sites d'inflammation à l'aide des gradients chimioattractants. Une fois arrivés dans les tissus, les monocytes se différencient en macrophages capables de subsister dans les tissus inflammés. Ces cellules ont également tendance à s'accumuler dans les sites hypoxiques, caractéristiques typiques d'un développement tumoral. Les macrophages possèdent une membrane flexible, semi-perméable et composée de phospholipides. Ce sont des cellules phagocytaires ayant pour fonction principale d'internaliser les corps étrangers que ce soit des bactéries, des débris mais aussi des particules, d'échanger sélectivement des substances, d'absorber des nutriments, d'évacuer des déchets métaboliques, ainsi que de sécréter et de transporter des protéines [51]. Elles peuvent donc être chargées de molécules thérapeutiques *ex vivo* puis être réinjectées pour relarguer ces composés. Plusieurs études ont démontré leur capacité à délivrer des molécules thérapeutiques comme lors d'infection au VIH [52], de cancers [53] ou lors du développement de la maladie de Parkinson [54].

Toutefois, tous les types de thérapie ne peuvent être utilisés car potentiellement toxiques pour ces cellules servant de vecteur. Leur activité naturelle de dégradation et d'élimination pourrait provoquer un endommagement des nanoparticules en intracellulaire pouvant causer une altération du développement des macrophages, de leur différenciation, de leur activité mais également provoquer la mort de ces cellules [51].

3.1.2.3. Lymphocytes T

Les lymphocytes T (LT) jouent un rôle essentiel dans l'immunité adaptative et interviennent dans la régulation de diverses pathologies, notamment les cancers, les infections virales et les processus inflammatoires. Grâce à leur récepteur à l'antigène (TCR), ils peuvent reconnaître les antigènes des cellules anormales, qu'elles soient tumorales ou infectées, en fonction de leur spécificité. Une fois ces cellules anormales détectées, les LT s'activent et se multiplient au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Ils migrent ensuite sur le site d'intérêt pour exercer leurs actions cytotoxiques et activer les autres acteurs du système immunitaire adaptatif afin d'éliminer ces cellules anormales. Ils sont ainsi capables de passer les différentes barrières biologiques pour pénétrer dans les tissus tumoraux où ils peuvent également résider [55].

C'est notamment en raison de ces capacités migratoires que ces cellules représentent des vecteurs attractifs pour les nanoparticules. Dans leur étude, Wayteck *et al.* ont d'ailleurs montré qu'il est possible de coupler l'effet cytotoxique des cellules, en l'occurrence des LT CD8+, avec l'action des molécules contenues dans les liposomes attachés à ces cellules. De plus, le couplage de ces liposomes à la surface des LT CD8+ n'altère pas leurs capacités migratoires ni cytolytiques [56]. Une seconde étude, menée par Ayer et ses collègues, a également montré la faisabilité de coupler de manière covalente des nanoparticules polymériques sur des LT CD4+ effecteurs. L'utilisation de modèles *in vivo* et *in vitro* a prouvé la capacité de ce biohybride à traverser la barrière hémato-encéphalique [57]. Toutefois, comparé aux cellules présentées précédemment, les LT ne sont pas réputés pour leur propriété de phagocytose ce qui complique leur association avec les nanoparticules. Cela implique un accrochage des nanoparticules à leur membrane pour être transportées. Quelques équipes ont donc décidé de se focaliser sur cet aspect en évaluant le comportement des nanoparticules lorsqu'elles sont mises en contact avec diverses cellules immunitaires. Leurs résultats suggèrent que l'association de ces nanoparticules avec les lymphocytes est considérablement plus faible que celle observée avec les autres types cellulaires tels que les globules rouges, les plaquettes ou encore les monocytes [58], [59]. Par conséquent, le contrôle de cette interaction LT – nanoparticules est primordial pour assurer une délivrance efficace tout en limitant les interactions non spécifiques avec d'autres cellules.

Comme démontré ici, les LT sont une population prometteuse pour le transport de nanoparticules du fait de leur forte capacité de ciblage des sites d'intérêt. De plus, ces cellules sont catégorisées en plusieurs sous-populations, chacune avec un mode de reconnaissance et d'action spécifique à un contexte particulier. Par exemple, les $LT\gamma\delta$, sous-population minoritaire des LT, possèdent de nombreuses spécificités de ciblage, d'action et de reconnaissance de cellules tumorales ou infectées par divers virus, parasites ou bactéries. Leur utilisation dans ce type de système serait très prometteuse, c'est pourquoi notre travail s'est fixé sur ce type cellulaire. Leurs propriétés seront développées dans le chapitre suivant.

Pour développer le biohybride idéal, un dernier point reste à être étudié : l'association entre le polymersome et la cellule immunitaire choisie. Cette liaison doit respecter plusieurs critères tels qu'une bonne biocompatibilité, une forte réactivité, une adaptabilité au type cellulaire mais surtout elle ne doit pas altérer les caractéristiques et actions des nanoparticules ou des cellules. Dans cette dernière partie, nous allons donc développer une méthode pouvant être utilisée pour répondre à cette problématique : la chimie bio-orthogonale.

3.2. Concept de la chimie bio-orthogonale

Lors des deux parties précédentes, nous avons donc mis en évidence l'importance de la sélection des deux principales entités du système de délivrance idéal : la nanoparticule, qui est ici un polymersome, et le vecteur, représenté ici par les cellules immunitaires. Toutefois, il faut maintenant savoir comment associer ces deux entités pour obtenir un couplage optimal tout en maintenant les activités et caractéristiques spécifiques de ces dernières. La chimie bio-orthogonale représente donc une solution idéale.

La chimie bio-orthogonale regroupe toute réaction se produisant à l'intérieur de systèmes vivants sans interférer avec les processus biochimiques natifs ni le métabolisme et la viabilité de la cellule hôte. Ces réactions basées sur les principes de la chimie organique physique, sont caractérisées comme étant à la fois sélectives et biocompatibles du fait de leur utilisation en conditions aqueuses, leur absence de catalyseurs toxiques et leur vitesse d'exécution. Elles représentent donc une liaison spécifique et idéale pour coupler les polymersomes à nos cellules immunitaires en limitant toute atteinte au métabolisme cellulaire. Il existe de

nombreuses réactions bio-orthogonales fréquemment utilisées, toutefois seules trois seront développées ici : la liaison de Staudinger, la Copper(I)-catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition et la Strain-promoted azide–alkyne cycloadditions [60], [61] (**Figure 9**).

3.2.1. La liaison de Staudinger

La réaction de Staudinger a été mise en évidence pour la première fois en 1919 par Staudinger lui-même [61] et repose sur une réaction entre un dérivé de phosphore et un azide organique menant à l'élaboration d'un iminophosphorane puis d'une molécule d'amine (**Figure 9A**). Cette réaction a tout d'abord été développée lors de la production de composés chimiques avant d'être adaptée aux contextes biologiques. Du fait de la quasi absence des dérivés de phosphore et des azides organiques en condition physiologique et de leur simplicité de formulation au niveau chimique, cette réaction a formé une base idéale pour le développement de réactions biocompatibles. C'est sur cette base que l'équipe de Bertozzi s'est appuyée pour créer la première transformation bio-orthogonale devenue indispensable de nos jours : la liaison de Staudinger ou liaison de Staudinger – Bertozzi [62]. Cette liaison est basée sur une interaction entre un azide organique et un dérivé de phosphate spécifique (triarylphosphine) menant à la formation d'une liaison amide (**Figure 9B**). Grâce à ses caractéristiques de biocompatibilité, de sélectivité, de rapidité et d'efficacité, cette liaison est devenue une technique de bioconjugaison incontournable dans les années 1990 [63]. Initialement utilisée pour le marquage des glycanes à la surface des cellules [62], son utilisation a rapidement été élargie. En effet, en plus d'être entièrement biocompatible, les azides possèdent l'avantage de faire partie des plus petits groupes fonctionnels bio-orthogonaux, ce qui facilite leur utilisation. Concrètement, les dérivés de phosphate peuvent être ajoutés à la surface de toute entité chimique (sonde, fluorochrome, polymersome) tandis que les azides organiques s'intègrent à la surface des entités biologiques (protéine, ADN, cellule). La liaison de Staudinger-Bertozzi a donc notamment pu être utilisée pour cibler des protéines [64], des acides nucléiques [65] mais elle a également permis le développement de sondes à base de phosphate dans le but de fonctionnaliser des protéines [66].

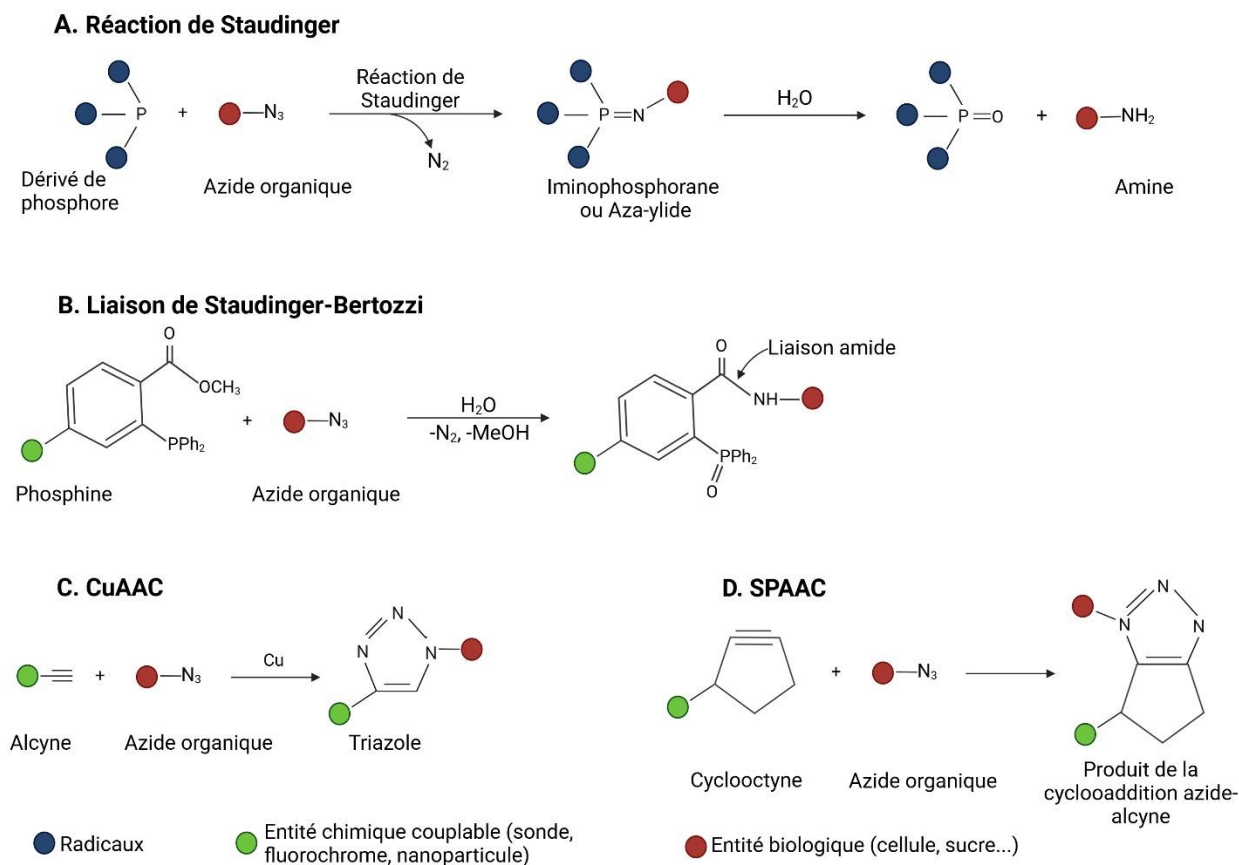


Figure 9 : Représentation schématique de différentes chimies bio-orthogonales menant à l'élaboration de la chimie click.

La réaction de Staudinger repose sur l'interaction entre un dérivé de phosphore et un azide organique, elle a marqué le début du développement des chimies bio-orthogonales (A). Quelques années plus tard, l'équipe de Bertozzi a adapté cette réaction pour une utilisation en milieu biologique. La liaison de Staudinger – Bertozzi implique la réaction entre un dérivé de phosphate avec un azide organique (B). Comme son nom l'indique, cette réaction permet de créer une liaison entre les deux composés initiaux aboutissant à un composé final unique comprenant une liaison amide. Ainsi, une entité chimique (représentée par le cercle vert) peut être attachée à la molécule de phosphine, et une entité biologique (représentée par le cercle rouge) peut être liée à l'azide organique permettant la formation d'un biohybride. Cette approche a par la suite été améliorée menant à la création de la première chimie click utilisant le cuivre : la Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) (C). Enfin, une optimisation supplémentaire a conduit au développement de la Strain-promoted azide-alkyne cycloadditions (SPAAC), chimie click bien plus biocompatible que la CuAAC en raison de l'absence de cuivre (D). Cette élimination du cuivre est possible grâce à une meilleure réactivité entre une cyclooctyne (liée à une entité chimique) et l'azide organique. Créée avec BioRender.com

C'est également à partir de la réaction de Staudinger que l'équipe de K. Barry Sharpless a pu développer la chimie click en 2001 [67]. Sous ce terme sont regroupées « toutes les réactions chimiques capables de former très rapidement et efficacement des intermédiaires synthétiques en établissant des connexions covalentes entre différentes entités, selon des processus analogues à ceux qui sont mis en œuvre par la nature ». Il est donc nécessaire que ces réactions soient réalisables à température ambiante, en milieux aqueux, organiques ou

hydro-alcooliques et qu'elles soient sélectives en plus d'être tolérantes à l'oxygène et à l'humidité [68]. Une des plus importantes caractéristiques de cette chimie click est le fait qu'elle ne laisse aucune trace, c'est-à-dire que toutes les molécules chimiques présentes lors de la réaction initiale sont utilisées pour former la molécule finale. Aucune d'entre elles n'est éliminée de la réaction pour se retrouver stagnante dans l'environnement biologique, ce qui limite fortement la toxicité cellulaire. La chimie click regroupe plusieurs réactions que nous allons décrire plus en détails dans les chapitres suivants : la Copper(I)-catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition et la Strain-promoted azide-alkyne cycloadditions.

3.2.2. Copper(I)-catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition : CuAAC

Comme précédemment mentionné, la Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC), qui correspond à une cycloaddition d'azide-alkyne catalysée par le cuivre, fait partie de la famille des réactions click. Brièvement, cette cycloaddition est basée sur la réaction mise en évidence par Huisgen en 1986 [69] entre des cycles d'alcynes et des azides organiques formant des groupes aromatiques triazoles (**Figure 9C**). Comme les liaisons introduites précédemment, cette dernière ne peut se produire naturellement du fait de l'absence d'azides et d'alcynes en milieu naturel. De plus, il a été démontré que cette réaction était trop lente pour être utilisée en condition biologique. C'est pourquoi des adaptations ont été mises en place. Tout d'abord, les équipes de Medal et Sharpless en 2002 ont révélé que l'ajout d'un catalyseur à base de cuivre permet l'accélération de cette réaction [70], [71]. Cependant, l'excès de cuivre peut provoquer une oxydation du milieu, phénomène délétère pour le corps. Des ligands hydrosolubles liant le cuivre ont ainsi été développés. Cela a permis d'ouvrir cette technique à la conjugaison bio-orthogonale. En effet, les ligands hydrosolubles limitent la formation d'espèces réactives de l'oxygène en stabilisant l'état d'oxydation requis du cuivre tout en donnant une meilleure accessibilité au métal. En résumé, l'ajout de ce ligand hydrosoluble permet l'accélération de la réaction tout en minimisant le stress oxydatif induit par le cuivre améliorant donc la biocompatibilité de la réaction [61]. Comme mentionné ci-dessus, en plus de leur forte biocompatibilité, les azides et alcynes ne sont pas naturellement présents dans le système biologique. Ils n'interagissent qu'entre eux en présence de leur catalyseur. Cette spécificité d'interaction permet d'intégrer des azides à la surface d'entités biologiques sans risquer d'altérer leur fonctionnement ou leur élimination [61]. Cette intégration d'azide

permet ainsi le couplage de ces molécules biologiques (cellules, protéines, sucres, lipides) avec toute autre entité marquée avec un alcyne, son conjugué orthogonal (polymersomes, sondes, fluorochromes). C'est notamment pour le développement de cette nouvelle chimie click que Carolyn Bertozzi, Barry Sharpless et Morten Meldal ont reçu le prix Nobel de chimie en 2022 [72]. Toutes ces améliorations ont conduit à une adaptation de la CuAAC pour la fonctionnalisation de polymères [73] aussi pour le marquage de surface cellulaire [74] ou d'enzyme [75].

Toutefois, l'utilisation du cuivre comme catalyseur de la réaction click présente quelques limitations du fait d'une forte régulation de cette molécule par les cellules. Par exemple, les molécules de thiols sous forme de cystéine et glutathion ont une forte capacité de liaison au cuivre le rendant inactif et déclenchant un stress oxydatif au niveau cellulaire pouvant être toxique [76]. C'est pourquoi des alternatives sans cuivre ont été développées.

3.2.3. Strain-promoted azide–alkyne cycloadditions (SPAAC)

La Strain-promoted azide–alkyne cycloadditions (SPAAC) se base sur le même processus que la CuAAC mais ne nécessite pas d'ajout de cuivre. Comme son nom l'indique, cette interaction est favorisée par des réactions d'azide avec des cycles d'alcynes appelés cyclooctynes (**Figure 9D**). Les cyclooctynes sont les plus petits alcynes cycliques pouvant être isolés et conservés sous leur forme pure [77]. L'idée de les utiliser dans un contexte de couplage a émergé à l'aide des remarques de Blomquist en 1953 portant sur la réactivité de ces cyclooctynes. Il a été le premier à observer que "le cyclooctyne réagit de manière explosive lorsqu'il est traité avec de l'azoture de phényle, formant un produit liquide visqueux" [78]. L'idée était donc de remplacer les alcynes simples présents à la surface des entités chimiques lors de la CuAAC par ces cyclooctynes ne nécessitant pas d'ajout de cuivre pour interagir avec les azides. Ce procédé a été utilisé pour la première fois par l'équipe de Bertozzi [79]. Dans cette étude, leur but était de visualiser de manière sélective des cellules vivantes modifiées exprimant des azides à leur surface. Pour ce faire, les glycanes de la surface cellulaire ont été métaboliquement modifiés pour exprimer les azides et des cyclooctynes ont été ajoutés à la surface de molécule de biotine. La biotine a pu être accrochée à la cellule par le biais de la SPAAC et cette interaction a été révélée par un marquage streptavidine. Cette première

démonstration a ainsi permis d'affirmer que la SPAAC est suffisamment rapide pour que cette chimie puisse être utilisée en milieu physiologique sans avoir recours à l'ajout de catalyseurs.

3.2.3.1. Fonctionnalisation des polymersomes avec les cyclooctynes

Comme mentionné précédemment, l'équipe de Bertozzi a montré qu'il était possible de fonctionnaliser ces cyclooctynes avec de la biotine *via* la réaction SPAAC [79]. Ces molécules se sont donc révélées comme particulièrement attrayantes pour la fonctionnalisation des polymersomes. Les cyclooctynes peuvent être ajoutés à la surface des polymersomes post-formulation, pour présenter un alcyne pouvant agir comme un lien entre le polymersome et un azide organique disponible sur une protéine ou une cellule par exemple. Les alcynes terminaux constituent un groupe fonctionnel très intéressant pour la modification post-formulation du fait de leur bonne tolérance aux larges gammes de conditions de réaction qui peuvent être utilisées pour cette étape [80]. Plusieurs études ont déjà exploré l'utilisation de la SPAAC pour la modification contrôlée de la surface de différents types de nanoparticules polymériques comme l'ont montré les travaux des équipes de Boons, sur l'accrochage de nanoparticules sur des protéines dans le cas de thérapie anti-cancéreuse, [80], [81] et de Theogarajan, dans une étude comparative de diverses réactions click [82].

3.2.3.2. Développement des cyclooctynes

Depuis, de nombreuses cyclooctynes ont été développées afin de parfaire la réactivité de cette chimie click sans compromettre la stabilité de la réaction. En effet, la lenteur de la réactivité entre le cyclooctyne et l'azide ainsi que l'utilisation de quantités conséquentes de réactif ont rapidement été vus comme des points limitants dans l'utilisation de ce système dans des systèmes biologiques [77]. Il existe dorénavant deux classes de cyclooctynes : les cyclooctynes aliphatiques de la première génération, correspondant à des hydrocarbures à chaînes ouvertes (**Figure 10A**), et les cyclooctynes (di)benzoannulés plus communément utilisés aujourd'hui (**Figure 10B**). La suite de ce chapitre va s'intéresser uniquement à cette seconde génération.

L'ajout de molécules de benzène améliore la réactivité du cyclooctyne mais elle peut engendrer une augmentation de son caractère hydrophobe pouvant interférer avec sa

disponibilité lors de la SPAAC [77]. De nombreuses molécules ont été développées en jouant sur divers paramètres de formulation pour améliorer leur réactivité, leur caractère hydrosoluble ou leur stabilité tels que le biarylazacyclooctynone (BARAC), réputé pour une bonne réactivité mais une très faible stabilité [83], ou encore le bicyclononyne (BCN), connu pour une synthèse rapide et simple [84]. Toutefois, ces améliorations se sont basées sur le premier cyclooctyne dibenzoannulé adapté à la conjugaison, le dibenzocyclooctyne (DIBAC ou DBCO) (**Figure 10C**). Ce dernier a été mis au point par Ning et al en 2008 [85] et fait partie des cyclooctynes les plus utilisées pour la SPAAC [77]. Il regroupe plusieurs caractéristiques attrayantes comme une approche synthétique simple, une non-toxicité et une compatibilité avec de nombreux composés [86]. C'est notamment pour ces raisons que notre choix s'est porté sur l'association du DBCO avec notre polymersome donnant donc le Pbut-PEG-DBCO.

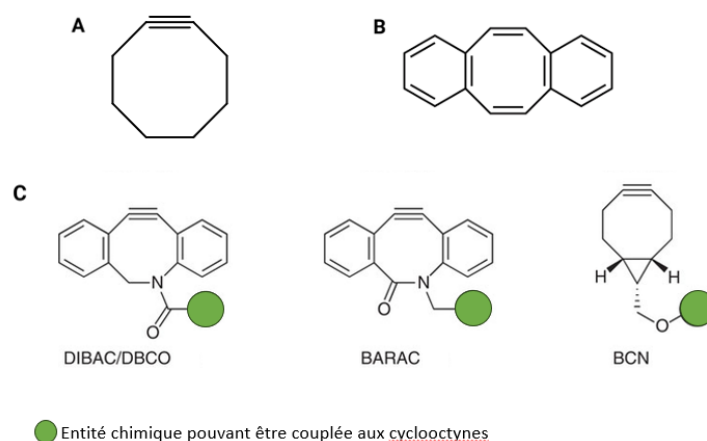


Figure 10 : Représentation moléculaire de différentes cyclooctynes.

Représentations moléculaires des cyclooctynes aliphatiques de première génération (A) et des cyclooctynes (di)benzoannulés (B). Les cyclooctynes utilisés lors de la SPAAC incluent généralement le dibenzocyclooctyne (DIBAC ou DBCO), le biarylazacyclooctynone (BARAC) ou le bicyclononyne (BCN). Leurs représentations moléculaires sont retrouvées en C. Le rond vert représente une entité chimique pouvant être liée aux cyclooctynes, comme une nanoparticule par exemple. Modifiée d'après [87].

Comme expliqué lors de ce chapitre, la SPAAC correspond à une interaction entre un cyclooctyne et un azide organique. De plus, il est possible d'ajouter des cyclooctynes à la surface des polymersomes. Le but final étant de coupler ces polymersomes à des cellules immunitaires pour former le système de transport de principes actifs parfait, il est nécessaire que ces azides soient présents à leur surface. Cependant, ces azides ne sont pas naturellement présents dans les systèmes biologiques. Il est donc nécessaire de modifier ces cellules pour

qu'elles l'expriment. Pour cela, il est possible d'utiliser la méthode de la modification glycométabolique que nous allons détailler ci-dessous.

3.3. Expression d'un azide organique par les cellules : la modification glycométabolique

Une avancée séduisante dans le développement des thérapies ciblées utilisant les nanoparticules est de coupler ces particules aux cellules à l'aide de la chimie click SPAAC entre un azide organique et un cyclooctyne. Le biohybride obtenu permet un ciblage actif des sites d'intérêt plus performants qu'une nanoparticule nue. Comme présenté précédemment, il est possible d'ajouter des cyclooctynes à la surface des polymersomes. Cependant, les azides organiques sont inexistantes dans le système biologique excepté chez certains microorganismes et levures [88]. L'ingénierie métabolique des glycanes de la surface cellulaire s'est avérée une modification biochimique intéressante pour faire exprimer ces azides aux cellules. Les glycanes de surface sont de bons sites de liaison pour la conjugaison de polymersomes en raison de leur grande abondance à la surface cellulaire. En effet, les récepteurs membranaires responsables des fonctions biologiques tels que les récepteurs à tyrosine kinase, le récepteur du TGF β ou encore les récepteurs de mort comme Fas, sont des protéines transmembranaires généralement fortement glycosylées (**Figure 11**). Ces glycanes liés aux récepteurs émergent du cœur de la protéine vers l'espace extracellulaire et se retrouvent comme étant le premier point de contact. Ils ont le potentiel de contrôler la conformation et l'accessibilité des sites de liaison spécifiques aux ligands [89] jouant ainsi un rôle crucial dans de nombreux processus immunitaires [90], [91] mais aussi au niveau structurel et métabolique [92].

Bertozi et ses collaborateurs, Saxon et Laughlin, ont été les premiers à utiliser le marquage métabolique des glycanes pour y introduire des fonctionnalités non naturelles [62], [93]. Dans cette approche, les cellules sont cultivées avec des monosaccharides non naturels contenant un azide. Cette culture a pour effet d'exposer les glycanes modifiés contenant l'azide non naturel à la surface de la cellule (**Figure 12**). Cette première démonstration indique la faisabilité de modifier des cellules pour leur faire exprimer des azides à leur surface, permettant donc potentiellement d'y greffer des polymersomes possédant un DBCO.

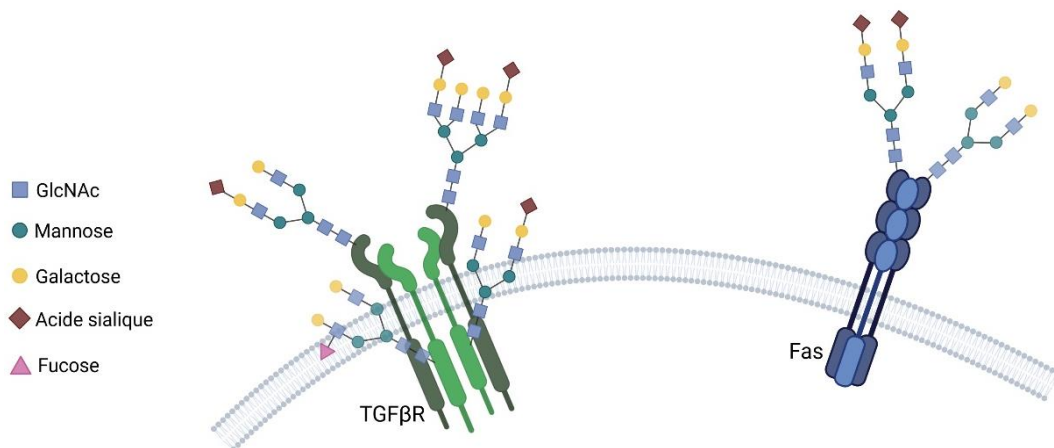


Figure 11 : Glycanes retrouvés sur des récepteurs clés de la surface cellulaire.

Une majeure partie des protéines de surface sont glycosylées au cours de leur formation intracellulaire. Les glycanes de surface jouent donc un rôle primordial lors des interactions intracellulaires ou lors de liaisons entre un récepteur et son ligand. Les récepteurs membranaires responsables des fonctions biologiques tels que les récepteurs à tyrosine kinase, le récepteur du TGF β ou encore les récepteurs de mort comme Fas, sont des protéines transmembranaires généralement fortement glycosylées. Modifiée d'après Gao et al. 2021. Créée avec BioRender.com

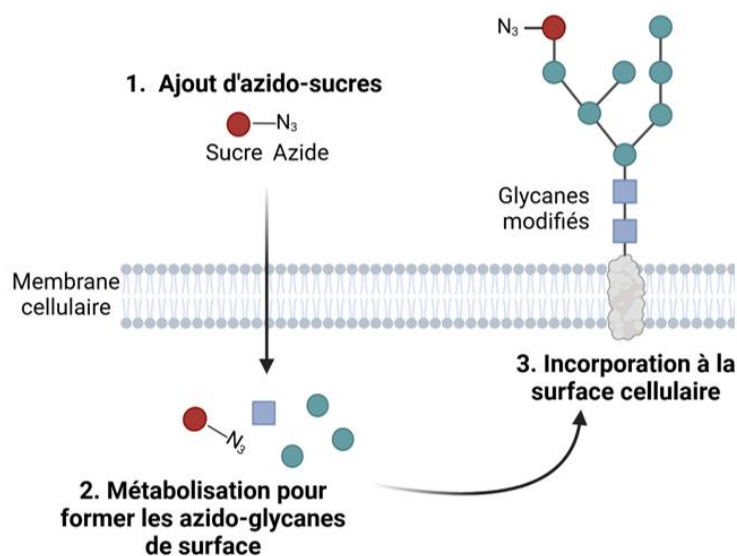


Figure 12 : Intégration des azido-sucres lors de la modification métabolique des glycanes de surface.

Des azido-sucres tétra-acétylés peuvent être intégrés au métabolisme des glycanes permettant aux cellules d'exprimer un azide à leur surface. Cet azide libre peut ensuite interagir avec des cyclooctynes dans le but de réaliser la SPAAC. Créée avec BioRender.com

De nombreux précurseurs métaboliques, également appelés azido-sucres, peuvent être utilisés pour réaliser cette ingénierie métabolique. Ici, nous allons nous concentrer sur trois d'entre eux : le N-azidoacétylglucosamine tétra-acétylé (Ac₄GlcNAz), le N-

azidoacétylgalactosamine tétra-acétylé ($Ac_4GalNAz$) et le N-azidoacétylmannosamine tétra-acétylé ($Ac_4ManNAz$).

3.3.1. Sélection des azido-sucre

Divers analogues de sucres peuvent être pris en charge par les voies de biosynthèse des glycanes mais ceux contenant un groupe azide, dont font partie l' $Ac_4GlcNAz$, l' $Ac_4ManNAz$ et l' $Ac_4GalNAz$ (**Figure 13**), ont été favorisés *via* le développement des techniques du groupe de Bertozzi. Certains critères sont à prendre particulièrement en compte lors de leur considération, notamment la localisation de l'azide au niveau de la structure du sucre. En effet, il est crucial que ces azido-sucre soient pris en charge correctement lors des conversions enzymatiques puis lors de leur incorporation aux glycanes afin de favoriser l'exposition de leurs groupes azides à la surface des cellules [94]. Ces azido-sucre sont sous forme tétra-acétylée, c'est-à-dire qu'ils possèdent quatre groupements acétyls. Cette acétylation assure leur entrée dans les cellules par diffusion passive. Une fois désacétylés par des estérases naturelles, chacun de ces sucres GalNAz, ManNAz et GlcNAz peut entrer dans les voies métaboliques de biosynthèse ou de récupération de leurs analogues naturels GalNAc, ManNAc et GlcNAc respectivement. La voie métabolique de chaque sucre ainsi que leur implication dans l'élaboration des glycanes cellulaires sont détaillés dans les sous-chapitres suivants.

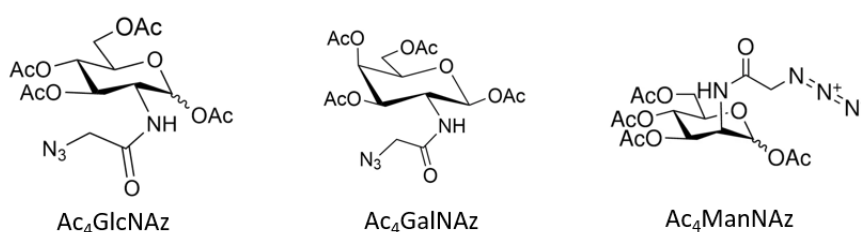


Figure 13 : Représentation moléculaire de trois azido-sucre.

Le N-azidoacétylglucosamine tétra-acétylé ($Ac_4GlcNAz$), le N-azidoacétylgalactosamine tétra-acétylé ($Ac_4GalNAz$) et le N-azidoacétylmannosamine tétra-acétylé ($Ac_4ManNAz$) sont les trois analogues de sucres étudiés lors de ce travail. Grâce à leur groupement acétyls, ces composés peuvent pénétrer passivement dans les cellules. Une fois à l'intérieur, ils peuvent être intégrés dans les voies de biosynthèse des glycanes, permettant ainsi aux cellules d'exprimer un azide à leur surface. Ces azides peuvent ensuite réagir avec des cyclooctynes *via* la SPAAC et donc permettre un couplage entre cellule et l'entité liée aux cyclooctynes.

3.3.1.1. N-azidoacétylglucosamine tétra-acétylée : Ac₄GlcNAz

Après diffusion, le GlcNAz peut intégrer la voie de glycosylation du GlcNAc (**Figure 14**). C'est en 1984 que l'on découvre l'importance du GlcNAc dans la glycosylation de protéines nucléaires et cytosoliques, contrairement à la glycosylation conventionnelle qui se produit dans la voie de sécrétion [95]. La structure de cette nouvelle glycosylation a été identifiée comme étant l'O-GlcNAc (« O-linked- β -N-acetylglucosamine ») unique et a été comparée au mécanisme de phosphorylation, une modification post-traductionnelle connue pour les protéines nucléocytoplasmiques. Ce type de glycosylation possède plusieurs particularités : elle ne se produit qu'en intracellulaire, elle n'est pas allongée en structures plus complexes dans la majeure partie des cas et elle est dynamique. En effet, cette modification possède un cycle « on / off » répondant à de nombreux stimuli cellulaires et physiologiques tels que les nutriments, les hormones, ou encore le stress [96], [97]. Deux enzymes sont primordiales lors de cette glycosylation et de la régulation du cycle de l'O-GlcNAc : la glycotransférase O-GlcNAc transférase (OGT) [98] et la glycoside hydrolase O-GlcNAcase (OGA) [99]. L'OGT permet d'introduire le GlcNAc sur les protéines cibles et donc de les glycosyler tandis que l'OGA a un effet inverse permettant de les ramener à leur état non modifié en fonction des stimuli envoyés par la cellule [100]. Cependant, ces deux enzymes sont considérées comme critiques et limitantes lors de ce processus ce qui peut engendrer un encombrement des métabolites précédents et donc une mauvaise intégration du GlcNAc ou GlcNAz dans notre cas [101].

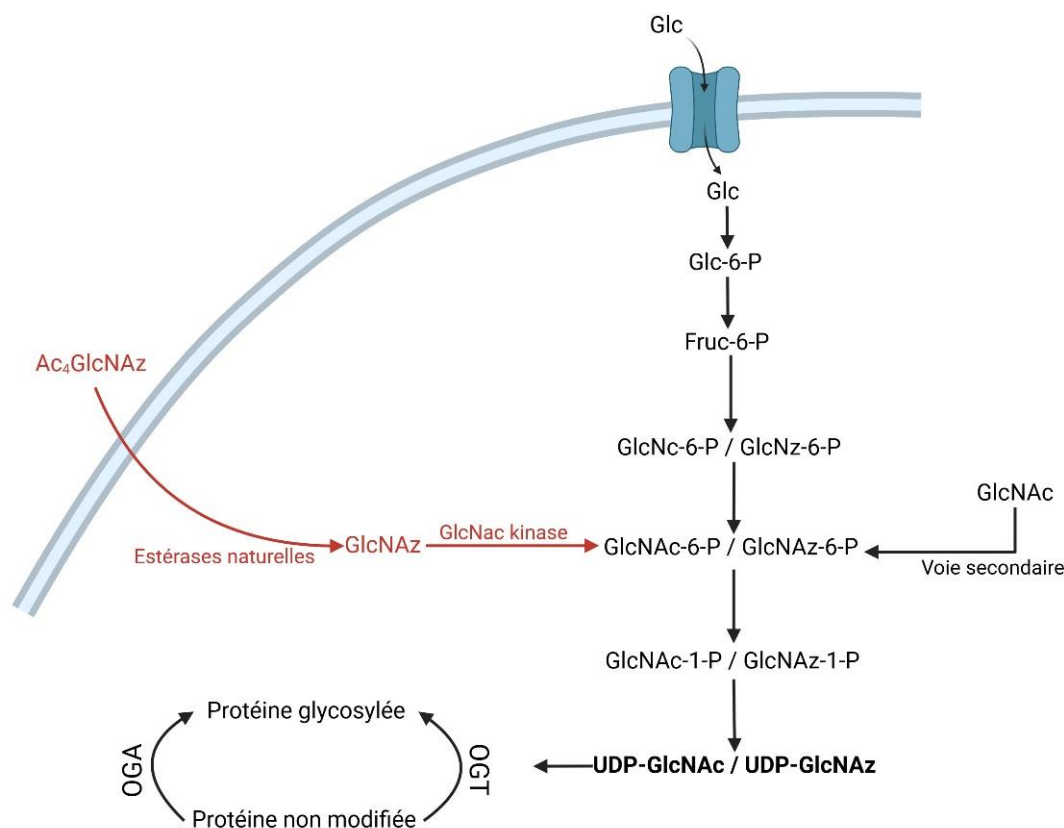


Figure 14 : Voie de la glycosylation par le GlcNAc et intégration du Ac₄GlcNAz.

La glycosylation impliquant le GlcNAc, et donc dans notre cas le GlcNAz, est responsable de l'ajout de glycanes sur les protéines nucléaires et cytosoliques. Cette modification possède un cycle « on / off » répondant à de nombreux stimuli cellulaires et physiologiques tels que les nutriments, les hormones, ou encore le stress. Modifiée d'après [100]. Créée avec BioRender.com

Ac₄GlcNAz : N-azidoacétylglucosamine tétra-acétylé, GlcNAc : N-acétylglucosamine, GlcNAz : N-azidoacétylglucosamine, Glc : Glucose, Glc-6-P : Glucose-6-Phosphate, Fruc-6-P : Fructose-6-Phosphate, GlcNc-6-P ou GlcNAc-6-P : N-Acétylglucosamine-6-Phosphate, GlcNz-6-P ou GlcNAz-6-P : N-azidoacétylglucosamine-6-Phosphate, GlcNAc-1-P : N-acétylglucosamine-1-Phosphate, GlcNAz-1-P : N-azidoacétylglucosamine-1-Phosphate, UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate N-acétylglucosamine, UDP-GlcNAz : Uridine diphosphate N-azidoacétylglucosamine, OGT : glycotransférase O-GlcNAc transférase, OGA : glycoside hydrolase O-GlcNAcase.

3.3.1.2. N-azidoacétylmannosamine tétra-acétylée : Ac₄ManNAz

L'Ac₄ManNAz, après désacétylation, peut intégrer la voie de l'acide sialique en imitant le ManNAc (**Figure 15**). L'acide sialique est un composant essentiel dans le métabolisme mammalien. En effet, il est localisé en bout de glycanes de surface et permet donc de nombreuses interactions cellules-cellules ou cellules-matrice extracellulaire : il influence les propriétés biochimiques des glycoprotéines et lipides et participe au contrôle de l'adhésion cellulaire et la migration. Il est également un ligand de la protéine H, empêchant l'activation du complément lors du trafic des lymphocytes et leur extravasation sur les sites inflammatoires [102]. C'est donc un composant très présent à la surface des cellules et l'un de

ses précurseurs uniques par sa voie de récupération (voie secondaire à cette biosynthèse), est le ManNAc. Le ManNAc est converti en Neu5Ac par trois enzymes : l'UDP-GlcNAc 2-épimérase/ManNAc kinase (GNE) qui produit le ManNAc-6-phosphate, la N-acétylneuraminase synthase (NANS) qui produit le Neu5Ac-9-phosphate, et enfin la Neu5Ac-9-P-phosphatase (NANP) qui produit le Neu5A [102]. Sur la voie principale, les acides sialiques sont quant à eux, synthétisés dans le cytosol à partir du GlcNAc converti en GlcNAc-6-P puis GlcNAc-1-P avant de devenir l'UDP-N-acétylglucosamine. La suite de la réaction est identique à la voie de sauvetage. L'ajout direct de ManNAz et non de GlcNAz permet donc d'éviter la molécule limitante UDP-GlcNAc en passant par la voie secondaire de l'acide sialique [103].

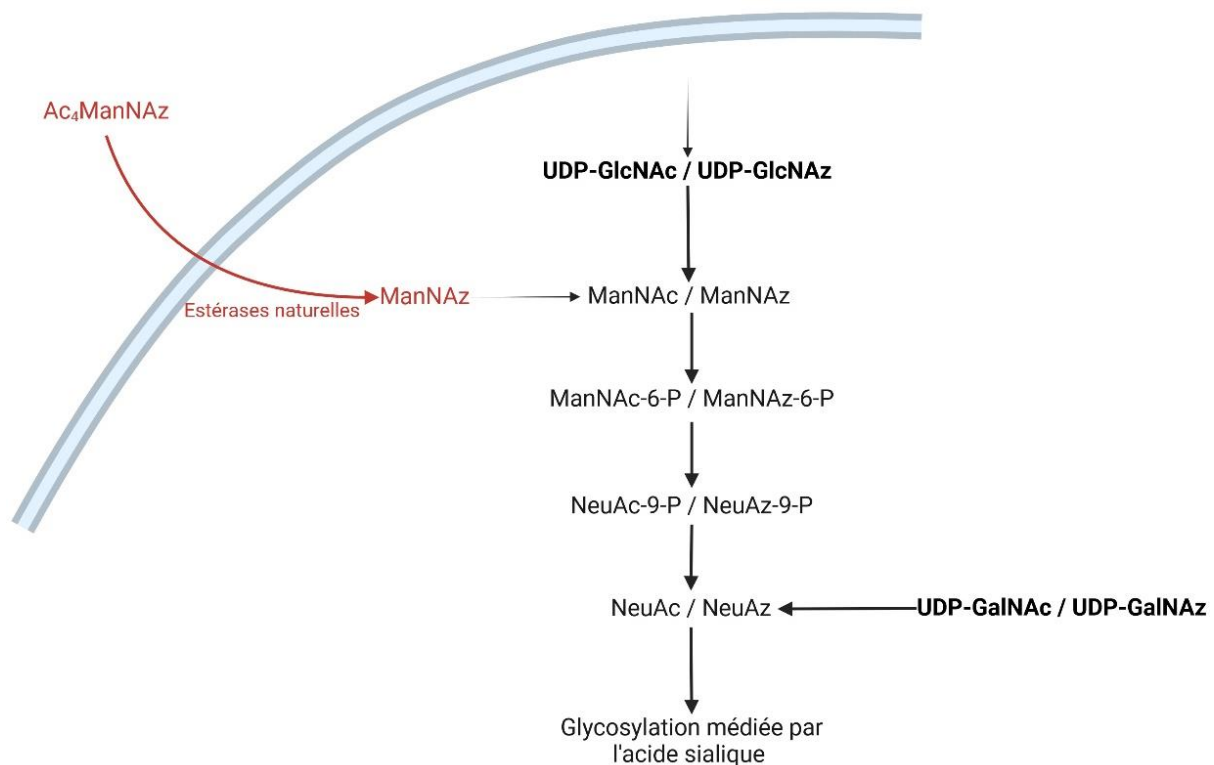


Figure 15 : Voie de la glycosylation par le ManNAc et intégration du Ac₄ManNAz.

Le ManNAc, et dans notre cas le ManNAz, sont impliqués dans la glycosylation de protéines de surface par la voie de l'acide sialique. L'acide sialique, composant essentiel dans le métabolisme mammalien, est localisé en bout de glycanes de surface. Il permet donc de nombreuses interactions cellules-cellules ou cellules-matrice extracellulaire. Modifiée d'après [103]. Créée avec BioRender.com

Ac₄ManNAz : N-azidoacétylmannosamine tétra-acétylé, ManNAz : N-azidoacétylmannosamine, ManNAc : N-acétylmannosamine, ManNAc-6-P : N-acétylmannosamine-6-Phosphate, ManNAz-6-P : N-azidoacétylmannosamine-6-Phosphate, NeuAc-9-P : Acide N-acétylneuraminic acid-9-phosphate, NeuAz-9-P : N-azidoacétylneuraminic acid-9-phosphate, NeuAc : N-acétylneuraminic acid, NeuAz : N-azidoacétylneuraminic acid, UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate N-acétylglucosamine, UDP-GlcNAz : Uridine diphosphate N-azidoacétylglucosamine.

3.3.1.3. N-azidoacétylgalactosamine tétra-acétylée : Ac₄GalNAz

Enfin, l'Ac₄GalNAz, après désacétylation, peut entrer dans le processus d'O-glycosylation de type mucine des protéines sécrétées qui est caractérisé par la présence de GalNAc (**Figure 16**). Le mucus est présent sur une grande partie des types cellulaires et possède de nombreuses fonctionnalités en fonction de sa localisation (tractus digestif, cavité utérine, mucus oculaire...). Cette glycosylation est initiée dans l'appareil de Golgi par une famille de polypeptides N-acétyl- α -galactosaminyltransférases (ppGalNAcTs) [104]. Comme décrit, cette glycosylation peut démarrer par plusieurs précurseurs. Elle peut partir du GalNAc comme expliqué précédemment ou du GlcNAc *via* sa voie secondaire. L'intégration du GalNAz permet l'utilisation de la voie principale et non de la voie secondaire du GlcNAc ce qui permet d'éviter l'encombrement évoqué précédemment. De plus, le GalNAz est fortement similaire au ManNAz, il pourrait donc être incorporé et converti en NeuNAz comme le ManNAz *via* leur voie de sauvetage. Cela mènerait donc à la voie de l'acide sialique et à sa forte présence à la surface cellulaire [94].

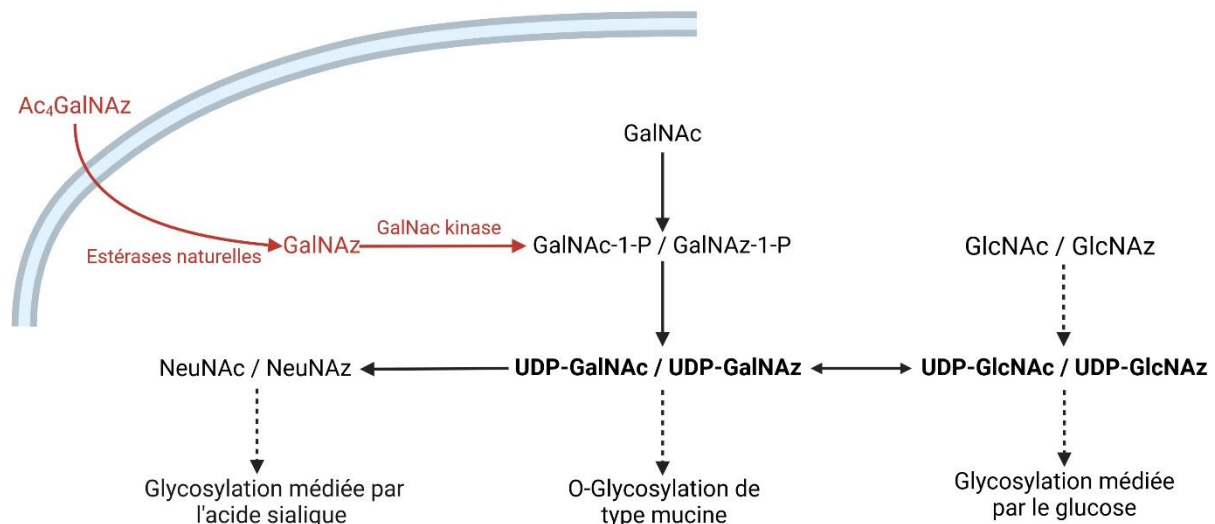


Figure 16 : Voie de la glycosylation par le GalNAc et intégration du Ac₄GalNAz.

Le GalNAc et dans notre cas le GalNAz, jouent un rôle dans le processus d'O-glycosylation de type mucine des protéines sécrétées. Comme son nom l'indique, ce processus permet la glycosylation de protéines présentes dans le mucus qu'il soit intestinal, utérin ou encore oculaire. Cette glycosylation peut être initiée par divers précurseurs mais le GalNAc ou GalNAz peut également emprunter l'une des deux autres voies métaboliques étudiées précédemment impliquant le glucose ou le mannose. Modifiée d'après [104]. Créée avec BioRender.com

Ac₄GalNAz : N-azidoacétylgalactosamine tétra-acétylé, GalNAc : N-acétylgalactosamine, GalNAz : N-azidoacétylgalactosamine, GalNAc-1-P : N-acétylgalactosamine-1-Phosphate, GalNAz-1-P : N-azidoacétylgalactosamine-1-Phosphate, UDP-GalNAc: Uridine diphosphate N-acétylgalactosamine, UDP-GalNAz: Uridine diphosphate N-azidoacétylgalactosamine, GlcNAc : N-acétylglucosamine, GlcNAz : N-azidoacétylglucosamine, UDP-GlcNAc: Uridine diphosphate N-acétylglucosamine, UDP-GlcNAz : Uridine diphosphate N-azidoacétylglucosamine, NeuAc : N-acetylneuraminic acid, NeuAz : N-azidoacetylneuraminic acid.

3.3.2. Couplage des cellules avec les nanoparticules *via* la chimie click

L'ensemble de l'évolution de ces techniques a permis à l'équipe de Bertozzi d'établir la première étude utilisant la chimie bio-orthogonale sur des cellules vivantes [104]. Les glycanes issus du processus d'O-glycosylation ont été marqués en utilisant l'Ac₄GalNAz. Comme décrit précédemment, cette étude a montré que cette glycosylation est initiée dans l'appareil de Golgi par une famille de ppGalNAcTs. Par la suite, de nombreuses études ont exploité cette technique dans divers contextes avec différentes cellules. Par exemple, Koo *et al.* ont couplé des liposomes PEGylés sur des cellules d'adénocarcinome A549 modifiées à l'aide d'Ac₄ManNAz [105]. L'ensemble de ces études montre la faisabilité de coupler des nanoparticules à la surface de cellules immunitaires que ce soit au niveau de la disponibilité des azides ou de la fonctionnalité des cellules après couplage. Un des plus gros avantages de cette chimie click est qu'elle n'existe pas naturellement ce qui permet un contrôle important avec un risque de réaction non spécifique très faible. Gibson et ses collègues se sont plus précisément intéressés au contrôle de cette interaction à l'aide d'un couplage entre un polymersome couplé au DBCO et des cellules d'adénocarcinome A549 modifiées par l'azide ce qui leur a permis d'acquies une meilleure compréhension de la réaction et de ses spécificités [106], [107].

Cette dernière partie a mis en lumière le dernier maillon nécessaire à la formation d'un système idéal de transport de principes actifs mêlant nanoparticules et cellules immunitaires : la chimie click. C'est sur l'association de ces trois entités que notre projet s'est développé afin de créer le système de transport/le biohybride le plus efficace. Le but est donc de coupler des polymersomes sur des cellules immunitaires par le biais de la SPAAC. Pour ce faire, les polymersomes sont fonctionnalisés avec du DBCO et les cellules modifiées métaboliquement à l'aide d'azido-sucres (**Figure 17**).

Polymersome fonctionnalisé avec du DBCO

Composition et taille modulable
 Capacité d'encapsulation importante
 Biocompatible
 Fonctionnalisation aisée

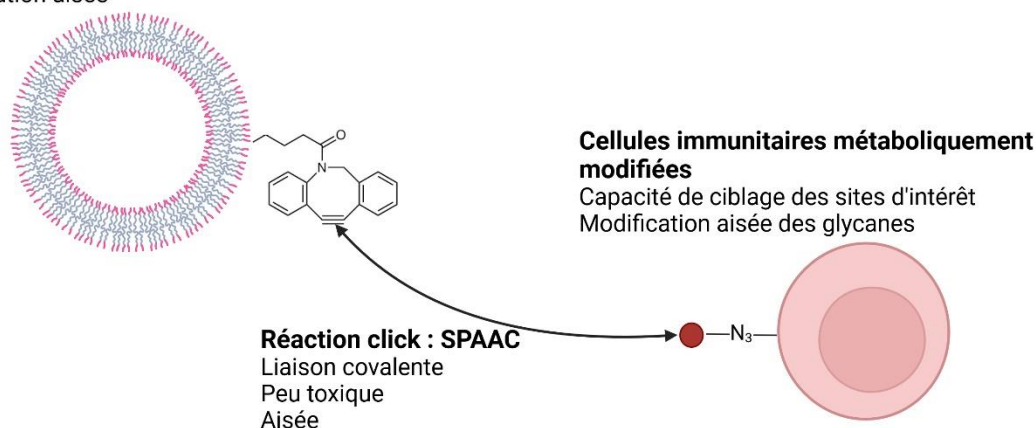


Figure 17 : Représentation schématique du système de transport idéal.

Le polymersome a été choisi en raison de ses caractéristiques avantageuses. En plus d'être biocompatible et facile à fonctionnaliser, sa composition est modulable et adaptable au contexte d'étude. Il présente une grande capacité d'encapsulation tant au niveau de la concentration du principe actif que de sa nature (hydrophile ou hydrophobe). Ensuite, les cellules immunitaires se sont révélées être des vecteurs de choix. Elles permettent un ciblage actif, spécifique et efficace des sites d'intérêt. De plus, la modification métabolique favorise leur utilisation grâce à l'élaboration de la SPAAC. L'interaction entre le cyclooctyne présent sur les polymersomes et l'azide libre à la surface des cellules, crée une liaison covalente, pérenne, non toxique et simple à mettre en œuvre. L'ensemble de ces caractéristiques contribue à l'élaboration d'un système de transport idéal. Créée avec BioRender.com

SPAAC : Strain-promoted azide-alkyne cycloadditions

Dans le prochain chapitre, nous allons nous intéresser aux cellules immunitaires choisies pour le développement de ce biohybride : les lymphocytes $T\gamma\delta$ ($LT\gamma\delta$). En effet, de nombreuses études ont mis en avant les avantages des lymphocytes T (LT) dans le transport de nanoparticules du fait de leur forte capacité de ciblage des sites d'intérêt. Toutefois, aucune étude n'a encore exploré l'utilisation des $LT\gamma\delta$ comme vecteur. Les $LT\gamma\delta$, sous-population minoritaire des LT, possèdent de nombreuses propriétés de ciblage, d'action et de reconnaissance de cellules tumorales ou infectées par divers virus, parasites ou bactéries. Leur utilisation dans ce type de système est donc pertinente, c'est pourquoi notre travail s'est concentré sur ce type cellulaire. Leurs propriétés seront donc développées dans le chapitre suivant.

Chapitre 2 : Les lymphocytes T $\gamma\delta$ humains : de la défense immunitaire à la révolution thérapeutique

Lors du chapitre précédent, nous avons étudié les différentes composantes essentielles au développement d'un système de transport de principes actifs : une nanoparticule de choix déterminée ici comme le polymersome, un transport actif à l'aide de cellules immunitaires et une association de ces deux entités à l'aide de la chimie click. Toutefois, il existe de nombreuses cellules immunitaires pouvant jouer le rôle de transporteur de ces nanoparticules encapsulant le principe actif. Pour notre projet, nous avons décidé de nous intéresser aux lymphocytes T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$). Dans ce chapitre, nous allons donc mettre en avant les différents bénéfices à utiliser ces cellules dans le développement de notre biohybride.

1. Découverte des lymphocytes T $\gamma\delta$

Les LT $\gamma\delta$ représentent 0,5 à 5% des cellules du sang périphérique chez l'Homme et tiennent leur nom des chaînes composant leur récepteur de surface à l'antigène (TCR), une chaîne γ associée à une chaîne δ . Tout comme pour les lymphocytes T alpha beta (LT $\alpha\beta$), les chaînes γ et δ sont composées d'un domaine variable (V) et d'un domaine constant (C) couplé à un domaine transmembranaire, tous deux de type immunoglobuline. Afin de former un TCR complet et fonctionnel, ces chaînes sont associées à des chaînes CD3 membranaires et intracellulaires chargées de transmettre le signal d'activation à la cellule T [108] (**Figure 18A**). L'existence de nouvelles chaînes de type γ a été découverte au niveau génétique de façon inattendue en 1985 tout d'abord chez la souris [109] puis chez l'Homme [110]. Par la suite, leur association avec des chaînes δ a été mise en évidence validant l'existence d'un nouveau type de TCR et, par conséquent, de lymphocytes. La chaîne γ , se rapproche de la chaîne α par la présence de réarrangements de segments codés par des gènes variables (V) et jonctionnels (J) tandis que la chaîne δ est codée par des gènes issus de la recombinaison somatique des segments V, D et J, la rapprochant davantage de la chaîne β (**Figure 18B**). Il existe 4 à 6 segments fonctionnels variables V γ et 8 segments V δ chez l'Homme. Malgré les évolutions, ces quatre familles de gènes semblent avoir été fortement conservées durant les dernières 500 millions d'années d'évolution des vertébrés supérieurs [111].

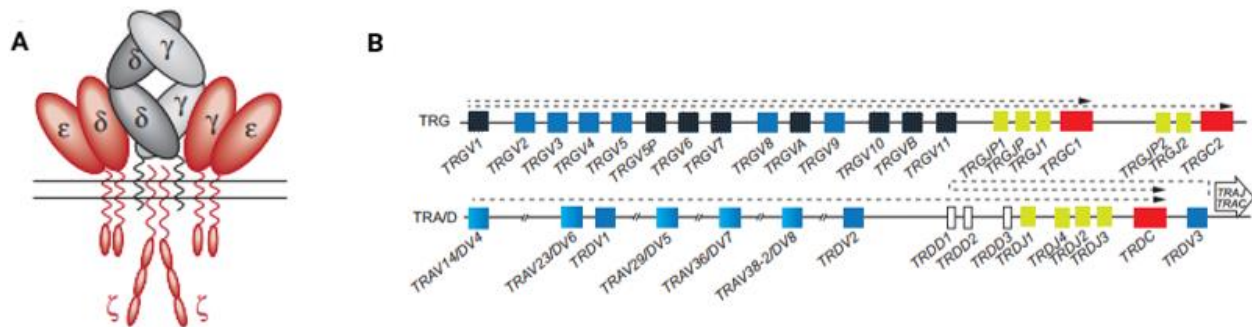


Figure 18 : Le récepteur TCR $\gamma\delta$ humain et son gène codant.

A. Schéma des chaînes du TCR $\gamma\delta$ humain (noir) en complexe avec les chaînes CD3 (rouge). **B.** Familles de segments géniques γ et δ chez l'Homme : nuances de bleu clair et foncé, segments Variables (V) ; blanc, segments D ; jaune, segments J ; rouge, segments C ; Les flèches indiquent la direction de la transcription et l'orientation du réarrangement. Nomenclature des gènes : humain, HGNC basée sur la nomenclature des segments de [112]. Figure modifiée de [108].

2. Développement des lymphocytes T $\gamma\delta$ humains

Le développement des LT $\gamma\delta$ suit un processus très précis caractérisé par des vagues et dépendant de différents critères : la nature des progéniteurs au niveau de thymus foetal, l'environnement thymique et l'intensité du signal du TCR [113]. Chaque vague correspond à une population partageant une chaîne V δ commune, qui colonise des tissus périphériques précis où elle exerce des fonctions spécifiques. Ce mécanisme de développement par vague a été largement discuté et étudié chez la souris, ce qui n'est pas le cas au niveau humain. Dans le cadre de ce travail, axé sur l'utilisation de LT $\gamma\delta$ humains en tant que vecteur de nanoparticules, nous nous concentrerons sur le développement des LT $\gamma\delta$ humains.

2.1. Développement thymique des lymphocytes T $\gamma\delta$

Bien qu'aujourd'hui les LT $\gamma\delta$ soient un type cellulaire fortement étudié pour ses capacités thérapeutiques et fonctionnelles, son développement reste très peu connu. En effet, l'accès au matériel d'étude durant le développement est très restreint, mais le développement des nouvelles technologies telles que le séquençage de cellule unique a permis de révéler certaines caractéristiques clés. Cependant, de nombreuses études ont été mises en place à l'aide de modèles murins pour améliorer cette compréhension mais il existe de grandes différences inter-espèces et les loci TRG et TRD sont très peu conservés ce qui se reflète dans l'apparition de sous-populations différentes de LT $\gamma\delta$ [113].

Les LT se développent à partir des cellules souches hématopoïétiques et de progéniteurs (HSPC) provenant du foie fœtal lors du développement prénatal ou de la moelle osseuse lors du développement postnatal. Les HSPC se différencient ensuite en progéniteurs lymphoïdes capables de migrer dans le thymus afin de former les différents sous-types de LT, en fonction des signaux de différenciation reçus. Les thymocytes immatures obtenus vont alors subir un réarrangement séquentiel de leur TCR *via* les recombinaisons V(D)J des quatre loci du TCR qui sont TRD, TRG, TRB puis TRA codant pour les chaînes δ , γ , β et α respectivement. Au moment où ce réarrangement est effectué deux types de diversité des TCR sont générées :

- la diversité combinatoire : qui consiste en l'association d'un gène J avec l'un des divers gènes D (pour le locus qui en contiennent) et l'un des divers gènes V
- la diversité jonctionnelle : cette dernière consiste en l'ajout aléatoire de nucléotides au niveau de la jonction des différents segments associés, ce qui crée la région CDR3 des chaînes TRG et TRD, correspondant au domaine hypervariable et responsable de la reconnaissance de l'antigène [114].

Ces associations de gènes sont ensuite transcrites et associées à la région C au moment de l'épissage de l'ARNm. La traduction en protéine de l'ARNm épissé aboutit au TCR final exprimé à la surface des LT $\gamma\delta$. Ces cellules sont divisées en sous-populations en fonction du type de région V utilisée dans le TCR $\gamma\delta$ exprimé en surface [113]. En théorie, un répertoire très diversifié composé de 10^{18} combinaisons de TCR $\gamma\delta$ peut être créé au cours de ce processus. Néanmoins, le répertoire est ensuite façonné par de multiples facteurs, ce qui limite sa diversité [115].

Comme énoncé précédemment, les réarrangements des loci TRD et TRG s'opèrent avant ceux des loci TRB et TRA, ce qui explique l'arrivée précoce des LT $\gamma\delta$ comparé au LT $\alpha\beta$. Ils constituent la population lymphoïde la plus abondante dans le thymus jusqu'à la 11^e semaine de gestation [116]. De plus, cette apparition précoce des LT $\gamma\delta$ au cours de l'ontogenèse pourrait être attribuée à leur développement qui, contrairement au LT $\alpha\beta$, ne nécessite pas de mécanismes de sélection positive et négative basés sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou de classe II [113]. L'étude de Montel-Hagen *et al.* a confirmé, sur la base de systèmes de culture *in vitro* « semblables à des thymus », la capacité plus précoce des LT $\gamma\delta$ à se développer comparés aux LT $\alpha\beta$ [117].

2.2. Evolution vers deux populations distinctes majoritaires : lymphocytes TV δ 1 et V δ 2

À la suite de ce processus, on peut donc distinguer deux populations principales de LT $\gamma\delta$ humains : les LT V γ 9V δ 2 et les LT non-V γ 9V δ 2, ces derniers étant principalement composés de cellules exprimant les chaînes V δ 1 et V δ 3 qui peuvent s'associer à n'importe quelle chaîne V γ . Dans la mesure où la biologie de l'ensemble des sous-populations de LT non-V γ 9V δ 2 est très similaire, nous nous focaliserons dans ce travail sur la population largement majoritaire qui sont les LT V δ 1.

Comme mentionné précédemment, les sous-populations de LT $\gamma\delta$ humains apparaissent en plusieurs vagues développementales distinctes (**Figure 19**). Il a été montré que l'arrivée des LT V γ 9V δ 2 correspond à la première vague préthymique dès 5-6 semaines de développement fœtal et qu'ils dominent au cours du deuxième trimestre, tandis que les LT V δ 1 sont présents en très faible quantité [118]. Ces LT V γ 9V δ 2 sont également les premières à quitter le thymus pour rejoindre le sang périphérique [119] où ils présentent des caractéristiques dites innées. En effet, ils possèdent un répertoire restreint et public, ce qui signifie que cette population est constituée de cellules ayant une faible diversité clonale avec un TCR semi-invariant, partagé entre individus. Il a été démontré que ces LT V γ 9V δ 2 étaient progressivement remplacés par des LT V δ 1, qui augmentent en nombre jusqu'à devenir le sous-ensemble dominant dans le sang du cordon ombilical lors de l'accouchement, où ils constituent un répertoire hautement polyclonal et privé [115], [118].

Après la naissance, une seconde vague de LT V γ 9V δ 2 est générée à partir des thymocytes postnataux avec des caractéristiques différentes de la première. En effet, Tieppo *et al.* ont montré, à l'aide de séquençage du TCR, que ces cellules possédaient une séquence CDR3 significativement différente avec un grand nombre d'ajout de nucléotides ainsi qu'une utilisation distincte de segments TRDJ [115]. Cependant, ces cellules conservent leurs caractéristiques innées et migrent vers le sang périphérique où elles deviennent, chez la majorité d'adultes, la principale population de LT $\gamma\delta$ [118]. Concernant les LT V δ 1, ils vont coloniser les tissus ainsi que les muqueuses pour y devenir le sous-type LT $\gamma\delta$ majoritaire. Ils possèdent alors un répertoire ciblé, avec seulement quelques clones dominants, et privés, ce qui suggère une expansion de clones spécifiques lors de la rencontre avec l'antigène.

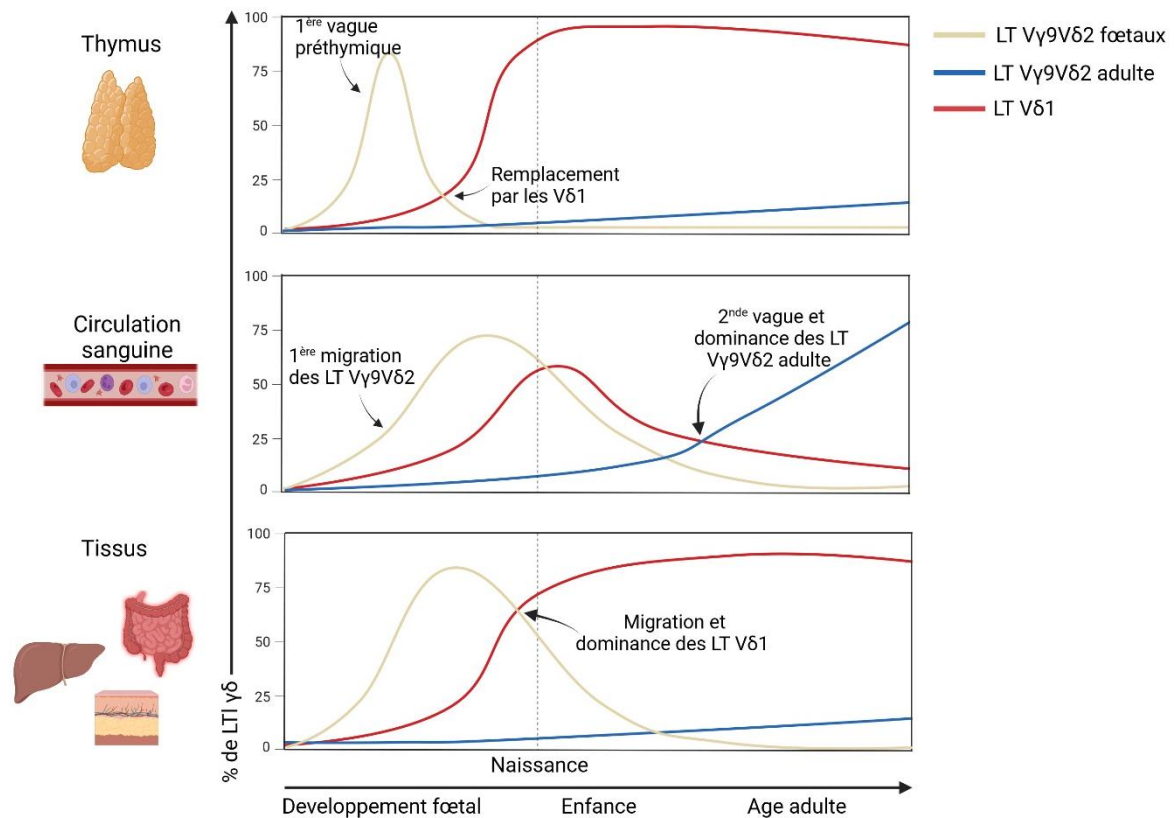


Figure 19 : Évolution des populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ humains dans le thymus, le sang périphérique et les tissus tout au long de la vie.

Trois populations sont distinguées : les LT V γ 9V δ 2 foetaux, les LT V γ 9V δ 2 adultes et les LT non-V γ 9V δ 2 décrites ici comme les LT V δ 1. Dans le thymus, première vague de LT V γ 9V δ 2 foetaux apparaît et cette population devient la première à migrer dans le sang périphérique. Après les premières années de vie, cette population diminue au profit des LT V γ 9V δ 2 adultes. Ce phénomène correspond à une seconde vague de production de LT V γ 9V δ 2 provenant de thymocytes postnataux migrant préférentiellement vers le sang périphérique, où ils deviennent la population la plus abondante chez la majorité des adultes. Enfin, les LT V δ 1 constituent la principale population de LT $\gamma\delta$ provenant du thymus en fin de grossesse et deviennent prédominants dans les tissus dès la naissance. Modifiée d'après [113], [120], [121]. Créée avec BioRender.com

LT : Lymphocytes T

2.3. Localisation en fonction du TCR exprimé

Comme mentionné précédemment, les LT $\gamma\delta$ vont migrer au niveau du sang périphérique ou dans les tissus une fois leur développement terminé. Chez l'Homme, la localisation des LT $\gamma\delta$ diffère en fonction de la chaîne δ exprimée. Les LT V γ 9V δ 2 vont être majoritairement retrouvés dans le sang périphérique ainsi que dans les ganglions lymphatiques tandis que les LT V δ 1 seront plus tissulaires. En effet, les LT V δ 1 représentent la principale population retrouvée dans le derme [122], la rate [123], le foie [124], [125], le poumon [126], mais également au niveau des parois intestinales [127], [128]. Cette migration et persistance des LT V δ 1 au niveau tissulaire constituent un avantage certain au regard de notre projet. En effet,

ces cellules représentent un parfait outil de ciblage des tissus infectés ou des tumeurs solides en permettant le transport des polymersomes et le relargage des principes actifs encapsulés. Une fois arrivés sur leurs sites de prédilection, les LT $\gamma\delta$ vont acquérir diverses fonctions à l'aide des multiples récepteurs présents à leur surface.

3. Une multitude de récepteurs exprimés à la surface des lymphocytes T $\gamma\delta$

Les LT $\gamma\delta$ possèdent à leur surface une combinaison de nombreux récepteurs caractéristiques des cellules innées ou adaptatives. C'est pourquoi les LT $\gamma\delta$ sont placés à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. En fonction de leur niveau d'activation, ils expriment une multitude de récepteurs pouvant être catégorisés en 5 groupes : (i) le TCR $\gamma\delta$, (ii) les récepteurs de costimulation, (iii) les récepteurs de cytokines, (iv) les récepteurs de type « Natural Killer » (NK) et (v) les récepteurs inhibiteurs [129] (**Figure 20**).

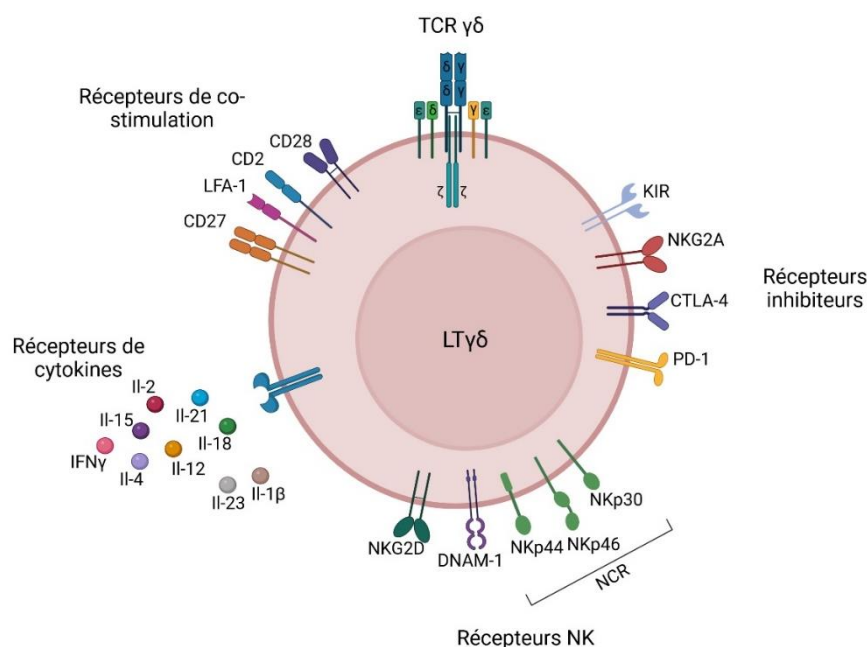


Figure 20 : Récepteurs exprimés sur les lymphocytes T $\gamma\delta$ humains au repos ou activés.

Les LT $\gamma\delta$ expriment une multitude de récepteurs capables de moduler leurs fonctions effectrices. Ces récepteurs peuvent être présents sur les cellules au repos ou en état d'activation et de différenciation. Ils sont divisés en cinq principaux groupes fonctionnels : le TCR $\gamma\delta$, les récepteurs de costimulation, les récepteurs activateurs des cellules NK, les récepteurs inhibiteurs et les récepteurs de cytokines. Créée avec BioRender.com

CD : cluster of differentiation, CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4, DNAM-1 : DNAX accessory molecule-1, IFN γ : Interféron γ , IL : Interleukine, KIR : Killer-cell immunoglobulin-like receptors, LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1, NCR : Natural Cytotoxicity Receptors, NK : Natural Killer, NKG2A : Natural-Killer Group 2 Member A, NKG2D : Natural-Killer Group 2 Member D, PD-1 : Programmed cell death protein 1, TCR : T cell receptor.

3.1. Le TCR $\gamma\delta$

Les LT $\gamma\delta$ possèdent un TCR à leur surface, leur conférant donc une place dans l'immunité adaptative. Toutefois, l'implication de leur TCR est bien différente de celle des LT $\alpha\beta$. La très grande majorité des LT $\alpha\beta$ reconnaissent des antigènes sous forme de peptides, qu'ils soient du soi ou du non-soi *via* une présentation par les molécules du CMH (HLA-I ou HLA-II). Les LT $\gamma\delta$, quant à eux, interagissent avec des molécules induites ou modifiées par le stress de façon majoritairement indépendante du CMH.

Les LT V γ 9V δ 2 sont activés par le biais des phosphoantigènes (PAGs), intermédiaires métaboliques de la voie non-mévalonate ou de la voie mévalonate, de manière dépendante du TCR [130]. Ces PAGs peuvent provenir de deux sources distinctes : (i) d'une sécrétion par des mycobactéries ou des parasites [131] ou (ii) d'une accumulation dans des cellules transformées, cancéreuses ou infectées, reflétant une altération de leur métabolisme [132]. Il existe deux PAGs largement connus et étudiés qui sont l'hydroxyméthyl-but-2-enyl pyrophosphate (HMBPP), un intermédiaire de la voie non-mévalonate (DOXP) générant des dérivés de cholestérol et des stérols, et l'isopentenyl pyrophosphate (IPP), un intermédiaire de la voie mévalonate [133]. Cette reconnaissance de la présence de PAGs par le TCR V γ 9V δ 2 s'effectue à l'aide de molécules appelées butyrophilines (BTN) et notamment de la BTN3A1 et BTN3A2 présentes à la surface de nombreuses cellules. Lors de l'accumulation intracellulaire de PAGs, ces molécules se lient au domaine intracellulaire B30.2 de la BTN3A1. Cette interaction induit une signalisation inside-out ainsi qu'un changement de conformation du domaine extracellulaire de la BTN3A1 [134] favorisant son interaction avec la BTN2A1 et donc la formation d'un hétérodimère comprenant ces deux molécules. La formation de cette hétérodimère va alors induire l'interaction entre la BTN2A1 et la chaîne γ 9 du TCR menant à l'activation des LT $\gamma\delta$ [135], [136].

Les LT V δ 1, quant à eux, ont la capacité d'interagir avec de nombreuses molécules induites par le stress cellulaire possédant des structures très diverses telles que les récepteurs de la famille des glycoprotéines CD1 (CD1c, CD1d, CD1a, CD1b [137], [138], [139], [140]), des récepteurs de type CMH ou apparentés (EPCR [141], MR1 [142], [143], HLA-A [144] et HLA-DR [145]), des protéines de type BTN [146] et des protéines membranaires (EphA2 [147]) ou qui se délocalisent à la surface cellulaire à l'occasion de stress (annexine A2 [148]). Bien que la reconnaissance d'un antigène par les LT $\gamma\delta$ ne soit pas restreinte aux molécules du CMH, des

études ont révélé que cette reconnaissance pouvait se faire *via* une présentation impliquant d'autres molécules, leur conférant leurs caractéristiques de cellules immunitaires adaptatives. Par exemple, les $LT\gamma\delta$ peuvent reconnaître des molécules apparentées aux molécules du CMH-I telles que MR1 et CD1 [149] qui sont aussi des molécules présentatrices pour des populations de $LT\alpha\beta$ innés (lymphocytes NKT et *mucosa-associated invariant T cells* (MAIT)). Les protéines CD1, et plus particulièrement CD1d, permettent la présentation au TCR de molécules lipidiques du soi ou du non-soi [149]. Cette protéine est exprimée de manière constitutive sur les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques et est retrouvée comme étant sur-exprimée lors d'hémopathies malignes [150]. La protéine MR1, quant à elle, permet la présentation de métabolites non peptidiques dérivés de la vitamine B provenant principalement de certaines bactéries et champignons. Un lien entre $LT\gamma\delta$ et MR1 a également été fait lors du développement du psoriasis [151].

Nous avons donc vu ici que les principaux signaux reconnus par le $TCR\gamma\delta$ sont des signaux de stress cellulaire. Cette reconnaissance semble impliquer différentes interactions et ce, de façon indépendante des molécules du CMH classique. Une différence de mécanisme peut être observée entre les $LT V\gamma 9V\delta 2$ et les $LT V\delta 1$. Les $LT V\gamma 9V\delta 2$ agissent comme des cellules « innate-like » du fait de la reconnaissance directe de PAg sécrétés par les cellules transformées tandis que les $LT V\delta 1$ ont des mécanismes dits « adaptive-like ». En effet, ils vont interagir avec des récepteurs induits par le stress ou nécessitent la présentation de l'antigène par des molécules apparentées aux molécules du CMH-I.

3.2. Les récepteurs de costimulation

Une seconde famille de récepteurs confirmant la place des $LT\gamma\delta$ dans l'immunité adaptative est la famille des récepteurs de costimulation. Selon leur état de différenciation et d'activation, les $LT\gamma\delta$ expriment une multitude de ces récepteurs, notamment le CD28, les membres de la superfamille TNF (CD27, CD30 et 4-1BB), CD8aa et des intégrines incluant LFA-1. Les $LT\gamma\delta$ peuvent utiliser ces récepteurs de costimulation pour diverses fonctions. Le CD28, molécule exprimée sur 40 à 60% des $LT\gamma\delta$, améliore leur prolifération lorsqu'ils sont activés en synergie avec le TCR [152]. Les molécules d'adhésion LFA-1 et CD2, elles, sont cruciales pour la cytotoxicité des cellules, leur sécrétion de cytokines, leur prolifération ainsi que leur migration vers les cellules cibles et leur adhésion [153]. Ainsi, il a été démontré que la

costimulation de LFA-1 avec le TCR déclenche la destruction de lignées de cellules cancéreuses par les LT V γ 9V δ 2 [153], [154] ou infectées par le CMV par des LT V δ 1 [141].

Le CD27 est une des molécules de costimulation clés dans le développement et l'activation des LT γ δ chez la souris mais son implication chez l'Homme n'a été étudiée que pour les LT V γ 9V δ 2. Son expression améliore la capacité de prolifération des LT V γ 9V δ 2, leurs sécrétions cytokiniques lorsque CD27 interagit avec le CD70 mais également l'expansion de cellules de type Th1 lors de leur réponse contre des PAg *in vitro* [155]. Il est également important de noter que, chez la souris, son expression est établie au cours du développement thymique et détermine l'équilibre entre les sous-ensembles de LT γ δ produisant de l'IFN γ (CD27+) et produisant de l'IL-17 (CD27-). De plus, ces profils cytokiniques restent stables même en cas d'infection [156]. Cette dichotomie n'a cependant pas été retrouvée chez l'Homme.

Les signaux de costimulation représentent donc un allié du TCR lors de l'activation des LT γ δ leur permettant d'améliorer leur réponse spécifique au pathogène rencontré.

3.3. Les récepteurs de cytokines

Les cytokines telles que l'IL-2, l'IL-15, l'IL-18, l'IL-12 et l'IL-21 sont des actrices clés de la survie, de la prolifération, de la différenciation et de la régulation des fonctions des LT γ δ . Diverses études ont montré l'importance de l'IL-2 et de l'IL-15. Ces cytokines permettent la différenciation des thymocytes γ δ humains en cellules effectrices exprimant une signature cytotoxique de type 1 [157]. De plus, elles favorisent l'expansion des LT V γ 9V δ 2 en réponse à des PAg [158] mais aussi des LT V δ 1 [159]. Des études ont montré l'implication de l'IL-12, l'IL-18 et l'IL-21 dans la différenciation des LT γ δ en effecteurs Th1, potentialisant leurs fonctions d'effecteurs, que ce soit envers des cellules infectées par le CMV, des cellules cancéreuses ou encore l'accumulation de PAg [160], [161], [162].

En résumé, les combinaisons de signaux cytokiniques captés par les LT γ δ sont cruciaux pour déterminer leur polarisation, leur niveau d'activation ou d'inhibition mais également pour obtenir une amplification suffisante de cellules effectrices.

3.4. Les récepteurs NK

Une preuve que les LT $\gamma\delta$ se situent à la jonction entre l'immunité innée et adaptative réside dans la présence de récepteurs NK à leur surface. Qu'ils soient au repos ou en état d'activation, les LT $\gamma\delta$ expriment ces récepteurs initialement décrits sur les cellules NK. Les cellules NK sont des cellules cytotoxiques faisant partie de la famille des cellules lymphoïdes innées. Ce sont des cellules circulantes pouvant détecter et réagir immédiatement aux premiers signes de transformation tumorale ou d'infection, les plaçant en première ligne de défense contre les virus et le cancer [163].

Les deux récepteurs NK les plus étudiés sont NKG2D (natural-killer group 2 member D) et DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1). NKG2D est un récepteur transmembranaire de type lectine C qui reconnaît une série de molécules apparentées au CMH-I induites lors de stress cellulaire comme MICA, MICB et les membres de la famille des UL16-binding protein (ULBP) (ULBP1-6) [164]. L'importance de l'expression de NKG2D dans l'interaction entre les LT $\gamma\delta$ et les cellules tumorales a notamment été mise en évidence lors de leucémies [165], de cancer du côlon, de la prostate ou de poumon par exemple [166], [167]. Son engagement, qu'il soit dépendant ou indépendant du TCR [168], déclenche des réponses effectrices, notamment la cytotoxicité et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, par les LT $\gamma\delta$ [169].

DNAM-1 est un récepteur constitutivement exprimé à la surface des LT $\gamma\delta$ capable de reconnaître la Nectine-2 (CD112) et le PVR (CD155), molécules surexprimées à la surface des cellules cancéreuses comme dans le cas de leucémie myéloïde aiguë (LMA). La liaison des ligands sur ce récepteur provoque une cytotoxicité conférant alors aux LT $\gamma\delta$ la capacité de lutter contre le développement tumoral notamment lors de mélanome [170].

Une seconde famille de récepteurs NK pouvant être exprimée à la surface des LT $\gamma\delta$ est, les NCR (natural cytotoxicity receptors). Cette famille regroupe NKp30, NKp44 et NKp46. Toutefois, ces récepteurs ne sont pas exprimés à l'état basal dans les populations circulantes ce qui rend l'étude de leur implication plus difficile. Les études de l'équipe de Silva-Santos ont montré que l'expression de NKp30 et NKp44 peut être induite par un protocole spécifique d'amplification des LT V δ 1, appelés dans ce contexte DOT pour « Delta One T cell » [159], [171]. Ces cellules obtiennent alors la capacité de cibler et de tuer les cellules de LMA [172]. Ils ont récemment montré que cette reconnaissance des DOT envers les cellules leucémiques passait par les interactions NKp30/B7-H6 et DNAM-1/PVR [173].

Dans l'ensemble, ces récepteurs NK sont des régulateurs clés des réponses des $LT\gamma\delta$. Ils permettent une activation rapide en réponse à un stress cellulaire indépendamment ou en synergie avec l'engagement du TCR. Ces récepteurs placent alors ces cellules comme des acteurs centraux dans la lutte et le contrôle du développement tumoral.

3.5. Les récepteurs inhibiteurs

Une autre famille de récepteurs essentielle au bon fonctionnement des $LT\gamma\delta$ est celle des récepteurs inhibiteurs. Après une forte activation des LT, il est nécessaire pour une bonne homéostasie que ces cellules reviennent à leur état de repos. C'est le rôle des récepteurs inhibiteurs tels que PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 et TIGIT. PD-1 et CTLA-4 sont deux récepteurs cruciaux dans l'inhibition des $LT\gamma\delta$ humains. Bien que ces cellules les expriment très peu de manière constitutive, elles peuvent les surexprimer après une phase d'activation afin de contrôler leur réponse [174], [175]. L'étude de Davies *et al.* a montré que, chez les patients atteints de mélanome, la présence intra-tumorale de $LT V\delta 1$ prédit une réponse efficace à la thérapie anti-PD-1, en particulier dans les contextes à faible néo-antigène. Ils suggèrent que ces cellules pourraient être exploitées pour améliorer les réponses immunitaires contre les tumeurs et que la modulation de PD-1 par des ligands tels que PD-L1 pourrait influencer la survie et la fonction des $LT V\delta 1$. Cela offrirait ainsi des perspectives pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques [176]. De façon intéressante, cette étude démontre également que, contrairement aux $LT\alpha\beta$, les $LT\gamma\delta$ exprimant le PD-1 ne semblent pas épuisés et répondent très bien au signal TCR.

Comme mentionné précédemment, les $LT\gamma\delta$ expriment à leur surface des récepteurs NK. Ils peuvent donc exprimer des récepteurs inhibiteurs de cette famille comme CD85j [177], NKG2A [178] ou encore des inhibiteurs KIR (« Killer-cell immunoglobulin-like receptor ») [179]. Il a été montré que l'expression de KIR à la surface des $LT\gamma\delta$, et plus particulièrement de l'hétérodimère CD94/NKG2A, est associée à une forte activité cytolytique des lymphocytes contre les cellules cibles déficientes en CMH I tout en inhibant la lyse des cellules exprimant ce CMH I. Ce mécanisme de régulation permet aux $LT\gamma\delta$ de participer aux réponses immunitaires contre les pathogènes et les tumeurs tout en empêchant une autoréactivité des $LT\gamma\delta$ [180].

Ces paragraphes offrent un aperçu non exhaustif de la multitude de récepteurs présents à la surface des $LT\gamma\delta$. Ces récepteurs permettent aux cellules de détecter des signaux de stress cellulaire, de contrôler le niveau d'activation ainsi que d'exercer leurs diverses fonctions qui seront développées dans la partie suivante. Cela met donc en évidence le potentiel de ces cellules et les avantages qu'elles offrent dans des stratégies thérapeutiques et plus particulièrement dans notre projet. Pour rappel, le but de notre travail est de construire un biohybride composé de polymersomes, encapsulant un principe actif, couplé à une cellule immunitaire permettant le ciblage actif des cellules et sites d'intérêt. La multitude de récepteurs innés et adaptatifs présents sur les $LT\gamma\delta$ leur permet donc de cibler de nombreuses cellules transformées mais également d'outrepasser certains mécanismes d'échappement du fait de leur indépendance aux molécules du CMH.

L'atout principal de notre projet serait d'obtenir un effet synergique entre le ciblage des sites actifs et une potentielle action cytotoxique des $LT\gamma\delta$. Ici, nous allons discuter des différentes fonctions des $LT\gamma\delta$, et plus spécifiquement des $LT V\delta 1$ que ce soit au niveau de l'homéostasie, des interactions cellulaires ainsi que de leurs actions directes sur les cellules transformées.

4. Les fonctions effectrices multiples des lymphocytes $T\gamma\delta$

D'après les données précédemment évoquées concernant les nombreux récepteurs présents sur les $LT\gamma\delta$, il est aisé de concevoir que ces cellules peuvent exercer de nombreuses fonctions effectrices en réponse à plusieurs altérations, qu'elles soient induites par des pathogènes ou par la transformation des cellules. La présence de ces nombreux récepteurs suggère également que ces cellules pourraient avoir une forte implication au niveau de l'homéostasie et du contrôle cellulaire.

4.1. Rôle dans l'homéostasie

Les $LT\gamma\delta$ jouent un rôle primordial dans l'homéostasie de l'organisme. Ce processus, permettant le maintien d'un équilibre entre l'état d'activation et d'inhibition cellulaire, est essentiel pour un fonctionnement optimal de l'organisme et est finement régulé par de nombreux mécanismes cellulaires. Les $LT\gamma\delta$ peuvent avoir différents rôles dans cette homéostasie en fonction de leur localisation et du contexte étudié.

4.1.1. Implication dans la maturation et l'activation de divers types cellulaires

Les $LT\gamma\delta$ peuvent favoriser les réponses immunitaires en agissant sur les effecteurs innés et adaptatifs, par le biais d'interactions directes ou de la sécrétion de facteurs solubles (**Figure 21**). Des études ont montré que les $LT\gamma\delta$, et notamment les $LT V\delta 1$, pouvaient potentialiser l'activation des neutrophiles *via* les sécrétions d'IL-17 lors d'infection systémique par *Candida albicans* [181] ou par la production de $TNF-\alpha$ et de CXCL2 lors d'infection pulmonaire par *Streptococcus pneumoniae* [182]. En revanche, l'étude de Sabbione *et al.* a révélé une interaction bidirectionnelle entre les $LT\gamma\delta$ et les neutrophiles : les $LT\gamma\delta$ favorisent le recrutement et l'activation des neutrophiles pour combattre les agents pathogènes, tandis que ces mêmes neutrophiles suppriment l'activation des $LT\gamma\delta$ pour contribuer à la résolution de l'inflammation [183].

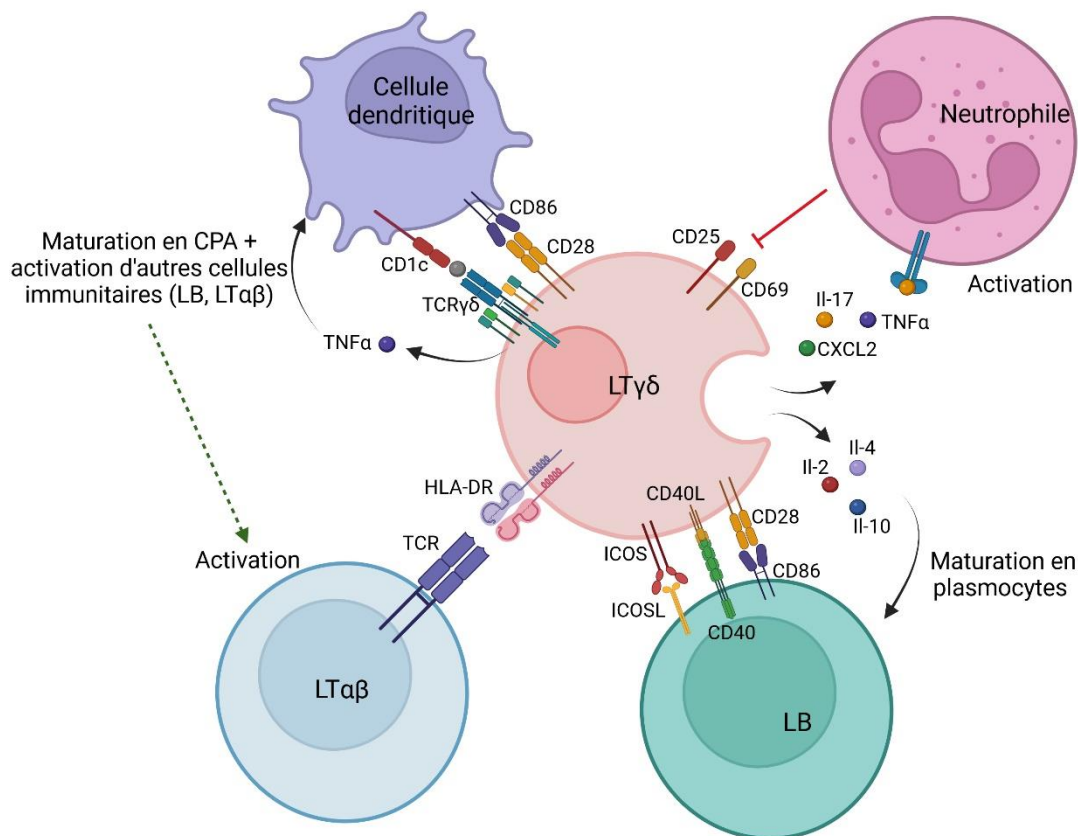


Figure 21 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la maturation et l'activation de divers types cellulaires.

Les $LT\gamma\delta$ jouent un rôle primordial dans l'homéostasie de l'organisme. Ce processus permet le maintien d'un équilibre entre l'état d'activation et d'inhibition des cellules. Cette capacité des cellules immunitaires peut également être utile lors d'une réponse immunitaire afin que cette dernière soit rapide et efficace. Créée avec BioRender.com

CD : cluster de différenciation, CPA : Cellule présentatrice d'antigène, HLA-DR : Human leucocyte antigen DR, ICOS : Inducible T-cell COStimulator, ICOSL : Inducible T-cell COStimulator Ligand, IL : Interleukine, LB : Lymphocyte B, $LT\alpha\beta$: Lymphocyte $T\alpha\beta$, $LT\gamma\delta$: Lymphocyte $T\gamma\delta$, TCR : T cell receptor, $TNF\alpha$: Tumor necrosis factor α .

D'autre part, il a été montré que les LT $\gamma\delta$ pouvaient également influencer sur l'activation et la maturation des cellules dendritiques. Par exemple, Leslie et ses collègues ont montré que des LT V δ 1 étaient capables d'interagir avec des cellules dendritiques immatures par le biais du récepteur CD1c, provoquant la sécrétion de TNF α nécessaire à la maturation des cellules dendritiques dérivées de monocytes [184]. Une autre étude a également fait le lien entre LT $\gamma\delta$, cellules dendritiques et LT $\alpha\beta$. En effet, comme mentionné dans le chapitre précédent, les LT $\gamma\delta$ expriment divers récepteurs tels que HLA-DR et le CD86. Ces derniers, en plus de la sécrétion TNF α et IFN γ , permettent la maturation des cellules dendritiques et favoriseraient leur rôle de cellules présentatrices d'antigène envers les LT $\alpha\beta$ permettant alors une amélioration de la réponse immunitaire [185]. Les LT $\gamma\delta$, et plus spécifiquement les LT V γ 9V δ 2, peuvent également avoir un effet direct sur l'activation des LT $\alpha\beta$ en agissant comme une cellule présentatrice d'antigène *via* leur HLA-DR lors d'infections microbiennes ou de développement tumoral [186], [187].

Pour finir, l'importance des LT $\gamma\delta$ dans la maturation des lymphocytes B (LB), et de donc l'immunité humorale, a été démontrée par différents moyens. Par exemple, les LT $\gamma\delta$, mais surtout les LT V γ 9V δ 2, ont la capacité de sécréter des cytokines telles que de l'IL-10, de l'IL-4 et de l'IL-2 pour favoriser la maturation des LB en plasmocytes. Ils peuvent également réaliser une interaction directe *via* les couples ICOS/ICOSL, CD40/CD40L et CD28/CD86 [188], [189], [190]. De plus, les LT V γ 9V δ 2 produisent la chimiokine CXCL13, primordiale pour la migration des LB dans les follicules de la rate [191]. Enfin, il a aussi été démontré l'existence d'une activation réciproque entre les LT V δ 3 et les cellules B. Leur interaction induisait l'expression de CD40L et du HLA-DR sur les LT $\gamma\delta$ ainsi que l'expression du CD86 sur les LB avec une sécrétion d'IgM [192].

Ces interactions entre les LT $\gamma\delta$ et les autres cellules immunitaires ont donc une place importante dans l'homéostasie en permettant une régulation fine des réponses immunitaires (**Figure 21**).

4.1.2. Fonctions régulatrices

En condition basale les LT $\gamma\delta$ ne présentent aucune propriété immunosuppressive. Toutefois, leur activation par l'engagement du TCR et différentes cytokines spécifiques, comme l'IL-2,

l'IL-15, le TGF β ou l'IL-7 peut induire un phénotype régulateur notamment lors de développement tumoral. Cette immunosuppression peut alors se mettre en place par différents mécanismes [175], [193]. Tout d'abord, les LT $\gamma\delta$ peuvent sécréter du TGF β ou de l'IL-10 provoquant une suppression des LT $\alpha\beta$ [194]. Ils peuvent également favoriser le recrutement d'autres cellules immunosuppressives comme les MDSC (« Myeloïde Derived Suppressor Cells ») [195]. Les LT $\gamma\delta$ sont également capables de sécréter de l'IL-17, connu pour avoir un effet pro-tumoral en induisant la production de facteurs angiogéniques par les cellules cancéreuses [196]. L'infiltration des LT $\gamma\delta$ immunosuppresseurs est généralement associée à un mauvais pronostic dans le cas de cancer du côlon, du pancréas ou de la vésicule biliaire [195], [196], [197], [198]. Toutefois, ces particularités immunosuppressives n'interviennent pas dans la totalité des cas et de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont démontré le rôle ambivalent des LT $\gamma\delta$ lors de ces processus tumoraux. Ces rôles seront développés dans le paragraphe 4.2.1.

4.1.3. Homéostasie tissulaire

Le rôle des LT $\gamma\delta$ dans l'homéostasie tissulaire a été largement étudié chez la souris avec plusieurs revues résumant leur diverses actions [199], [200]. En revanche, leur rôle n'a pas été aussi bien caractérisé chez l'Homme avec encore très peu d'études consacrées à ce sujet. Les LT $\gamma\delta$ globaux mais surtout les LT V δ 1 sont abondamment présents dans les sites épithéliaux représentant environ 70% des LT dermiques et 40% des lymphocytes intraépithéliaux intestinaux [201], [202], ce qui souligne leur rôle potentiel dans l'homéostasie tissulaire. Plusieurs études ont suggéré leur implication dans la réparation des tissus de la peau et de l'intestin [200].

4.2. Ciblage direct des cellules infectées ou transformées

Les LT $\gamma\delta$ n'ont pas seulement la capacité de détecter les cellules transformées ou altérées et de favoriser le recrutement de diverses cellules immunitaires, ils peuvent également cibler et tuer directement ces cellules par le biais de plusieurs mécanismes : (i) l'exocytose de granules cytotoxiques contenant des granzymes, de la perforine ou de la granulysine, (ii) l'expression des ligands induisant l'apoptose tels que FasL et TRAIL, ces derniers pouvant être liés à la

membrane ou solubles [203], [204], [205] et (iii) la sécrétion de différentes cytokines comme IFN γ , TNF α , MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4) and RANTES (CCL5) [180], [205], [206]. Leurs rôles et actions dans le cas de cancer, d'infections bactériennes, virales et parasitaires sont développés ci-après.

4.2.1. Lymphocytes T $\gamma\delta$ et cancer

Le rôle des LT $\gamma\delta$ dans l'immunité des cancers a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années, ce qui a mis en lumière les fonctions contrastées de ces cellules [203], [207], [208], [209]. Toutefois, ces lymphocytes possèdent de nombreuses caractéristiques leur conférant un rôle intéressant en oncologie.

4.2.1.1. Rôle anti-tumoral

Bien que les LT $\gamma\delta$ ne constituent qu'une petite fraction des différents sous-types de cellules présentes dans les sites cancéreux, les études récentes montrent qu'ils pourraient y jouer un rôle favorable dans le contrôle du développement tumoral. *In vitro*, de nombreuses études ont démontré la capacité des LT $\gamma\delta$ à reconnaître spécifiquement des cellules tumorales et à les tuer en produisant des cytokines aux fonctions anti-tumorales comme l'IFN γ ou le TNF α [210], [211]. Comme évoqué dans le chapitre 3.1, les LT $\gamma\delta$ humains agissent principalement en s'affranchissant des molécules du CMH I, par opposition aux LT $\alpha\beta$ conventionnels qui ont été les plus étudiés dans l'immunité anti-tumorale jusqu'à présent. Ce processus les rend ainsi parfaitement adaptés dans le contexte de tumeurs déficientes en CMH I, mécanisme d'évasion immunitaire. Cette caractéristique a été démontrée dans l'étude de Vries *et al.* qui s'intéresse à l'implication des LT $\gamma\delta$, et plus particulièrement des LT V δ 1 et V δ 3, dans le contrôle du cancer du côlon déficient en molécules HLA de classe I [212]. Dans cette étude, des analyses transcriptomiques de cohortes de patients ont mis en évidence une augmentation de l'expression des gènes *TRDV1* et *TRDV3* pouvant être corrélée avec une infiltration tumorale accrue des LT V δ 1 et V δ 3 qui n'est pas observable pour les LT CD8 $^{+}$ cytotoxiques. Ces premières données confirment une implication directe des LT V δ 1 et V δ 3 dans la réponse immunitaire. Des modèles de xénogreffes tumorales ont ensuite permis de démontrer la capacité de ces cellules à inhiber la croissance tumorale, confirmant leur rôle dans le contrôle

de cancers échappant à la surveillance immunitaire classique. De plus, des expériences *in vitro* de co-cultures utilisant des lignées cellulaires déficientes en HLA I ont démontré que l'activité cytotoxique observée était restreinte aux cellules PD-1+ et que cette dernière pouvait donc être amplifiée à l'aide d'inhibiteurs tels que des anticorps anti-PD-1 ou anti-PD-L1. Tous ces résultats mettent donc en évidence l'intérêt des LT $\gamma\delta$ dans le contrôle de tumeurs déficientes en CMH I. De plus, ces cellules ont une activité anti-tumorale indépendante de la charge mutationnelle des tumeurs, ce qui, contrairement aux LT $\alpha\beta$, les rend réactives à de nombreux cancers présentant relativement peu de mutations somatiques, qu'ils soient solides ou hématologiques [207].

En outre, ces cellules possèdent une amplitude d'action bien supérieure aux autres LT. Comme souligné plus tôt, les LT $\gamma\delta$ sont capables de combiner des mécanismes d'activation adaptatifs, avec une signalisation *via* le TCR et des signaux de costimulation, avec des mécanismes plus innés à l'aide de leurs récepteurs NKG2D, DNAM-1, NKp46, NKp44, et NKp30 (**Figure 22**). Il a été montré que l'association de ces différents signaux contrôlait l'activation et la prolifération des LT $\gamma\delta$ ainsi que leur activité cytotoxique (sécrétion d'IFN γ et de TNF α) et cytolytique (production de granzymes, perforines et TRAIL). Cette dynamique a été vérifiée *in vitro* contre des cellules tumorales de carcinome rénal [213], épidermoïde [214], de cancer colorectal [215] ou pulmonaire [216]. En outre, comme évoqué dans le chapitre 4.1.1, les LT $\gamma\delta$ peuvent sécréter diverses cytokines et exprimer plusieurs récepteurs afin de recruter d'autres cellules immunitaires et donc générer un environnement anti-tumoral [185], [187], [217].

De façon intéressante, de nombreuses études ont mis en avant la capacité des LT V δ 1 à infiltrer et à résider dans les tissus épithéliaux, ce qui les place en première ligne de défense lors de nombreux cancers solides comme le mélanome [218], le cancer du sein [219] ou du poumon [220].

4.2.1.1. Rôle pro-tumoral

Cependant, comme pour les LT $\alpha\beta$ conventionnels, les processus d'évasion tumorale peuvent induire un microenvironnement immunosuppresseur orientant les LT $\gamma\delta$ vers un phénotype favorisant le développement tumoral. Chez la souris, ce phénotype pro-tumoral est fortement lié à leur capacité à produire de l'IL-17. Certaines études, plus rares chez l'Homme, ont montré

que cette sécrétion peut agir directement sur les cellules cancéreuses en stimulant leur prolifération et migration [221], ou indirectement en influant sur l'environnement tumoral, en favorisant l'angiogenèse dépendante du VEGF et de la perméabilité endothéliale par exemple [196], [222].

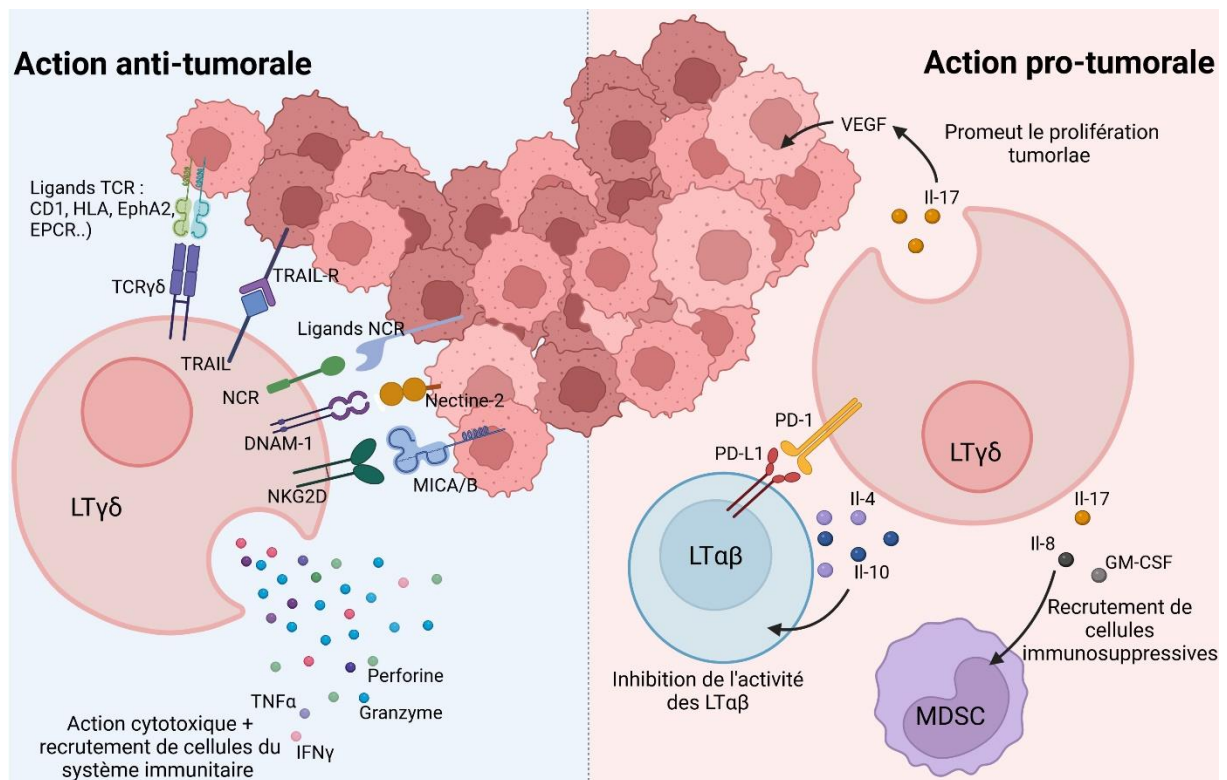


Figure 22 : Mécanismes ambivalets des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans le développement tumoral.

Les LT $\gamma\delta$ jouent un rôle crucial dans le développement tumoral, que ce soit pour le contrôler ou le favoriser, en agissant directement sur les cellules tumorales ou indirectement en influençant sur le microenvironnement et les cellules adjacentes. Pour inhiber la prolifération tumorale, ces cellules sont capables de combiner des mécanismes d'activation adaptatifs, avec une signalisation via le TCR et des signaux de costimulation, avec des mécanismes plus innés à l'aide de leurs récepteurs NKG2D, DNAM-1, NKp46, NKp44, et NKp30. Elles exercent également une action cytotoxique et cytolytique directe en sécrétant de l'IFN γ et du TNF α mais aussi en produisant des granzymes, des perforines et du TRAIL. Cependant, certains LT $\gamma\delta$ peuvent promouvoir le développement tumoral, notamment par la sécrétion d'IL-17, d'IL-4 ou IL-10, et l'expression de récepteurs inhibiteurs tels que PD-1. Ils peuvent également favoriser le recrutement de cellules immunosuppressives, contribuant ainsi à un environnement favorable à la croissance tumorale. Créée avec BioRender.com

CD : cluster de différenciation, DNAM-1 : DNAX accessory molecule-1, EPCR : Endothelial Protein C Receptor, GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, HLA : Human leucocyte antigen, IFN γ : Interféron γ , IL : interleukine, LT $\gamma\delta$: Lymphocyte T $\gamma\delta$, MDSC : Myeloid Derived suppressor Cell, MICA et B : MHC class I-chain related proteins A and B, NCR : natural cytotoxicity receptors, NKG2D : natural killer group 2 member D, PD-1 : Programmed cell death protein 1, PD-L1 : Programmed death-ligand 1, TCR : T cell receptor, TNF α : Tumor necrosis factor α , TRAIL : Tumor-Necrosis-Factor related Apoptosis Inducing Ligand, VEGF : Vascular endothelial growth factor.

Elle peut aussi faciliter le recrutement de cellules suppressives comme les MDSC pour maintenir cet environnement pro-tumoral [195]. Un autre mécanisme par lequel les LT $\gamma\delta$, et

plus spécifiquement les LT V δ 1, peuvent promouvoir le développement tumoral est l'expression de marqueurs ou la sécrétion de cytokines associés au phénotype des LT régulateurs tels que PD-1, IL-4 ou IL-10. Ces cellules ont été retrouvées dans certaines tumeurs et inhibent l'activité des LT $\alpha\beta$ [223], [224] (**Figure 22**). Cependant, le développement tumoral reste un processus complexe avec l'implication d'une multitude de signaux et de récepteurs. Les caractéristiques énoncées ci-dessus peuvent donc varier en fonction des signaux reçus par les LT $\gamma\delta$, de leur niveau d'activation ou encore du type de tumeur étudié.

4.2.1.2. Utilisation comme marqueur de pronostic

Cette ambivalence dans le potentiel d'action des LT $\gamma\delta$ réside notamment dans la différence de phénotype exprimé. Leur potentiel comme marqueur de pronostic a donc largement été étudié. Tout d'abord, on observe une augmentation de l'expression des gènes *TRGV* et *TRDV*, codant respectivement pour les chaînes gamma et delta, associées à un meilleur pronostic de survie dans de multiples cancers [225]. De plus, la grande majorité des études récentes montre que la présence de LT V δ 1 est associée à un pronostic favorable dans de nombreux cancers comme le cancer du côlon, du sein triple-négatif ou encore du poumon [219], [220], [226]. Toutefois, il a été montré que l'infiltration de LT $\gamma\delta$ IL-17+ dans le cancer colorectal est un marqueur de mauvais pronostic [195] tandis que ces cellules peuvent être associées à un bon pronostic lorsqu'elles expriment NKp46 ou CD69 dans ce même cancer [128], [226]. Quelques études démontrant l'ambivalence des LT $\gamma\delta$ lors de développement tumoral sont regroupées dans le tableau suivant (**Tableau 1**).

En résumé, bien que les LT $\gamma\delta$ humains puissent se polariser vers des phénotypes pro-tumoraux dans certains contextes précis, leurs propriétés anti-tumorales observées *in vitro* et *in vivo* en font des candidats intéressants dans le développement de thérapie contre le cancer. Dans notre cas, toutes ces études nous confirment l'intérêt d'utiliser les LT V δ 1 comme vecteur pour les polymersomes. Ces cellules sont naturellement retrouvées au sein des sites tumoraux mais peuvent aussi y résider ce qui, dans notre contexte, nous permet d'imaginer le transport des nanoparticules sur site et de les y maintenir suffisamment longtemps pour qu'elles puissent y libérer leur contenu.

Tableau 1 : Lymphocytes T $\gamma\delta$ en tant que marqueur pronostic.

| Type de cancer | Sous-type de LT $\gamma\delta$ | Pronostic | Références |
|--|--------------------------------|-------------|------------|
| Cancer du sein triple négatif | LT V δ 1 | Favorable | [219] |
| Cancer du poumon à petit cellules | LT V δ 1 | Favorable | [220] |
| Cancer colorectal dérivé de métastases du foie | LT V δ 1 CD69+ | Favorable | [226] |
| Cancer colorectal | LT V δ 1 NKp46+ | Favorable | [128] |
| | LT $\gamma\delta$ | Favorable | [227] |
| | LT $\gamma\delta$ IL-17+ | Défavorable | [195] |
| Cancer de la vésicule biliaire | LT $\gamma\delta$ IL-17+ | Défavorable | [196] |
| Carcinome hépatocellulaire | LT $\gamma\delta$ | Favorable | [228] |

Modifié d'après [207]

4.2.2. Infection virale

En plus d'un rôle dans les cancers, les LT $\gamma\delta$ peuvent jouer un rôle important dans l'immunité contre certains virus, notamment dans la détection précoce des virus et l'initiation de la réponse immunitaire. Une amplification de ces cellules a été observée dans le sang des patients lors de diverses infections virales, telles que celles causées par le cytomégalo virus (CMV), le virus de l'hépatite B (HBV), le virus d'Epstein-Barr (EBV) et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

4.2.2.1. Infection par le cytomégalo virus

Le CMV est un virus de la famille des Herpesviridae au tropisme cellulaire très large et qui après une infection aiguë peut rester sous forme latente dans l'organisme. L'infection par le CMV est inoffensive chez les individus sains mais est responsable d'une morbidité et d'une mortalité importantes chez les patients immunodéprimés. Cela est notamment retrouvé chez les receveurs de greffes d'organes solides et de cellules hématopoïétiques. Lors d'infections congénitales ou péri-natales le CMV peut engendrer des séquelles neuro-sensorielles. La réponse immunitaire des LT $\gamma\delta$, et plus particulièrement des LT V δ 1, a été un sujet de recherche très étudié notamment dans notre équipe qui a mis en évidence leur potentiel dans le contrôle de l'infection [229].

Tout d'abord, il a été montré que ces cellules subissent une expansion clonale dans le sang des patients spécifiquement après l'infection par le CMV, qu'elle soit asymptomatique [179] ou chez les patients immunodéprimés. Cette immunodépression peut survenir chez des receveurs de greffes de rein [230], de cellules hématopoïétiques [231], de foie, de poumon [232], mais aussi chez des nouveaux nés [233]. La réactivité ainsi que la spécificité d'action des LT V δ 1 pour le CMV ont pu être vérifiées grâce au développement de divers modèles *in vitro* de co-cultures avec des cellules infectées [234], et *in vivo* avec des modèles murins [235]. Lors de l'étude de Khairallah et ses collègues, plusieurs modèles murins ont été utilisés pour démontrer le rôle crucial des LT $\gamma\delta$ dans le contrôle de l'infection par le CMV. Ils ont montré que des souris CD3^{-/-}, correspondant à des souris ne possédant aucun LT, étaient incapables de contrôler cette infection tandis que des souris déplétées en LT $\alpha\beta$, c'est-à-dire ne possédant que des LT $\gamma\delta$ et NK, étaient tout à fait en capacité de la contrôler. Cette étude a mis en évidence la place plus qu'importante qu'occupent les LT $\gamma\delta$ dans le contrôle de l'infection par le CMV. Par ailleurs, des tests *in vitro* basés sur des expériences de co-culture comprenant des fibroblastes infectés par le CMV et des clones de LT V δ 1, V δ 3 ou V δ 5 appuient ces résultats. Ces derniers ont démontré une forte réactivité des LT $\gamma\delta$ *via* un phénotypage par cytométrie en flux [179], [231] et par une sécrétion d'IFN γ , de TNF α ou de GM-CSF [160], [161], [231], [234]. Il est important de noter que cette activité est spécifique du CMV. Des co-cultures utilisant des cellules infectées par d'autres virus de la même famille comme l'Herpes Simplex Virus (HSV-I) et le virus de la Varicelle et du Zona (VZV) n'ont montré ni prolifération, ni production d'IFN γ par les LT $\gamma\delta$ [177], [230].

Bien que cette spécificité soit maintenant établie, les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des antigènes de stress produits par les cellules infectées restent peu connus. De nos jours, seuls deux principaux mécanismes ont été complètement identifiés. Certains clones de LT V δ 1 peuvent être activés soit par la liaison entre un TCR V γ 9V δ 3 et l'annexine A2 [148], soit par une signature de stress multimoléculaire incluant le ligand d'un TCR V γ 4V δ 5, l'EPCR, et les signaux de costimulation ICAM-1 et LFA-1 [141]. Toutefois, des études ont suggéré que cette reconnaissance pouvait être médiée par d'autres récepteurs. Dans ce contexte, la molécule CD16, qui est normalement un récepteur de costimulation, pourrait reconnaître les IgG présents à la surface des virions opsonisés, provoquant ainsi l'activation LT V δ 1 indépendamment du TCR $\gamma\delta$ et une production accrue d'IFN γ bloquant alors la

prolifération du virus [160]. Les récepteurs cytokiniques semblent également impliqués dans le contrôle de l'infection par le CMV. Il a été montré que certaines cellules infectées peuvent sécréter des cytokines, comme l'IFN α , et l'IL-18, et que ces dernières augmentent la production d'IFN γ induite par CD16 ou par le TCR dans les LT V δ 1, ce qui renforce le contrôle de la réplication du CMV *in vitro* [160], [161] (**Figure 23**).

4.2.2.1. Autres virus

Une prolifération de LT $\gamma\delta$ humains a également été observée après infection par d'autres virus que le CMV. Lors d'une infection par HBV, une augmentation de LT $\gamma\delta$, que ce soit du sous-type V δ 1 ou V δ 2, est observée. Ces derniers sont caractérisés par une production accrue d'IFN γ [236], [237]. Une prolifération de LT V δ 1 a également été décrite en réponse à une stimulation par des lignées cellulaires de LB transformés par le virus EBV. Cette réponse cytotoxique a été décrite comme pouvant être médiée par une interaction avec l'HLA-DR. Toutefois, ces résultats *in vitro* sont à prendre avec prudence car cette prolifération de LT V δ 1 a également été observée avec des lignées de LB transformés non infectés par EBV [238], [239], [240], [241].

In vitro, les LT V γ 9V δ 2 activés par des PAg peuvent répondre spécifiquement au VIH. Toutefois, les deux sous-types de LT $\gamma\delta$ prolifèrent lors de l'infection et peuvent directement tuer les cellules infectées ou sécréter des cytokines inhibant la réplication virale, telles que l'IFN γ , le TNF α , MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES [242], [243]. Des études ont mis en évidence l'importance de NKG2A/C – HLA-E dans la reconnaissance du virus par les LT V δ 1 [242], [244]. Enfin, des études *in vitro* ont également montré que NKp30 est un récepteur clé dans l'inhibition du VIH par des LT V δ 1 amplifiés *ex vivo* [245].

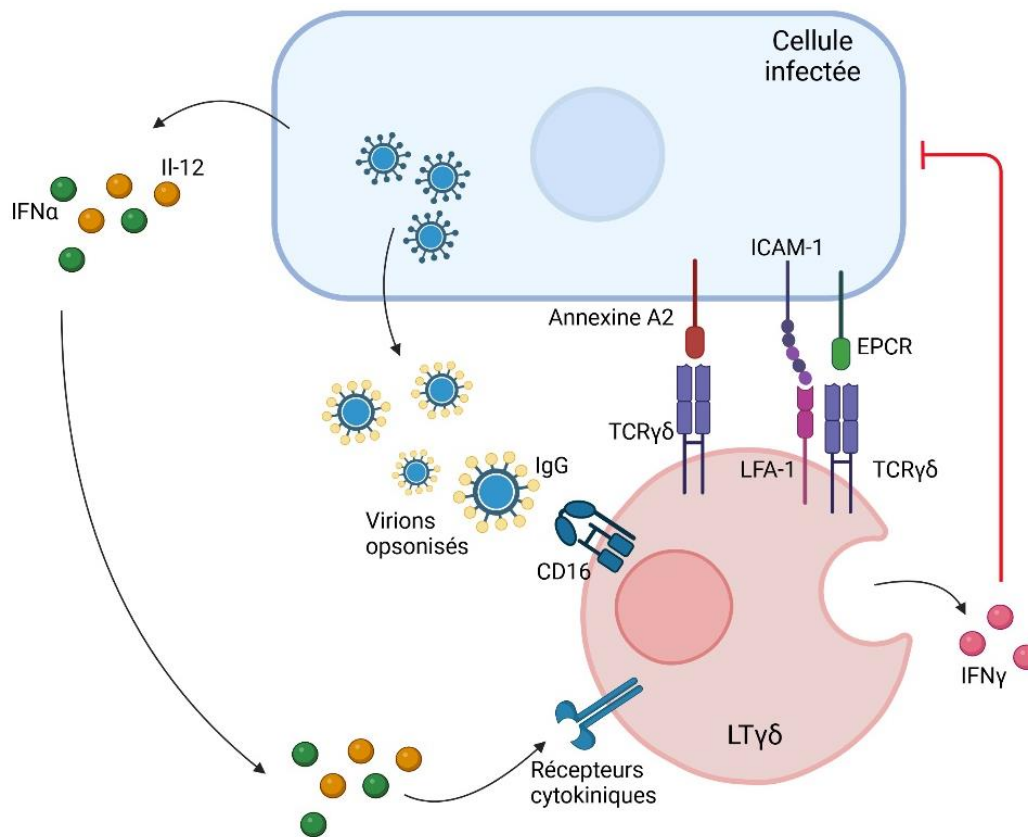


Figure 23 : Mécanismes moléculaires de détection de l'infection virale du cytomegalovirus (CMV) par les lymphocytes T Vδ1.

L'infection par le CMV induit une signature de stress multimoléculaire, caractérisée par la surexpression de molécules de surface telles que l'annexine A2 ou ICAM-1, ainsi que par la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- α ou l'IL-12. Ces molécules sont détectées par les LT V δ 1 via leur TCR $\gamma\delta$, des récepteurs de costimulation comme LFA-1, et des récepteurs de cytokines. Les virions libérés par les cellules infectées et opsonisés par des IgG peuvent être reconnus par les LT V δ 1 via CD16. Créée avec BioRender.com
 CD : cluster de différenciation, EPCR : Endothelial Protein C Receptor, ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1, IFN α : Interféron α , IFN γ : Interféron γ , IgG : immunoglobuline G, Il : interleukine, LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1, LT $\gamma\delta$: Lymphocyte T $\gamma\delta$, TCR $\gamma\delta$: T cell receptor $\gamma\delta$.

En résumé, les LT $\gamma\delta$ possèdent un rôle primordial dans le contrôle d'infections par divers virus, que ce soit par le biais de la reconnaissance de PAg pour les LT V γ 9V δ 2, ou par une reconnaissance directe des récepteurs présents sur les cellules infectées par les LT V δ 1.

4.2.3. Infection bactérienne

Les infections bactériennes font tout autant partie du spectre de détection des LT $\gamma\delta$. En effet, dans tous les cas d'infections par des bactéries possédant la voie DOXP de production des stéroïdes, la présence d'HMBPP est détectée par les LT V γ 9V δ 2 provoquant ainsi leur

prolifération [246]. Seules les infections par trois bactéries seront brièvement développées ci-dessous : *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), *Listeria monocytogenes* et *Streptococcus pneumoniae*.

Le rôle des LT V γ 9V δ 2 dans l'infection par *Mtb* a été largement étudié et leurs fonctions ont été résumées dans diverses revues [247], [248]. Il a été montré que l'infection par *Mtb* induit la production d'IL-17, favorise la surexpression de ICAM-1 et LFA-1 à la surface des macrophages et renforce la réponse Th1 des LT $\alpha\beta$ par le biais de l'IL-12 [249], [250], [251], [252]. Une étude récente réalisée par Ogongo et ses collègues a montré que des clones de LT V δ 1 sont enrichis dans les lésions pulmonaires induites par *Mtb*, ce qui suggère une implication de ces cellules dans la physiopathologie de la tuberculose. Toutefois, leur rôle exact dans le contrôle de l'infection reste encore peu connu [126].

Concernant l'infection par *Listeria monocytogenes*, les LT $\gamma\delta$ jouent un rôle multifactoriel. Des études sur des modèles murins ont prouvé leur rôle crucial dans la production d'IL-17 et d'IL-12, favorisant ainsi la réponse des LT CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques de l'antigène [253]. Enfin, il a été montré que, les LT $\gamma\delta$ jouent un rôle en deux temps dans l'infection par *Streptococcus pneumoniae* chez la souris. Au début de l'infection, ces cellules produisent de l'IL-17 favorisant le recrutement de neutrophiles pour contrôler l'infection. Par la suite, une fois l'infection stabilisée, ces LT $\gamma\delta$ vont éliminer les macrophages et les cellules dendritiques pulmonaires afin de restaurer l'homéostasie [254], [255].

4.2.4. Infection parasitaire

Les LT $\gamma\delta$ sont également impliqués dans le contrôle de l'infection par *Plasmodium falciparum* qui possède la voie DOXP. Par exemple, des études ont montré que les LT V γ 9V δ 2, une fois activés *via* leur TCR par l'accumulation de PAgS produits par les parasites, peuvent dégranuler des facteurs cytolytiques tels que le granzyme ou la granulysine, affectant les parasites et les empêchant de ré-infecter des érythrocytes sains [256], [257]. Ils sont également capables de phagocyter des érythrocytes infectés [258]. Des études de vaccination ont également mis en lumière leurs capacités cytotoxique, de phagocytose, de sécrétion de cytokines et de présentation d'antigène [259], [260]. De façon intéressante, dans les essais récents de vaccination contre le parasite, le taux sanguin de LT V γ 9V δ 2 est un des facteurs les mieux

corrélés avec le taux de protection [261]. Il a enfin été montré que les LT V δ 1 peuvent être impliqués dans le contrôle de cette infection. Une accumulation de clones V δ 1+ affichant une signature cytotoxique a été observée chez des volontaires après une infection. De plus, l'exposition *in vitro* à *Plasmodium falciparum* peut induire la prolifération des LT V δ 1 et l'expression de marqueurs cytotoxiques [262], [263].

L'ensemble de ces études montre la multitude d'actions que peuvent effectuer les LT $\gamma\delta$ et notamment les LT V δ 1. Ils possèdent la capacité de contrôler des infections qu'elles soient virales, bactériennes ou parasitaires. Ils ont également un rôle clé lors du développement tumoral, bien qu'ambivalent en fonction des signaux cytokiniques et des récepteurs détectés. Ces LT V δ 1 peuvent agir directement sur les cellules transformées avec une activité cytotoxique et cytolytique, mais également par le biais de diverses cellules immunitaires en favorisant leur recrutement sur le site d'intérêt. Toutes ces caractéristiques nous confirment leur grand intérêt dans leur utilisation lors de la production de notre biohybride. Nous pouvons également imaginer qu'en plus de transporter les polymersomes spécifiquement sur les sites d'intérêt, il serait possible d'avoir un effet synergique entre l'action des LT V δ 1 et celle du principe actif présent dans le polymersome. En effet, certaines études ont d'ores-et-déjà mis en évidence le potentiel thérapeutique des LT V δ 1 dans plusieurs pathologies. Dans cette dernière partie, nous allons donc développer les possibilités mises en avant lors de ces études.

5. Potentiel thérapeutique des lymphocytes T $\gamma\delta$

Comme souligné plus haut, les LT $\gamma\delta$, et plus particulièrement les LT V δ 1, possèdent de nombreuses propriétés faisant d'elles des cellules de choix lors du développement de nouvelles thérapies cellulaires. Dans cette partie, nous allons résumer de manière non exhaustive certaines études démontrant leur potentiel thérapeutique ainsi que le développement de protocoles permettant leur utilisation.

5.1. Développement d'un protocole d'expansion des lymphocytes T V δ 1 (cellules DOT)

Des protocoles d'expansions des LT $\gamma\delta$ ont été développés dans le but d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques utilisant ces cellules. Tout d'abord, des protocoles ciblant l'expansion des LT V γ 9V δ 2 ont été élaborés. Les immunothérapies utilisant ces cellules ont pu être divisées en deux catégories : (i) la première consistant à stimuler les cellules *in vivo* par l'administration systémique de PAg ou d'antigènes synthétiques et (ii) la deuxième, plus largement utilisée, consistant à réaliser une expansion *ex vivo* des cellules à l'aide de PAg synthétiques (Zoledronate) couplés à des cytokines (IL-2, IL-18, IL-21) suivie d'une administration de ces cellules amplifiées au patient [264]. L'étude de Sawaisorn et ses collègues a mis en évidence les caractéristiques cytotoxiques acquises par LT V γ 9V δ 2 après leur expansion *ex vivo* avec un cocktail de Zoledronate, d'IL-2, d'IL-15 et d'IL-18 à l'aide d'un modèle de cholangiocarcinome [265]. D'autres études cliniques ont démontré l'avantage de cette thérapie allogénique dans le cas de mélanome, de myélome multiple ou de cancer du poumon [266], [267], [268].

Concernant les LT V δ 1, plusieurs protocoles ont été développés. Par exemple, Ferry et ses collègues ont mis au point un protocole d'expansion ne nécessitant que deux étapes. Tout d'abord, des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été déplétées de LT $\alpha\beta$ et de cellules CD56+ (cellules NK). Par la suite, les cellules restantes ont été cultivées et stimulées pendant 20 jours à l'aide d'anticorps monoclonal anti-CD3 (OKT-3) en présence d'un milieu supplémenté en IL-15. Les cellules obtenues peuvent être efficacement transduites avec un récepteur antigénique chimérique (CAR) et possèdent donc une reconnaissance innée des cibles en plus d'une amélioration fonctionnelle spécifique à l'antigène, sans montrer de signe d'alloréactivité [269].

Toutefois, lors de ce travail, nous allons nous intéresser plus particulièrement au protocole mis en place par Almeida *et al.* Ce protocole mène à la production d'un pool de cellules fortement enrichi en LT V δ 1, basé sur la déplétion des LT $\alpha\beta$ suivi de 21 jours de culture en présence d'un activateur du TCR (OKT-3) et d'un cocktail de cytokines spécifiques incluant l'IL-4, l'IL-15 et l'IL-21, ainsi que l'IL-1 β et l'IFN γ [159]. Ce protocole génère une suspension cellulaire nommée DOT (Delta One T cell) composée majoritairement de LT V δ 1, mais également de quelques V δ 3 ayant une activité décrite comme similaire aux V δ 1. Ce protocole a été conçu pour induire l'expression des récepteurs NK, en particulier les NCRs (NKp30 et

NKp44) impliqués dans la destruction des cellules cancéreuses, et l'expansion spécifique de cellules dites « centrales-mémoires » (CD27+ CD45RA-) à partir des cellules naïves afin d'obtenir un produit cellulaire hautement polyclonal et capable de se maintenir à long terme *in vivo*. Le protocole DOT semble actuellement le mieux adapté à une utilisation clinique future pour les raisons suivantes : (i) il permet une expansion à grande échelle de LT V δ 1 de manière très spécifique et reproductible, (ii) il utilise un protocole simple et facilement transposable aux conditions cliniques, (iii) le phénotype des cellules générées a été largement caractérisé, notamment pour les marqueurs d'activation, de différenciation, les inhibiteurs de points de contrôle, les récepteurs de migration, et les récepteurs de costimulation, (iv) l'absence de réactivité contre les cellules normales a été caractérisée *in vitro* par co-culture avec plusieurs cellules lymphoïdes et myéloïdes autologues, (v) les modèles murins précliniques de xénogreffe ont montré la persistance et la prolifération *in vivo* des DOT transférées et ont également démontré leur efficacité [171], [229]. Ces cellules sont actuellement utilisées comme thérapie allogénique "prête à l'emploi" dans un essai clinique de phase I en cours de recrutement chez des patients atteints de LMA (NCT05001451). Cela fait des cellules DOT le premier produit thérapeutique de LT V δ 1 évalué en clinique.

5.2. Utilisation des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans le développement de thérapie ciblée

L'utilisation des LT V δ 1 pour les thérapies allogéniques est particulièrement pertinent du fait de leur absence de restriction par le HLA. Cela permettrait un développement à grande échelle à partir de peu de donneurs. Cette stratégie "off-the-shelf" permettrait, après validation, la cryopréservation d'une bio-banque rapidement disponible pour le transfert chez des patients atteints d'infection virale (CMV), bactérienne ou lors de développement tumoral. Un aperçu non-exhaustif des essais cliniques impliquant des LT $\gamma\delta$ globaux ou LT V δ 1 est présenté dans le **Tableau 2** suivant.

Ce tableau met en évidence les possibilités d'utilisation des LT $\gamma\delta$ et plus spécifiquement des LT V δ 1 lors de développement de thérapies. Ces cellules sont fréquemment utilisées lors de thérapies ciblant les cellules cancéreuses mais également lors d'infection notamment par le CMV. Comme montré ici, elles peuvent être simplement injectées de façon allogénique ou modifiées si besoin afin de les rendre plus spécifiques.

Tableau 2 : Essais cliniques en cours utilisant les lymphocytes T $\gamma\delta$.

| Approches | Produits thérapeutiques | Pathologies | Essais cliniques |
|------------------------|---|---|--------------------------|
| ACT non modifié | Amplification de LT $\gamma\delta$ allogéniques ou autologues, résistants à la chimiothérapie | GBM | NCT04165941, NCT05664243 |
| | Amplification de LT $\gamma\delta$ allogéniques post transplantation de cellules souches hématopoïétiques | Leucémies et les syndromes myélodysplasiques | NCT03533816 |
| | Amplification de LT V δ 1 allogéniques | Leucémie myéloïde aiguë réfractaire ou en rechute | NCT05886491 |
| | Amplification de LT $\gamma\delta$ allogéniques | Leucémie myéloïde aiguë | NCT05015426 |
| CAR T cell | LT V δ 1 modifiés par CAR spécifique au CD20 | Lymphome | NCT04735471, NCT04911478 |
| | LT $\gamma\delta$ modifiés par CAR spécifique au HLA-G | Tumeur solide réfractaire ou en rechute | NCT06150885 |
| $\gamma\delta$ TCR-ACT | LT $\gamma\delta$ avec un TCR modifiés par un anticorps anti-CD19 | Lymphome | NCT04014894 |
| Médiateur | PSMA-targeting bispecific $\gamma\delta$ -T Cell engager | Cancer de la prostate | NCT05369000 |

ACT : Adoptive Cell Transfert, CAR : Chimeric Antigenic Receptor, GBM : Glioblastome, PSMA : Prostate-specific membrane antigen. Modifié de [150].

Dans ce chapitre, nous avons donc exploré les nombreuses propriétés bénéfiques des LT $\gamma\delta$ et plus particulièrement des LT V δ 1. Ces cellules possèdent la capacité de cibler divers sites pathologiques et de s'y accumuler à l'aide de leurs multiples récepteurs innés et adaptatifs. Une fois accumulés, les LT V δ 1 peuvent y résider et exercer de nombreuses actions, qu'elles soient directes envers les cellules transformées, ou indirectes en favorisant le recrutement de cellules immunitaires, renforçant ainsi le contrôle de la pathologie. Pour toutes ces raisons, les LT V δ 1 se distinguent comme des candidats prometteurs pour le développement de nouvelles thérapies cellulaires. Toutefois, comme développé dans le chapitre 1, de nombreuses recherches se focalisent sur le développement de nouvelles thérapies utilisant la nanomédecine et plus particulièrement les nanoparticules. Dans ce contexte, les LT V δ 1 joueraient le rôle de transporteur de ces nanoparticules.

C'est sur cette base que notre projet s'est développé. Pour résumer, le but de ce travail est d'encapsuler des principes actifs/thérapeutiques dans des polymersomes afin de les protéger d'une élimination précoce par le système immunitaire. Ces polymersomes sont couplés à des DOT à l'aide de la chimie click et plus spécifiquement de la SPAAC. Ce couplage permet alors l'utilisation des DOT comme vecteur favorisant un ciblage actif des sites d'intérêt afin d'obtenir une thérapie ciblée, spécifique limitant les effets secondaires potentiels. Pour réaliser cette chimie click, les polymersomes sont fonctionnalisés avec un DBCO. Les DOT, précédemment amplifiées par le protocole établi par Almeida *et al.* [159], sont métaboliquement modifiées à l'aide d'azido-sucre afin qu'elles expriment un azide libre à la surface de leur glycanes de surface (**Figure 24**). La mise en place ainsi que les optimisations de ces protocoles seront développées tout au long de ce travail.

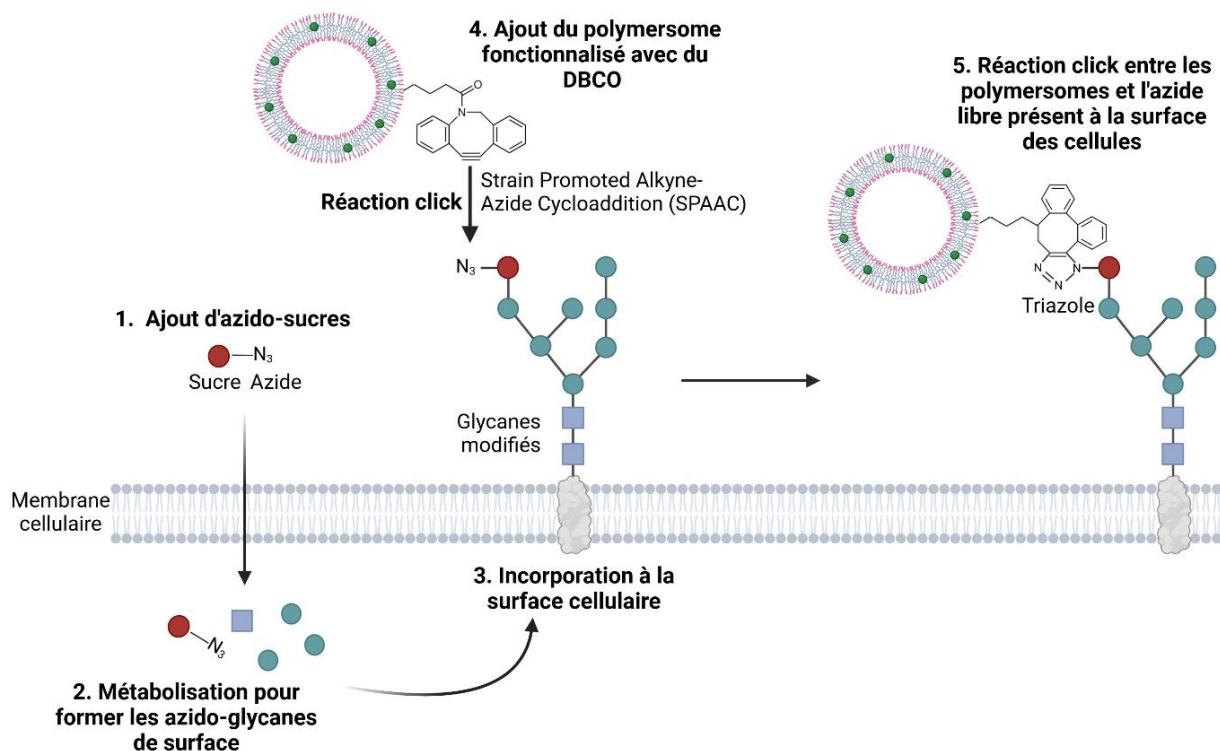


Figure 24 : Représentation schématique de l'objectif : Modification métabolique des DOT suivie de la chimie click (SPAAC) avec un polymersome fonctionnalisé avec un DBCO.

Les LT V δ 1, précédemment amplifiés par le protocole établi par [159], [171], sont métaboliquement modifiés par l'ajout d'azido-sucre tétra-actétylés. Ces derniers peuvent pénétrer passivement dans la cellule pour entrer dans leurs voies métaboliques respectives afin d'être intégrés aux glycanes de surface. Ces glycanes expriment donc des azides libres à leur extrémité pouvant interagir avec un DBCO présent à la surface des polymersomes à l'aide de la SPAAC. Ce protocole permet la création d'un biohybride où le polymersome protège le principe actif et les LT V δ 1 jouent le rôle de vecteur. Créée avec BioRender.com

Objectif

Les thérapies conventionnelles, qu'elles soient anti-cancéreuses ou antivirales, provoquent souvent de nombreux effets secondaires délétères en raison de leur manque de spécificité. Cette absence de ciblage spécifique impose l'utilisation de doses plus élevées ou d'administrations plus fréquentes pour obtenir l'effet escompté sur les cellules cibles, engendrant une augmentation du risque d'effets secondaires. Par ailleurs, le transport de ces molécules peut être entravé par divers mécanismes tels que l'incapacité à traverser les barrières biologiques et la clairance rénale rapide des petites molécules. Face à ces défis, de nouvelles stratégies thérapeutiques émergent, faisant appel à des nanoparticules et des agents ciblant activement les sites d'intérêt tels que des cellules immunitaires. Ces systèmes offrent une protection du principe actif par leur encapsulation dans la nanoparticule ainsi qu'un ciblage spécifique des cellules visées. De nombreuses avancées ont été réalisées concernant le choix des nanoparticules et des cellules immunitaires à utiliser en fonction du contexte étudié ainsi que le couplage de ces deux entités. Les polymersomes se sont rapidement fait une place dans ce domaine de par leurs qualités membranaires et leur fonctionnalisation aisée. De même, les LT se sont distingués comme des cellules de choix dans le ciblage et l'élimination de cellules transformées. Toutefois, aucune étude ne s'est intéressée à une sous-population précise, comme les LT V δ 1. Afin d'exploiter ce système de transport, des équipes telles que celle de Gibson se sont intéressées au couplage nanoparticule/cellule immunitaire à l'aide de la chimie click et plus spécifiquement de la SPAAC [107]. Cette chimie, développée par Bertozzi, Sharpless et Meldal, est basée sur la réaction entre un cyclooctyne et un azide organique [72]. Ce système s'appuie sur la fonctionnalisation des polymersomes avec un cyclooctyne, en l'occurrence le DBCO, et sur la modification métabolique des LT V δ 1 avec des azido-sucres permettant ainsi l'expression d'un azide libre à l'extrémité des glycanes de surface des cellules [62], [77].

Ce travail de thèse a donc pour objectif de mettre au point un protocole de chimie click entre des polymersomes couplés à du DBCO, produits par nos collaborateurs au Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO), et des LT V δ 1 (DOT) amplifiés selon le protocole de l'équipe de Bruno Silva-Santos et modifiés par ingénierie métabolique.

Dans un premier temps, nous avons optimisé le protocole de modification métabolique à l'aide d'un DBCO fluorescent. Cette étape nous a permis de déterminer les conditions

optimales de culture des DOT avec les azido-sucres. Nous avons identifié les paramètres idéaux pour obtenir une quantité suffisante d'azides libres à la surface des cellules tout en minimisant la toxicité potentielle des composés chimiques. L'objectif de produire des DOT capables de se lier efficacement au DBCO fluorescent tout en préservant leurs caractéristiques physiologiques a également nécessité la mise en place de tests fonctionnels pour vérifier leurs propriétés.

Dans une seconde partie, nous avons travaillé sur l'élaboration de ce même protocole en incluant des polymersomes vides, c'est-à-dire n'encapsulant aucun principe actif, mais fonctionnalisés avec du DBCO. Nous avons mis au point une méthode d'évaluation du nombre de polymersomes obtenus après formulation afin d'expérimenter divers ratios lors des réactions click entre ces derniers et les cellules. Différentes conditions de culture ont également été examinées afin de perfectionner le biohybride final.

Matériels et méthodes

1. Culture cellulaire

Les cellules JRT3 LES avaient précédemment été générées à partir de la lignée de lymphome T J.RT3-T3.5 (ATCC) en les transduisant avec un vecteur lentiviral exprimant le TCR V γ 4V δ 5 isolé à partir du clone T LES (dérivé d'un patient transplanté infecté par le CMV) spécifique de l'antigène EPCR [141]. Elles ont été cultivées dans du milieu RPMI (Gibco, Life Technologies) complété avec 8% de sérum de veau foetal (SVF), 100 unités/ml de pénicilline, 100 μ g/ml de streptomycine (PS) et 2mM de L-glutamine.

Des échantillons de sang total (50ml) ont été obtenus auprès de volontaires sains, recrutés par l'Établissement Français du Sang. Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées à l'aide d'un milieu de séparation des lymphocytes (Eurobio Scientific). Ces cellules ont ensuite été cultivées dans du milieu RPMI complet décrit précédemment.

Après expansion, les DOT (« Delta One T cell »), ont été cultivés dans du milieu OpTmizer™ CTS™ (GIBCO, Life Technologies) complété avec 10% de sérum humain, 100 unités/ml de pénicilline, 100 μ g/ml de streptomycine (PS), 2mM de L-glutamine et 100ng/ml d'IL-15.

2. Expansion des DOTS

Des échantillons de sang total (50ml) ont été obtenus auprès de volontaires sains, recrutés pas l'Établissement Français du Sang. Les PBMC ont été isolées à l'aide d'un milieu de séparation des lymphocytes (Eurobio Scientific). Ces cellules ont ensuite été marquées avec un anticorps dirigé contre le TCR $\alpha\beta$, couplé à de la biotine (Miltenyi Biotec, clone REA652, dilué 1:50), puis incubées avec des microbilles anti-biotines (Miltenyi Biotec). Les lymphocytes T $\alpha\beta$ ont été éliminés par tri cellulaire magnétique et les PBMC restantes ont été cultivées pendant 21 jours pour l'expansion des lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 2neg (contenant majoritairement des lymphocytes T V δ 1+), en utilisant le protocole des cellules DOT décrit par l'équipe de Bruno Silva-Santos [159], [171]. Les cellules ont été cultivées dans le milieu sans sérum OpTmizer™ CTS™ (GIBCO, Life Technologies) complété avec 10% de sérum humain, 100 unités/ml de pénicilline, 100 μ g/ml de streptomycine (PS) et 2 mM de L-glutamine (milieu d'expansion), à une concentration de 160 000 cellules/ml. Les cytokines humaines recombinantes suivantes ont été ajoutées : 100ng/ml d'interleukine 4 (IL-4), 70ng/ml

d'interféron gamma (IFN γ), 7ng/ml d'IL-21, 15ng/ml d'IL-1 β (toutes provenant de Peprotech) et un anticorps dirigé contre le CD3 (1 μ g/ml, clone OKT-3, Biolegend). Aux jours 6, 11 et 16 de culture, le milieu d'expansion a été renouvelé et complété avec 70ng/ml d'IL-15 (jours 6, 11, 16), 13ng/ml d'IL-21 (jour 6), 70ng/ml d'IFN γ (jour 16) et 2 μ g/ml d'anti-CD3 (jours 6, 11, 16) (**Tableau 5**).

3. Phénotypage des DOT après amplification

Les DOT ont été récoltées et marquées pour le suivi de l'amplification aux jours 0, 11 et 21. Les cellules ont été marquées à l'aide d'un marqueur de viabilité cellulaire (Fixable Viability Stain 780, BD Biosciences) puis marquées avec les anticorps anti-CD3, anti-TCR $\gamma\delta$, anti-TCR $\alpha\beta$, anti-TCR V δ 1 et anti-TCR V δ 2 (**Tableau 5**). Les cellules ont été analysées avec le cytomètre Canto II (BD Biosciences) et les données obtenues à l'aide du logiciel FlowJo V10.5.

4. Formulation des polymersomes

La formulation des polymersomes a été réalisée en collaboration avec le LCPO ce qui m'a permis de me former sur trois techniques : l'électroformation, la double émulsion et l'extrusion manuelle.

4.1. Electroformation

Une solution de copolymères dilués dans du CHCl₃ à 1mg/ml (20%_w NH₂-PEG₂₂-b-PBD₂₃, 76%_w PBD₂₂-b-PEG₁₈, 4%_w PBD₃₃-Fluoresceine) a été déposée en forme de quadrillage sur deux lamelles recouvertes d'oxyde d'indium-étain avec un microcapillaire de 10 μ l. Deux fils électriques ont été fixés à l'aide de ruban adhésif et un joint en caoutchouc enduit de graisse a été mis entre les deux lamelles dans le but de former une chambre d'électroformation. Cette dernière a été séchée sous vide pendant 2h puis connectée à un générateur. Une solution de sucrose à 300mM a été injectée dans la chambre et un courant de 2V, 10Hz pendant 1h a été appliqué pour hydrater le film. Les polymersomes formés ont été récupérés puis extrudés manuellement (Cf 4.3) avant de les incuber avec 10 ou 20% de DBCO-NHS en fonction des conditions étudiées (**Tableau 4**) toute une nuit sous agitation (600rpm) à 4°C. Par la suite,

trois bains de dialyse d'1h en PBS 300mOsm pH7,4 ont été réalisés afin d'éliminer l'excès de DBCO-NHS. Les polymersomes obtenus ont été analysés en diffusion de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS, Malvern Zetasizer NanoZS) et au NanoFCM afin de connaître leur taille et leur concentration respectivement.

4.2. Double émulsion

30 μ l d'une solution de copolymères dilués dans du toluène à 6mg/ml (20%_w NH₂-PEG₂₂-b-PBD₂₃, 76%_w PBD₂₂-b-PEG₁₈, 4%_w PBD₃₃-Fluoresceine) ont été mélangés avec 5 μ l de sucrose à 300mM afin de créer une première émulsion. Puis, 15 μ l de cette solution ont été ajoutés et mélangés à 300 μ l de Sucrose 300mM dans le but de réaliser la seconde émulsion et créer les polymersomes. Ces solutions ont ensuite été laissées pendant 2h sous hôte afin d'éliminer l'excédent de toluène puis extrudées manuellement. Les polymersomes obtenus ont été incubés avec 10 ou 20% de DBCO-NHS en fonction des conditions étudiées (**Tableau 4**) toute une nuit sous agitation (600rpm) à 4°C puis purifiés à l'aide de filtre Amicon ultra 100 KDa afin d'éliminer l'excès de DBCO-NHS. Les polymersomes ont été analysés en DLS (Malvern Zetasizer NanoZS) et au NanoFCM afin de connaître leur taille et leur concentration respectivement.

4.3. Extrusion

Les polymersomes ont été extrudés à la taille souhaitée en fonction des conditions étudiées (**Tableau 4**) à l'aide d'un mini-extruder manuel Avanti polar. Pour cela, l'extrudeur a été assemblé en suivant les instructions du fabricant et les échantillons ont subi 11 passages à travers les filtres. La taille obtenue a été vérifiée par DLS à l'aide du Malvern Zetasizer NanoZS.

5. Détermination de la taille et de la concentration des polymersomes

5.1. Détermination de la taille

La taille et la dispersion des polymersomes ont été vérifiées par diffraction lumineuse (Dynamic Light Scattering, DLS) à l'aide du Malvern Zetasizer NanoZS disponible au LCPO équipé d'un laser à 633nm et d'un angle de diffusion de 90°. Pour cela, 50 μ l de chaque

échantillon ont été déposés dans des chambres en quartz et trois sets de dix mesures ont été réalisés à température ambiante (RT : « Room Temperature »). Les paramètres de temps et de nombres de mesures ont été optimisés automatiquement. Les données de polydispersion (PDI, « Polydispersity index ») et de taille ont été visualisées, calculées et moyennées automatiquement à l'aide du logiciel Zetasizer.

5.2. Détermination de la concentration

La technologie NanoFCM a été utilisée pour quantifier les polymersomes obtenus après formulation. Cela a pu être possible grâce à l'aide de Liam Barry-Carroll, post-doctorant dans l'équipe ExoMarQuage du laboratoire NutriNeuro (UMR INRAE 1286). Le Flow NanoAnalyzer est un appareil permettant une caractérisation multiparamétrique de nanoparticules comprises entre 7 et 1000nm. Il combine la diffusion de la lumière ainsi que la détection de fluorescence. Cela permet de détecter au niveau de la particule unique et de déterminer des distributions de tailles de petits objets naturels et synthétiques. Tout d'abord, une calibration à l'aide de petites (40-200nm) ou de grandes (200-1 000nm) billes de silice puis un zéro à l'aide de PBS sont réalisés. Ensuite, une série de dilution des échantillons est analysée afin de trouver la plage d'analyse idéale ($1.10^8 - 1.10^9$ nano/ml). 2 000 à 12 000 événements par minute (min) doivent être collectés pour considérer le résultat comme correct.

6. Modification métabolique des cellules et réaction click avec le FAM-DBCO

Un protocole global de la modification métabolique des cellules ainsi que de la chimie click entre les azides et le FAM-DBCO est décrit ci-dessous. Les différentes conditions testées sont regroupées dans le **Tableau 3**.

Les cellules (JRT3 LES, PBMC ou DOT) ont été cultivées dans leur milieu respectif, en présence de différentes concentrations de sucres azidés ($Ac_4GalNAz$, $Ac_4ManNAz$ ou $Ac_4GlcNAz$ (Carbosynth)) pendant des temps différents. Par la suite, les cellules ont été lavées en tampon FACS (PBS 1X, 0,5% BSA, 2mM EDTA) ou en milieu RPMI simple (milieu RPMI non complété par du SVF, glutamine et PS) avant d'être incubées avec 50 μ M de FAM-DBCO (Lumiprobe) pendant 30min. Les cellules ont été lavées en tampon de FACS ou en milieu RPMI simple et fixées en paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 10min avant d'être marquées avec du 4',6-

Diamidino-2-phénylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma). La chimie click a été observée par microscopie confocale (Leica SP5-AOBS) au LCPO ainsi que par cytométrie en flux avec le cytomètre Canto II (BD Biosciences). Les données obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel Fiji et FlowJo V10.5 respectivement.

Tableau 3 : Optimisations de la modification métabolique et de la réaction click à l'aide d'un DBCO fluorescent.

| Expérience | Type cellulaire | Azido-sucres | [Azido-sucres] | Temps culture avec les azido-sucres | [FAM-DBCO] | Milieu réaction click | Conditions de la réaction click |
|---|-----------------|--|-------------------------|-------------------------------------|------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Gamme de concentration des azido-sucres | JRT3 | Ac ₄ ManNAz | 3, 10, 30, 50, 100, 150 | 24h | 50 | Tampon FACS* | 4°C, 30min |
| Cinétique d'assimilation des 3 azido-sucres | JRT3 | Ac ₄ ManNAz Ac ₄ GalNAz Ac ₄ GlcNAz | 50 | 24, 48 ou 72h | 50 | Tampon FACS* | 4°C, 30min |
| | PBMC | | 30 | | | | |
| Comparaison milieu de réaction click | PBMC | Ac ₄ ManNAz Ac ₄ GalNAz | 30 | 48h | 50 | Tampon FACS* ou milieu RPMI | RT, 30min |
| Vérification de la capacité d'activation des cellules (CD69) | PBMC | Ac ₄ ManNAz Ac ₄ GalNAz | 30 | 48h | 50 | Milieu RPMI simple** | RT, 30min |
| Vérification de l'assimilation des azido-sucres après expansion | DOT | Ac ₄ ManNAz Ac ₄ GalNAz | 30 | 48h | 50 | Milieu RPMI simple** | RT, 30min |
| Vérification de la capacité d'activation des cellules (INF γ) | | | | | | | |
| Analyse de la stabilité des azido-sucres à la surface des DOT | | | | | | | |

*Tampon FACS : Tampon PBS, 0,5% BSA, 2Mm EDTA

** Milieu RPMI non complémenté par du SVF, glutamine et pen/strep

7. Phénotypage des PBMC

Après la réaction avec le FAM-DBCO, les PBMC ont été récoltées et marquées pour observer l'efficacité de la réaction click ainsi que leur viabilité. Les cellules ont été marquées à l'aide des anticorps anti-CD45, anti-CD3, anti-CD4 et anti-TCR $\gamma\delta$ puis à l'aide du DAPI (Sigma) utilisé ici comme marqueur de viabilité cellulaire (**Tableau 4**). Les cellules ont été analysées avec le cytomètre Canto II (BD Biosciences) et les données obtenues à l'aide du logiciel FlowJo V10.5.

8. Activation des cellules après la chimie click

8.1. Activation PMA (phorbol 12-myristate-13-acetate)/Ionomycine

Les PBMC ont été récupérées, cultivées et fonctionnalisées avec du FAM-DBCO comme décrit précédemment. Par la suite, les cellules ont été activées avec 10ng/ml de PMA et 750ng/ml d'Ionomycine pendant 4h à 37°C, lavées, puis marquées à l'aide du panel suivant : anti-CD45, anti-CD3, anti-CD8, anti-Pan $\gamma\delta$, anti-CD69, DAPI (**Tableau 5**). Les cellules ont été analysées avec le cytomètre Canto II (BD Biosciences) et les données obtenues à l'aide du logiciel FlowJo V10.5.

8.2. Activation DOT

Les DOT ont été cultivées et fonctionnalisées avec du FAM-DBCO comme décrit précédemment. Ces cellules ont ensuite été cultivées en plaque 96 puits préalablement coatées avec un anti-CD3 (OKT3, 10 μ g/ml) en milieu RPMI complet pendant 24h à 37°C. Les surnageants de culture ont été récupérés et la sécrétion INF γ a été quantifiée par ELISA.

8.3. ELISA

Les DOT ont été cultivées et fonctionnalisées avec du FAM-DBCO et activées avec un anticorps anti-CD3 (clone OKT3, 10 μ g/ml) comme décrit précédemment. Les concentrations d'INF γ ont été quantifiées dans les surnageants de culture cellulaire par ELISA à l'aide du kit ELISA INF γ humain (Mabtech), conformément aux instructions du fabricant.

9. Élaboration du biohybrid cellules-polymersomes

Un protocole global de chimie click entre les DOT et les polymersomes est décrit ci-dessous. Les différentes conditions testées sont regroupées dans le **Tableau 4**.

Les DOT ont été cultivées et modifiées métaboliquement comme décrit précédemment. Les cellules ont ensuite été lavées en milieu RPMI simple avant d'être incubées avec les polymersomes. Une fois la réaction click terminée, les cellules ont été lavées en milieu RPMI simple et marquées à l'aide d'un marqueur de viabilité cellulaire (Fixable Viability Stain 780, BD Biosciences) en fonction des conditions. Les cellules sont ensuite fixées en PFA 4% pendant

10min et le noyau a été marqué à l'aide du DAPI (Sigma). La chimie click a été observée par microscopie confocale (Leica SP5-AOBS) au LCPO. Les données obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel Fiji.

Tableau 4 : Mise en œuvre du biohybride « DOT – polymersomes.

| Expérience | Type de polymersome | Taille (nm) et Nombre (polymersome/ml) | Formulation | Ratio polymersome / cellule | T° réaction click | Temps réaction click |
|--|--|--|------------------|-----------------------------|-------------------|----------------------|
| Evaluation de l'absence d'internalisation des polymersomes | Pbut-PEG 2% Rhodamine B | 100 : $3,23.10^{10}$ | Electroformation | 10, 100, 1000 / 1 | RT | 30min ou 2h en P96U |
| | | 300 : $1,01.10^{10}$ | | | | |
| | | 1000 : $1,71.10^{10}$ | | | | |
| | | 5000, pas de comptage | | | | |
| Optimisation du polymersome | Pbut-PEG-fluorescéine 10% DBCO-NHS | 100 : $1,34.10^9$ | Electroformation | 10, 100, 1000 / 1 | RT | 30min ou 2h en P96U |
| | | 400 : $2,83.10^9$ | | | | |
| Optimisation de l'interaction cellules-polymersomes | Pbut-PEG-fluorescéine 20% DBCO-NHS | 200 : $2,2.10^{10}$ | Double émulsion | 10, 100, 1000 / 1 | RT | 30min ou 2h en P96V |
| | | 1000 : $1,29.10^{10}$ | | | | |
| | Pbut-PEG-fluorescéine 20% DBCO-PEG ₅ -NHS | 200 : $3,02.10^{10}$ | | | | |
| Optimisation du ratio cellules-polymersomes | Pbut-PEG-fluorescéine 20% DBCO-NHS | 200 : $5,11.10^{10}$ | Double émulsion | 100, 1000 / 1 | 37°C | 2h ou 4h en P96V |
| | | | | 1000 / 1 | | |
| | | | | 1000, 3000, 10 000 / 1 | 37°C | 4h en P96V |

Toutes les réaction click ont été réalisées dans un milieu RPMI simple = Milieu RPMI non complété par du SVF, glutamine et P/S

Les cellules (JRT3 ou DOT) ont été incubées uniquement avec l'Ac₄ManNAz

P96U : plaque 96 puits à fonds ronds, P96V : plaque 96 puits à fonds coniques

10. Microscopie confocale

Les images de microscopie confocale à balayage laser ont été acquises sur un microscope inversé Leica TCS SP5 équipé d'un objectif à immersion d'huile HCX PL APO 63x, NA 1,4 en mode fluorescence. Les cellules en suspension (100µl) ont été placées dans des puits de 300µl non traités (IBIDI) et observées après sédimentation.

Les réglages des sorties des lasers ainsi que des photomultiplicateurs ont été optimisés comme suit : Le DAPI a été excité avec une diode laser à 405nm (12,5%) et sa fluorescence mesurée sur une fenêtre d'émission allant de 410 nm à 490nm, le FITC a été excité avec un laser Argon à 488nm (20%) tandis que son émission a été collectée sur une gamme allant de 500 à 570nm et le FVS 780 a été excité à 633nm avec un laser Hélium-Néon (50%) et son émission collectée entre 705-800nm. Les cellules ont été observées avec un laser Hélium-

Néon à 633nm (10%) en mode transmission. Toutes les images ont été collectées à l'aide du microscope en mode séquentiel pour éviter la superposition des spectres d'émission avec un format de 512*512 pixels. Afin d'évaluer en 3D la distribution des polymersomes fluorescents sur la membrane, une série de 30 à 40 images couvrant une profondeur de 15 à 20µm a été enregistrée à 600Hz. Le traitement des images de fluorescence et la reconstruction 3D ont été réalisés à l'aide du logiciel FIJI ImageJ. Les configurations de gain et d'offset des photomultiplicateurs ont été effectuées sur les cellules de contrôle afin de corriger le signal d'auto-fluorescence vert. Les images obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel Fiji.

11. Analyses statistiques

Les données ont été analysées à l'aide du logiciels GraphPad Prism 10.1. La normalité des données a été vérifiée à l'aide du teste de Shapiro-Wilk. Les données suivant la loi normale ont été analysées à l'aide d'une one-way ou two-way ANOVA ou d'un test t paramétrique ou multiparamétrique. Les données ne suivant pas la loi normale ont été analysées à l'aide des tests de Wilcoxon ou de Mann-Whitney en fonction de la caractéristique recherchée. Une significativité statistique a été considérée lorsque $*p < 0,05$.

12. Tableaux des réactifs

La liste des anticorps (expansion DOT, phénotypage PBMC, microscopie confocale) et des réactifs utilisés (modification métabolique et réaction click) sont récapitulés dans le **Tableau** suivant.

Tableau 5 : Liste des réactifs.

| | | Anticorps | Clone | Fournisseurs | Références | Fluorochrome | Dilution / Concentration |
|---------------------------------------|---------------------|------------------------|----------|--------------------|-------------|--------------|-----------------------------|
| Anticorps de cytométrie en flux | Expansion DOT | CD3 | UCHT1 | BD Biolegend | 560365 | V450 | 1/50 ^e |
| | | TCR $\gamma\delta$ | REA591 | Miltenyi | 130-113-512 | PE | 1/50 ^e |
| | | TCR V δ 1 | REA173 | Miltenyi | 130-118-362 | FITC | 1/50 ^e |
| | | TCR V δ 2 | REA771 | Miltenyi | 130-111-012 | PE-Vio770 | 1/100 ^e |
| | | TCR $\alpha\beta$ | REA652 | BD Biolegend | 130-114-061 | APC | 1/50 ^e |
| | | FVS780 | | | | APC-Cy7 | 1/2500 ^e |
| | Phénotypage PBMC | CD45 | J33 | Beckman | IM3548 | PC7 | 1/50 ^e |
| | | | J33 | Coulter | A07785 | PC5 | 1/50 ^e |
| | | CD3 | SK7 | BD Bioscience | 560176 | APC-H7 | 1/25 ^e |
| | | CD4 | M-T466 | Miltenyi | 130-113-254 | PE | 1/50 ^e |
| | | CD8 | RPA-T8 | BD Bioscience | 557746 | PC7 | 1/50 ^e |
| | | TCR $\gamma\delta$ | 11F2 | Miltenyi | 130-113-500 | APC | 1/50 ^e |
| | | CD69 | TP1.55.3 | Beckman Coulter | IM1943U | PE | 1/10 ^e |
| | | DAPI | | Invitrogen | D1306 | Pacific blue | 1/2000 ^e |
| | | | | | | | |
| Réactifs d'expansion | | IL-4 | | Peptotech | 200-04 | | 100ng/mL |
| | | IL-15 | | Peptotech | 200-15 | | 70ng/mL |
| | | IL-21 | | Peptotech | 200-21 | | 7ng/mL |
| | | IL-1 β | | Peptotech | 200-01B | | 15ng/mL |
| | | IFN γ | | Peptotech | 300-02 | | 70ng/mL |
| | | CD3 | OKT-3 | BD Biolegend | 317326 | | 1 μ g/mL |
| | | | | | | | |
| Réactifs réaction click | | FAM-DBCO | | Lumiprobe | 251F0 | Fluorescéine | 50 μ M |
| | | DAPI | | Invitrogen | D1306 | Pacific blue | 1/2000 ^e |
| | | FVS780 | | | | APC-Cy7 | 1/2500 ^e |
| | | Ac ₄ ManNAz | | Carbosynth | MA46004 | | |
| | | Ac ₄ GalNAz | | Carbosynth | MA46005 | | |
| | | Ac ₄ GlcNAz | | Carbosynth | MA46003 | | |

Résultats

1. Optimisation de la modification métabolique et de la réaction click à l'aide d'un DBCO fluorescent

Le développement de notre biohybride repose sur le couplage des polymersomes à la membrane cellulaire. Ce couplage s'effectue *via* la réaction click (SPAAC) entre les résidus azides (N_3), présents à la surface des glycanes cellulaires après modification métabolique, et le dibenzocyclooctyne (DBCO) présent à la surface des polymersomes (**Figure 24**). Initialement, nous avons voulu mettre en place le protocole permettant de réaliser cette réaction N_3 -DBCO en testant des azido-sucres pouvant s'intégrer efficacement au métabolisme cellulaire afin d'obtenir des azides libres sur les glycanes de surface. Un DBCO fluorescent (FAM-DBCO) a été utilisé en tant que rapporteur de ces azides et de la liaison suite à la réaction click. Ces étapes sont nécessaires à la création des conditions basiques optimales pour la future incorporation des polymersomes produits par le LCPO.

1.1. Utilisation d'une lignée cellulaire Jurkat : les JRT3 LES

Les JRT3 LES ont été utilisées comme modèle de $LT\gamma\delta$ dans le but de réaliser les premières optimisations du protocole de réaction click du fait de leur culture plus aisée comparé aux cellules primaires. Ces cellules sont une lignée cellulaire immortalisée et modifiée de $LT\ CD4^+$ exprimant un TCR $V\gamma 4V\delta 5$. Elles ont été générées à partir de la lignée de lymphome T J.RT3-T3.5 (ATCC) en les transduisant avec un vecteur lentiviral exprimant le TCR $V\gamma 4V\delta 5$ isolé à partir du clone T LES (dérivé d'un patient transplanté infecté par le CMV) spécifique de l'antigène EPCR [141]. Leur expression d'un TCR $\gamma\delta$ non- $\delta 2$ nous a permis d'obtenir des résultats préliminaires sur leur capacité d'activation avant de passer sur notre modèle d'intérêt, les $LT\ \delta 1$ aussi appelés DOT pour « Delta-one T cell ».

1.1.1. Cinétique d'assimilation des trois azido-sucres d'intérêt : l' $Ac_4GlcNAz$, l' $Ac_4GalNAz$ et l' $Ac_4ManNAz$

La capacité des cellules à assimiler les azido-sucres ainsi qu'à les intégrer dans leur métabolisme afin d'exprimer un azide à la surface de leurs glycanes a été étudiée à l'aide de

trois candidats : l'Ac₄GlcNAz formé à partir de glucose, l'Ac₄ManNAz à partir de mannose et l'Ac₄GalNAz à partir de galactose (**Figure 13**). Ces azido-sucres sont sous forme tétra-acétylée, assurant leur entrée dans les cellules par diffusion passive. Ils sont par la suite désacétylés par des estérases cytosoliques naturelles afin d'être métabolisés par les cellules. Le GlcNAz est connu pour être retrouvé au niveau des glycoprotéines nucléaires et cytoplasmiques qui portent habituellement des résidus β-O-GlcNAc (**Figure 14**). Le ManNAz peut intégrer la voie de l'acide sialique, composant essentiel localisé en bout des glycanes de surface. Il est impliqué dans de nombreux processus et interactions cellulaires, ce qui explique leur potentiel pour ce protocole (**Figure 15**). Le GalNAz, lui, est un substitut du GalNAc se trouvant dans le processus d'O-glycosylation de type mucine des protéines sécrétées. De plus, une partie du GalNAz peut être converti en ManNAz, par l'intermédiaire UDP-GalNAz, mais aussi en GlcNAz, par de l'intermédiaire métabolique UDP-GalNAz en UDP-GlcNAz (**Figure 16**).

Tout d'abord, nous avons cherché à identifier le temps nécessaire à l'assimilation des différents azido-sucres par le métabolisme cellulaire. Basé sur les études de Saxon *et al.* et Tomas et Gibson [62], [107], les JRT3 LES ont été cultivées pendant 24, 48 ou 72h avec 50μM d'azido-sucres avant d'être incubées avec 50μM de FAM-DBCO pendant 30min en tampon FACS à 4°C (**Figure 25A**). Cette seconde incubation, qui correspond à la réaction click, révèle la présence d'azides à la surface par cytométrie en flux. En effet, une bonne assimilation des sucres permet une forte présence d'azides à la surface des glycanes des cellules et donc une fluorescence intense. La viabilité a également été évaluée à l'aide d'un marquage DAPI.

Ces premiers tests montrent que l'assimilation des azido-sucres engendre une forte mortalité cellulaire après 48 et 72h de culture quel que soit l'azido-sucre (**Figure 25C**). Cependant, cette diminution reste faible pour 24h de culture et n'est significative que pour la culture avec l'Ac₄GlcNAz (**Figure 25C**). De plus, l'intensité de fluorescence du FAM-DBCO, représentant l'efficacité de la réaction click entre l'azide et le DBCO, est significativement augmentée après 24h et 48h de culture pour l'Ac₄GalNAz et l'Ac₄ManNAz (**Figure 25B, D**). Cela traduit une prise en charge de ces azido-sucres par le métabolisme des JRT3 LES et donc une présentation efficace des azides libres à la surface cellulaire. Cependant, nous pouvons noter une augmentation de fluorescence du FAM-DBCO pour 72h d'incubation qui correspondrait à l'auto-fluorescence ces cellules mortes. L'ensemble de ces résultats indique qu'une culture de

24h en présence des azido-sucre semble être le meilleur compromis pour les JRT3 LES. Nous avons donc décidé de conserver ces conditions pour la suite.

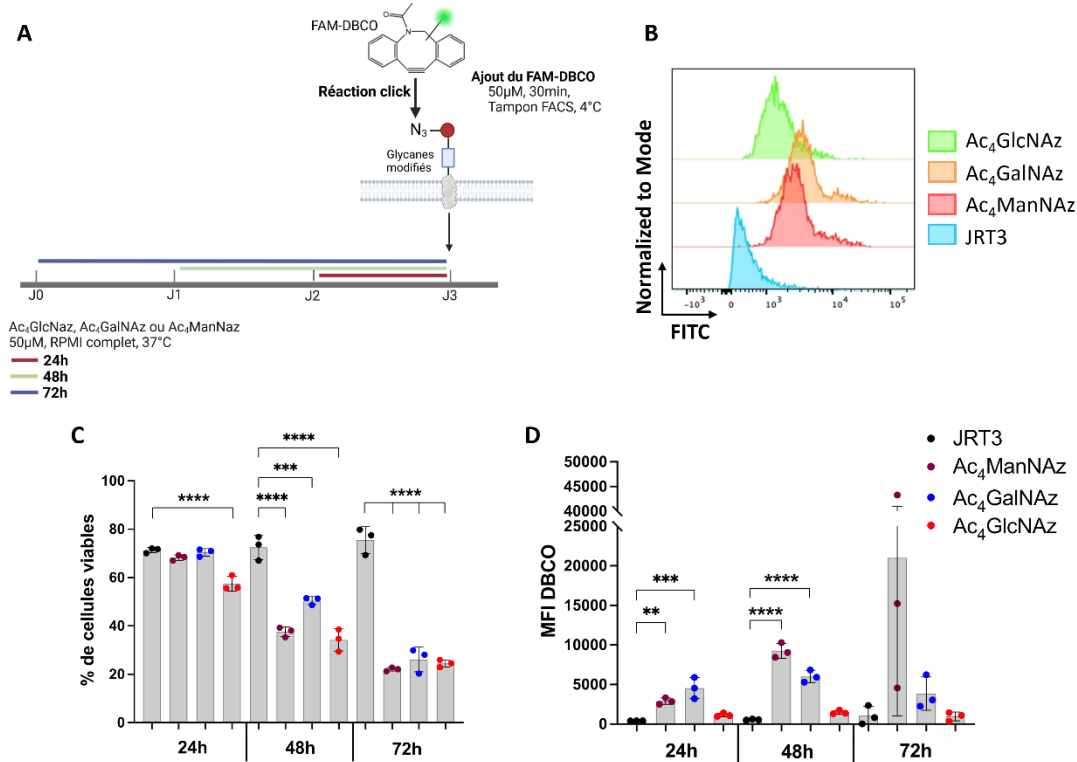


Figure 25 : Cinétique d’assimilation des azido-sucre Ac₄GlcNAz, Ac₄GalNAz et Ac₄ManNAz par les JRT3 LES et réaction click avec le FAM-DBCO.

500 000 JRT3 LES ont été cultivées en présence d’Ac₄GlcNAz, d’Ac₄GalNAz ou d’Ac₄ManNAz (50µM, 24, 48 ou 72h) puis ont été incubées avec le FAM-DBCO (50µM, 30min, tampon FACS, 4°C). Le schéma expérimental est représenté en (A). Leur viabilité cellulaire (C) ainsi que la réaction click (B et D) ont été analysées par cytométrie en flux. Les données ont été obtenues à partir de 3 répliques biologiques et sont présentées sous forme de moyenne ± SEM. La significativité a été déterminée par ANOVA ou *p≤0,05, **p≤0,01 et ***p≤0,005.

1.1.2. Optimisation de la concentration des azido-sucre

Afin de déterminer la concentration d’azido-sucre optimale pour une meilleure efficacité de la réaction click tout en conservant une bonne viabilité cellulaire, une gamme de 3µM à 150µM a été réalisée, basée sur celle utilisée par Saxon et Bertozzi [62]. D’après nos résultats précédents, les JRT3 LES ont été cultivées 24h avec les différentes concentrations d’azido-sucre puis ont été incubées avec 50µM de FAM-DBCO pendant 30min en tampon de FACS à 4°C (**Figure 26A**). Comme montré en **Figure 26B**, l’incorporation d’Ac₄GlcNAz augmente la mortalité cellulaire de façon plus importante que celle de l’Ac₄GalNAz et de l’Ac₄ManNAz, avec une augmentation significative dès 30µM. En ce qui concerne la réaction click avec le FAM-

DBCO, la **Figure 26C** nous montre une augmentation significative de la fluorescence pour l'Ac₄ManNAz quelle que soit la concentration utilisée et pour l'Ac₄GalNAz jusqu'à 100µM. Cette augmentation n'est pas observée dans le cas de l'Ac₄GlcNAz. Du fait de la forte mortalité ainsi que de cette faible réactivité avec le FAM-DBCO, l'Ac₄GlcNAz a été écarté.

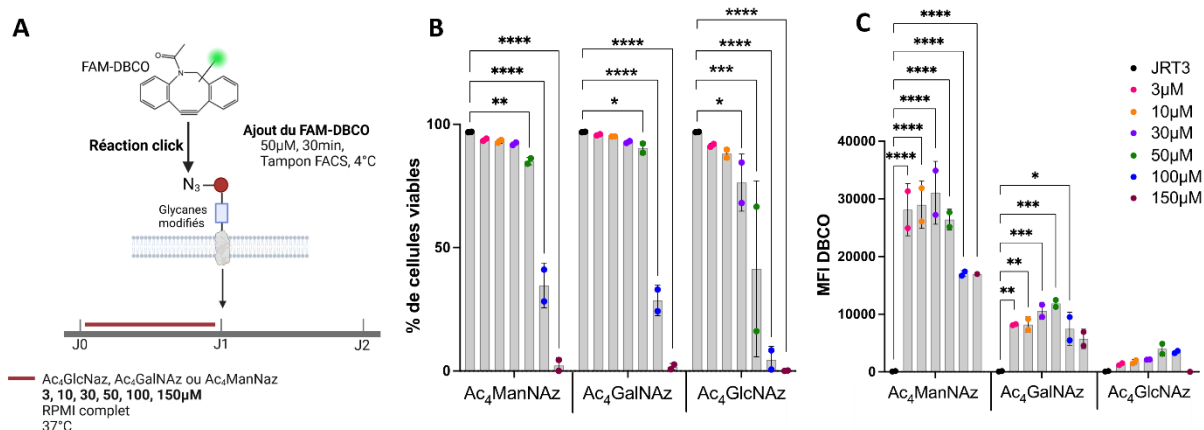


Figure 26 : Gamme de concentration des trois azido-sucres Ac₄GlcNAz, Ac₄GalNAz et Ac₄ManNAz sur les JRT3 LES et réaction click avec le FAM-DBCO.

500 000 JRT3 LES ont été cultivées en présence d'Ac₄GlcNAz, d'Ac₄GalNAz ou d'Ac₄ManNAz (3-150µM, 24h) puis ont été incubées avec le FAM-DBCO (50µM, 30min, tampon FACS, 4°C). Le schéma expérimental est représenté en (A). Leur viabilité cellulaire (B) ainsi que la réaction click (C) ont été analysées par cytométrie en flux. Les valeurs ont été représentées comme les moyennes ± SEM de deux expériences indépendantes réalisées avec trois réplicas par condition. La significativité a été déterminée par ANOVA ou *p≤0,05, **p≤0,01 et ***p≤0,005.

Au vu de la faible mortalité engendrée et de l'efficacité de la réaction click avec 30 et 50µM d'Ac₄GalNAz et d'Ac₄ManNAz, ces deux concentrations ont été retenues et une expérience de validation les comparant a été réalisée (**Figure 27A**). De plus, la présence du FAM-DBCO à la surface des cellules est primordiale pour la suite des expériences comprenant les polymersomes. En effet, une fluorescence cytoplasmique indiquerait une internalisation des azides ou du FAM-DBCO et donc une potentielle incapacité à interagir avec les polymersomes ou une internalisation de ces derniers à la suite de la réaction. Cette présence à la surface a donc été évaluée par microscopie confocale. Enfin, la culture des cellules sans azido-sucres mais incubées avec FAM-DBCO permet de confirmer que cette interaction azide-DBCO est spécifique en éliminant la potentielle fluorescence non spécifique du FAM-DBCO.

Une augmentation de la MFI est observée dès la concentration de 30µM pour les deux azido-sucres en comparaison au signal non spécifique (**Figure 27B**). De façon intéressante, cette interaction apparaît spécifique entre l'azide et le DBCO, comme le montre l'absence de

fluorescence membranaire lorsque les cellules ne sont pas cultivées avec les sucres (**Figure 27C**). De plus, elle semble se faire uniquement à la surface des cellules viables (**Figure 27D**). Une internalisation du FAM-DBCO peut être observée dans les cellules semblant morphologiquement non viables à l'aide de la colocalisation du DAPI et de la fluorescéine. En conclusion, l'utilisation de la concentration de $30\mu\text{M}$ pendant 24h serait suffisante pour avoir une réaction efficace et limiterait la potentielle toxicité du composé chimique.

Ces expériences nous ont permis d'établir les conditions de culture basiques pour la suite des expérimentations : $30\mu\text{M}$ d' Ac_4ManNAz ou d' Ac_4GalNAz pendant 24h en milieu RPMI complet à 37°C puis une réaction click avec $50\mu\text{M}$ de FAM-DBCO pendant 30min en tampon FACS à 4°C .

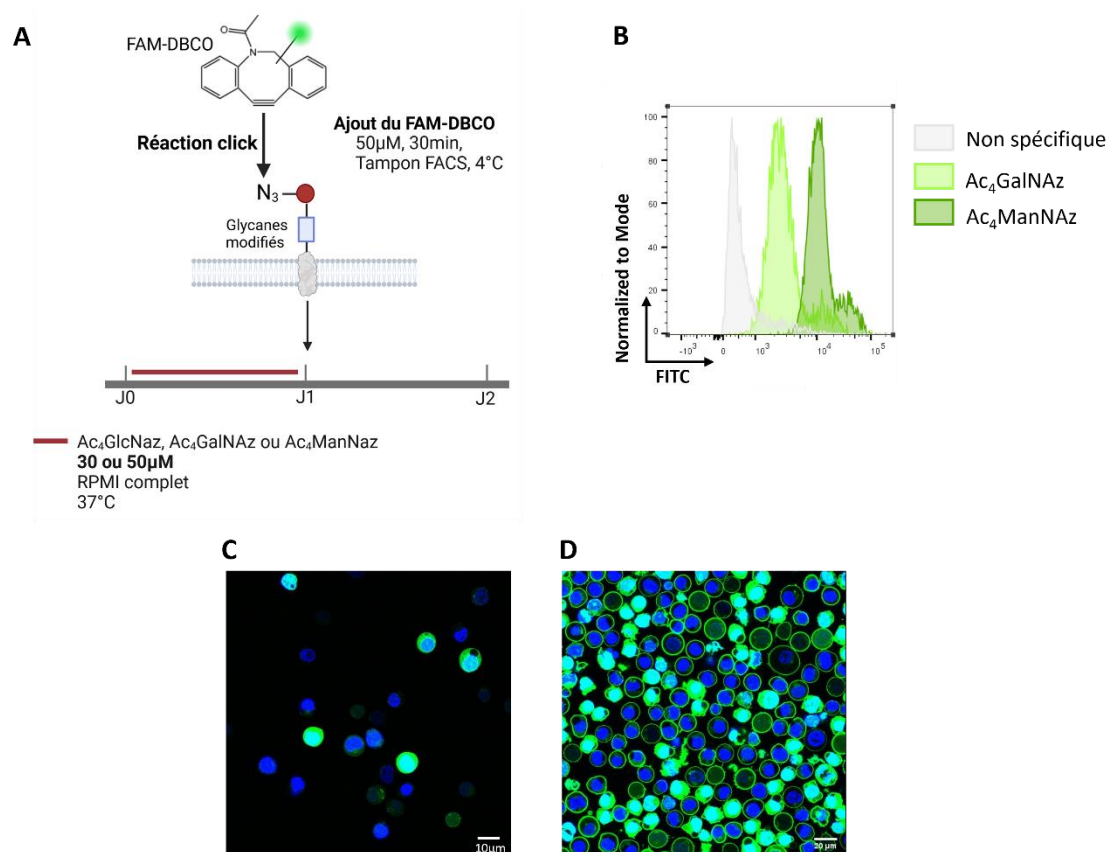


Figure 27 : Comparaison d'efficacité de deux concentrations d' Ac_4GalNAz et d' Ac_4ManNAz (30 et $50\mu\text{M}$) sur les JRT3 LES et réaction click avec le FAM-DBCO.

500 000 JRT3 LES ont été cultivées en présence d' Ac_4GalNAz ou d' Ac_4ManNAz (30 ou $50\mu\text{M}$, 24h) puis ont été incubées avec le FAM-DBCO ($50\mu\text{M}$, 30min, tampon FACS, 4°C). Le schéma expérimental est représenté en (A). La réaction click a été analysée par cytométrie en flux et par microscopie confocale. L'histogramme représente les résultats obtenus en cytométrie en flux pour la culture avec $30\mu\text{M}$ d' Ac_4GalNAz et d' Ac_4ManNAz (B). Les images de microscopie confocale représentent les résultats obtenus lors de la culture sans sucre (C) ou avec $30\mu\text{M}$ d' Ac_4ManNAz (D). Echelle : $20\mu\text{m}$.

1.1.3. Vérification de la capacité d'activation des JRT3 LES

Lors de ce projet, nous visons à développer un biohybride à partir de LT. Le maintien de la capacité d'activation de ces cellules après incorporation des azido-sucres et la réaction click avec le FAM-DBCO est donc un paramètre critique. En effet, le métabolisme des cellules pourrait être impacté par la présence d'azido-sucres au niveau des voies métaboliques. De plus, la liaison du FAM-DBCO à la membrane pourrait physiquement impacter l'interaction antigène-anticorps au niveau du TCR par encombrement stérique. Afin de tester l'impact potentiel de ces modifications, nous avons mimé (partiellement) la stimulation des LT par les cellules présentatrices d'antigène à l'aide d'un anticorps anti-CD3 permettant leur activation *via* leur TCR. L'activation est mesurée en cytométrie en flux par l'intermédiaire de l'expression du marqueur CD69. Ce dernier est un marqueur très précoce de l'activation des lymphocytes. Ce marqueur est fréquemment utilisé car l'expression transcriptionnelle du gène peut être détectée après 30min d'activation et l'expression de sa protéine dès 2-3heures ce qui le rend détectable rapidement [270].

Afin de limiter un potentiel stress cellulaire dû au changement de température et de milieu entre la réaction click (tampon FACS, 4°C) et l'activation (milieu RPMI complet, 37°C), nous avons décidé de modifier le protocole et de réaliser la réaction click en milieu RPMI simple à température ambiante (Room temperature = RT). Nous avons donc voulu vérifier que ce changement de condition n'impactait pas l'interaction N₃-DBCO en comparant la MFI du FAM-DBCO entre les deux conditions d'incubation (**Figure 28A**). Une augmentation significative de la MFI du FAM-DBCO est visible après incubation avec les nouvelles conditions (RPMI simple, RT) comparé aux anciennes (FACS, 4°C), et ce pour les deux azido-sucres étudiés (**Figure 28**). Cette augmentation est d'autant plus importante (x4) après culture avec l'Ac₄ManNAz. Cette optimisation a permis de mettre au point un nouveau protocole : 24h d'incubation avec 30µM d'azido-sucres (Ac₄GalNAz ou Ac₄ManNAz) en milieu RPMI complet à 37°C puis réaction click à l'aide de 50µM de FAM-DBCO en milieu RPMI simple à RT pendant 30min.

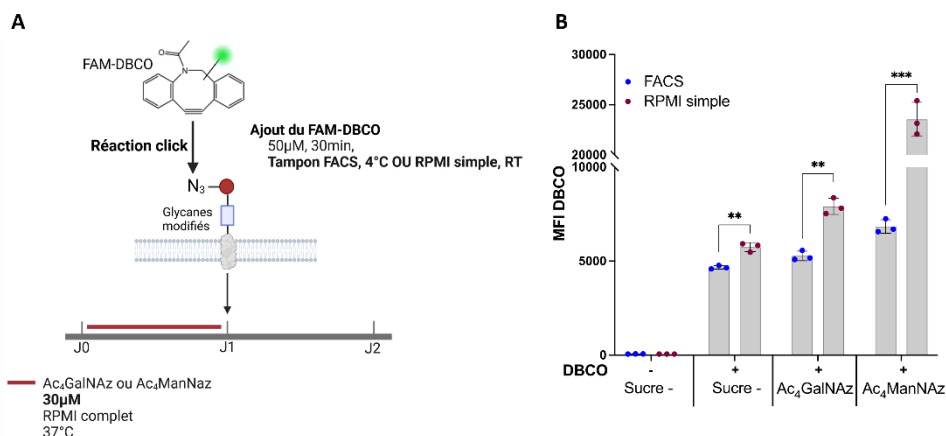


Figure 28 : Comparaison de l'efficacité de la réaction click après incubation en tampon FACS ou en milieu RPMI simple.

Les JRT3 LES ont été cultivées en présence d'Ac₄GalNAz ou d'Ac₄ManNAz (30µM, 24h) puis ont été incubées avec le FAM-DBCO (50µM, 30min) en tampon FACS ou en milieu RPMI simple. Le schéma expérimental est représenté en (A). La réaction click a été analysée par cytométrie en flux (B). RT : Température ambiante. Les données ont été obtenues à partir de 3 répliques biologiques et sont présentées sous forme de moyenne ± SEM. La significativité a été déterminée par un test t multiparamétrique ou * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ et *** $p \leq 0,005$.

Une fois cette validation effectuée, nous avons testé la capacité d'activation des JRT3 LES. Ici, les cellules ont été cultivées comme décrit précédemment puis activées pendant 4h avec un anticorps anti-CD3 (clone OKT3) (**Figure 29A**). Comme montré en **Figure 29B**, l'activation des JRT3 LES par un anticorps anti-CD3 ainsi que la modification des conditions d'incubation avec le FAM-DBCO n'a aucune incidence sur la viabilité cellulaire. En comparaison à l'expression basale de CD69 observée en condition contrôle (NA, Sucre -, DBCO -), l'activation des cellules par l'anticorps anti-CD3 entraîne une augmentation significative de cette expression dans la condition sans azido-sucre ni DBCO (A, Sucre -, DBCO -). Cette dernière reste constante même après l'ajout d'Ac₄ManNAz ou d'Ac₄GalNAz et/ou du FAM-DBCO (**Figure 29C**). En effet, il n'y a pas de différence significative d'expression du CD69 entre toutes les conditions activées. Cela indique donc que la capacité d'activation des JRT3 LES n'est pas impactée par l'incorporation des azido-sucres dans le métabolisme ou par la réaction click avec le FAM-DBCO. De plus, en se basant sur la MFI du FAM-DBCO de la condition non spécifique, c'est-à-dire sans azido-sucre avec le FAM-DBCO (A, Sucre - DBCO +), on observe une augmentation de cette intensité de fluorescence après ajout d'Ac₄GalNAz ou d'Ac₄ManNAz (**Figure 29D**). L'incorporation des azido-sucres ainsi que la réaction ne semblent donc pas altérer les capacités d'activation des JRT3 LES et ces dernières conservent le FAM-DBCO à leur surface même après avoir été activées. Ces résultats indiquent que les cellules, une fois couplées avec les polymersomes,

seraient capables de conserver les vésicules à leur surface après activation afin de les emmener sur les sites d'intérêt.

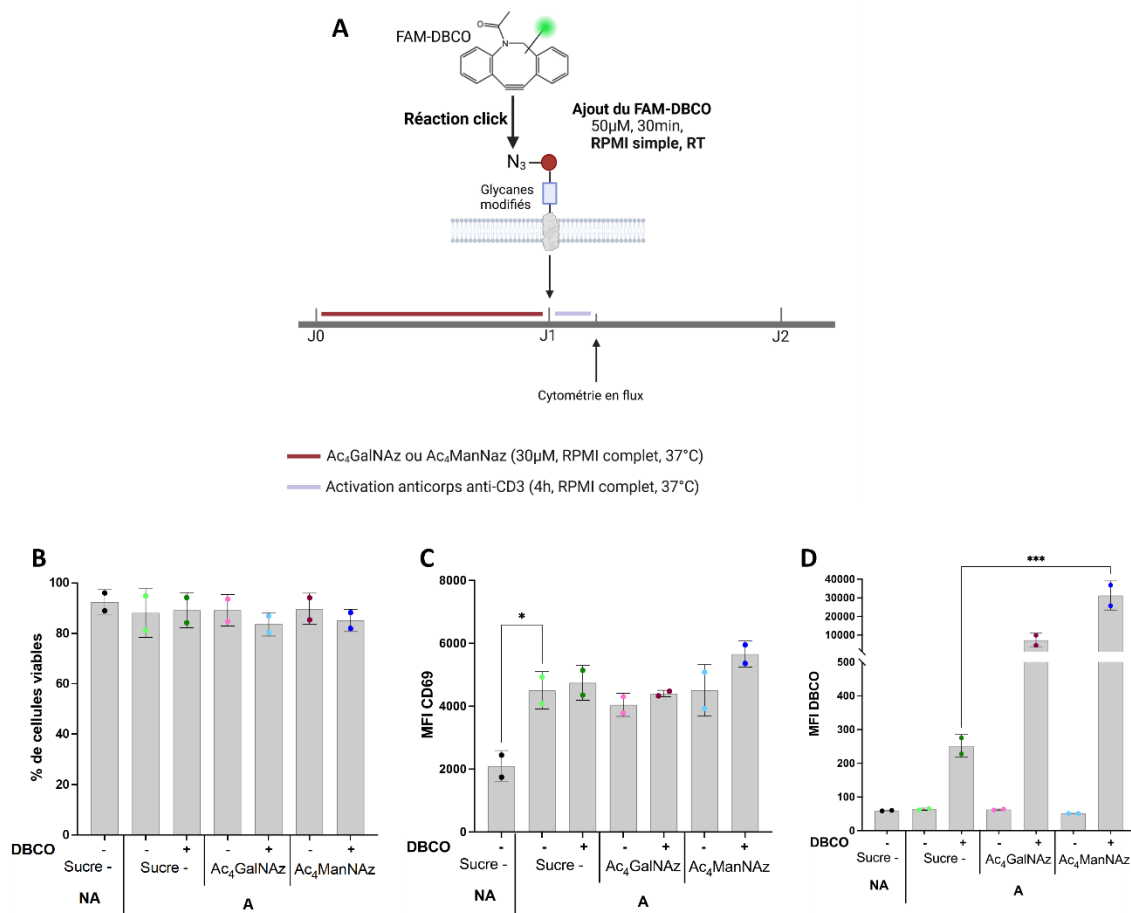


Figure 29 : Quantification de l'expression du CD69 par les JRT3 LES après la réaction click avec le FAM-DBCO.

200 000 JRT3 LES ont été cultivées en présence d'Ac₄GalNAz ou d'Ac₄ManNAz (30µM, 24h) puis ont été incubées avec le FAM-DBCO (50µM, 30min, RPMI simple). Les cellules ont ensuite été activées à l'aide d'un anticorps anti-CD3 (Clone OKT3, 10µg/ml, 4h). Le schéma expérimental est représenté en (A). Leur viabilité cellulaire (B), l'expression du CD69 membranaire (C) ainsi que la réaction click (D) ont été analysées par cytométrie en flux. Les valeurs ont été représentées comme les moyennes ± SEM de deux expériences indépendantes réalisées avec trois réplicas par condition. La significativité a été déterminée par ANOVA ou *p≤0,05, **p≤0,01 et ***p≤0,005. NA : Non activé, A : activé, RT : Température ambiante.

1.2. Validation du protocole sur un modèle physiologique : les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC)

Afin de valider le développement de cette technique, nous l'avons confirmé sur des PBMC primaires, représentant un modèle physiologique de LT non modifiés tels qu'ils pourraient être utilisés en thérapeutique. L'utilisation de PBMC nous permet aussi d'évaluer la capacité d'adaptation de cette technique sur d'autres cellules immunitaires impliquées dans les

réponses cancéreuses telles que les LB et les cellules NK. Elles seront représentées ici par les cellules non-CD3. En effet, cela pourrait ouvrir la possibilité à de nombreuses autres thérapies utilisant ces différents types cellulaires. Pour cela, des PBMC provenant de donneurs sains ont été isolés de sang total à l'aide d'un milieu de séparation des lymphocytes et les cellules ont été marquées pour identifier les LT et les cellules non-CD3 (**Figure 30**).

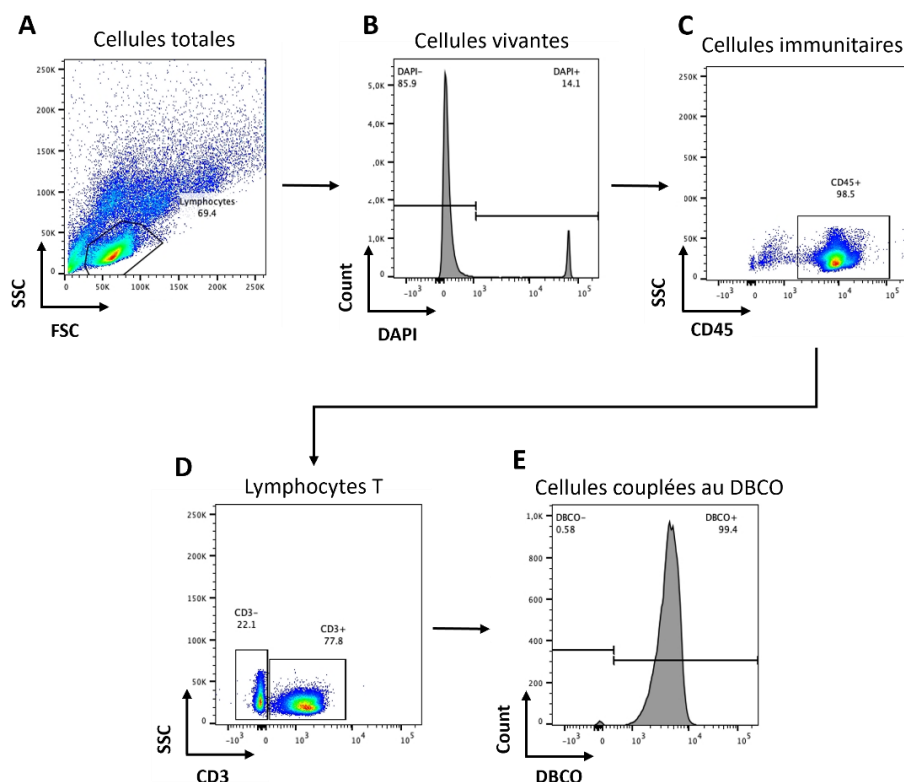


Figure 30 : Stratégie d'analyse des PBMC par cytométrie en flux.

Les PBMC sont analysées en sélectionnant les lymphocytes sur leur morphologie (A). Les cellules non viables sont éliminées grâce au marquage par le DAPI (B), les leucocytes sont sélectionnés grâce au marquage CD45 (C) et les LT sont distingués des autres cellules (essentiellement LB et cellules NK) grâce au marquage CD3 (D). Le marquage par le FAM-DBCO est ensuite évalué sur chacune des populations CD3⁺ et CD3⁻ (E).

1.2.1. Cinétique d'assimilation des deux azido-sucres : l'Ac₄GalNAz et l'Ac₄ManNAz

Il est connu que les lignées cellulaires transformées ont un métabolisme plus actif que les cellules primaires. De plus, ce sont des cellules plus aisées à cultiver mais également plus robustes et donc avec une meilleure capacité d'adaptation aux différentes conditions de culture. Afin de tester la capacité des PBMC à assimiler et à métaboliser les azido-sucres ainsi qu'à exprimer un azide libre sur les extrémités des glycanes de surface, une nouvelle cinétique utilisant l'Ac₄GalNAz et l'Ac₄ManNAz a été réalisée. Les PBMC ont été cultivées pendant 24,

48 ou 72h avec 30µM d'azido-sucre avant d'être incubées avec 50µM FAM-DBCO en milieu RPMI simple à RT (**Figure 31A**). Comme attendu, la viabilité des PBMC est plus affectée par l'ajout des azido-sucre comparé au JRT3 LES mais 72h semble être le temps approprié pour limiter cette mortalité (**Figure 31B**). De façon intéressante, les LT (**Figure 31C**) ainsi que les cellules non-CD3 (**Figure 31D**) sont capables d'interagir avec le FAM-DBCO comme montré par l'augmentation progressive de sa MFI lorsque les azido-sucre sont ajoutés à la culture. Cette augmentation est même significative dès 24h pour la condition contenant l'Ac₄ManNaz. Néanmoins, il n'y a pas de différence significative de réaction click entre 48 et 72h de culture pour les LT et la mortalité reste faible pour les deux conditions. Nous avons donc choisi de conserver 48h de culture pour la suite.

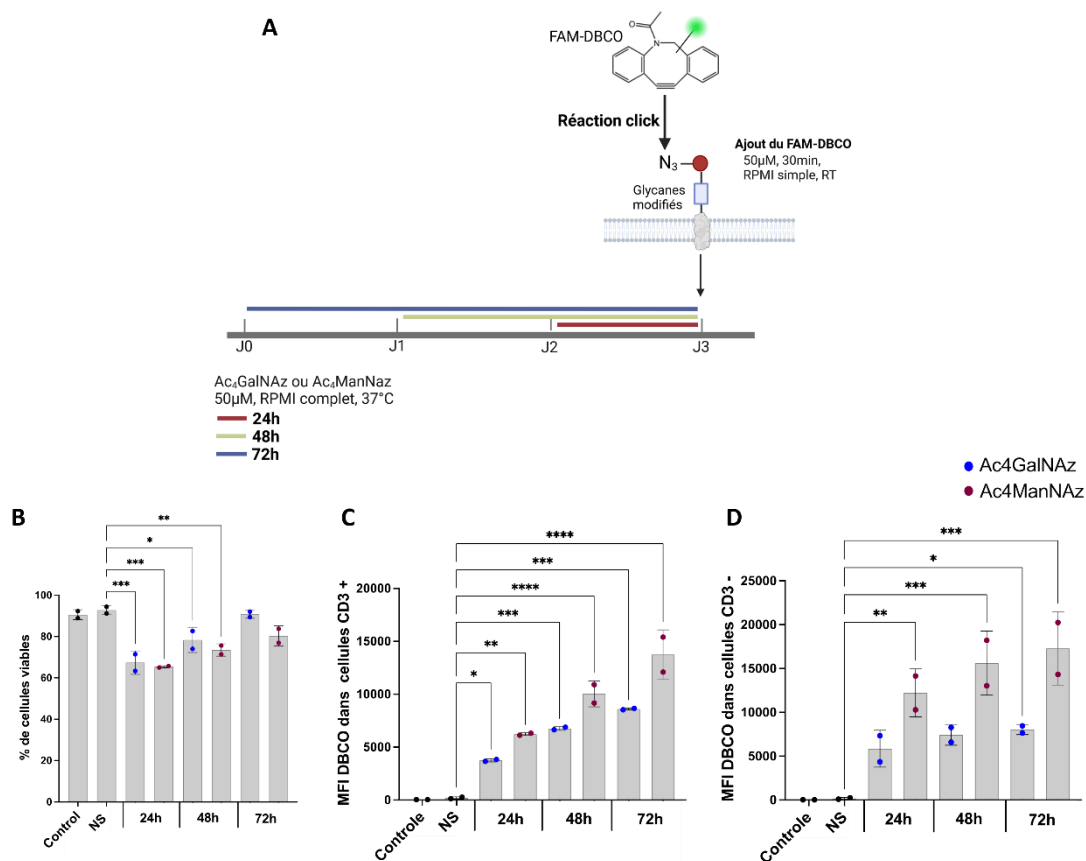


Figure 31 : Cinétique d'assimilation des azido-sucre Ac₄GalNAz et Ac₄ManNAz par les PBMC et réaction click avec le FAM-DBCO.

200 000 PBMC ont été cultivées en présence d'Ac₄GalNAz ou d'Ac₄ManNAz (30µM, 24, 48 ou 72h) puis ont été incubées avec le FAM-DBCO (50µM, 30min, RPMI simple). Le schéma expérimental est représenté en (A). La viabilité des PBMC (B), la réaction click pour les LT (C) ainsi que la réaction click pour les cellules non-CD3 (D) ont été analysées par cytométrie en flux. Les valeurs ont été représentées comme les moyennes ± SEM de deux expériences indépendantes réalisées avec trois réplicas par condition. La significativité a été déterminée par ANOVA ou *p≤0,05, **p≤0,01 et ***p≤0,005.

NS : non spécifique, Sucre - DBCO +, RT : Température ambiante.

1.2.2. Vérification de la capacité d'activation des cellules

Comme pour les JRT3 LES, la capacité d'activation des PBMC a été vérifiée dans le but de confirmer que la modification métabolique avec les azido-sucres ainsi que la réaction click avec le FAM-DBCO n'altèrent pas leur fonction. Pour cela, les cellules ont été cultivées et incubées avec le FAM-DBCO comme déterminé précédemment puis activées à l'aide d'un cocktail de 12-myristate 13-acétate (PMA) (10ng/ml) et d'ionomycine (750ng/ml) pendant 4h (**Figure 32A**). La PMA est un activateur de la Protéine Kinase C tandis que la Ionomycine est un ionophore calcique. L'utilisation de ces deux composés permet de contourner le complexe d'activation, que ce soit le TCR pour les LT, les récepteurs activateurs des cellules NK ou le BCR dans le cas des LB, tout en activant les diverses voies de signalisation associées à ces récepteurs aboutissant donc à l'activation des cellules et à la production de diverses cytokines.

De façon prévisible, la viabilité des PBMC est impactée après activation par le cocktail PMA/Ionomycine mais cette mortalité n'est pas amplifiée avec l'ajout d'azido-sucres ou de DBCO (**Figure 32B**). Toutefois, les LT conservent leur capacité d'activation même après avoir effectué la réaction click avec le FAM-DBCO comme montré par l'augmentation de l'expression du CD69 et de la MFI du FAM-DBCO dans les conditions contenant les azido-sucres et le FAM-DBCO (A, Ac₄GalNAz, DBCO + et A, Ac₄ManNAz, DBCO +) (**Figure 32C**). Cela confirme la capacité des PBMC à intégrer les azido-sucres et à interagir avec le FAM-DBCO comme démontré précédemment. D'autre part, l'activation des PBMC par le cocktail PMA/Ionomycine engendre une augmentation significative de l'expression du CD69 comparé à la condition contrôle (NA, Sucre -, DBCO -). Cette dernière reste constante même après l'ajout d'Ac₄ManNAz ou d'Ac₄GalNAz et/ou du FAM-DBCO (**Figure 32D**). Des résultats similaires sont retrouvés pour les cellules non-CD3 avec une augmentation significative de la MFI du FAM-DBCO en présence d'azido-sucres et de DBCO ainsi qu'une augmentation de l'expression du CD69 après activation quelle que soit la condition de culture regardée (**Figure 32E, F**).

Tous ces résultats nous indiquent que la capacité d'activation des LT ainsi que des cellules non-CD3 n'est pas impactée par l'incorporation des azido-sucres dans le métabolisme ou par la réaction click avec le FAM-DBCO.

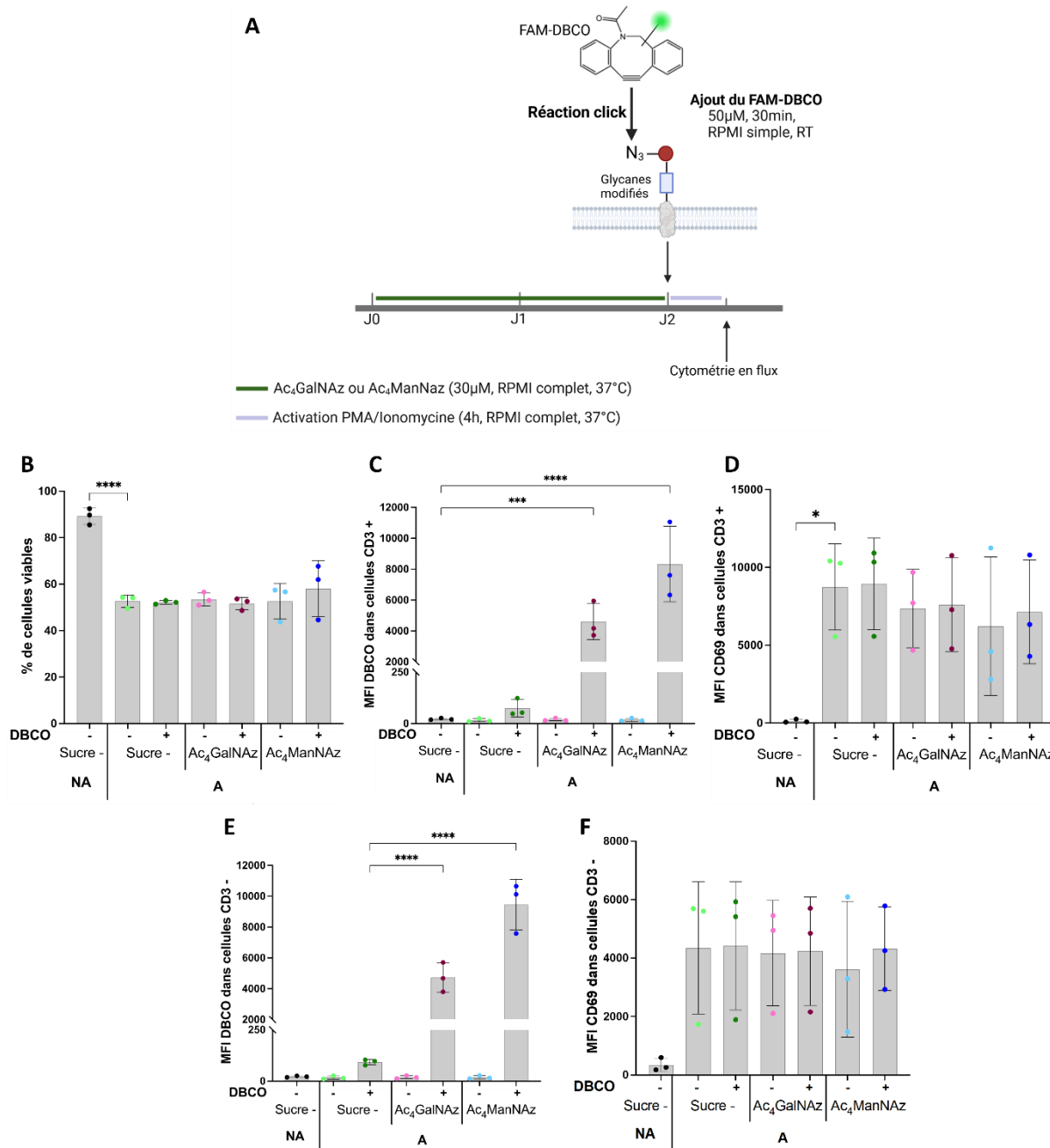


Figure 32 : Quantification de l'expression du CD69 par les PBMC après la réaction click avec le FAM-DBCO.

200 000 PBMC ont été cultivées en présence d'Ac₄GalNAz ou d'Ac₄ManNAz (30µM, 48h) puis ont été incubées avec le FAM-DBCO (50µM, 30min, RPMI simple). Les cellules ont ensuite été activées à l'aide d'un cocktail de PMA (10ng/ml)/Ionomycine (750ng/ml) pendant 4h. Le schéma expérimental est représenté en (A). La viabilité cellulaire des PBMC (B), la réaction click ainsi que l'expression du CD69 pour les LT (C, D) et non-CD3 (E, F) ont été analysées par cytométrie en flux. Les valeurs ont été représentées comme les moyennes ± SEM de trois expériences indépendantes réalisées avec trois réplicas par condition. La significativité a été déterminée par ANOVA ou *p≤0,05, **p≤0,01 et ***p≤0,005.

NA : Non activé, A : activé, RT : Température ambiante.

1.3. Validation du protocole sur le modèle d'intérêt : les lymphocytes T δ 1 (DOT)

Ce projet repose sur l'élaboration d'un biohybride couplant des nanoparticules à la surface de LT non- δ 2 amplifiés *in vitro* également appelés DOT pour « Delta One T cells ». Ce produit cellulaire regroupe des LT V δ 1 et T V δ 3 bien que la majorité possède un TCR V δ 1, d'où leur nom. Les DOT possèdent de nombreuses caractéristiques intéressantes pour une utilisation en thérapie ciblée, c'est pourquoi nous les avons choisies comme modèle pour valider notre technique de couplage. Les LT V δ 1 sont des cellules non-conventionnelles constituées de récepteurs divers les plaçant à la limite du système immunitaire inné et adaptatif. Cela leur permet donc d'effectuer une réponse rapide à l'aide de leurs récepteurs innés, tel que NKG2D, mais également d'avoir une activité cytotoxique par le biais de leur TCR (**Figure 20**). Le protocole de génération des DOT a donc été conçu pour générer en grande quantité et selon un protocole compatible avec des conditions GMP des LT V δ 1 utilisables en clinique. Notre laboratoire a montré la réactivité de ces cellules contre des cellules infectées par le CMV et contre des cellules de GBM. Toutes ces caractéristiques font des DOT un modèle de choix pour notre biohybride. Nous avons donc voulu valider la réaction click à l'aide du FAM-DBCO sur ces cellules.

1.3.1. Résultats de l'expansion des DOT

Le protocole de génération des DOT a été développé par l'équipe de Bruno Silva-Santos [159]. Cette stratégie repose sur une stimulation de PBMC déplétées en LT $\alpha\beta$ avec une combinaison d'agonistes des récepteurs TCR et de cytokines (OKT3, IL-1b, IL-4, IL-15, IL-21, IFN γ) pendant 21 jours (**Figure 33A**). Elle induit l'expansion massive, jusqu'à 60 000 fois plus de cellules, et sélective des LT V δ 1 (**Figures 33B, C**) exprimant *de novo* ou surexprimant plusieurs récepteurs NK (NKp30, NKp44, NKG2D, DNAM-1), tous précédemment identifiés comme des acteurs importants dans le ciblage des cellules tumorales. Elles sont également caractérisées par une augmentation des molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1, CD56) et des récepteurs de chimiokines (CD183/CXCR3, CD196/CCR6 et CX3CR1) suggérant un potentiel élevé de migration et de recirculation entre le sang et les tissus. Pour finir, une diminution des molécules associées à l'exhaustion des cellules (PD-1, CTLA-4) démontre une remarquable "fitness" des cellules DOT [159], [171]. Ces cellules sont actuellement testées comme thérapie

cellulaire adoptive allogénique "prête à l'emploi" dans un essai clinique de phase I en cours de recrutement chez des patients atteints de LMA (NCT05886491).

A la suite de cette amplification les DOT sont cultivées en milieu contenant de l'IL-15 afin de conserver leur caractéristique cytotoxique. En effet, cette cytokine est un facteur clé de différenciation des DOT [157].

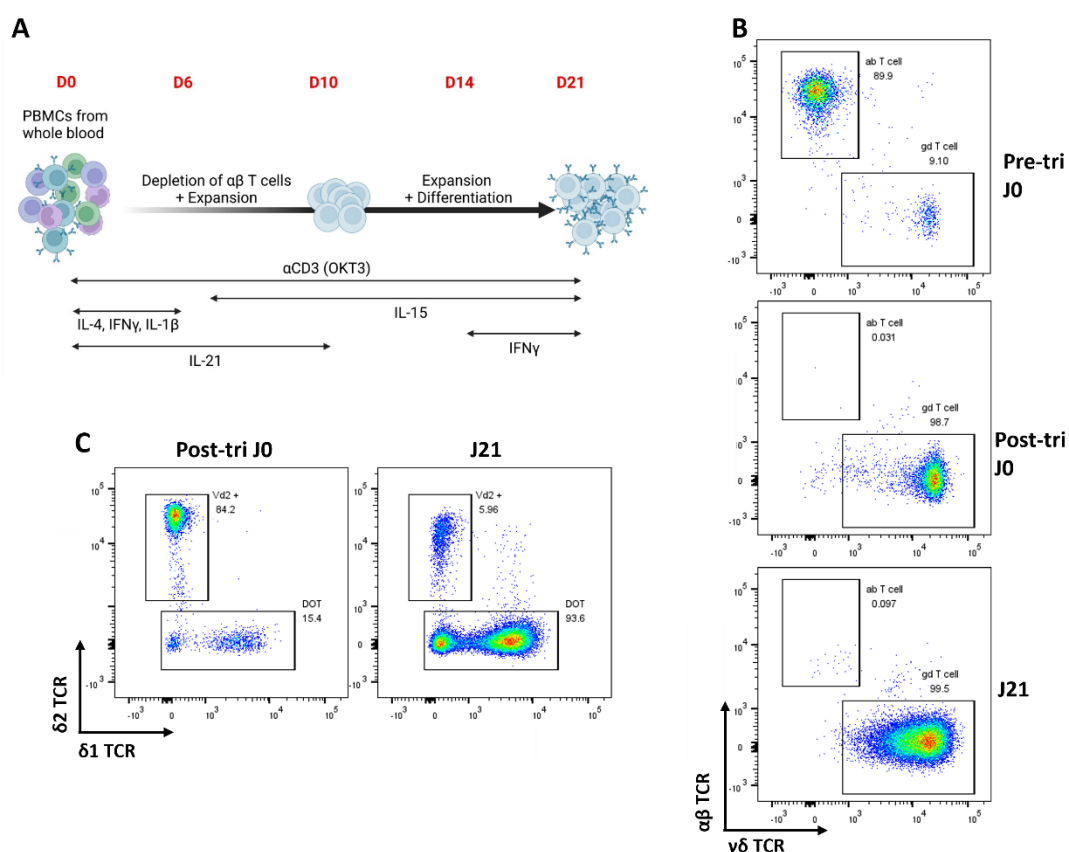


Figure 33 : Phénotypage des DOT avant et après amplification.

Les DOT ont été récupérées à partir de sang total de donneurs sains. Les PBMC ont été isolées et les L $\alpha\beta$ ont été éliminés à l'aide d'un tri cellulaire magnétique. Les PBMC restantes ont été cultivées pendant 21 jours à l'aide d'un protocole développé par l'équipe de Bruno Silva-Santos [159], [171] pour l'expansion des L $\gamma\delta$ V δ 2neg, également appelé DOT, à l'aide d'un cocktail de cytokines. Le schéma expérimental est représenté en (A). L'élimination des L $\alpha\beta$ et l'expansion ont été suivies par cytométrie en flux (B et C).

1.3.2. Vérification de l'assimilation des azido-sucre après expansion

Tout d'abord, il a été primordial de vérifier l'assimilation correcte des azido-sucre Ac₄GalNAz et Ac₄ManNAz par les DOT à la suite du protocole d'expansion. Basé sur les résultats obtenus avec les PBMC, le protocole établi a été utilisé sur les DOT (48h, 30 μ M d'Ac₄GalNAz ou

d'Ac₄ManNAz puis 30min, 50μM de FAM-DBCO en RPMI simple à RT (**Figure 34A**). Les résultats ont été évalués par microscopie confocale et cytométrie en flux.

Les DOT, après les 3 semaines d'amplification, sont capables de métaboliser les azido-sucres et de les présenter à leur surface comme observé en cytométrie en flux (**Figure 34B**). La fluorescence verte est uniquement localisée à leur surface comme attendu, il n'y a donc pas d'internalisation du FAM-DBCO après fixation sur le groupement azide (**Figure 34C(b) et (c)**). La fluorescence détectée dans la condition non spécifique (Sucre -, DBCO +, **Figure 34C(a)**), est probablement due à l'internalisation du FAM-DBCO par les cellules non viables. Une colocalisation avec le noyau, coloré en bleu, est observée dans ce cas (**Figure 34C**). D'autre part, les DOT présentent une plus grande quantité d'azides à leur surface après culture avec l'Ac₄ManNAz par rapport à l'Ac₄GalNAz suggérant une meilleure efficacité d'assimilation de ce sucre par les cellules (**Figure 34B**). Tous ces résultats confirment la capacité des DOT à effectuer la réaction click avec le FAM-DBCO même après les 21 jours d'amplification.

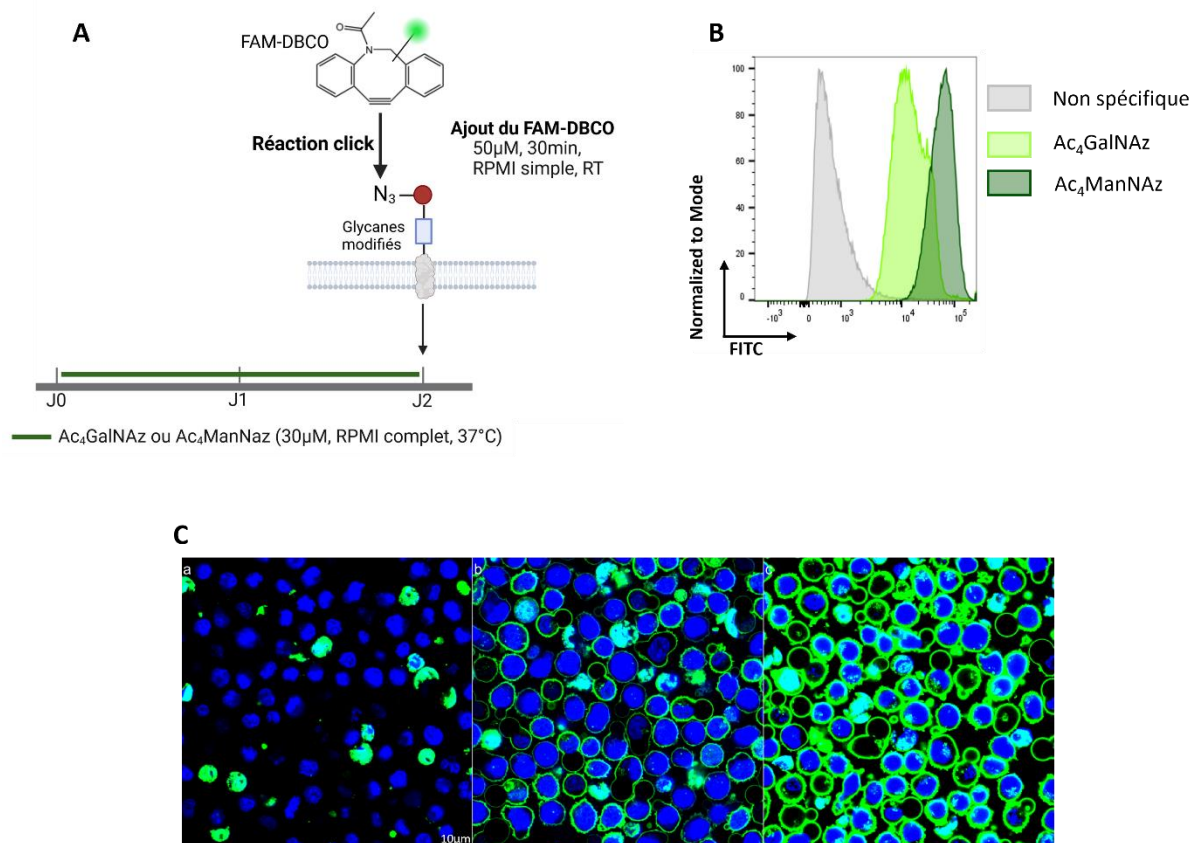


Figure 34 : Fonctionnalisation des DOT avec le FAM-DBCO.

200 000 DOT ont été cultivées en présence d'IL-15 et d'Ac₄GalNAz ou d'Ac₄ManNAz (30μM, 48h) puis ont été incubées avec le FAM-DBCO (50μM, 30min, RPMI simple, RT). Le schéma expérimental est représenté en (A). La réaction click a été analysée par cytométrie en flux (B) et microscopie confocale (C) où (a) correspond à la condition non spécifique (Sucre -, DBCO +), (b) à la culture des cellules avec le Ac₄GalNAz et le (c) avec l'Ac₄ManNAz. RT : Température ambiante, Echelle : 10μm

1.3.3. Analyse de la stabilité des azido-sucres à la surface des DOT

Le statut très activé des cellules DOT pourrait engendrer une dilution des azides disponibles à la surface à cause soit de la division cellulaire soit d'un métabolisme important conduisant au remplacement rapide des sucres de surface. Nous avons donc analysé le temps de conservation des azides à la surface des cellules.

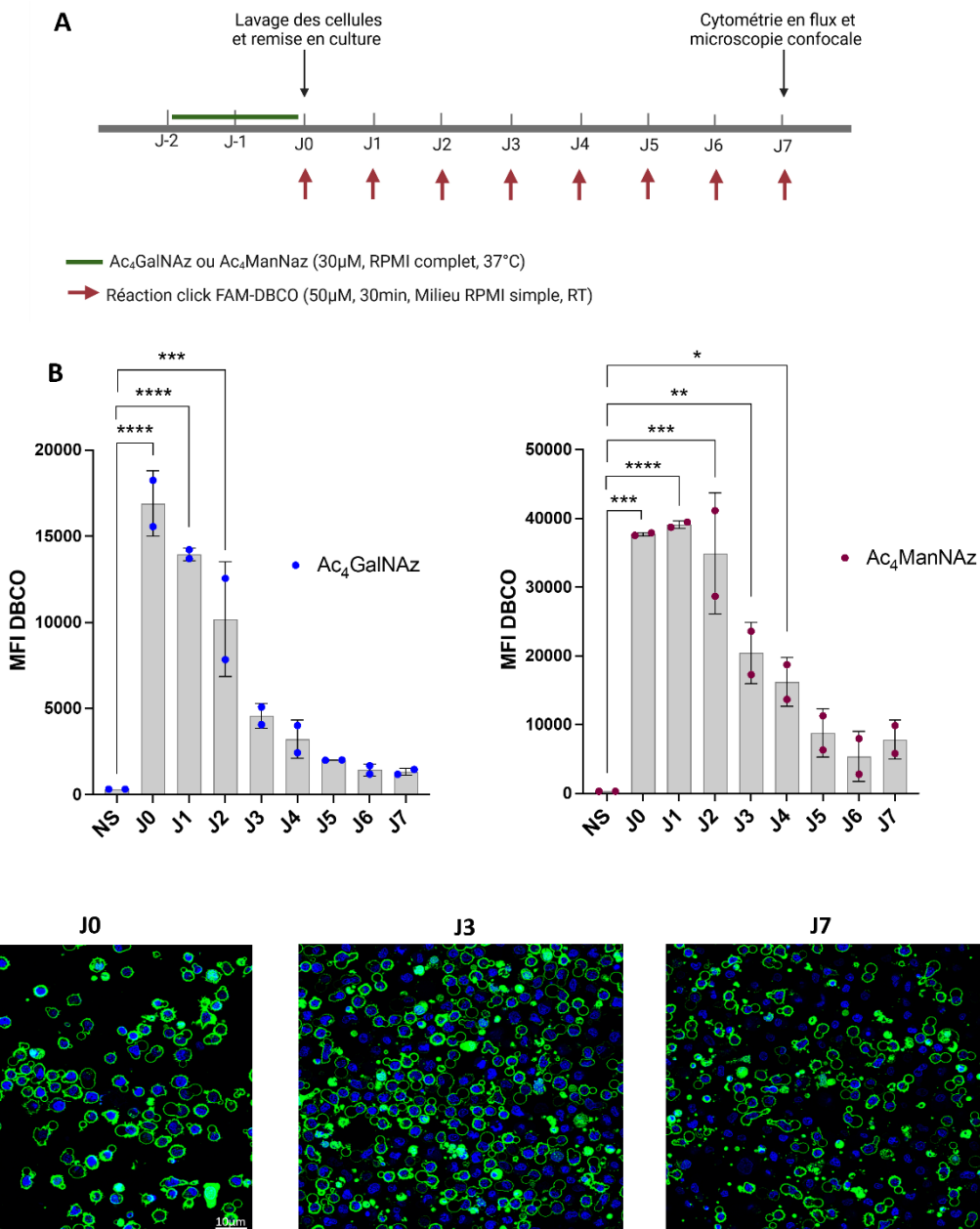


Figure 35 : Cinétique de conservation des azides à la surface des DOT.

200 000 DOT ont été cultivées en présence d'IL-15 et d'Ac₄GalNAz ou d'Ac₄ManNAz (30µM, 48h) puis les cellules ont été remises en culture (0 à 7 jours, 37°C, RPMI complet) avant d'être incubées avec le FAM-DBCO (50µM, 30min, RPMI simple, RT). Le schéma expérimental est représenté en (A). Le suivi de la réaction click a été analysé par microscopie confocale (B) et cytométrie en flux (C). Les valeurs ont été représentées comme les moyennes ± SEM de deux expériences indépendantes réalisées avec trois répliques par condition. La significativité a été déterminée par ANOVA ou * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,005$. RT : Température ambiante.

Les DOT ont été cultivées avec les azido-sucres ainsi que de l'IL-15 pendant 48h puis lavées et remises en culture uniquement avec de l'IL-15 jusqu'à sept jours avant de les incuber avec le FAM-DBCO (**Figure 35A**). Les DOT sont capables d'interagir avec le FAM-DBCO pendant trois à quatre jours de remise en culture, en fonction de l'azido-sucre utilisé, avant une diminution progressive et significative de la fluorescence (**Figure 35B**). Cependant, toutes les cellules n'ont pas la même capacité à conserver les azides à leur surface au vu des résultats obtenus en microscopie confocale. Certaines conservent une forte fluorescence même après sept jours de remise en culture tandis que d'autres la perdent complètement dès trois jours (**Figure 35C**). Une hétérogénéité de capacité proliférative ou d'activité métabolique pourraient expliquer ces différences, les cellules les plus quiescentes conservant peut-être plus longtemps les azides membranaires.

1.3.4. Vérification de la capacité d'activation des DOT

Tout comme pour les JRT3 LES et les PBMC, une validation de la capacité d'activation des DOT a été entreprise *via* leur sécrétion d'IFN γ après activation par un anticorps anti-CD3. L'IFN γ est une cytokine produite rapidement par les DOT après leur activation et d'intérêt pour les réponses anti-virales et anti-tumorales. La culture et la réaction click ont été réalisées comme déterminé précédemment puis les cellules ont été incubées avec un anticorps anti-CD3 (clone OKT3) pendant 24h. Un ELISA IFN γ sur les surnageants de culture a été réalisé dans le but de quantifier la sécrétion de cette cytokine (**Figure 36A**).

Les résultats montrent que la capacité d'activation des DOT ne semble pas impactée par l'incorporation des azido-sucres dans les cellules ou par la réaction click avec le FAM-DBCO. Effectivement, en comparaison à la sécrétion basale d'IFN γ observée en condition non activée (NA, Sucre -, DBCO+/-), l'activation des cellules par l'anticorps anti-CD3 provoque une augmentation significative de cette sécrétion dans la condition sans azido-sucre ni DBCO (A Sucre -, DBCO -). Cette dernière reste constante même après l'ajout d'Ac₄ManNAz ou d'Ac₄GalNAz et/ou du FAM-DBCO, il n'y a pas de différence significative de quantification d'IFN γ entre toutes les conditions activées (**Figure 36B**).

Un protocole a donc été établi à l'aide du FAM-DBCO sur ces différents types cellulaires. Cette première optimisation nous donne donc une base pour réaliser les premiers tests comprenant

les polymersomes : 30µM d'azido-sucre pendant 48h puis un temps d'incubation de 30min à température ambiante pour la réaction click. La formulation des polymersomes étant un facteur limitant dans les prochaines expérimentations, seul l'Ac₄ManNAz a été conservé du fait de sa meilleure efficacité.

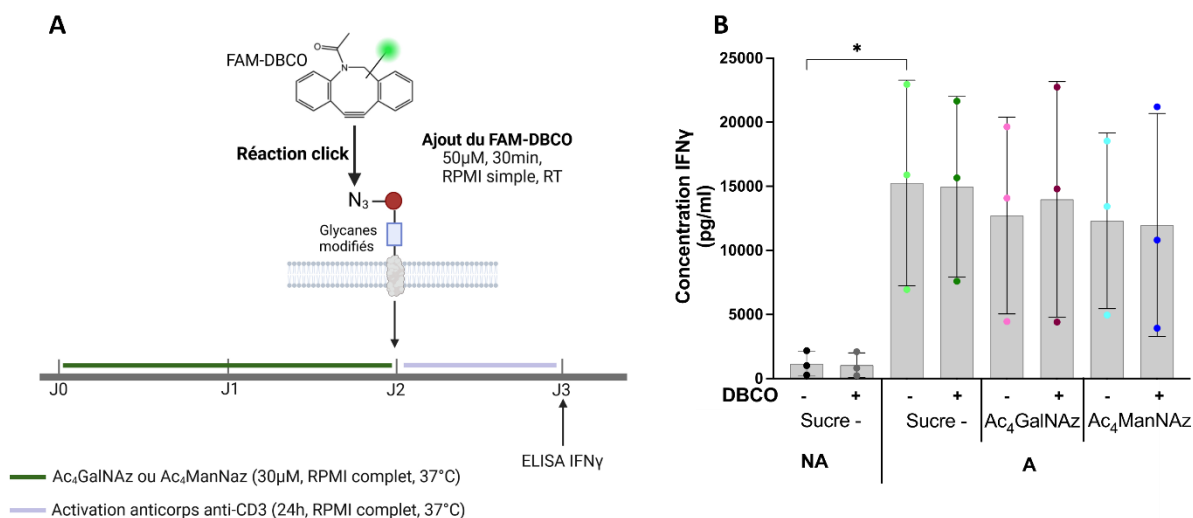


Figure 36 : Quantification de la sécrétion d'IFN γ par les DOT après la réaction click avec le FAM-DBCO.

200 000 DOT ont été cultivées en présence d'Ac₄GalNAz ou d'Ac₄ManNAz (30µM, 48h) puis ont été incubées avec le FAM-DBCO (50µM, 30min). Les cellules ont ensuite été activées à l'aide d'un anticorps anti-CD3 (Clone OKT3, 10µg/ml, 24h). Le schéma expérimental est représenté en (A). Le taux d'IFN γ a été analysé par ELISA (B). Les valeurs ont été représentées comme les moyennes \pm SEM de trois expériences indépendantes réalisées avec trois réplicas par condition. La significativité a été déterminée par un test t multiparamétrique ou * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ et *** $p \leq 0,005$. NA : Non activé, A : activé, RT : Température ambiante.

2. Mise en œuvre du biohybride « DOT – polymersomes »

Le développement de notre biohybride s'appuie sur le couplage des polymersomes à la membrane cellulaire à l'aide de la réaction click entre un azide libre et le DBCO. Les résultats obtenus auparavant démontrent l'efficacité de cette réaction click par l'utilisation du FAM-DBCO. Ici, nous avons intégré le DBCO à la membrane du polymersome afin de le coupler aux DOT. La réaction click se déroule donc entre les azides libres présents sur l'extrémité des glycanes de surface cellulaire et le DBCO disponible à membrane du polymersome. Nous avons également inclus un composé fluorescent (Rhodamine B ou Fluorescéine) à la membrane du polymersome afin d'évaluer le couplage entre les deux acteurs par microscopie confocale (Figure 37). Dans cette partie, nous allons voir l'optimisation du protocole de réaction click

entre les DOT et les polymersomes. Pour cela, diverses tailles, ratio et formulation de polymersomes ont été testés.

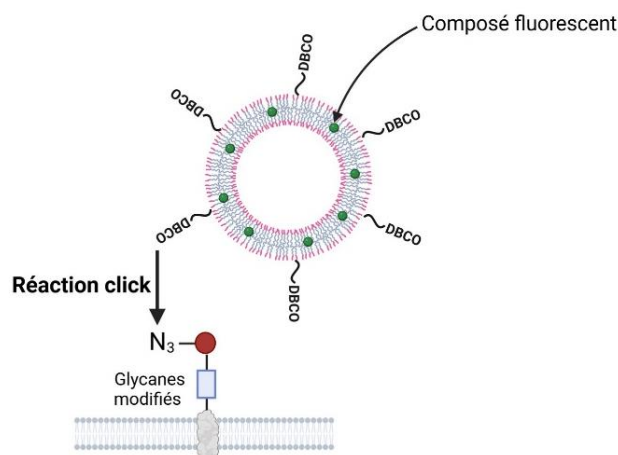


Figure 37 : Représentation schématique de la réaction click entre un azide libre présent sur l'extrémité des glycanes de surface cellulaire et le DBCO présent à la membrane du polymersome.

2.1. Formulation des polymersomes

2.1.1. Production

La production des polymersomes se déroule en deux étapes. La première permet de former la base de la vésicule et la seconde d'ajouter le DBCO à l'aide d'une liaison NH_2 -NHS (**Figure 38A**). La collaboration avec le LCPO m'a permis de me former sur l'utilisation de techniques de formulation des polymersomes : l'électroformation, la double émulsion et l'extrusion manuelle.

L'électroformation fait partie des méthodes dites de « bulk hydratation », considérée comme la plus simple pour l'auto-assemblage des copolymères amphiphiles. Elle consiste en l'hydratation directe du copolymère solide dans une solution aqueuse. L'auto-assemblage se produit progressivement au fil du temps, à mesure que le copolymère se dissout. En ce qui concerne l'électroformation, c'est une des variantes assistées par un champ électrique. Elle a été développée dans le but de former des vésicules géantes en un temps court. Les étapes de production sont schématisées en **Figure 38B**.

Lors de la méthode de double émulsion, les copolymères sont solubilisés dans un solvant organique tel que du toluène afin de former une phase huileuse. Cette solution est mélangée

à une phase aqueuse (PBS) pour former une émulsion eau-dans-huile où des gouttelettes se forment et sont stabilisées à l'interface avec l'huile par les copolymères agissant comme des surfactants. Cette première émulsion est par la suite mélangée à une seconde phase aqueuse pour former une double émulsion eau-dans-huile-dans-eau. Lors de l'évaporation du toluène, la phase huileuse se réduit permettant aux blocs hydrophobes des deux interfaces de se rencontrer formant une bicouche polymérique et donc des polymersomes (**Figure 38C**).

Ces deux approches ne permettent pas de former des particules de tailles homogènes mais plutôt des particules de diverses morphologies avec une dispersion de taille élevée. Cependant, dans ce projet l'impact de la disparité et de la différence de taille sur le couplage cellule-polymersome n'est pas connu. Il est donc primordial d'obtenir une solution homogène afin de rechercher la taille la plus appropriée à cette technique de réaction click. Pour cela, nous avons extrudé manuellement nos polymersomes afin de les calibrer. Le but de l'extrusion est de forcer les polymersomes à passer à travers un filtre avec des pores de tailles définies afin de réduire leur spectre de taille (**Figure 38D**). Nous obtenons alors une population de polymersomes ayant une taille maximale choisie et fixe avec une hétérogénéité réduite.

Comme expliqué plus haut, l'ajout de DBCO à la membrane des polymersomes consiste en une deuxième étape. Après assemblage des polymères par électroformation ou double émulsion et extrusion, les polymersomes obtenus sont entourés de NH_2 à leur surface du fait des polymères choisis. Cela nous a permis de lier le DBCO couplé à une molécule de NHS (DBCO-NHS) et donc de choisir la quantité de DBCO à ajouter à la surface des polymersomes (**Figure 38A**).

Lors de ce projet, plusieurs polymersomes à base de PBut-PEG-NHS ont été formés. Les pourcentages et types de DBCO-NHS et la molécule fluorescente ont été modifiés en fonction de l'expérimentation menée. Leur nom, leur taille, leur quantification ainsi que leur méthode de formulation ont été regroupés dans la **Tableau 6**.

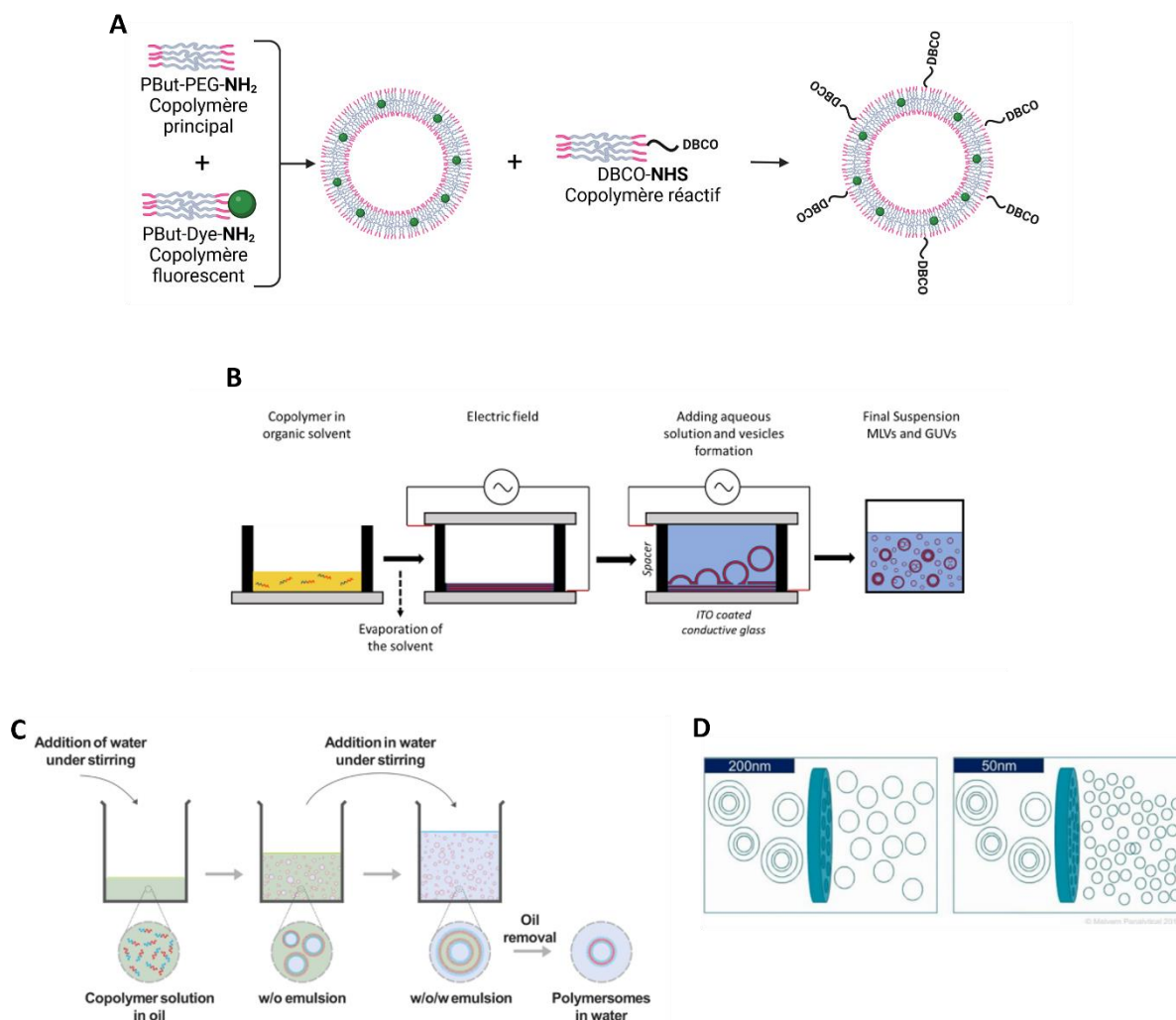


Figure 38 : Représentation schématique des différentes techniques de formulation utilisées.

Un schéma global de la formulation des polymersomes est représenté en (A). Etapes d'électroformation (B), de double émulsion (C) et d'extrusion manuelle (D). Schémas récupérés de [271], [272], [273].

2.1.2. Comptage

Différents ratios de polymersomes ont été mis en contact avec les DOT afin de déterminer la quantité nécessaire pour obtenir une réaction click efficace tout en limitant leur potentielle toxicité cellulaire. Lors de la production, il n'a pas été possible de quantifier les vésicules formées. Il nous a donc été nécessaire de trouver une méthode de comptage robuste et reproductible afin de respecter les ratios définis lors de chaque expérimentation.

Les polymersomes formés mesuraient entre 100nm et 5µm. Nous avons donc choisi dans un premier temps d'utiliser la cytométrie en flux afin de les quantifier, cette technologie autorisant la détection d'évènements en-dessous du µm. De plus, des billes de comptage sont

disponibles pour nous aider à détecter au mieux nos évènements. Tout d'abord, il existe des Mégamix permettant de paramétrer le cytomètre afin de séparer au mieux les évènements du bruit de fond de l'appareil. En effet, malgré leur fluorescence, certains polymersomes possèdent une taille très faible et peuvent donc passer sous le seuil de détection de l'instrument. Ensuite, des billes de comptage appelées Trucount servent de gamme étalon. Le nombre de billes par microlitre étant connu, nous avons pu comparer notre échantillon à cette gamme afin de connaître le nombre d'évènements enregistrés dans le volume aspiré. Nous avons testé cette méthode sur deux cytomètres distincts afin d'évaluer la reproductibilité. Malgré plusieurs tentatives et de nombreux ajustements, cette technique ne nous a pas permis d'obtenir une quantification fiable et reproductible entre les deux cytomètres. Les polymersomes ne formant pas une population homogène au niveau de la taille ni de la fluorescence, il était trop compliqué de les détecter précisément et de les séparer du bruit de fond.

Suite à ces difficultés, nous nous sommes tournés vers la technologie NanoFCM avec l'aide de Liam Barry-Carroll, post-doctorant dans l'équipe ExoMarQuage du laboratoire NutriNeuro (UMR INRAE 1286). Le Flow NanoAnalyzer est un appareil permettant une caractérisation multiparamétrique de nanoparticules comprises entre 7 et 1000nm. Il combine la diffusion de la lumière ainsi que la détection de fluorescence. Cela permet de détecter au niveau de la particule unique et de déterminer des distributions de tailles de petits objets naturels et synthétiques tels que les vésicules extracellulaires, les mitochondries, les bactéries, les virus ou encore différents types de nanoparticules et nanomatériaux. Une fois les calibrations faites à l'aide de billes de silice ainsi que de tampon PBS (**Figure 39A**), les différents échantillons de polymersomes ont été dilués et analysés (**Figure 39B**). Les résultats sont regroupés dans le **Tableau 6**.

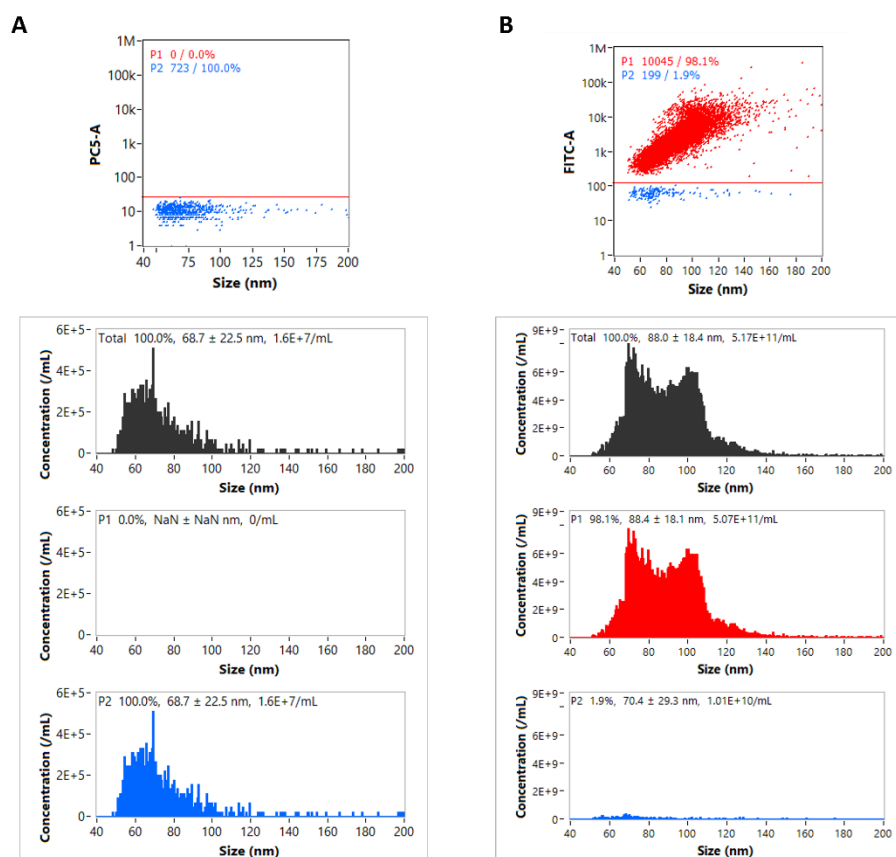


Figure 39 : Exemple de résultats de comptage des polymersomes à l’aide du NanoFCM.

Les polymersomes ont été formés par électroformation ou double émulsion au LCPO. Le NanoFCM a été calibré au laboratoire NutriNeuro à l’aide de billes de calibration puis un échantillon de PBS a été acquis pour fixer le seuil de détection. Différentes dilutions ont été analysées afin de déterminer les concentrations de polymersomes. Un exemple de résultat obtenu pour le PBS et les polymersomes sont représentés en (A) et (B) respectivement. L’histogramme noir représente la concentration totale de l’échantillon, le rouge la concentration d’événements positifs pour la fluorescence choisie et le bleu la concentration d’événements négatifs pour cette même fluorescence.

Tableau 6 : Tableau récapitulatif du compte des polymersomes en fonction de leur type et de leur technique de formulation.

| Polymersomes | Taille (nm) | Concentration (nano/ml) | Techniques de formulation |
|---|-------------|-------------------------|---------------------------|
| Pbut-PEG 2 % Rhodamine B | 100 | 3,23.10 ¹⁰ | Electroformation |
| | 300 | 1,01.10 ¹⁰ | |
| | 1 000 | 1,71.10 ¹⁰ | |
| Pbut-PEG-fluorescéine 10 % DBCO-NHS | 100 | 1,34.10 ⁹ | Electroformation |
| | 400 | 2,83.10 ⁹ | |
| Pbut-PEG-fluorescéine 20 % DBCO-NHS | 200 | 2,2.10 ¹⁰ | Double émulsion |
| | 1 000 | 1,29.10 ¹⁰ | |
| Pbut-PEG-fluorescéine 20 % DBCO-PEG ₅ -NHS | 200 | 3,02.10 ¹⁰ | Double émulsion |
| Pbut-PEG-fluorescéine 20 % DBCO-NHS | 200 | 5,11.10 ¹¹ | Double émulsion |

2.2. Evaluation de l'absence d'internalisation des polymersomes

Avant d'envisager une interaction entre cellules et polymersomes, nous avons voulu vérifier que les polymersomes n'étaient pas internalisés passivement par les DOT. Pour cette étape, des polymersomes de 100nm, 300nm, 1 μ m et 5 μ m sans DBCO avec 2% de Rhodamine B (excitation à 545nm et émission à 566nm) ont été formés par électroformation puis extrusion manuelle comme expliqué précédemment. N'ayant pas pour but de coupler les polymersomes aux cellules mais uniquement de voir une potentielle internalisation, nous n'avons pas introduit de DBCO à leur membrane. De plus, nous avons choisi des tailles assez diverses afin d'évaluer si ce paramètre influait sur ce phénomène d'endocytose ou d'internalisation passive.

Afin de vérifier l'absence d'internalisation, les DOT ont été incubées pendant 30min ou 2h à RT avec trois ratios de polymersomes : 10 polymersomes pour 1 cellule (10/1), 100/1 ou 1000/1 après avoir été cultivées avec l'Ac₄ManNAz (30 μ M, 48h) (**Figure 40A**). Après lavage des cellules, les résultats sont analysés par microscopie confocale. Des résultats similaires pour tous les ratios ainsi que pour les deux temps d'incubations ont été trouvés, c'est pourquoi seules les conditions les plus extrêmes sont représentées en **Figure 40** (2h d'incubation, 1000/1, 100nm et 5 μ m). Concernant les nanoparticules de 100nm, nous pouvons observer un polymersome fluorescent en rouge libre dans le milieu (**Figure 40B**, flèche jaune, 100nm, ratio 1000/1). Aucune colocalisation avec le noyau n'a été observée dans cette condition. La **Figure 40C**, quant à elle, correspond à une image de microscopie confocale obtenue avec les polymersomes de 5 μ m à un temps et un ratio identique (2h, 1 000/1). Un résultat similaire est observé avec deux polymersomes libres dans le milieu mais aucune colocalisation nucléaire n'est visible. L'ensemble de ces observations indique donc que les DOT n'engagent aucun mécanisme d'internalisation des polymersomes ou qu'il n'y a pas de diffusion passive même à une forte concentration pendant un temps long.

2.3. Optimisation du protocole de réaction click

Afin de trouver les conditions optimales pour obtenir un nombre conséquent de DOT fonctionnalisées avec les polymersomes avec la meilleure viabilité possible, nous avons

optimisé le protocole en testant plusieurs formats, ratios et tailles de polymersomes ainsi que divers temps d'incubation (**Tableau 4**).

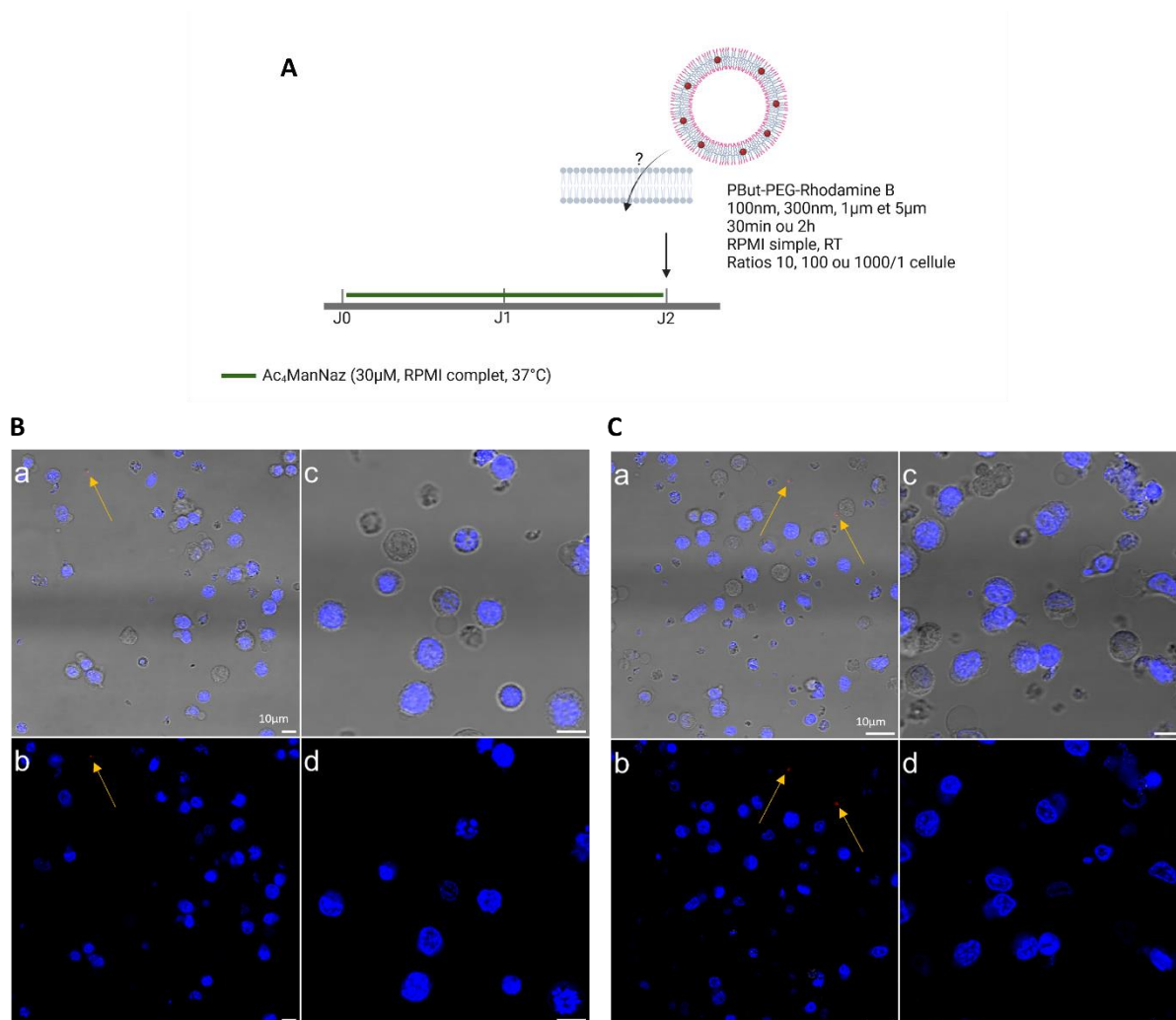


Figure 40 : Vérification de la non-intériorisation des polymersomes Pbut-PEG-Rhodamine B dans les DOT.

200 000 DOT ont été cultivées en présence d'Ac₄ManNAz (30µM, 48h) puis ont été incubées 30min ou 2h à température ambiante avec des polymersomes Pbut-PEG-Rhodamine B sans DBCO (100nm, 300nm, 1µm et 5µm) à trois ratios différents (10/1, 100/1 ou 1000/1 cellule). La potentielle intériorisation des polymersomes a été analysée par microscopie confocale. Le schéma expérimental est représenté en (A). Les résultats obtenus pour les cellules incubées pendant 2h avec 1000 polymersomes de 100nm ou 5µm sont présentés en B et C respectivement. Les noyaux ont été marqués à l'aide du DAPI (bleu), les polymersomes sont visibles dans le rouge et sont marqués d'une flèche. RT : Température ambiante. Echelle : 10µm

2.3.1. Optimisation du polymersome

Nous avons tout d'abord cherché à optimiser la disponibilité du DBCO à la surface des polymersomes. Dans un premier temps, des Pbut-PEG-fluorescéine avec 10% de DBCO-NHS ont été produits par électroformation et extrusion manuelle comme expliqué précédemment. Ici, nous avons choisi d'intégrer de la fluorescéine et non de la Rhodamine B afin de pouvoir

comparer les résultats avec ceux obtenus lors de l'optimisation avec le FAM-DBCO. Le pourcentage de DBCO a été choisi à l'aide de résultats préliminaires non concluants réalisés avec 0,5 et 5% de DBCO. Nous avons donc décidé d'accroître ce pourcentage afin d'améliorer la disponibilité du DBCO à la surface et donc d'optimiser l'interaction recherchée. Deux tailles de polymersomes ont été utilisées, 100 et 400nm, et ces derniers ont été mis en contact avec les DOT pendant 30min ou 2h à RT (**Figure 41A**). Les trois ratios 10, 100 et 1000/1 ont été testés. Comme précédemment, le DAPI a été utilisé comme marqueur nucléaire. La **Figure 41B** est un exemple des résultats obtenus en microscopie confocale pour le temps d'incubation le plus long au plus grand ratio pour les deux tailles (2h, 1000/1, 100 et 400nm). Quelle que soit la taille des polymersomes, aucune fluorescence n'est visible à la surface des cellules ce qui traduit une absence de réaction click. Cependant, nous observons une colocalisation de cette dernière avec le DAPI au niveau des cellules semblant non viables au vu de leur morphologie granuleuse. Cela suggère que les polymersomes peuvent pénétrer dans ces cellules non-viables ou en processus de mort cellulaire. L'absence de réaction click peut être due à un manque de disponibilité du DBCO à la surface des cellules ce qui empêcherait son interaction avec l'azide libre.

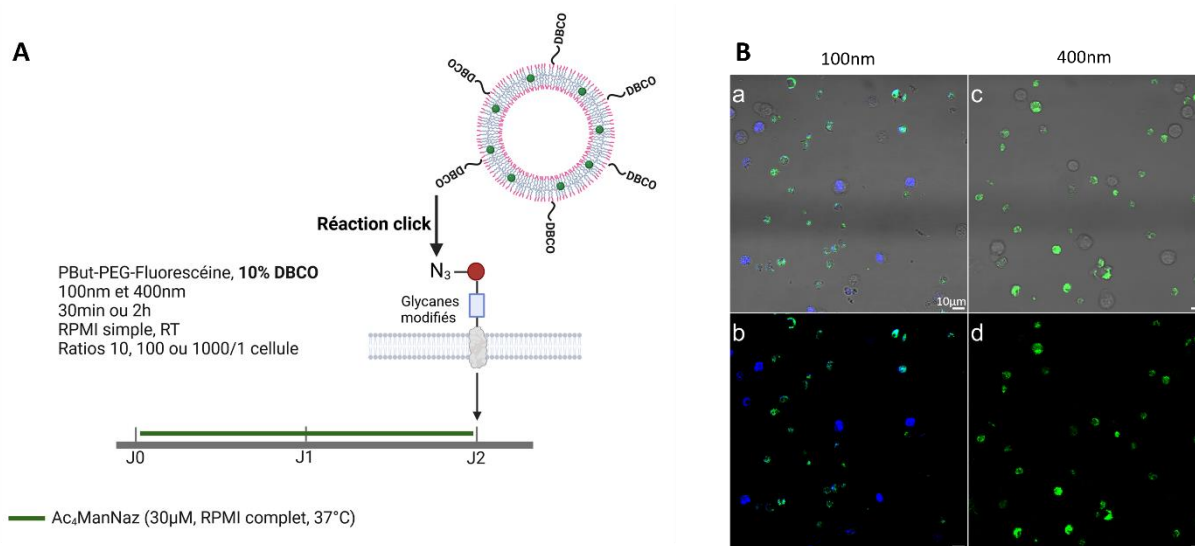


Figure 41 : Fonctionnalisation des DOT avec des polymersomes Pbut-PEG-Fluorescéine avec 10% DBCO-NHS.

200 000 DOT ont été cultivées en présence d'Ac₄ManNAz (30μM, 48h) puis ont été incubées 30min ou 2h à température ambiante avec des polymersomes Pbut-PEG-Fluorescéine 10% DBCO (100nm, et 400nm) à trois ratios différents (10/1, 100/1 ou 1000/1 cellule). Le schéma expérimental est représenté en (A). La réaction click entre les polymersomes et les cellules a été analysée par microscopie confocale (B). Les résultats obtenus pour les cellules incubées pendant 2h avec 1000 polymersomes de 100nm sont présentés en B(a) et B(c) tandis que ceux pour les polymersomes de 400nm en B(b) et B(d). Les noyaux ont été marqués à l'aide du DAPI (bleu) et les polymersomes sont visibles dans le vert. RT : Température ambiante. Echelle : 10μm

Nous avons donc vérifié cette disponibilité à l'aide d'un azide fluorescent (N_3 -FAM). Lors de cette étape, les polymersomes seuls et non extrudés sont incubés avec ce N_3 -FAM. Si le DBCO est disponible à la surface des vésicules, une fluorescence est visible à la surface de ces dernières par microscopie confocale car les deux entités sont capables d'interagir entre elles *via* la réaction click (**Figure 42**). Or nous n'avons observé aucune fluorescence ce qui confirme l'absence de DBCO. Cela pourrait être dû à un manque d'efficacité de la liaison NHS-NH₂ ou bien une internalisation du DBCO après s'être accroché au polymersome.

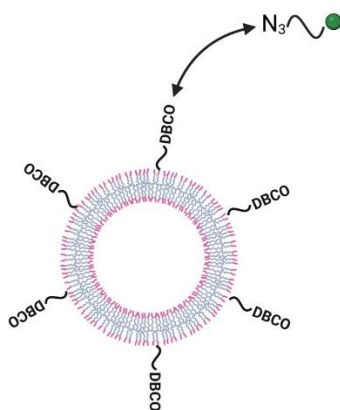


Figure 42 : Schéma expérimental de la vérification de la disponibilité du DBCO sur les polymersomes Pbut-PEG 20% DBCO à l'aide d'un azide fluorescent (N_3 -fluorescéine).

Les polymersomes Pbut-PEG avec ou sans DBCO (20%) ont été incubés toute une nuit avec un N_3 -FAM.

Malgré divers essais, cette méthode d'électroformation n'a pas permis d'avoir une quantité suffisante de DBCO à la surface des polymersomes pour réaliser une réaction click concrète avec les DOT. Une seconde méthode de production a donc été envisagée dans le but de corriger ce biais de formulation : la double émulsion. A la suite de cette formulation, les polymersomes Pbut-PEG sont fonctionnalisés avec 20% de DBCO-NHS et une vérification de la disponibilité du DBCO par réaction avec le N_3 -FAM a été réalisée avant la formation des polymersomes finaux. Pour cela, les polymersomes non extrudés, possédant donc une forte dispersion de taille, ont été incubés comme précédemment avec un N_3 -FAM et cette réaction a été analysée par microscopie confocale. La disponibilité du DBCO est confirmée comme montré par la présence de fluorescence verte à la surface des polymersomes contenant 20% de DBCO-NHS (**Figure 43B**) qui ne l'est pas sur la condition contrôle ne contenant pas de DBCO (**Figure 43A**). Cela prouve l'interaction entre le N_3 -FAM et le DBCO et donc sa disponibilité à la surface du polymersome.

La méthode de double émulsion ainsi que l'ajout de 20% de DBCO-NHS ont donc été conservés pour les formulations suivantes.

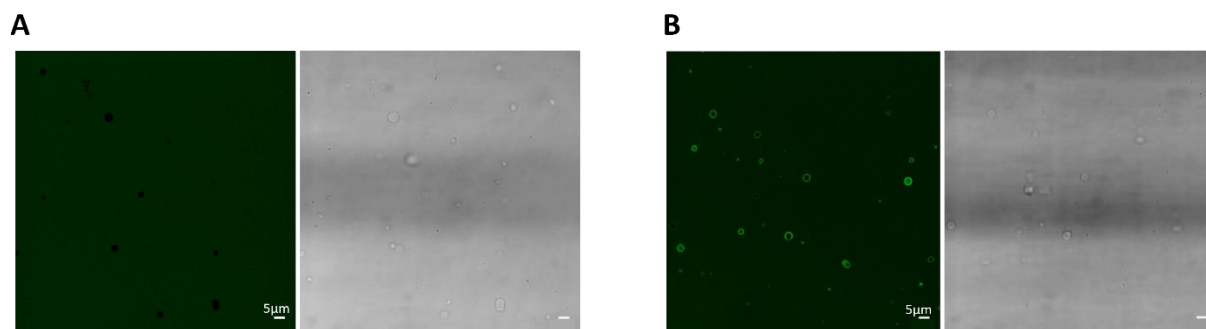


Figure 43 : Vérification de la disponibilité du DBCO sur les polymersomes Pbut-PEG 20% DBCO à l'aide d'un azide fluorescent (N₃-fluorescéine).

Les polymersomes Pbut-PEG avec ou sans DBCO (20%) ont été formés par double émulsion puis ont été mis en contact toute une nuit avec un N₃-FAM. La réaction click pour le contrôle Pbut-PEG (A) et l'échantillon Pbut-PEG 20% DBCO (B) a été analysée par microscopie confocale. Les polymersomes sont visibles dans le vert. RT : Température ambiante. Echelle : 5µm

2.3.2. Optimisation de l'interaction cellule - polymersome

En plus de l'augmentation du pourcentage de DBCO à la surface des polymersomes, nous avons recherché différentes solutions pour palier à ce manque d'interaction entre l'azide libre et le DBCO présent sur les vésicules. L'une d'entre elles a été de rapprocher physiquement les deux entités, c'est-à-dire le DBCO et l'azide, tout en limitant le potentiel encombrement stérique présent à la surface des polymersomes. Pour cela, deux types de polymersomes ont été formés avec la méthode de double émulsion dont l'un possédant un DBCO plus long grâce à la présence de cinq molécules de PEG (DBCO-PEG₅-NHS). En effet, le fait de créer un bras plus long pour le DBCO pourrait faciliter sa rencontre avec les cellules. Pour cette étape, trois polymersomes ont été formés (**Figure 44**) :

- PBut-PEG-Fluorescéine avec 20% DBCO-PEG₅-NHS extrudé à 200nm
- PBut-PEG-Fluorescéine avec 20% DBCO-NHS extrudé à 200nm
- PBut-PEG-Fluorescéine avec 20% DBCO-NHS extrudé à 1µm

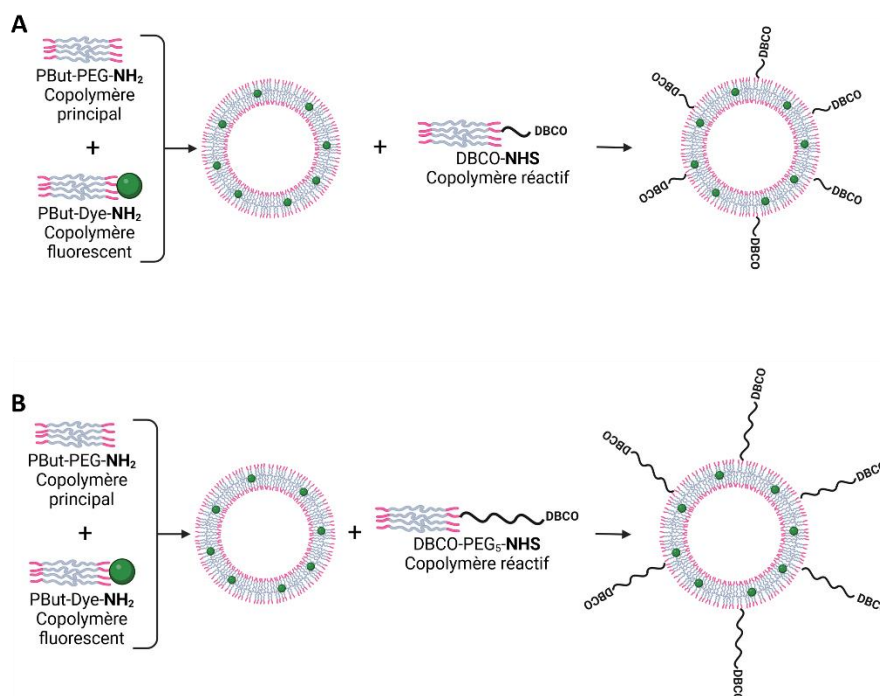


Figure 44 : Représentation schématique de la formulation des deux types de polymersomes.

La formulation des polymersomes possédant un DBCO-NHS (200nm et 1 μ m) est représentée en (A). Celle des polymersomes possédant un bras plus long avec le DBCO-PEG₅-NHS (200nm) est représentée en (B).

La seconde solution pouvant rapprocher les cellules des polymersomes est de diminuer le volume d'incubation lors de la réaction click. Ce dernier a été réduit à 10 μ l en P96V au lieu de 50 μ l en P96U initialement. Les temps d'incubation de 30min et 2h à RT et les trois ratios (1000, 100 ou 10/1) ont été conservés (**Tableau 4, Figure 45A**). Ces conditions ont donc permis de tester plusieurs paramètres : la longueur du DBCO sur les polymersomes, la taille des polymersomes mais également les conditions d'interaction. La **Figure 45B** illustre les résultats obtenus en microscopie confocale pour 2h d'incubation avec les polymersomes de 1 μ m au ratio 1000/1. On observe une interaction entre les polymersomes et les cellules comme montré par la présence de fluorescence verte à la surface des cellules. De plus, leur position membranaire est confirmée du fait de l'absence de colocalisation avec le DAPI. Lors de ces essais, nous n'avons observé aucune fluorescence pour les deux polymersomes de 200nm quelle que soit la longueur du bras. Ces résultats indiquent que la réaction click reste faible malgré ces nouvelles conditions. En outre, les polymersomes de 200nm restent relativement petits ce qui pourrait expliquer qu'ils ne se fixent pas ou alors qu'ils ne soient pas visibles en microscopie confocale.

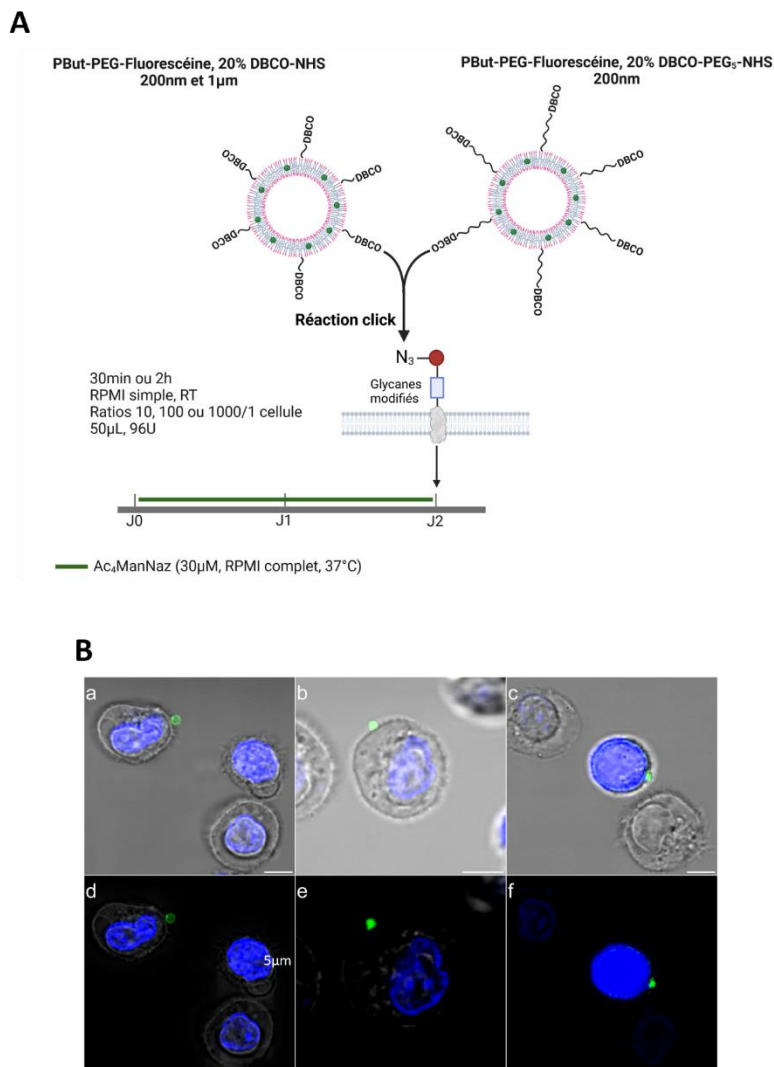


Figure 45 : Fonctionnalisation des DOT avec trois polymersomes Pbut-PEG-Fluorescéine avec 20% DBCO-NHS (200nm ou 1µm) ou DBCO-PEG₅-NHS (200nm).

100 000 DOT ont été cultivées en présence d'Ac₄ManNAz (30µM, 48h) puis ont été incubées 30min ou 2h à température ambiante avec des polymersomes Pbut-PEG-Fluorescéine avec 20% DBCO-NHS (200nm, et 1µm) ou 20% DBCO-PEG₅-NHS (200nm) à trois ratios différents (10/1, 100/1 ou 1000/1 cellule). Le schéma expérimental est représenté en (A). La réaction click entre les polymersomes et les cellules a été analysée par microscopie confocale. Seuls les résultats pour une incubation de 2h avec 1 000 polymersomes Pbut-PEG-Fluorescéine avec 20% DBCO-NHS de 1µm sont présentés ici (B). Les noyaux ont été marqués à l'aide du DAPI (bleu) et les polymersomes sont visibles dans le vert. RT : Température ambiante. Echelle : 5µm

Au vu de cette faible interaction, nous avons envisagé une nouvelle optimisation concernant les caractéristiques d'incubation lors de la réaction click. Nous avons augmenté le temps d'incubation ainsi que la température (en la montant à 37°C) pendant 2h ou 4h tout en gardant les trois types de polymersomes et les trois ratios. De plus, un marqueur de viabilité (FVS780) a été ajouté pour distinguer les cellules viables des cellules non viables à l'aide de son spectre

d'émission dans le rouge (excitation à 633nm et émission à 780) (**Figure 46A**). Ce colorant se lie de manière covalente aux amines intracellulaires et de surface. Lors d'un processus de mort cellulaire, les membranes des cellules deviennent perméables ce qui permet la diffusion intracellulaire du colorant et donc une concentration localisée dans le cytoplasme. Une colocalisation de la fluorescence verte des polymersomes avec la rouge du marqueur de viabilité nous permettrait de prouver que les polymersomes se sont internalisés *via* la perméabilisation des membranes ce qui les exclurait de l'analyse (**Figure 46B**).

Nous avons également ajouté un contrôle avec le FAM-DBCO afin de confirmer la présence d'azide à la surface des cellules et exclure un quelconque problème de culture ou d'assimilation de l'Ac₄ManNAz par les DOT. Une fluorescence verte est visible à la surface des cellules et aucune internalisation n'est perceptible traduisant une réaction click efficace et donc une présence conséquente d'azides libres à la surface des DOT. De plus, aucune colocalisation entre le DAPI et le FVS780 n'est présente sur les cellules ayant interagi avec le FAM-DBCO, ce qui indique une bonne viabilité (**Figure 46C**).

Concernant les polymersomes, seuls les résultats pour les DOT incubées pendant 4h à un ratio de 1000/1 de PBut-PEG-Fluorescéine 20% DBCO-NHS extrudés à 200nm sont représentés (**Figure 46D**). Quelques spots verts sont visibles sur la membrane des DOT traduisant une amélioration de la réaction click. Aucune colocalisation avec le marqueur de viabilité ou avec le DAPI n'est observée. Les polymersomes se fixent donc de façon spécifique aux azides libres présents à la surface des cellules viables. Cependant nous n'avons pas observé de fluorescence et donc de fixation des polymersomes comprenant le DBCO-PEG₅-NHS quelles que soient les conditions utilisées et ce sur trois expériences distinctes.

Tous ces résultats nous indiquent que les polymersomes de 200nm comprenant 20% DBCO-NHS incubés pendant 4h à 37°C avec les DOT semblent être les conditions optimales pour une réaction click efficace. Nous avons alors décidé de nous focaliser sur ce protocole ainsi que ce polymersome pour la suite des optimisations.

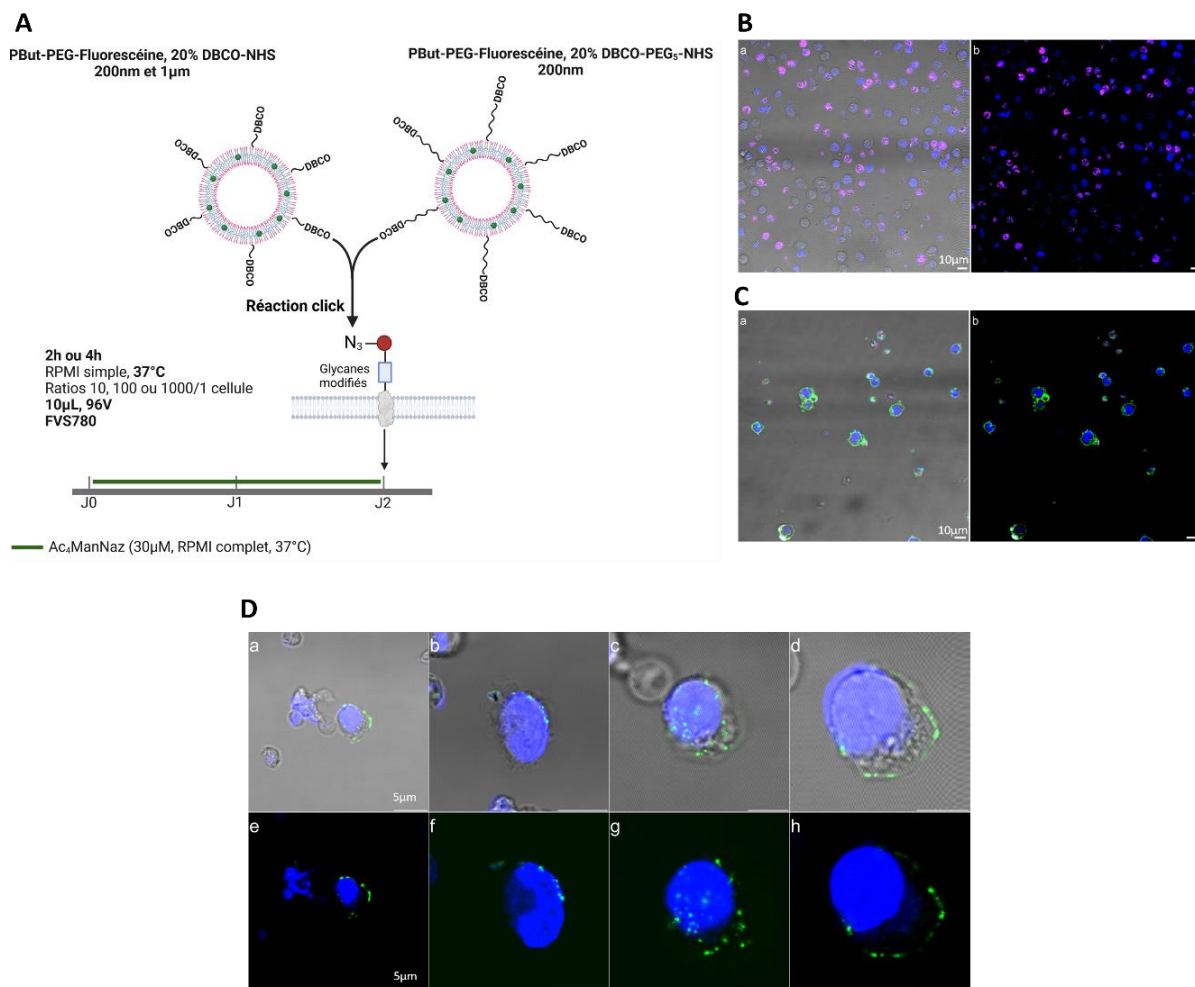


Figure 46 : Fonctionnalisation des DOT avec trois polymersomes Pbut-PEG-Fluorescéine avec 20% DBCO-NHS (200nm ou 1µm) ou DBCO-PEG₅-NHS (200nm).

100 000 DOT ont été cultivées en présence d'Ac₄ManNAz (30µM, 48h) puis ont été incubées 2h ou 4h à 37°C avec du FAM-DBCO ou des polymersomes Pbut-PEG-Fluorescéine avec 20% DBCO-NHS (200nm, et 1µm) ou 20% DBCO-PEG₅-NHS (200nm) à trois ratios différents (10/1, 100/1 ou 1000/1 cellule). Le schéma expérimental est représenté en (A). La viabilité des cellules (B) et la réaction click avec le FAM-DBCO (C) ou avec 1 000 polymersomes Pbut-PEG-Fluorescéine avec 20% DBCO-NHS de 200nm pendant 4h (D) ont été analysées par microscopie confocale. Les noyaux ont été marqués à l'aide du DAPI (bleu), les cellules non viables sont visibles en violet et les polymersomes sont visibles dans le vert. L'expérience a été reproduite trois fois de façon indépendante. RT : Température ambiante. Echelle B et C : 10µm, Echelle D : 5µm

2.3.3. Optimisation du ratio cellule - polymersomes

Dans le but d'augmenter encore la réaction click, nous avons voulu tester une augmentation des ratios de Pbut-PEG-Fluorescéine, 20% DBCO de 200nm : 1 000, 3 000 ou 10 000/1. Les conditions de culture énoncées précédemment ont été conservées (P96V, 10µl, 4h, 37°C + FVS780) (**Figure 47A**). Comme auparavant, un contrôle à l'aide du FAM-DBCO a été inclus afin de vérifier l'assimilation de l'Ac₄ManNAZ par les cellules. Une fluorescence verte est visible à

la surface des cellules et aucune internalisation n'est perceptible traduisant une réaction click efficace et donc une présence conséquente d'azides libres à la surface des DOT. De plus, aucune colocalisation entre le DAPI et le FVS780 n'est présente sur les cellules ayant interagi avec le FAM-DBCO, ce qui indique une bonne viabilité (**Figure 47B**). Concernant le ratio 1000/1, un résultat similaire au précédent a été retrouvé ce qui indique la reproductibilité de ce protocole (**Figure 47C**). Une augmentation du nombre de cellules fonctionnalisées ainsi que du nombre de polymersomes à la surface de ces cellules est observée avec l'augmentation du ratio (**Figure 47D, E, F, G**). Ces résultats indiquent qu'une quantité conséquente de polymersomes est nécessaire pour obtenir une réaction spécifique sur certaines cellules. Cependant, une validation de cette expérience ainsi qu'une analyse approfondie de la viabilité cellulaire serait intéressante afin de voir si l'utilisation du ratio 10 000/1 est réellement nécessaire ou si 3000/1 ne serait pas suffisant.

De plus, bien que ce phénomène soit légèrement réduit avec l'augmentation des ratios, nous avons remarqué que certaines cellules sont fonctionnalisées par un grand nombre de polymersomes tandis que d'autres ne le sont pas du tout et ce phénomène n'est pas observé lors de l'utilisation du contrôle FAM-DBCO. Il est possible que cela soit dû à une hétérogénéité de métabolisme ou de prolifération entre les DOT. Cela engendrerait une faible quantité d'azide libre à leur surface et donc une faible réactivité avec les polymersomes. De plus, les vésicules sont plus grosses et moins fluorescentes que le FAM-DBCO ce qui augmenterait cette difficulté d'interaction et d'observation en microscopie confocale. Nous aimerions donc réaliser cette expérience une nouvelle fois afin de confirmer les résultats obtenus mais également d'utiliser un marqueur de la membrane cellulaire afin de confirmer la localisation des polymersomes. Pour finir, de nombreux tests de validation fonctionnelle sont à prévoir. Tout d'abord, il serait intéressant de pouvoir quantifier le nombre de polymersomes liés aux cellules. Cela nous permettrait de connaître l'efficacité du couplage et de pouvoir moduler ce paramètre. Ensuite, nous aimerions vérifier la capacité des DOT à s'activer comme effectué précédemment lors de l'optimisation avec le FAM-DBCO. Des systèmes de co-culture en 2D ou 3D pourront également être mis en place à l'aide de modèle de GBM ou de CMV afin d'évaluer la capacité de ces biohybrides à cibler mais aussi à infiltrer les sites d'intérêt dans le cas des cultures 3D. La capacité cytotoxique des cellules pourra être évaluée, et ce, dans le but de vérifier que la présence du polymersome à la surface des cellules n'affecte cette

dernière. D'autre part, nous aimerions réaliser ces tests de ciblage à l'aide de modèles *in vivo* (CMV et GBM). Enfin, des tests d'encapsulation de molécules au sein du polymersome seront à prévoir au LCPO afin de valider la faisabilité et l'intérêt thérapeutique de ce biohybride. Des tests de comparaison d'efficacité entre des DOT seules ou fonctionnalisées avec des polymersomes vides ou encapsulant une molécule pourront être fait sur des modèles 3D dans un premier temps (GBM) puis sur des modèles *in vivo* (CMV et GBM). Toutes ces possibilités seront développées dans le chapitre suivant.

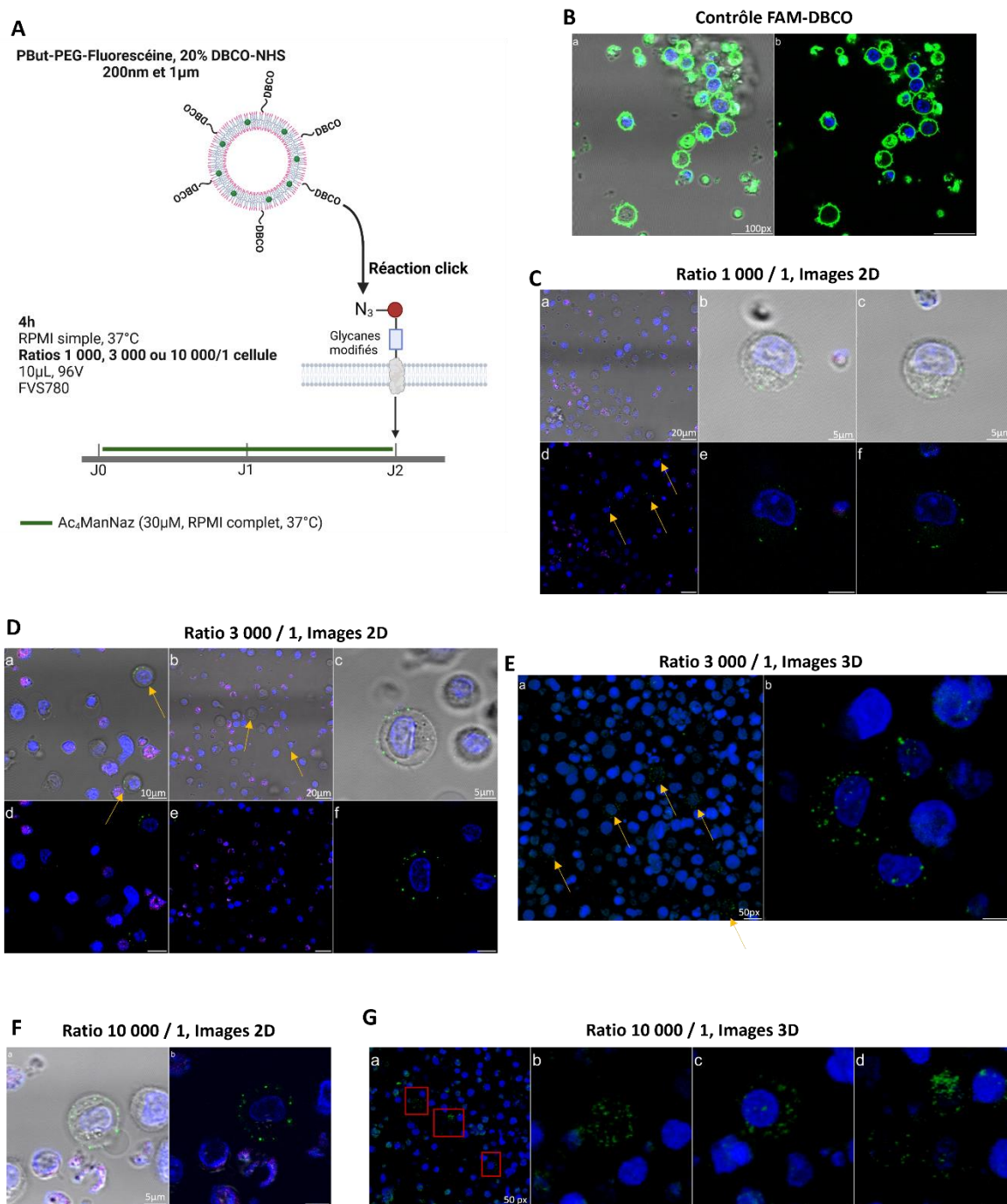


Figure 47 : Fonctionnalisation des DOT avec une gamme de polymersomes Pbut-PEG-Fluorescéine avec 20% DBCO-NHS (200nm).

Le schéma expérimental est représenté en (A). 200 000 DOT ont été cultivées en présence d'Ac₄ManNAz (30 μ M, 48h) puis ont été incubées 4h à 37°C avec des polymersomes Pbut-PEG-Fluorescéine avec 20% DBCO-NHS (200nm) à trois ratios différents : 1000/1 (B), 3000/1 (C) ou 10 000/1 (D, E). La réaction click entre les polymersomes et les cellules a été analysée par microscopie confocale. Les noyaux ont été marqués à l'aide du DAPI (bleu), les cellules non viables sont visibles en violet et les polymersomes sont visibles dans le vert. L'expérience n'a été réalisée qu'une fois. RT : Température ambiante. Echelle B : 100px, Echelle C(a),(d) / D(b), (e) : 20 μ m, Echelle C(b),(c),(e),(f) / D(c),(f), F : 5 μ m, Echelle D(a),(d) : 10 μ m, Echelle E, G : 50px

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce projet consiste à coupler le meilleur de la nanotechnologie au système biologique le plus approprié en formant un biohybride couplant des LT V δ 1, ici modélisés par les cellules DOT, associés à des polymersomes. La formation de ce biohybride peut être réalisée à l'aide de la chimie click appelée SPAAC se faisant entre les azides exprimés à la surface cellulaire par modification métabolique et le DBCO ajouté à la surface des polymersomes. Dans cette partie, nous allons discuter des principaux résultats obtenus mais également des problématiques rencontrées lors de l'élaboration de ces protocoles avec les optimisations pouvant être mises en place pour les améliorer. Par la suite, nous évoquerons les perspectives envisagées à court, moyen et long terme suite à ce travail.

1. Optimisation de la modification métabolique et de la réaction click à l'aide d'un DBCO fluorescent

La première étape de ce travail consistait à mettre au point les protocoles de modification métabolique des cellules et de chimie click. Pour cela, différents produits cellulaires (lignée JRT3 LES, PBMC et DOT) ont été utilisés et l'efficacité de la réaction a été visualisée à l'aide d'un DBCO fluorescent (FAM-DBCO). Dans ce premier chapitre, nous allons discuter des résultats obtenus lors de ces optimisations et des expériences que nous pourrions mettre en place pour répondre aux problématiques rencontrées.

1.1. Sélection de l'azido-sucre optimal

Concernant la modification métabolique des cellules, notre choix s'est porté sur l'utilisation de trois azido-sucres : l'Ac₄GlcNAz, l'Ac₄GalNAz et l'Ac₄ManNAz. Lors des expériences de cinétique et de concentration, l'Ac₄ManNAz a montré la meilleure efficacité, suivi par l'Ac₄GalNAz, alors que l'Ac₄GlcNAz s'est révélé moins performant et toxique, justifiant son exclusion des études ultérieures (**Figure 26**). Cette différence de performance et de toxicité peut s'expliquer par les différentes voies métaboliques empruntées par chaque sucre une fois intégré dans la cellule. Le GlcNAz, produit à partir de l'Ac₄GlcNAz, emprunte la voie du GlcNAc, qui est particulièrement impliquée dans la glycosylation des protéines nucléaires et

cytosoliques [99]. En conséquence, le GlcNAz est moins présent à la surface des cellules, ce qui réduit son efficacité dans les réactions de chimie click. Concernant la toxicité, l'Ac₄GlcNAz n'est pas reconnu comme particulièrement cytotoxique bien que nos résultats nous indiquent le contraire. Deux hypothèses ont donc été avancées : premièrement, les groupes azides du GlcNAz pourraient être peu exposés à la surface cellulaire et perturber le métabolisme en restant dans le cytosol ou le noyau. Deuxièmement, la voie métabolique du GlcNAz dépend de deux enzymes critiques, OGT et OGA, qui régulent l'ajout et le retrait du GlcNAz sur les protéines (**Figure 14**). Un déséquilibre dans l'activité de ces enzymes pourrait entraîner une accumulation des métabolites, provoquant une toxicité cellulaire [99], [100].

L'Ac₄GalNAz, *via* l'O-glycosylation, pourrait se convertir en NeuNAz, favorisant son incorporation dans la voie du ManNAz, responsable de la production d'acide sialique, essentiel dans les interactions cellulaires [102]. L'Ac₄ManNAz, précurseur clé de la voie métabolique menant à l'acide sialique, est largement utilisé dans la SPAAC pour lier des entités chimiques aux cellules ou anticorps. Tomás et Gibson ont montré que 96h de culture avec 40µM d'Ac₄ManNAz optimisent la réaction click, mais des concentrations supérieures provoquent une toxicité due au DMSO [107]. Nous avons obtenu une réaction efficace après 24 à 48h de culture avec 30µM d'Ac₄ManNAz, un résultat similaire. Ces variations de temps et de concentration peuvent s'expliquer par les différences métaboliques des lignées cellulaires. Li *et al.* ont démontré que des cellules tumorales pouvaient n'être traitées qu'avec 20µM d'Ac₄ManNAz-BCN pendant 48h pour avoir une expression suffisante tandis que des LT nécessitaient 50µM d'Ac₄GalNAz pendant 48h [274]. Cela souligne les besoins variables en azido-sucres selon les types cellulaires.

1.2. Stabilité / Conservation des glycanes modifiés à la surface cellulaire

L'une des difficultés rencontrées au cours de notre étude concernait la stabilité des glycanes modifiés à la surface des cellules. En effet, certaines expériences ont indiqué une internalisation du FAM-DBCO, révélée par une fluorescence verte intracellulaire, révélant donc une potentielle internalisation des azides (**Figures 27, 34**). De plus, nous avons observé une diminution de cette fluorescence à la surface de DOT avec le temps indiquant que pour certaines cellules, les azides restent stables à la surface pendant une période très limitée, de 3 à 4 jours (**Figure 35**). Après expansion, les DOT présentent un état fortement activé, ce qui

pourrait entraîner une dilution des azides disponibles à la surface en raison soit du métabolisme cellulaire conduisant au renouvellement des sucres membranaires soit en raison de la division cellulaire.

1.2.1. Hypothèse d'un recyclage métabolique des glycanes azidés

Ces phénomènes d'internalisation de fluorescence, liés au DBCO fluorescent ou à des nanoparticules, et la perte d'azides ont été observés dans plusieurs études. Kang *et al.* ont montré que les cellules, traitées avec des azido-sucres, n'interagissaient avec un DBCO fluorescent que pendant 3 jours, sans fournir davantage d'explications sur cette perte d'azides [275]. Tomas et Gibson, en couplant des polymersomes sur des cellules A549 *via* la SPAAC, ont constaté que les polymersomes restaient à la surface des cellules pendant 4 jours, et ont suggéré que la perte d'azides pourrait être liée au recyclage membranaire provoquant l'internalisation des glycanes [107]. Yamagishi *et al.*, en utilisant une sonde DBCO-fluorescente sur des cellules HeLa modifiées, ont observé par microscopie confocale que la fluorescence était d'abord localisée dans le réticulum endoplasmique avant d'être transportée vers les lysosomes, puis l'appareil de Golgi [276]. Enfin, Wang *et al.* ont suggéré que le DBCO-Cy5 pouvait s'internaliser passivement, détectant une fluorescence dans les endosomes et les lysosomes des cellules cancéreuses modifiées *in vivo* [277].

Perspectives : Pour explorer le lien entre l'instabilité des glycanes azidés à la surface des cellules et leur recyclage métabolique, il serait pertinent d'utiliser des azido-sucres marqués au carbone 13 (^{13}C), un isotope stable avec une masse légèrement supérieure au ^{12}C , isotope naturel. En marquant l'azido-sucre avec du ^{13}C , il serait possible de suivre son intégration dans les intermédiaires métaboliques. Cette approche, couplée à la spectrométrie de masse, permettrait de distinguer le ^{13}C du ^{12}C en fonction de leur masse et de suivre leur répartition dans les produits métaboliques. Par exemple, Bhowmik *et al.* ont utilisé cette technique pour analyser le métabolisme des composés phosphorylés dans des voies comme la glycolyse et le cycle de Krebs [278], et Cocuron et Alonso ont suivi les voies de la glycolyse et des pentoses phosphates [279]. Dans notre projet, marquer les azido-sucres (Ac_4ManNAz ou Ac_4GalNAz) avec du ^{13}C et les incubés avec les DOT pendant une semaine avec des prélèvements réguliers permettrait, *via* la spectrométrie de masse, de quantifier l'incorporation du ^{13}C dans les voies

de glycosylation et de recyclage des membranes. La détection du ^{13}C dans ces voies confirmerait le lien entre l'instabilité des glycanes azidés et leur recyclage métabolique.

De plus, il serait intéressant d'examiner si la liaison avec le FAM-DBCO ralentit l'internalisation et la perte des glycanes à la surface. Dans notre étude, nous avons remis les DOT en culture pendant plusieurs jours avant de réaliser la réaction click avec le FAM-DBCO. Nous pourrions inverser ce processus en effectuant la réaction click juste après l'ajout des azido-sucres, puis remettre les cellules en culture pour observer l'intensité de fluorescence. D'après Tomas et Gibson, la réaction click avec les polymersomes n'empêche pas les neuraminidases de cliver les sialoglycoconjugués à la membrane [107]. Nous pourrions confirmer ces résultats à l'aide de l'Incucyte, un système d'imagerie cellulaire en temps réel, permettant de suivre la fluorescence du FAM-DBCO au fil du temps. Les DOT seraient incubées avec des azido-sucres pendant 48h, puis avec le FAM-DBCO pendant 30min, avant d'être remises en culture. Une diminution de la fluorescence indiquerait une perte des azides malgré la liaison au FAM-DBCO.

1.2.2. Hypothèse de la division cellulaire

Bien que les DOT ne soient pas réputées pour une division cellulaire importante après expansion, cette division pourrait expliquer la perte de fluorescence du FAM-DBCO à leur surface, indiquant une perte des glycanes modifiés. Plusieurs études, dont celle de Tomas et Gibson, ont abordé cette problématique. Ils ont observé une réduction de 50 à 60% de la fluorescence 48h après la réaction click, due à la division cellulaire et à la perte des polymersomes de surface, avec une diminution plus modérée après 72h [107]. Dans une autre étude, Baskin *et al.* ont utilisé la réaction click pour suivre la distribution des glycanes dans le développement embryonnaire. Après injection d'azido-sucres dans des embryons de poisson-zèbre, marqués avec des sondes fluorescentes *via* la SPAAC, ils ont observé que la fluorescence, initialement répartie uniformément, devenait plus intense au niveau du sillon de clivage pendant l'anaphase, avant de s'estomper à la fin de la division cellulaire. Cette disparition serait due à la production de nouveaux glycanes sans azide, remplaçant les glycanes modifiés [280]. Dans notre cas, il est possible que deux populations cellulaires coexistent dans nos cultures : une avec une prolifération très réduite, voire arrêtée, et une autre avec une prolifération dite « normale ». Cela pourrait expliquer pourquoi certaines

cellules conservent une fluorescence de surface jusqu'à 7 jours après la culture, tandis que d'autres la perdent après seulement 3 jours (**Figure 35**).

Perspectives : Pour explorer ce lien possible entre l'instabilité des glycanes azidés à la surface des cellules (référée par la fluorescence du FAM-DBCO) et la prolifération des DOT, il serait pertinent de réaliser un test de prolifération à l'aide de l'estérase succinimidyl de la carboxyfluorescéine (CFSE). Le CFSE, un colorant fluorescent vert, marque les molécules intracellulaires et se répartit lors de la division cellulaire entre les cellules filles, permettant ainsi de suivre la prolifération [281], [282]. La prolifération des DOT seules ou couplées au FAM-DBCO pourrait être évaluée par cytométrie en flux en observant la dilution du CFSE, comparée à celle du FAM-DBCO. Une corrélation positive entre ces deux dilutions indiquerait que la perte des azides est en partie liée à la prolifération cellulaire. De plus, un suivi en temps réel avec un système d'imagerie automatisé tel que l'Incucyte permettrait de visualiser directement la division cellulaire et ainsi tester cette hypothèse.

Bien que la stabilité des glycanes modifiés à la surface des cellules soit un point crucial à vérifier, les mécanismes de recyclage ou de division cellulaire mentionnés au-dessus ne devraient pas compromettre le potentiel de notre biohybride. En effet, le but serait d'ajouter les polymersomes à la surface des cellules dès la fin de la culture avec les azido-sucres. Les biohybrides formés seraient immédiatement injectés chez le patient, de sorte que les cellules n'aient pas le temps de se diviser ou de recycler leur membrane avant que le biohybride n'atteigne le site d'intérêt.

2. Mise en œuvre du biohybride « DOT – polymersome »

La seconde étape de ce travail consistait à mettre au point notre biohybride à l'aide de la SPAAC. Ce dernier s'appuie sur le couplage des polymersomes fonctionnalisés avec du DBCO avec les DOT métaboliquement modifiées à l'aide de l'Ac₄ManNAz. Tout au long de ce processus, nous avons réalisé des tests de vérification de la disponibilité des azides et du DBCO en utilisant respectivement du FAM-DBCO et un azide fluorescent.

Sélection de la taille des polymersomes : Deux tailles principales de polymersomes ont été testées : 200nm et 1µm. Le but ici était d'avoir des polymersomes d'une taille assez importante pour empêcher leur potentielle internalisation par la cellule, que ce soit *via* un

processus actif ou passif, tout en évitant une taille excessive qui pourrait perturber les fonctions naturelles des cellules en raison d'un encombrement stérique. Ce choix nous a également permis d'évaluer le comportement des cellules face à des polymersomes de tailles plutôt éloignées. Nous avons observé une réaction click relativement efficace lorsque les polymersomes de 200nm étaient incubés avec les DOT, tandis qu'aucune réaction n'a été détectée avec les polymersomes de 1 μ m (**Figure 46**). Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que la SPAAC est contrôlée par la diffusion. En effet, dans ce type de réaction, la transformation chimique, ici la SPAAC, est si rapide que la vitesse de la réaction dépend principalement de la diffusion des molécules et de leur probabilité de rencontre, plutôt que de la rapidité de leur interaction une fois en contact. Ainsi, la diffusion des objets à travers le milieu devient déterminante. La diffusion des nanoparticules, qui correspond à leur déplacement dans un milieu, est influencée par divers facteurs, notamment leur taille. Plus un objet est petit, plus il diffuse rapidement, facilitant ainsi la rencontre et réduisant le risque d'encombrement stérique qui pourrait bloquer l'interaction. Par conséquent, plus les objets en interaction sont grands, plus leur diffusion est lente, ce qui impacte directement la vitesse de la réaction contrôlée par la diffusion [283]. Dans notre cas, cette théorie pourrait expliquer pourquoi nous avons observé une réaction click avec les polymersomes de 200nm, mais pas avec ceux de 1 μ m. C'est pour cette raison que nous avons décidé de poursuivre les expériences avec les polymersomes de 200nm.

Disponibilité du DBCO : Lors de nos optimisations, nous avons rencontré des difficultés à établir une interaction efficace entre les cellules et les polymersomes. Les cellules ont tendance à sédimenter rapidement au fond des puits de culture, tandis que les polymersomes restent en suspension en raison de leurs propriétés versatiles. Pour pallier à ce problème, nous avons effectué la réaction click dans un faible volume de milieu (10 μ l) dans des plaques à fond conique. Afin d'améliorer la disponibilité du DBCO à la surface des polymersomes, nous avons allongé le polymère contenant le DBCO en ajoutant des molécules de PEG entre le DBCO et le NHS (**Figure 44**). Cependant, cet allongement n'a pas amélioré l'efficacité de la réaction click, probablement en raison d'un encombrement stérique menant à une altération de la réaction.

Répartition hétérogène des polymersomes : Nous avons également observé une répartition non homogène des polymersomes à la surface des cellules. Certaines DOT en possédaient beaucoup tandis que d'autres n'en avaient très peu voire aucun. Or, comme mentionné

précédemment, des tests de vérification de la disponibilité des azides à la surface des cellules et du DBCO sur les polymersomes ont été effectués. Le problème semble donc provenir de la rencontre entre les deux entités. Cette hétérogénéité pourrait s'expliquer par l'utilisation de plaques de culture à fond conique, condition défavorable à la rencontre. Comme expliqué plus haut, la SPAAC est fortement dépendante de la diffusion des nanoparticules. Dans des plaques à fond conique, les cellules forment plusieurs couches et, malgré une homogénéisation à mi-incubation, peut-être que les polymersomes ne parviennent pas à diffuser à travers ces couches. Certaines cellules, probablement situées en surface, interagissent fortement avec les nanoparticules, tandis que celles au fond du puits n'en rencontrent aucune. Une optimisation des conditions d'incubation lors de la SPAAC serait donc nécessaire pour parfaire la production des biohybrides.

3. Perspectives globales du projet

3.1. Perspectives à court terme : validations *in vitro* avec des polymersomes vides

Ce projet a donc permis le développement d'un biohybride couplant les DOT et les polymersomes à l'aide de la réaction click et plus particulièrement de la SPAAC. Toutefois, plusieurs étapes de validations restent nécessaires pour démontrer que ce biohybride est idéal dans le traitement de diverses pathologies comme les infections ou le cancer.

Optimisation des conditions de réaction click : Comme mentionné dans le chapitre précédent, les DOT ne sont pas uniformément recouvertes de polymersomes, certaines en présentent une grande quantité à leur surface, tandis que d'autres en ont très peu, voire aucun (**Figure 47**). Pour valider l'hypothèse des différentes couches cellulaires évoquées, il serait pertinent d'optimiser les conditions d'incubation en optant pour des plaques de culture à fond plat. Une quantification précise du nombre de cellules serait nécessaire afin de ne recouvrir que le fond du puits, sans superposition de plusieurs couches, garantissant ainsi à chaque DOT une probabilité équivalente d'interagir avec les polymersomes. Il serait également important de maintenir un faible volume d'incubation et d'envisager l'ajout d'une légère agitation constante, par un mouvement de balancier, afin d'améliorer l'homogénéité des interactions.

Tests fonctionnels d'activation polyclonale avec un anti-CD3 : Dans un premier temps il est primordial de vérifier que l'ajout de polymersomes, même vides, n'altère pas la capacité d'activation des DOT. Leur activation par le TCR, phénomène classique d'activation des DOT, pourrait donc être testée comme par une activation *via* un anti-CD3, suivie d'une mesure de la sécrétion d'IFN γ , comme réalisé plus tôt dans ce projet (**Figure 36**). Un phénotypage en cytométrie en flux permettrait également d'observer l'expression de marqueurs d'activation tels que 4-1BB et CD40L, deux récepteurs de costimulation rapidement exprimés après activation et jouant un rôle clé dans l'amplification des fonctions des LT $\gamma\delta$ [189], [284]. Cependant, nos résultats montrent que toutes les cellules ne réussissent pas la réaction click avec les polymersomes (**Figure 47**), nécessitant un tri préalable. Utiliser un trieur FACSAria (BD) permettrait donc de séparer les cellules non fonctionnalisées (qui serviraient de contrôle) des celles fonctionnalisées avec les polymersomes, à l'aide de leur fluorescence.

Tests de réactivités anti-virale et anti-tumorale *in vitro* : Les biohybrides DOT - polymersome devront ensuite être testés dans des conditions d'activation plus physiologiques, notamment à l'aide de co-cultures. L'idée principale serait de tester l'activité de notre biohybride dans deux contextes différents : un contexte infectieux à l'aide de modèles utilisant le CMV et un contexte tumoral à l'aide de modèles de GBM.

Plusieurs études, y compris certains travaux de notre équipe, ont mis en lumière le rôle des DOT dans la reconnaissance des cellules infectées par le CMV. Il a été démontré que les DOT peuvent identifier des fibroblastes, des macrophages ou des cellules endothéliales uniquement lorsque ces cellules sont infectées, et qu'ils sont capables de sécréter des cytokines antivirales comme l'IFN γ . Des co-cultures ont également révélé la sécrétion d'effecteurs solubles, notamment l'IP-10, l'I-TAC et le GM-CSF, qui jouent un rôle important dans le recrutement de cellules immunitaires sur les sites d'infection, renforçant ainsi l'immunité adaptative contre le CMV. De plus, les DOT montrent une cytotoxicité directe envers les fibroblastes infectés *via* des mécanismes de dégranulation (Marsères *et al.*, en révision dans Nature Communication). Ces résultats établissent une base solide pour l'évaluation des DOT fonctionnalisés avec des polymersomes. Cela permettrait de déterminer si la modification des glycanes de surface par des azides, ou l'ajout de polymersomes, altère leur capacité à reconnaître les cellules infectées.

Par ailleurs, pour valider la polyvalence de ce biohybride, il serait pertinent d'évaluer son activité contre des lignées tumorales, en particulier dans le contexte du GBM. Dans notre laboratoire, la réactivité des DOT contre des lignées cellulaires de GBM (U87, U251, U343, U373) et des cellules à caractère souche de GBM (GSC) dérivées de patients (P3, BDX6, BDX7, BDX8, BDX10) a déjà été démontrée. Ces analyses ont montré une cytotoxicité dose - dépendante des DOT, induisant l'apoptose des cellules tumorales, et cela avec des résultats reproductibles chez différents donneurs de DOT. En culture 3D, à partir de sphéroïdes de GSC, les DOT ont montré une cytotoxicité accrue, associée à une sécrétion de granzyme et perforine et à une élimination complète des sphéroïdes, surtout en présence d'IL-15 (Marsères *et al.*, en révision dans Nature Communication). Nous pourrions reproduire les tests déjà effectués en utilisant notre biohybride et comparer les niveaux de cytotoxicité obtenus à ceux des études précédentes. L'utilisation de sphéroïdes permettrait aussi d'évaluer la capacité de ce biohybride à infiltrer les masses tumorales, ce qui constituerait un indicateur clé de son efficacité en thérapie anticancéreuse.

3.2. Perspectives à moyen terme : Validation *in vivo* avec des polymersomes vides

Pour envisager l'utilisation du biohybride en essais cliniques, des tests *in vivo* sont essentiels pour garantir l'efficacité et la sécurité du biohybride. La sélection de modèles pertinents pour l'étude des $LT\gamma\delta$ est complexe à cause des différences inter-espèces, mais les modèles humanisés peuvent aider. Ces modèles permettront de valider la réactivité des biohybrides dans un environnement biologique complet, en étudiant les interactions cellulaires, la biocompatibilité et leur capacité à infiltrer les sites d'intérêt. Du fait de la fluorescence des biohybrides, l'imagerie en temps réel et la cytométrie en flux serviront à évaluer leur distribution et persistance dans les tissus.

Modèles humanisés : Il a été montré que le CMV humain (HCMV) n'infecte pas les souris, et que les DOT humains ne réagissaient pas contre des cellules murines infectées par le CMV murin (MCMV) *in vitro* (Marsères *et al.*, en révision dans Nature Communication). Ainsi un modèle murin humanisé pourrait reproduire une infection par le CMV. Un modèle prometteur consiste à injecter par voie intra-splénique des fibroblastes infectés par le HCMV chez des souris immunodéficientes greffées avec des PBMC humains [285]. Ce modèle est déjà utilisé pour tester des thérapies anti-HCMV, et, dans notre laboratoire, pour évaluer la réactivité des

DOT amplifiées contre ce virus. Bien que ce modèle ait permis de démontrer la présence de DOT sur les sites infectieux, il est important de noter qu'il ne reproduit pas fidèlement l'infection des tissus humains par le HCMV. Dans notre contexte, il nous servirait à évaluer la capacité des biohybrides à cibler les sites infectieux par imagerie ou cytométrie en flux.

Un second modèle plus sophistiqué serait nécessaire pour étudier la toxicité et l'élimination du biohybride. En effet, lors de transfert allogénique, un processus de rejet des cellules « étrangères » est toujours observé. Le but de ce type de thérapie est donc de réussir à avoir un effet avant que ce mécanisme de rejet se mette en place. Bien que les DOT soient généralement bien tolérées lors de transferts allogéniques et que les polymersomes soient réputés biocompatibles, il est crucial de vérifier que l'ajout de ce polymersome à la surface des cellules n'accélère pas le processus d'élimination du biohybride, diminuant son potentiel d'action. Un modèle murin greffé de progéniteurs hématopoïétiques CD34+ recréant partiellement un système immunitaire humain permettrait d'observer l'interaction des biohybrides avec le système immunitaire et leur ciblage des sites infectieux [286]. Il nous permettrait d'évaluer la persistance du biohybride et de la comparer aux DOT seules afin de voir si l'ajout du polymersome a un quelconque effet sur cette caractéristique. Cependant, ce modèle est coûteux, chronophage (18 à 25 semaines pour une expérimentation complète) et complexe à mettre en place. De plus, bien que le système immunitaire humain soit partiellement reconstitué, il ne reproduit pas parfaitement la totalité des interactions immunitaires retrouvées chez l'Homme.

Modèles murins : Les modèles murins humanisés présentent des limitations, notamment une migration non optimale des DOT, observée principalement vers les poumons et le foie, qui ne sont ni les sites infectieux, ni les cibles privilégiées ou une mise en place trop complexe, et restent une mimétique artificielle d'un système dans un contexte *in vivo*. Une alternative serait d'adopter un modèle murin à 100%, en développant des biohybrides à partir de LT $\gamma\delta$ murins. Un protocole d'expansion des LT $\gamma\delta$ murins, inspiré de celui utilisé pour les DOT humaines [159], a déjà été développé au laboratoire. Il consiste à prélever des rates de souris C57BL/6, à dépléter simultanément les LT $\alpha\beta$ et les cellules NK, puis à amplifier les LT $\gamma\delta$ en présence d'IL-15, d'INF γ , d'IL-21, et d'IL-1 β . Les LT $\gamma\delta$ ainsi obtenus seraient ensuite métaboliquement modifiés et couplés à nos polymersomes, comme décrit dans le cadre de nos travaux. Ce biohybride serait ensuite injecté dans des souris immunodéficientes RAG-1,

infectées par le MCMV. Ce modèle permettrait d'étudier la persistance ainsi que les capacités d'activation et de migration des biohybrides dans un environnement plus physiologique que les modèles humanisés, tout en permettant des comparaisons avec des souris recevant uniquement des LT $\gamma\delta$ sans polymersome.

L'utilisation de modèles murins offre également la possibilité d'évaluer la toxicité potentielle de notre biohybride. Les LT $\gamma\delta$ murins, seuls ou couplés à des polymersomes, seraient injectés dans des souris sauvages (WT), et la réponse immunitaire serait mesurée à l'aide de divers marqueurs pour évaluer la biocompatibilité. Bien que le système immunitaire murin diffère de celui de l'Homme, ce modèle offrirait un système biologique complet pour observer à la fois le comportement du biohybride et la tolérance immunitaire face aux polymersomes.

3.3. Perspectives à long terme : Validation *in vivo* avec des polymersomes encapsulant un principe actif

Une dernière étape de validation de la faisabilité et de l'efficacité de notre biohybride serait de tester son activité en encapsulant un agent thérapeutique à l'intérieur des polymersomes. Bien que de nombreuses optimisations soient encore nécessaires au LCPO pour une encapsulation efficace, nous pouvons déjà envisager des modèles permettant de valider l'utilité de ce système. Comme précédemment, les analyses seraient réalisées par imagerie en temps réel et cytométrie en flux *via* de la fluorescence du polymersome.

Modèle CMV : Si ce dernier montre des résultats intéressants et pour simplifier la mise en œuvre de ces validations *in vivo*, il serait pertinent de conserver le modèle CMV murin précédemment mentionné. Ce modèle permet de tester de manière rigoureuse l'efficacité de notre biohybride. Des agents antiviraux (le Ganciclovir, le Valganciclovir ou le Maribavir) seraient encapsulés dans les polymersomes et la capacité du biohybride à délivrer ces traitements aux sites infectés serait évalué. L'intérêt des biohybrides par rapport à une utilisation systémique des antiviraux est un effet local qui limite la toxicité médullaire ou rénale de ces molécules. L'efficacité du biohybride pourrait être évaluée en termes de migration, de biocompatibilité et d'activité antivirale et serait alors comparée aux LT $\gamma\delta$ couplés ou non à des polymersomes vides.

Modèle GBM : Sur la base des résultats obtenus lors des tests *in vitro* avec les lignées de GBM, il serait pertinent de mettre en place un modèle murin afin de poursuivre la validation de notre biohybride dans ce contexte. Un agent chimio-thérapeutique serait encapsulé dans le polymersome et testé dans un modèle de xénogreffe dérivé de patients (PDX). Dans ce modèle, des cellules souches dérivées de patients (P3) seraient injectées par voie intracrânienne chez des souris Ragy2C^{-/-}, reproduisant la formation d'une tumeur [287]. Une fois la tumeur formée, le biohybride serait administré par injection intracrânienne ou intra-tumorale, permettant d'évaluer sa persistance et son effet sur la croissance tumorale. Les résultats seraient ensuite comparés à ceux obtenus avec des DOT seules ou couplées à des polymersomes vides.

L'une des limites potentielles de ce modèle réside dans les effets négatifs que la chimiothérapie pourrait avoir sur les DOT. Une stratégie en deux étapes pourrait être envisagée : d'abord, les DOT fonctionnalisées transporteraient les polymersomes vers la tumeur, exécutant leur action cytotoxique (sécrétion de perforine et granzyme), généralement effective en 24 à 72 heures [288]. Une fois les DOT épuisées (« exhaustion »), la chimiothérapie encapsulée serait libérée à l'aide d'un stimulus extérieur tel qu'un flash lumineux. Des données préliminaires obtenues au LCPO ont montré qu'il était possible d'intégrer des molécules photoclivables à l'intérieur du polymersome permettant une libération de son contenu par choc osmotique après l'administration d'un flash lumineux (données non représentées). Nous pourrions également imaginer que la chimiothérapie libérée pourrait être utilisée pour éliminer les DOT en état d'épuisement. Cela permettrait potentiellement de limiter la réponse immunitaire due au transfert adoptif comme énoncé précédemment mais également de freiner une éventuelle prolifération anormale des DOT modifiées avec les polymersomes. Ce modèle pourrait ainsi prouver la potentielle approche synergique de notre biohybride : une première phase de destruction tumorale *via* les DOT, suivie d'une phase d'élimination des cellules tumorales et des DOT modifiées par la chimiothérapie encapsulée dans les polymersomes, optimisant le potentiel thérapeutique contre le GBM.

4. Ouvertures

Dans ce travail, nous avons démontré les bénéfices de la chimie click, et en particulier de la réaction SPAAC, pour le couplage de nanoparticules avec des cellules dans le but d'améliorer les thérapies ciblées. Nous avons opté pour l'utilisation des LT $\gamma\delta$ et des polymersomes afin de réaliser ultérieurement une preuve de concept avec les modèles MCMV / HCMV et GBM disponibles au laboratoire. Néanmoins, cette approche pourrait être adaptée à d'autres contextes, en envisageant le couplage de polymersomes à la surface d'autres types de cellules ou en greffant différentes entités sur les cellules. Ces perspectives seront développées dans les chapitres suivants.

4.1. Modification métabolique de diverses cellules

La modification métabolique des cellules couplée à la chimie click, se révèle adaptable à de nombreux contextes pathologiques. Tout d'abord, nos résultats ont montré que la modification métabolique par l'Ac₄ManNAz ou l'Ac₄GalNAz, suivie d'une réaction click avec le FAM-DBCO, était applicable aux LT mais également à d'autres cellules que nous avons nommées non-CD3 (**Figures 31, 32**). De plus, plusieurs études de preuve de concept ont prouvé la faisabilité d'appliquer cette méthode sur diverses cellules tumorales. Kang *et al.* ont réussi à modifier métaboliquement des lignées cellulaires tumorales (KB, A549, U87MG, MCF-7, MDA-MB-468, et MDA-MB-436) pour marquer ces cellules *in vivo* avec du DBCO fluorescent [275]. De même, Lee et Zhang ont démontré la possibilité de modifier métaboliquement des cellules tumorales pulmonaires (A549) et coliques (CT26) pour y attacher des polymersomes couplés au BCN ou des micelles polymériques *via* la SPAAC ou la réaction de Staudinger-Bertozzi respectivement [289], [290].

Les macrophages, en raison de leur rôle immunitaire, représentent des vecteurs intéressants pour les nanoparticules, notamment pour la réparation tissulaire. Mao et son équipe ont montré que la modification métabolique des macrophages pouvait être bénéfique lors de la réparation tissulaire à l'aide d'un modèle imitant la matrice extracellulaire [291]. De plus, Xie *et al.* ont montré que les neutrophiles, bien que difficiles à cultiver, pouvaient aussi être modifiés sans perte de viabilité, contribuant à la phagocytose et à la polarisation anti-inflammatoire des macrophages [292]. Ces études suggèrent que la modification métabolique

de ces cellules immunitaires peut être utile dans diverses thérapies, notamment pour traiter des pathologies inflammatoires.

Ces résultats indiquent que la modification métabolique suivie de la réaction click peut être appliquée à divers types de cellules immunitaires, telles que les LT, macrophages et neutrophiles, pour des applications thérapeutiques et cliniques dans des domaines comme la lutte contre le cancer, la réparation tissulaire et le traitement des inflammations.

4.2. Utilisation de la SPAAC pour lier d'autres entités chimiques à la surface des cellules

La technologie de chimie click, notamment *via* la SPAAC, offre des perspectives d'optimisation des thérapies ciblées en couplant des cellules immunitaires à d'autres entités chimiques que des nanoparticules, telles que des anticorps. Par exemple, des études comme celle de Gong *et al.* ont démontré la possibilité de lier des anticorps à des oligonucléotides *via* la SPAAC. Cette conjugaison repose sur la fonctionnalisation de cet anticorps avec un DBCO-PEG₅-NHS au niveau de ses chaînes latérales amines *via* une interaction NH₂-NHS. Cet anticorps peut ensuite être lié de manière covalente à un oligonucléotide modifié par un azide [293].

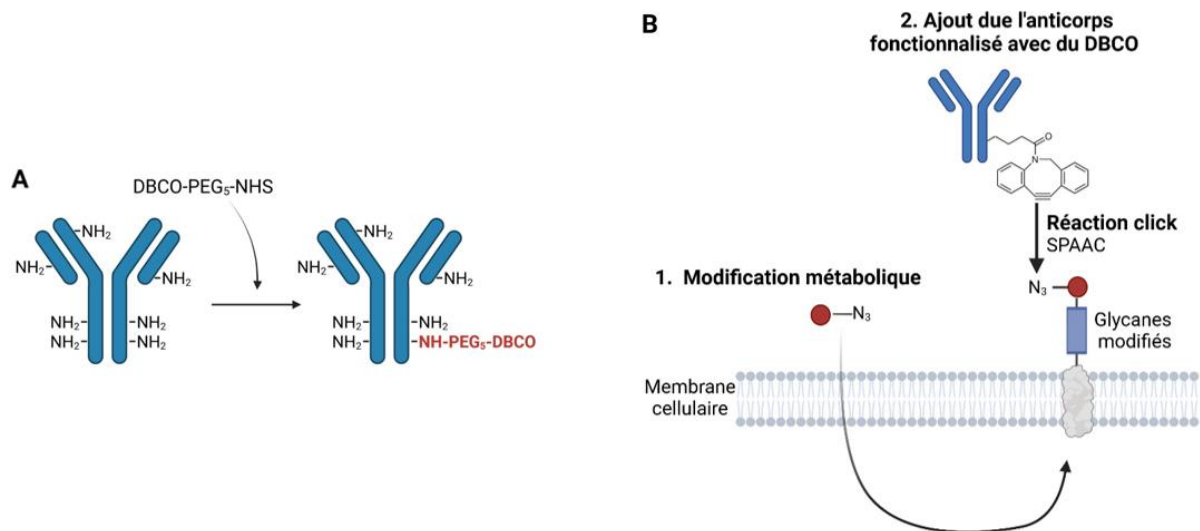


Figure 48 : Représentation schématique de la modification des anticorps avec un DBCO et incorporation à la membrane cellulaire.

L'anticorps peut être fonctionnalisé avec un DBCO-PEG₅-NHS au niveau de ses chaînes latérales amines via une interaction NH₂-NHS. Cet anticorps peut ensuite être couplé à la membrane cellulaire à l'aide de la SPAAC. Ce protocole permet la création d'un biohybride où l'anticorps peut améliorer le ciblage des DOT tout en jouant un rôle sur la DOT elle-même ou sur l'environnement. Créée avec BioRender.com

Une étude similaire a été réalisée par Wiener *et al.* dans laquelle ils ont utilisé la SPAAC afin de créer un anticorps couplé avec un simple ou un double oligonucléotide pour améliorer les outils de diagnostic au niveau protéique [294]. Sur la base de ces études, nous pourrions envisager de coupler des anticorps fonctionnalisés avec du DBCO à des cellules immunitaires pour améliorer différentes propriétés selon l'anticorps choisi. Cela permettrait d'optimiser le ciblage des sites tumoraux ou inflammatoires, de moduler l'environnement tumoral, de favoriser le recrutement d'autres cellules immunitaires sur le site d'intérêt ou encore de renforcer l'interaction avec les cellules cibles. Selon l'anticorps sélectionné, il serait possible d'activer des voies métaboliques menant à la destruction des cellules tumorales ou immunosuppressives. Nous développerons ci-après quelques exemples illustrant ces approches.

Ainsi, dans le cadre du cancer, une stratégie potentielle serait de coupler des DOT à des anticorps ciblant les marqueurs PD-L1 ou CD80/CD86. En effet, comme mentionné dans l'introduction de ce travail, les LT expriment des récepteurs inhibiteurs à leur surface tels que PD-1 et CTLA-4, qui interagissent respectivement avec les ligands PD-L1 et CD80/CD86 [174], [175]. Lors d'un développement tumoral, les cellules cancéreuses mettent en place des mécanismes d'évasion immunitaire, notamment *via* l'expression de ces ligands, inhibant ainsi l'activation des LT infiltrant la tumeur. En couplant des anticorps dirigés contre ces marqueurs aux DOT *via* la SPAAC, nous pourrions non seulement améliorer le ciblage des cellules cancéreuses, mais aussi bloquer ces mécanismes d'échappement, facilitant une meilleure reconnaissance des cellules tumorales et une activation plus efficace des LT, renforçant ainsi potentiellement la réponse immunitaire antitumorale.

Une autre stratégie consisterait à utiliser un anticorps pour rapprocher physiquement une cellule immunitaire de sa cible, facilitant ainsi la formation de la synapse immunitaire. Un des modèles envisageables pour démontrer cela serait l'utilisation de fibroblastes HT29 infectés par le CMV. Les cellules infectées par le CMV sont reconnues par les LT $\gamma\delta$ *via* l'interaction entre le TCR $\gamma\delta$ et l'EPCR, bien que cette interaction ne soit pas toujours optimale [141]. Pour améliorer cette synapse, nous pourrions coupler des LT $\gamma\delta$ avec un anticorps permettant de rapprocher les deux cellules. Par exemple, un anticorps anti-EphA2, récepteur fortement exprimé sur les cellules infectées, pourrait être une option envisageable. Cet anticorps ne

jouerait alors aucun rôle biologique direct, mais servirait uniquement à rapprocher les cellules pour faciliter leur interaction.

Ce chapitre montre les nombreuses possibilités qu'offre la modification métabolique de cellules *via* la chimie click, applicable à divers contextes pathologiques, en fonction des besoins thérapeutiques.

CONCLUSION

En conclusion, ce travail de thèse a permis de développer **un biohybride innovant** associant des **DOT** métaboliquement modifiés à des **polymersomes** fonctionnalisés grâce à la chimie click, et plus précisément la réaction **SPAAC**. L'optimisation des conditions de culture pour la modification métabolique à l'aide d'un DBCO fluorescent (FAM-DBCO), d'abord sur des lignées cellulaires comme JRT3 LES et les PBMC, puis sur les DOT, a permis de faire la preuve du concept de fonctionnalisation métabolique de ces types cellulaires. Par la suite, l'élaboration du protocole avec des polymersomes vides, ainsi que le développement d'une méthode de quantification de ces derniers, a permis de définir des conditions optimales pour la création du biohybride. La limitation de la disponibilité des polymersomes permettant l'établissement de nos biohybride restant un facteur limitant, des optimisations ainsi que des tests fonctionnels supplémentaires soient nécessaires pour valider pleinement la fonctionnalité de ce biohybride. Cependant, les résultats obtenus constituent une base prometteuse pour le développement de nouvelles stratégies utilisant les DOT ainsi que les polymersomes. De plus, la flexibilité qu'offre la chimie click permettrait de l'adapter à différents types cellulaires et d'autres entités chimiques, ouvrant ainsi des perspectives pour améliorer le développement de thérapies ciblées et d'outils de diagnostic.

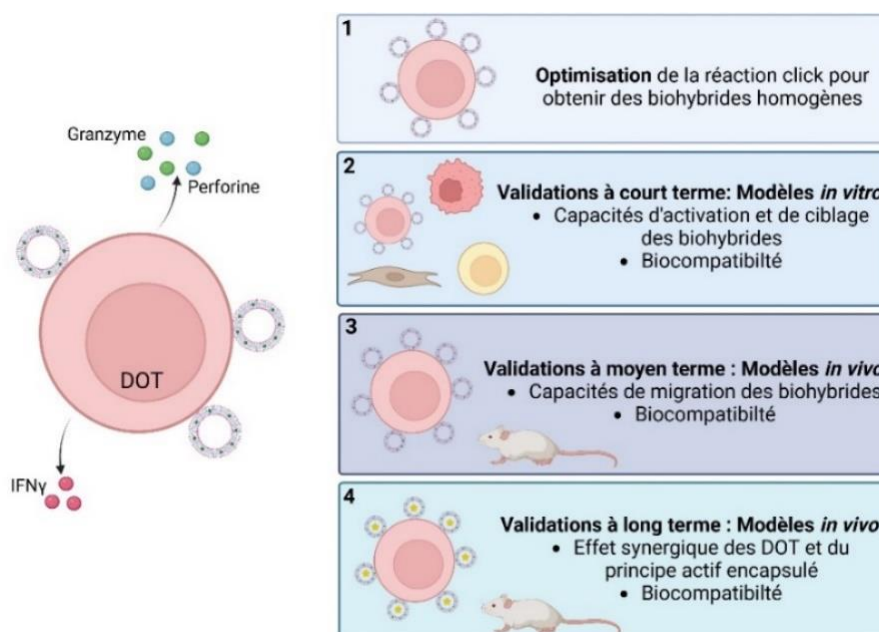


Figure 49 : Schéma de conclusion

Ce travail a mené à l'élaboration de biohybrides composés de DOT, métaboliquement modifiées avec des azido-sucres, et des polymersomes fonctionnalisés avec du DBCO. Les protocoles mis en place lors de ce projet ont présenté quelques limites et des optimisations et validations sont à prévoir afin de parfaire cet outil thérapeutique. **1.** Optimisation des conditions de culture afin d'obtenir une suspension cellulaire homogène avec des DOT suffisamment recouvertes de polymersomes. **2.** Des tests *in vitro* validant les capacités d'activation et de ciblage du biohybride formé ainsi que sa biocompatibilité. **3.** Tests *in vivo* validant les capacités de reconnaissance et de migration du biohybride formé ainsi que sa biocompatibilité. **4.** Test *in vivo* validant les bénéfices thérapeutiques qu'apporte ce biohybride avec un effet synergique de l'activité des DOT et du principe actif encapsulé dans les polymersomes. Créée avec BioRender.com. DOT : Delta One T cell, IFN γ : Interféron γ

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. P. Feynman, « There's Plenty of Room at the Bottom », *Eng. Sci.*, vol. 23, n° 5, Art. n° 5, févr. 1960.
- [2] « The Nobel Prize in Physics 1965 », NobelPrize.org. Consulté le: 16 août 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1965/feynman/facts/>
- [3] Taniguchi, « On the Basic Concept of "Nano-Technology" », *Proc Intl Conf Prod Eng Tokyo Part II 1974*, 1974, Consulté le: 16 août 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1572261550373135488>
- [4] Z. Salehahmadi et F. Hajiliasgari, « Nanotechnology Tolls the Bell for Plastic Surgeons », *World J. Plast. Surg.*, vol. 2, n° 2, p. 71-80, juin 2013.
- [5] F. Crick et J. Knäblein, Éd., *Modern biopharmaceuticals: design, development and optimization*. Weinheim ; Chichester: Wiley-VCH, 2005.
- [6] P. Couvreur et C. Vauthier, « Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease », *Pharm. Res.*, vol. 23, n° 7, p. 1417-1450, juill. 2006, doi: 10.1007/s11095-006-0284-8.
- [7] D. Peer, J. M. Karp, Seungpyo Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, et R. Langer, « Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy », *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, n° 12, p. 751-760, déc. 2007, doi: 10.1038/nnano.2007.387.
- [8] R. T. Stiepel, E. Duggan, C. J. Batty, et K. M. Ainslie, « Micro and nanotechnologies: The little formulations that could », *Bioeng. Transl. Med.*, vol. 8, n° 2, p. e10421, 2023, doi: 10.1002/btm2.10421.
- [9] A. C. Powell, G. F. Paciotti, et S. K. Libutti, « Colloidal gold: a novel nanoparticle for targeted cancer therapeutics », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 624, p. 375-384, 2010, doi: 10.1007/978-1-60761-609-2_25.
- [10] L. A. Dykman et N. G. Khlebtsov, « Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects », *Acta Naturae*, vol. 3, n° 2, p. 34-55, avr. 2011.
- [11] « Société Chimique de France », 2019.
- [12] A. B. G. Lansdown, « GOLD: human exposure and update on toxic risks », *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 48, n° 7, p. 596-614, août 2018, doi: 10.1080/10408444.2018.1513991.
- [13] A. Puri *et al.*, « Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic », *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, vol. 26, n° 6, p. 523-580, 2009, doi: 10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v26.i6.10.
- [14] A. D. Bangham et R. W. Horne, « NEGATIVE STAINING OF PHOSPHOLIPIDS AND THEIR STRUCTURAL MODIFICATION BY SURFACE-ACTIVE AGENTS AS OBSERVED IN THE ELECTRON MICROSCOPE », *J. Mol. Biol.*, vol. 8, p. 660-668, mai 1964, doi: 10.1016/s0022-2836(64)80115-7.
- [15] M. Sarfraz *et al.*, « Development of Dual Drug Loaded Nanosized Liposomal Formulation by A Reengineered Ethanolic Injection Method and Its Pre-Clinical Pharmacokinetic Studies », *Pharmaceutics*, vol. 10, n° 3, p. 151, sept. 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10030151.
- [16] S. Tenzer *et al.*, « Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology », *Nat. Nanotechnol.*, vol. 8, n° 10, p. 772-781, oct. 2013, doi: 10.1038/nnano.2013.181.

- [17] H. H. Gustafson, D. Holt-Casper, D. W. Grainger, et H. Ghandehari, « Nanoparticle uptake: The phagocyte problem », *Nano Today*, vol. 10, n° 4, p. 487-510, août 2015, doi: 10.1016/j.nantod.2015.06.006.
- [18] M. J. Mitchell, M. M. Billingsley, R. M. Haley, M. E. Wechsler, N. A. Peppas, et R. Langer, « Engineering precision nanoparticles for drug delivery », *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 20, n° 2, p. 101-124, févr. 2021, doi: 10.1038/s41573-020-0090-8.
- [19] S. A. Moosavian, V. Bianconi, M. Pirro, et A. Sahebkar, « Challenges and pitfalls in the development of liposomal delivery systems for cancer therapy », *Semin. Cancer Biol.*, vol. 69, p. 337-348, févr. 2021, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.09.025.
- [20] M. Fonseca, I. Jarak, F. Victor, C. Domingues, F. Veiga, et A. Figueiras, « Polymersomes as the Next Attractive Generation of Drug Delivery Systems: Definition, Synthesis and Applications », *Materials*, vol. 17, n° 2, p. 319, janv. 2024, doi: 10.3390/ma17020319.
- [21] M. Shahriari, S. M. Taghdisi, K. Abnous, M. Ramezani, et M. Alibolandi, « Self-targeted polymersomal co-formulation of doxorubicin, camptothecin and FOXM1 aptamer for efficient treatment of non-small cell lung cancer », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 335, p. 369-388, juill. 2021, doi: 10.1016/j.jconrel.2021.05.039.
- [22] C. Lebleu, L. Rodrigues, J.-M. Guigner, A. Brûlet, E. Garanger, et S. Lecommandoux, « Self-Assembly of PEG-b-PTMC Copolymers: Micelles and Polymersomes Size Control », *Langmuir ACS J. Surf. Colloids*, vol. 35, n° 41, p. 13364-13374, oct. 2019, doi: 10.1021/acs.langmuir.9b02264.
- [23] R. Wehr, J. Gaitzsch, D. Daubian, C. Fodor, et W. Meier, « Deepening the insight into poly(butylene oxide)-block-poly(glycidol) synthesis and self-assemblies: micelles, worms and vesicles », *RSC Adv.*, vol. 10, n° 38, p. 22701-22711, juin 2020, doi: 10.1039/D0RA04274A.
- [24] J. Habel *et al.*, « Selecting analytical tools for characterization of polymersomes in aqueous solution », *RSC Adv.*, vol. 5, n° 97, p. 79924-79946, sept. 2015, doi: 10.1039/C5RA16403F.
- [25] S. Jain, M. H. E. Dyrda, X. Gong, L. E. Scriven, et F. S. Bates, « Lyotropic Phase Behavior of Poly(ethylene oxide)-Poly(butadiene) Diblock Copolymers: Evolution of the Random Network Morphology », *Macromolecules*, vol. 41, n° 9, p. 3305-3316, mai 2008, doi: 10.1021/ma702322b.
- [26] S. Förster, B. Berton, H.-P. Hentze, E. Krämer, M. Antonietti, et P. Lindner, « Lyotropic Phase Morphologies of Amphiphilic Block Copolymers », *Macromolecules*, vol. 34, n° 13, p. 4610-4623, juin 2001, doi: 10.1021/ma001923h.
- [27] S. Li, B. Byrne, J. Welsh, et A. F. Palmer, « Self-assembled poly(butadiene)-b-poly(ethylene oxide) polymersomes as paclitaxel carriers », *Biotechnol. Prog.*, vol. 23, n° 1, p. 278-285, 2007, doi: 10.1021/bp060208+.
- [28] N. Chiannikulchai, N. Ammouy, B. Caillou, J. Ph. Devissaguet, et P. Couvreur, « Hepatic tissue distribution of doxorubicin-loaded nanoparticles after i.v. administration in reticulosarcoma M 5076 metastasis-bearing mice », *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 26, n° 2, p. 122-126, mai 1990, doi: 10.1007/BF02897257.
- [29] A. Abuchowski, T. Van Es, N. C. Palczuk, et F. F. Davis, « Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. », *J. Biol. Chem.*, vol. 252, n° 11, p. 3578-3581, juin 1977, doi: 10.1016/S0021-9258(17)40291-2.
- [30] A. Abuchowski, J. R. McCoy, N. C. Palczuk, T. Van Es, et F. F. Davis, « Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver

- catalase. », *J. Biol. Chem.*, vol. 252, n° 11, p. 3582-3586, juin 1977, doi: 10.1016/S0021-9258(17)40292-4.
- [31] D. Bazile, C. Prud'homme, M. Bassoullet, M. Marlard, G. Spenlehauer, et M. Veillard, « Stealth Me. PEG-PLA Nanoparticles Avoid Uptake by the Mononuclear Phagocytes System », *J. Pharm. Sci.*, vol. 84, n° 4, p. 493-498, avr. 1995, doi: 10.1002/jps.2600840420.
- [32] F. M. Veronese et G. Pasut, « PEGylation, successful approach to drug delivery », *Drug Discov. Today*, vol. 10, n° 21, p. 1451-1458, nov. 2005, doi: 10.1016/S1359-6446(05)03575-0.
- [33] A. S. Narang, R.-K. Chang, et M. A. Hussain, « Pharmaceutical development and regulatory considerations for nanoparticles and nanoparticulate drug delivery systems », *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, n° 11, p. 3867-3882, nov. 2013, doi: 10.1002/jps.23691.
- [34] H. Maeda, K. Tsukigawa, et J. Fang, « A Retrospective 30 Years After Discovery of the Enhanced Permeability and Retention Effect of Solid Tumors: Next-Generation Chemotherapeutics and Photodynamic Therapy--Problems, Solutions, and Prospects », *Microcirc. N. Y. N 1994*, vol. 23, n° 3, p. 173-182, avr. 2016, doi: 10.1111/micc.12228.
- [35] J. Nicolas et P. Couvreur, « [Polymer nanoparticles for the delivery of anticancer drug] », *Med. Sci. MS*, vol. 33, n° 1, p. 11-17, janv. 2017, doi: 10.1051/medsci/20173301003.
- [36] N. Mackiewicz *et al.*, « Precise Engineering of Multifunctional PEGylated Polyester Nanoparticles for Cancer Cell Targeting and Imaging », *Chem. Mater.*, vol. 26, n° 5, p. 1834-1847, mars 2014, doi: 10.1021/cm403822w.
- [37] Y. Nagasaki, K. Yasugi, Y. Yamamoto, A. Harada, et K. Kataoka, « Sugar-installed block copolymer micelles: their preparation and specific interaction with lectin molecules », *Biomacromolecules*, vol. 2, n° 4, p. 1067-1070, 2001, doi: 10.1021/bm015574q.
- [38] J. Nicolas, S. Mura, D. Brambilla, N. Mackiewicz, et P. Couvreur, « Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, n° 3, p. 1147-1235, févr. 2013, doi: 10.1039/c2cs35265f.
- [39] Q. C. Zheng *et al.*, « Dual-Targeting Nanoparticle-Mediated Gene Therapy Strategy for Hepatocellular Carcinoma by Delivering Small Interfering RNA », *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, p. 512, 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00512.
- [40] S. Acosta-Gutiérrez *et al.*, « A Multiscale Study of Phosphorylcholine Driven Cellular Phenotypic Targeting », *ACS Cent. Sci.*, vol. 8, n° 7, p. 891-904, juill. 2022, doi: 10.1021/acscentsci.2c00146.
- [41] D. Zhou *et al.*, « Dual-responsive polymersomes as anticancer drug carriers for the co-delivery of doxorubicin and paclitaxel », *J. Mater. Chem. B*, vol. 9, n° 3, p. 801-808, janv. 2021, doi: 10.1039/d0tb02462g.
- [42] D. Bratosin *et al.*, « Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review », *Biochimie*, vol. 80, n° 2, p. 173-195, févr. 1998, doi: 10.1016/s0300-9084(98)80024-2.
- [43] Y. Du et B. Chen, « Combination of drugs and carriers in drug delivery technology and its development », *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 13, p. 1401-1408, 2019, doi: 10.2147/DDDT.S198056.
- [44] P. H. D. Nguyen, M. K. Jayasinghe, A. H. Le, B. Peng, et M. T. N. Le, « Advances in Drug Delivery Systems Based on Red Blood Cells and Their Membrane-Derived

- Nanoparticles », *ACS Nano*, vol. 17, n° 6, p. 5187-5210, mars 2023, doi: 10.1021/acsnano.2c11965.
- [45] G. M. Ihler, R. H. Glew, et F. W. Schnure, « Enzyme loading of erythrocytes », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 70, n° 9, p. 2663-2666, sept. 1973, doi: 10.1073/pnas.70.9.2663.
- [46] J.-C. Murciano, S. Medinilla, D. Eslin, E. Atochina, D. B. Cines, et V. R. Muzykantov, « Prophylactic fibrinolysis through selective dissolution of nascent clots by tPA-carrying erythrocytes », *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, n° 8, p. 891-896, août 2003, doi: 10.1038/nbt846.
- [47] S. de Oliveira, E. E. Rosowski, et A. Huttenlocher, « Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 16, n° 6, p. 378-391, mai 2016, doi: 10.1038/nri.2016.49.
- [48] S. B. Coffelt, M. D. Wellenstein, et K. E. de Visser, « Neutrophils in cancer: neutral no more », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 16, n° 7, p. 431-446, juill. 2016, doi: 10.1038/nrc.2016.52.
- [49] J. Xue *et al.*, « Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence », *Nat. Nanotechnol.*, vol. 12, n° 7, p. 692-700, juill. 2017, doi: 10.1038/nnano.2017.54.
- [50] M. Liu *et al.*, « Influence of Dose on Neutrophil-Mediated Delivery of Nanoparticles for Tumor-Targeting Therapy Strategies », *AAPS PharmSciTech*, vol. 22, n° 3, p. 89, mars 2021, doi: 10.1208/s12249-021-01959-2.
- [51] T. Liang *et al.*, « Recent Advances in Macrophage-Mediated Drug Delivery Systems », *Int. J. Nanomedicine*, vol. 16, p. 2703-2714, 2021, doi: 10.2147/IJN.S298159.
- [52] A. S. Nowacek *et al.*, « Analyses of nanoformulated antiretroviral drug charge, size, shape and content for uptake, drug release and antiviral activities in human monocyte-derived macrophages », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 150, n° 2, p. 204-211, mars 2011, doi: 10.1016/j.jconrel.2010.11.019.
- [53] M.-R. Choi *et al.*, « A cellular Trojan Horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors », *Nano Lett.*, vol. 7, n° 12, p. 3759-3765, déc. 2007, doi: 10.1021/nl072209h.
- [54] E. V. Batrakova *et al.*, « A macrophage-nanozyme delivery system for Parkinson's disease », *Bioconjug. Chem.*, vol. 18, n° 5, p. 1498-1506, 2007, doi: 10.1021/bc700184b.
- [55] U. H. von Andrian et C. R. Mackay, « T-cell function and migration. Two sides of the same coin », *N. Engl. J. Med.*, vol. 343, n° 14, p. 1020-1034, oct. 2000, doi: 10.1056/NEJM200010053431407.
- [56] L. Wayteck *et al.*, « Hitchhiking nanoparticles: Reversible coupling of lipid-based nanoparticles to cytotoxic T lymphocytes », *Biomaterials*, vol. 77, p. 243-254, janv. 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.016.
- [57] M. Ayer *et al.*, « T Cell-Mediated Transport of Polymer Nanoparticles across the Blood-Brain Barrier », *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 10, n° 2, p. e2001375, janv. 2021, doi: 10.1002/adhm.202001375.
- [58] P. M. Cevaal *et al.*, « In Vivo T Cell-Targeting Nanoparticle Drug Delivery Systems: Considerations for Rational Design », *ACS Nano*, vol. 15, n° 3, p. 3736-3753, mars 2021, doi: 10.1021/acsnano.0c09514.
- [59] J. J. Glass *et al.*, « Thiol-Reactive Star Polymers Display Enhanced Association with Distinct Human Blood Components », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, n° 14, p. 12182-12194, avr. 2017, doi: 10.1021/acсами.6b15942.
- [60] A. Battigelli, B. Almeida, et A. Shukla, « Recent Advances in Bioorthogonal Click Chemistry for Biomedical Applications », *Bioconjug. Chem.*, vol. 33, n° 2, p. 263-271, févr. 2022, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00564.

- [61] S. L. Scinto *et al.*, « Bioorthogonal chemistry », *Nat. Rev. Methods Primer*, vol. 1, p. 30, 2021, doi: 10.1038/s43586-021-00028-z.
- [62] E. Saxon et C. R. Bertozzi, « Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction », *Science*, vol. 287, n° 5460, p. 2007-2010, mars 2000, doi: 10.1126/science.287.5460.2007.
- [63] C. Bednarek, I. Wehl, N. Jung, U. Schepers, et S. Bräse, « The Staudinger Ligation », *Chem. Rev.*, vol. 120, n° 10, p. 4301-4354, mai 2020, doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00665.
- [64] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, et C. R. Bertozzi, « Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, n° 1, p. 19-24, janv. 2002, doi: 10.1073/pnas.012583299.
- [65] C. C.-Y. Wang, T. S. Seo, Z. Li, H. Ruparel, et J. Ju, « Site-specific fluorescent labeling of DNA using Staudinger ligation », *Bioconjug. Chem.*, vol. 14, n° 3, p. 697-701, 2003, doi: 10.1021/bc0256392.
- [66] M. R. J. Vallée, P. Majkut, I. Wilkening, C. Weise, G. Müller, et C. P. R. Hackenberger, « Staudinger-phosphonite reactions for the chemoselective transformation of azido-containing peptides and proteins », *Org. Lett.*, vol. 13, n° 20, p. 5440-5443, oct. 2011, doi: 10.1021/ol2020175.
- [67] H. C. Kolb, M. G. Finn, et K. B. Sharpless, « Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions », *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 40, n° 11, p. 2004-2021, juin 2001, doi: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.
- [68] J. Bernard, É. Drockenmuller, É. Fleury, et J.-P. Pascault, « Quelles perspectives pour les polymères ? », 2010.
- [69] W. Carruthers, Éd., « 6 - 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions », in *Tetrahedron Organic Chemistry Series*, vol. 8, in *Cycloaddition Reactions in Organic Synthesis*, vol. 8., Elsevier, 1990, p. 269-331. doi: 10.1016/B978-0-08-034712-7.50011-4.
- [70] C. W. Tornøe, C. Christensen, et M. Meldal, « Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides », *J. Org. Chem.*, vol. 67, n° 9, p. 3057-3064, mai 2002, doi: 10.1021/jo011148j.
- [71] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, et K. B. Sharpless, « A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes », *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 41, n° 14, p. 2596-2599, juill. 2002, doi: 10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4.
- [72] « The Nobel Prize in Chemistry 2022 », NobelPrize.org. Consulté le: 16 août 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2022/summary/>
- [73] N. M. Saraiva, A. Alves, P. C. Costa, et M. Correia-da-Silva, « Click Chemistry in Polymersome Technology », *Pharm. Basel Switz.*, vol. 17, n° 6, p. 747, juin 2024, doi: 10.3390/ph17060747.
- [74] S. Li *et al.*, « Copper-Catalyzed Click Reaction on/in Live Cells », *Chem. Sci.*, vol. 8, n° 3, p. 2107-2114, mars 2017, doi: 10.1039/C6SC02297A.
- [75] A. E. Speers, G. C. Adam, et B. F. Cravatt, « Activity-based protein profiling in vivo using a copper(i)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, n° 16, p. 4686-4687, avr. 2003, doi: 10.1021/ja034490h.
- [76] D. C. Kennedy *et al.*, « Cellular consequences of copper complexes used to catalyze bioorthogonal click reactions », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, n° 44, p. 17993-18001, nov. 2011, doi: 10.1021/ja2083027.

- [77] J. Dommerholt, F. P. J. T. Rutjes, et F. L. van Delft, « Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides », *Top. Curr. Chem. Cham*, vol. 374, n° 2, p. 16, avr. 2016, doi: 10.1007/s41061-016-0016-4.
- [78] A. T. Blomquist et L. H. Liu, « Many-membered Carbon Rings. VII. Cycloöctyne », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 75, n° 9, p. 2153-2154, mai 1953, doi: 10.1021/ja01105a039.
- [79] N. J. Agard, J. A. Prescher, et C. R. Bertozzi, « A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, n° 46, p. 15046-15047, nov. 2004, doi: 10.1021/ja044996f.
- [80] P. A. Ledin, N. Kolishetti, et G.-J. Boons, « Multi-Functionalization of Polymers by Strain-Promoted Cycloadditions », *Macromolecules*, vol. 46, n° 19, p. 7759-7768, oct. 2013, doi: 10.1021/ma400913a.
- [81] J. Guo *et al.*, « Surface modification of polymeric micelles by strain-promoted alkyne-azide cycloadditions », *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.*, vol. 16, n° 45, p. 13360-13366, déc. 2010, doi: 10.1002/chem.201002532.
- [82] M. F. Debets *et al.*, « Nanobody-functionalized polymersomes for tumor-vessel targeting », *Macromol. Biosci.*, vol. 13, n° 7, p. 938-945, juill. 2013, doi: 10.1002/mabi.201300039.
- [83] J. C. Jewett, E. M. Sletten, et C. R. Bertozzi, « Rapid Cu-free click chemistry with readily synthesized biarylazacyclooctynones », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, n° 11, p. 3688-3690, mars 2010, doi: 10.1021/ja100014q.
- [84] J. Dommerholt *et al.*, « Readily accessible bicyclononynes for bioorthogonal labeling and three-dimensional imaging of living cells », *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 49, n° 49, p. 9422-9425, déc. 2010, doi: 10.1002/anie.201003761.
- [85] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, et G.-J. Boons, « Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions », *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 47, n° 12, p. 2253-2255, 2008, doi: 10.1002/anie.200705456.
- [86] F. Friscourt *et al.*, « Polar dibenzocyclooctynes for selective labeling of extracellular glycoconjugates of living cells », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, n° 11, p. 5381-5389, mars 2012, doi: 10.1021/ja3002666.
- [87] J. Dommerholt, O. van Rooijen, A. Borrmann, C. F. Guerra, F. M. Bickelhaupt, et F. L. van Delft, « Highly accelerated inverse electron-demand cycloaddition of electron-deficient azides with aliphatic cyclooctynes », *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 5378, nov. 2014, doi: 10.1038/ncomms6378.
- [88] J. A. Marchand, M. E. Neugebauer, M. C. Ing, C.-I. Lin, J. G. Pelton, et M. C. Y. Chang, « Discovery of a pathway for terminal-alkyne amino acid biosynthesis », *Nature*, vol. 567, n° 7748, p. 420-424, mars 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1020-y.
- [89] Y. Gao, X. Luan, J. Melamed, et I. Brockhausen, « Role of Glycans on Key Cell Surface Receptors That Regulate Cell Proliferation and Cell Death », *Cells*, vol. 10, n° 5, Art. n° 5, mai 2021, doi: 10.3390/cells10051252.
- [90] M. M. Fuster et J. D. Esko, « The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, n° 7, p. 526-542, juill. 2005, doi: 10.1038/nrc1649.
- [91] Y. van Kooyk et G. A. Rabinovich, « Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses », *Nat. Immunol.*, vol. 9, n° 6, p. 593-601, juin 2008, doi: 10.1038/ni.f.203.
- [92] J. G. Briard, H. Jiang, K. W. Moremen, M. S. Macauley, et P. Wu, « Cell-based glycan arrays for probing glycan-glycan binding protein interactions », *Nat. Commun.*, vol. 9, n° 1, p. 880, févr. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03245-5.

- [93] S. T. Laughlin et C. R. Bertozzi, « Metabolic labeling of glycans with azido sugars and subsequent glycan-profiling and visualization via Staudinger ligation », *Nat. Protoc.*, vol. 2, n° 11, p. 2930-2944, 2007, doi: 10.1038/nprot.2007.422.
- [94] A. Mongis, F. Pillier, et V. Pillier, « Coupling of Immunostimulants to Live Cells through Metabolic Glycoengineering and Bioorthogonal Click Chemistry », *Bioconjug. Chem.*, vol. 28, n° 4, p. 1151-1165, avr. 2017, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00042.
- [95] C. R. Torres et G. W. Hart, « Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc », *J. Biol. Chem.*, vol. 259, n° 5, p. 3308-3317, mars 1984.
- [96] J. L. E. Walgren, T. S. Vincent, K. L. Schey, et M. G. Buse, « High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin », *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 284, n° 2, p. E424-434, févr. 2003, doi: 10.1152/ajpendo.00382.2002.
- [97] N. E. Zachara, N. O'Donnell, W. D. Cheung, J. J. Mercer, J. D. Marth, et G. W. Hart, « Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 29, p. 30133-30142, juill. 2004, doi: 10.1074/jbc.M403773200.
- [98] L. K. Kreppel, M. A. Blomberg, et G. W. Hart, « Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 14, p. 9308-9315, avr. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.14.9308.
- [99] Y. Gao, L. Wells, F. I. Comer, G. J. Parker, et G. W. Hart, « Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 13, p. 9838-9845, mars 2001, doi: 10.1074/jbc.M010420200.
- [100] E. J. Kim, « Chemical arsenal for the study of O-GlcNAc », *Mol. Basel Switz.*, vol. 16, n° 3, p. 1987-2022, févr. 2011, doi: 10.3390/molecules16031987.
- [101] M. Boyce *et al.*, « Metabolic cross-talk allows labeling of O-linked beta-N-acetylglucosamine-modified proteins via the N-acetylgalactosamine salvage pathway », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, n° 8, p. 3141-3146, févr. 2011, doi: 10.1073/pnas.1010045108.
- [102] S. J. Moons, G. J. Adema, M. T. Derks, T. J. Boltje, et C. Büll, « Sialic acid glycoengineering using N-acetylmannosamine and sialic acid analogs », *Glycobiology*, vol. 29, n° 6, p. 433-445, juin 2019, doi: 10.1093/glycob/cwz026.
- [103] M. Schwarzkopf *et al.*, « Sialylation is essential for early development in mice », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, n° 8, p. 5267-5270, avr. 2002, doi: 10.1073/pnas.072066199.
- [104] H. C. Hang, C. Yu, D. L. Kato, et C. R. Bertozzi, « A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, n° 25, p. 14846-14851, déc. 2003, doi: 10.1073/pnas.2335201100.
- [105] H. Koo *et al.*, « Bioorthogonal copper-free click chemistry in vivo for tumor-targeted delivery of nanoparticles », *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 51, n° 47, p. 11836-11840, nov. 2012, doi: 10.1002/anie.201206703.
- [106] R. M. F. Tomás, B. Martyn, T. L. Bailey, et M. I. Gibson, « Engineering Cell Surfaces by Covalent Grafting of Synthetic Polymers to Metabolically-Labeled Glycans », *ACS Macro Lett.*, vol. 7, n° 11, p. 1289-1294, nov. 2018, doi: 10.1021/acsmacrolett.8b00675.

- [107] R. M. F. Tomás et M. I. Gibson, « Optimization and Stability of Cell-Polymer Hybrids Obtained by “Clicking” Synthetic Polymers to Metabolically Labeled Cell Surface Glycans », *Biomacromolecules*, vol. 20, n° 7, p. 2726-2736, juill. 2019, doi: 10.1021/acs.biomac.9b00478.
- [108] M. Flajnik, *Paul’s Fundamental Immunology*. in Gamma Delta T Cells, no. Chapter 35. Lippincott Williams & Wilkins, 2022.
- [109] A. C. Hayday *et al.*, « Structure, organization, and somatic rearrangement of T cell gamma genes », *Cell*, vol. 40, n° 2, p. 259-269, févr. 1985, doi: 10.1016/0092-8674(85)90140-0.
- [110] M. P. Lefranc et T. H. Rabbitts, « Two tandemly organized human genes encoding the T-cell gamma constant-region sequences show multiple rearrangement in different T-cell types », *Nature*, vol. 316, n° 6027, p. 464-466, août 1985, doi: 10.1038/316464a0.
- [111] A. C. Hayday, « [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 18, p. 975-1026, 2000, doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.975.
- [112] J. S. Heilig et S. Tonegawa, « Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes », *Nature*, vol. 322, n° 6082, p. 836-840, sept. 1986, doi: 10.1038/322836a0.
- [113] G. Sanchez Sanchez, Y. Tafesse, M. Papadopoulou, et D. Vermijlen, « Surfing on the waves of the human $\gamma\delta$ T cell ontogenic sea », *Immunol. Rev.*, vol. 315, n° 1, p. 89-107, mai 2023, doi: 10.1111/imr.13184.
- [114] M. Papadopoulou, G. Sanchez Sanchez, et D. Vermijlen, « Innate and adaptive $\gamma\delta$ T cells: How, when, and why », *Immunol. Rev.*, vol. 298, n° 1, p. 99-116, nov. 2020, doi: 10.1111/imr.12926.
- [115] P. Tieppo *et al.*, « The human fetal thymus generates invariant effector $\gamma\delta$ T cells », *J. Exp. Med.*, vol. 217, n° 3, p. jem.20190580, mars 2020, doi: 10.1084/jem.20190580.
- [116] J.-E. Park *et al.*, « A cell atlas of human thymic development defines T cell repertoire formation », *Science*, vol. 367, n° 6480, p. eaay3224, févr. 2020, doi: 10.1126/science.aay3224.
- [117] A. Montel-Hagen, S. Tsai, C. S. Seet, et G. M. Crooks, « Generation of Artificial Thymic Organoids from Human and Murine Hematopoietic Stem and Progenitor Cells », *Curr. Protoc.*, vol. 2, n° 4, p. e403, avr. 2022, doi: 10.1002/cpz1.403.
- [118] T. Dimova *et al.*, « Effector V γ 9V δ 2 T cells dominate the human fetal $\gamma\delta$ T-cell repertoire », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, n° 6, p. E556-565, févr. 2015, doi: 10.1073/pnas.1412058112.
- [119] M. Papadopoulou *et al.*, « TCR Sequencing Reveals the Distinct Development of Fetal and Adult Human V γ 9V δ 2 T Cells », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 203, n° 6, p. 1468-1479, sept. 2019, doi: 10.4049/jimmunol.1900592.
- [120] A. S. Fichtner, S. Ravens, et I. Prinz, « Human $\gamma\delta$ TCR Repertoires in Health and Disease », *Cells*, vol. 9, n° 4, Art. n° 4, avr. 2020, doi: 10.3390/cells9040800.
- [121] Y. Hu *et al.*, « $\gamma\delta$ T cells: origin and fate, subsets, diseases and immunotherapy », *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 8, n° 1, p. 1-38, nov. 2023, doi: 10.1038/s41392-023-01653-8.
- [122] J. Daniels *et al.*, « Cellular origins and genetic landscape of cutaneous gamma delta T cell lymphomas », *Nat. Commun.*, vol. 11, n° 1, p. 1806, avr. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15572-7.

- [123] G. Inghirami, B. Y. Zhu, L. Chess, et D. M. Knowles, « Flow cytometric and immunohistochemical characterization of the gamma/delta T-lymphocyte population in normal human lymphoid tissue and peripheral blood », *Am. J. Pathol.*, vol. 136, n° 2, p. 357-367, févr. 1990.
- [124] S. Hunter *et al.*, « Human liver infiltrating $\gamma\delta$ T cells are composed of clonally expanded circulating and tissue-resident populations », *J. Hepatol.*, vol. 69, n° 3, p. 654-665, sept. 2018, doi: 10.1016/j.jhep.2018.05.007.
- [125] T. Kenna, L. Golden-Mason, S. Norris, J. E. Hegarty, C. O'Farrelly, et D. G. Doherty, « Distinct subpopulations of gamma delta T cells are present in normal and tumor-bearing human liver », *Clin. Immunol. Orlando Fla*, vol. 113, n° 1, p. 56-63, oct. 2004, doi: 10.1016/j.clim.2004.05.003.
- [126] P. Ogongo *et al.*, « Differential skewing of donor-unrestricted and $\gamma\delta$ T cell repertoires in tuberculosis-infected human lungs », *J. Clin. Invest.*, vol. 130, n° 1, p. 214-230, janv. 2020, doi: 10.1172/JCI130711.
- [127] K. Deusch, F. Lüling, K. Reich, M. Classen, H. Wagner, et K. Pfeffer, « A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the gamma/delta T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V delta 1 gene segment », *Eur. J. Immunol.*, vol. 21, n° 4, p. 1053-1059, avr. 1991, doi: 10.1002/eji.1830210429.
- [128] J. Mikulak *et al.*, « NKp46-expressing human gut-resident intraepithelial V δ 1 T cell subpopulation exhibits high antitumor activity against colorectal cancer », *JCI Insight*, vol. 4, n° 24, p. e125884, 125884, déc. 2019, doi: 10.1172/jci.insight.125884.
- [129] S. T. Ribeiro, J. C. Ribot, et B. Silva-Santos, « Five Layers of Receptor Signaling in $\gamma\delta$ T-Cell Differentiation and Activation », *Front. Immunol.*, vol. 6, p. 15, 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00015.
- [130] Y. Tanaka, C. T. Morita, Y. Tanaka, E. Nieves, M. B. Brenner, et B. R. Bloom, « Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells », *Nature*, vol. 375, n° 6527, p. 155-158, mai 1995, doi: 10.1038/375155a0.
- [131] C. Behr *et al.*, « Plasmodium falciparum stimuli for human gammadelta T cells are related to phosphorylated antigens of mycobacteria », *Infect. Immun.*, vol. 64, n° 8, p. 2892-2896, août 1996, doi: 10.1128/iai.64.8.2892-2896.1996.
- [132] H.-J. Gober, M. Kistowska, L. Angman, P. Jenö, L. Mori, et G. De Libero, « Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells », *J. Exp. Med.*, vol. 197, n° 2, p. 163-168, janv. 2003, doi: 10.1084/jem.20021500.
- [133] C. Riganti, M. Massaia, M. S. Davey, et M. Eberl, « Human $\gamma\delta$ T-cell responses in infection and immunotherapy: common mechanisms, common mediators? », *Eur. J. Immunol.*, vol. 42, n° 7, p. 1668-1676, juill. 2012, doi: 10.1002/eji.201242492.
- [134] A. Sandstrom *et al.*, « The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human V γ 9V δ 2 T cells », *Immunity*, vol. 40, n° 4, p. 490-500, avr. 2014, doi: 10.1016/j.immuni.2014.03.003.
- [135] M. Rigau *et al.*, « Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by $\gamma\delta$ T cells », *Science*, vol. 367, n° 6478, p. eaay5516, févr. 2020, doi: 10.1126/science.aay5516.
- [136] M. M. Karunakaran *et al.*, « Butyrophilin-2A1 Directly Binds Germline-Encoded Regions of the V γ 9V δ 2 TCR and Is Essential for Phosphoantigen Sensing », *Immunity*, vol. 52, n° 3, p. 487-498.e6, mars 2020, doi: 10.1016/j.immuni.2020.02.014.

- [137] S. Roy *et al.*, « Molecular Analysis of Lipid-Reactive V δ 1 $\gamma\delta$ T Cells Identified by CD1c Tetramers », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 196, n^o 4, p. 1933-1942, févr. 2016, doi: 10.4049/jimmunol.1502202.
- [138] A. P. Uldrich *et al.*, « CD1d-lipid antigen recognition by the $\gamma\delta$ TCR », *Nat. Immunol.*, vol. 14, n^o 11, p. 1137-1145, nov. 2013, doi: 10.1038/ni.2713.
- [139] M. Wegrecki *et al.*, « Atypical sideways recognition of CD1a by autoreactive $\gamma\delta$ T cell receptors », *Nat. Commun.*, vol. 13, n^o 1, p. 3872, juill. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-31443-9.
- [140] J. F. Reijneveld *et al.*, « Human $\gamma\delta$ T cells recognize CD1b by two distinct mechanisms », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 117, n^o 37, p. 22944-22952, sept. 2020, doi: 10.1073/pnas.2010545117.
- [141] C. R. Willcox *et al.*, « Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human $\gamma\delta$ T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor », *Nat. Immunol.*, vol. 13, n^o 9, p. 872-879, sept. 2012, doi: 10.1038/ni.2394.
- [142] J. Le Nours *et al.*, « A class of $\gamma\delta$ T cell receptors recognize the underside of the antigen-presenting molecule MR1 », *Science*, vol. 366, n^o 6472, p. 1522-1527, déc. 2019, doi: 10.1126/science.aav3900.
- [143] M. T. Rice *et al.*, « Recognition of the antigen-presenting molecule MR1 by a V δ 3+ $\gamma\delta$ T cell receptor », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 118, n^o 49, p. e2110288118, déc. 2021, doi: 10.1073/pnas.2110288118.
- [144] P. M. Benveniste *et al.*, « Generation and molecular recognition of melanoma-associated antigen-specific human $\gamma\delta$ T cells », *Sci. Immunol.*, vol. 3, n^o 30, p. eaav4036, déc. 2018, doi: 10.1126/sciimmunol.aav4036.
- [145] M. Deseke *et al.*, « A CMV-induced adaptive human V δ 1+ $\gamma\delta$ T cell clone recognizes HLA-DR », *J. Exp. Med.*, vol. 219, n^o 9, p. e20212525, sept. 2022, doi: 10.1084/jem.20212525.
- [146] D. Melandri *et al.*, « The $\gamma\delta$ TCR combines innate immunity with adaptive immunity by utilizing spatially distinct regions for agonist selection and antigen responsiveness », *Nat. Immunol.*, vol. 19, n^o 12, p. 1352-1365, déc. 2018, doi: 10.1038/s41590-018-0253-5.
- [147] C. Harly *et al.*, « Human $\gamma\delta$ T cell sensing of AMPK-dependent metabolic tumor reprogramming through TCR recognition of EphA2 », *Sci. Immunol.*, vol. 6, n^o 61, p. eaba9010, juill. 2021, doi: 10.1126/sciimmunol.aba9010.
- [148] R. Marlin *et al.*, « Sensing of cell stress by human $\gamma\delta$ TCR-dependent recognition of annexin A2 », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, n^o 12, p. 3163-3168, mars 2017, doi: 10.1073/pnas.1621052114.
- [149] I. Van Rhijn et J. Le Nours, « CD1 and MR1 recognition by human $\gamma\delta$ T cells », *Mol. Immunol.*, vol. 133, p. 95-100, mai 2021, doi: 10.1016/j.molimm.2020.12.008.
- [150] A. Hayday, J. Dechanet-Merville, J. Rossjohn, et B. Silva-Santos, « Cancer immunotherapy by $\gamma\delta$ T cells », *Science*, vol. 386, n^o 6717, p. eabq7248, oct. 2024, doi: 10.1126/science.abq7248.
- [151] V. Plužarić *et al.*, « Differential Skewing of Circulating MR1-Restricted and $\gamma\delta$ T Cells in Human Psoriasis Vulgaris », *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 572924, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.572924.
- [152] R. Testi et L. L. Lanier, « Functional expression of CD28 on T cell antigen receptor gamma/delta-bearing T lymphocytes », *Eur. J. Immunol.*, vol. 19, n^o 1, p. 185-188, janv. 1989, doi: 10.1002/eji.1830190129.

- [153] P. Wang et M. Malkovsky, « Different roles of the CD2 and LFA-1 T-cell co-receptors for regulating cytotoxic, proliferative, and cytokine responses of human V gamma 9/V delta 2 T cells », *Mol. Med. Camb. Mass*, vol. 6, n° 3, p. 196-207, mars 2000.
- [154] G. M. Siegers, E. J. Ribot, A. Keating, et P. J. Foster, « Extensive expansion of primary human gamma delta T cells generates cytotoxic effector memory cells that can be labeled with Feraheme for cellular MRI », *Cancer Immunol. Immunother. Clin*, vol. 62, n° 3, p. 571-583, mars 2013, doi: 10.1007/s00262-012-1353-y.
- [155] A. DeBarros, M. Chaves-Ferreira, F. d'Orey, J. C. Ribot, et B. Silva-Santos, « CD70-CD27 interactions provide survival and proliferative signals that regulate T cell receptor-driven activation of human $\gamma\delta$ peripheral blood lymphocytes », *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, n° 1, p. 195-201, janv. 2011, doi: 10.1002/eji.201040905.
- [156] J. C. Ribot *et al.*, « CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets », *Nat. Immunol.*, vol. 10, n° 4, p. 427-436, avr. 2009, doi: 10.1038/ni.1717.
- [157] J. C. Ribot, S. T. Ribeiro, D. V. Correia, A. E. Sousa, et B. Silva-Santos, « Human $\gamma\delta$ thymocytes are functionally immature and differentiate into cytotoxic type 1 effector T cells upon IL-2/IL-15 signaling », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 192, n° 5, p. 2237-2243, mars 2014, doi: 10.4049/jimmunol.1303119.
- [158] V. E. García *et al.*, « IL-15 enhances the response of human gamma delta T cells to nonpeptide [correction of nonpetide] microbial antigens », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 160, n° 9, p. 4322-4329, mai 1998.
- [159] A. R. Almeida *et al.*, « Delta One T Cells for Immunotherapy of Chronic Lymphocytic Leukemia: Clinical-Grade Expansion/Differentiation and Preclinical Proof of Concept », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 22, n° 23, p. 5795-5804, déc. 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0597.
- [160] L. Couzi *et al.*, « Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human $\gamma\delta$ T cells expressing CD16 (Fc γ R11a) », *Blood*, vol. 119, n° 6, p. 1418-1427, févr. 2012, doi: 10.1182/blood-2011-06-363655.
- [161] F. Guerville *et al.*, « TCR-dependent sensitization of human $\gamma\delta$ T cells to non-myeloid IL-18 in cytomegalovirus and tumor stress surveillance », *Oncoimmunology*, vol. 4, n° 5, p. e1003011, mai 2015, doi: 10.1080/2162402X.2014.1003011.
- [162] A. Thedrez, C. Harly, A. Morice, S. Salot, M. Bonneville, et E. Scotet, « IL-21-mediated potentiation of antitumor cytolytic and proinflammatory responses of human V gamma 9V delta 2 T cells for adoptive immunotherapy », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 182, n° 6, p. 3423-3431, mars 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0803068.
- [163] C. Guillerey, « NK Cells in the Tumor Microenvironment », *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1273, p. 69-90, 2020, doi: 10.1007/978-3-030-49270-0_4.
- [164] B. Silva-Santos et J. Strid, « Working in "NK Mode": Natural Killer Group 2 Member D and Natural Cytotoxicity Receptors in Stress-Surveillance by $\gamma\delta$ T Cells », *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 851, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00851.
- [165] T. Lança *et al.*, « The MHC class Ib protein ULBP1 is a nonredundant determinant of leukemia/lymphoma susceptibility to gammadelta T-cell cytotoxicity », *Blood*, vol. 115, n° 12, p. 2407-2411, mars 2010, doi: 10.1182/blood-2009-08-237123.
- [166] V. Groh, R. Rhinehart, H. Secrist, S. Bauer, K. H. Grabstein, et T. Spies, « Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, n° 12, p. 6879-6884, juin 1999, doi: 10.1073/pnas.96.12.6879.

- [167] Y. Kong, W. Cao, X. Xi, C. Ma, L. Cui, et W. He, « The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCR γ 9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCR γ delta and NKG2D », *Blood*, vol. 114, n° 2, p. 310-317, juill. 2009, doi: 10.1182/blood-2008-12-196287.
- [168] D. V. Correia, A. Lopes, et B. Silva-Santos, « Tumor cell recognition by $\gamma\delta$ T lymphocytes: T-cell receptor vs. NK-cell receptors », *Oncoimmunology*, vol. 2, n° 1, p. e22892, janv. 2013, doi: 10.4161/onci.22892.
- [169] A. E. Simões, B. Di Lorenzo, et B. Silva-Santos, « Molecular Determinants of Target Cell Recognition by Human $\gamma\delta$ T Cells », *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 929, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00929.
- [170] A. Knight, S. Mackinnon, et M. W. Lowdell, « Human Vdelta1 gamma-delta T cells exert potent specific cytotoxicity against primary multiple myeloma cells », *Cytotherapy*, vol. 14, n° 9, p. 1110-1118, oct. 2012, doi: 10.3109/14653249.2012.700766.
- [171] B. Di Lorenzo *et al.*, « Broad Cytotoxic Targeting of Acute Myeloid Leukemia by Polyclonal Delta One T Cells », *Cancer Immunol. Res.*, vol. 7, n° 4, p. 552-558, avr. 2019, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0647.
- [172] D. V. Correia, M. Fogli, K. Hudspeth, M. G. da Silva, D. Mavilio, et B. Silva-Santos, « Differentiation of human peripheral blood V δ 1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells », *Blood*, vol. 118, n° 4, p. 992-1001, juill. 2011, doi: 10.1182/blood-2011-02-339135.
- [173] S. Mensurado *et al.*, « CD155/PVR determines acute myeloid leukemia targeting by Delta One T cells », *Blood*, vol. 143, n° 15, p. 1488-1495, avr. 2024, doi: 10.1182/blood.2023022992.
- [174] M. Iwasaki *et al.*, « Expression and function of PD-1 in human $\gamma\delta$ T cells that recognize phosphoantigens », *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, n° 2, p. 345-355, févr. 2011, doi: 10.1002/eji.201040959.
- [175] C. Peters, D. Kabelitz, et D. Wesch, « Regulatory functions of $\gamma\delta$ T cells », *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 75, n° 12, p. 2125-2135, juin 2018, doi: 10.1007/s00018-018-2788-x.
- [176] D. Davies *et al.*, « PD-1 defines a distinct, functional, tissue-adapted state in V δ 1+ T cells with implications for cancer immunotherapy », *Nat. Cancer*, vol. 5, n° 3, p. 420-432, mars 2024, doi: 10.1038/s43018-023-00690-0.
- [177] H. Kaminski *et al.*, « Characterization of a Unique $\gamma\delta$ T-Cell Subset as a Specific Marker of Cytomegalovirus Infection Severity », *J. Infect. Dis.*, vol. 223, n° 4, p. 655-666, févr. 2021, doi: 10.1093/infdis/jiaa400.
- [178] V. Cazzetta *et al.*, « NKG2A expression identifies a subset of human V δ 2 T cells exerting the highest antitumor effector functions », *Cell Rep.*, vol. 37, n° 3, p. 109871, oct. 2021, doi: 10.1016/j.celrep.2021.109871.
- [179] V. Pitard *et al.*, « Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection », *Blood*, vol. 112, n° 4, p. 1317-1324, août 2008, doi: 10.1182/blood-2008-01-136713.
- [180] F. Halary *et al.*, « Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors », *Eur. J. Immunol.*, vol. 27, n° 11, p. 2812-2821, nov. 1997, doi: 10.1002/eji.1830271111.
- [181] K. Shibata, H. Yamada, H. Hara, K. Kishihara, et Y. Yoshikai, « Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after Escherichia coli infection via IL-17 production », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 178, n° 7, p. 4466-4472, avr. 2007, doi: 10.4049/jimmunol.178.7.4466.

- [182] C. Nakasone *et al.*, « Accumulation of gamma/delta T cells in the lungs and their roles in neutrophil-mediated host defense against pneumococcal infection », *Microbes Infect.*, vol. 9, n° 3, p. 251-258, mars 2007, doi: 10.1016/j.micinf.2006.11.015.
- [183] F. Sabbione *et al.*, « Neutrophils suppress $\gamma\delta$ T-cell function », *Eur. J. Immunol.*, vol. 44, n° 3, p. 819-830, mars 2014, doi: 10.1002/eji.201343664.
- [184] D. S. Leslie *et al.*, « CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells », *J. Exp. Med.*, vol. 196, n° 12, p. 1575-1584, déc. 2002, doi: 10.1084/jem.20021515.
- [185] J. Ismaili, V. Orlislagers, R. Poupot, J.-J. Fournié, et M. Goldman, « Human gamma delta T cells induce dendritic cell maturation », *Clin. Immunol. Orlando Fla*, vol. 103, n° 3 Pt 1, p. 296-302, juin 2002, doi: 10.1006/clim.2002.5218.
- [186] M. Brandes *et al.*, « Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, n° 7, p. 2307-2312, févr. 2009, doi: 10.1073/pnas.0810059106.
- [187] B. Altvater *et al.*, « Activated human $\gamma\delta$ T cells induce peptide-specific CD8+ T-cell responses to tumor-associated self-antigens », *Cancer Immunol. Immunother. Cll*, vol. 61, n° 3, p. 385-396, mars 2012, doi: 10.1007/s00262-011-1111-6.
- [188] F. Rampoldi, L. Ullrich, et I. Prinz, « Revisiting the Interaction of $\gamma\delta$ T-Cells and B-Cells », *Cells*, vol. 9, n° 3, p. 743, mars 2020, doi: 10.3390/cells9030743.
- [189] A. A. Horner, H. Jabara, N. Ramesh, et R. S. Geha, « gamma/delta T lymphocytes express CD40 ligand and induce isotype switching in B lymphocytes », *J. Exp. Med.*, vol. 181, n° 3, p. 1239-1244, mars 1995, doi: 10.1084/jem.181.3.1239.
- [190] N. Caccamo *et al.*, « CXCR5 identifies a subset of Vgamma9Vdelta2 T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 177, n° 8, p. 5290-5295, oct. 2006, doi: 10.4049/jimmunol.177.8.5290.
- [191] D. Vermijlen *et al.*, « Distinct cytokine-driven responses of activated blood gammadelta T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 178, n° 7, p. 4304-4314, avr. 2007, doi: 10.4049/jimmunol.178.7.4304.
- [192] A. Petrasca, A. M. Melo, E. P. Breen, et D. G. Doherty, « Human V δ 3+ $\gamma\delta$ T cells induce maturation and IgM secretion by B cells », *Immunol. Lett.*, vol. 196, p. 126-134, avr. 2018, doi: 10.1016/j.imlet.2018.02.002.
- [193] S. Giri et G. Lal, « Differentiation and functional plasticity of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells under homeostatic and disease conditions », *Mol. Immunol.*, vol. 136, p. 138-149, août 2021, doi: 10.1016/j.molimm.2021.06.006.
- [194] F. Hua, N. Kang, Y.-A. Gao, L.-X. Cui, D.-N. Ba, et W. He, « Potential regulatory role of in vitro-expanded V δ 1 T cells from human peripheral blood », *Immunol. Res.*, vol. 56, n° 1, p. 172-180, mai 2013, doi: 10.1007/s12026-013-8390-2.
- [195] P. Wu *et al.*, « $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer », *Immunity*, vol. 40, n° 5, p. 785-800, mai 2014, doi: 10.1016/j.immuni.2014.03.013.
- [196] R. S. Patil, S. U. Shah, S. V. Shrikhande, M. Goel, R. P. Dikshit, et S. V. Chiplunkar, « IL17 producing $\gamma\delta$ T cells induce angiogenesis and are associated with poor survival in gallbladder cancer patients », *Int. J. Cancer*, vol. 139, n° 4, p. 869-881, août 2016, doi: 10.1002/ijc.30134.
- [197] G. Hu *et al.*, « Tumor-infiltrating CD39+ $\gamma\delta$ Tregs are novel immunosuppressive T cells in human colorectal cancer », *Oncoimmunology*, vol. 6, n° 2, p. e1277305, 2017, doi: 10.1080/2162402X.2016.1277305.

- [198] D. Daley *et al.*, « $\gamma\delta$ T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining $\alpha\beta$ T Cell Activation », *Cell*, vol. 166, n° 6, p. 1485-1499.e15, sept. 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.07.046.
- [199] J. C. Ribot, N. Lopes, et B. Silva-Santos, « $\gamma\delta$ T cells in tissue physiology and surveillance », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 21, n° 4, p. 221-232, avr. 2021, doi: 10.1038/s41577-020-00452-4.
- [200] M. D. Johnson, D. A. Witherden, et W. L. Havran, « The Role of Tissue-resident $\gamma\delta$ T Cells in Stress Surveillance and Tissue Maintenance », *Cells*, vol. 9, n° 3, p. 686, mars 2020, doi: 10.3390/cells9030686.
- [201] M. M. Nielsen, D. A. Witherden, et W. L. Havran, « $\gamma\delta$ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 17, n° 12, p. 733-745, déc. 2017, doi: 10.1038/nri.2017.101.
- [202] S. Paul et G. Lal, « Regulatory and effector functions of gamma–delta ($\gamma\delta$) T cells and their therapeutic potential in adoptive cellular therapy for cancer », *Int. J. Cancer*, vol. 139, n° 5, p. 976-985, 2016, doi: 10.1002/ijc.30109.
- [203] G. Chitadze, H.-H. Oberg, D. Wesch, et D. Kabelitz, « The Ambiguous Role of $\gamma\delta$ T Lymphocytes in Antitumor Immunity », *Trends Immunol.*, vol. 38, n° 9, p. 668-678, sept. 2017, doi: 10.1016/j.it.2017.06.004.
- [204] D. Tawfik *et al.*, « TRAIL-Receptor 4 Modulates $\gamma\delta$ T Cell-Cytotoxicity Toward Cancer Cells », *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 2044, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02044.
- [205] M. A. Hernández-Castañeda *et al.*, « $\gamma\delta$ T Cells Kill Plasmodium falciparum in a Granzyme- and Granulysin-Dependent Mechanism during the Late Blood Stage », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 204, n° 7, p. 1798-1809, avr. 2020, doi: 10.4049/jimmunol.1900725.
- [206] J. P. H. Fisher *et al.*, « Neuroblastoma killing properties of V δ 2 and V δ 2-negative $\gamma\delta$ T cells following expansion by artificial antigen-presenting cells », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 20, n° 22, p. 5720-5732, nov. 2014, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3464.
- [207] S. Mensurado, R. Blanco-Domínguez, et B. Silva-Santos, « The emerging roles of $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy », *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 20, n° 3, p. 178-191, mars 2023, doi: 10.1038/s41571-022-00722-1.
- [208] B. Silva-Santos, S. Mensurado, et S. B. Coffelt, « $\gamma\delta$ T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 19, n° 7, p. 392-404, juill. 2019, doi: 10.1038/s41568-019-0153-5.
- [209] S. Mensurado et B. Silva-Santos, « Battle of the $\gamma\delta$ T cell subsets in the gut », *Trends Cancer*, vol. 8, n° 11, p. 881-883, nov. 2022, doi: 10.1016/j.trecan.2022.08.006.
- [210] Y. Liu et C. Zhang, « The Role of Human $\gamma\delta$ T Cells in Anti-Tumor Immunity and Their Potential for Cancer Immunotherapy », *Cells*, vol. 9, n° 5, p. 1206, mai 2020, doi: 10.3390/cells9051206.
- [211] A. G. Ramstead et M. A. Jutila, « Complex role of $\gamma\delta$ T-cell-derived cytokines and growth factors in cancer », *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.*, vol. 32, n° 12, p. 563-569, déc. 2012, doi: 10.1089/jir.2012.0073.
- [212] N. L. de Vries *et al.*, « $\gamma\delta$ T cells are effectors of immunotherapy in cancers with HLA class I defects », *Nature*, vol. 613, n° 7945, p. 743-750, janv. 2023, doi: 10.1038/s41586-022-05593-1.

- [213] E. Viey *et al.*, « Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 174, n° 3, p. 1338-1347, févr. 2005, doi: 10.4049/jimmunol.174.3.1338.
- [214] A. A. Z. Alexander *et al.*, « Isopentenyl pyrophosphate-activated CD56+ {gamma}{delta} T lymphocytes display potent antitumor activity toward human squamous cell carcinoma », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 14, n° 13, p. 4232-4240, juill. 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4912.
- [215] M. Todaro *et al.*, « Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 182, n° 11, p. 7287-7296, juin 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0804288.
- [216] P. Dokouhaki *et al.*, « NKG2D regulates production of soluble TRAIL by ex vivo expanded human $\gamma\delta$ T cells », *Eur. J. Immunol.*, vol. 43, n° 12, p. 3175-3182, déc. 2013, doi: 10.1002/eji.201243150.
- [217] A. Maniar *et al.*, « Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement », *Blood*, vol. 116, n° 10, p. 1726-1733, sept. 2010, doi: 10.1182/blood-2009-07-234211.
- [218] M. Donia, E. Ellebaek, M. H. Andersen, P. T. Straten, et I. M. Svane, « Analysis of V δ 1 T cells in clinical grade melanoma-infiltrating lymphocytes », *Oncoimmunology*, vol. 1, n° 8, p. 1297-1304, nov. 2012, doi: 10.4161/onci.21659.
- [219] Y. Wu *et al.*, « An innate-like V δ 1+ $\gamma\delta$ T cell compartment in the human breast is associated with remission in triple-negative breast cancer », *Sci. Transl. Med.*, vol. 11, n° 513, p. eaax9364, oct. 2019, doi: 10.1126/scitranslmed.aax9364.
- [220] Y. Wu *et al.*, « A local human V δ 1 T cell population is associated with survival in nonsmall-cell lung cancer », *Nat. Cancer*, vol. 3, n° 6, p. 696-709, juin 2022, doi: 10.1038/s43018-022-00376-z.
- [221] N. Guo, G. Shen, Y. Zhang, A. A. Moustafa, D. Ge, et Z. You, « Interleukin-17 Promotes Migration and Invasion of Human Cancer Cells Through Upregulation of MTA1 Expression », *Front. Oncol.*, vol. 9, p. 546, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00546.
- [222] P. Kulig *et al.*, « IL17A-Mediated Endothelial Breach Promotes Metastasis Formation », *Cancer Immunol. Res.*, vol. 4, n° 1, p. 26-32, janv. 2016, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0154.
- [223] J. Ye *et al.*, « Tumor-derived $\gamma\delta$ regulatory T cells suppress innate and adaptive immunity through the induction of immunosenescence », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 190, n° 5, p. 2403-2414, mars 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1202369.
- [224] Y. Mao *et al.*, « A new effect of IL-4 on human $\gamma\delta$ T cells: promoting regulatory V δ 1 T cells via IL-10 production and inhibiting function of V δ 2 T cells », *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 13, n° 2, p. 217-228, mars 2016, doi: 10.1038/cmi.2015.07.
- [225] X. Yu *et al.*, « A pan-cancer gamma delta T cell repertoire », *BioRxiv Prepr. Serv. Biol.*, p. 2024.07.18.604205, juill. 2024, doi: 10.1101/2024.07.18.604205.
- [226] E. Bruni *et al.*, « Intrahepatic CD69+V δ 1 T cells re-circulate in the blood of patients with metastatic colorectal cancer and limit tumor progression », *J. Immunother. Cancer*, vol. 10, n° 7, p. e004579, juill. 2022, doi: 10.1136/jitc-2022-004579.
- [227] S. Meraviglia *et al.*, « Distinctive features of tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T lymphocytes in human colorectal cancer », *Oncoimmunology*, vol. 6, n° 10, p. e1347742, 2017, doi: 10.1080/2162402X.2017.1347742.

- [228] N. Zakeri *et al.*, « Characterisation and induction of tissue-resident gamma delta T-cells to target hepatocellular carcinoma », *Nat. Commun.*, vol. 13, n° 1, p. 1372, mars 2022, doi: 10.1038/s41467-022-29012-1.
- [229] H. Kaminski *et al.*, « Understanding human $\gamma\delta$ T cell biology toward a better management of cytomegalovirus infection », *Immunol. Rev.*, vol. 298, n° 1, p. 264-288, nov. 2020, doi: 10.1111/imr.12922.
- [230] J. Déchanet *et al.*, « Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus », *J. Clin. Invest.*, vol. 103, n° 10, p. 1437-1449, mai 1999, doi: 10.1172/JCI5409.
- [231] A. Knight *et al.*, « The role of V δ 2-negative $\gamma\delta$ T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation », *Blood*, vol. 116, n° 12, p. 2164-2172, sept. 2010, doi: 10.1182/blood-2010-01-255166.
- [232] L. Couzi *et al.*, « Gamma-delta T cell expansion is closely associated with cytomegalovirus infection in all solid organ transplant recipients », *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.*, vol. 24, n° 5, p. e40-42, mai 2011, doi: 10.1111/j.1432-2277.2010.01181.x.
- [233] D. Vermijlen *et al.*, « Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero », *J. Exp. Med.*, vol. 207, n° 4, p. 807-821, avr. 2010, doi: 10.1084/jem.20090348.
- [234] F. Halary *et al.*, « Shared reactivity of V δ 2(neg) $\gamma\delta$ T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells », *J. Exp. Med.*, vol. 201, n° 10, p. 1567-1578, mai 2005, doi: 10.1084/jem.20041851.
- [235] C. Khairallah *et al.*, « $\gamma\delta$ T cells confer protection against murine cytomegalovirus (MCMV) », *PLoS Pathog.*, vol. 11, n° 3, p. e1004702, mars 2015, doi: 10.1371/journal.ppat.1004702.
- [236] M. J. Conroy *et al.*, « Increased Frequencies of Circulating IFN- γ -Producing V δ 1(+) and V δ 2(+) $\gamma\delta$ T Cells in Patients with Asymptomatic Persistent Hepatitis B Virus Infection », *Viral Immunol.*, vol. 28, n° 4, p. 201-208, mai 2015, doi: 10.1089/vim.2014.0133.
- [237] D. Gogoi, B. Borkakoty, D. Biswas, K. Yadav, et V. Patel, « Characteristics of Circulatory $\gamma\delta$ T cells in Patients with Symptomatic Chronic Hepatitis B Infection », *Viral Immunol.*, vol. 34, n° 7, p. 483-490, sept. 2021, doi: 10.1089/vim.2020.0314.
- [238] G. Häcker, S. Kromer, M. Falk, K. Heeg, H. Wagner, et K. Pfeffer, « V delta 1+ subset of human gamma delta T cells responds to ligands expressed by EBV-infected Burkitt lymphoma cells and transformed B lymphocytes. », *J. Immunol.*, vol. 149, n° 12, p. 3984-3989, déc. 1992, doi: 10.4049/jimmunol.149.12.3984.
- [239] D. L. Orsini *et al.*, « A subset of V delta 1+ T cells proliferates in response to Epstein-Barr virus-transformed B cell lines in vitro », *Scand. J. Immunol.*, vol. 38, n° 4, p. 335-340, oct. 1993, doi: 10.1111/j.1365-3083.1993.tb01735.x.
- [240] M. E. Rothenberg, W. E. Weber, J. A. Longtine, et D. A. Hafler, « Cytotoxic gamma delta T lymphocytes associated with an Epstein-Barr virus-induced posttransplantation lymphoproliferative disorder », *Clin. Immunol. Immunopathol.*, vol. 80, n° 3 Pt 1, p. 266-272, sept. 1996, doi: 10.1006/clin.1996.0122.
- [241] D. L. Orsini *et al.*, « Functional and molecular characterization of B cell-responsive V delta 1+ gamma delta T cells », *Eur. J. Immunol.*, vol. 24, n° 12, p. 3199-3204, déc. 1994, doi: 10.1002/eji.1830241243.
- [242] S. Boullier, G. Dadaglio, A. Lafeuillade, T. Debord, et M. L. Gougeon, « V delta 1 T cells expanded in the blood throughout HIV infection display a cytotoxic activity and are

- primed for TNF-alpha and IFN-gamma production but are not selected in lymph nodes », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 159, n° 7, p. 3629-3637, oct. 1997.
- [243] F. Poccia *et al.*, « Phosphoantigen-reactive Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes suppress in vitro human immunodeficiency virus type 1 replication by cell-released antiviral factors including CC chemokines », *J. Infect. Dis.*, vol. 180, n° 3, p. 858-861, sept. 1999, doi: 10.1086/314925.
- [244] H. Fausther-Bovendo, N. Wauquier, J. Cherfils-Vicini, I. Cremer, P. Debré, et V. Vieillard, « NKG2C is a major triggering receptor involved in the V[delta]1 T cell-mediated cytotoxicity against HIV-infected CD4 T cells », *AIDS Lond. Engl.*, vol. 22, n° 2, p. 217-226, janv. 2008, doi: 10.1097/QAD.0b013e3282f46e7c.
- [245] K. Hudspeth *et al.*, « Engagement of NKp30 on Vδ1 T cells induces the production of CCL3, CCL4, and CCL5 and suppresses HIV-1 replication », *Blood*, vol. 119, n° 17, p. 4013-4016, avr. 2012, doi: 10.1182/blood-2011-11-390153.
- [246] N. Nanda et M. P. Alphonse, « From Host Defense to Metabolic Signatures: Unveiling the Role of γδ T Cells in Bacterial Infections », *Biomolecules*, vol. 14, n° 2, p. 225, févr. 2024, doi: 10.3390/biom14020225.
- [247] L. Shen *et al.*, « Fast-acting γδ T-cell subpopulation and protective immunity against infections », *Immunol. Rev.*, vol. 298, n° 1, p. 254-263, nov. 2020, doi: 10.1111/imr.12927.
- [248] L. Gay *et al.*, « Role of Vγ9Vδ2 T lymphocytes in infectious diseases », *Front. Immunol.*, vol. 13, p. 928441, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.928441.
- [249] C. K. Vorkas *et al.*, « Mucosal-associated invariant and γδ T cell subsets respond to initial Mycobacterium tuberculosis infection », *JCI Insight*, vol. 3, n° 19, p. e121899, 121899, oct. 2018, doi: 10.1172/jci.insight.121899.
- [250] A. Qaqish *et al.*, « Adoptive Transfer of Phosphoantigen-Specific γδ T Cell Subset Attenuates Mycobacterium tuberculosis Infection in Nonhuman Primates », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 198, n° 12, p. 4753-4763, juin 2017, doi: 10.4049/jimmunol.1602019.
- [251] Y. Okamoto Yoshida *et al.*, « Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 184, n° 8, p. 4414-4422, avr. 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0903332.
- [252] C. Y. Chen *et al.*, « Phosphoantigen/IL2 expansion and differentiation of Vγ2Vδ2 T cells increase resistance to tuberculosis in nonhuman primates », *PLoS Pathog.*, vol. 9, n° 8, p. e1003501, août 2013, doi: 10.1371/journal.ppat.1003501.
- [253] S. Hamada *et al.*, « IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 181, n° 5, p. 3456-3463, sept. 2008, doi: 10.4049/jimmunol.181.5.3456.
- [254] M. Hassane *et al.*, « Neutrophilic NLRP3 inflammasome-dependent IL-1β secretion regulates the γδT17 cell response in respiratory bacterial infections », *Mucosal Immunol.*, vol. 10, n° 4, p. 1056-1068, juill. 2017, doi: 10.1038/mi.2016.113.
- [255] J. A. Mathews, D. I. Kasahara, L. Ribeiro, A. P. Wurmbrand, F. M. C. Ninin, et S. A. Shore, « γδ T Cells Are Required for M2 Macrophage Polarization and Resolution of Ozone-Induced Pulmonary Inflammation in Mice », *PLoS One*, vol. 10, n° 7, p. e0131236, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0131236.
- [256] M. Guenot *et al.*, « Phosphoantigen Burst upon Plasmodium falciparum Schizont Rupture Can Distantly Activate Vγ9Vδ2 T Cells », *Infect. Immun.*, vol. 83, n° 10, p. 3816-3824, oct. 2015, doi: 10.1128/IAI.00446-15.

- [257] G. Costa *et al.*, « Control of Plasmodium falciparum erythrocytic cycle: $\gamma\delta$ T cells target the red blood cell-invasive merozoites », *Blood*, vol. 118, n° 26, p. 6952-6962, déc. 2011, doi: 10.1182/blood-2011-08-376111.
- [258] C. Junqueira *et al.*, « $\gamma\delta$ T cells suppress Plasmodium falciparum blood-stage infection by direct killing and phagocytosis », *Nat. Immunol.*, vol. 22, n° 3, p. 347-357, mars 2021, doi: 10.1038/s41590-020-00847-4.
- [259] I. Zaidi *et al.*, « $\gamma\delta$ T Cells Are Required for the Induction of Sterile Immunity during Irradiated Sporozoite Vaccinations », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 199, n° 11, p. 3781-3788, déc. 2017, doi: 10.4049/jimmunol.1700314.
- [260] A. S. Ishizuka *et al.*, « Protection against malaria at 1 year and immune correlates following PfSPZ vaccination », *Nat. Med.*, vol. 22, n° 6, p. 614-623, juin 2016, doi: 10.1038/nm.4110.
- [261] C. Speake *et al.*, « Identification of Novel Pre-Erythrocytic Malaria Antigen Candidates for Combination Vaccines with Circumsporozoite Protein », *PLoS One*, vol. 11, n° 7, p. e0159449, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0159449.
- [262] A. von Borstel *et al.*, « Repeated Plasmodium falciparum infection in humans drives the clonal expansion of an adaptive $\gamma\delta$ T cell repertoire », *Sci. Transl. Med.*, vol. 13, n° 622, p. eabe7430, déc. 2021, doi: 10.1126/scitranslmed.abe7430.
- [263] L. Hviid, C. Smith-Togobo, et B. E. Willcox, « Human $V\delta 1+$ T Cells in the Immune Response to Plasmodium falciparum Infection », *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 259, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.00259.
- [264] H. Kobayashi et Y. Tanaka, « $\gamma\delta$ T Cell Immunotherapy-A Review », *Pharm. Basel Switz.*, vol. 8, n° 1, p. 40-61, févr. 2015, doi: 10.3390/ph8010040.
- [265] P. Sawaisorn *et al.*, « Human $V\gamma 9V\delta 2$ T cell expansion and their cytotoxic responses against cholangiocarcinoma », *Sci. Rep.*, vol. 14, n° 1, p. 1291, janv. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-51794-1.
- [266] A. J. Nicol *et al.*, « Clinical evaluation of autologous gamma delta T cell-based immunotherapy for metastatic solid tumours », *Br. J. Cancer*, vol. 105, n° 6, p. 778-786, sept. 2011, doi: 10.1038/bjc.2011.293.
- [267] Y. Abe *et al.*, « Clinical and immunological evaluation of zoledronate-activated $V\gamma 9V\delta 2$ T-cell-based immunotherapy for patients with multiple myeloma », *Exp. Hematol.*, vol. 37, n° 8, p. 956-968, août 2009, doi: 10.1016/j.exphem.2009.04.008.
- [268] J. Nakajima *et al.*, « A phase I study of adoptive immunotherapy for recurrent non-small-cell lung cancer patients with autologous $\gamma\delta$ T cells », *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.*, vol. 37, n° 5, p. 1191-1197, mai 2010, doi: 10.1016/j.ejcts.2009.11.051.
- [269] G. M. Ferry *et al.*, « A Simple and Robust Single-Step Method for CAR- $V\delta 1$ $\gamma\delta$ T Cell Expansion and Transduction for Cancer Immunotherapy », *Front. Immunol.*, vol. 13, p. 863155, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.863155.
- [270] D. Cibrián et F. Sánchez-Madrid, « CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper », *Eur. J. Immunol.*, vol. 47, n° 6, p. 946-953, juin 2017, doi: 10.1002/eji.201646837.
- [271] C. Lebleu, « Polymersomes based on PEG-b-PTMC towards cell-mediated delivery of nanomedicines », phdthesis, Université de Bordeaux, 2019. Consulté le: 1 octobre 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://theses.hal.science/tel-03463393>

- [272] A. Martin, « Microfluidic-assisted self-assembly of biocompatible polymersomes : size control, drug-loading and self-assembly mechanism », These de doctorat, Bordeaux, 2023. Consulté le: 1 octobre 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://theses.fr/2023BORD0174>
- [273] « Characterizing Liposome Formation, Structure, and Stability | Malvern Panalytical ». Consulté le: 1 octobre 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.malvernpanalytical.com/fr/learn/knowledge-center/insights/characterizing-liposome-formation-structure-and-stability>
- [274] W. Li *et al.*, « Bio-Orthogonal T Cell Targeting Strategy for Robustly Enhancing Cytotoxicity against Tumor Cells », *Small*, vol. 15, n° 4, p. 1804383, 2019, doi: 10.1002/sml.201804383.
- [275] S.-W. Kang *et al.*, « Cell labeling and tracking method without distorted signals by phagocytosis of macrophages », *Theranostics*, vol. 4, n° 4, p. 420-431, 2014, doi: 10.7150/thno.7265.
- [276] K. Yamagishi, K. Sawaki, A. Murata, et S. Takeoka, « A Cu-free clickable fluorescent probe for intracellular targeting of small biomolecules », *Chem. Commun. Camb. Engl.*, vol. 51, n° 37, p. 7879-7882, mai 2015, doi: 10.1039/c4cc09947h.
- [277] H. Wang *et al.*, « Selective in vivo metabolic cell-labeling-mediated cancer targeting », *Nat. Chem. Biol.*, vol. 13, n° 4, p. 415-424, avr. 2017, doi: 10.1038/nchembio.2297.
- [278] S. K. Bhowmik *et al.*, « Application of ¹³C isotope labeling using liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) to determining phosphate-containing metabolic incorporation », *J. Mass Spectrom. JMS*, vol. 48, n° 12, p. 1270-1275, déc. 2013, doi: 10.1002/jms.3292.
- [279] J.-C. Cocuron et A. P. Alonso, « Liquid chromatography tandem mass spectrometry for measuring ¹³C-labeling in intermediates of the glycolysis and pentose phosphate pathway », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 1090, p. 131-142, 2014, doi: 10.1007/978-1-62703-688-7_9.
- [280] J. M. Baskin, K. W. Dehnert, S. T. Laughlin, S. L. Amacher, et C. R. Bertozzi, « Visualizing enveloping layer glycans during zebrafish early embryogenesis », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, n° 23, p. 10360-10365, juin 2010, doi: 10.1073/pnas.0912081107.
- [281] A. Filby, J. Begum, M. Jalal, et W. Day, « Appraising the suitability of succinimidyl and lipophilic fluorescent dyes to track proliferation in non-quiescent cells by dye dilution », *Methods San Diego Calif*, vol. 82, p. 29-37, juill. 2015, doi: 10.1016/j.ymeth.2015.02.016.
- [282] J. D. Tario, K. Humphrey, A. D. Bantly, K. A. Muirhead, J. S. Moore, et P. K. Wallace, « Optimized staining and proliferation modeling methods for cell division monitoring using cell tracking dyes », *J. Vis. Exp. JoVE*, n° 70, p. e4287, déc. 2012, doi: 10.3791/4287.
- [283] D. S. Grebenkov, « Diffusion-Controlled Reactions: An Overview », *Molecules*, vol. 28, n° 22, Art. n° 22, janv. 2023, doi: 10.3390/molecules28227570.
- [284] S. J. Lee *et al.*, « 4-1BB signal stimulates the activation, expansion, and effector functions of $\gamma\delta$ T cells in mice and humans », *Eur. J. Immunol.*, vol. 43, n° 7, p. 1839-1848, juill. 2013, doi: 10.1002/eji.201242842.
- [285] Li *et al.*, « T cell receptor-targeted immunotherapeutics drive selective in vivo HIV- and CMV-specific T cell expansion in humanized mice », *J. Clin. Invest.*, vol. 131, n° 23, janv. 2021, doi: 10.1172/JCI141051.

- [286] J. Koenig, S. J. Theobald, et R. Stripecke, « Modeling Human Cytomegalovirus in Humanized Mice for Vaccine Testing », *Vaccines*, vol. 8, n° 1, p. 89, févr. 2020, doi: 10.3390/vaccines8010089.
- [287] L. Daubon *et al.*, « Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development », *Nat. Commun.*, vol. 10, n° 1, août 2019, doi: 10.1038/s41467-019-08480-y.
- [288] X. Li, S. Weller, G. Clergeaud Veiga, et T. Andresen, « A versatile method for conjugating lipid nanoparticles on T cells through combination of click chemistry and metabolic glycoengineering », *Biotechnol. J.*, vol. 19, p. e2300339, janv. 2024, doi: 10.1002/biot.202300339.
- [289] S. Lee *et al.*, « Chemical tumor-targeting of nanoparticles based on metabolic glycoengineering and click chemistry », *ACS Nano*, vol. 8, n° 3, p. 2048-2063, mars 2014, doi: 10.1021/nn406584y.
- [290] P. Zhang, X. Zhang, C. Li, S. Zhou, W. Wu, et X. Jiang, « Target-Amplified Drug Delivery of Polymer Micelles Bearing Staudinger Ligation », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 11, n° 36, p. 32697-32705, sept. 2019, doi: 10.1021/acsami.9b10295.
- [291] D. Mao *et al.*, « Bio-orthogonal click reaction-enabled highly specific in situ cellularization of tissue engineering scaffolds », *Biomaterials*, vol. 230, p. 119615, févr. 2020, doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119615.
- [292] D. Xie, J. Chen, C. Chen, Y. Niu, L. Dong, et C. Wang, « Carbohydrate-Engineered Neutrophils Modulating Macrophage Phagocytosis and Phenotype », *Adv. NanoBiomed Res.*, vol. 3, n° 8, p. 2300008, août 2023, doi: 10.1002/anbr.202300008.
- [293] H. Gong *et al.*, « Simple Method To Prepare Oligonucleotide-Conjugated Antibodies and Its Application in Multiplex Protein Detection in Single Cells », *Bioconjug. Chem.*, vol. 27, n° 1, p. 217-225, janv. 2016, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00613.
- [294] J. Wiener, D. Kokotek, S. Rosowski, H. Lickert, et M. Meier, « Preparation of single- and double-oligonucleotide antibody conjugates and their application for protein analytics », *Sci. Rep.*, vol. 10, n° 1, p. 1457, janv. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-58238-6.

Développement d'un biohybride conjuguant lymphocytes T $\gamma\delta$ et polymersome : combinaison de la thérapie cellulaire et du drug delivery

Contexte : L'association de la thérapie cellulaire et des nanomédecines a progressé ces dernières années afin d'améliorer la prise en charge de nombreuses pathologies. Les lymphocytes T (LT) $\gamma\delta$, population cellulaire à l'interface entre l'immunité innée et adaptative, sont impliqués dans les réponses aux agents infectieux et aux cancers. Ils se divisent en deux sous-populations principales : les LT V γ 9V δ 2 et les LT non-V γ 9V δ 2, composés essentiellement de LT V δ 1. Les LT V δ 1 possèdent de multiples mécanismes d'activation, indépendants de la présentation antigénique par le HLA, et diverses fonctions effectrices, ce qui les rend particulièrement intéressant pour contourner les limitations rencontrées avec les thérapies utilisant les populations plus conventionnelles comme les LT $\alpha\beta$. De plus, ces cellules possèdent des propriétés de ciblage tissulaire qui en font des vecteurs prometteurs lors du développement de thérapie utilisant des nanoparticules. Parmi les nanoparticules développées ces dernières années, les nanoparticules polymériques, ou polymersomes, se distinguent par leurs nombreuses caractéristiques très utiles pour la thérapie : une membrane ayant une taille et une composition modulables, une capacité d'encapsulation importante de composés hydrophiles ou hydrophobes et une formulation relativement simple. De plus, les avancées en ingénierie métabolique et en chimie click utilisant les cyclooctynes comme le Dibenzocyclooctyne (DBCO) ont facilité son utilisation lors du développement de nouvelles thérapies ciblées.

Objectif : Ce travail de thèse avait pour objectif de mettre au point un protocole de chimie click afin de créer un biohybride composé de polymersomes fonctionnalisés avec du DBCO et des LT V δ 1 (DOT) amplifiés et modifiés par ingénierie métabolique.

Résultats : Dans un premier temps, les protocoles d'ingénierie métabolique et de chimie click ont été mis au point à l'aide de DBCO fluorescents. Ces protocoles ont été optimisés successivement sur une lignée cellulaire, des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) puis sur les cellules d'intérêt, les DOT. Des tests de toxicité et de fonctionnalité cellulaire ont été réalisés afin de vérifier la faisabilité de ce biohybride. Par la suite, ce même protocole a été expérimenté et optimisé sur des DOT et des polymersomes vides fonctionnalisés avec du DBCO.

Perspectives : Cette thèse apporte une première preuve de concept pour la combinaison de polymersomes avec les DOT. Toutefois, des tests de validation sont nécessaires pour évaluer pleinement la faisabilité de ce biohybride. Ces tests devront notamment vérifier l'activité des biohybrides envers les cellules cibles d'intérêt, la toxicité liée à la chimie click ainsi que les avantages potentiels que cette nouvelle approche thérapeutique pourrait offrir dans le traitement de pathologies telles que le cancer et l'infection au CMV.

Mots clés : lymphocytes T $\gamma\delta$, polymersome, réaction click, dibenzocyclooctyne, biohybride

Development of a Bio-Hybrid Combining $\gamma\delta$ T Lymphocytes and Polymersomes: Merging Cell Therapy and Drug Delivery

Background: The combination of cell therapy and nanomedicine has advanced in recent years to improve the management of various pathologies. $\gamma\delta$ T lymphocytes ($\gamma\delta$ T cells), a cell population at the interface between innate and adaptive immunity, are involved in immune response to infectious agents and to cancers. They are divided into two main subpopulations: V γ 9V δ 2 T cells and non-V γ 9V δ 2 T cells, mainly composed of V δ 1 T cells. V δ 1 T cells have multiple activation mechanisms independent of antigen presentation by HLA and various effector functions, making them particularly attractive for overcoming the limitations associated with therapies that use more conventional populations such as $\alpha\beta$ T cells. Additionally, these cells have tissue-targeting properties that make them promising vectors for developing nanoparticle-based therapies. Among the nanoparticles developed in recent years, polymeric nanoparticles, or polymersomes, stand out due to their many attractive features: a membrane with tunable size and composition, significant encapsulation capacity, and relatively simple formulation. Moreover, advances in metabolic engineering and click chemistry using cyclooctynes such as Dibenzocyclooctyne (DBCO) have facilitated their use in the development of new targeted therapies.

Objective: This thesis aimed to develop a click chemistry protocol to create a biohybrid composed of DBCO-functionalized polymersomes and V δ 1 T cells (DOT) amplified and modified through metabolic engineering.

Results: Initially, metabolic engineering and click chemistry protocols were developed using fluorescent DBCO. These protocols were sequentially optimized on a cell line, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and then on the cells of interest, the DOT cells. Toxicity and functionality tests were conducted to assess the feasibility of this biohybrid. Subsequently, the same protocol was tested and optimized on DOT cells and empty polymersomes functionalized with DBCO.

Perspectives: This thesis provides a first proof of concept for combining polymersomes with DOT cells. However, further validation tests are necessary to fully evaluate the feasibility of this biohybrid. These tests should particularly verify the activity of DOT cells against the target cells, the toxicity associated with click chemistry, and the potential benefits that this new therapeutic approach could offer in treating pathologies such as cancer and CMV infection.

Keywords: $\gamma\delta$ T cell, polymersome, click reaction, dibenzocyclooctyne, biohybrid