

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MEDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE NANTES - Santé	
SUDOC	
COTE	14 NANT 08-VS
LOC.	EXCLU
HOR.	

Année 2014

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Développement d'une Affitin anti-CD138 comme nouvel outil pour l'imagerie phénotypique

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie
Spécialité : Cancérologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Etienne MATOUS

Le 11 février 2014, devant le jury ci-dessous

Président : Professeur Hervé WATIER
Rapporteurs : Docteur Daniel BATY,
Professeur Pierre-Yves SALAUN

Examineur : Professeur Hervé WATIER

*Directeur de thèse :
Professeur Michel CHEREL*

*Co-directrice de thèse :
Docteur Barbara MOURATOU-PECORARI*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres rapporteurs du jury le Dr Daniel Baty ainsi que le professeur Pierre-Yves Salaün qui ont accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier mes encadrants de thèse Barbara Mouratou et Michel Chérel pour m'avoir accompagné tout au long de ces trois années. Vous m'avez donné l'opportunité de travailler sur un sujet passionnant, qui j'en suis persuadé, me servira de tremplin pour les années futures. Merci d'avoir su vous rendre disponible, merci pour votre encadrement, vos conseils ainsi que votre enseignement !

Je remercie Françoise Kraeber-Bodéré ainsi que Michel Chérel de m'avoir accueilli au sein de leur équipe de recherche.

Un grand merci à Michel pour les mille et une histoires contées au cours des pauses quatre-heures madeleines St-Mich mich, mais aussi pour les explications de tes concepts scientifiques hors du cadre universitaire et scolaire !

Merci à Frédéric pour tes conseils et pour ton écoute attentive, j'espère que l'on pourra aller prendre une bière ensemble à Zurich !

Merci à Ghislaine, pour m'avoir formé aux différentes techniques d'ingénierie des protéines : RD, purifications, production...merci pour ta disponibilité, tes conseils et ton efficacité

Mille mercis à Sébastien pour avoir relu une bonne partie de cette thèse, pour ton aide et tes conseils précieux dans la planification de manips compliquées, ta rigueur scientifique et ton efficacité font référence !

Merci à Catherine pour ton aide précieuse pour les manip *vivo*.

Merci à la Davodeau Team alias : François, Laetitia, Maya et Maxime. François pour toutes les conversations intéressantes que l'on a pu avoir (scientifiques ou sociétales). Merci à mes trois voisins de bureau, Maxime, Maya et Laetitia pour leur disponibilité et leur gentillesse, petite dédicace pour Maya : merci pour les superbes bonnes pâtisseries ou plats du Liban !!

Un grand merci à Alain de m'avoir accompagné au service de médecine nucléaire, merci à toi et à Patricia de vous être irradiés pour marquer des Affitins ! et pour votre disponibilité et votre bonne humeur !!

Merci à Steven et Philippe pour le temps passé à observer les Affitins accrochées aux cellules avec votre microscope de compét', merci à Steven de m'avoir appris à dompter les logiciels de traitement des images ! et de m'avoir supporter avec mes questions à répétition !

Merci à Myriam pour son aide, sa gentillesse et sa disponibilité !

Merci à Juliette pour son aide en cytométrie et pour sa gentillesse et sa bonne humeur !

Merci beaucoup à Jérémy S. pour son coup de crayon !

Merci à Jérémy pour m'avoir permis d'entraîner mon lever de coude au bar à bières le vendredi soir,

Merci à Jb le blond et à Jérémy pour tous les bons moments passés au RU à midi ou au cours des soirées de fiestas.

Merci à l'ensemble de l'équipe 13, Joëlle, Yannick, Nolwenn, Aurore, Matthieu, Françoise, Mickaël, Jacques : ça été un véritable plaisir de travailler avec vous et de vous côtoyer au cours de ces années !

Merci à tous mes amis de l'ADN Bio-santé : JB (le brun), Iza, Mathilde (pour ta relecture), Quentin, JB (le blond), Jérémy. C'était génial de monter cette asso ensemble, je n'oublierai jamais nos réunions en fin d'après-midi qui partaient forcément

en sucette à un moment (ou plusieurs moments), l'organisation des événements, le sens aigu de la direction de JB (Brown), l'application d'Iza à décrypter d'éventuelles informations intéressantes du brouhaha des réunions (pour le compte rendu)...à vous tous un grand merci pour les supers moments passés ensemble, j'espère pouvoir vous retrouver dans les années à venir !!

Une pensée particulière pour Ariane, merci pour m'avoir supporté et soutenu durant ces nombreux mois, merci pour les relectures qui ont grandement contribué à l'élaboration de ce manuscrit, merci pour ta compréhension et ton amour !

Merci à mes parents qui m'ont soutenu durant toutes ces années et qui m'ont permis de réaliser les études de mon choix, merci pour vos encouragements et votre compréhension.

Merci à mes trois frères pour avoir supporté mes interminables explications sur les cellules, les protéines et tout le toutim !

A ma famille.

TABLE DES ILLUSTRATIONS	9
INDEX DES ABREVIATIONS	12
PREAMBULE	17
INTRODUCTION	19
I. GENERALITES SUR LES CANCERS	20
1. PHYSIOPATHOLOGIE DU PROCESSUS TUMORAL	22
2. LA PRISE EN CHARGE DIAGNOSTIQUE ET THERAPEUTIQUE DES CANCERS	27
II. MEDECINE NUCLEAIRE – ASPECTS D’IMAGERIE ET THERAPEUTIQUES	30
1. GENERALITES SUR LA RADIOACTIVITE	30
2. LES RADIOPHARMACEUTIQUES	33
3. LES RADIO-ISOTOPES UTILISES EN MEDECINE NUCLEAIRE	34
4. L’IMAGERIE TEP POUR LA DETECTION DES CANCERS.....	36
III. VECTEURS POUR L’IMAGERIE : STRATEGIES DE CIBLAGE	39
1. CARACTERISTIQUES D’UN VECTEUR POUR L’IMAGERIE	39
2. LES TRACEURS : GENERALITES ET MODES D’ACTION.....	40
3. UTILISATION DES ANTICORPS POUR LE CIBLAGE D’ANTIGENES TUMORAUX.....	45
4. LES ALTERNATIVES AUX ANTICORPS POUR LE CIBLAGE DES TUMEURS	58
5. EVOLUTION DIRIGEE DE PROTEINES : DE LA CREATION DE LA DIVERSITE AU SEIN D’UNE BANQUE A LA SELECTION DES VARIANTS	72
6. RECAPITULATIF ET CONCLUSION A PROPOS DES PROTEINES ALTERNATIVES AUX ANTICORPS :	85
IV. LE MYELOME MULTIPLE.....	87
1. EPIDEMIOLOGIE.....	87
2. PHYSIOPATHOLOGIE ET MICROENVIRONNEMENT OSSEUX.....	88
3. DIAGNOSTIC	89
4. INTERET DE L’IMAGERIE PHENOTYPIQUE DANS LE MYELOME MULTIPLE	92
V. CD138 (SYNDECAN-1) BIOMARQUEUR POUR LE CIBLAGE TUMORAL.....	94
1. STRUCTURE ET SYNTHESE DES PROTEOGLYCANES (PG)	94
2. LES PROTEOGLYCANES A CHAINES HEPARANES SULFATES (HSPG).....	97
VI. LES AFFITINS COMME NOUVEAUX VECTEURS	106
1. ORIGINES ET CARACTERISTIQUES	106
2. GENERATION DE BANQUES	107
3. EXEMPLES D’APPLICATIONS DES AFFITINS.....	108

VII. LES OBJECTIFS DE LA THESE	112
MATERIELS ET METHODES	114
I. PRODUCTION DE LA PROTEINE RECOMBINANTE : CD138-β2M.....	114
II. UTILISATION DES BANQUES D’AFFITINS POUR LA SELECTION EN RIBOSOME DISPLAY	115
1. LES BANQUES D’AFFITINS	115
2. SELECTION PAR RIBOSOME DISPLAY.....	117
3. TOURS DE SELECTIONS PAR RIBOSOME DISPLAY DE 1 A 7.....	123
III. ELISA DE CONTROLE DE L’ENRICHISSEMENT EN AFFITINS ANTI-CD138.....	125
1. <i>TECHNIQUE N°1 : ELISA EN SANDWICH REALISE AVEC PROTEINES FIXEES SUR SUPPORT SOLIDE ENDUIT</i> <i>STREPTAVIDINE</i>	<i>127</i>
2. <i>TECHNIQUE N°2 : ELISA EN SANDWICH REALISEE AVEC UNE COMPLEXATION DES AFFITIN/PROTEINE BIOTINYLEES</i> <i>EN SOLUTION, PUIS CAPTURE VIA STREPTAVIDINE</i>	<i>128</i>
IV. CLONAGE DU POOL D’AFFITINS SUITE A LA SELECTION.....	128
1. PCR D’AMPLIFICATION DU POOL DE SELECTION.....	128
2. DESSALAGE DE LA PCR	129
3. DIGESTION ENZYMATIQUE DES PRODUITS DE PCR	129
4. PURIFICATION SUR GEL D’AGAROSE.....	129
5. LIGATION DES INSERTS DANS LE VECTEUR D’EXPRESSION PFP1001	130
6. TRANSFORMATION DE LA LIGATION DANS LES BACTERIES DH5 α I ^q	131
V. PRODUCTION ET PURIFICATION DES AFFITINS ISSUES DES SELECTIONS	131
1. CONSTITUTION D’UNE PLAQUE MERE DEEPWELL	132
2. PRODUCTION D’AFFITINS EN PLAQUE DEEPWELL 24 PUIITS	132
3. PURIFICATION DES AFFITINS ISSUES DE LA PRODUCTION EN PLAQUE DEEPWELL 24 PUIITS	133
VI. PRODUCTION D’UNE AFFITIN SOUS FORME DE PROTEINE DE FUSION COUPLEE A LA GFP.....	134
1. SOUS CLONAGE DE L’AFFITIN DANS LE VECTEUR PFP1300 :	134
2. LIGATION DANS LE VECTEUR PFP1300	135
3. PRODUCTION ET PURIFICATION DE L’AFFITIN FUSIONNEE	135
VII. CRIBLAGE DES AFFITINS PAR CYTOMETRIE EN FLUX : MISE EN EVIDENCE DES CLONES POSITIFS POUR CD138 PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	136
VIII. CULTURE CELLULAIRE	137
IX. DETERMINATION DE L’AFFINITE DES AFFITINS	138
X. MICROSCOPIE CONFOCAL	139
XI. IMMUNOHISTOCHEMIE.....	140

XII. MARQUAGE D'UNE AFFITIN A L'ALEXA 680.....	141
XIII. MARQUAGE RADIOACTIF	142
1. MARQUAGE AU SIB ET COUPLAGE SUR AFFITIN	142
2. MARQUAGE A L'IODOGENE	144
3. MARQUAGE AU TECHNETIUM 99M A L'AIDE DU KIT ISOLINK.....	144
XIV. MUTAGENESE DIRIGEE SUR A872	145
XV. PRODUCTION D'UNE AFFITIN EN MILIEU MINIMUM M9 EN VUE D'EFFECTUER UNE REACTION DE « CLICK	
CHEMISTRIE »	147
<u>RESULTATS.....</u>	150
I. PREPARATION DES PROTEINES UTILISEES POUR LES SELECTIONS EN RIBOSOME DISPLAY.....	150
1. BIOTINYLATION DES PROTEINES : CD138- β 2M ET β 2M.....	150
2. VERIFICATION DES PROTEINES	150
II. SELECTION D'AFFITINS CONTRE CD138-β2M	152
1. BANQUES D'AFFITINS UTILISEES POUR LA SELECTION.....	152
2. TOUR DE SELECTION N°7 ET MISE EN EVIDENCE D'AFFITINS CONTRE CD138	152
3. <i>PRE-CRIBLAGE DU POOL DE SELECTION PAR ELISA</i>	155
III. CARACTERISATION DES LIGNEES CELLULAIRES POUR L'EXPRESSION DE CD138 ET DE LA β2M.....	159
1. <i>PRODUCTION ET CRIBLAGE PAR CYTOFLUORIMETRIE DES CLONES ISSUS DU CLONAGE DU POOL DE SELECTION</i>	162
IV. ETUDES APPROFONDIES DE L'AFFITIN ANTI-CD138 : A872	172
1. ETUDE DE LA SPECIFICITE ET DE L'AFFINITE SUR DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES HUMAINES PAR	
CYTOFLUORIMETRIE	172
2. ETUDE DE REACTIVITE CROISEE SUR DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES	175
3. ETUDE DE LA STABILITE D'A872	176
4. ETUDE DE MICROSCOPIE CONFOCAL	179
V. ETUDE <i>IN VIVO</i> DES AFFITINS	186
1. BIODISTRIBUTION DE L'AFFITIN A6 APRES MARQUAGE A L'IODE 125	186
2. BIODISTRIBUTION D'A872 DANS UN MODELE DE XENOGREFFE DE CELLULES MDN EN SOUS CUTANE CHEZ LA	
SOURIS CB17-SCID	189
VI. ETUDE DU RADIOMARQUAGE DE L'AFFITIN A872.....	196
1. MARQUAGE DE L'AFFITIN A872 AVEC L'IODOGENE ET LE SIB.....	196
2. MISE EN PLACE DE STRATEGIES POUR L'UTILISATION D'UN SITE UNIQUE DE MARQUAGE SUR L'AFFITIN A872 ...	200
VII. MODELISATION STRUCTURALE PAR INFORMATIQUE	211
<u>RESULTATS SUPPLEMENTAIRES.....</u>	213

I. ETUDE SUR LA POSSIBILITE D'UN COUPLAGE D'UNE BIOTINE BI-FONCTIONNELLE VIA UN AVITAG	213
1. PRODUCTION D'A872 AVEC UN AVITAG	213
2. CONTROLE DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE D'A872-AVITAG-BIOT	214
II. MARQUAGE ET ANALYSE PAR CYTOFLUORIMETRIE DE CELLULES CANCEREUSES DE PATIENTS.....	216
III. GENERATION D'UNE BANQUE DE SECONDE GENERATION PAR UNE STRATEGIE « D'ERROR PRONE PCR » ET SELECTION PAR « OFF-RATE»	218
1. GENERATION D'UNE BANQUE DE SECONDE GENERATION	218
2. SELECTION D'AFFITINS PAR RIBOSOME DISPLAY A L'AIDE DES BANQUES DE SECONDES GENERATIONS	219
IV. IMMUNOGENICITE.....	222
<u>DISCUSSION</u>	<u>223</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>234</u>

Table des illustrations

<i>Figure 1 : Paramètres des processus tumoraux connus en 2000 (A), et en 2011 (B). D'après Hanahan et Weinberg.</i>	20
<i>Figure 3 : Barrières pour le transport de molécules jusqu'aux cellules cancéreuses.</i>	25
<i>Figure 4 : Comparaison du parcours des particules α (a) et des particules β (b) dans un tissu. D'après Couturier 2005.</i>	32
<i>Figure 5 : Processus de l'imagerie TEP. D'après © Hamamatsu Photonics K.K.</i>	37
<i>Figure 7 : Structure d'une immunoglobuline G. Protéine composée de quatre chaînes peptidiques : 2 chaînes lourdes (γ) et 2 chaînes légères (κ ou λ).</i>	46
<i>Figure 8 : Anticorps monoclonaux recombinants (IgG). Humanisation progressive des anticorps monoclonaux murins.</i>	47
<i>Figure 9 : A) Activation ou inhibition de la signalisation moléculaire après fixation du complexe anticorps/antigène sur les récepteurs Fc. B) Clairance du complexe anticorps/antigène et présentation aux CMH I et CMH II après fixation aux récepteurs Fc. D'après Toshiyuki Takai, et al., 2002.</i>	49
<i>Figure 10 : Mécanisme de protection des IgG par le récepteur Fc néonatal. D'après Chetty et al., 2013.</i>	50
<i>Figure 11 : Illustrations de vecteurs développés à partir d'anticorps. D'après Hudson 2005.</i>	54
<i>Figure 13 : Structure protéique d'un V_HH, les acides aminés impliqués dans l'interaction des domaines VH et VL sont entourés sur la modélisation. D'après Muyldermans et al., 2013.</i>	57
<i>Figure 14 : Schéma des domaines d'application des protéines alternatives aux anticorps.</i>	60
<i>Figure 15 : Structure d'un Affibody. (D'après Nordlund et al., 2003)</i>	61
<i>Figure 22 : A) Représentation schématique du bactériophage filamenteux fd B) Exemples d'expression à la surface d'un vecteur phage ou d'un vecteur phagemide. D'après Souriau et al., 1998.</i>	80
<i>Figure 23 : Schéma de la technique du Ribosome Display. D'après Jérémy Segard 2013.</i>	84
<i>Figure 26 : Structure et fonction biologiques des protéoglycanes. Le noyau protéique est en rouge, et les chaînes GAG fixées en vert sont composées d'unités dissaccharidiques répétées. (D'après Sasisekharan et al., 2002)</i>	95
<i>Figure 27 : Schéma de la biosynthèse des héparanes sulfates (D'après Bernfield et al., 2000).</i>	97
<i>Figure 28 : Schéma de la structure d'un HS. La chaîne est fixée au noyau protéique par des résidus spécifiques, et contient des séquences spécifiques pouvant être modifiées par des acétylations ou sulfonations, et servant de plateforme à différents facteurs de croissance comme par exemple le FGF-2, D'après Esko et al., 2007.</i>	99
<i>Figure 29 : Représentation schématique de la structure des syndécans. Les HS-GAGs sont attachées à la partie extracellulaire (Ectodomain), le domaine transmembranaire (transmembrane domain), C1 et C2 sont les parties conservées de la partie intracellulaire et la partie variable est symbolisée par V. D'après Rapraeger et al., 2001.</i>	101
<i>Figure 30 : Implication biologique de CD138 dans différents types de cancers.</i>	103
<i>Figure 37 : Représentation des différentes banques d'Affitins utilisées lors de la sélection contre CD138.</i>	116
<i>Figure 40 : Représentation du schéma de sélection par ribosome display utilisé contre CD138</i>	125

Figure 43 A) Le clonage de l’Affitin A6 ou A872 est réalisé dans un vecteur d’expression contenant la séquence de la GFP. B) Modélisation de structure de la protéine de fusion A6-GFP. _____	136
Figure 52 : Histogramme des résultats obtenus en ELISA avec la traduction <i>in vitro</i> des ARN du pool de sélection n°7 _____	154
Figure 54 Alignement des séquences peptidiques de A6 et A8 isolées à partir d’un criblage par ELISA. _____	156
Figure 55 A) Courbes de saturation pour les lignées LP1 et Adam obtenues avec la protéine de fusion A6-GFP. B) Résultats obtenus pour la détermination du K_d _____	157
Figure 59 A) Affitins sélectionnées lors du criblage du pool#7. B) Clones identiques. C) Clones sélectionnés contre CD138+/LP1 (échelle linéaire). _____	164
Figure 62 : Chromatogrammes des Affitins sélectionnées contre CD138, représentation de la DO_{280nm} en fonction du temps. _____	168
Figure 63 : Courbes de saturation obtenues sur la lignée U266 A) et sur la lignée Raji B), montrant les intensités de médiane de fluorescence en fonction de la concentration des Affitins sélectionnées contre CD138. _____	170
Figure 66 Cytogrammes décrivant le marquage d’A872 (5 μ M) sur des lignées cellulaires exprimant CD138 murin et canin. _____	175
Figure 67 : Mesure de l’activité biologique d’A872 après 12 heures d’incubation à température ambiante dans un tampon acétate et carbonate à différents pH (A), et après chauffage à 100°C jusqu’à 30 minutes en tampon acétate pH=4 (B) sur la lignée U266. _____	177
Figure 70 Modélisation de structure tridimensionnelle de la protéine de fusion A872-GFP ainsi que l’alignement de sa séquence peptidique avec A872 et la GFP _____	180
Figure 71 : Courbes de saturation d’IMF en fonction de la concentration en A872-GFP pour les lignées cellulaires U266, KMM1 et Raji. _____	181
Figure 72 : Clichés de microscopie réalisés sur la lignée U266 avec A872-GFP, ainsi que C5-GFP et B-B4 couplé dylight 640. _____	182
Figure 79 : A) Histogramme présentant les volumes tumoraux des souris utilisées pour la biodistribution. B) Photo d’une souris CB17-SCID avec une xénogreffe de cellules MDN en sous cutanée. _____	189
Figure 80 : Clichés de coupes histologiques avec révélation de CD138 dans la tumeur à l’aide de l’anticorps B-B4 utilisé en marquage direct sur la coupe histologique, grossissement x20 et x80. _____	190
Figure 90 Alignement des séquences peptidiques obtenues après mutation du résidu cystéine en position 41. _____	201
Figure 92 : Cytogrammes et IMF obtenues sur les lignées cellulaires LP1, KMM1 et Raji avec A872 à 100 nM et les mutants A872 Cys ⁻ à 10 μ M. _____	202
Figure 102 : Alignement des séquences peptidiques obtenues après mutation du résidu méthionine en position 72. _____	208
Figure 103 : Cytogrammes regroupe les résultats obtenus pour le marquage des lignées U266 et Raji avec l’anticorps anti-CD138 MI15, l’Affitin A872 et pour les clones M72I, M72L et M72V. _____	209
Figure 108 : Histogramme présentant les résultats de ELISA obtenu après traduction des pools de sélection du tour n°9 et des pools de sélection n°12. _____	221

Figure 109 : Test de l'immunogénicité de l'Affitin A872 A) planification des injections d'Affitin par voie intraveineuse ainsi que des prélèvements sanguins B) Schéma du montage en ELISA. _____ 223

Index des abréviations

¹⁸F-FDG : Fluorodésoxyglucose marqué au fluor 18

A

ACE : Antigène carcino-embryonnaire

AcMs : Anticorps monoclonaux

ADCC : Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

Ang-1 : Angiopoétin-1

ARN : Acide ribonucléique

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

aa : Acide aminé

B

BBP : Bilin-binding protein

bFGF : Basic fibroblast growth factor

C

CAM : Cell adhesion molecule

CDC : Complement-dependent cytotoxicity

CDR : Complementary determining region

CE : Cellule endothéliale

CEA : Carcinoembryonic antigen

COX-2 : Cyclo-oxygénase-2

CS : Chondroïne sulfate

CT : Computed tomographie, tomographie calculée par ordinateur

D

DARPin : Designed ankyrin repeat protein

DKK-1 : Dickkopf-related protein 1

DOTA : 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid

DS : Dermatane-sulfate

DuARChem : Dual Approach to Random Chemical Mutagenesis

E

EGF : Epidermal growth factor

EGFR : Récepteur de l'EGF

epPCR : error prone polymerase chain reaction

F

FcRn : Neonatal Fc receptor

FGF : Fibroblast growth factor

FISH : Fluorescent *in situ* hybridization

G

GAG : Glycoaminoglycanes

GLUT : Glucose transporter type

GRP : Gastrin-releasing peptide

H

HCABs : Heavy-chain antibodies

Hep : Héparine

HER-2 : Human epidermal growth factor receptor-2

HGF : Hepatocyte growth factor

Hpg : Homopropargylglycine

HS : Héparane-sulfate

HSGAGs : Heparan sulfate glycosaminoglycans

HSPGs : Heparansulfate proteoglycans

I

Id : Inhibitors of differentiation

IFN : Interféron

IFP : Interstitial fluid pressure

Ig : Immunoglobuline

IGF : Insulin-like growth factor

IGFR : Récepteur à l'IGF

IMGW : International myeloma working group

INCa : Institut national du cancer

IRM : Imagerie par résonance magnétique

ITAM-ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based activator motif-IT inhibitory M

J

JNK : c-Jun N-terminal kinases

M

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1

MM : Myélome multiple

MMP : Métalloprotéinase matricielle

N

NOS : Nitric oxide synthase

NRP1 : Neuropilin 1

O

OB-fold : oligonucleotide/oligosaccharide binding fold

OMS : Organisation mondiale de la santé

OPG : Ostéoprotégérine

P

PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1

PCA : Protein Fragment complementary assay

PCE : Progéniteurs de cellules endothéliales

PCR : Polymerase chain reaction

PDB : Protein data base

PDGF : Platelet-derived growth factor

PET : Positron emission tomography

PFI : Pression du fluide interstitiel

PG : Protéoglycane

pH : Potentiel hydrogène

PIB : *p*-iodo-benzoate

R

RANK-L : Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

RCA : Rolling circle amplification

RD : Ribosome display

RIT : Radio-immunothérapie

S

SAPK : Stress-activated protein kinases

SELEX : Systematic evolution of ligands by exponential enrichment

SPARC : Secreted protein acidic and rich in cysteine

T

TC : Tip cell, cellule de l'embout

TDM : Tomodensitométrie

TEMP : Tomographie d'émission monophotonique

TEP : Tomographie par émission de positons

TGF- β : Transforming growth factor beta

TIE-2 : Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains

TNE : Tumeurs neuro-endocrines

TNF- α : Tumor

U

UAAs : Unnatural amino acids

V

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VEGFR : Récepteur du VEGF

VHHs : Variable fragments of heavy chain antibodies

Préambule

Le rapport de l'Institut National du Cancer estime à 146 500 le nombre de décès par cancer en 2010, dont 60% d'hommes et 40% de femmes. La recherche contre le cancer constitue par conséquent une priorité majeure de santé publique. Malgré l'augmentation de l'incidence des cancers au cours des trente dernières années, la mortalité a reculé grâce notamment à la mise au point de nouveaux protocoles thérapeutiques et de moyens de diagnostics plus performants. Ces améliorations ont notamment été rendues possibles grâce à la compréhension des processus biologiques. Actuellement les moyens de diagnostic sont limités par leurs niveaux de détection qui permettent de déceler des tumeurs de plusieurs mm³ laissant ainsi aux tumeurs plus petites la possibilité d'échapper au traitement et de se développer. De plus, pour les tumeurs repérables, leur caractérisation nécessite la réalisation d'une biopsie afin de procéder à des études génomiques, des études d'expression antigénique ou encore des études histologiques. Ces analyses sont non seulement invasives pour le patient mais elles nécessitent également la mise en place de protocoles longs et coûteux. L'évolution et l'amélioration de la médecine personnalisée nécessitent par conséquent la recherche et le développement de nouveaux outils permettant de détecter et de caractériser les foyers tumoraux *in situ* de façon non-invasive et à l'échelle du corps entier. Les approches de diagnostic par imagerie médicale permettent de mettre en lumière la présence de processus tumoraux à l'aide de protocoles peu ou pas invasifs. L'imagerie biomédicale repose aujourd'hui principalement sur les rayons X, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou sur la tomographie par émission de positons (TEP) et constitue actuellement l'un des principaux piliers des soins oncologiques.

L'OMS (Organisation mondiale de la Santé) estime qu'un tiers des cancers pourraient être évité par le dépistage précoce et la mise en place de programmes visant à détecter des bio-marqueurs. La révélation de ces derniers permettrait de caractériser chaque cancer et d'adapter les moyens thérapeutiques à chaque patient.

Les premiers protocoles d'imagerie phénotypique étaient basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux radiomarqués. Cependant leurs propriétés pharmacocinétiques n'étant pas optimales pour des protocoles d'imagerie, la mise au point de nouveaux vecteurs comme le FDG stoppa leur utilisation pour l'imagerie TEP. Néanmoins les anticorps se sont révélés performants pour le traitement de nombreux cancers lors de leur couplage à des radioéléments. De nombreuses études ont déjà pu mettre en évidence l'intérêt de l'utilisation de molécules de petites tailles ciblant des biomarqueurs de tumeurs *in vivo*. Leur utilisation permet, en effet, un ciblage tumoral rapide et l'obtention d'images diagnostiques de meilleures résolutions qu'avec des macromolécules comme les anticorps entiers.

Dans ce contexte, notre groupe de recherche développe les Affitins comme nouvel outil pour le ciblage de tumeurs. L'objectif de mon travail de thèse est de générer des Affitins anti-CD138 et d'exploiter leur faible poids moléculaire et leur grande stabilité physique pour les utiliser comme nouvel outil d'imagerie phénotypique.

Aussi, afin d'introduire le travail réalisé au cours de ma thèse et suite à un rappel sur les connaissances actuelles en oncologie, je vais définir dans les parties suivantes la place de l'imagerie médicale dans la lutte contre le cancer, ainsi que les moyens de recherche mis en œuvre pour obtenir les futurs outils qui seront utilisés dans la médecine personnalisée de demain. Je préciserai par la suite les difficultés de diagnostic et de thérapie rencontrées chez les patients atteints de myélome multiple en expliquant l'intérêt de l'imagerie pour cette pathologie. Enfin les dernières parties seront consacrées à l'étude bibliographique de CD138 qui constitue un biomarqueur particulièrement intéressant pour le ciblage du myélome multiple mais aussi de plusieurs autres cancers, ainsi qu'à la description des Affitins.

INTRODUCTION

I. Généralités sur les cancers

La publication de Doug Hanahan et de Bob Weinberg en 2000 a posé un cadre conceptuel du processus tumoral en décrivant six caractéristiques partagées par l'ensemble des cancers [1]. De façon générale, les cancers sont autosuffisants en facteurs de croissance, insensibles aux signaux inhibiteurs de croissance, dépourvus d'apoptose, possèdent un potentiel répliatif illimité, et enfin sont capables d'induire de l'angiogenèse et de métastaser. Cette conceptualisation a eu un impact important dans la recherche contre le cancer. Depuis, de nombreuses études ont permis de réaliser des progrès considérables dans la compréhension des mécanismes de tumorigenèse et ainsi de mettre en évidence l'implication d'autres facteurs dans le développement tumoral. Les mêmes auteurs ont publié en 2011 un nouvel article proposant quatre nouveaux paramètres (dérégulation de l'énergie cellulaire, échappement au système immunitaire, instabilité du génome, promotion de l'inflammation) permettant de mieux comprendre l'extraordinaire diversité ainsi que la complexité des maladies néoplasiques (Figure 1) [2].

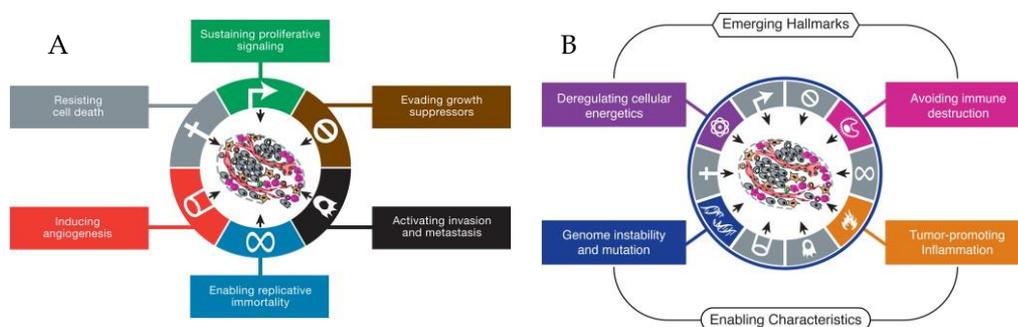


Figure 1 : Paramètres des processus tumoraux connus en 2000 (A), et en 2011 (B).
D'après Hanahan et Weinberg.

L'analyse fondamentale des interactions biologiques au sein des tumeurs permet aujourd'hui de mieux comprendre la tumorigenèse ainsi que les interactions des systèmes physiologiques de l'hôte avec les cellules tumorales. Elle permet en outre de mieux comprendre l'organisation structurelle des masses tumorales. La

conceptualisation et la compréhension de ces phénomènes biologiques sont fondamentales pour prescrire des stratégies thérapeutiques adaptées. En effet une lutte efficace contre le cancer, permettant idéalement une rémission totale, passe par la mise au point d'outils de diagnostic permettant aux cliniciens de dresser rapidement un bilan personnalisé de la pathologie (localisation, taille, quantité, caractéristiques individuelles) et d'adapter spécifiquement le traitement thérapeutique au cancer considéré.

La tumorigénèse des cellules est initiée par plusieurs étapes successives conduisant au gain de différentes caractéristiques promouvant le développement tumoral. Il s'agit ici d'une accumulation de changements génétiques activant des proto-oncogènes et/ou inactivant des gènes suppresseurs de tumeurs [3, 4]. Une des principales conséquences est la prolifération incontrôlée maintenue notamment grâce à la sécrétion importante de facteurs de croissance par les cellules tumorales. De plus, la biodisponibilité de ces facteurs de croissance est favorable à la prolifération cellulaire par leur stockage au niveau du microenvironnement tumoral. Les cellules cancéreuses sont ainsi capables de stimulations autocrines, mais également de stimuler les cellules normales du stroma tumoral, qui peuvent répondre à leur tour par la sécrétion de facteurs de croissance et notamment par la mise en place d'une néo-angiogenèse permettant la survie du foyer tumoral [5].

L'angiogenèse tumorale est un événement décisif pour le développement tumoral (apport de nutriments, d'oxygène et élimination des déchets métaboliques). Le processus de vascularisation tumorale (la structure des vaisseaux, la pression sanguine intra-tumorale) joue également un rôle primordial dans la distribution des molécules exogènes comme celles utilisées pour réaliser de l'imagerie médicale ou pour effectuer un traitement curatif. C'est pourquoi j'aborderai par la suite les processus intervenant dans la formation de nouveaux vaisseaux intratumoraux.

1. Physiopathologie du processus tumoral

1.1. Vascularisation tumorale

a) *Formation et anatomie des vaisseaux tumoraux*

Toutes les cellules des mammifères ont besoin d'oxygène et de nutriments pour survivre au sein de leur microenvironnement. Leur distribution est assurée à l'ensemble des cellules par le réseau vasculaire. Les cellules se situent au maximum à 200 µm d'un vaisseau sanguin, distance limite de diffusion de l'oxygène entre le capillaire et les cellules, ce qui correspond à approximativement 3 à 5 couches cellulaires autour du vaisseau. Les tumeurs peuvent ainsi grossir jusqu'à environ 1 à 2 mm³ (10⁵-10⁶ cellules) tant que leur besoin métabolique est satisfait par la diffusion de l'oxygène et des nutriments. Pour poursuivre leur croissance au delà de cette limite, les tumeurs modifient leur phénotype et réalisent une commutation angiogénique en attirant les vaisseaux sanguins du stroma environnant [6].

Il est communément admis que le contrôle de l'angiogenèse fait intervenir une balance entre facteurs pro- et anti-angiogéniques (Tableau 1). Dans des conditions physiologiques, les facteurs inhibiteurs dominent les activateurs. Lors de la commutation, des facteurs pro-angiogéniques vont être excrétés par les cellules cancéreuses et par des cellules du stroma tumoral (fibroblastes, cellules musculaires lisses) ou de la matrice extracellulaire, ayant pour conséquence de déréguler la balance [7]. Plusieurs facteurs pouvant initier ces changements phénotypiques ont été identifiés :

- les stress métaboliques : hypoglycémie, acidification du microenvironnement, hypoxie
- la réponse inflammatoire
- le stress mécanique : compression des tissus par la prolifération des cellules tumorales

- les mutations génétiques : activation d'oncogènes et/ou délétion de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le contrôle de l'angiogenèse [8].

Activateurs	Fonction
Membres de la famille des VEGF	Stimulation de l'angio/vasculogenèse, perméabilité, adhésion leucocytaire
VEGFR, NRP1	Récepteurs des signaux angiogéniques et de survies
Ang1 et Tie2	Stabilise les vaisseaux, inhibition de la perméabilité
PDGF-BB et récepteurs	Recrutement des cellules musculaire lisses
TGF-β1, endogliline, récepteur TGF-β	Stimule la production de matrice extracellulaire
FGF, HGF, MCP-1	Stimule angio/artériogenèse
Intégrine αVβ3, αVβ5, α5β1	Récepteurs pour macromolécules de la matrice et de protéases
VE-cadherine, PECAM (CD31)	Molécules de jonction endothéliale
Ephrins	Régulation de la spécialisation veineuse et artérielle
Activateur du plasminogène, MMPs	Remodelage de la matrice, libère et active des facteurs de croissance
PAI-1	Stabilisation des néovaisseaux
NOS, COX-2	Stimule l'angiogenèse et la vasodilatation
AC133	Régulation de la différenciation angioblastique
Chémokines	Rôle pléiotropique dans l'angiogenèse
Id1/Id3	Détermine la plasticité endothéliale

Inhibiteurs	Fonction
VEGFR-1 transmembranaire et soluble, NRP-1 soluble	VEGF pour la peau, VEGF-B, PlGF
Ang2	Antagoniste de Ang1
TSP-1,2	Inhibition de la migration endothéliale, croissance, adhésion et survie
Angiostatine, plasminogène	Suppresseur d'angiogenèse tumorale
Endostatine (fragment de collagène XVIII)	Inhibe la migration et la survie endothéliale
Vasostatine, calréticuline	Inhibe la croissance endothéliale
Facteur plaquettaire 4	Inhibition de la fixation de bFGF et VEGF
TIMP, inhibiteur de MMP, PEX	Suppresseurs de pathologies angiogéniques
Meth-1, Meth-2	Inhibiteur des domaines MMP, TSP et désintègre
IFN-α-β-γ, IP-10, IL-4, IL-12, IL-18	Inhibition de la migration endothéliale, diminue bFGF
Prothrombine Kringel-2, fragment antithrombine III	Suppression de la croissance endothéliale
Prolactine (Mt, 16K)	Inhibition de bFGF/VEGF
VEGI	Module la croissance cellulaire
Fragment de SPARC	Inhibition de la fixation endothéliale et de l'activité du VEGF
Fragment ostéopontine	Interfère avec le signal de l'intégrine
Maspin	Inhibiteur de protéase
Canstatin, restin	Mécanismes inconnus

Tableau 1 : Activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse. D'après Carmeliet et Jain 2000.

L'hypoxie intra-tumorale semble jouer un rôle prépondérant dans la surexpression de gènes pro-angiogéniques et dans l'attraction de macrophages qui produisent des protéases facilitant la migration des cellules endothéliales sur le site tumoral. Ce processus va permettre à la tumeur d'établir son propre système vasculaire pour poursuivre sa croissance et sa dissémination métastatique. Les vaisseaux sanguins tumoraux se développent par bourgeonnement ou par intussusception à partir de vaisseaux préexistants, et en mobilisant des précurseurs endothéliaux issus de la moelle osseuse ou de la paroi des vaisseaux [9]. Il a

également était décrit dans de nombreux cancers un mécanisme de mimétisme au cours duquel les cellules tumorales acquièrent la capacité à exprimer un phénotype de cellules endothéliales (CE) et à former un réseau de pseudo-vaisseaux dépourvu de CE où les cellules tumorales sont en contact direct avec le sang [10, 11].

b) *Anatomie des vaisseaux tumoraux*

L'angiogenèse tumorale est moins bien régulée que le processus physiologique, et les vaisseaux tumoraux sont structurellement et fonctionnellement différents. Contrairement aux vaisseaux normaux, la vascularisation tumorale est généralement désorganisée et anarchique, les vaisseaux sont tortueux et dilatés [12]. Ils présentent des diamètres inégaux et de nombreuses ramifications et dérivations résultant du déséquilibre entre les régulateurs de l'angiogenèse, comme notamment le VEGF et l'angiopoïétine. Histologiquement, la paroi des vaisseaux est anormale. Elle comporte un grand nombre d'ouvertures et de fenestrations avec des jonctions inter-endothéliales élargies. En outre, la forme et la disposition des CE sont anormales et rendent les vaisseaux tumoraux perméables et ponctuellement hémorragiques (Figure 2) [13]. Par conséquent le flux hémodynamique est variable et chaotique. Il peut s'arrêter voire s'inverser, et malgré la formation de néovaisseaux, une hypoxie et une acidification du microenvironnement peuvent être observées. Il s'ensuit une nécrose intra-tumorale associée.

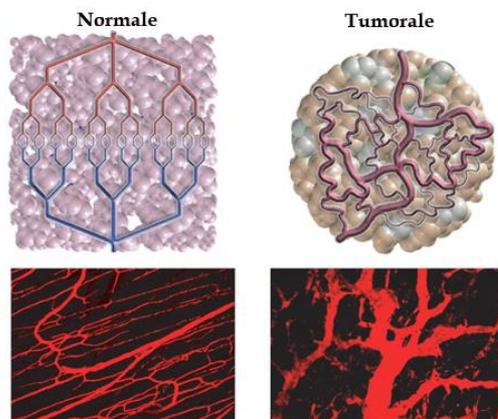


Figure 2.: Réseaux vasculaires normaux et tumoraux. D'après Rakesh 2010.

1.2. La distribution intra-tumorale des molécules

La micro-vascularisation chaotique des tumeurs solides, associée à leur organisation complexe, peut limiter significativement la distribution des molécules thérapeutiques ou de diagnostic. Pour que ces agents de thérapie ou de diagnostic puissent atteindre leur cible à des niveaux de concentration significatifs après leur injection systémique, trois barrières principales doivent être franchies : la distribution dans l'espace vasculaire de la tumeur avec ses compartiments vasculaires chaotiques, puis l'extravasation, soit le transport à travers la paroi de vaisseaux, suivie par la convection extravasculaire (transport interstitiel) (Figure 3). De plus, comme nous l'avons vu précédemment, les pores vasculaires sont généralement plus larges dans les vaisseaux tumoraux que dans les tissus sains. En outre, ils sont de tailles très variées, et l'organisation de la membrane basale de ces vaisseaux tumoraux est anormale. Les propriétés de composition des vaisseaux tumoraux jouent donc un rôle prépondérant dans la variabilité de distribution des molécules exogènes et concourent à la répartition très hétérogène des drogues au sein de la tumeur.

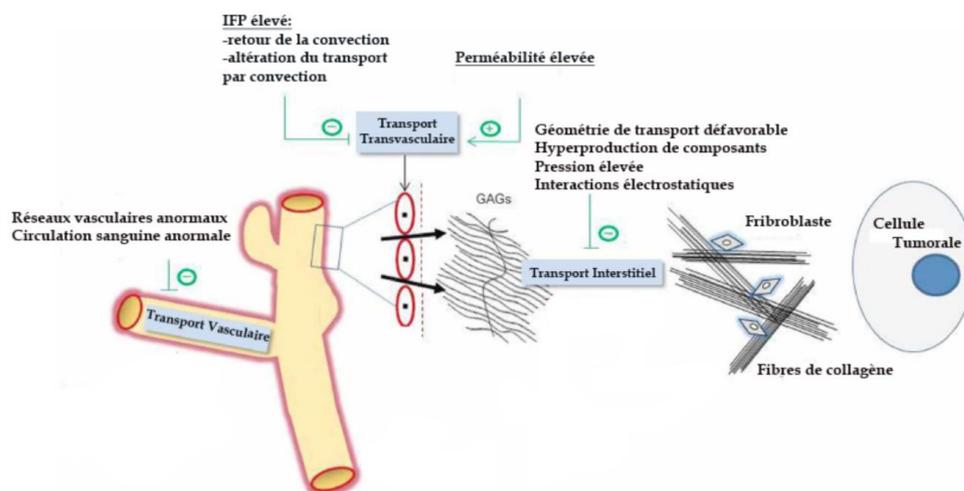


Figure 3 : Barrières pour le transport de molécules jusqu'aux cellules cancéreuses.

Le transport des molécules dans le milieu interstitiel est affecté par la pression élevée du liquide interstitiel (IFP : Interstitial Fluid Pressure). En effet, l'espace interstitiel des tumeurs diffère grandement de celui retrouvé dans les tissus sains. La matrice interstitielle des tumeurs solides est composée d'un réseau très dense de fibres de collagène qui interagissent avec d'autres molécules comme les protéoglycanes ou les glycosaminoglycanes [14]. Le développement de vaisseaux sanguins très perméables, la perte d'un réseau lymphatique fonctionnel, la fibrose de l'espace interstitiel, la concentration de la matrice interstitielle médiée par les fibroblastes, et enfin la prolifération cellulaire dans un espace restreint, ont pour conséquence d'élever la pression du fluide interstitiel et hydrostatique dans la plupart des tumeurs solides. La conséquence directe de l'augmentation de la pression intratumorale est une différence de gradient de pression transvasculaire et interstitiel égal à zéro, excepté en périphérie où le réseau lymphatique encore fonctionnel peut drainer les fluides excédentaires [15, 16]. En l'absence de gradients de pression de fluide, la force motrice pour le transport de molécules par convection est fortement diminué, laissant la diffusion en grande partie responsable du transport transvasculaire et interstitiel des molécules dans une grande partie de l'espace tumoral. Ce sont surtout les molécules de haut poids moléculaire (ex : anticorps, liposomes) qui pénètrent dans les tissus par convection en opposition au transport par simple diffusion des molécules de plus faible poids moléculaire. Leur distribution est par conséquent pauvre et les pénétrations dans l'espace interstitiel limitées (Figure 3).

Le coefficient de diffusion des particules telles que les liposomes ou les anticorps dont la taille peut aller jusqu'à plusieurs nanomètres de diamètre, est considérablement diminué par les interactions avec la matrice interstitielle. En effet, la place disponible à travers les réseaux de fibres de collagène pour le transport de ces molécules diminue avec leurs tailles [17]. Les caractéristiques électrostatiques des molécules interviennent également. En fonction de leur charge globale, les particules chargées développent de l'attraction ou de la répulsion électrostatique avec les composés chargés de l'espace interstitiel, ce qui peut diminuer potentiellement leur

diffusion vers les cellules cibles [18, 19]. Enfin, la forme de la molécule peut se révéler être importante. Il a été montré que les macromolécules de configuration linéaire et semi-flexible diffusent plus efficacement que ne le font les particules sphériques de taille comparable [20, 21]. Par exemple, les agents de vectorisation développés sur la base de petites charpentes protéiques qui ne dépassent pas quelques nanomètres de diamètre, diffusent très rapidement au sein de la matrice interstitielle.

2. La prise en charge diagnostique et thérapeutique des cancers

2.1. Bilan et état de l'art

Comme explicité dans le rapport de l'INCa sur la « Dynamique d'évolution des taux de mortalité des principaux cancers en France » paru en novembre 2010, le cancer a représenté la première cause de décès en France chez l'homme (33% de l'ensemble des décès masculins) et la deuxième cause chez la femme (23% de l'ensemble des décès féminins) au cours de la période 2003-2007. Ce rapport met en évidence d'importantes évolutions au cours des 20 dernières années, avec un taux de décès, tous âges et types de cancers confondus, en net recul avec notamment une accélération de ce recul au cours des dix dernières années. Cette diminution est observée en comparant les taux de mortalité enregistrés pour les périodes 1983-87 et 2003-07. Le taux moyen pour les hommes a ainsi baissé de 22% passant de 208,7 à 162,6 décès pour 100 000 hommes. Le taux moyen pour les femmes a diminué de manière moins importante (14%), mais reste toujours inférieur à celui des hommes, en passant de 92,8 à 79,9 décès pour 100 000 femmes. La décroissance du taux de mortalité moins importante chez les femmes s'explique par la forte hausse du taux féminin de mortalité par cancer du poumon au cours des vingt dernières années, augmentation liée directement à celle de la consommation de tabac observée depuis quarante ans. Chez l'homme, la baisse du taux de mortalité de cancer est notamment attribuée à la baisse importante de mortalité de certains cancers liés à la

consommation de tabac et d'alcool. Le mérite de la diminution de ces cancers en lien avec le recul de la consommation alcoolo-tabagique, peut être attribué aux multiples campagnes de prévention et de communication, visant les consommateurs d'alcool et de tabac et rappelant les effets de ces produits sur la santé. Il apparaît clairement que l'effet sur la santé des populations est directement proportionnel à leur degré de consommation. En revanche l'évolution de la mortalité par cancer ne semble pas être liée à des paramètres démographiques tels que l'accroissement ou le vieillissement de la population. Actuellement nous pouvons observer une nette diminution du nombre de morts par cancer due à l'éducation comportementale mais également grâce à la précocité et à la qualité des diagnostics ainsi qu'à une meilleure prise en charge thérapeutique des patients.

Les enjeux de la cancérologie sont doubles : d'une part la recherche et le développement de nouveaux outils pour améliorer le diagnostic précoce et évaluer rapidement la réponse thérapeutique afin d'être en mesure de moduler le traitement si besoin est, et ainsi d'éviter la toxicité et les coûts inutiles. D'autre part il est nécessaire de développer de nouvelles thérapies ciblées, afin que les cliniciens puissent adapter les différents traitements (chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie) de manière individuelle et ainsi offrir aux patients une plus grande efficacité de traitement et de meilleures chances de guérison.

Ces axes de recherche s'inscrivent dans le développement d'une médecine personnalisée, qui nécessite l'emploi d'outils permettant de « typer » chaque patient et d'adapter à chacun les meilleurs moyens thérapeutiques. L'utilisation de protocoles de biologie comme les analyses histologiques ou la FISH (« fluorescence *in situ* hybridization ») permet d'ores et déjà de caractériser au niveau cellulaire ou génétique les cancers des patients. Néanmoins ces méthodes sont invasives et ne permettent pas de préciser le profil cancéreux à l'échelle du patient en se limitant aux fragments de tumeur accessibles par chirurgie.

2.2. Les enjeux de l'imagerie médicale

L'objectif des recherches actuelles est de disposer d'outils de contraste utilisables en imagerie médicale permettant de localiser et de caractériser les tumeurs *in situ* avec des temps de prise en charge courts (inférieurs à une journée), et de façon non invasive.

L'imagerie biomédicale en oncologie est fondée sur la recherche de maladies symptomatiques et sur la détection des cellules tumorales, en utilisant différentes techniques d'imagerie. Durant les trente dernières années, les technologies utilisées dans l'imagerie ont évolué plus rapidement que dans n'importe quelle spécialité médicale. L'imagerie biomédicale a assisté à l'introduction d'une succession de découvertes technologiques révolutionnaires dans la capture d'images. Nous pouvons citer notamment l'échographie (ultrasons), la radiographie tomodensitométrie (CT pour « Computed Tomodensitometry », utilisant les rayons X), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'imagerie TEP et enfin l'imagerie utilisée pour le guidage de cathéters. Ces nouvelles technologies figurent parmi les innovations majeures ayant permis l'amélioration des résultats de la lutte contre le cancer et sont également utilisées pour des applications en recherche.

L'imagerie est d'autant plus importante qu'elle est utile dans toutes les phases de gestion des cancers qui incluent : le dépistage et la détection précoce [22, 23], le diagnostic et la stadification [24], la planification des thérapies à mettre en place [25], et enfin le suivi de la réponse thérapeutique [26-29].

II. Médecine nucléaire - aspects d'imagerie et thérapeutiques

Les progrès technologiques récents dans le domaine de la médecine ainsi qu'une meilleure connaissance des processus biologiques spécialement au niveau des cellules tumorales poussent les équipes de recherche à développer de nouveaux outils de « theranostic ». Ces outils participent au développement de la médecine personnalisée, en permettant de visualiser à l'aide d'imagerie TEP un processus biologique spécifique grâce à la vectorisation de radioéléments émetteurs de positons. En outre, leur utilisation peut être envisagée pour la radiothérapie, par la vectorisation d'éléments radioactifs émetteurs de rayonnements alpha ou bêta. De nombreux espoirs sont fondés sur le développement de ces nouveaux outils, qui permettraient non seulement de diagnostiquer une pathologie mais également d'effectuer son typage moléculaire de façon non invasive. Les résultats d'imageries obtenus permettront de quantifier l'efficacité de ciblage du vecteur pour chaque patient. Dans un second temps, les calculs informatiques permettront aux médecins nucléaires de réaliser une projection sur la quantité de radioactivité à injecter (dosimétrie) pour permettre une action thérapeutique dont les effets toxiques seront réellement limités et contenus.

Après un rappel sur la radioactivité, nous détaillerons les différents éléments radioactifs mis à pour la médecine nucléaire et enfin nous décrirons l'utilisation de l'imagerie TEP en clinique.

1. Généralités sur la radioactivité

La radiobiologie est née de la découverte des rayons X par Wilhelm Conrad Röntgen en 1895 et de la radioactivité naturelle en 1896 par Henri Becquerel. Chaque noyau atomique est caractérisé par un certain nombre de protons (porteurs de charges positives) et de neutrons, électriquement neutres. La radioactivité est issue

de l'instabilité du noyau atomique créée par un déficit ou un excès de l'un de ses constituants. Ils se transforment spontanément, en émettant des rayonnements ionisants, en un noyau fils qui peut être stable ou à son tour radioactif (loi de désintégration radioactive). La radioactivité retrouvée naturellement sur terre est principalement due à la désintégration de l'uranium, du radon et du thorium contenus dans la terre, ainsi qu'aux rayonnements cosmiques de très haute énergie cinétique qui créent dans la haute atmosphère des noyaux légers comme le béryllium 7. La majorité de la radioactivité sur terre est générée artificiellement pour produire de l'électricité grâce aux réacteurs des centrales nucléaires ou en vue d'applications médicales.

Les rayonnements ionisants émis par les radioéléments sont caractérisés par leur nature, leur énergie et leur période. Ces rayonnements peuvent être des particules α ou β , ou être des radiations électromagnétiques : rayonnements γ et X. Ils sont dits ionisants car leur énergie est suffisante pour arracher un électron à un atome. L'énergie générée par ces rayons agit sur les organismes vivants en perturbant l'activité cellulaire comme par exemple en altérant l'expression protéique ou encore en activant des voies de signalisation impliquées dans des mécanismes de réparation ou de mort cellulaire.

- Le rayonnement alpha (α): c'est un noyau d'hélium, composé de deux protons et deux neutrons, chargé positivement. C'est un rayonnement particulaire de haute énergie (3 à 11 MeV) peu pénétrant (quelques μm dans l'eau) (Figure 11 a).
- Les rayonnements beta (β^- ou β^+): ce sont des électrons (positifs ou négatifs). Un neutron se désintègre en se scindant en un électron et un proton. L'électron émis est alors appelé particule bêta moins. Ces rayonnements possèdent une énergie entre 0 et 3 MeV et sont capables de parcourir quelques millimètres de tissus et plusieurs mètres dans l'air, en fonction de leurs énergies initiales (Figure 11 b). Les émissions β^+ (positons) sont utilisées en

imagerie TEP. Ces particules sont issues d'atomes possédant un excès de neutrons qui va induire l'émission d'une particule chargée positivement : le bêta⁺. Une fois libérés dans le milieu par le noyau atomique, les positons interagissent avec les électrons du milieu et s'annihilent en donnant deux photons γ avec une énergie de 511 Kev détectés par l'appareil d'imagerie.

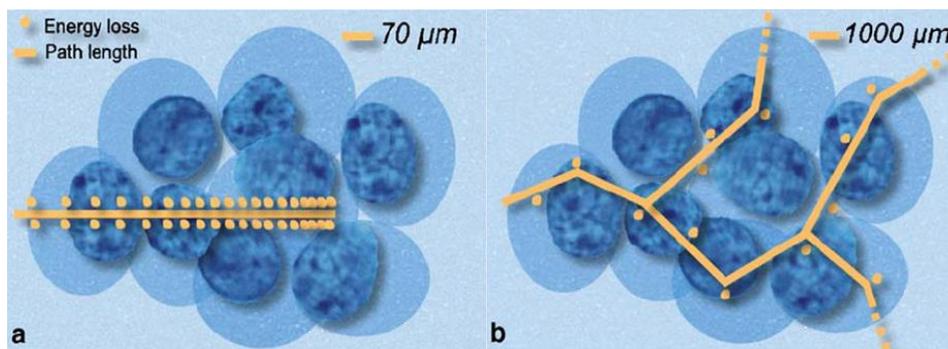


Figure 4 : Comparaison du parcours des particules α (a) et des particules β (b) dans un tissu. D'après Couturier 2005.

- Les électrons Auger : il s'agit d'électrons émis lors de la désexcitation d'un atome. Ces rayonnements particuliers possèdent un transfert d'énergie linéaire élevé au début de leur parcours dans la matière (équivalent à celui des émetteurs alpha) puis leur dépôt d'énergie diminue pour atteindre celui des rayons beta. L'utilisation des émetteurs d'électrons Auger comme ^{125}I , ^{111}In ou le ^{67}Ga permet d'avoir un effet thérapeutique très localisé.
- Les rayonnements électromagnétiques ionisants (γ , X) : Ces ondes électromagnétiques ont un pouvoir pénétrant très important en fonction de l'énergie initiale, du rayonnement et de la nature du milieu traversé. Le rayonnement gamma est émis par le noyau radioactif lors de sa désintégration. Le rayonnement X quant à lui est un phénomène lié indirectement à la désintégration du noyau. Il est émis soit lors du retour d'un électron sur une couche électronique inférieure après ionisation de l'atome par

un électron incident (désexcitation), soit par décélération d'un électron lorsqu'il passe au voisinage du noyau d'un atome (phénomène appelé rayonnement de freinage).

Outre la nature du rayonnement, les éléments radioactifs sont caractérisés par leur période radioactive qui correspond au temps nécessaire à la radioactivité pour diminuer de moitié. Cette caractéristique physique est particulièrement importante lors du choix du radio-isotope. Il est donc primordial non seulement d'adapter le choix du radioélément à l'application médicale envisagée (qui demeure tributaire de la nature des rayonnements émis) mais également de prendre en compte sa période physique afin qu'elle soit adaptée au temps de demi-vie biologique du radiopharmaceutique [30].

2. Les radiopharmaceutiques

Un radiopharmaceutique est un médicament composé d'un isotope radioactif. Il peut-être constitué d'un isotope seul jouant tant le rôle de vecteur que de traceur, comme par exemple l'¹³¹I sous forme d'iodure de sodium pour les tumeurs thyroïdiennes, ou alors être formé par l'association d'un radio-isotope et d'un vecteur. Les radiopharmaceutiques peuvent être utilisés pour effectuer une action thérapeutique. Cependant leur utilisation demeure principalement à visée pronostique ou diagnostique. Le radio-isotope permet de déterminer la biodistribution du vecteur qui possède un tropisme particulier pour un organe, une tumeur ou encore une fonction. De façon générale, les radio-isotopes utilisés en médecine nucléaire sont essentiellement des émetteurs gamma (γ) ou bêta plus (β^+) administrés à l'état de traces puis détectés à l'aide d'appareils. L'utilisation de ces radiotraceurs autorise une exploration anatomique, fonctionnelle et dynamique d'un organe sans recours à des méthodes invasives et constitue aujourd'hui l'activité majeure des centres de médecine nucléaire.

L'objectif de la partie suivante est de faire un point sur les différents radio-isotopes utilisés en médecine nucléaire et notamment ceux destinés à l'imagerie médicale.

3. Les radio-isotopes utilisés en médecine nucléaire

Avant d'aborder le descriptif des principaux radioéléments utilisés en médecine nucléaire, il est important de préciser que le mode de production et le coût de ce dernier sont des critères pris en compte lors du choix des radio-isotopes. Tous les éléments radioactifs utilisés en médecine nucléaire sont produits à partir de cyclotrons comme le ^{18}F ou le ^{64}Cu , de réacteurs nucléaires (^{131}I) ou à l'aide de générateurs comme pour le $^{99\text{m}}\text{Tc}$. L'utilisation de générateurs est particulièrement intéressante dans la mesure où elle permet de produire des isotopes ayant une activité importante à faible coût sur le site d'utilisation. Par exemple l'achat d'un générateur de Technétium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ coûte environ 3 €/MBq, le prix peut être plus élevé pour un générateur de Bismuth ^{213}Bi obtenu à partir de l'Actinium ^{225}Ac : de 50 à 100 €/MBq.

Comme précisé précédemment, chaque radioélément possède des constantes physiques propres et exploitables pour des applications spécifiques. Le Tableau 2 regroupe les principaux radionucléides utilisés en médecine nucléaire pour la thérapie et l'imagerie. Pour une utilisation en thérapie, des radioéléments comme ^{131}I , ^{90}Y ou le ^{177}Lu (émetteurs β^-) sont jusqu'à présent majoritairement utilisés pour de la radiothérapie ciblée [31]. Les électrons β^- émis possèdent en général un transfert d'énergie linéaire (TEL) de 0,2 keV/ μm , et une pénétration dans les tissus de plusieurs millimètres. Par conséquent le dépôt d'énergie au niveau des cellules saines périphériques peut être important et peut constituer un inconvénient majeur à l'utilisation d'émetteurs β^- . Différentes stratégies sont mises en œuvre afin de compenser ce désavantage. Par exemple, l'utilisation combinée de plusieurs

Radioisotope	Temps de demi-vie (h)	Emissions	Portée (mm)	Méthode de marquage sur vecteur protéique
Technetium-99 m	6,0	γ		Marquage direct sur résidus de la protéine
Indium-111	67	γ		Polyamino-carboxylic acids: DOTA, DTPA
Iode-123	13,3	γ		Marquage direct sur tyrosine
Fluore-18	1,83	β^+	3	
Galium-68	1,13	β^+	9,1	Polyamino-carboxylic acids: DOTA, NOTA
Cuivre-64	12,7	β^+		
Zirconium-89	78	β^+	4,3	Desferrioxamine
Iode-124	100	β^+	7,4 et 10	Marquage direct sur tyrosine
Iode-131	193	β^- , γ	2,9	Marquage direct sur tyrosine
Yttrium-90	64	β^-	11	Polyamino-carboxylic acids: DOTA
Rhenium-188	17	β^- , γ	10	Marquage identique à celui du technetium
Lutetium-177	162	β^- , γ	2	Polyamino-carboxylic acids: DOTA
Cuivre-67	62	β^- , γ	1,8	Stratégie de marquage multiple
Bismuth-213	0,76	α , γ	0,1	Polyamino-carboxylic acids: DOTA, CHX-DTPA,
Astatine-211	7,2	α , γ	0,055-0,080	Synthons: SAB, SAPS

Tableau 2 : Radioéléments utilisés en médecine nucléaire pour la thérapie et l'imagerie moléculaire

émetteurs beta possédant des TEL différentes offre la possibilité de traiter des tumeurs macroscopiques et microscopiques simultanément.

Des radio-isotopes émetteurs de β^+ (^{18}F , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{89}Zr , ^{124}I) sont utilisés pour réaliser de l'imagerie médicale par TEP. Concernant l'imagerie utilisant la tomographie d'émission monophotonique (TEMP) ou celle utilisant des gamma caméras, des émetteurs de rayons gamma comme le $^{99\text{m}}\text{Tc}$, l' ^{123}I ou l' ^{131}I sont exploités. Pour la TEMP, l'utilisation d'émetteurs de photons de basse énergie (150 keV) permet d'obtenir des images de meilleure résolution, il en est de même pour la TEP car l'énergie initiale de la particule est proportionnelle à la distance parcourue dans la matière et donc au temps mis pour l'annihilation du positon et l'émission des rayons γ détectés par l'appareillage. Il est important de préciser que les radio-isotopes émetteur β^+ à demi-vie très courte comme le ^{68}Ga ne sont utilisables que dans le cadre d'une association avec des vecteurs de faible poids moléculaire

permettant une biodistribution rapide et une élimination rénale importante afin d'obtenir un rapport de radioactivité tumeur/bruit de fond le plus élevé possible.

4. L'imagerie TEP pour la détection des cancers

Le développement de l'imagerie fonctionnelle est un domaine particulièrement prometteur. Contrairement à l'imagerie anatomique ou structurale dont font partie la radiographie ou l'IRM classique, qui permettent d'obtenir des informations sur la structure des organes, l'imagerie fonctionnelle utilise le ciblage de bio-marqueurs afin de caractériser des organes, des tissus ou des cellules. La plupart des techniques d'imagerie utilisent des agents de contraste qui permettent la distinction de structures anatomiques naturellement peu contrastées. Le contraste peut être donné par des mécanismes endogènes dépendant de la nature des tissus comme la température, la susceptibilité magnétique, le changement des fréquences acoustiques, ou par des agents exogènes comme la fluorescence, la bioluminescence, ou la radioactivité.

Les agents contrastants pour l'imagerie introduits en intraveineux, intra-artériel, ou par les orifices naturels, jouent un rôle de plus en plus important dans l'imagerie cancéreuse, en particulier les nouveaux traceurs utilisés pour l'imagerie TEP. De façon générale le principe repose sur l'injection d'un traceur (radionucléide) associé à un vecteur. La biodistribution de ce traceur radiomarqué est ensuite localisée grâce à un détecteur et permet la localisation des tumeurs avec une grande précision (Figure 5). Le TEP scan est basé sur la détection de radionucléides émetteurs de positons, synthétisés dans un cyclotron comme le ^{18}F , ^{11}C , ^{64}Cu , ^{124}I , ^{86}Y , ^{15}O et le ^{13}N ou avec des générateurs comme pour le ^{68}Ga [32].

L'isotope radioactif qui possède un excès de proton, convertit son proton excédentaire en neutron, positon et en neutrino. Le positon et le neutrino sont

immédiatement émis à partir du noyau, et le positon est annihilé au contact d'un électron après avoir parcouru une courte distance à travers les tissus (1 à 2 mm). L'annihilation produit deux rayons gamma d'une énergie de 511 keV opposés à 180°, qui peuvent être détectés par les deux détecteurs placés en coïncidence.

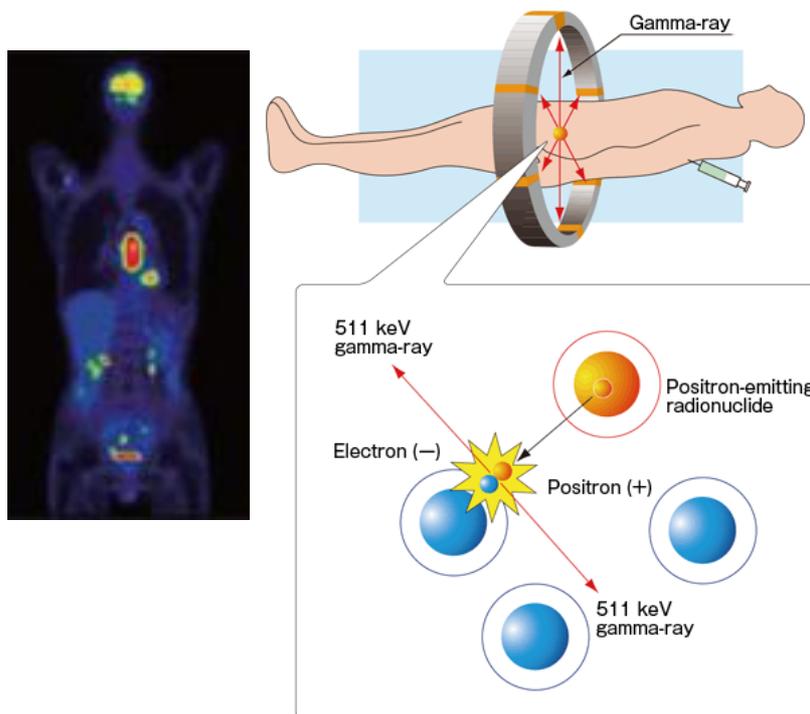


Figure 5 : Processus de l'imagerie TEP. D'après © Hamamatsu Photonics K.K.

Historiquement les premiers radiopharmaceutiques étaient employés sous forme de complexes chimiques possédant un tropisme particulier pour un organe. La spécificité du radio traceur était déterminée par les propriétés physico-chimiques du complexe. À titre d'exemple, le gallium 67 peut être utilisé afin d'imager la fonction de la moelle osseuse lors de la recherche de certaines infections ou de tumeurs grâce à son mimétisme du métabolisme du fer. Néanmoins l'accumulation physiologique de radioéléments dans les tumeurs est rare et l'utilisation de ce radioélément a été abandonnée suite à l'apparition du fluorodesoxyglucose couplé au ¹⁸Fluor (¹⁸F-FDG).

La TEP utilisant le fluorodesoxyglucose couplé au ^{18}F Fluor (TEP-FDG) est une technique d'imagerie non invasive présentant d'excellentes performances de diagnostic en termes de sensibilité et de résolution. Son utilisation a été validée pour l'évaluation de nombreuses tumeurs solides (carcinome colorectal, cancer du sein, mélanome etc.) ou d'origine hématologique (lymphome diffus à grandes cellules, maladie de Hodgkin) [33, 34].

Le ^{18}F -FDG est un analogue structural du glucose. Son transport à travers les membranes plasmiques des cellules est facilité par les transporteurs GLUT 1 et GLUT 3 surexprimés à la membrane des cellules cancéreuses. Comme pour le glucose, après son entrée dans la cellule, le ^{18}F -FDG est phosphorylé par une hexokinase, ce qui permet, outre l'absence de métabolisation, son accumulation au sein des cellules. La capture du ^{18}F -FDG est corrélée au taux de glycolyse qui est plus important dans les tissus néoplasiques que dans les tissus normaux, excepté pour le tissu cérébral, ce qui limite son utilisation pour les tumeurs se développant dans le parenchyme cérébral [35]. En outre, la détection des foyers tumoraux à l'aide du ^{18}F -FDG peut également être limitée pour les tumeurs présentant une activité métabolique faible.

Néanmoins la technologie de la TEP offre une imagerie tridimensionnelle non invasive avec des niveaux de performance en terme de diagnostic, de sensibilité et de résolution bien meilleurs au regard d'autres examens proposés en médecine nucléaire. Cependant il est nécessaire de mener des recherches pour le développement de nouveaux vecteurs spécifiques d'antigènes. La partie suivante est consacrée à la description des vecteurs pour l'imagerie comme les peptides ou les anticorps autorisant la mise au point de nouveaux radiotraceurs.

III. Vecteurs pour l'imagerie : stratégies de ciblage

1. Caractéristiques d'un vecteur pour l'imagerie

L'acquisition d'images fonctionnelles se fait généralement par l'injection d'un traceur couplé à un radioisotope. Cette technologie permet l'étude d'un processus biologique dans son environnement naturel et de façon non-invasive. Afin d'obtenir une image *in vivo* de bonne qualité il est crucial de disposer d'un vecteur possédant une demi-vie biologique compatible avec la demi-vie physique du radionucléide auquel il est associé. En effet, l'isotope radioactif doit émettre de la radioactivité suffisamment longtemps afin que le vecteur ait le temps d'atteindre sa cible, et à l'inverse la demi-vie du radioélément ne doit pas être trop longue afin de limiter l'irradiation périphérique de l'organisme. Afin d'obtenir l'image du patient le jour de l'injection du radiotracer, ce dernier doit répondre à certaines caractéristiques permettant d'offrir le meilleur rapport marquage tumoral sur bruit de fond (Figure 6).

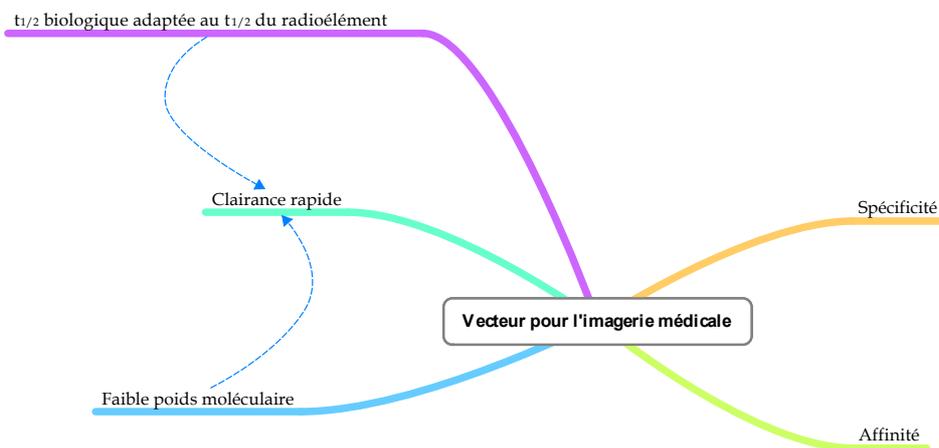


Figure 6 : Caractéristiques essentielles pour un vecteur utilisé en imagerie nucléaire

Le vecteur doit présenter une spécificité pour sa cible. La détection spécifique du biomarqueur ciblé permet une mise en lumière des cellules cancéreuses. Pour y parvenir, il est nécessaire de limiter au maximum l'accumulation aspécifique dans des organes sains pour d'une part écarter la présence de faux positifs et d'autre part ne pas cacher par un bruit de fond important la présence de signaux positifs.

L'une des caractéristiques essentielles que doit présenter un vecteur destiné à l'imagerie est une vitesse clairance élevée. En effet, une clairance rénale importante permet une élimination rapide du vecteur circulant de façon systémique, limitant le phénomène de bruit de fond. Ceci permet la réalisation de prise d'images seulement quelques heures après l'injection. Pour atteindre un niveau de clairance important, le vecteur doit posséder un poids moléculaire inférieur à 50 kDa (fenêtre glomérulaire). De plus, il faut noter qu'un faible poids moléculaire va également améliorer la diffusion du vecteur au sein de la tumeur, permettant un marquage plus rapide et une pénétration plus importante au sein des tissus. Néanmoins, pour parvenir à obtenir une fixation spécifique du vecteur suffisante au niveau de la tumeur avec un temps de résidence sanguin très court, il est nécessaire que le vecteur possède une forte affinité pour sa cible, et ceci est d'autant plus vrai que son poids moléculaire est faible [36].

D'autres propriétés peuvent influencer la biodistribution des radio-traceurs, dont la vascularisation de la tumeur comme nous l'avons vu dans la première partie. L'expression du biomarqueur ciblé, ou encore le type d'isotope radioactif vont également jouer un rôle important dans la distribution des radio-traceurs.

2. Les traceurs : généralités et modes d'action

Les évolutions technologiques dans la capture d'images avec l'utilisation de l'IRM et de la TEP combinée au scanner (TEP-CT), permettent d'obtenir des informations sur les caractéristiques fonctionnelles de la maladie. L'usage de ces

techniques permet de renseigner les médecins, ou les chercheurs, sur la distribution de la pathologie au sein de la moelle osseuse, ou sur l'envahissement extra-médullaire. L'imagerie moderne peut également donner des informations sur les activités métaboliques des foyers tumoraux [37, 38], aussi bien lors du diagnostic que durant le traitement, permettant ainsi d'apprécier l'efficacité de ce dernier [39, 40]. Afin d'améliorer la détection des processus tumoraux en utilisant ces technologies, la recherche s'applique à développer de nouveaux vecteurs permettant de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses.

L'utilisation du ^{18}F -FDG dans l'imagerie TEP décrite précédemment est largement répandue et permet d'obtenir de bons résultats dans l'évaluation de nombreux cancers. Cependant la détection des tumeurs se fait en fonction de leurs activités métaboliques et ne permet pas leur typage.

La recherche de bio-marqueurs spécifiques des tumeurs et permettant de typer les patients est essentielle à l'utilisation de thérapies ciblées. Les connaissances acquises depuis les vingt dernières années en génétique, biologie moléculaire et cellulaire ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les phénomènes tumoraux. Dans ce cadre, de nouvelles molécules ciblant certaines anomalies spécifiques des cellules cancéreuses ont été développées. Les cibles peuvent être intracellulaires (gènes, enzymes) et extracellulaires (récepteur aux facteurs de croissance, protéine transmembranaire localisée à la surface membranaire). L'activation ou l'inhibition de ces cibles sont des stratégies utilisées pour le développement de nouveaux ligands. Il est par conséquent primordial d'effectuer la caractérisation des tumeurs afin d'administrer au patient les traitements les plus adaptés.

2.1. Vecteurs métaboliques

L'objectif des recherches actuelles est de développer des agents fiables et sûrs pour l'imagerie fonctionnelle afin d'avoir des outils adaptés à la détection précoce et à la classification précise des cancers, et susceptibles de fournir des informations essentielles pour le diagnostic et le pronostic. Avec l'imagerie TEP, les processus tumoraux sont mis en lumière par l'accumulation du radionucléide émetteur de position, véhiculé par un vecteur spécifique du tissu cible. Nous avons cité et décrit l'utilisation du ^{18}F -FDG, mais il existe de nombreux autres vecteurs de transport de radioéléments *in vivo*, faisant l'objet d'une intense recherche depuis le développement de l'imagerie fonctionnelle. Ils peuvent être classés en fonction de leurs mécanismes d'action. Des traceurs comme le ^{18}F -FDG permettent de mettre en évidence l'activité d'une enzyme cible : l'hexokinase. Nous pouvons également citer le ^{18}F -FLT (3'-désoxy-3'-fluorothymidine- ^{18}F) qui permet de quantifier la synthèse d'ADN *via* l'activité de la thymidine kinase-1 (TK1). En effet, la concentration de TK1 augmente spécifiquement lors de la phase S du cycle cellulaire et par conséquent permet de repérer les zones d'intense prolifération cellulaire caractéristiques des foyers tumoraux [41]. Ainsi, ces radiotraceurs produisent un contraste d'image résultant de leur accumulation élevée dans le tissu tumoral par comparaison aux tissus normaux du fait d'une activité enzymatique importante.

Néanmoins, l'utilisation de marqueurs métaboliques comme le ^{18}F -FDG ou le ^{18}F -FLT présente des limites car ces marqueurs mettent en évidence un phénotype moléculaire (expression du récepteur GLUT à la surface membranaire des cellules cancéreuses pour le FDG et activité proliférative pour le ^{18}F -FLT) qui est variable. Ces phénotypes moléculaires sont sous l'influence de multiples facteurs (ex : hypoxie, activation oncogénique, densité vasculaire etc.) qui peuvent potentiellement être modifiés au cours du développement tumoral rendant les cellules cancéreuses indétectables par ces moyens. Il existe par conséquent un besoin clinique de développer de nouveaux outils permettant de détecter plus précisément des événements moléculaires caractérisant spécifiquement les pathologies visées [42].

Une autre classe de vecteurs est constituée par des radiotraceurs capables de se lier directement à leur cible, fournissant ainsi un signal spécifique proportionnel à l'abondance de la cible. Ce groupe comprend notamment les peptides, les anticorps radiomarqués, ou des alternatives aux anticorps comme les Affibodies ou les DARPins.

2.2. Vecteurs peptidiques

Il y a une quinzaine d'années, des vecteurs pour le ciblage tumoral ont été développés sous la forme de petits peptides (1.5 kDa) radiomarqués. Les plus représentés ont été développés spécifiquement pour les tumeurs neuroendocrines (TNE). Il s'agit d'analogues structuraux de la somatostatine qui ciblent avec une grande affinité les récepteurs à la somatostatine. La somatostatine est un peptide cyclique présent au niveau des neurones et des cellules endocrines, présentes en grande quantité dans le cerveau, dans le pancréas et dans le tractus intestinal. Cette hormone a une durée de vie biologique relativement courte, par conséquent des analogues structuraux plus stables ont été développés [43].

Suite à l'injection par voie intraveineuse du peptide radiomarqué, ce dernier va être distribué dans l'ensemble du corps du patient. Si le patient possède des cellules cancéreuses exprimant des récepteurs correspondant au peptide, la radioactivité sera internalisée *via* le peptide au sein des tumeurs. Les peptides circulant non capturés seront rapidement éliminés par clairance rénale. A l'aide d'un appareil comme une γ caméra ou un PET-CT (en fonction du radioélément utilisé), la radioactivité accumulée au sein des foyers tumoraux peut être détectée et permettre ainsi la visualisation des tumeurs. Sur le même principe, l'utilisation de peptides radiomarqués peut être étendue à une application *in situ* pendant un acte chirurgical d'exérèse de tumeur et permettre le repérage avec une grande précision des zones à éliminer [44].

D'autres peptides visant des récepteurs caractéristiques de différentes tumeurs ont été développés. Nous pouvons citer de façon non exhaustive le peptide vasoactif intestinal (ou VIP pour « vasoactive intestinal peptide ») marqué à ^{123}I ou au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ciblant le VPAC₁ dans les cancers gastro-intestinaux ou encore la bombésine (ou GRP : « gastrin-releasing peptide ») couplée au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ qui se fixe sur son récepteur le GRP-R. Ce peptide est utilisé pour l'imagerie du cancer de la prostate ou du cancer du sein.

En 2010, l'association européenne de médecine nucléaire a publié un guide de procédure pour l'utilisation des peptides conjugués au galium 68 *via* le DOTA en imagerie TEP-CT [45]. Ceci illustre la volonté européenne d'augmenter la fréquence d'utilisation clinique de l'imagerie TEP, qui est comme vu précédemment, un outil de détection très puissant permettant de mettre en lumière des tumeurs de faible diamètre.

Des stratégies dites en « deux temps » ont été développées afin de s'affranchir des contraintes pharmacocinétiques de l'agent radioactif. Ce concept repose sur l'injection de deux réactifs : dans un premier temps un anticorps dirigé contre l'antigène tumoral est injecté puis, lorsque l'anticorps est éliminé de la circulation, une molécule portant la radioactivité et possédant une forte affinité pour l'anticorps est injectée à son tour. Cette molécule doit être de petite taille afin d'être distribuée dans l'organisme rapidement. L'anticorps injecté au préalable va capturer la molécule concentrant alors la radioactivité dans la zone d'intérêt. Plusieurs modifications de l'anticorps sont possibles : système streptavidine/biotine, ou bispécificité [46]. La technique « affinity enhancement system » (AES) mise au point par Jacques Barbet permet de limiter les difficultés liées aux anticorps circulants qui peuvent piéger la radioactivité. L'AES repose sur le concept de l'augmentation de l'affinité par liaisons multiples. La molécule portant la radioactivité possède deux sites de liaison à l'anticorps ce qui lui permet de se lier simultanément à deux anticorps bispécifiques fixés à leurs antigènes [47]. La preuve de concept réalisée *in vivo* dans des modèles murins de xénogreffe de mélanomes humains et de tumeurs

coliques humaines a permis l'utilisation de l'AES en clinique (en imagerie et en radio-immunothérapie) [48, 49].

3. Utilisation des anticorps pour le ciblage d'antigènes tumoraux

3.1. Les anticorps

Historiquement, les anticorps ont été les premiers à être utilisés comme vecteurs pour le ciblage d'antigènes tumoraux [50]. Les immunoglobulines (Ig) sont des macromolécules composées de quatre chaînes polypeptidiques deux chaînes lourdes identiques (50 kDa) et deux chaînes légères identiques (25 kDa). Ces chaînes sont liées ensemble par des ponts disulfures. La molécule comprend des régions variables (V) et constantes (C). Les parties variables comprennent une très grande variabilité de séquences peptidiques qui leur confèrent une capacité de reconnaissance antigénique. Des séquences peptidiques plus conservées caractérisent la partie dite constante. Ce fragment est notamment reconnu par les récepteurs (les FcRs) et permet d'établir un lien entre le système humoral et le système cellulaire, jouant ainsi un rôle essentiel dans la mise en place d'une réponse immunitaire. Les mammifères possèdent cinq familles d'immunoglobulines caractérisées par leur partie Fc (fragment cristallisable) : IgG, IgA, IgM, IgD et IgE [51]. Une Ig comporte par conséquent deux fragments fonctionnels : le Fab (fragment antigen binding) impliqué dans la reconnaissance antigénique, et le fragment Fc permettant l'activation du système immunitaire (Figure 7).

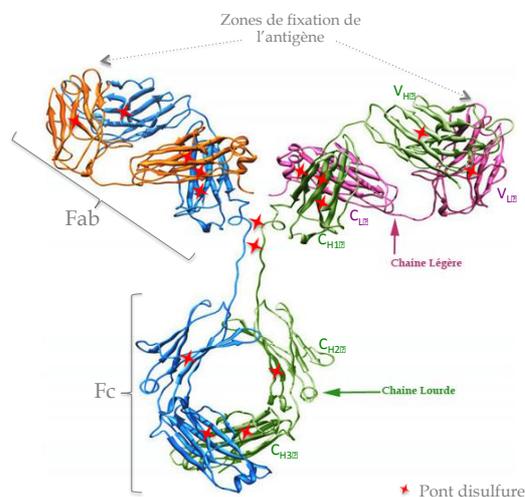


Figure 7 : Structure d'une immunoglobuline G. Protéine composée de quatre chaînes peptidiques : 2 chaînes lourdes (γ) et 2 chaînes légères (κ ou λ).

a) *Historique et généralités*

La découverte des anticorps contenus dans le sérum a été réalisée par Emil-August Behring en 1890. Ces travaux visant la mise au point d'un traitement contre le bacille de la diphtérie, permis de mettre en évidence la présence d'un facteur humoral chez les animaux immunisés. Il démontra que le sérum des animaux immunisés pouvait transférer une immunité chez des patients après injection. En 1908 Paul Ehrlich a décrit le potentiel thérapeutique des anticorps en les qualifiant de « magic bullets » [52]. Cependant, c'est avec le développement de la technologie de l'hybridome par Kohler et Milstein en 1975 que l'espoir d'utiliser les anticorps comme outil thérapeutique est né [53]. Les premiers anticorps monoclonaux (AcM) ont été fabriqués grâce à la fusion de lymphocytes B et de lignées cellulaires de myélome d'origine murine. Le développement des AcM a permis la mise en place de nombreux essais cliniques qui se sont révélés plutôt décevants du fait des réactions immunitaires qu'ils pouvaient provoquer consécutivement à leur injection [54, 55]. En effet les AcMs étant d'origine murine, ils entraînaient la formation d'anticorps humains anti-souris (« Human Anti-Mouse Antibodies-HAMA »), susceptibles de neutraliser leur activité thérapeutique, voire de provoquer des symptômes auto-immuns. La résolution de la structure des anticorps, mais également la

compréhension de leurs fonctions ont permis de résoudre ce problème, du moins partiellement.

b) *Des anticorps murins aux anticorps humains*

L'évolution des biotechnologies dans le domaine de l'ADN recombinant a permis d'humaniser progressivement les anticorps monoclonaux murins afin de diminuer leur immunogénicité. L'objectif poursuivi consiste à remplacer par génie génétique des zones de plus en plus nombreuses de l'anticorps murin, par des parties humaines en conservant l'activité biologique de l'anticorps (Figure 8) [56, 57]. S'il a été montré que l'utilisation de ces anticorps chimériques humanisés, voire dernièrement entièrement humains, a permis de réduire substantiellement l'immunogénicité des AcMs de première génération, l'optimisation de la production et de la formulation a également contribué à cette amélioration [58].

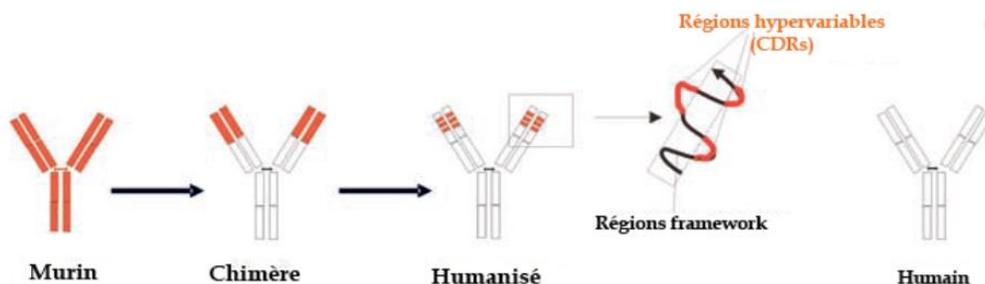


Figure 8: Anticorps monoclonaux recombinants (IgG). Humanisation progressive des anticorps monoclonaux murins.

Cependant, bien que les anticorps entièrement humains soient moins immunogènes que les anticorps murins, certains d'entre eux continuent à présenter un degré élevé de réponse immunitaire [59].

c) *Modes d'action*

Les anticorps sont apparus au cours de l'évolution afin de renforcer l'immunogénicité des protéines exogènes, et à ce titre ils possèdent plusieurs mécanismes d'action. Les anticorps monoclonaux peuvent être utilisés pour leur capacité à induire des effets cytotoxiques par une interaction avec le système du complément ou avec des cellules effectrices comme les macrophages, les lymphocytes NK (natural killer), les monocytes, les granulocytes, les éosinophiles etc. Ces modes d'action sont désignés par le terme de *Complement-Dependent Cytotoxicity* (CDC) pour les mécanismes activateurs du complément, ou par *Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity* (ADCC) pour les mécanismes effecteurs qui font appel à des cellules effectrices secondaires [60, 61]. L'activation de ces outils du système immunitaire se fait par l'intermédiaire de la partie Fc de l'anticorps. Cette partie de l'IgG humaine fait l'objet par conséquent d'une attention toute particulière lors de la fabrication des anticorps monoclonaux chimères et humanisés, lorsque l'objectif est de les utiliser comme agents cytotoxiques. Les AcMs peuvent également induire des effets thérapeutiques en bloquant des récepteurs cellulaires de surface, comme par exemple le cetuximab (Erbix[®]) qui se fixe sur l'EGFR [62], ou le trastuzumab (Herceptin[®]) qui bloque le signal de HER2 utilisé pour le traitement du cancer du sein [63, 64]. Ils peuvent également neutraliser des facteurs de croissance solubles comme le VEGF pour le bevacizumab (Avastin[®]) ou le TNF- α (Infliximab[®]) [65].

La capacité des anticorps à activer ou à inhiber le système immunitaire est étudiée depuis les années 60 [66]. De nombreuses études ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu. Les travaux réalisés sur les récepteurs aux fragments Fc (FcRs) ont décrit trois fonctions principales. La première fut la régulation des cellules du système immunitaire (ex : prolifération des lymphocytes B, phagocytose, destruction cellulaire, activation du complément), à l'aide d'un système de balance activation/inhibition (ITAM-ITIM pour Immunoreceptor Tyrosine-based Activator / Inhibitory Motif) (Figure 9).

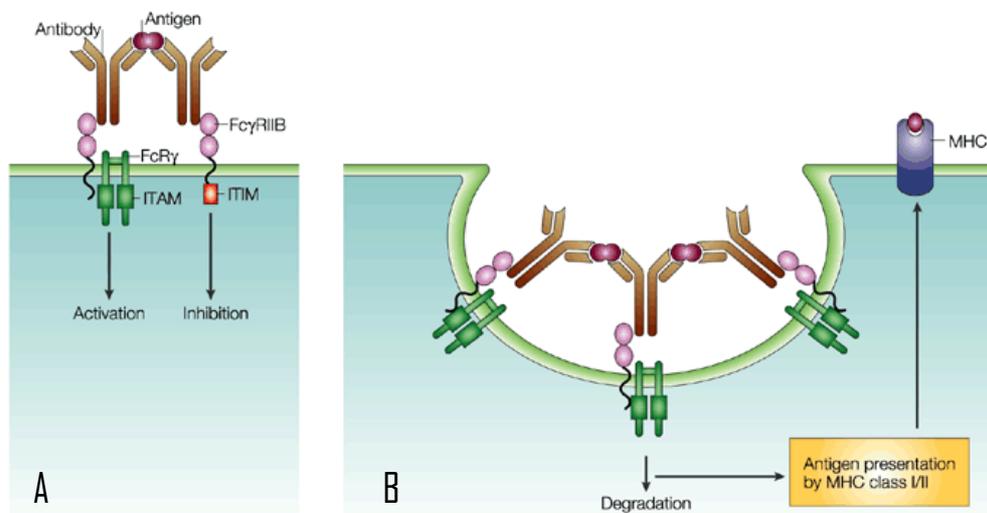


Figure 9: A) Activation ou inhibition de la signalisation moléculaire après fixation du complexe anticorps/antigène sur les récepteurs Fc. B) Clairance du complexe anticorps/antigène et présentation aux CMH I et CMH II après fixation aux récepteurs Fc. D'après Toshiyuki Takai, *et al.*, 2002.

La deuxième fonction mise en évidence est la présentation des peptides via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). En effet, les FcRs déclenchent l'internalisation des complexes antigène-anticorps suite à leur capture via leur fragment Fc. Puis suit la dégradation du complexe et la présentation de peptides antigéniques aux CMH de classe I ou II (Figure 9) [67].

Le troisième point important concerne les FcR néonatales (FcRns) ainsi que les récepteurs aux immunoglobulines polymériques (poly-IgR), qui sont capables de réaliser des transferts transcellulaires. Ce mécanisme est mis en œuvre lors du franchissement de la barrière placentaire et du transfert d'IgGs maternelles au fœtus, ou encore lors du transfert d'IgA au niveau des muqueuses. En outre, une étude sur des cellules polarisées a pu mettre en évidence un mécanisme de transcytose d'IgG avec un transport du niveau basolatéral au niveau apical d'une lignée de cellules épithéliales intestinales [68].

Les FcRns jouent un rôle particulièrement important dans la biodistribution des IgG. En effet, le temps de demi-vie relativement long des IgG (≈ 20 jours) est dû en partie aux FcRns qui les recyclent et les protègent de la dégradation par les lysosomes [69]. L'équipe de Ghetie a pu montrer dans un modèle de souris KO pour le FcRn, que le taux d'élimination des IgG était 15 fois supérieur aux taux de souris sauvages [70]. Ces résultats montrent l'importance de ces récepteurs pour la biodistribution des IgG. On peut en outre ajouter que certains types de récepteurs Fc peuvent être présents dans le sang sous forme soluble, et ainsi moduler la réponse immunitaire [71]. Il a clairement été montré que la fixation des IgG sur les FcRns était indispensable pour augmenter leur temps de demi-vie biologique. Néanmoins les mécanismes de capture des IgGs médiés principalement par le niveau d'affinité des partie Fc pour les FcRns restent mal connus [72-74]. Ci-dessous la Figure 10 propose un mécanisme de protection des IgG via les FcRns [75].

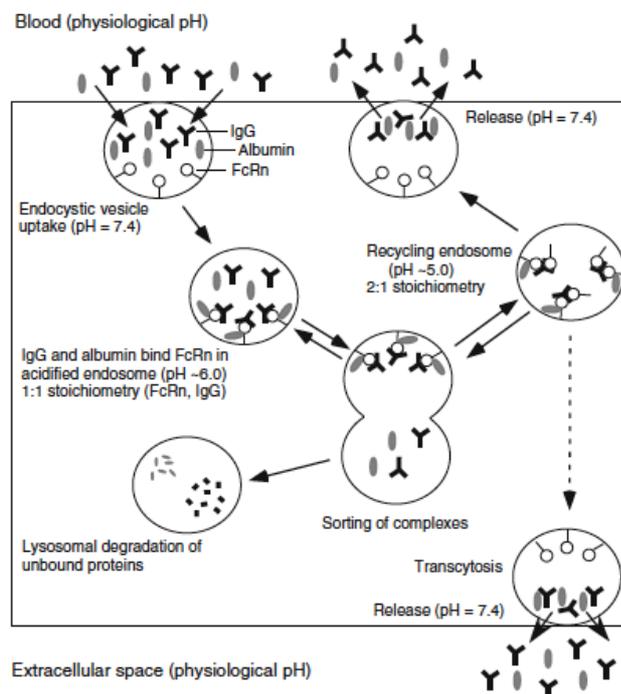


Figure 10 : Mécanisme de protection des IgG par le récepteur Fc néonatal. *D'après Chetty et al., 2013.*

d) Ciblage d'antigènes cancéreux

L'aptitude des anticorps à reconnaître des structures spécifiques, notamment celles retrouvées à la surface des cellules tumorales, permet de les utiliser comme agents de ciblage (Tableau 3). Ces vecteurs peuvent être couplés à des toxines, à des isotopes radioactifs, à des cytokines, ou encore à des molécules de chimiothérapie. On parle alors d'immunoconjugués [76, 77]. L'activité immunologique est ici de

DCI	Nom du produit commercial	Type	Cible	Pathologie	Société	Date de mise sur le marché
Obinutuzumab	Gazyva	Humanisé	CD20	Leucémie	Genentech/Roche	2013 US
Adotrastuzumab	Kadcyla	IgG1 Humanisé	Her2	Cancer du sein	Genentech/Roche	2013 US
Pertuzumab	Perjeta	IgG1 Humanisé	Her2	Cancer du sein	Genentech/Roche	2012 US
Brentuximab	Adcetris	IgG1 Chimérique	CD30	Lymphome	Seattle Genetics	2011 US
Ipilimumab	Yervoy	IgG1 Humain	CTLA-4	Mélanome	BMS	2011 US
Ofatumumab	Arzerra	IgG1 Humain	CD20	Leucémie	Genmab	2009 UE
Panitumumab	Vectibix	IgG2 Humain	EGFR	Cancer colorectal métastatique	Amgen	2006 US
Bevacizumab	Avastin	IgG1 Humanisé	VEGF	Cancer colorectal métastatique	Genetech	2004 US, 2005 UE
Cetuximab	Erbix	IgG1 Chimérique	EGFR	Cancer colorectal métastatique	ImClone Systems	2004 US et UE
Tositumomab	Bexxar	IgG2a Souris (131I)	CD20	Lymphome non-Hodgkinien	GlaxoSmithKline	2003 US
Ibritumomab	Zevalin	IgG1 Souris (90Y)	CD20	Lymphome non-Hodgkinien	Biogen Idec	2002 US, 2004 UE
Alemtuzumab	Campath	IgG1 Humanisé	CD52	Leucémie chronique, lymphome cellules B	Genzyme	2001 US et UE
Gemtuzumab	Mylotarg	IgG4 Humanisé	CD33	Leucémie	Wyeth/Pfizer	2000 US
Trastuzumab	Herceptin	IgG1 Humanisé	Her2	Cancer du sein	Genetech	1998 US, 2000 UE
Rituximab	Rituxan	IgG1 Chimérique	CD20	Lymphome cellules B (non-Hodgkinien)	Genetech	1997 US, 1998 UE

moins importance. Les vecteurs permettent de concentrer de manière spécifique

Tableau 3 : anticorps monoclonaux commercialisés pour le traitement de cancers

les agents thérapeutiques au niveau tumoral, diminuant ainsi leur toxicité [78].

Le couplage d'un élément radioactif à un anticorps permet une irradiation ciblée de la tumeur. De façon générale, des isotopes émetteurs bêta sont utilisés et permettent d'irradier une zone de 1 à 7 mm. Ainsi grâce à ce rayon d'action du radioélément, le complexe anticorps/radioélément est capable d'atteindre également des cellules cancéreuses n'exprimant pas l'antigène ciblé.

Des anticorps conjugués à l'indium¹¹¹ ou aux technétium⁹⁹ sont utilisés dans le diagnostic du cancer (tableau 4) [79]. Les premiers rapports proposant l'utilisation du

DCI	Nom du produit commercial	Type	Cible	Pathologie	Société	Date de mise sur le marché
Fanolesomab	NeutroSpec 99mTc	IgM Souris	CD15	Appendicite et ostéomyélite	Palatin Technologies	2004 US retiré en 2005, NA UE
Sulesomab	LeukoScan 99mTc	Fab' Souris	NCA	Ostéomyélite	ANSTO Health	US NA, 1997 UE
Capromab	Prostascint 111In	IgG Souris	PSMA	Cancer de la prostate	Cytogen Corp	1996 US, NA UE
Nofetumomab	Verluma 99mTc	Fab Souris	TAG-40	Cancer du poumon à petites cellules	Dr. Karl Thomae GmbH	1996 US, NA UE
Imciromab	Myoscint 111In	Fab Souris	Myosin	Nécroses myocarde	Centocor B.V.	1996 US, NA UE
Arcitumomab	CEA-Scan 99mTc	Fab' Souris	CEA	Cancer colorectal	Immunomedics Inc	1996 US, 1996 UE retiré en 2006
Saumomab	Oncoscint 111In	IgG Souris	TAG-72	Cancer colorectal et ovaires	CIS BIO International	1992 US, NA UE

^{99m}Tc couplé à un anticorps anti-CEA (Arcitumomab) pour le diagnostic par imagerie de sites métastatiques de carcinomes colorectaux datent d'un peu moins de vingt ans [80]. Toutefois, l'intérêt que l'on peut porter aux anticorps en oncologie est surtout fondé sur leur potentiel thérapeutique [81].

Tableau 4 : Anticorps utilisés en imagerie médicale. *D'après Chames et al., 2006.*

e) *Propriétés pharmacocinétiques*

Les anticorps du type IgG sont des protéines multimériques de taille importante (150 kDa), contenant de nombreux pont-disulfures et nécessitant des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation. Par conséquent il est impératif d'utiliser une machinerie eucaryote pour les produire sous forme active. Ceci occasionne une logistique et des coûts de production d'autant plus importants qu'il est souvent nécessaire d'injecter de 6 à 12g d'anticorps par patient ($\approx 3500\text{€}/\text{g}$ pour le Rituximab).

Concernant leur utilisation pour l'imagerie médicale, leurs limites se situent principalement au niveau de leur pharmacocinétique. Des études réalisées dans un modèle murin de xénogreffe ont pu mettre en évidence que suite à l'administration d'une dose d'anticorps dirigé contre la tumeur greffée, seuls 20% des anticorps circulant dans le sang interagissent avec la cible tumorale [82]. La fixation et la rétention de l'anticorps dans la tumeur dépendent d'une subtile balance entre une pharmacocinétique favorable et une efficacité de pénétration dans le tissu cible.

Plusieurs caractéristiques physiques contrôlent ces propriétés comme la taille moléculaire, la forme, ou encore l'affinité de l'anticorps pour sa cible antigénique. Comme précisé précédemment, les anticorps sont des protéines de haut poids moléculaire, qui se caractérisent par une très longue demi-vie dans le sérum, pouvant aller jusqu'à vingt et un jours pour une IgG. Leur taille dépasse largement le

seuil de la clairance rénale ($\approx 50\text{kDa}$), ce qui bloque l'élimination glomérulaire. De plus, la partie Fc de l'anticorps peut potentiellement interagir avec des récepteurs exprimés à la surface de plusieurs types cellulaires augmentant le temps de présence dans l'organisme. Leur taille importante peut également être un frein à la pénétration au sein des tumeurs. En effet, spécialement dans le cas de tumeurs solides, la taille est un paramètre crucial qui limite bien souvent l'efficacité du traitement. En outre, comme nous l'avons détaillé dans le premier chapitre, les tumeurs sont caractérisées par un réseau vasculaire hétérogène, tortueux, avec une pression interstitielle et une viscosité élevées. Par conséquent les anticorps doivent diffuser contre un gradient de pression pour pénétrer dans la tumeur, et leur taille demeure un facteur majeur déterminant leur vitesse de diffusion [83]. Le taux de diffusion est en effet approximativement inversement proportionnel à la racine carrée du poids moléculaire. De plus, les tumeurs peuvent exprimer de façon hétérogène les antigènes ciblés. L'utilisation des anticorps dans le cadre de l'imagerie médicale peut présenter une source importante de signaux non spécifiques due aux anticorps circulants. Le contraste maximal entre la cible et le bruit de fond n'est obtenu que 2 à 4 jours après l'injection. Ce temps de biodistribution contraint à l'utilisation de radioéléments ayant une longue demi-vie comme le ^{89}Zr ($t_{1/2} = 78,4\text{ h}$) ou l' ^{124}I ($t_{1/2} = 100,3\text{ h}$), ce qui peut potentiellement induire une toxicité pour les tissus périphériques. Afin d'adapter le temps de demi-vie des anticorps pour être capable de réaliser des images phénotypiques de bonne résolution dans des temps plus courts mais également de disposer d'outils permettant de pénétrer plus profondément la tumeur, des fragments d'anticorps ont été développés (Figure 11) [84].

3.2. Fragments d'anticorps

Comme montré dans la Figure 11 plusieurs types de fragments d'anticorps ont été développés. Les fragments Fab (55 kDa) et F(ab')_2 (110 kDa) sont générés par digestion enzymatique à partir de l'anticorps entier. Ils font l'objet de recherches

importantes afin de conserver les propriétés de ciblage de l'anticorps tout en réduisant leur poids moléculaire [85]. Les fragments sont caractérisés par des vitesses de clairance sanguine beaucoup plus courtes que celles des anticorps entiers dont ils sont issus [86]. La spécificité antigénique du fragment d'anticorps est portée par le fragment Fv, c'est pourquoi ce dernier fait l'objet d'une attention toute particulière.

Le fragment Fv est la plus petite sous-unité issue des anticorps qui possède l'activité de reconnaissance antigénique. Le fragment Fv se compose des régions N terminales des domaines VH et VL des anticorps, et l'interaction entre ces deux domaines est relativement faible ce qui rend le complexe peu stable. Contrairement aux fragments Fab ou F(ab'₂) elle ne peut être obtenue par simple digestion enzymatique [87]. Ainsi plusieurs stratégies ont été développées pour réaliser la production et la purification de ce fragment dans des systèmes procaryotes [88, 89].

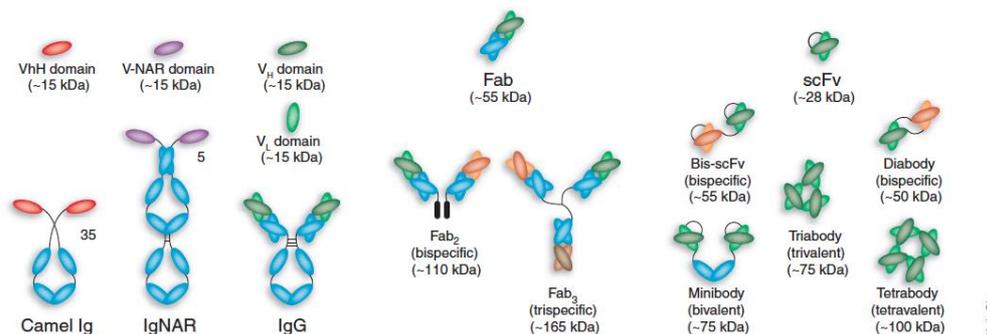


Figure 11 : Illustrations de vecteurs développés à partir d'anticorps. *D'après Hudson 2005.*

Dans le cadre d'un anticorps entier, le maintien sous forme d'hétérodimère des domaines VH et VL est principalement dû aux interactions entre les domaines CH1 et CL. Ces domaines étant absents dans le fragment Fv, une solution a été mise au point par l'équipe d'Andreas Plückthun en introduisant par génie génétique un polypeptide flexible de 15 à 20 acides aminés permettant de relier les deux domaines et donnant naissance au scFv (« single chain Fv ») [90, 91]. Les fragments scFv (28

kDa) ainsi que les dimères de scFvs (diabodies) présentent des poids moléculaires en dessous du seuil de clairance rénal et montrent dans des modèles murin de xénogreffes un marquage tumoral maximum entre 1 à 6 heures [86, 92].

Des fragments plus grands tels que les minibodies ou encore des scFvs fusionnées à des domaines d'anticorps constants (scFv-Fc, 80 kDa) présentent une clairance intermédiaire comparée aux fragments de plus faible poids moléculaire et aux anticorps entiers. De plus ils possèdent un taux de marquage tumoral plus important que les fragments de faible poids moléculaire (Figure 12) [93, 94].

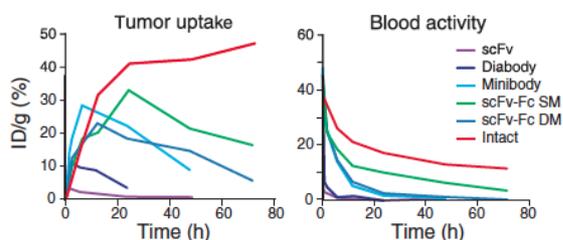


Figure 12: Courbes représentant la radioactivité (en % de dose injectée/gramme) mesurée dans le sang et au niveau de la tumeur greffée en sous cutanée dans un modèle murin. D'après Senter et al., 2005.

Comme précisé précédemment, l'obtention d'images caractérisant les foyers tumoraux *in vivo* est dépendante du contraste entre le signal obtenu pour la tumeur et le bruit de fond. En raison de leur clairance rapide, les fragments d'anticorps comme les diabodies ou les minibodies ont un ratio tumeur/sang qui augmente rapidement en fonction du temps après leur injection en systémique, ce qui fait de ces vecteurs d'excellents candidats pour la réalisation d'images phénotypiques. De plus la conjugaison de ces protéines à des éléments cytotoxiques permet de concevoir également des vecteurs efficaces pour le traitement de certains cancers[95].

Cependant l'ingénierie des fragments d'anticorps est complexe et peu économique. Comme pour les anticorps entiers, le repliement de ces fragments est dépendant de ponts S-S dont la formation est tributaire du milieu. De plus ils

présentent souvent une tendance à l'agrégation [96]. Une alternative possible est représentée par les fragments V_HH des anticorps des camélidés.

3.3. Les nanobodies

Il existe chez les camélidés un exemple singulier d'anticorps possédant une organisation structurale différente : les HCABs (« heavy-chain antibodies »). En effet 20% des anticorps des camélidés sont dépourvus du premier domaine constant (CH1) ce qui leur donne un domaine variable unique : le VHH (Figure 11 et 13). Ce domaine est également connu sous le nom de nanobody. Il est situé en N terminal et constitue la partie variable de l'anticorps, soit l'équivalent du fragment Fab. Le VHH est composé de 9 feuillets beta reliés par des boucles et un pont disulfure (Figure 13). Les régions hypervariables de la structure se situent aux niveaux des boucles H1, H2 et H3 (en couleur sur la Figure 13) qui se regroupent toutes en N terminal de l'anticorps, formant une surface interagissant avec l'antigène. Une comparaison des VHH s avec les VHs des anticorps conventionnels met en évidence des mutations de certains acides aminés impliqués dans l'interaction avec le domaine VL [97]. Une seconde différence est retrouvée au niveau des régions hypervariables. En effet, les anticorps comportent 6 boucles hypervariables : 3 portées par le domaine VH et 3 présentées par le domaine VL. Les VHH ne possèdent que 3 boucles ce qui offre logiquement moins de surface disponible pouvant potentiellement interagir avec l'antigène et réduisant également la diversité du répertoire d'anticorps.

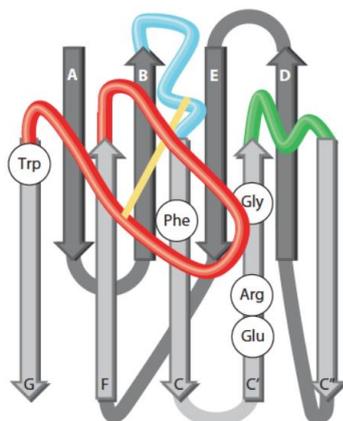


Figure 13: Structure protéique d'un VHH, les acides aminés impliqués dans l'interaction des domaines VH et VL sont entourés sur la modélisation. *D'après Muyldermans et al., 2013.*

Néanmoins cette structure a été sélectionnée au cours de l'évolution démontrant sa capacité à interagir avec toute sorte d'antigènes et pouvant être à la base du système immunitaire de plusieurs types d'animaux (lama, dromadaire, requin) [98]. Des études ont pu montrer que le répertoire des anticorps à VHH s peut être augmenté notamment grâce à la boucle H3 qui comporte 14 acides aminés [99].

Cette structure protéique peut être utilisée comme agent de ciblage pour des antigènes spécifiques. Les nanobodies peuvent en effet être facilement humanisés et possèdent des propriétés physicochimiques particulièrement intéressantes faisant d'eux d'excellents candidats au développement en tant qu'outils de ciblage ou de vectorisation d'agents thérapeutiques ou de diagnostic.

En effet de façon similaire aux structures décrites précédemment, le faible poids moléculaire des nanobodies (15 kDa) va leur conférer des propriétés pharmacocinétiques particulièrement intéressantes pour le ciblage d'antigènes possédant une localisation isolée ou difficile d'accès pour des molécules plus imposantes [100]. Ces domaines sont capables d'interagir contre de multiples cibles avec des affinités de l'ordre du nanomolaire. De plus il est facile de produire des nanobodies contre un antigène spécifique par immunisation de dromadaire, de lama ou de chameaux [101]. Il est également possible de les produire chez *E. coli* ou chez la levure où ils présentent une bonne expression ainsi qu'une bonne solubilité comparés aux fragments dérivés des anticorps humains ou murins [102].

Leurs propriétés pharmacocinétiques permettent donc d'envisager des marquages radioactifs avec des éléments de demi-vies courtes comme le ^{99m}Tc (6 h), le ^{68}Ga (68 min) ou le ^{18}F (110 min). Ainsi des études de biodistribution dans des modèles murins de xénogreffe avec des nanobodies dirigés contre l'antigène carcino-embryonnaire (ACE), contre l'EGFR ou contre HER2 ont pu montrer une fixation spécifique à la tumeur [103-105]. D'une façon générale le pourcentage de dose injectée par gramme pour le tissu tumoral est inférieur comparé aux études réalisées avec l'anticorps monoclonal, en revanche le contraste entre tumeur/sang ou tumeur/muscle est dix fois supérieur pour les nanobodies et ce seulement 1 heure après l'injection [105]. Par conséquent l'utilisation de nanobodies couplés à des radioéléments de courte demi-vie permettrait d'obtenir des niveaux de radiotoxicité beaucoup plus intéressants pour les patients et autoriserait la prise d'images dans les premières heures après l'injection du radiotraceur.

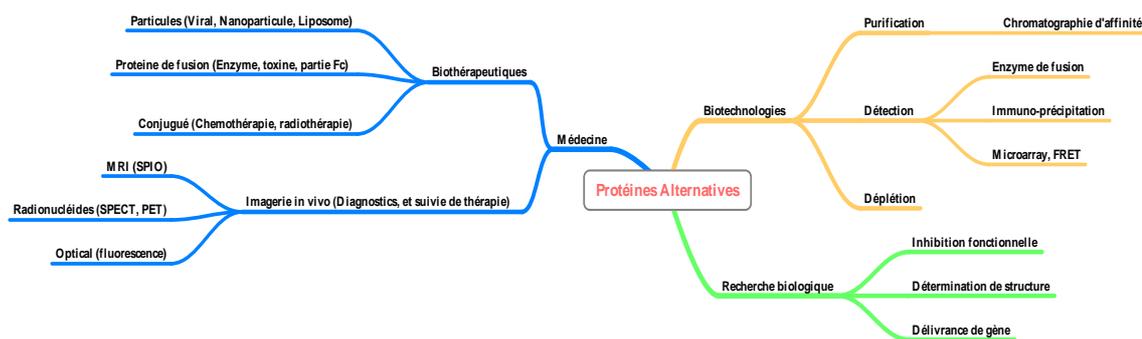
Nous allons nous intéresser dans les parties suivantes à d'autres alternatives issues de structures protéiques différentes des anticorps. L'objectif est de disposer de ligands présentant une ossature robuste, possédant de hautes affinités et une spécificité pour leur cible et pouvant être exprimés dans un système procaryote.

4. Les alternatives aux anticorps pour le ciblage des tumeurs

D'intenses recherches en biologie moléculaire et cellulaire ont permis de mettre en lumière de nombreux processus mettant en jeu des cascades de signalisation médiées par des protéines. L'évolution des systèmes biologiques a ainsi généré de nombreuses protéines possédant des capacités remarquables de reconnaissance moléculaire et dont les fonctions biologiques peuvent être dépendantes de l'interaction avec d'autres protéines. Les propriétés de reconnaissance sélective de ces protéines sont particulièrement étudiées afin de comprendre les mécanismes de signalisation intracellulaire, mais également pour en détourner leurs propriétés afin de s'en servir comme outils moléculaires utilisables

pour la recherche biologique ou la médecine. L'apport technologique de nouvelles techniques d'évolution dirigée et le développement de méthodes de sélection telles que le « phage display » ou le « ribosome display » ont permis l'essor d'une multitude de protéines alternatives aux anticorps qui suscitent un intérêt croissant.

De façon générale, les ossatures peptidiques peuvent être utilisées afin de générer des banques constituées d'un certain nombre de variants, créés grâce à l'insertion de mutations, puis exploités dans l'objectif de générer artificiellement un processus d'évolution de sélection et d'amplification semblable à celui retrouvé lors de la réponse immunitaire. Ainsi, il est possible de générer des protéines avec de nouvelles fonctionnalités. La fonction souhaitée peut être par exemple une meilleure activité enzymatique d'une protéine donnée ou encore la capacité d'une protéine à se fixer spécifiquement avec une haute affinité sur un récepteur membranaire. Ces protéines alternatives aux immunoglobulines capables d'une fixation sur d'autres protéines spécifiques avec de hautes affinités peuvent en effet être utilisées pour un large éventail d'applications comme par exemple la détection et l'analyse protéomique ou la bio-séparation. Outre les applications de biotechnologie en laboratoire, elles peuvent être utilisées pour des applications médicales soit comme médicaments thérapeutiques, soit pour des applications de diagnostic *in vivo* (Figure



14).

Figure 14: Schéma des domaines d'application des protéines alternatives aux anticorps.

Le développement de ces nouveaux ligands a pour objectif l'obtention de protéines capables de se fixer spécifiquement à la cible d'intérêt, comme les anticorps, mais cependant sans présenter les inconvénients physico-chimiques de ces derniers. Dans le cadre de l'imagerie médicale, ces nouvelles protéines doivent donc présenter d'une part une stabilité thermique et chimique, et d'autre part un faible poids moléculaire leur conférant une clairance rapide. En outre, leur ossature doit permettre une variabilité de séquences autorisant ainsi la création de multiples variants.

On dénombre dans la littérature une cinquantaine de protéines ayant été développées comme alternative aux immunoglobulines durant les dernières années. Nous décrivons ci-dessous une partie de ces ossatures retrouvées dans la littérature [106, 107]. Certains projets demeurent au stade de la proposition, d'autres ont atteint le stade d'essai préclinique et clinique [108].

4.1. Les Affibodies

Ces protéines sont issues du domaine B de la protéine A du staphylocoque. Elles comportent 58 résidus se présentant sous la forme de 3 hélices alpha [109] (Figure 15). C'est en 1997 que l'équipe de Nygren a décrit pour la première fois l'utilisation de ces petites protéines capables de se fixer sur différentes protéines cibles. Deux premières banques contenant approximativement 4×10^7 variants ont été utilisées dans la technologie du phage display [110]. Quatre années plus tard la même équipe modifiait la structure de base et générait des banques de 2^{ème} génération en mutant 10 résidus supplémentaires localisés sur la seconde hélice. De multiples études ont permis de sélectionner de nombreuses protéines destinées à être dirigées contre une large gamme de cibles. Outre leur capacité à se fixer sur leurs

cibles protéiques, les Affibodies peuvent présenter une activité inhibitrice. Une étude parue en 2012 mettait cette caractéristique en évidence dans le cadre de l'analyse d'un Affibody capable de se fixer à la protéine HER3 (membre de la famille EGFR) en bloquant sa phosphorylation [111].

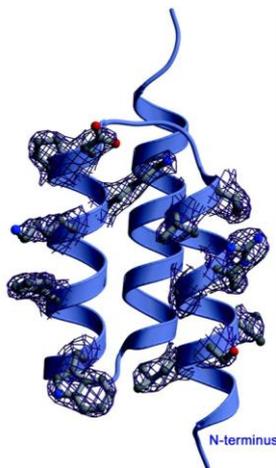


Figure 15 : Structure d'un Affibody. (D'après Nordlund et al., 2003)

La même structure protéique fut utilisée pour réaliser de l'imagerie médicale après le radio-marquage de la protéine. Tolmachev publie en 2009 un travail permettant de comparer l'utilisation d'un anticorps entier avec un Affibody dans un modèle murin de xénogreffe [112]. Pour cette étude l'anticorps monoclonal humanisé, Trastuzumab, et l'Affibody Z_{HER2:342} furent utilisés, tous deux marqués à ¹²⁴I via le linker PIB (*p*-iodo-benzoate), et possédant une spécificité pour le récepteur membranaire HER2 surexprimé à la surface des cellules cancéreuses greffées *in vivo*. L'étude mit en évidence un meilleur ratio tumeur/organe avec l'Affibody. En outre, le contraste et la sensibilité retrouvés au niveau de l'imagerie TEP, notamment au niveau des organes présentant fréquemment des métastases, sont bien meilleurs. Cet Affibody s'étant révélé utile dans la détermination des différents niveaux d'expression de HER2 au sein des tumeurs, il est particulièrement intéressant pour le typage des patients et la planification des traitements [113].

Néanmoins, l'inconvénient principal des protéines à faible poids moléculaire utilisables pour le ciblage des tumeurs en imagerie médicale demeure une intense

rétention rénale et ceci est particulièrement vrai avec les Affibodies. En effet de nombreuses études réalisées avec cette charpente protéique et différents types de marquages radioactifs (^{111}I , ^{177}Lu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{68}Ga) ont montré systématiquement des pourcentages de dose injectée par gramme de tissus au niveau du rein entre 200 et 300%, et ce même plusieurs heures après l'injection (jusqu'à 24 heures) [114-116]. Le marquage aspécifique au niveau d'autres organes périphériques comme le foie et les poumons reste en général faible et ne dépasse pas 6% à 3 heures. On observe en revanche un marquage important et durable (jusqu'à 24 heures) au niveau de la tumeur avec des doses de 7 à 30% par gramme de tissus (Figure 16) [117]. Ces résultats ont permis le lancement d'une étude clinique en avril 2013 pour l'Affibody ABY-025 anti-HER2 marqué au ^{68}Ga afin de réaliser de l'imagerie TEP chez les patients atteints de cancer du sein. Deux doses d'Affibody sont injectées en intraveineux et sa biodistribution est suivie par TEP. La fin de l'étude est prévue au cours du mois de juin 2014.

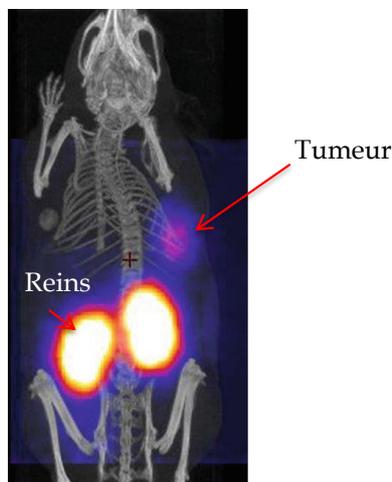


Figure 16 : Image de TEP/CT 2 heures après injection d'un Affibody couplé au DOTA et marqué au ^{68}Ga d'un corps de souris entier en vue postérieure avec xénogreffe de cellules BT474 de cancer du sein humain en sous cutanée. D'après Capala et al., 2011.

4.2. Les DARPins

Les DARPins font partie de la classe des protéines à motifs répétés. Elles sont constituées par assemblage de plusieurs copies consécutives d'une petite unité structurale. Ce type de structure se retrouve dans la nature et offre des capacités d'interaction exploitées dans la cellule pour diverses fonctions telles que le transport, l'assemblage de complexes, ou la régulation. Le séquençage des analyses de divers génomes a permis la découverte de 6 grandes familles de protéines à motifs répétés. De façon générale, il existe des protéines à motifs exclusivement β , d'autres à motifs exclusivement α , et enfin des protéines à motifs mixtes α/β . Les ankyrines font partie de cette dernière famille. Ce motif a historiquement été décrit pour la première fois dans une protéine humaine : l'ankyrine érythrocytaire humaine [118]. Ce peptide de 33 résidus est organisé en une structure en épingles à cheveux β -hélice α -une boucle-une hélice ($\beta 2\alpha 2$) [119]. Les ankyrines retrouvées dans la nature possèdent de 4 à 6 répétitions de motifs. Sept à trente trois résidus au sein d'un même domaine ont été randomisés afin de créer des banques de peptides combinatoires. La randomisation des résidus est effectuée sur des éléments de structure secondaire permettant de donner à la protéine une surface de fixation plane. Les modules de répétition ainsi générés, peuvent être reliés entre eux. Ils sont généralement 2 à 4, encadrés par un module en N terminal et C terminal [120]. Le poids moléculaire d'un module étant approximativement de 3,5 kDa, la masse totale d'une protéine DARPIn est comprise entre 14 et 21 kDa (Figure 17). L'ossature des DARPins a été optimisée afin d'obtenir des protéines d'une grande stabilité structurale (température de dénaturation de 66 à 95°C) et avec une capacité de repliement fonctionnel importante. De plus, des rendements de production élevée de la protéine fonctionnelle ont été obtenus chez *E. coli* et de hautes affinités ont été générées grâce à la technologie du ribosome display contre différentes cibles [121].

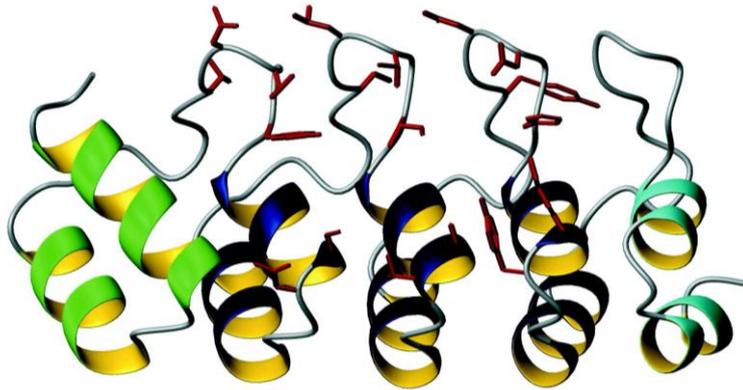


Figure 17 : Structure cristallographique de la Darpin E3_5 (Binz 2003).

Les protéines cibles comprennent des enzymes [122], des immunoglobulines [123] ou des biomarqueurs comme HER2 [124]. La DARPin dirigée contre HER2 a notamment été générée à partir d'une banque contenant des variants avec 2 domaines répétés et en utilisant une stratégie de maturation d'affinité par « error prone PCR » et ribosome display. Ceci a permis d'obtenir une DARPin avec une affinité de 90 pM. La DARPin anti HER2 s'est montrée efficace à la fois *in vitro* pour le diagnostic et *in vivo* pour de ciblage tumorale. Cette charpente protéique possède en effet les caractéristiques essentielles pour vectoriser un agent contrastant pour l'imagerie ou encore pour la délivrance d'agent cytotoxique. De plus il a récemment été montré par l'équipe d'Andreas Plückthun que l'utilisation d'une protéine de fusion constituée de deux DARPins ciblant HER2 a pu *in vitro* induire un effet cytotoxique plus important que celui obtenu avec l'anticorps monoclonal de référence actuellement utilisé en clinique contre HER2 (trastuzumab), démontrant ainsi leur capacité à induire des effets biologiques [125].

In vivo les DARPins sont caractérisées par une clairance sanguine rapide ainsi qu'une bonne diffusion au sein de la masse tumorale grâce à leur faible poids moléculaire. Comme décrit précédemment pour les Affibodies ou les fragments

d'anticorps, les DARPin sont rapidement éliminées de la circulation sanguine par voie rénale. De plus, leur capacité à se fixer sur leur cible avec une affinité importante fait de ces alternatives aux anticorps de bons agents de ciblage pour l'imagerie moléculaire [126]. Des études ont pu montrer que la fusion de ces petites protéines avec des chaînes PEGylées ou avec des protéines plus imposantes comme l'albumine ou un fragment Fc pouvait augmenter de façon importante la demi-vie biologique des DARPin et ainsi augmenter leur concentration locale et leur temps de résidence au niveau tumoral. Une des études a notamment pu démontrer que l'augmentation du poids moléculaire par PEGylation permet de diminuer le pourcentage de dose injectée par gramme au niveau du rein en passant de 93,5% à 24 heures pour la DARPin non PEGylée, à 18,9% à 24 heures pour la DARPin PEGylée. Les doses retrouvées au niveau du foie demeurent qu'en à elles inchangées (4 à 7 % à 24 heures) et le marquage tumoral passe de 0,57% pour la DARPin non PEGylée à 3% pour la DARPin PEGylée à 24 heures [127, 128]. Pour finir, le DARPin anti-VEGF-A (MPO 112) est actuellement en essai clinique chez des patients atteints de dégénérescence maculaire et d'œdème maculaire [129].

4.3. Les Adnectines

Ces protéines doivent leur nom au 10^{ème} domaine de la fibronectine humaine ¹⁰F_n3 (Figure 26). Naturellement, ce monomère comporte 94 résidus et se fixe à l'intégrine. ¹⁰F_n3 est une petite protéine de 10 kDa comportant des feuillets β reliés par 6 boucles dont trois font l'objet d'une randomisation pour la génération de banques. Ainsi des Adnectines de haute affinité (nano et pico-molaire) peuvent être sélectionnées contre des cibles spécifiques par ribosome display, phage ou yeast display [130]. Nous pouvons souligner ici l'importance des boucles pour l'interaction des Adnectines sur leurs cibles, puisque les boucles utilisées ont été construites à partir de celles observées au niveau des CDR des domaines d'immunoglobulines.

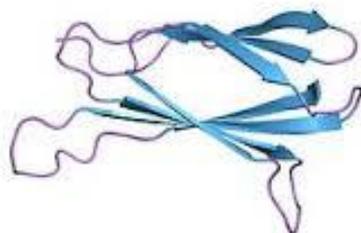


Figure 18 : Domaine de type III de la fibronectine humaine (PDB 1TTG)

A ce propos la charpente protéique des Adnectines est structurellement similaire au fragment variable des anticorps sans les ponts disulfures. Le domaine ¹⁰F_{n3} possède une grande stabilité thermique avec une température de fusion supérieure à 80°C. Le faible poids moléculaire des Adnectines leur confère une pharmacocinétique rapide avec une élimination rénale importante, et potentialise dans un même temps leur pénétration dans les tissus.

L'une des Adnectines les plus prometteuses a été générée spécifiquement contre le récepteur humain VEGFR2 avec une affinité de 11 nM : CT-322. Cette Adnectine est (PEG)ylée, ce qui permet d'augmenter son temps de rétention sérique ($t_{1/2}$ (biologique) = 100 heures). L'équipe de Sun basée aux Etats-Unis a montré qu'elle était capable de perturber la fonction de ce récepteur qui joue un rôle fondamental dans l'angiogenèse [131]. Une étude *in vivo* a pu mettre en évidence l'induction d'un effet thérapeutique anti-angiogénique dans des modèles murins de xénogreffe de cancer du colon humain et de glioblastome humain [132]. Une évaluation de son potentiel thérapeutique a été réalisée par une étude clinique de phase I avec une injection de 2 mg/kg en intraveineux une à deux fois par semaine chez 34 patients atteints de tumeurs solides. Une légère diminution du volume tumoral a été observée chez 4 d'entre eux et une stabilisation de la tumeur a été observée chez 24 patients. Un autre exemple d'activité biologique anti-cancéreuse peut être donné avec l'utilisation d'Adnectines bi-spécifiques fonctionnalisées en tandem à l'aide d'une liaison peptidique. Une Adnectine cible l'EGFR et l'autre IGF1R. Cette molécule est capable d'inhiber la phosphorylation de ces récepteurs, d'induire leur dégradation et de stopper la prolifération de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines *in vitro* et induit également une diminution du volume tumoral *in vivo* [133].

Ces résultats illustrent le potentiel thérapeutique anti-cancéreux de ces protéines, néanmoins elles n'ont pas encore été utilisées pour réaliser de l'imagerie moléculaire.

4.4. Les Anticalines

Les Anticalines (les lipocalines) constituent également une ossature protéique à feuillets β , composée d'une chaîne polypeptidique de 160 à 180 acides aminés. Ces protéines sont caractérisées par une structure conservée en tonneau bêta avec 4 boucles flexibles (Figure 19). La randomisation de 16 à 24 acides aminés par boucle permet de générer des banques d'Anticalines et ainsi d'isoler à l'aide d'une technique de sélection comme le phage display, des Anticalines dirigées spécifiquement contre une cible d'intérêt [134].

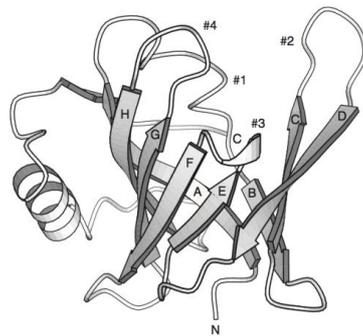


Figure 19 : Représentation schématique d'une protéine lipocaline. #1 illustre le centre du tonneau formé par les feuillets bêta, 8 brins au total (étiquetés de A à H), à qui une hélice alpha est attachée. Le tonneau bêta est pourvu de 4 boucles qui ont une structure variable et possèdent un degré de liberté (étiquetées de #1 à #4). (D'après Lola Ganfornina et al., 2006)

Les Anticalines sont en outre dépourvues de glycosylation et de pont disulfure et peuvent être produites chez la bactérie ou chez la levure. Cette structure protéique est très stable avec un point de fusion supérieur à 70°C. Elles possèdent un poids

moléculaire de 20 kDa et sont par conséquent éliminées de la circulation sanguine rapidement par filtration glomérulaire. Leur demi-vie plasmatique peut être augmentée en effectuant une (PEG)ylation de la structure protéique [135].

L'équipe de Skerra a utilisé la BBP (« bilin-binding protein »), une lipocalin issue de *Pierris brassicae*, un papillon blanc, comme ossature afin de réaliser une sélection pour générer de nouvelles protéines d'affinité contre la fluorescéine. Ils ont randomisé 16 résidus répartis sur les 4 boucles pour construire des banques qu'ils ont utilisées dans la technologie du phage display [136]. A partir de la même librairie, des protéines dirigées contre un stéroïde (l'oligoxine) possédant une affinité subnanomolaire ont pu être générées après une maturation d'affinité [137]. Cette protéine pourrait avoir un intérêt thérapeutique comme antidote pour les intoxications à la digitaline.

Plusieurs autres applications peuvent être envisagées avec les Anticalines comme par exemple en tant qu'antagoniste ciblant l'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4) avec potentiellement un effet modulateur sur la réponse anticancéreuse du système immunitaire. Elles sont également susceptibles de permettre le ciblage du VEGF dans le cadre d'une thérapie anti-angiogénique tumorale [138]. Elles sont en outre utilisables pour la vectorisation d'agents cytotoxiques ou de radioisotopes. Une étude récente publiée par l'équipe de Neri montre l'utilisation des Anticalines dans une stratégie de marquage en deux temps. Ils utilisent une protéine de fusion composée de deux fragments scFvs dirigés contre un marqueur de l'angiogenèse tumorale (le domaine EDA de la fibronectine) et d'une Anticaline (FluA) capable de fixer spécifiquement la fluorescéine. L'étude *in vivo* est réalisée dans un modèle murin de xénogreffe de teratocarcinome en sous-cutané. Vingt-quatre heures après l'injection en systémique de la protéine de fusion, la fluorescéine couplée au IRDye 750 est injectée en intraveineux, puis les souris sont imagées à 0, 4 et 8 heures. L'expérience montre qu'au temps le plus tardif la fluorescéine-IRDye 750 a été quasiment éliminée de l'ensemble des organes excepté au niveau des reins et de la tumeur [139]. Le pré-ciblage par une stratégie de

marquage en deux temps pour la vectorisation d'agents contrastants ou thérapeutiques a déjà été décrit comme particulièrement efficace avec différentes approches [140]. Cette stratégie permet en effet de découpler la délivrance de l'agent de ciblage et de l'agent contrastant ou thérapeutique comme par exemple un radionucléide. Mais certains paramètres nécessitent d'être améliorés comme la dose de chaque agent à administrer, l'intervalle de temps entre les deux injections, ou encore la stœchiométrie précise qu'il est important d'adapter en fonction de la pharmacocinétique spécifique de chaque molécule.

Enfin, une étude clinique de phase I a également menée en 2011 avec l'Anticaline anti-VEGF-A, PRS-050 (Angiocal), afin de déterminer la dose efficace à administrer chez des patients atteints de tumeurs solides.

4.5. Les Knottines

Plusieurs Knottines ont été isolées à partir de toxines de scorpions, d'araignées ou d'escargots marins, et peuvent agir comme des inhibiteurs ou activateurs spécifiques de canaux ioniques [141]. Leur structure protéique extrêmement stable est composée de 30 acides aminés formant trois feuillets beta connectés par des boucles de séquence et de longueurs variables (Figure 20).

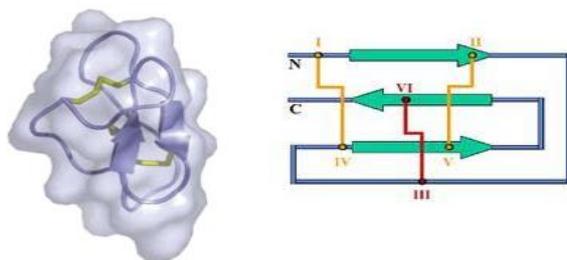


Figure 20: Structure protéique d'une Knottine. Dans la modélisation de gauche les structures secondaires sont en bleu, et les cystéines sont en jaune. Le schéma de droite permet de visualiser la position des cystéines sur la structure secondaire (en jaune et rouge). D'après Kolmar et al., 2009. D'après le centre de biochimie structurale de Montpellier.

Une des caractéristiques principales de ces protéines est la présence de 6 cystéines formant trois ponts disulfures, conférant aux Knottines une très grande stabilité thermique et chimique. Elles peuvent en effet être chauffées jusqu'à ébullition dans une solution d'HCl ou de NaOH à 1N sans perdre leur activité biologique ou leur structure tridimensionnelle. Ces propriétés permettent d'envisager leur administration *per os*. La fonctionnalisation des Knottines peut être obtenue par transfert de boucles sur la charpente protéique. Ainsi un peptide possédant une activité antagoniste du VEGF-A a été greffé sur la structure protéique d'une Knottine et une activité biologique a pu être observée *in vitro* avec des concentrations de l'ordre du micromolaire.

En 2009 l'équipe de Cochran a publié une étude d'imagerie phénotypique dans un modèle murin de xénogreffe de glioblastome humain. La Knottine utilisée était dirigée contre le récepteur à l'intégrine et marquée au ^{64}Cu via du DOTA ou à de la cyanine. Cette étude a permis de mettre en évidence l'importance de l'affinité de la protéine de ciblage pour son ligand. Elle a également permis de faire ressortir l'effet de la nature du marquage de la protéine (radioactif ou fluorescent) sur les niveaux de fixation aspécifique de la protéine de ciblage. L'étude montre des marquages tumoraux post injection de l'ordre de 10% de dose injectée par gramme (%DI/g) et de 2,5% ID/g au niveau du foie à 1 heure. En revanche des doses importantes sont relevées au niveau du rein avec 50% DI/g à 1 heures [142].

4.6. Les domaines Kunitz

Initialement issues des domaines actifs de protéines inhibitrices, ces protéines se sont montrées adaptées pour la génération de banques. Elles sont de petite taille (60 acides aminés), stables, et ont la capacité de se lier à leurs cibles protéiques grâce à la présence d'une boucle dont les acides aminés peuvent être randomisés pour la création d'une banque combinatoire [143] (Figure 21). La structure protéique est stabilisée par 3 ponts disulfures, et elle a été utilisée avec succès pour la sélection d'inhibiteurs de protéase présentant un intérêt thérapeutique [144].

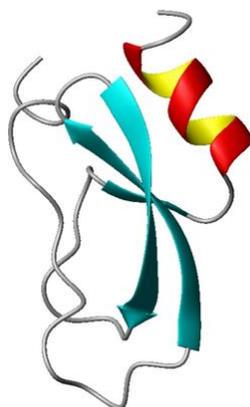


Figure 21 : Structure cristallographique d'un Kunitz

D'après Arnoux B. et al., 2002.

La DX-88 est une Kunitz particulièrement intéressante. Cette molécule possède une activité inhibitrice de haute affinité pour une sérine protéase : la kallikrein. Cette enzyme est impliquée dans une pathologie héréditaire : l'angio-œdème. Cette maladie peut être due à une mutation génétique provoquant une déficience du C1-inhibiteur qui est une enzyme inhibitrice de sérine protéase impliquée notamment dans l'inhibition du système du complément. La DX-88 (ou Kalbitor®) permet d'inhiber spécifiquement la kallikrein plasmatique et a pu

montrer dans une étude clinique sa réelle efficacité pour le traitement de cette pathologie [145].

5. Evolution dirigée de protéines : de la création de la diversité au sein d'une banque à la sélection des variants

A partir de la vingtaine d'acides aminés existants, l'évolution a pu générer une immense variété de protéines. Malgré l'amélioration des connaissances en biologie moléculaire et le développement de l'informatique, la recherche biologique n'est pas encore capable de synthétiser dans son intégralité une protéine ayant une structure et une fonction déterminées à partir d'une séquence d'acides aminés raisonnés (*Protein Design*). Il sera sans doute possible dans les décennies à venir de concevoir *in silico* une séquence d'acides aminés susceptible, après synthèse, de prendre la structure tridimensionnelle nécessaire à une interaction protéique ou à une activité enzymatique souhaitée. Cependant à ce jour, les connaissances des lois reliant la séquence peptidique et la structure de la protéine dans l'espace demeurent insuffisantes.

Il est en revanche désormais possible de contourner ces difficultés en utilisant des technologies d'évolution *in vitro* pour générer des protéines avec de nouvelles fonctionnalités. L'intérêt réside ici dans la génération de nouvelles protéines d'affinité. Il existe également des domaines de recherche visant, par exemple, à améliorer l'activité enzymatique d'une protéine, ou encore la solubilité et la spécificité pour un substrat donné.

Dans tous les cas, les stratégies d'évolution dirigée nécessitent d'une part une étape de création de diversité génétique et d'autre part une étape de criblage des variants présentant les propriétés recherchées.

La première étape consiste en la génération d'une population de gènes (banque) qui codent pour des variants de la protéine initiale par l'insertion de mutations. Ces modifications incorporées à l'ossature protéique initiale peuvent être totalement aléatoires au niveau de la position ainsi que de la nature des acides aminés ou alors faire l'objet d'une étude raisonnée afin de ne modifier que des positions particulières avec une famille d'acides aminés donnée.

Avant de détailler dans la partie suivante les différentes techniques d'évolution moléculaire dirigée, il est important de préciser que le processus d'évolution nécessite une association adéquate entre la méthode de génération de la diversité et celle qui permet de sélectionner les variants présentant les propriétés d'intérêt. De façon générale, deux types d'objectif sont recherchés :

- la création d'une protéine dotée d'une nouvelle fonction,
- l'amélioration de la fonction préexistante d'une protéine.

La stratégie adoptée varie en fonction de l'objectif à atteindre. En effet, lorsqu'il s'agit d'augmenter l'activité catalytique d'une enzyme ou encore d'améliorer l'affinité d'un anticorps pour un antigène, il convient d'adopter une stratégie visant à introduire progressivement de petites modifications évolutives à partir d'une structure préexistante, afin de réaliser une amélioration globale du phénotype. En revanche, la stratégie est différente lorsqu'il s'agit de générer une nouvelle interface afin d'obtenir les propriétés désirées. En effet, la fixation sur une protéine cible, qui n'existe pas dans la banque initiale, nécessite la réalisation d'un bond évolutif important.

Quelques équipes ont expérimenté la création de protéines présentant de nouvelles fonctions biologiques à partir de séquences d'acides aminés complètement aléatoires [146, 147]. La génération d'une collection de variants protéiques diversifiés peut alors aboutir à l'émergence de protéines possédant l'activité souhaitée. Cependant seul un nombre restreint d'équipes de recherche a choisi cette démarche, dans la mesure où les probabilités d'obtenir des protéines correctement reliées à

l'activité biologique recherchée sont relativement faibles et nécessitent de surcroît la manipulation de bibliothèques extrêmement diverses. Il paraît ainsi plus aisé de réaliser les manipulations d'évolution dirigée sur une population protéique issue d'une ossature protéique connue, et ayant par conséquent une probabilité plus élevée de générer des variants capables d'un repliement tridimensionnel fonctionnel.

La grande majorité des travaux est donc réalisée à partir de structures protéiques retrouvées dans la nature. L'objectif est d'insérer des mutations (aléatoires ou raisonnées) au sein de la structure initiale afin de générer des populations de variants. L'objectif final est de faire émerger les protéines aux fonctionnalités recherchées après exercice d'une pression de sélection sur les variants obtenus. Les outils de diversification d'évolution et de sélection peuvent être constitués selon deux procédés différents. D'une part les techniques purement *in vitro*, dont les étapes de diversification et de sélection sont entièrement réalisées *in vitro*, et d'autre part les techniques dans lesquelles l'insertion de mutations est effectuée *in vitro* puis le criblage peut être effectué *in vitro* et ou *in cellulo*, cette seconde étape étant réalisée après une phase de transfection ou de transformation.

5.1. Génération de la diversité génétique *in vitro*

Depuis l'utilisation de la technologie de l'ADN recombinant, deux méthodes de génération de diversité à partir d'une séquence mère sont utilisées communément. L'introduction des mutations se fait soit par mutagenèse aléatoire, soit par recombinaison de gènes [148, 149]. C'est en 1994 que Stemmer introduit pour la première fois la technique du « DNA shuffling » [150] pour la recombinaison de gènes *in vitro*. Depuis, de nombreuses autres techniques ont été développées [148, 149, 151-153]. Nous pouvons par exemple citer l'utilisation d'agents mutagènes chimiques pour le traitement de l'ADN ou des bactéries, la réalisation de PCR en condition peu fidèle (error-prone PCR), la mutagenèse par RCA (*Rolling Circle Amplification*), ou enfin la mutagenèse par saturation.

a) Mutagenèse à l'aide d'agents chimiques

De nombreux agents chimiques ont été identifiés comme pouvant induire des mutations génétiques. En fonction des modifications que l'on veut introduire au sein de la séquence d'intérêt, des agents chimiques peuvent être utilisés dans les étapes de réplication. L'acide nitrique (HNO_3) agit en désaminant les adénines, les guanines et les cytosines et induit des mutations ponctuelles par transversion (A/T en G/C). L'éthylméthane sulfonate (EMS) agit quant à lui sur les bases de guanine alors que le bisulfite de sodium cible spécifiquement les cytosines des ADN simple brin [154]. Toutefois l'utilisation de ces produits chimiques présente l'inconvénient d'introduire des mutations totalement aléatoires et pouvant potentiellement perturber le matériel génétique du plasmide nécessaire à l'amplification des gènes. Afin de contourner cet inconvénient, il a été proposé en 2008 la DuARChem (« Dual Approach to Random Chemical Mutagenesis ») qui permet l'introduction de mutations aléatoires, mais dans une portion d'ADN définie [155].

Nous pouvons citer également l'exemple de l'utilisation d'acides aminés modifiés chimiquement, les UAAs (« Unnatural Amino Acids »), qui peuvent remplacer les acides aminés naturels au cours de la traduction *in vitro* grâce à l'emploi d'ARNt chimiquement aminoacétylés, ou par leur utilisation directe dans le milieu de culture cellulaire déplété de l'acide aminé naturel. L'utilisation des UAAs a pour objectif d'attribuer de nouvelles propriétés chimiques à la protéine pour des applications spécifiques comme par exemple l'augmentation de la durée de vie *in vivo* qui passe par une meilleure résistance à la protéolyse ou encore l'ajout d'un site unique pour le marquage de la protéine. Nous pouvons citer comme exemple la substitution de la méthionine présente en N-terminale d'une DARPin par l'homopropargylglycine (Hpg) permettant de réaliser un marquage orienté sans perturbation de l'activité biologique de la protéine avec la technologie de la Chimie « click » [156].

b) L' « error prone » PCR : epPCR

La technique d'epPCR repose sur une augmentation contrôlée de la fréquence d'erreurs globales de la Taq polymérase lors de son activité répliquative. Cette enzyme ne possède pas d'activité exonucléasique et présente un taux d'erreur relativement élevé ($2,2 \times 10^{-5}$ bases substituées/paire de bases produites) dans des conditions standards [157]. Il est possible de moduler ce taux d'erreur en modifiant les conditions dans lesquelles est réalisée la PCR.

Les paramètres influençant la fidélité de l'enzyme sont d'une part la concentration en Mn^{2+} , qui réduit la spécificité d'appariement des bases nucléotidiques complémentaires et stabilise les appariements non complémentaires [158, 159], et d'autre part une concentration non stœchiométrique de dNTP qui va favoriser une mauvaise incorporation [160]. Enfin la fréquence des erreurs effectuées par la polymérase peut être majorée par l'augmentation de la concentration de l'enzyme qui va accroître la probabilité de l'élongation des terminaisons sans amorce [161]. Suite à la PCR, les produits d'amplification sont clonés dans un vecteur d'expression afin de disposer de la bibliothèque de variants. Cette technique présente ici un avantage car seules les parties du gène encadrées par les amorces seront soumises aux mutations. En revanche la diversité des bibliothèques obtenues peut être limitée du fait des étapes de ligature et de transformation. Cette technique peut notamment être utilisée pour effectuer une maturation d'affinité en permettant la réintroduction d'une diversité au sein d'une séquence déjà sélectionnée. La banque de seconde génération ainsi générée servira dans un second temps à réaliser de nouveaux tours de sélection dans une technique d'évolution dirigée et permettra éventuellement d'isoler de nouveaux clones avec de meilleures affinités.

c) Le « error prone RCA »

La technique de *error prone RCA* [162] utilise le principe d'amplification de « Rolling Circle Amplification » (RCA). Elle permet l'introduction de mutations aléatoires par l'ajout de $MnCl_2$ qui a pour effet de diminuer la fidélité de l'enzyme polymérase. Il s'agit d'une technique d'amplification circulaire de séquences d'ADN réalisée *in vitro* qui s'inspire d'une technique de réplication de l'ADN circulaire observée chez différents virus [163]. La technique repose sur l'amplification de l'ADN matrice présente sous forme circulaire par un processus de cercle roulant créant un long homopolymère de la séquence amplifiée [164]. L'amplification faite par la $\Phi 29$ ADN polymérase ne nécessite pas d'oligonucléotides spécifiques comme ceux retrouvés en PCR, mais des hexamères aléatoires (NNNNNN) capables d'amorcer l'amplification en tout point de l'ADN circulaire matrice. Par conséquent l'amplification n'est pas séquence spécifique mais les séquences longues ou circulaires sont privilégiées. Il en résulte la synthèse d'un long concatémère ramifié.

Le produit de la réaction est une molécule d'ADN linéaire double brin formée de séquences répétées contenant des mutations ponctuelles aléatoires. Ces brins d'ADN linéaires sont directement transformés dans des levures ou des bactéries capables de les récirculariser. Par comparaison avec d'autres méthodes d'amplification *in vitro* comme *error prone PCR*, ou l'utilisation de souches bactériennes mutagènes, la technique du RCA permet l'introduction de mutations avec peu d'étapes de manipulation. Cependant l'introduction de mutations aléatoires dans les gènes nécessaires à la réplication du plasmide ou à la sélection de clones après transformation, peut être un inconvénient.

d) *Mutagenèse à saturation*

Il peut être intéressant d'identifier un acide aminé dont la position est déterminante pour l'activité de la protéine considérée. L'information acquise après substitution ou délétion de cet acide aminé permettrait de mieux comprendre le fonctionnement moléculaire de la protéine. La technique de mutation à saturation

(ou mutagénèse dirigée) est tout à fait adaptée à l'insertion de mutations ponctuelles au sein de la séquence d'ADN codant pour la protéine d'intérêt. Elle peut être réalisée en une seule étape de PCR à l'aide d'amorces contenant les codons mutés et en partie complémentaires des brins opposés du plasmide [165]. Les oligonucléotides servent à amplifier par PCR le plasmide avec la ou les mutations souhaitées. Le plasmide sauvage ayant servi de matrice est éliminé par digestion enzymatique (DpnI) à laquelle l'ADN amplifié n'est pas soumis car dépourvu de méthylation nécessaire à la digestion. Après transformation de bactéries compétentes le mésappariement des plasmides est réparé *in vivo* par la machinerie cellulaire.

e) *Mutagénèse par cassette combinatoire*

Cette technique consiste à introduire à l'aide d'oligonucléotides des codons dégénérés dans la séquence du gène sauvage. Ce procédé permet d'introduire des mutations aléatoires dans des régions spécifiques de la protéine. Il s'agit dans la plupart des cas de codons NNN, NNB, NNK, ou NNS (N=A/C/G/T ; B=C/G/T ; K=G/T ; S=G/C). Cette combinaison de codons permet de coder les vingt acides aminés. Cependant l'incorporation de codons dégénérés NNN présente plusieurs limites. Elle peut en effet conduire à l'apparition fréquente de codons stop au sein de la séquence ayant pour résultat un arrêt prématuré de la traduction. De plus il est statistiquement plus probable de retrouver les acides aminés arginine, leucine et sérine car ils sont codés par six codons comparés à des acides aminés plus rares comme la méthionine ou le tryptophane, ceci pouvant compliquer la génération d'une diversité au sein de la banque. En outre, il peut être important de privilégier l'incorporation de codons dégénérés codant pour des acides aminés proches en terme de propriétés physico-chimiques afin d'augmenter les probabilités d'obtenir une protéine fonctionnelle [166]. Par conséquent l'utilisation des codons dégénérés NNB permet de réduire la probabilité d'apparition d'un codon stop, et les codons NNK et NNS minimisent la surreprésentation des résidus les plus communs [161].

5.2. Méthodes de criblage et de sélection

Suite à l'étape de création d'une banque de variants, il convient d'utiliser une technique afin de sélectionner et d'enrichir le répertoire de gènes codant pour des protéines possédant la propriété souhaitée. Plusieurs méthodes de sélection ont été mises au point *in vivo* et *in vitro*. Elles reposent essentiellement sur la possibilité de lier la fonction (souvent d'une protéine) à son information génétique. Les paragraphes suivants décrivent deux techniques : l'une *in vivo* (le phage display), et l'autre *in vitro* (le ribosome display). Toutefois il est important de signaler qu'il existe d'autres méthodes comme par exemple la PCA (Protein Fragment Complementary Assay) mise au point par l'équipe de Michnick afin d'explorer les réseaux biochimiques cellulaires [167]. La technique du double hybride est certainement l'une des plus utilisées. Ce système développé par Fields et Song en 1985 permet d'étudier des interactions protéine-protéine en se basant sur la protéine GAL4 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* [168].

a) Le Phage Display

Cet outil biotechnologique est très puissant pour la sélection de variants d'une banque combinatoire. Il permet l'expression de diverses molécules (peptides, protéines, fragments d'anticorps ou anticorps entiers) à la surface de phages sous forme de protéines de fusion couplées avec le domaine N-terminal de la protéine pIII ou pVIII du phage (Figure 22) [169]. Ainsi exprimés les phages sont sélectionnés pour leur capacité à se fixer à une cible immobilisée sur un support solide. En fonction de la pression de sélection exercée, plusieurs lavages sont effectués, puis les phages fixés sur la cible sont élués, isolés et amplifiés par des bactéries après leur transformation. Ceci constitue un tour de sélection. Après 3 à 5 tours, le pool de phages est analysé pour l'activité recherchée.

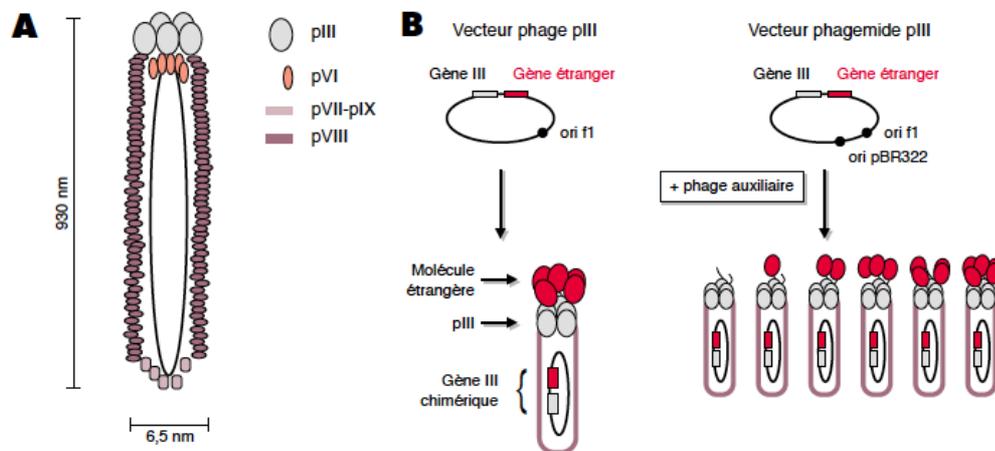


Figure 22: A) Représentation schématique du bactériophage filamenteux fd B) Exemples d'expression à la surface d'un vecteur phage ou d'un vecteur phagemide. D'après Souriau *et al.*, 1998.

La puissance de cette technique repose sur la possibilité de cribler de 10^6 à 10^{10} variants contenus dans un tube. De plus, le phage permet d'associer le phénotype au génotype en transportant l'ADN codant pour la protéine exposée à sa surface, ce qui offre la possibilité d'accéder rapidement et facilement aux séquences des molécules sélectionnées.

Les banques de protéines combinatoires sont clonées par PCR en 5' des gènes pIII ou pVIII d'un phage filamenteux (M13 est le plus communément utilisé). Le gène du phage est choisi en fonction de la longueur de la protéine ou des paramètres de fixation (valence). La longueur de la protéine couplée avec pIII ne perturbe pas la morphologie du phage, en revanche des phénomènes d'encombrements stériques surviennent lorsque la taille des peptides fusionnés avec pVIII est supérieure à 8 acides aminés, car la protéine pVIII est exprimée en grande quantité à la surface du phage. Ces problèmes de tailles et d'encombrements peuvent être résolus avec l'utilisation d'un phage auxiliaire ("helper phage") qui possède le gène sauvage de la protéine III et VIII et permet la dilution des protéines de fusion par des protéines sauvages (Figure 22).

Une des principales limites du système est la diversité de la banque, l'objectif étant que le nombre maximum de variants soit représenté afin de maximiser l'obtention de protéines intéressantes. Le nombre de variants (la diversité) dépend du nombre de résidus soumis aux mutations. Au delà de 7 acides aminés les banques de variants possèdent un répertoire de l'ordre de 10^{11} . Sachant que l'efficacité de transformation bactérienne n'excède pas 10^8 , la représentativité des variants ne sera que partielle. D'autre part les clones protéiques présentant une toxicité pour la pousse bactérienne, ceux qui sont faiblement traduits ou qui diminuent la capacité infectieuse des phages, seront éliminés de la banque.

Il est important de noter également qu'un à deux tours de sélection suffisent à diminuer drastiquement la diversité de la banque car certains clones possèdent des avantages de pousse et prennent le pas sur le reste de la population d'où la nécessité d'effectuer un nouveau clonage des banques et non pas une simple amplification. Néanmoins la présentation de produits de traduction issus d'ADNc à la surface de phages est un procédé de sélection efficace qui a permis de promouvoir l'activité catalytique de plusieurs enzymes (phosphatase alcaline, beta-lactamase, trypsine) ou encore de réaliser des maturations d'affinité d'un anticorps pour un antigène [170, 171].

b) *Le Ribosome Display*

Cette technique de sélection se réalise entièrement *in vitro* et a été utilisée pour la première fois par l'équipe de Mattheakis en 1994 afin d'identifier parmi des séquences aléatoires de décapeptides celles se fixant sur un anticorps monoclonal en utilisant le système de transcription S30 d'*E.coli* [172].

Mattheakis et ses collaborateurs se sont inspirés d'une méthode de sélection proposée quelques années plus tôt par Ellington [173] intitulée « évolution

« systématique de ligands par enrichissement exponentiel » (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment : SELEX).

Cette technique consiste en la réalisation de plusieurs cycles de transcription d'un pool d'ADN aléatoire, suivie d'une étape de sélection par contact avec la molécule cible puis d'une étape de RT-PCR permettant l'amplification exponentielle des acides nucléiques se fixant sur la cible. Après la sélection, les "binders" obtenus sont clonés, séquencés et caractérisés. L'avantage réside dans le fait de pouvoir disposer de l'information génétique et phénotypique sur la même molécule et d'utiliser des banques avec un nombre important de variants (10^{15} à 10^{16} séquences différentes), puisqu'ici la totalité des étapes est réalisée *in vitro* et n'est pas limitée par des étapes de transformation bactérienne. En revanche la fragilité des ARN (sensibilité aux RNAses) ainsi que leur caractère polyanionique constituent des inconvénients majeurs. En effet les ARN sont des molécules chargées négativement, elles auront par conséquent tendance à interagir préférentiellement avec des cibles positives diminuant par la même la gamme de cibles envisageables. Afin de dépasser ce problème, les ARN peuvent être remplacés par des protéines : le Ribosome display.

Le principe général reste inchangé par rapport au SELEX, l'objectif étant la sélection de protéines ayant une affinité pour la protéine cible immobilisée sur un support solide. La première étape permet la production de complexes ternaires composés d'ARN, d'un ribosome et de la protéine naissante à partir d'une banque de 10^{12} variants. La formation des complexes ternaires peut être effectuée à partir des ARN messagers issus de la transcription des banques d'ADN en couplant les étapes de transcription et de traduction. Après évaluation du temps nécessaire à la formation des complexes ternaires (dépendant de chaque préparation de S30), la traduction est arrêtée par ajout d'un tampon à 4°C contenant du Mg^{2+} . Cette action permet la condensation des ribosomes empêchant la dissociation ou l'hydrolyse des complexes. Le mélange de complexes est ensuite exposé à la cible qui est immobilisée sur une surface solide. La capture de la cible sur la surface solide se fait

préférentiellement via le complexe streptavidine/biotine afin de potentialiser la présentation de la cible dans sa conformation native en minimisant les risques d'interaction avec le support. Une plaque recouverte de streptavidine permet la capture de la cible biotinylée. En outre, l'utilisation de billes magnétiques recouvertes de streptavidine est une alternative particulièrement intéressante afin de réaliser une sélection en solution.

Suite à l'exposition des complexes ternaires sur la cible, les complexes présentant peu ou pas de spécificité sont éliminés par des lavages avec du tampon contenant du magnésium afin d'éviter le relargage des ARNm. Suite à cette étape, l'éluion des ARNm est effectuée par l'ajout d'un excès d'EDTA qui va complexer le magnésium et provoquer la dissociation des complexes ternaires. Les ARNm isolés sont retro-transcrit en ADNc et amplifiés par PCR. L'ADN synthétisé peut être utilisé pour réaliser un nouveau tour de sélection. Après 3 à 5 tours, la sélection est analysée par un test ELISA afin de quantifier l'enrichissement du pool en protéines spécifiques de la cible (Figure 23). Si l'enrichissement est sujet suffisamment important, le pool de sélection est cloné, les clones sont criblés puis séquencés.

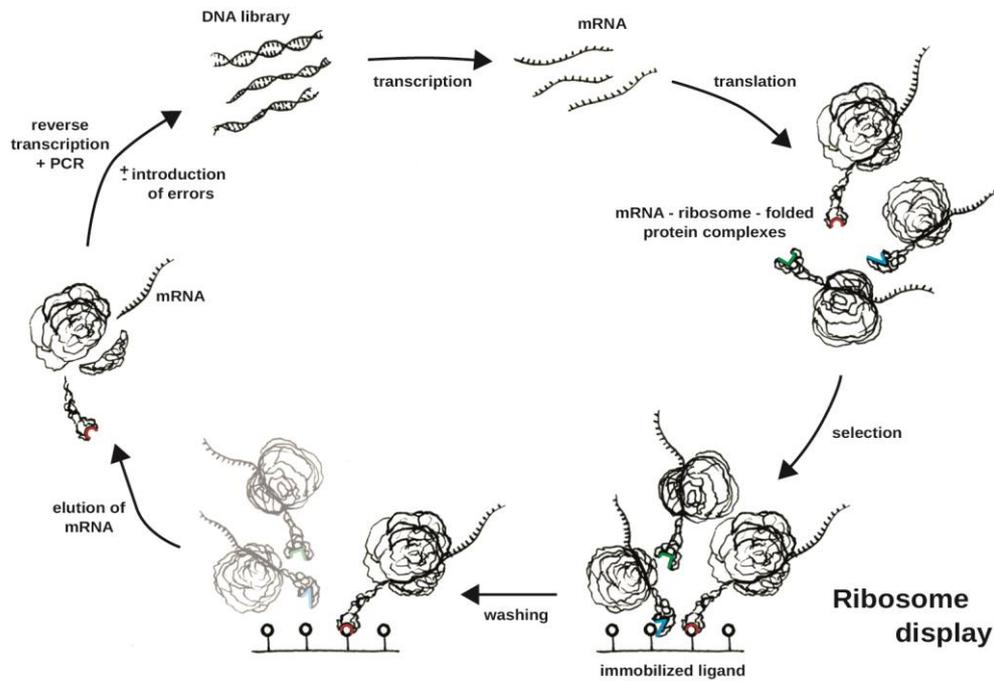


Figure 23 : Schéma de la technique du Ribosome Display. D'après Jérémy Segard 2013.

Le Ribosome Display peut être à la fois une technique de sélection et d'évolution, car l'étape de PCR peut être utilisée pour réintroduire de la diversité au sein de l'information génétique sélectionnée. L'équipe de recherche de Andréas Plückthun a pu isoler plusieurs scFv interagissant avec l'insuline en utilisant une banque de fragments d'anticorps de 2×10^9 clones indépendants. Après cinq tours de sélection par Ribosome Display, les chercheurs ont observé qu'aucune séquence sélectionnée n'était présente au début de la sélection mettant en évidence les mutations introduites lors des étapes d'amplification pour lesquelles une polymérase peu fidèle est utilisée [174]. Ce processus de régénération de diversité mime celui d'hypermutation somatique naturelle des anticorps observé lors de réponses immunitaires, et permet la génération et la sélection de protéines possédant des K_D de l'ordre du picomolaire pour leur ligand.

6. Récapitulatif et conclusion à propos des protéines alternatives aux anticorps :

La preuve de l'utilité et de l'efficacité thérapeutique des nouvelles charpentes protéiques servant d'alternatives aux anticorps fut apportée par l'utilisation du DX-88 en 2009 pour le traitement de l'angio-œdème [145]. De plus, l'évaluation clinique de nombreuses autres alternatives est actuellement en cours. Parmi les exemples non exhaustifs de protéines alternatives donnés dans le chapitre précédent, toutes possèdent une structure protéique stable, robuste, un faible poids moléculaire et peuvent être produites en grande quantité dans un système d'expression bactérien. Les techniques permettant de générer des banques de variants d'une diversité importante, combinées aux techniques d'évolution dirigée et d'ingénierie protéique ont permis d'utiliser ces charpentes protéiques comme nouveaux outils au service de la médecine de demain.

En effet leur petite taille leur confère un faible encombrement stérique et par conséquent leur permet d'accéder à des poches de reconnaissance ou à des sites actifs d'enzymes qui restent inaccessibles à des protéines de haut poids moléculaire comme les anticorps [107]. Comme nous l'avons détaillé précédemment pour les DARPins anti-HER2, il est possible dans certains cas d'obtenir des protéines alternatives possédant une activité thérapeutique plus efficace que l'anticorps dirigé contre le même antigène. Ceci démontre l'intérêt de développer des protéines alternatives, de plus il est beaucoup plus aisé et rapide de manipuler ces petites protéines et par conséquent ceci potentialise les chances d'obtenir la protéine souhaitée. Le faible poids moléculaire de ces protéines autorise également une pénétration tumorale plus importante et une clairance rénale rapide, qui est requise du fait de l'utilisation en imagerie moléculaire de radioisotopes de courtes demi-vies.

Néanmoins cet avantage est contre balancé par la nécessité de procéder à des augmentations de poids moléculaire (PEGylation, ou fusion à des protéines de plus

haut poids moléculaire) afin de moduler leur demi-vie biologique. En outre le nombre limité de résidus de ces charpentes protéiques peut être un obstacle à leur marquage. En effet, les résidus au contact du solvant et ceux pouvant potentiellement réagir chimiquement et établir une liaison covalente durable avec un marqueur (radioactif ou fluorescent), sont limités. Il est primordial que le marquage n'interfère pas avec une zone importante pour l'activité biologique de la protéine, afin de ne pas risquer de la rendre inexploitable. C'est pour cette raison que de nombreuses stratégies ont été développées pour permettre l'introduction d'un site unique de marquage au sein des structures protéiques, pour marquer de façon ciblée sans modifier l'activité de la protéine.

IV. Le myélome multiple

Le myélome multiple (MM), est une hémopathie maligne caractérisée par la prolifération clonale de plasmocytes dans la moelle osseuse. La plupart des myélomes sont caractérisés par la production d'immunoglobulines monoclonales (60 % d'IgG, 20% d'IgA et 2% d'IgD) il existe toutefois quelques cas de myélome non sécrétant. Cette maladie peut se manifester par un phénotype bénin, caractérisé par une gammopathie monoclonale indéterminée, mais aussi par un myélome symptomatique avec une infiltration diffuse de la moelle, des destructions osseuses localisées et des lésions extramédullaires. De plus, une suppression de la fonction de la moelle osseuse et une insuffisance rénale peuvent survenir.

1. Epidémiologie

En terme d'épidémiologie on estime qu'il survient 86 000 nouveaux cas de MM par an à l'échelle mondiale. Chaque année près de 68 000 personnes meurent de ce cancer ce qui correspond à près de 1% des décès par cancer. La fréquence d'apparition de ce cancer est inégalement répartie géographiquement, avec une incidence plus importante dans les régions industrialisées comme l'Australie, la Nouvelle Zélande, l'Europe et l'Amérique du nord [175]. En France, 3000 nouveaux cas sont diagnostiqués par an, il s'agit en terme de prévalence de la deuxième hémopathie maligne après les lymphomes. Ce cancer est particulièrement invalidant, et se développe dans l'ensemble du squelette avec une préférence pour le rachis. D'importants progrès ont été réalisés au cours des dix dernières années aussi bien au niveau de la physiopathologie qu'au niveau du traitement. Le MM reste une maladie incurable, néanmoins il semble désormais possible qu'elle devienne dans un avenir proche une maladie chronique [176].

2. Physiopathologie et microenvironnement osseux

La compréhension des mécanismes du processus tumoral nécessite la prise en compte du stroma environnant. Les plasmocytes tumoraux sécrètent des cytokines et notamment RANK-Ligand (« receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand ») au sein du microenvironnement osseux induisant une suractivation des ostéoclastes et par conséquent un déséquilibre de la balance ostéoformation/ostéolyse en faveur de l'ostéolyse. La destruction de la matrice osseuse par les ostéoclastes provoque alors un relargage de facteurs de croissance stimulant la croissance tumorale et initiant un cercle vicieux entre ostéolyse et prolifération tumorale (Figure 24). De plus, il a été montré que les plasmocytes tumoraux sont capables de réaliser le catabolisme de l'ostéoprotégérine (OPG) qui est le récepteur leurre de RANK-L permettant dans des conditions physiologiques, de réguler l'action de RANK-L. Enfin, il a également été montré que la reconstruction de l'os par les ostéoblastes est anormale en raison de la sécrétion par les cellules myélomateuses de la cytokine Dickkopf Homolog 1 (DKK1) qui inhibe les ostéoblastes [177, 178].

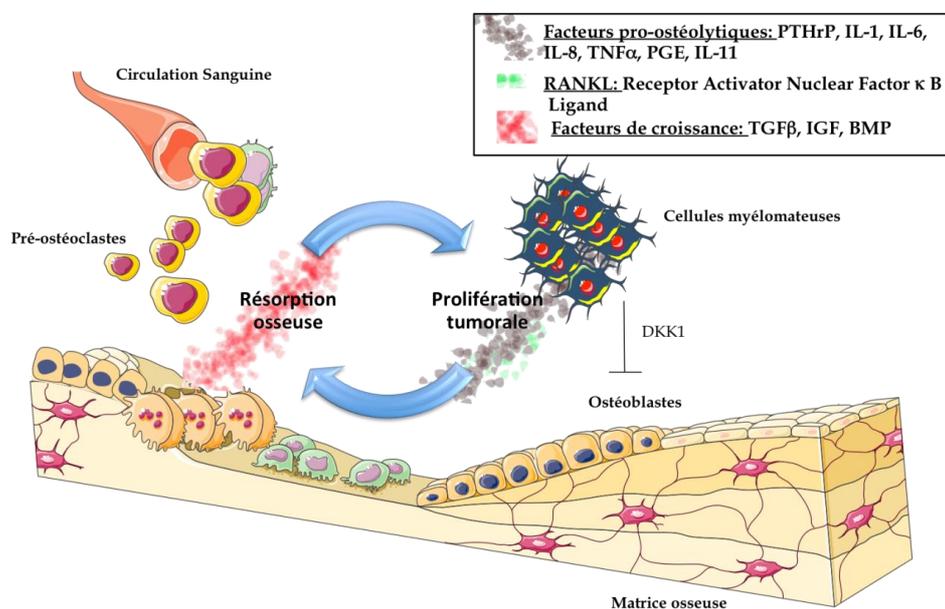


Figure 24 : Cercle vicieux au sein de la moelle osseuse entre prolifération tumorale et destruction osseuse dans le myélome multiple

La pathologie se présente ainsi sur deux niveaux : la prolifération tumorale d'une part et la résorption osseuse induite d'autre part. Le MM provoque des lésions ostéolytiques aléatoires sans tropisme véritable avec une localisation unique ou multiple. L'évolution de la pathologie est rapide et engendre des complications mécaniques dues aux fractures ostéolytiques qui peuvent contraindre le patient à une immobilisation prolongée. Il est par conséquent essentiel de réaliser le diagnostic de la pathologie le plus précocement possible afin de mettre en place le traitement thérapeutique lorsque l'ostéolyse et la dissémination des cellules tumorales sont les plus faibles possibles.

3. Diagnostic

Durie et Salmon ont défini dans leur publication en 1979 [179] les signes cliniques les plus caractéristiques observés lors de l'augmentation du volume tumorale chez les patients atteints d'un myélome multiple. Ainsi leur système de stadification préconise le contrôle de la fonction urinaire et de l'ostéolyse par une mesure de la calcémie et un contrôle radiographique du squelette entier. Le contrôle de l'ostéolyse par radiographie est également préconisé dans le cadre des critères CRAB (hypercalcémie, insuffisance rénale, anémie et ostéolyse), proposés par l'IMGW (International Myeloma Working Group) [180]. L'évaluation standard du myélome multiple comprend un hémogramme, une biochimie sérique, l'électrophorèse de l'urine et une biopsie médullaire.

3.1. L'imagerie médicale pour le diagnostic

Le système de classification Durie / Salmon, introduit en 1975, propose l'étude squelettique comme seul critère radiologique [179]. Dans un effort de normalisation des approches thérapeutiques et de stadification de la maladie, le système de Durie/Salmon PLUS a été introduit, en intégrant les techniques d'imagerie les plus

sensibles dans son système de classification : l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la tomодensitométrie (TDM) et la TEP/CT [181].

a) *La radiographie*

La détection des foyers tumoraux par la mise en évidence de destructions osseuses par l'utilisation des rayons X reste aujourd'hui l'examen conventionnel. L'étude du squelette avec des appareils de radiologie largement disponibles et peu coûteux permet d'obtenir des résultats fiables, comparables d'une étude à l'autre et peu ionisant pour le patient (environ 0,3 à 0,4 mSv/radiographie). Cependant les rayons X classiques présentent des inconvénients. La haute densité du tissu osseux rend la détection des lésions osseuses peu sensible en imagerie radiographique conventionnelle. L'ostéolyse ne devient réellement détectable que lorsque 30 à 50% de la masse osseuse est détruite [182]. Par conséquent l'utilisation de ce type d'imagerie est basée sur la détection d'un événement tardif du développement de la pathologie. En outre, selon la partie du squelette à radiographier il peut y avoir des phénomènes de superposition ou des interférences avec les gaz intestinaux, notamment dans la région pelvienne.

b) *La tomодensitométrie*

Le scanner (« Computed Tomography ») utilise également les rayons X. Cependant, à la différence de la radiographie conventionnelle, la source de ces rayons est mobile autour du patient permettant la prise de multiples clichés par tomographie, et la génération d'images en 2D ou 3D. Le scanner est reconnu comme ayant une meilleure sensibilité que la radiographie classique en matière de détection d'altérations de la minéralisation osseuse [183, 184]. De plus, l'obtention d'images tridimensionnelles du squelette est particulièrement intéressante pour la réalisation de biopsies permettant de définir l'origine d'une lésion douteuse, dans la mesure où elle permet un guidage très précis de l'aiguille. Bien qu'il soit difficile de visualiser une infiltration diffuse de la moelle osseuse dans l'os spongieux avec des images de

scanner sans l'ajout d'un produit de contraste, la détection et le suivi de foyers tumoraux dans les os longs sont possibles [185]. L'exposition aux radiations constitue le principal désavantage du scanner, avec un report de dose de 4 à 7,5 mSv par examen. Ainsi l'utilisation répétée du scanner chez les patients présentant un myélome latent ou à longue vie peut les soumettre à un taux de radiations cumulées important.

c) *L'IRM*

L'utilisation de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet de détecter et d'évaluer avec une grande sensibilité les masses tumorales au niveau de la moelle osseuse avant la destruction de la matrice osseuse lors du développement tumoral et sans l'utilisation de rayons ionisants. Plusieurs études ont montré la pertinence de l'utilisation de l'IRM dans la stadification et le suivi des patients atteints de myélome multiple [186]. Il a été mis en évidence que la réduction tumorale observée par IRM, corrélée avec une rémission sérologique, avait une valeur prédictive de rémission complète plus importante qu'avec une donnée sérologique unique [40]. La possibilité de détecter les masses tumorales directement dans la moelle osseuse confère à l'IRM un avantage certain, surtout chez les patients âgés qui peuvent présenter de l'ostéoporose. En effet, avec une simple radiographie du squelette, il peut être difficile de différencier une fracture ayant pour origine une fragilité osseuse due à l'ostéoporose de celle résultant du développement d'un myélome multiple [187]. Le coût d'achat de l'appareil et son maintien sous tension permanent constituent les principaux inconvénients de cette technologie. Il convient en outre de noter que les personnes claustrophobes ainsi que celles ayant subi la pose d'implants métalliques ne peuvent bénéficier de cette méthode d'imagerie. En outre, bien que disposant d'une grande sensibilité, la définition de l'IRM ne descendant pas en dessous du centimètre, seules les masses tumorales supérieures à cette taille plancher sont susceptibles d'être repérées.

d) *La TEP-FDG*

La TEP-FDG est en cours d'évaluation pour la stadification et le contrôle de l'efficacité thérapeutique chez les patients atteints de myélome multiple. Sa place doit être encore validée en particulier en comparaison avec l'IRM. Cependant des études récentes suggèrent que cette technique d'imagerie est particulièrement prometteuse tant en ce qui concerne l'établissement du bilan initial que l'observation postérieure de l'effet des thérapies mises en œuvre [188].

La sélection d'une cible caractérisant au mieux les cellules tumorales demeure tributaire d'une connaissance la plus approfondie possible de la biologie du cancer. En outre, la sélection d'un biomarqueur pertinent reste déterminant pour un ciblage efficace des foyers tumoraux tant pour le diagnostic que pour la thérapie.

4. Intérêt de l'imagerie phénotypique dans le myélome multiple

Notre équipe de recherche s'est particulièrement intéressée à la réalisation d'images moléculaires dans un modèle murin de xénogreffe de cellules humaines de cancer du sein (MDA-MB-468). Ce modèle d'étude est induit par l'injection sous cutanée de cellules cancéreuses humaines surexprimant CD138, et pourrait à ce titre être comparé au modèle murin de xénogreffe de cellules myélomateuses utilisé également au sein de notre équipe et qui sera exploité au cours de ce travail.

Suite au développement tumoral des cellules MDA-MB-468, l'anticorps anti-CD138 B-B4 marqué à ^{124}I a été injecté en intraveineux et des prises d'images par TEP-CT ont été réalisées sur souris entières à 1, 2, 3, 4 et 8 jours après l'injection. De l'imagerie TEP a également été réalisée une heure après l'injection en intraveineux de ^{18}F FDG. Le ciblage de CD138 a permis d'obtenir des images moléculaires de bonne

qualité, mettant spécifiquement en lumière la présence de la tumeur au site d'injection (Figure 13) [189]. Nous pouvons remarquer que le marquage tumoral obtenu à D8 en utilisant l'anticorps anti-CD138 est plus important que celui observé avec le ^{18}F FDG.

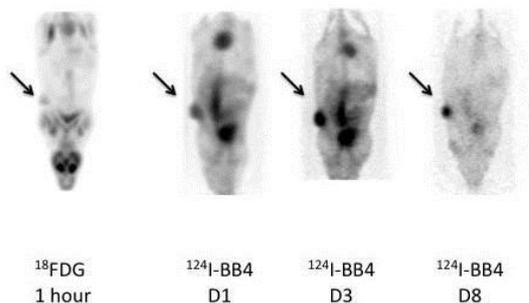


Figure 25 : Imagerie TEP réalisée après l'injection de ^{18}F FDG ou du B-B4 marqué à l' ^{124}I à différents temps dans un modèle murin de cancer du sein. *D'après Rousseau et al., 2012.*

Parallèlement à ce travail d'imagerie, de la radio-immunothérapie a été effectuée par administration de B-B4 marqué à l' ^{131}I . Avec une dose injectée de 22,2 MBq, on a pu observer une diminution importante du volume tumoral mais également une augmentation significative du taux de survie à 100 jours [190]. Ces résultats montrent l'intérêt du radio-ciblage du CD138 à la fois pour l'imagerie TEP et pour la RIT.

V. CD138 (syndécan-1) biomarqueur pour le ciblage tumoral

Comme précisé précédemment les travaux de recherche et les études cliniques menés par notre groupe ont notamment pu montrer l'intérêt du ciblage de cette protéine pour le traitement du myélome multiple [189, 191].

Le CD138 est un membre de la famille des syndécans qui comprend des protéoglycanes (PG) à chaînes héparane sulfate (HS). Cette protéine est constituée d'une charpente protéique avec des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG). Cette protéine transmembranaire joue un rôle important tant dans les interactions intercellulaires que dans les interactions avec la matrice extracellulaire. Chez l'homme adulte le CD138 est exprimé essentiellement par les cellules épithéliales, les plasmocytes normaux et tumoraux ainsi que dans différents autres types de cancers. Actuellement les fonctions biologiques du CD138 dans les processus tumoraux et notamment dans le myélome multiple sont mal connues, néanmoins le syndécan-1 est aujourd'hui utilisé comme marqueur standard par de nombreux laboratoires pour l'identification et la purification de cellules myélomateuses [192-194]. Par ailleurs, le dosage du taux sérique de syndécan-1 est utilisé comme facteur de pronostic pour le myélome multiple.

1. Structure et synthèse des protéoglycanes (PG)

Les protéoglycanes (PG) sont des macromolécules complexes composées d'une structure protéique portant des chaînes polysaccharides chargées négativement au niveau de zones d'ancrage spécifiques. L'intérêt porté à ces molécules est grandissant car elles possèdent des propriétés structurales et fonctionnelles remarquables. Les PG sont retrouvées au niveau de la MEC soit ancrées dans la membrane plasmique des cellules où elles jouent un rôle essentiel

Commentaire [MC1]: Abréviation déjà citée ?

dans les phénomènes d'adhésion, soit dans la fixation de facteurs de croissance (famille Wnt, TGF- β , FGF et Hedgehog) régulant ainsi l'activité de ces derniers (Figure 26).

Commentaire [MC2]: Cite ces facteurs de croissance

Commentaire [MC3]: Ou est la fig 25

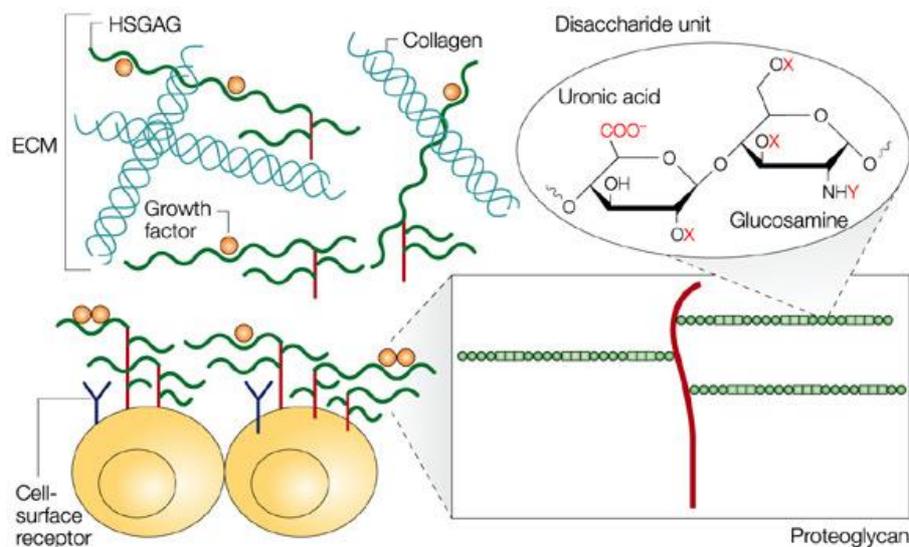


Figure 26 : Structure et fonction biologique des protéoglycanes. Le noyau protéique est en rouge, et les chaînes GAG fixées en vert sont composées d'unités dissaccharidiques répétées. (D'après Sasisekharan et al., 2002)

Ces molécules présentent un réel intérêt thérapeutique et de nombreuses études montrant l'implication des PG dans plusieurs voies morphogénétiques distinctes. Les PG interviennent ainsi dans de multiples phénomènes biologiques comme par exemple l'adhésion cellulaire, la mobilité, la prolifération ou encore la différenciation et permettent de réguler la réponse cellulaire en fonction du microenvironnement [195]. Nous pouvons citer notamment la génération de gradients de concentrations de Hedgehog (protéine impliquée dans le développement embryonnaire et tumoral) *via* sa fixation sur les HS [196].

Les PG sont formées d'une charpente protéique (noyau) sur laquelle sont fixées de façon covalente au niveau de certains résidus sérines des chaînes hétéropolysaccharidiques linéaires : les glycosaminoglycane (GAGs). De façon générale, il existe deux groupes de chaînes de GAGs : les chondroïtine-sulfates/dermatane-sulfates (CS/DS) et les héparines/héparane-sulfates (Hep/HS). La composition, la structure et les propriétés chimiques des chaînes GAGs diffèrent d'un type de protéoglycane à un autre, mais les PG suivent en général le même schéma de synthèse. La structure protéique comporte le plus souvent un motif sérine-glycine (Ser-Gly) sur lequel vient se fixer un résidu xylose qui permet l'initiation de la polymérisation de la chaîne GAG. Puis vient se greffer une région de liaison constituée d'une amorce tétrasaccharidique : xylose-galactose-galactose-acide glucuronique. Une élongation de cette amorce s'effectue ensuite par des ajouts successifs de résidus glycidiques d'un même motif disaccharidique formant les chaînes de GAGs. La composition de ces chaînes détermine leur type, et, bien que possédant des caractéristiques communes, les nombreuses modifications telles que les *N*-déacétylations et les *O*- et *N*-sulfatations opérées sur les chaînes de GAGs au cours de leur synthèse, confèrent à ces molécules une complexité et une diversité structurale très importante (Figure 27) [197, 198].

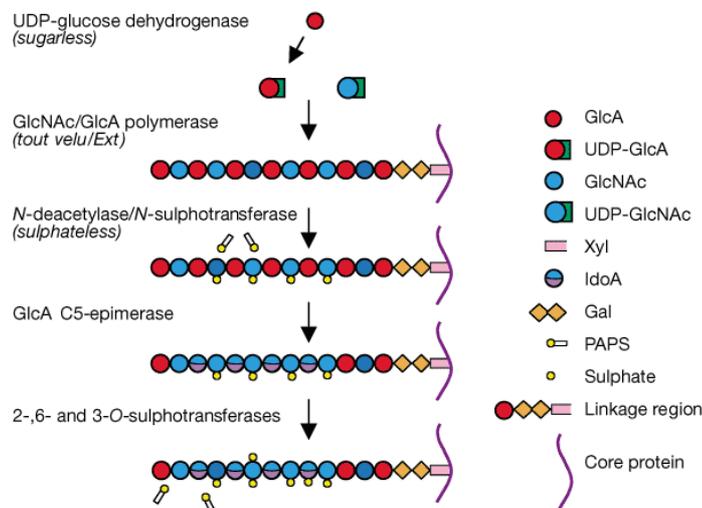


Figure 27 : Schéma de la biosynthèse des héparanes sulfates (D'après Bernfield et al., 2000).

2. Les protéoglycanes à chaînes Heparanes Sulfates (HSPG)

Les HSPG sont des membres des PG caractérisés par un complexe de polysaccharides formé par l'assemblage d'une unité disaccharidique : un acide uronique lié à un glucosamine. Ils sont présents à la surface de toutes les cellules eucaryotes. Les fonctions des HSPG demeurent grandement sous-estimées voire même ignorées par les biologistes alors qu'elles semblent avoir un rôle fondamental dans la biologie du vivant. Les recherches réalisées sur ces glycoprotéines permettent de définir les relations entre la structure et la fonction et ainsi de mieux comprendre comment la modification des chaînes HS peut conduire à l'apparition de pathologies. Des études ont pu montrer que ces glycoprotéines régulent des processus physiologiques lors de l'embryogenèse avec par exemple implications des facteurs Wingless (Wg), FGF et Hedgehog, mais également dans le maintien de l'homéostasie de l'adulte [195, 199].

Les HSPG sont également exprimés par les cellules tumorales ainsi que par les cellules essentielles pour le développement tumoral [200, 201]. Par exemple, les HSPG sont capables de moduler le processus angiogénique [202]. Leur très grande variété structurale leur confère de multiples rôles notamment dans les cancers où ils peuvent influencer le phénotype ainsi que le développement cellulaire, ce qui a un effet direct sur le volume tumoral ou les phénomènes métastatiques. Il a été montré chez la souris qu'une modulation de la structure des HSPG présents à la surface des cellules tumorales avait un effet important sur la croissance tumorale ainsi que sur la formation de métastases [200]. L'équipe de Sasisekharan a pu montrer qu'il existait au sein des HS des séquences glucidiques spécifiques modulant l'effet biologique des facteurs de croissance présents dans le microenvironnement. Ainsi, par une régulation dynamique de la composition et de la séquence de leurs HSPG, les cellules cancéreuses pourraient moduler leur potentiel métastatique et leur vitesse de croissance tumorale [203, 204].

L'immense variété structurale des HSPG leur confère la capacité de se lier et d'interagir avec une diversité de protéines telles que des facteurs de croissance, des chimiokines et des enzymes (Figure 28). Certaines de ces molécules, comme par exemple le FGF 1 (fibroblast growth factor) et 2, le VEGF (vascular endothelial growth factor), ou le HGF (hepatocyte growth factor) sont importantes pour la croissance tumorale [205]. L'équipe de Kleef *et al.* a par exemple pu mettre en évidence l'effet mitogène des HSPG surexprimés dans des cellules de cancer de pancréas induit par les facteurs de croissance FGF2 et HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) [206]. Plusieurs études de structures cristallographiques ont pu mettre en évidence que la fixation sur les HSPG de protéines telles que le FGF1, le FGF2 ou l'antithrombine III (AT-III) implique quatre ou cinq résidus saccharidiques [207, 208]. Les sites de fixation sont spécifiques à chaque ligand, et certaines de ces interactions sont indispensables au fonctionnement de plusieurs systèmes ligand/récepteurs [209]. Par exemple, une étude a pu démontrer que la liaison de FGF2 à son récepteur n'était rendue possible qu'avec une fixation préalable à un HSPG [210]. Ainsi les chaînes d'heparane sulfate peuvent servir de véritable

plateforme d'ancrage pour différentes protéines et permettre la présentation de ces dernières à leurs récepteurs au niveau de la membrane plasmique, à la manière d'un corécepteur. Comme dit précédemment, la spécificité des interactions des protéines sur les HS-GAGs ajoutée à l'immense variabilité de ces chaînes modulables par les cellules elles-mêmes, permet de donner une fonction spécifique supplémentaire à celles initialement établies par leur séquence peptidique. Par conséquent ces fonctionnalités additionnelles permettent aux HSPG de réguler très finement diverses fonctions biologiques.

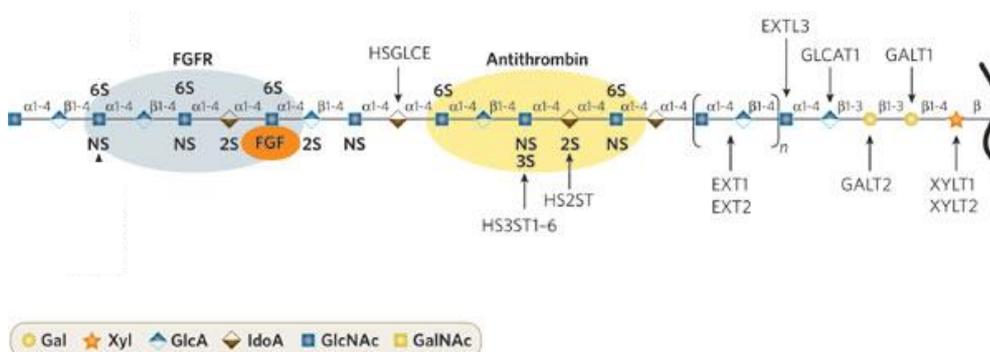


Figure 28 : Schéma de la structure d'un HS. La chaîne est fixée au noyau protéique par des résidus spécifiques, et contient des séquences spécifiques pouvant être modifiées par des acétylations ou sulfonations, et servant de plateforme à différents facteurs de croissance comme par exemple le FGF-2, D'après Esko et al., 2007.

Les HSPG sont divisés en trois grandes familles : les glypicans, les perlecans et les syndécans. Les glypicans jouent un rôle essentiel dans la morphogénèse du développement et semblent réguler notamment les voies de signalisation cellulaire des facteurs Wnt et Hedgehog. Les perlecans sont des PG sécrétés avec une structure modulable et possèdent plusieurs fonctions chez les eucaryotes. Les perlecans interagissent avec des molécules de la matrice extracellulaire, des facteurs de croissance, des récepteurs impliqués dans la croissance cellulaire et dans la différenciation cellulaire. Un déficit en perlecane entraîne chez l'homme une chondrodysplasie mortelle [211]. L'équipe de recherche de Y. Yamada a pu montrer que les perlecans modulent la signalisation du VEGF et qu'ils sont indispensables à

la vascularisation nécessaire à l'ossification endochondrale [212]. Au cours du chapitre suivant, nous allons nous intéresser plus particulièrement à la famille des syndécans.

2.1. La famille des syndécans

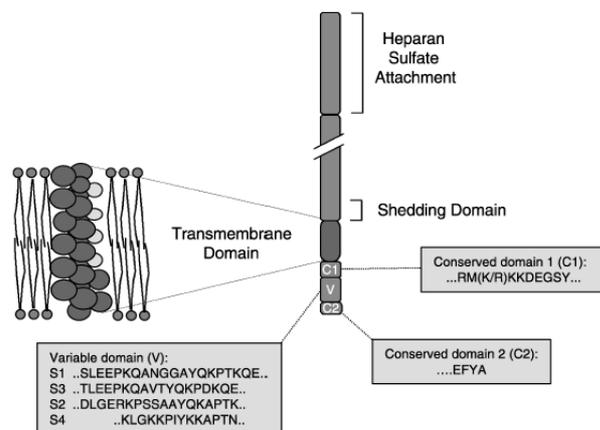
La famille des syndécans comprend chez les vertébrés quatre types de protéines : le syndécane-1 (CD138), le syndécane-2 (fibroglycan), le syndécane-3 (N-syndécane) et le syndécane-4 (amphiglycan). Chaque membre de la famille possède un profil d'expression tissu-spécifique, et s'exprime à différents moments au cours du développement (Tableau 5) [213, 214].

Protéoglycane	Expression	
	Embryon	Adulte
Syndécane-1	Pré-implantation, organogenèse	Cellules épithéliales, plasmocytes
Syndécane-2	Organogenèse	Endothélium, fibroblastes
Syndécane-3	Neuroectoderme, crêtes neurales	Crêtes neurales et dérivés du système nerveux central
Syndécane-4	Tissus matures	Ubiquitaire sur les cellules adhérentes

Tableau 5 : Expression des syndécans au cours du développement chez l'embryon et chez l'adulte.

Les gènes codant pour les syndécans sont issus d'une duplication d'un gène ancestral. Les domaines transmembranaires et certaines parties du domaine cytoplasmique furent très bien conservés au cours de l'évolution. Les ectodomains de chacun des membres n'ont guère d'homologie excepté les séquences consensus servant d'ancrage pour les chaînes de GAGs [214, 215]. Ce niveau de conservation suggère l'importance de la présentation de ces chaînes de GAGs. Ainsi, l'implication de la partie protéique de l'ectodomaine dans les fonctions biologiques a longtemps été négligée bien qu'il ait été démontré pour les syndécans 1 et 4 que des interactions protéine/protéine impliquaient des régions de l'ectodomaine [216, 217]. Le domaine cytoplasmique est relativement court (30 aa) et est constitué de deux domaines

conservés (C1 et C2) séparés par une région variable (V) spécifique du type de syndécan (Figure 29). Les syndécans sont des protéines à un seul domaine transmembranaire (type 1) dont le corps protéique fait de 20 à 45 kDa, et possède une séquence peptide-signal en N terminal. Le domaine transmembranaire est une petite séquence impliquée dans la formation de dimères, et il semble que les syndécans ne forment pas d'hétérodimères même dans des cellules exprimant plusieurs types de syndécans. En outre, en ce qui concerne le syndécan-4, il a été montré que son



homodimérisation était nécessaire à son activité biologique [218].

Figure 29 : Représentation schématique de la structure des syndécans. Les HS-GAGs sont attachées à la partie extracellulaire (Ectodomain), le domaine transmembranaire (transmembrane domain), C1 et C2 sont les parties conservées de la partie intracellulaire et la partie variable est symbolisée par V. D'après Rapraeger et al.,2001.

2.2. Syndécan-1 ou CD138

Des études cellulaires ainsi que des études sur des modèles animaux ont clairement pu mettre en évidence que CD138 occupait une place importante dans le développement de maladies inflammatoires, de cancers ou d'infections [219-222]. Concernant son implication en oncologie, le syndécan-1 est surexprimé à la surface de différents types de cellules cancéreuses. Comme précisé précédemment, il est utilisé comme biomarqueur pour le myélome multiple et les leucémies à plasmocytes, mais il est également exprimé dans plusieurs carcinomes :

- les tumeurs prostatiques [223]
- les cancers oto-rhino-laryngés [224, 225]
- le cancer colorectal (une faible expression épithéliale est associée à un stade clinique avancé) [226, 227]
- la carcinose ovarienne [228]
- le mélanome [229, 230]
- les cancers du sein triple négatifs (sa surexpression est associée à un mauvais pronostic) [231, 232].

Les cancers du sein triple négatif sont issus de cellules tumorales n'exprimant plus l'antigène Her2/neu et ou les récepteurs hormonaux habituellement utilisés comme cible thérapeutique. Le CD138 peut être utilisé par conséquent comme alternative pour des applications thérapeutiques ou diagnostiques, comme cela a été démontré dans une étude de faisabilité réalisée au sein de notre équipe de recherche [190].

Biologiquement, le syndécan-1 est impliqué dans la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'angiogenèse ou encore les phénomènes métastatiques. En effet, à l'instar des HSPG, les chaînes HS de CD138 vont interagir avec de nombreux facteurs de croissance comme le VEGF, le FGF-2, l'HGF ainsi que des composants de la matrice extracellulaire comme par exemple la fibronectine, le collagène ou N-CAM et P-CAM

(Figure 30) [233]. Les chaînes du syndécan-1 captent ces molécules et augmentent leurs concentrations à proximité de leurs récepteurs induisant l'activation des voies de signalisations et les réponses cellulaires qui en dépendent.

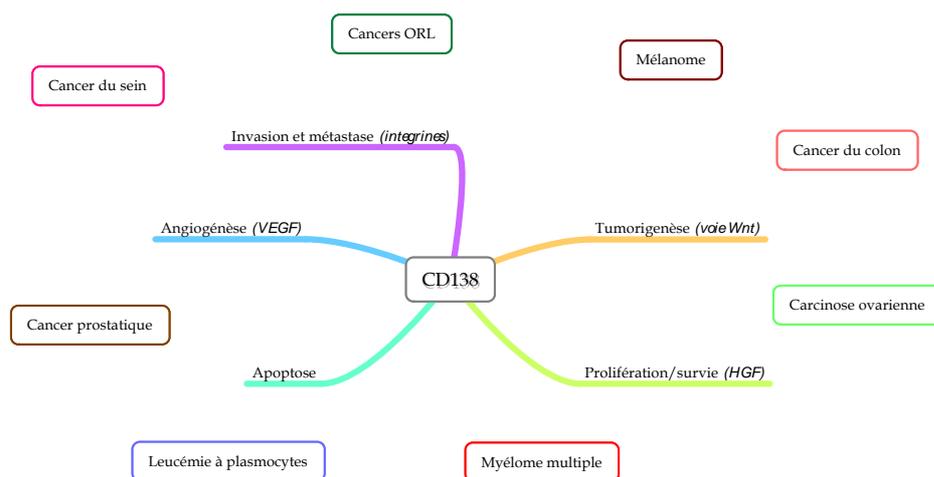


Figure 30 : Implication biologique de CD138 dans différents types de cancers.

Outre les formes membranaires il est important de préciser qu'il existe des formes solubles des HSPG et particulièrement des syndécans (Figure 31). Les syndécans sont clivés au niveau d'un domaine de la partie extracellulaire, très proche de la membrane plasmique. Ce clivage est réalisé par des métalloprotéinases (MMP) particulièrement contrôlées. Les mécanismes d'action de ces enzymes ne sont pas entièrement connus, cependant il a déjà été montré qu'une augmentation du clivage de CD138 s'effectue suite à un stress cellulaire (mécanique, hyper-osmolarité, choc thermique), par clivage protéique direct (thrombine, plasmine) ou encore *via* la voie JNK/SAPK [234]. De plus, les chaînes d'HS peuvent réguler le clivage de l'ectodomaine. En effet, la coupure des chaînes d'HS par des heparanases peut induire l'activation des MMPs responsables du clivage du corps protéique [235]. Le résultat de ce clivage est le relargage de la partie extracellulaire du syndécan. , le clivage de CD138 ajoute un niveau de régulation concernant les interactions HSPG/ligands en réduisant le nombre de molécules au niveau membranaire et en

libérant une forme soluble qui peut jouer le rôle de réservoir de facteurs de croissance en les séquestrant tout en les protégeant [236]

Ce mécanisme biologique de clivage a une grande importance dès lors que l'augmentation de la forme soluble du CD138 dans le microenvironnement tumoral peut jouer le rôle d'un régulateur intercellulaire, en activant notamment une angiogenèse de la tumeur et conduire au développement tumoral [237-240].

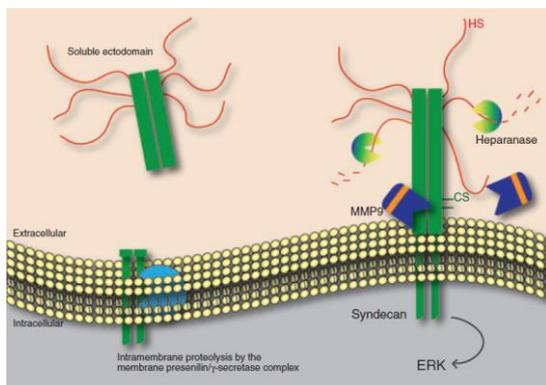


Figure 31 : Clivage d'un syndécan : de la partie extracellulaire par une MMP et des chaînes HS par une héparanase (D'après Manon-Jensen et al., 2010)

Le dosage de la forme soluble du syndécan-1 présente dans le sérum peut être utilisé comme facteur de pronostic comme cela a été montré avec succès dans le carcinome du tractus respiratoire ou le carcinome hépatocellulaire [241]. Néanmoins la fixation de la forme soluble lors de son ciblage pour la réalisation d'image TEP ou de radiothérapie pourrait potentiellement entraîner un bruit de fond supplémentaire d'une part, ou provoquer une irradiation des cellules sanguines d'autre part.

Conclusion :

La très grande variabilité de leurs structures leur permet d'interagir avec des protéines de différentes familles impliquées dans la réponse immunitaire, les phénomènes inflammatoires ou encore la progression tumorale

Le CD138 est par conséquent une protéine particulièrement intéressante pour toutes les notions de biologie et de mécanique cellulaire qui lui sont associées. De plus, son ciblage moléculaire dans le cadre de stratégies de diagnostic en imagerie médicale ou de thérapies à l'aide d'anticorps monoclonaux s'est révélé pertinent dans différents types de cancers et particulièrement dans le myélome multiple. L'exploration de la structure des glycosaminoglycanes pouvant, à terme, permettre un typage très fin des cancers, la découverte et la mise au point de nouvelles protéines de reconnaissance susceptibles de mettre en évidence l'expression d'isoformes spécifiques demeurent une réelle nécessité. A ce jour il n'existe que trois anticorps monoclonaux capables de reconnaître CD138. Par conséquent il peut être nécessaire de développer de nouveaux vecteurs... En outre, chacun d'eux se fixant sur le corps protéique de CD138, seule la quantité de chaîne peptidique présente à la surface membranaire ne peut être révélée.

VI. Les Affitins comme nouveaux vecteurs

1. Origines et caractéristiques

Les Affitins sont de petites protéines qui dérivent structurellement de la protéine Sac7d issue d'une archée hyperthermophile : *Sulfolobus acidocaldarius* [242]. Sac7d appartient à une famille de protéines contenant plusieurs membres, comme par exemple Sso7d, Ssh7b et Sis7 qui sont issues respectivement de *Sulfolobus solfataricus*, *Sulfolobus shibatae*, et *Sulfolobus islanditicus* [243-245]. Sac7d est formée d'une chaîne de 66 acides aminés (7 kDa) formant une structure appelée « SH3-Like » caractérisée par une architecture en tonneau formée par cinq feuillets beta coiffée par une hélice α [246]. Les membres de cette famille sont capables de reconnaître l'ADN double brin. Cette reconnaissance est rendue possible par la présence d'une surface de fixation d'environ 120 nm².

La fonction *in vivo* de Sac7d n'est pas encore connue, mais cette protéine est présente en grande quantité au niveau de la chromatine de *Sulfolobus* où elle se fixe de façon aspécifique et non coopérative protégeant ainsi l'ADN de la dénaturation thermique [247]. Cette protéine possède une stabilité thermique et chimique très importante, elle est en effet capable de résister à des pH de 0 à 13 ainsi qu'à de hautes températures (supérieures à 90,4°C à pH 5,5) [248]. En outre, elle est caractérisée par une haute solubilité dans les solutions aqueuses, un taux d'expression chez *E. coli* important (15 mg/L de culture), et enfin une structure monomérique simple compatible avec les technologies d'ingénierie utilisées dans les laboratoires, comme par exemple la synthèse peptidique sur phase solide [249]. La grande stabilité de cette protéine est un facteur particulièrement important pour la génération de banques combinatoires de variants en offrant un « réservoir de stabilité ». En effet l'introduction d'une diversité au sein d'une séquence peptidique peut potentiellement induire une déstabilisation importante de la protéine. Par

conséquent le choix d'une structure protéique initiale très stable permet de potentialiser, après sélection, l'obtention de variants dotés d'une stabilité (thermique et chimique) nécessaire à leur exploitation ou à leur utilisation pour des applications.

2. Génération de banques

Plusieurs études cristallographiques ont permis l'étude de la zone de fixation de Sac7d à l'ADN, ainsi il a été établi que 14 acides aminés étaient impliqués (Figure 35) [250, 251]. Ces études ont permis la randomisation raisonnée de ces acides aminés et ainsi la génération de banques combinatoires de variants.

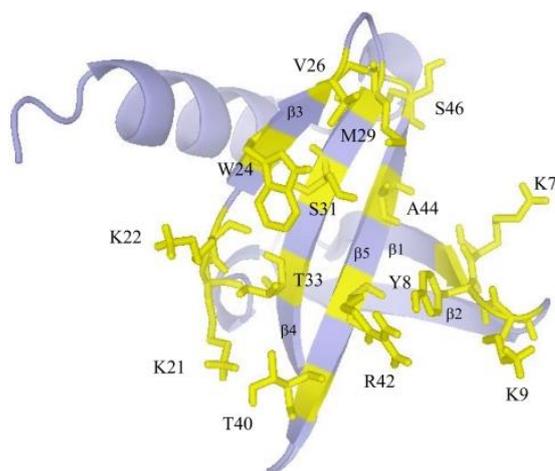


Figure 32 : Modélisation de la structure protéique de Sac7d sauvage (PDB code : 1AZP). Les résidus impliqués dans la fixation de l'ADN sont en jaune. *D'après Mouratou et al., 2007.*

Le procédé de génération des banques d'Affitins est détaillé au cours de travail (cf. matériels et méthodes)

3. Exemples d'applications des Affitins

Ces dernières années, F. Pecorari et B. Mouratou ont développé et validé les Affitins comme une stratégie originale de production de protéines affines. Différentes cibles ont déjà été atteintes, montrant qu'il est possible d'isoler des variants de Sac7d stables, solubles et avec un taux élevé de production chez *E.coli* (le plus souvent 10-100 mg/L de milieu de culture) capables de se lier de manière spécifique à leur cible avec des affinités de l'ordre du nanomolaire. Parmi ces cibles on peut citer des protéines bactériennes (PulD, PulG), humaines (IgG, IFN- γ), animales (lysozyme, ovalbumine), et des bactéries vivantes (*Staphylococcus aureus*).

3.1. Inhibition in vivo

Des Affitins dirigées contre le domaine N-terminal de la protéine PulD composante du canal de sécrétion de type II de *Klebsiella oxytoca* ont pu être isolées. Ces Affitins possèdent une affinité sous nano-molaires (140 pM) et une grande spécificité. En effet, les anti-PulD utilisés pour la détection de PulD en western blot ne détectent que la protéine PulD même si celle-ci est mélangée à de nombreuses protéines exogènes d'*E. coli*. Afin d'approfondir la compréhension du mode de reconnaissance, l'influence d'agents chaotropes et de détergents sur la fixation a été étudiée, de plus la cartographie d'épitope pour tenter de déterminer la partie de PulD reconnue a été réalisée.

Les résultats obtenues, notamment par des études de dichroïsme circulaire, montrent que les Affitins sont sensibles aux changements conformationnels induits dans PulD par un détergent zwitterionique couramment utilisé pour extraire la protéine PulD entière de la membrane externe. Par exemple, la perte de fixation dans l'urée est étroitement liée à la dénaturation du domaine isolé N-terminal de PulD et la fixation est aussi abolie par le détergent ZW3- 14 qui induit un changement de structure dans PulD. Les résultats montrent aussi que les 7 derniers acides aminés du

domaine N de PulD sont requis pour le repliement correct de l'épitope reconnu, mais qu'eux seuls ne suffisent pas à former l'épitope. Cette sensibilité à l'état conformationnel a permis d'utiliser les Affitins comme sonde de l'état natif de PulD et de définir un protocole d'extraction et de purification plus doux pour obtenir PulD native.

L'équipe de Frédéric Pécorari en collaboration avec l'équipe d'Antony Pugsley a pu montrer que trois Affitins différentes fusionnées avec PhoA ou MalE empêchent la multimérisation de PulD *in vivo* ce qui entraîne une perte de la fonction d'exportation. Dans deux cas, ceci est dû à la multimérisation induite par PhoA, puisque cet effet est absent lorsque les Affitins sont fusionnées à la protéine MalE qui est monomérique. Dans le troisième cas, MalE et PhoA interfèrent avec le protomère PulD en induisant probablement des contraintes stériques qui inhibent la multimérisation. Aucune des Affitins testées n'interagit avec PulD dans les régions impliquées dans l'association des protomères ou ne bloque le canal de sécrétion par la région du canal qui interagit avec l'exoprotéine à exporter. Ce travail a apporté aussi une meilleure compréhension du mécanisme de formation du canal de sécrétion. En effet, les travaux montrent que l'épitope reconnu sur PulD par les Affitins est présent sur les protomères non assemblés, et qu'ils ont donc acquis au moins partiellement leur conformation finale avant multimérisation et insertion dans la membrane externe.

3.2. Développement des Affitins comme biocapteurs fluorescents autonomes

Des biocapteurs autonomes peuvent être obtenus en intégrant dans un récepteur biologique dirigé contre un analyte cible, un fluorophore solvatochromique dont les propriétés d'émission sont sensibles à la nature de son environnement local. Le fluorophore traduit l'événement de la reconnaissance en un signal optique mesurable. On peut ainsi détecter et mesurer un analyte présent dans un mélange

biologique complexe. Cependant, l'intégration du fluorophore doit être faite à un endroit où il sera à la fois sensible à la fixation de la cible et ne perturbera pas l'affinité du récepteur.

Une stratégie développée dans le laboratoire d'Hughes Bedouelle pour générer des biocapteurs sans disposer de la structure de la protéine d'affinité consiste à changer individuellement les résidus des positions hypervariables en cystéine, puis à coupler cette cystéine avec un fluorophore, puis à classer les conjugués résultant par leur sensibilité relative qui implique à la fois leur affinité pour la cible et leur variation relative de signal de fluorescence.

Ce travail de balayage des positions par mutagenèse dirigée a été réalisé pour l'*Affitin* anti-lysozyme. La position 24 a permis d'obtenir le biocapteur le plus sensible avec une exaltation de fluorescence d'un facteur 8.8 lors de la fixation du lysozyme. Cette position est située dans la périphérie des résidus qui contribuent le plus à l'interaction avec le lysozyme (Figure 33). Ce biocapteur fluorescent autonome s'est montré opérationnel dans du sérum jusqu'à une concentration de 50%.

Ces travaux ont montré que les Affitins trouvent des applications dans le domaine des biocapteurs. Ils ont conforté l'approche développée au sein de l'équipe en validant qu'une grande partie des résidus randomisés pour créer des banques combinatoires de Sac7d sont mis à contribution pour fixer la cible.

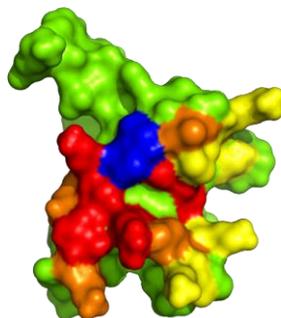


Figure 33 : Contributions des résidus à la fixation du lysozyme représentées sur la structure de Sac7d de type sauvage : forte (rouge), moyenne (orange), faible ou nulle (jaune). La position 24 est représentée en bleu

3.3. Développement des Affitins pour la préparation de puces à protéines

Un point clef de la conception de puces à protéines est la capacité à immobiliser des protéines d'affinité sur un support solide de telle façon qu'elles demeurent fonctionnelles. Dans ce but deux stratégies ont été développées (Figure 34) permettant des immobilisations à haute densité de façon orientée sur des lames de verre mettant en jeu des Affitins anti-lysozyme ayant des affinités d'environ 10 nM.

La première implique la synthèse d'adaptateurs bifonctionnels. Une ou deux unités NTA (acide nitrotriacétique) ont été conjuguées à deux acides phosphoniques qui interagissent fortement avec une monocouche de Zirconium. Ce travail a permis de démontrer qu'en utilisant cette surface fonctionnalisée avec le Zirconium il est possible d'avoir un ancrage orienté et réversible d'une Affitin portant une étiquette hexa histidine. Cette fixation a été suivie par résonance plasmonique de surface en utilisant du lysozyme marqué avec l'AlexaFluor 647.

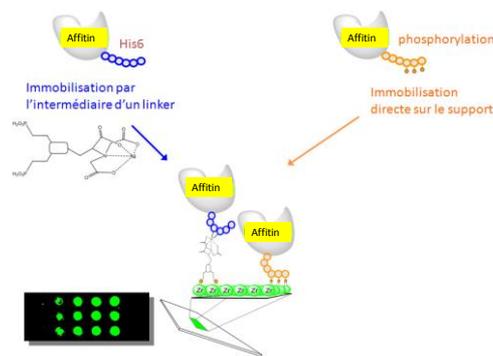


Figure 34: Deux approches pour immobiliser les Affitins sur lame de verre

Pour la deuxième approche une étiquette en C-terminal d'une Affitin anti-lysozyme de séquence DSDSSSEDE contenant 4 sérines dans un environnement acide a été insérée, ce qui favorise sa phosphorylation *in vitro* par la caséine kinase II. Le nanocluster de phosphates résultant permet d'immobiliser de manière spécifique et irréversible l'Affitin sur une lame recouverte de Zirconium. A nouveau la forte densité d'immobilisation de l'Affitin a été confirmée par la capture de lysozyme marqué avec l'AlexaFluor. La sensibilité de la puce était encore meilleure puisque le lysozyme a pu être détecté à une concentration de 50 pM en raison d'un bruit de fond exceptionnellement faible. Une sélectivité 65 fois supérieure à un support commercial couramment utilisé a été obtenue. Ce fort rapport signal sur bruit obtenu laisse espérer la possibilité d'observer des réponses de très faibles intensités (par exemple avec une protéine de capture de faible affinité) et qui serait masqué par un bruit de fond trop fort avec d'autres supports. En plus d'apporter des moyens efficaces d'immobiliser de façon orientée des protéines, ces travaux démontrent la robustesse des Affitins qui restent fonctionnelles malgré le passage par des étapes sèches pour la préparation des lames de verre fonctionnalisées.

VII. Les objectifs de la thèse

Les résultats précédemment obtenus au sein de notre équipe de recherche sur le ciblage de CD138 pour la réalisation d'imagerie phénotypique et de RIT à l'aide d'un anticorps entier, nous ont mené à nous intéresser spécifiquement au ciblage de cette glycoprotéine exprimée dans de nombreux carcinomes et notamment dans le myélome multiple. Parallèlement au développement des anticorps monoclonaux, de nouvelles stratégies de ciblage basées sur de petites protéines robustes ont été développées. Ces protéines « scaffolds » peuvent être générées contre des ligands spécifiques avec de hautes affinités autorisant leur utilisation pour des applications médicales ce qui était jusqu'alors irréalisable avec les anticorps et particulièrement pour la réalisation d'imagerie TEP. Les Affitins répondent aux critères nécessaires pour être utilisées en tant qu'agents de ciblage et de vectorisation d'isotopes

radioactifs. Elles représentent donc un nouvel outil de diagnostic ou de thérapie en médecine nucléaire.

Ainsi les objectifs de mon travail de thèse sont :

- Générer des Affitins anti-CD138 à l'aide du ribosome display
- Cribler la sélection d'Affitins contre CD138
- Caractériser les Affitins anti-CD138 (affinité, spécificité, stabilité)
- Explorer leur potentiel de ciblage du CD138 dans modèle murin de xéno greffe
- Réaliser un radio-marquage stable et non dénaturant d'une Affitin en ayant pour visée de réaliser des études de pharmacocinétique dans un modèle murin de xéno greffe de cellules cancéreuses humaines exprimant CD138 et à terme pouvoir effectuer des prises d'images en TEP.

Matériels et méthodes

I. Production de la protéine recombinante : CD138-β2m

Le gène codant pour le CD138 humain a été isolé par PCR à partir d'ADNc issus de la lignée U266. Les amorces utilisées ont permis d'amplifier la partie extracellulaire de CD138 (du résidu Gln23 à Gly254) (Tableau 5). Ce fragment a été inséré dans le vecteur d'expression pKCR6 permettant la production de CD138 sous forme de protéine de fusion couplée à la β2-microglobuline (β2m) humaine située en C terminal (Figure 35 A). Suite au clonage, le vecteur est transfecté dans la lignée CHO qui permet la production de CD138-β2m sous forme glycosylée. Après la production le surnageant de culture est récupéré et passé sur une colonne N-hydroxy-succinimide préalablement couplée à l'anticorps 6H4 (anti-β2m) afin de purifier spécifiquement la protéine produite (Figure 35 B). Suite à l'éluat de la colonne (100mM glycine, 0,5M NaCl pH3), l'éluât est dialysé dans du PBS (phosphate buffer salin : 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4) puis filtré avant d'être dosé au nanodrop et stocké à 4°C.

Séquences nucléotidiques	
Amorce sens	5'- CTC GAG ACA CAG ACC ATG CAA ATT GTG GCT -3'
Amorce anti-sens	5'- TCT AGA TCA TCC CAG CAC CTC TTT CCT GTC C -3'

Tableau 6 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour le clonage de CD138 humain

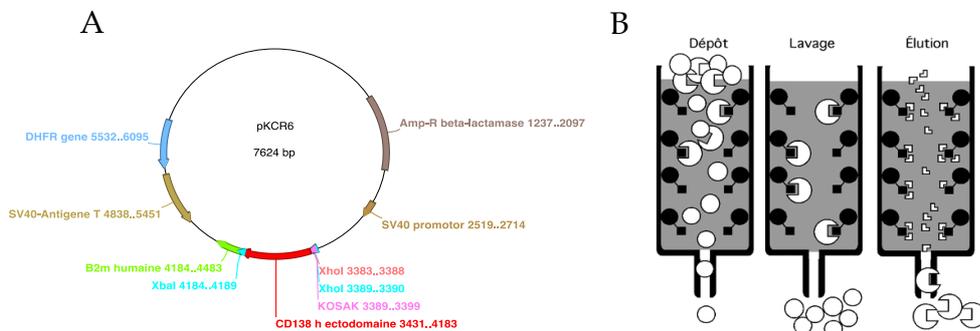


Figure 35 : A) Schéma du plasmide pKCR6 contenant le gène codant pour la protéine de fusion CD138-β2M. B) Etapes de purification par chromatographie d'affinité. 114

II. Utilisation des banques d’Affitins pour la sélection en ribosome display

1. Les banques d’Affitins

Les banques d’Affitins issues de Sac7d ont été synthétisées préalablement au laboratoire en utilisant différents oligonucléotides possédant des régions complémentaires dans les régions d’ADN codantes pour Sac7d et TolA (linker). La Figure 36 permet de visualiser l’emplacement de chaque amorce sur le gène codant pour les Affitins utilisées dans les sélections par ribosome display en prenant la construction de la banque L3 comme exemple.

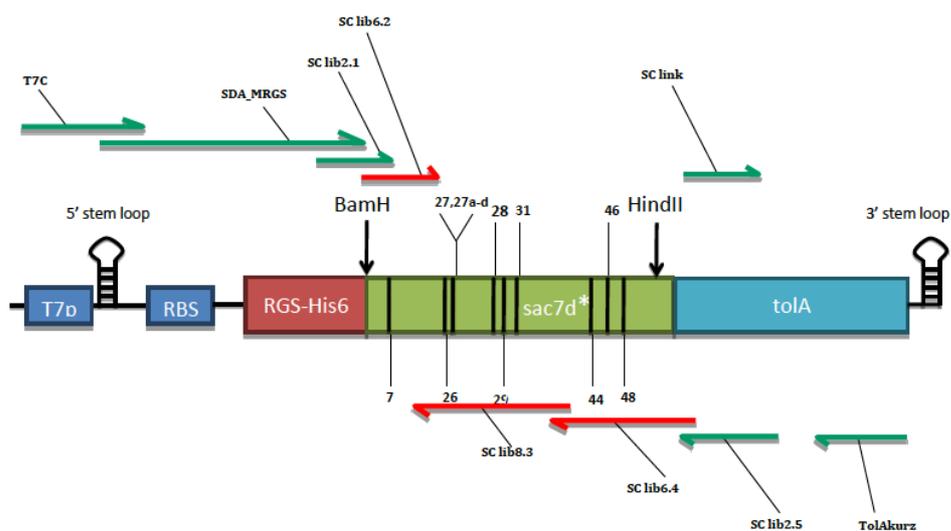


Figure 36 : Schéma de la construction de la banque L3, représentant les différentes amorces utilisées pour générer des mutations (rouge) et pour amplifier les fragments par PCR (vert).

Amorces	Séquence
ScepRev	TCGGCCCCGAGGCCATATAAAGCTTTTCTC
T7b	ATACGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGG
T7C	ATACGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTCCCTC
SDA-MRGS	AGACCACAACGGTTCCCTCTAGAATAATTTGTTAACTTAAAGAAGGAGATATCCATGAGAGGATCG
SC lib2.1	GGAGATATATCCATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGTCAAGGTGAAATTC
SC lib6.2	GGATCCGTCAAGGTGAAATTCNNSTATAAAGGCGAAGAAAAAGAAGTGACACTAGTAAGATC
SC lib8.3	CTTGCCGTGTGCTGCTAGGTAASNNCACSNNNSNNNSNNNSNNNSNNNSNNNACGCCAAACTTTCTTGAT- CTTACTAGTGCCACTTC
SC lib6.4	TAATAACTCTTTCGGGGCATCSNNCTCSNNCACSNNGCCACGGCCGGTCTTGCCGTTGCTGCTGATAGG
SC lib2.5	CCATATAAAGCTTTTCTCGCGTCCCGCAGCGCTAACATATCTAATAACTCTTTCGGGGGCATC
SC link	GCGGAACGCGAGAAAAAGCTTTATATGGCCTCGGGGGCC
ToIAKurz	CCGCACACCAGTAAGGTGTGCGGTTTCAGTTGCCGCTTCTTTCT
αssrA	TTAAGCTGCTAAAGCGTAGTTTTCGTCGTTTGGGACTA

Tableau 7 : Séquence des amorces utilisées pour la génération de la diversité au sein de la banque L3 et pour l'amplification des séquences par PCR

L'utilisation combinée des différents oligonucléotides dans des réactions de PCR a permis l'insertion de codons NNS (dégénérés) au sein de la séquence sauvage de Sac7d. L'amplification de ces différentes séquences a été réalisée par l'emploi d'oligonucléotides encadrant en 5' et 3' la séquence d'ADN codant pour Sac7d (Tableau 7). La diversité de chacune de ces banques est estimée à 10^{12} variants.

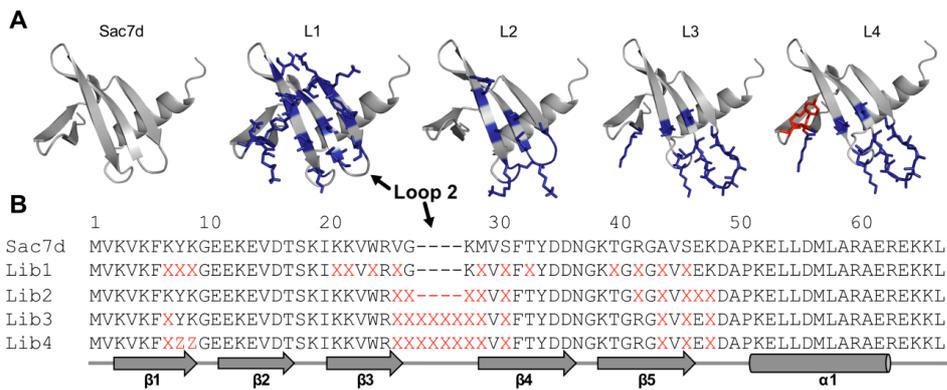


Figure 37 : Représentation des différentes banques d'Affitins utilisées lors de la sélection contre CD138 D'après S. Pacheco 2013.

L'utilisation de différentes séquences d'oligonucléotides a autorisé la construction de différentes banques qui sont représentées dans la Figure 37. L'ensemble de ces banques est utilisé par la suite afin de potentialiser la probabilité d'obtenir des Affitins contre CD138.

2. Sélection par ribosome display

2.1. Biotinylation des protéines utilisées pour la sélection par ribosome display

La biotinylation de CD138- β 2m et β 2m est réalisée en incubant les protéines à une concentration de 10 μ M avec 20 excès molaire de sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate (Pierce, Rockford, IL) dans du PBS à 4°C pendant vingt minutes. La réaction de biotinylation est arrêtée par l'élimination du tampon PBS et la reprise des protéines dans du TBS (Tris Buffer Salin : 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) à l'aide de colonnes de dessalage (Pierce 89862).

Une approximation du nombre de biotines par protéine est déterminée par un test HABA (4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid) (Sigma, St Louis MO). Une solution d'HABA à 0,01 M est préparée et la DO est mesurée à 500 nm : A1. La solution de la protéine biotinylée est diluée au 10^{ème} dans la solution d'HABA, puis la DO à 500 nm de cette solution est mesurée : A2. A partir de la formule ci-dessous une approximation du nombre de biotine/protéine est calculée : $((0,9 * A1) - A2) / (34000 * 0,1) * (10 / (\text{Concentration molaire de la protéine biotinylée}))$. (34000 correspond au coefficient d'extinction molaire du complexe HABA-Biotine et il est multiplié par 0,1 pour tenir compte de la longueur du trajet).

2.2. Validation de l'intégrité des protéines biotinylées

La validation est effectuée par la reconnaissance des protéines biotinylées par leurs anticorps respectifs : B-B4 (Diaclone Research, Besançon, France) pour CD138 et 6H4 (généralisé au sein du laboratoire) pour la β 2m. Les puits d'une plaque Nunc Maxisorb sont enduits de streptavidine (Sigma) avec une concentration finale de 100 nM (incubation 1 heure à température ambiante). Suite à trois lavages en PBS-BSA 0,1% (volume : 300 μ L), les puits sont saturés en PBS-BSA 0,5% (volume : 100 μ L) et la plaque est incubée 1 heure à température ambiante. Les puits sont de nouveau lavés trois fois en PBS-BSA 0,1%, et les protéines biotinylées sont incubées pendant 1 heure à température ambiante dans les puits à une concentration finale de 140 nM dans 50 μ L de PBS. Après trois lavages en PBS-BSA 0,1% les anticorps B-B4 ou 6H4 dilués dans du PBS à une concentration finale de 20 μ g/mL sont incubés dans les puits contenant le CD138 ou la β 2m biotinylées. Après une heure d'incubation à température ambiante, les puits sont lavés trois fois en PBS-BSA 0,1%, et la présence des anticorps B-B4 ou 6H4 est révélée à l'aide d'un anticorps anti-souris couplé à l'enzyme horse radish peroxydase (HRP) dilué dans du PBS à une concentration finale de 5 μ g/mL. Après 6 lavages en PBS-BSA 0,1%, la présence de l'anticorps secondaire est révélée à l'aide d'une solution d'OPD (o-Phenylenediamine) à une concentration finale de 1 mg/mL. La Figure 38 montre le schéma de montage de l'ELISA.

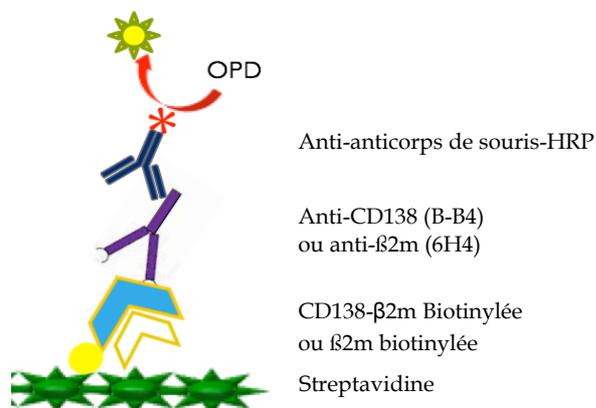


Figure 38: Schéma représentant la configuration utilisée pour la validation des protéines biotinylées par l'ELISA.

2.3. Traduction *in vitro* des ADN codant pour les banques de Sac7D

La traduction *in vitro* à partir des banques d'ADN codant pour les Affitins est réalisée en utilisant le système S30 de traduction isolée à partir de *Escherichia coli*. Des tests préalables sont nécessaires afin de déterminer le temps de réaction optimum pour la formation du complexe ternaire (ribosome/ARN/protéine naissante). En effet, la préparation du S30 ainsi que du prémix Z sont des étapes relativement délicates, et de petites variations de concentrations de leurs composants peuvent être à l'origine de temps de réaction variables. Les réactions de traduction sont effectuées dans des tubes eppendorf pendant une durée de 10 minutes à 37°. Le mix réactionnel a pour volume final 26,5 µL et contient les composants suivants : 11,5 µL de prémix Z (50 mM de Tris-HOAc à pH=7,5, 30 mM NH₄OAc, 12,3 mM Mg(OAc)₂, 0,35 mM, de chaque acide aminé, 2 mM d'ATP, 0,5 mM GTP, 1mM cAMP, 0,5 mg/mL de tARN de *E. coli*, 20 µg/mL d'acide folique, 100 mM KOAc, 30 mM d'acétylphosphate), 12,5 µL de S30 et 0,5 µL de méthionine à 200 mM. Une fois le mix réactionnel prêt, 1 µL à 2,5 µg/µL d'ARNm sont ajoutés, suivi d'une homogénéisation douce. Le tube est ensuite placé à 37°C pendant 10 minutes.

2.4. Arrêt de la traduction

Toutes les manipulations décrites ci-dessous doivent être réalisées à 4°C (sur glace ou en chambre froide). La traduction est stoppée par l'ajout de Mg(OAc)₂ à une concentration finale de 50mM. Un volume de 121 µL de tampon d'arrêt refroidi à 4°C est ajouté au volume de traduction (WBT 50 mM Tris-HOAc à pH=7,5, 150 mM NaCl, 50 mM Mg(OAc)₂, 0,1% de Tween 20 et 0,5% BSA. Le mix réactionnel est ensuite centrifugé à 20 000xg à 4° pendant 5 minutes afin d'éliminer les produits insolubles.

2.5. Sélection des binders : pré-panning et panning

140 μ L de traduction stoppée sont prélevés et placés dans un premier temps dans le puits de pré-panning contenant la β 2m biotinylée. Cette étape permet l'élimination des variants de Sac7d possédant une affinité pour les molécules autres que la cible d'intérêt présente dans le puits de sélection (exemple : BSA, streptavidine, neutravidine, ou la β 2m ayant permis ici la purification de CD138). La plaque est recouverte d'un plastique, et est placée sur un agitateur durant 1 heure. La seconde étape consiste à pipeter le volume contenu dans le puits de pré-panning, et à le transférer dans le puits de panning contenant la cible d'intérêt. La plaque est de nouveau placée à l'agitation à 4°C pendant 1 heure. Nous procédons ensuite à des étapes de lavages.

La sélection des binders peut être réalisé selon deux procédés : 1) les cibles biotinylées sont immobilisées dans des puits (plaque Maxisorp Nunc Naperville, IL) préalablement coatés en streptavidine ou neutravidine (Sigma, concentration finale : 100 nM, incubation 1 heure à température ambiante) et saturés en TBS-0,5%BSA (sur la nuit à 4°C, dans un volume de 300 μ L) ou 2) les cibles biotinylées sont incubées avec les complexes ternaires en solution puis sont capturées à l'aide de billes enduites en streptavidine (Roche) ou streptaDivin (Ademtech) et saturées en TBS-BSA 0,5%.

2.6. Lavage des puits de sélection

Le lavage est réalisé avec du tampon de lavage WBT et permet d'éliminer les Affitins ne possédant pas une affinité intéressante pour la cible d'intérêt. Afin de conserver le maximum de diversité et de ne pas risquer de perdre des variants qui sont peu représentés dans la population, il est primordial d'adapter la stringence du lavage (le temps et le nombre de lavage) en fonction du nombre de tours de sélection

effectué. Par exemple, six lavages de quelques secondes sont suffisants pour le premier tour de sélection. Au fil des tours de sélection, l'affinité des binders pour la cible va augmenter, les temps de lavage pouvant être augmentés jusqu'à 30 minutes afin de sélectionner les meilleures affinités.

2.7. Elution des ARN

Suite au lavage, l'élution des ARN par la dissociation des complexes ribosomiques retenus dans le puits est réalisée par l'ajout de 200 μL /puits de tampon d'élution contenant de l'EDTA à 4°C (50 mM Tris HOAc à pH=7,5, 150 mM NaCl, 20 mM d'EDTA et 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ARN de *S. cerevisiae*). Une incubation de 10 minutes est faite en chambre froide avant le prélèvement du volume dans le puits et la purification des ARNm.

2.8. Purification des ARNm

La purification des ARNm élués est effectuée à l'aide du kit Roche High pur RNA isolation (ref : 1828665) en suivant les recommandations du fournisseur.

2.9. Rétro-transcription

La RT des ARNm est réalisés en utilisant le kit Fermentas en suivant les recommandations fournies. L'hybridation du primer ScepRev (0,2 μL à 100 μM) au fragments d'ARN constitue la première étape : les 10,8 μL d'ARN élués et purifiés sont incubés 5 minutes à 70 °C puis mis dans la glace. Nous procédons ensuite à la rétro-transcription en ajoutant 1 μL d'enzyme Revert Aid Minus H RT (200 U/ μL Fermentas), 0,5 μL de Ribolock (Fermentas) et dNTPs à 10 mM pendant 60 minutes à 42°C puis 10 minutes à 70°C. Après réaction, 5 μL du mix réactionnel sont utilisés afin d'effectuer la PCR.

2.10. RT- PCR

La PCR est réalisé avec la polymérase Vent (Biolabs) en présence de 4 % final de DMSO, 4 mM de Mg²⁺, 5 mM de dNTP et de 0,125 μM des amorces SDA-MRGS et ScepRev pour un volume final de 50 μL.

Détails du programme de cycle :

- 5' à 90°C
 - 30'' à 95°C
 - 30'' à 63°C
 - 30'' à 72°C
 - 5' à 72°C
 - 4°C → ∞
- } X cycles en fonction du tour de sélection

2.11. PCR d'assemblage

Une dernière réaction de PCR consiste à rajouter une portion d'ADN supplémentaire en 3' codant pour la protéine TolA et ne contenant pas de codon stop. Ainsi, lors de la traduction de l'ARN par le complexe ribosomique la protéine naissante (l'Affitin) effectue un repliement à distance du ribosome. La Figure 39 montre la réaction de PCR d'assemblage ainsi que la formation du complexe ternaire suite à la traduction de l'ARN. TolA est mis en excès (320 ng) par rapport à la quantité de variant (300 ng) dans un mix réactionnel contenant 5mM final de chaque dNTP, 4 % final de DMSO, 0,125 μL des amorces T7b et TolAKurz pour un volume final de 100 μL. La polymérase Vent est utilisée pour faire la PCR avec le programme suivant :

- 5' à 95°C
 - 30'' à 95°C
 - 30'' à 45°C
 - 50'' à 72°C
- } 8 cycles
-
- 30'' à 95°C

- 30'' à 55°C 30 cycles
- 50'' à 72°C
- 5' à 72°C
- 4°C → ∞

Le produit de PCR est contrôlé sur un gel d'agarose 1,5 %, et une bande de 635 bp est attendue.

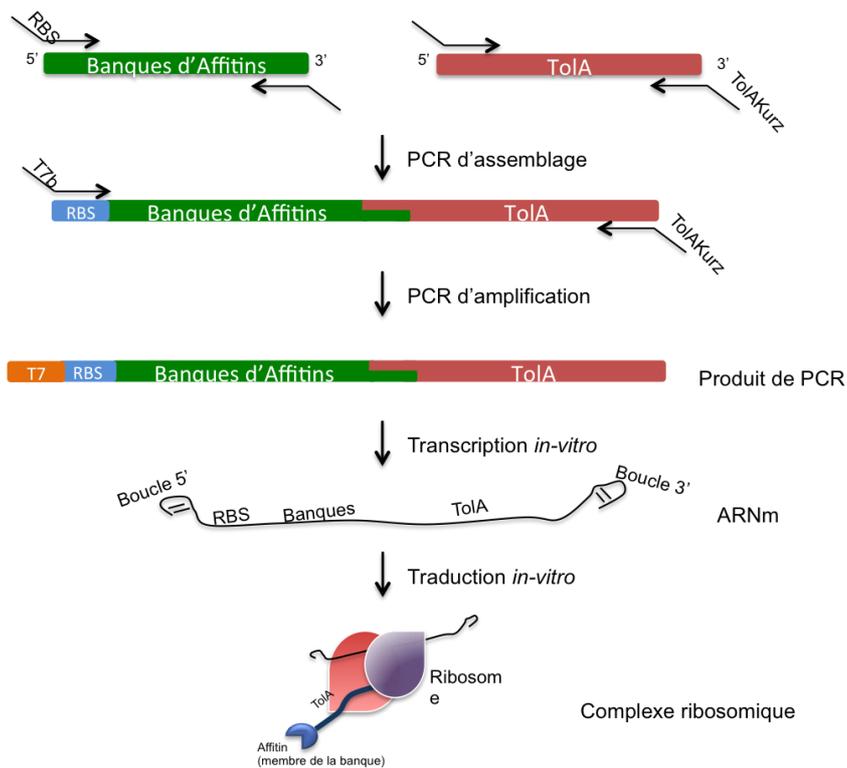


Figure 39: Schéma illustrant la PCR d'assemblage et la formation du complexe ternaire à partir de l'ARN

3. Tours de sélections par Ribosome Display de 1 à 7

Le premier tour de sélection est réalisé avec l'utilisation de puits d'une plaque maxisorp enduits en streptavidine. Suite à la fixation des protéines biotinylées en fond de plaque, les complexes ternaires issues de traduction des ARN de chacune

des banques sont incubés dans un premier temps dans le puits dit de « pré-panning » contenant la β 2m biotinylée, puis dans un second temps dans le puits contenant la cible d'intérêt CD138. L'objectif du « pré-panning » est d'appauvrir le pool de sélection d'éventuels ligands de β 2m ou de tout autre épitope présent dans les tubes de sélections, par exemple, la streptavidine. Ce premier tour permet l'amplification des banques de façon indépendante. Suite à cette étape un mélange équimolaire des ARN des banques issues du premier tour de sélection est réalisé afin de poursuivre le reste de la sélection avec ce pool.

Les tours de sélection suivants sont réalisés à l'aide de billes magnétiques enduites en strepta*Divin* ou streptavidine (une utilisation alternée de ces deux types de billes permet d'éviter la sélection d'Affitins « anti-bille »). Les complexes ternaires sont mis au contact des protéines en solution puis les complexes ternaires + protéines biotinylées sont capturés à l'aide des billes. Plusieurs étapes de lavages sont effectuées avant l'élution des ARN qui est réalisée à l'aide d'une solution d'EDTA. En effet l'EDTA va chélater le Mg^{2+} présent dans la solution induisant le relargage des ARN par déstructuration des complexes ternaires. Le tour n°7 est réalisé en parallèle avec une sélection négative (incubation du pool de sélection en l'absence de protéine biotinylée). La Figure 40 présente le plan de sélection utilisé pour les tours de sélection de 1 à 7, et le Tableau 8 regroupe les paramètres de la sélection.

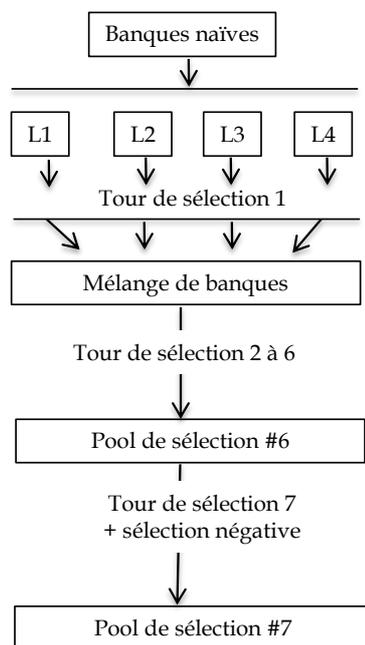


Figure 40 : Représentation du schéma de sélection par ribosome display utilisé contre

Tour de sélection	Type	Concentration des cibles (CD 138-β2m biot et β2m biot)	Temps de lavages	Nombre de cycles de PCR
1	Plaques	100 nM	8 x 30 secondes	
2	Billes streptaDivin (Ademtech)	100 nM	10 x 2 minutes	35
3	Billes streptavidine (Roche)	100 nM	10 x 2 minutes	30
4	Billes streptaDivin (Ademtech)	100 nM	10 x 5 minutes	25
5	Billes streptavidine (Roche)	100 nM	10 x 10 minutes	25
6	Billes streptaDivin (Ademtech)	100 nM	10 x 10 minutes	25
7	Billes streptavidine (Roche)	100 nM	10 x 10 minutes	25

CD138

Tableau 8 : Récapitulatif des paramètres de sélection utilisés lors des différents tours de ribosome display.

III. ELISA de contrôle de l'enrichissement en Affitins anti-CD138

Afin d'évaluer la présence d'Affitins possédant une spécificité de reconnaissance de la cible d'intérêt au sein du pool de sélection nous réalisons un test ELISA dans les mêmes conditions que le ribosome display. 300 ng d'ADN de la RT-PCR du tour n°7 sont utilisés afin de réaliser une PCR d'assemblage avec le linker TolA ainsi que le promoteur T7b. Les ARNm obtenus après transcription sont traduits *in vitro* durant 1 heure à 37°C afin d'obtenir une traduction complète du pool de sélection. Suite à cette étape de traduction nous réalisons un ELISA selon deux techniques (Figure 41) :

1. reconnaissance des protéines d'intérêt préalablement fixées en fond de puits
2. technique reposant sur la formation du complexe CD138-Affitin en solution préalablement à sa capture *via* la streptavidine déposée en fond des puits.

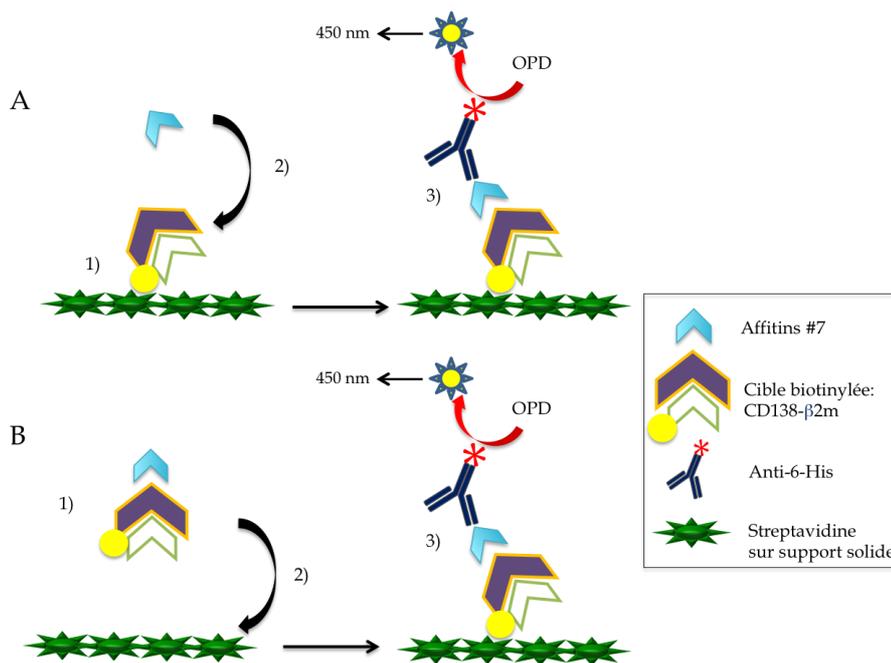


Figure 41 : Schéma des techniques d'ELISA utilisées. A) la cible biotinylée est fixée sur le support solide via la streptavidine puis les Affitins sont incubées avec la cible avant d'être révélées à l'aide d'un anticorps anti-6-His. B) Le complexe cible biotinylée/Affitin est formé en solution avant d'être capturé sur le support solide enduit avec la streptavidine, l'anti-6-His permet ensuite la révélation de l'Affitin.

1. Technique n°1 : ELISA en sandwich réalisé avec protéines fixées sur support solide enduit streptavidine

Les puits d'une plaque maxisorb sont enduits de streptavidine avec une concentration finale de 100 nM (incubation 1 heure à température ambiante). Suite à trois lavages en PBS-BSA 0,1% (volume : 300 µL), les puits sont saturés en PBS-BSA 0,5% (volume : 100 µL) et la plaque est incubée 1 heure à température ambiante. Les puits sont de nouveau lavés trois fois en PBS-BSA 0,1%, et les protéines biotinylées sont incubées pendant 1 heure à température ambiante dans les puits à une concentration finale de 140 nM dans 100 µL de PBS. Après trois lavages en PBS-BSA 0,1%, 100 µL de produit de traduction sont déposés dans les puits et incubés pendant 1 heure à température ambiante sous agitation douce. Suite à l'incubation, les puits sont lavés 3 fois avec du PBS-BSA 0,1%, et l'anticorps anti-RGS-(His)₆ couplé à

l'enzyme HRP (Qiagen) dilué au 5000^{ième} est incubé 1 heure à température ambiante sous agitation. L'excès d'anticorps est éliminé par 6 lavages avec du PBS-BSA 0,1% et enfin, 100 µL d'une solution d'OPD dilué dans l'eau à une concentration finale de 1 mg/mL est ajouté dans chaque puits. Il s'agit du substrat de l'enzyme HRP qui permet d'obtenir une coloration lue à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA.

2. Technique n°2 : ELISA en sandwich réalisée avec une complexation des Affitin/protéine biotinylées en solution, puis capture via streptavidine

Cent microlitres de produit de traduction sont déposés dans des tubes et incubés avec les protéines CD138-β2m-Biotinylée ou β2m-Biotinylée à une concentration finale de 140 nM. Après une incubation d'une heure à température ambiante sous agitation, le mix réactionnel est placé dans des puits préalablement cotés avec de la streptavidine et saturés avec du PBS-BSA à 0,5%. Suite à l'incubation (1 heure, température ambiante, sous agitation), les puits sont lavés 3 fois avec du PBS-BSA 0,1%, et l'anticorps anti-RGS-(His)₆ couplé à l'enzyme HRP (Horse Raddish Peroxydase, Qiagen) dilué au 5000^{ième} est incubé 1 heure à température ambiante et sous agitation. L'excès d'anticorps est éliminé par 6 lavages avec du PBS-BSA 0,1% et enfin, le substrat de l'enzyme HRP (OPD), est ajouté pour avoir une coloration lue à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA.

IV. Clonage du pool d'Affitins suite à la sélection

1. PCR d'amplification du pool de sélection

Le pool de sélection d'intérêt est amplifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques des régions 3' et 5' des Affitins afin d'augmenter la quantité de matériel génétique et d'insérer les sites de restrictions enzymatiques nécessaires au clonage.

Mix réactionnel :

- 1 μL de matrice de RT-PCR
- 5 μL de tampon thermopol 10X
- 0,5 μL de dNTP à 10 μM chacun
- 0,5 μL de SClib 2.5 à 100 μM
- 0,5 μL de SDAM/RGS à 100 μM
- 1 μL de Vent polymerase
- 42 μL d'eau

Programme thermocycleur :

95°C 60''	
95°C 30	} 30 X
55°C 30''	
72°C 30	
72°C 5''	
14°C +∞	

2. Dessalage de la PCR

Après réaction, les produits de la PCR sont dessalés à l'aide du kit Promega Wizard SV Gel et PCR Clean-up system (#A9281), puis élués dans 50 μL d'eau avant d'être quantifiés au nanodrop.

3. Digestion enzymatique des produits de PCR

Préparation du mix réactionnel suivant dans un tube eppendorf de 1,5 mL :

- 10 μL de PCR dessalée (environ 100 à 200ng)
- 2 μL de tampon BamHI 10X
- 0,5 μL de BamHI (10U/ μL)
- 1 μL de HindIII (10U/ μL)
- 6,5 μL d'eau

Incubation pendant 1,5 heure à 37°C

4. Purification sur gel d'agarose

Afin d'éliminer les fragments issus de la digestion enzymatique, les produits de digestion sont déposés dans un gel d'agarose de 1%, puis soumis à une tension

électrique pour les faire migrer en fonction de leur taille moléculaire. La bande de 240 pb est excisée du gel et l'ADN en est extrait à l'aide du kit Promega® Wizard SV gel et PCR Clean-up system (#A9281) puis élué dans 50 µL d'eau.

5. Ligation des inserts dans le vecteur d'expression pFP1001

Le mix de ligation est préparé dans un tube eppendorf de 1,5mL :

- 100 ng de vecteur pFP1001 prédigéré par BamHI et HindIII
- 60 ng d'insert purifié sur gel (soit un ratio V/I de 3/1)
- 1 µL de tampon Ligase T4 10X
- 0,5 µL de Ligase (5 Weiss U/µL, Fermentas)
- eau QSP 10 µL

Incubation de la ligation 30 minutes à température ambiante (un contrôle négatif de la réaction est réalisé en remplaçant l'insert par de l'eau). La Figure 42 illustre le plasmide pFP1001 utilisé pour le clonage des Affitins en sortie de sélection.

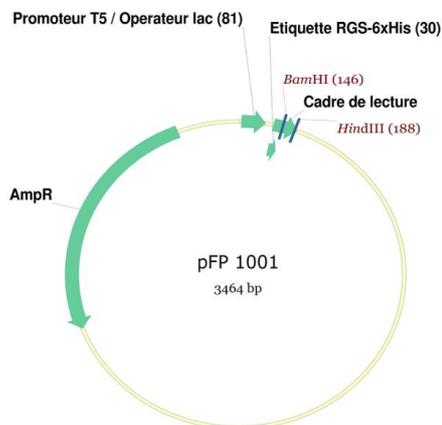


Figure 42 : Plasmide pFP1001 utilisé pour l'expression des Affitins chez *E.coli*.

Le vecteur d'expression utilisé possède le tag 6-His ainsi que le promoteur et le terminateur nécessaires à l'expression de protéines exogènes au sein d'organismes procaryotes. Le tag 6-His permettra la purification des Affitins à l'aide d'une colonne d'affinité (Ni-NTA) et leur détection avec l'aide d'anticorps anti-6His.

6. Transformation de la ligation dans les bactéries DH5 α I^q

Préparation du mix réactionnel suivant dans un tube eppendorf 1,5 mL

- 10 μ L de produit de ligation
- 100 μ L de cellules compétentes chimiques DH5 α I^q
- Mélanger en tapotant le tube
- Incuber dans la glace pendant 5 minutes
- Choc thermique : incubation 50 secondes à 42°C
- Incuber 2 à 3 minutes dans la glace
- Ajouter 800 μ L de LB (milieu Luria-Bertani : 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levures, 10 g de NaCl, eau ultra pure qsp 1 L)
- Incuber 45 minutes à 37°C sous agitation
- Centrifuger 5 minutes à 4500xg
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot cellulaire dans 100 μ L de milieu
- Etaler les bactéries dans une boîte LB avec antibiotiques (ampicilline et kanamycine)
- Incuber \approx 16 heures à 37°C

V. Production et purification des Affitins issues des sélections

Suite à la sélection, le pool d'Affitins est cloné dans un vecteur d'expression puis transformé dans des bactéries compétentes. Après leur étalement sur milieu sélectif, chaque colonie isolée est repiquée et placée dans un puits d'une plaque deepwell 96 puits.

1. Constitution d'une plaque mère deepwell

- Pipetter 1,4 mL de milieu de culture LB supplémenté en ampicilline (100 µg/mL), en kanamycine (25 µg/mL) et avec 1% de glucose dans chaque puits d'une plaque deepwell 96 puits.
- Inoculer chaque puits avec une colonie isolée sur boîte à l'aide d'un cône de pipette stérile
- Placer la plaque dans un incubateur à 37°C avec agitation (450 rpm) sur la nuit

Cette plaque constitue une plaque mère, elle permet l'ensemencement de cultures ou de pré-cultures, elle est conservée à -80°C pour servir de sauvegarde (après ajout de glycérol).

2. Production d'Affitins en plaque deepwell 24 puits

Des plaques deepwell 24 puits sont utilisées afin de réaliser des productions de nombreuses Affitins différentes dans 6,5 mL de milieu de culture.

- Pipetter 5 mL de milieu de culture LB supplémenté en ampicilline (100 µg/mL), en kanamycine (25 µg/mL) et avec 0,1% de glucose dans chaque puits d'une plaque deepwell 24 puits
- Inoculer chaque puits de la plaque avec 1,5 mL de pré-culture préparée la veille en milieu sélectif à partir de la plaque mère
- Incuber la plaque à 37°C avec agitation (180 rpm) afin d'atteindre une DO_{600nm} de 0,8
- Ajout d'IPTG (500 µM final) pour induire la production de la protéine d'intérêt
- Incubation de la plaque pendant 6 heures à 30°C sous agitation à 180 rpm
- La plaque deepwell est centrifugée à 3500 rpm pendant 10 minutes
- Le milieu est retiré par aspiration et les culots bactériens sont congelés à -80°C

3. Purification des Affitins issues de la production en plaque deepwell 24 puits

3.1. Lyse des culots

- La plaque est retirée du congélateur -80°C et les culots sont décongelés sur glace
- Reprise des culots dans 500 µL de tampon de lyse

Tampon de lyse :

- Solution de BugBuster® (Novagen® 10X Protein Extraction Reagent N° 70921-50mL) à 0,2X diluée dans du TBS₅₀₀ 1X avec 25 mM d'imidazole à pH=7,4
- DNase à 5 µg/mL
- Agitation forte pendant 45 minutes à température ambiante
- Sonication (9 watts, amplitude 80%, pulseur 6) pendant 10 minutes
- Centrifugation à 11 800xg 4°C, durant 20 minutes
- Prélèvement du surnageant pour purification sur colonne de nickel (Chelating Sepharose Fast-Flow, GE).

3.2. Purification sur colonne de nickel

- 400 µL de résine préalablement chargée en Ni²⁺ sont déposés dans chaque colonne du système NucleoVac 96 de chez Macherey-Nagel®
- Equilibration de la résine en faisant passer 3x250 µL de tampon TBS₅₀₀ 25 mM d'imidazole à travers les colonnes par aspiration
- Dépôt des surnageants d'extraction en haut de chaque colonne et laisser incubé pendant 15 minutes

- Passage de l'excès de liquide à travers les colonnes par aspiration
- Lavage des colonnes en faisant passer 3x1000 µL de tampon TBS₅₀₀ 25 mM d'imidazole à travers les colonnes par aspiration
- Placer une nouvelle plaque sous les colonnes et distribuer 150 µL de TBS₅₀₀ 1X avec 250 mM d'imidazole et incubé pendant 5 minutes
- Procéder à l'élution des protéines en faisant passer l'excès de liquide à travers la colonne par aspiration douce

3.3. Electrophorèse SDS-Page

Les éluats protéiques sont préparés en tampon de charge dénaturant et réducteur : Tris 60 mM pH 6,8, SDS 2%, glycerol 2%, bêta-mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 0,01%, puis incubés à 100°C pendant 5 minutes. 20 µL de solution sont ensuite déposés sur un gel d'acrylamide 15%. La migration est réalisée en solution de migration : Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3 à 50 mA / gel constant dans un système d'électrophorèse Mini-protean (Biorad).

VI. Production d'une Affitin sous forme de protéine de fusion couplée à la GFP

1. Sous clonage de l'Affitin dans le vecteur pFP1300 :

Le mélange réactionnel suivant est réalisé :

- 10 µg de plasmide pFP1001 contenant l'insert codant pour l'Affitin A6 ou A872 sont utilisés afin de réaliser une digestion enzymatique à l'aide d'enzymes encadrant la région codante (Figure 43 A).
- 35 µL de tampon Bam HI
- 3 µL de Bam HI 50 U/µL
- 6 µL de Hind III 50U/µL

- de l'eau est ajoutée qsp 350 μ L
- incubation du mélange à 37°C pendant 1 heure.

Une purification de l'insert correspondant à l'Affitin est réalisée selon un procédé déjà décrit précédemment.

2. Ligation dans le vecteur pFP1300

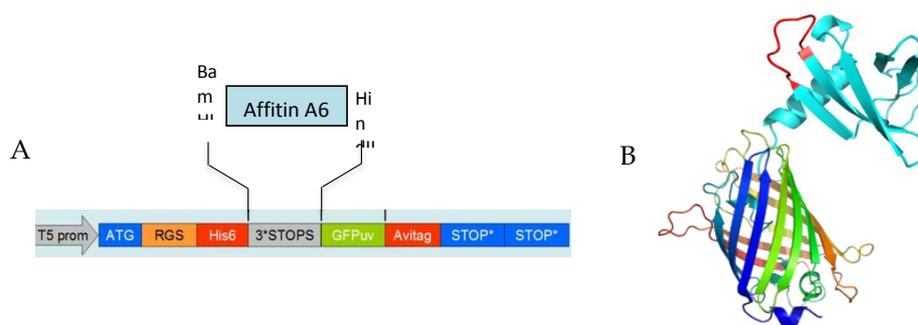
- 100 ng de vecteur
- 10 ng d'insert
- 1 μ L de tampon de ligation 10X
- 1 μ L de T4 DNA ligase
- ajout d'eau qsp 10 μ L
- incubation 1 heure à température ambiante, puis inactivation de la ligase avec une incubation de 10 minutes à 65°C
- Digestion des vecteurs vides à l'aide de KpnI (ajout d'1 μ L d'enzyme 50U/ μ L + 30 μ L d'eau) et incubation 1 heure à 37°C
- Inactivation de KpnI avec une incubation de 10 minutes à -20°C

3. Production et purification de l'Affitin fusionnée

Suite à la pousse de colonies issue de la transformation étalée sur milieu sélectif, une colonie est repiquée et placée en 50 mL de 2xYT (Tryptone 16 g/L, Yeast extract 10 g/L, NaCl 5 g/L) supplémenté en ampicilline (100 μ g/mL) en kanamycine (25 μ g/mL) et avec 1% de glucose. La préparation est incubée sur la nuit à 37°C sous agitation (160 rpm). Le lendemain 200 mL de 2xYT supplémenté en ampicilline (100 μ g/mL) en kanamycine (25 μ g/mL) et avec 0,1% de glucose sontensemencés avec 4 mL de la préculture, puis incubation à 37°C jusqu'à ce que la culture atteigne une DO de 0,650. La production de l'Affitin est induite par l'ajout d'IPTG (500 μ M final) et suit une incubation de la culture pendant 6 heures à 30°C

sous agitation à 160 rpm. La centrifugation de la culture suivie de la reprise des culots bactériens dans le tampon de lyse a déjà été décrite précédemment. L'extrait ainsi obtenu est soumis à une sonication : 9W, amplitude 80%, pulseur 6 pendant 1 minute réalisée sur glace. Cette étape est suivie par une centrifugation à 11 800xg à 4°C pendant 20 minutes ainsi que d'un purification sur colonne d'affinité.

Figure 43 A) Le clonage de l'Affitin A6 ou A872 est réalisé dans un vecteur d'expression contenant la séquence de la GFP. B) Modélisation de structure de la



protéine de fusion A6-GFP.

Après la purification de la protéine (Figure 43 B) sur colonne d'affinité, la protéine est purifiée à l'aide d'une colonne de gel filtration.

VII. Criblage des Affitins par cytométrie en flux : mise en évidence des clones positifs pour CD138 par cytométrie en flux

- Les cellules LP1 sont comptées sur cellule de Malassez et sont reprises dans du PBS-BSA 0,1% à 1 millions/mL et 200 µL/puits sont distribués dans une plaque à fond V.
- La plaque est centrifugée à 2000xg pendant 2 minutes

- Le surnageant est retiré et les cellules sont reprises dans 50 μL d'éluât protéique issu de la production en plaque deep well (pure ou dilué au demi)
- Incubation 1 heure à 4°C
- Lavage avec 200 μL de PBS-BSA 0,1% après centrifugation (2000xg, 2 minutes)
- Reprise des culots cellulaires avec 50 μL d'anticorps secondaire anti-6-His couplé phycoerythrin (Abcam, ab72467) dilué au 50^{ième} et incubation à 4°C pendant 1 heure.
- Suite à un lavage avec PBS-BSA 0,1%, les cellules sont reprise dans 200 μL de PBS et sont analysées au cytomètre en flux (modèle Calibur BD Pharmingen) réglé à la lecture de la fluorescence avec le canal adapté et à l'aide du logiciel FlowJo (Tree Star, Inc).

VIII. Culture cellulaire

Les cellules sont cultivées en RPMI 1640 (Gibco), supplémentées avec 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (PAA), 2mmol/L de L-glutamine (Gibco), de la pénicilline (1000 u/mL) (Gibco) et de la streptomycine (1 mg/mL) (Gibco). Toutes les lignées sont cultivées à 37°C en atmosphère humide enrichie avec 5% de CO₂. Elles sont repiquées deux fois par semaine à 1,5 x 10⁵ cellules/mL. Pour toutes nos expériences, les cellules sontensemencées à une concentration de 5 x 10⁵ cellules/mL 48 heures avant chaque test. Le jour de l'expérience, les cellules sont recomptées et placées à la concentration souhaitée.

Lignée humaine: les lignées U266 et LP1 ont été obtenues par la DSMZ (Braunschweig, Germany). La lignée KMM1 nous a été aimablement transmise par le Dr Otsuki (Okayama, Japan). Autres lignées humaines : Raji, Molt-4, Adam.

Les lignées MDN et Xg5 ont été générées au sein de notre laboratoire à partir d'une culture primaire de cellules de myélome (Catherine Pellat U892). Elles sont

cultivées dans du RPMI 1640 en présence de 10% de sérum de veau foetal ainsi que de 3 ng/mL d'IL-6 recombinante humaine.

Lignée murine :

La lignée 5T33 a été établie par le DR. J Radl du TNO Institut et fut obtenue auprès du Dr H Turner (Department of Nuclear Medicine, Fremantle Hospital, Australie).

Autres lignées :

CHO-CD138canin⁺ (lignée ovarienne de hamster exprimant le CD138 canin), cette lignée a été établie au sein du laboratoire (François Davodeau U892).

IX. Détermination de l'affinité des Affitins

Au cours de ce travail les constantes d'affinité des Affitins sélectionnées ont pu être établies à l'aide de la cytométrie en flux ou d'un test scatchard. Pour chacune de ces techniques 150 000 cellules des lignées cellulaires utilisées sont incubées 1 heure avec des gammes de concentrations des Affitins étudiées. Afin d'obtenir des mesures correctes l'internalisation du complexe ligand/récepteur est minimisé en réalisant les étapes de marquages à 4°C.

Pour les tests réalisés par cytométrie en flux la présence des Affitins est révélée à l'aide de l'anticorps anti-6X His tag® couplé à la phycoérythrine (ab72467). Pour chaque concentration 200 µL de suspensions cellulaires marquées avec les Affitins sont analysées par FACS (Calibur BD Pharmingen) à l'aide du détecteur FL2 après lavages en PBS-BSA 0,1% et re-suspension dans du PBS. Les résultats obtenus sont analysés à l'aide du logiciel FlowJo (Tree Star, Inc). Les IMF obtenues pour chaque concentration permettent la construction de courbes de saturation.

Concernant les essais par scatchard des gammes de concentrations de l’Affitin A872 radiomarquée sont réalisées puis l’Affitin est incubée avec les cellules dans les mêmes conditions que lors d’un marquage de cytométrie. Ici la présence de l’Affitin est révélée à l’aide d’un comptage de la radioactivité présente sur les cellules. Le nombre de coup par minute en fonction de la concentration en Affitin permet le traçage de courbes de saturation. Ces courbes ainsi obtenues sont analysées à l’aide du logiciel Prism (GraphPad) et les affinités des protéines pour leur ligand sont calculées à l’aide d’une procédure de régression non-linéaire sur site unique (Figure 44).

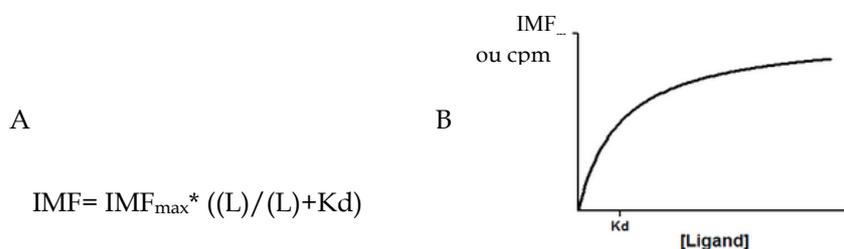


Figure 44 Formule utilisée pour déterminer le Kd de chaque Affitin, où l’IMF correspond à l’Intensité de la médiane de fluorescence. (L) est la concentration du ligand marqué (via l’anti-6-HIS), et le Kd la constance de dissociation qui doit être déterminée.

X. Microscopie confocal

L’Affitin A872 couplée à la GFP est utilisée comme outil d’étude pour la microscopie. Les lignées cellulaires U266 et Raji sont utilisées pour cette étude. Après les avoir comptées et distribuées dans une plaque 96 puits à 1 million/mL les cellules sont marquées avec la protéine de fusion A872-GFP et C5-GFP (Affitin non spécifique) à une concentration de 10 µM ainsi qu’avec l’anticorps anti-CD138 B-B4 couplée dylight (B-B4 dylight 640, à une concentration de 5 µg/mL) utilisé ici comme témoin positif. Le marquage est effectué pendant 1 heure à 4 ou 37°C en fonction des conditions. Après le temps d’incubation, un lavage est effectué avec du milieu RPMI

1640+10%SVF, après centrifugation (2000xg, 2 minutes) les culots cellulaires sont repris dans du milieu RPMI 1640 sans SVF et 30 000 cellules sont déposées dans des puits de lames ibidi 18 puits préalablement enduits avec de la poly-lysine.

Suite au marquage cellulaire avec les Affitins étudiées ou avec l'anticorps servant de contrôle, nous avons observé les cellules à l'aide d'un microscope confocal (Nikon A1RSi) équipé d'un objectif x60, N.A. :1.4. Les clichés réalisés ont été analysés à l'aide du logiciel NIS Element (V4.12) et mis en forme avec le logiciel ImageJ (NIH).

XI.Immunohistochimie

Suite à l'injection par voie intraveineuse de 10 µg d'Affitin, les organes sont prélevés après sacrifice des souris aux différents temps (30, 60, 90 et 120 minutes) puis conservés dans du formol 4% pendant 24 heures, inclus dans des blocs de paraffines. A l'aide d'un microtome des coupes des différents organes sont réalisées puis elles sont placées entre lame et lamelle après coloration.

Les inclusions en bloc paraffine ainsi les différentes colorations ont été réalisées par la plateforme MicroPICell à Nantes selon les protocoles suivants :

Echantillons marqués à l'aide de l'anticorps B-B4 :

- Déparaffinage
- Démasquage citrate
- Blocage des peroxydases endogènes (10 minutes)
- Blocage des immunoglobulines endogènes (60 minutes)
- Anticorps primaire anti BB4 dilué au 1/1000ème (4µg/mL finale, 60 minutes)
- Deuxième blocage des immunoglobulines endogènes (10 minutes)
- Anticorps secondaire anti Ig de souris couplé à la peroxydase (10 minutes)
- Révélation avec la DAB (10 minutes)

- Contre coloration à l'hématoxyline (1 minute)

Le deux bloquants ainsi que l'anticorps secondaire sont issus d'un kit : « mousetain kit » Nicherei Bioscience référence : 414322F.

Echantillons marqués à l'aide de l'anticorps anti-RGS-(His)₆ pour la révélation de l'Affitin A872

- Déparaffinage
- Démasquage EDTA
- Blocage des peroxydases endogènes (5 minutes)
- Anticorps anti-RGS-(His)₆-HRP (référence Qiagen : 34450) dilué au 1/20^{ième} (60 minutes)
- Révélation avec la DAB (10 minutes)
- Contre coloration à l'hématoxyline (1 minute)

XII. Marquage d'une Affitin à l'Alexa 680

- Préparation d'une solution de bicarbonate NaHCO₃ 0.1M pH 7.5.
- Préparation de 2 colonnes de dessalage (Pierce 89862) : 1 équilibrée en tampon NaHCO₃, la seconde en TBS.
- Dilution de la protéine à 2 mg/ml en tampon NaHCO₃ 0.1M pH 7,5.
- Passage de 50 µl d'Affitin en tampon NaHCO₃ sur la colonne équilibrée en tampon NaHCO₃
- Préparation de la solution Alexa ester succinimidyl (NHS= groupement activé pour le couplage) à 10 mg/ml dans du DMSO, vortex.
- Marquage :
 - 50 µl d'Affitin/ tampon NaHCO₃ à 2 mg/ml
 - 3 µl Alexa 680
 - 1 h, température ambiante, avec agitation.
 - Arrêt de la réaction par passage sur la colonne équilibrée en TBS 1X.

- La protéine marquée est stockée à 4°C.

XIII. Marquage radioactif

1. Marquage au SIB et couplage sur Affitin

Les préparations et les réactions sont réalisées dans des tubes en verre à hémolyse.

Préparation des solutions utilisées pour le marquage :

- Méthanol/ Acide acétique 5%
- N-chlorosuccinimide (NCS), (référence Aldrich : 10968-1), préparation d'une solution à 2 mg/mL
- Précurseur stannique SnMe₃ (N-succinimidyl 3-trimethylstannyl-benzoate), produit synthétisé au laboratoire, solution à 0,5 mg/mL
- NaCl saturé
- NaI (0,3 mg/mL) en solution NaOH à 10⁻⁵ M

Marquage du SIB (Figure 45) :

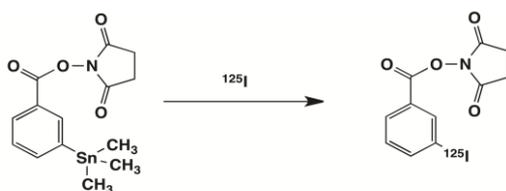


Figure 45 : Marquage du SIB à l'iode 125

- 20 µL de NaCl saturé
- 104,4 nmol de SnMe₃
- 522 nmol de NCS
- 20 nmol de NaI en NaOH
- 20 µL de Na I¹²⁵ (activité de 84,1 MBq)

Mélange de la préparation, puis incubation 30 minutes sous agitation à température ambiante.

Contrôle du marquage par chromatographie sur couche mince :

- Utilisation de TLC silica Gel Merck avec Acétate d'éthyle ou Chloroforme comme solvants migrateurs
- 1 μL de la solution de marquage est déposée en bas de la CCM

Évaporation à sec du marquage sous azote :

- Contrôle de l'activité avant et après évaporation
- Reprise du tube sec dans 190 μL de dichlorométhane

Purification sur HPLC :

- Utilisation d'une colonne Spherisorb 55 W lot 102127224066
- Vitesse réglée à 2 mL/min, tampon Heptane/AcOEt (rapport : 80%/20%)
- Collecte des fractions correspondantes au SIB radiomarké

Couplage SIB/Affitin :

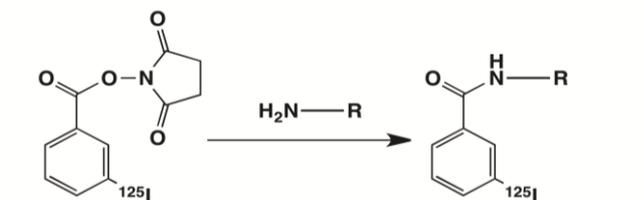


Figure 46 : couplage du SIB sur une amine primaire de la protéine

- 100 μL d'Affitin à 100 μM sont déposés dans le tube de SIB évaporé
- Incubation de 30 minutes à température ambiante sous agitation
- Vérification du couplage avec une CCM avec $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (80%/20%) comme solvant de migration
- Changement de tampon de l'Affitin à l'aide d'une colonne de dessalage (Pierce 89862) préalablement équilibré en PBS-BSA 0,1%.

2. Marquage à l'iodogène

La figure 47 montre le marquage à l'iodogène du radical d'une tyrosine.



Figure 47 : Réaction de substitution électrophile direct de l'iode (NaI) sur le groupement phénol d'une tyrosine.

• 1
60

µg d'Affitin en tampon TBS

- 1 µL d'iode 125
- 10 minutes à température ambiante sous agitation douce
- Vérification de l'efficacité de marquage à l'aide d'une CCM
- Récupération de la fraction d'intérêt après passage sur colonne NAP-5 (gel filtration) préalablement équilibrée en PBS-BSA 0,5%

3. Marquage au technétium 99m à l'aide du kit Isolink

Préparation du composé tricarbonyl :

- 1 mL de $^{99m}\text{TcO}_4$ (1194 MBq) sont ajoutés à un flacon d'Isolink (CRS Kit for tricarbonyl (Center for Radiopharmaceutical Sciences CRS, Paul Scherrer Institut))
- Incubation du flacon au bain marie à 100°C pendant 20 minutes
- Après refroidissement à température ambiante, le milieu est neutralisé avec l'ajout de 120 µL d'HCl à 1N

Marquage de l'Affitin :

- L'Affitin est placée en tampon carbonate 0,1M à pH8 supplémenté en NaCl à 150 mM à l'aide d'une colonne de dessalage (Pierce 89862)

- 45 nmol d’Affitin en tampon carbonate sont ajouté au flacon contenant le composé tricarbonyl (volume : 230 µL)
- Chauffage du mélange réactionnel pendant 1 heure à 52°C
- Purification sur colonne Sephadex (PD midi trap G-10 GE Healthcare) équilibrée en PBS-BSA 0,1%
- Récupération des différentes fractions d’élution, comptage à l’aide d’un compteur gamma de l’ensemble des fractions et migration sur CCM des fractions d’intérêt afin de déterminer le rendement de marquage.

XIV. Mutagenèse dirigée sur A872

L’ensemble des réactions de mutagenèse dirigée sont réalisées à l’aide du kit QuikChange II site-Directed Mutagenesis (Agilent technologies #200523). Les recommandations fournies par le fabricant ont été suivies. Le Tableau 9 regroupe les séquences des oligonucléotides utilisés pour les mutations dirigées.

		Séquence	Longueur	Tm (°C)
C41G	Amorce sens	5'-tatcccgcatcacggccccaggcg-3'	25	78,38
	Amorce anti-sens	5'-cgcttggggccgctatgccgggata-3'	25	78,38
C41M	Amorce sens	5'-cgctatcccgcatcacggccccaggcggtt-3'	33	78,05
	Amorce anti-sens	5'-gaacaccgctggggcatgtatgccgggatac-3'	33	78,05
C41S	Amorce sens	5'-tatcccgcatcacggccccaggcg-3'	25	78,38
	Amorce anti-sens	5'-cgcttggggccgctatgccgggata-3'	25	78,38
C41A	Amorce sens	5'-gtatcccgcatcacggccccaggcggtg-3'	29	78,60
	Amorce anti-sens	5'-caccgctggggcgctatgccgggatac-3'	29	78,60
M72V	Amorce sens	5'-tgccccgaaagagttattagatgtttagcgcgtg-3'	35	78,10
	Amorce anti-sens	5'-cacgcgctaacaatcttaataactttcggggca-3'	35	78,10
M72I	Amorce sens	5'-gccccgaaagagttattagatattagcgcgtg-3'	37	80,50
	Amorce anti-sens	5'-cgcacgcgctaataatcttaataactttcggggca-3'	37	80,50
M72 L	Amorce sens	5'-tgccccgaaagagttattagattgtttagcgcgtg-3'	35	78,10
	Amorce anti-sens	5'-cacgcgctaacaatcttaataactttcggggca-3'	35	78,10

Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour les réactions de PCR effectuées pour la mutagenèse dirigée

Après construction des oligonucléotides, une amplification par PCR du vecteur d’expression contenant la séquence codante pour A872 est réalisée. Cette

étape d'amplification permet la synthèse de l'ADN codant pour A872 avec les mutations désirées. Le plasmide ainsi généré est transformé à des bactéries compétentes. La Figure 48 décrit les étapes principales du processus de mutagenèse dirigé.

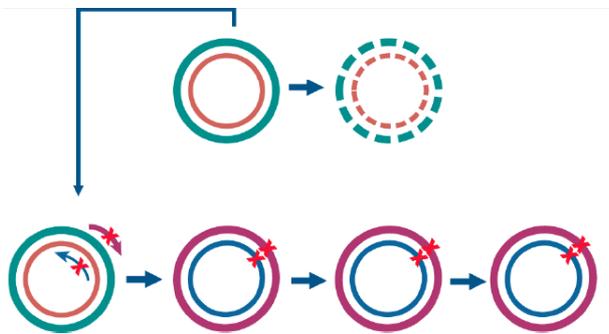


Figure 48 : Schéma de la méthode de mutagenèse dirigée utilisée.

Préparation du mélange réactionnel pour la réalisation de la PCR :

- 5 μ L de tampon
- 50 ng de vecteur pFP1001 contenant l'insert codant pour A872
- 1 μ L de dNTP
- 125 ng d'oligonucléotides sens et anti-sens
- H₂O qsp 50 μ L
- 1 μ L de Pfu polymérase

Programme du thermocycleur utilisé :

- 95°C 30 secondes

- 95°C 30 secondes
 - 55°C 1 minute
 - 68°C 4 minutes
 - 4°C ∞
- } 12X

Suite à ces réactions d'amplifications, une digestion des plasmides matrices de PCR est réalisée par l'ajout d'un microlitre de Dpn I, puis 1 heure d'incubation à 37°C. Des bactéries XL-1 blue sont transformées avec les mélanges réactionnels puis étalées sur boîte de pétri contenant de l'agar avec de l'ampiciline (100 µg/mL), et incubation à 37°C pendant 16 heures.

Suite à la pousse de colonies, une colonie isolée est repiquée pour être amplifiée et servir à la préparation d'ADN plasmidique. Après séquençage des préparations plasmidiques, les préparations contenant les mutations souhaitées sont sélectionnées et servent à produire les clones mutés d'A872.

XV. Production d'une Affitin en milieu minimum M9 en vue d'effectuer une réaction de « click chimie »

1.1. Préparation du milieu minimum M9

- Resuspendre 10,5 g de M9 medium broth (AMRESCO, J863-500G) pour 1 L d'eau ultra pure
- Ajuster le pH à 7,4
- Autoclaver (121°C, 20 minutes)

1.2. Préparation des acides aminés

Les concentrations des acides aminés (Sigma-Aldrich, L-Amino Acids LAA21-1KT) utilisées pour le milieu minimum M9 sont présentées dans le Tableau 10.

	mg/L de milieu de culture
Arg, His, Trp	15
Ile, Lys, Tyr	23
Phe	38
Leu	75
Thr	150
Val	113
Asp, Glu, Ser, Pro, Cys, Gly, Asp, Ala, Glu	19

Tableau 10 : Concentrations des acides aminés ajoutés au milieu M9

Les acides aminés en rouge dans le tableau sont solubilisés dans du NaOH à 0,1 N, les autres acides aminés sont repris dans de l'eau. Concernant l'acide aminé non naturel, le L-Homopropargylglycine (HPG, Chiralix, B.V., Nijmegen, Hollande) il est ajouté au milieu de culture pour une concentration finale de 50 mg/L de culture.

1.3. Production de l'Affitin

- Une transformation du plasmide d'intérêt est réalisée dans la souche bactérienne B834 (BE3) (auxotrophe pour la méthionine) selon le protocole décrit précédemment.
- Une colonie isolée est repiquée est mise dans 10 mL de 2xYT supplémenté en glucose (1%) et ampicilline (100 µg/mL), incubation 12 heures à 37°C sous agitation 190 rpm.
- 5 mL de la préculture servent à ensemencer 500 mL de 2xYT supplémentés avec 0,1% de glucose et de l'ampicilline, incubation 37°C pendant 3 heures sous agitation pour atteindre une DO à 600 nm égale à 0,94.
- Centrifugation 3000xg, 10 minutes, 20°C
- Reprise du culot dans 100 mL de M9

- Centrifugation 3000xg, 10 minutes, 20°C
- Reprise du culot bactérien dans 400 mL de M9 et incubation pendant 30 minutes à 37°C sous agitation
- Centrifugation 3000xg, 10 minutes, 20°C
- Reprise du culot bactérien dans 500 mL de M9 + acides aminés + HPG + IPTG (500 µM finale)
- Production à 30°C pendant 5 heures sous agitation
- Centrifugation 8000xg, 20 minutes à 4°C
- Congélation à -80°C des culots avant purification sur colonne d'affinité.

Résultats

I. Préparation des protéines utilisées pour les sélections en ribosome display

1. Biotinylation des protéines : CD138-β2m et β2m

La sélection par ribosome display nécessite la biotinylation des cibles protéiques afin d'être en mesure de les capturer sur un support solide (via la streptavidine) sans altérer leur conformation spatiale. L'utilisation d'une biotine contenant un groupement NHS permet la biotinylation de protéines via leurs amines primaires comme celles des lysines. De plus, la biotine utilisée contient un bras de liaison entre la partie NHS et la biotine permettant l'insertion d'un espace entre la protéine et le support solide. Suite à la réaction de biotinylation, une estimation du nombre de biotine/protéine est réalisée par spectrophotométrie en utilisant le complexe HABA/Avidine. Le principe de cette mesure repose sur le déplacement stoechiométrique de l'Avidine fixée sur l'HABA par la biotine. La mesure de la modification de la DO à 500 nm induite permet de déterminer le niveau de biotinylation de la protéine. Ce nombre ne doit pas dépasser 2 à 3 molécules de biotine par protéine afin de minimiser la potentielle modification des épitopes. Nous avons obtenu une approximation de 2,3 biotine/protéine pour le CD138, et une approximation de 1,9 biotine/protéine pour la β2m.

2. Vérification des protéines

Les protéines recombinantes CD138 biotinylée et β2m biotinylée sont déposées sur un gel SDS-PAGE 15 % afin de vérifier leur pureté ainsi que leur intégrité (Figure 49). Nous pouvons observer dans le puits 1 une bande du poids moléculaire attendu (12,5 kDa) correspondant à la β2m et une bande dans le puits 2 correspondant à

CD138-β2m avec un poids moléculaire d'environ 60 kDa. Pour chacune de ces protéines aucune dégradation n'est mise en évidence. De plus, nous n'observons pas d'autre bande correspondant à des protéines contaminantes. La vérification des protéines biotinylées est réalisée également par un test ELISA (cf. matériels et méthodes). Les résultats obtenus montrent une bonne reconnaissance des cibles par leurs anticorps de références (Figure 50). Cette expérience permet de valider la biotinylation des protéines avant leur utilisation en ribosome display.

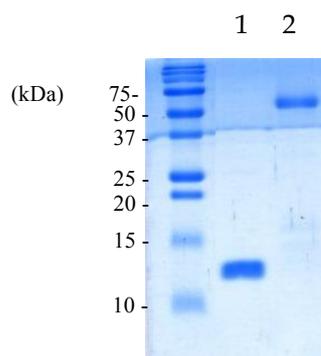


Figure 49 : Puits 1 : protéine β2m biotinylée et puits 2 : CD138-β2m biotinylée sur gel SDS-Page 15%.

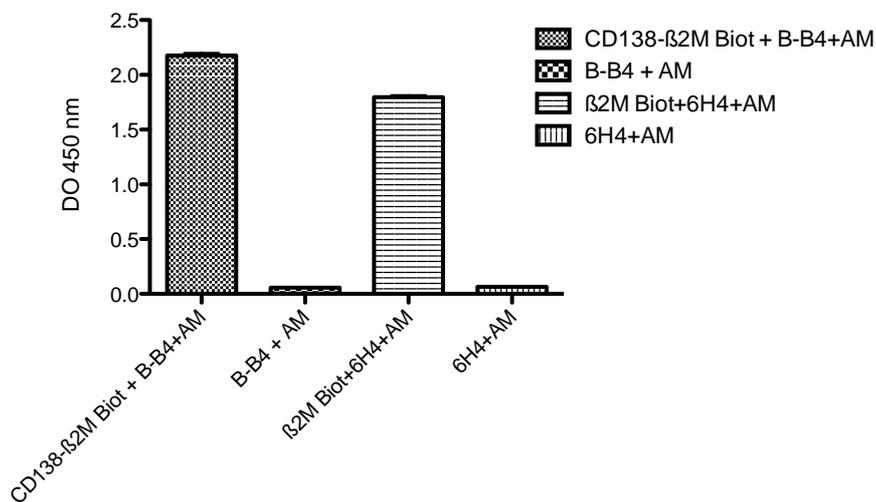


Figure 50: Contrôle des protéines biotinylées par ELISA. B-B4 anticorps anti-CD138, 6H4 anticorps anti-β2m et AM anticorps anti-souris

II. Sélection d'Affitins contre CD138-β2m

1. Banques d'Affitins utilisées pour la sélection

Quatre banques d'Affitins sont utilisés pour réaliser la sélection par ribosome display : les banques L1, L2, L3 et L4 (cf. matériels et méthodes). Chacune de ces banques est caractérisée par l'insertion de codons dégénérés dans des régions spécifiques de Sac7d. Les banques L1 et L2 ont respectivement 10 et 14 acides aminés soumis à la variabilité. Les banques L3 et L4 possèdent respectivement 13 et 15 points de mutations, dont 6 se situent au niveau d'une boucle, ces banques sont dites « à boucle ». Chacune de ces banques d'Affitins possèdent une zone de fixation spécifique leur conférant des capacités de fixation différentes en fonction du type et de la nature de la cible. Aussi l'utilisation d'un mélange de banques au cours des sélections permet d'augmenter les probabilités d'obtenir des Affitins dirigées contre la cible d'intérêt. Nous avons réalisé sept tours de sélection par ribosome display contre la cible recombinante CD138-β2m en effectuant à chaque tour une étape de contre sélection avec la protéine β2m seule. Cette étape permet d'éliminer d'éventuelles Affitins spécifique de la séquence de la β2m présente dans la protéine de fusion. Les conditions ainsi que le schéma des sélections réalisées sont décrits dans la partie matériels et méthodes.

2. Tour de sélection n°7 et mise en évidence d'Affitins contre CD138

Sept tours de sélection sont réalisés contre CD138-β2m. Le dernier tour de sélection est réalisé en parallèle avec une sélection négative. Cette dernière correspond à l'incubation des complexes ternaires issus du tour 6 dans des tubes ne contenant aucune cible. Cette expérience permet de mesurer le bruit de fond de la sélection et par conséquent la quantité d'Affitins spécifiques des cibles.

2.1. Contrôle des produits de PCR après le tour de sélection n°7

L'analyse de la RT-PCR réalisée suite au tour de sélection n°7 permet de mettre en évidence la présence d'une bande d'amplification d'une taille de 300 pb en présence de CD138 (Figure 51). Nous observons une bande de 300 pb de très faible intensité dans le puits de la sélection négative. Ce résultat nous permet de conclure au bon déroulement de la sélection, ainsi que sur la présence d'Affitins spécifiques de CD138 au sein du pool de sélection.

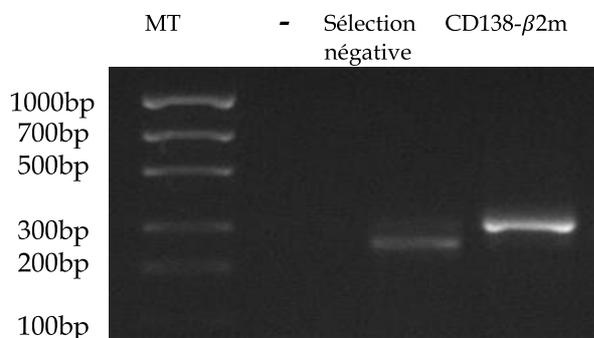


Figure 51: Gel d'agarose présentant les bandes d'amplification de RT-PCR obtenues à l'issue du tour de sélection n°7

2.2. Contrôle de la présence d'Affitins anti-CD138 dans le pool de sélection par ELISA

Les produits de RT-PCR issus du tour de sélection n°7 sont utilisés pour réaliser une traduction *in vitro*. Les produits de traduction (l'ensemble des Affitins contenues dans le pool de sélection) sont incubés :

1. soit avec le CD138 préalablement fixé en fond de puits d'une plaque ELISA enduit avec de la streptavidine

- soit avec le CD138 dans un tube eppendorf afin de former le complexe CD138/Affitin en solution.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'histogrammes dans la Figure 52. Nous pouvons observer qu'aucun signal positif n'est obtenu lorsque l'ELISA est réalisé selon la technique n°1. En revanche un résultat positif est obtenu lorsque le pool de sélection est incubé avec la protéine de fusion CD138-β2m selon la technique n°2. En effet les densités optiques obtenues pour la cible CD138-β2m sont 3,8 fois plus importante (2,4) que celles obtenues avec β2m seule (0,63). Nous obtenons un signal de 0,21 lorsque le pool de traduction est incubé dans un puits enduit en streptavidine et saturé en PBS-BSA 0,1%, ce qui correspond au bruit de fond de l'expérience. Par conséquent nous n'observons pas de fixation non spécifique des Affitins présents dans le pool de sélection. L'Affitin anti-IgG C3 est ici utilisé comme témoin de l'expérience.

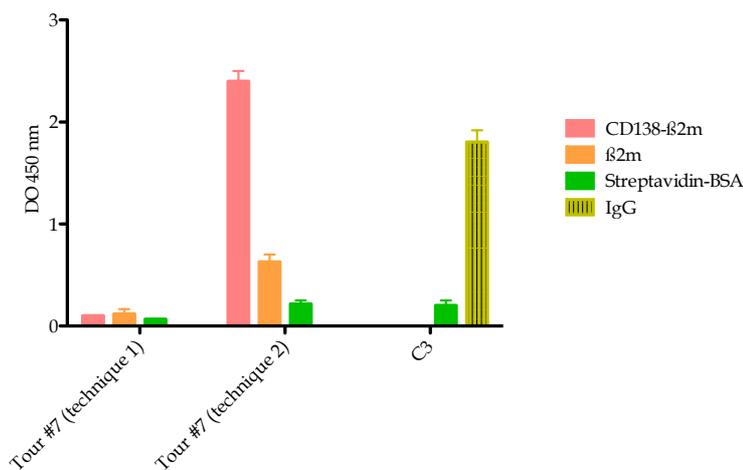


Figure 52 : Histogramme des résultats obtenus en ELISA avec la traduction *in vitro* des ARN du pool de sélection n°7

Les résultats obtenus permettent de confirmer la présence d'Affitins spécifiques de CD138 au sein du pool de sélection. En outre, la différence des résultats obtenus en ELISA permet de penser que le repliement conformationnel de CD138 joue un rôle capital pour sa reconnaissance par les Affitins.

Nous procédons dès lors au clonage de l'ensemble des Affitins présentes au sein du pool de sélection n°7 dans un vecteur d'expression autorisant l'expression de chacun des variants d'Affitins chez *E. coli*.

3. Pré-criblage du pool de sélection par ELISA

3.1. Sélection d'Affitins contre CD138-β2m

Un premier criblage est réalisé par ELISA en utilisant les extraits protéiques issus d'une production d'Affitins effectuée en plaque 96 puits deep well. Après lyse des bactéries, les extraits protéiques sont dilués au 500^{ième} puis utilisés afin de réaliser un ELISA selon la technique n°2. Deux Affitins A6 et A8 sont sélectionnées comme pouvant présenter un intérêt car montrant des signaux significativement élevés pour CD138-β2m comparé à ceux obtenus pour β2m seul ou la BSA (Figure 53).

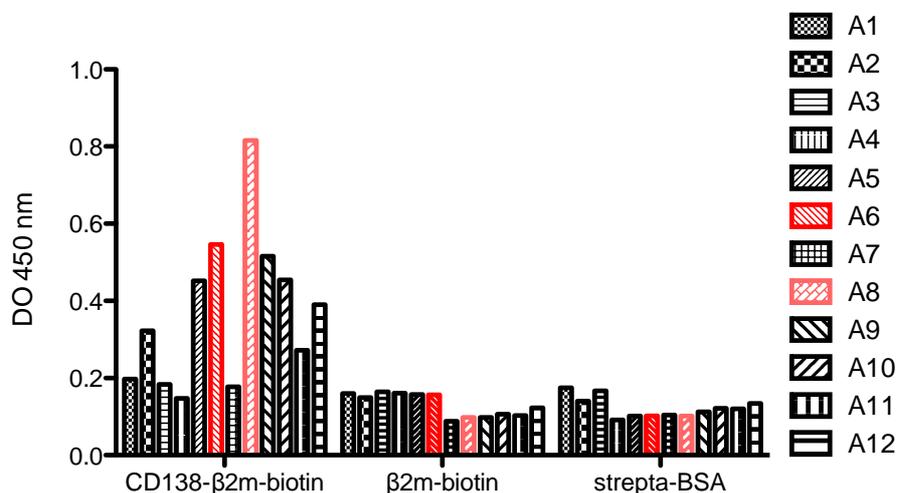


Figure 53 : Histogramme des Affitins issu du criblage du pool de sélection par ELISA.

3.2. Séquençage et alignement de séquences peptidiques

Les ADN plasmidiques des Affitins A6 et A8 sont isolés et séquencés ce qui permet de réaliser un alignement de séquences peptidiques montré dans la Figure 54. Les séquences des Affitins sont comparées à celle de Sac7d. Nous pouvons remarquer que A6 et A8 sont toutes deux issues de la banque à boucle (banque L4, Figure 37).

	1	10	20	30	40	50	60	70	73																																																																
1. Sac7D	G	S	V	K	V	K	F	K	Y	R	G	E	E	K	E	V	D	T	S	K	I	K	K	V	W	R	V	---	---	E	K	M	S	F	T	Y	D	D	N	G	K	T	G	R	G	A	V	S	E	K	D	A	P	K	E	L	L	D	M	L	A	R	A	E	R	E	K	K	L	N			
2. A6	G	S	V	K	V	K	F	R	Y	I	G	E	E	K	E	V	D	T	S	K	I	K	K	V	W	R	I	L	A	Y	C	P	Q	A	V	F	F	T	Y	D	D	N	G	K	T	G	R	G	V	V	A	E	N	D	A	P	K	E	L	L	D	M	L	A	R	A	E	R	E	K	K	L	N
3. A8	G	S	V	K	V	K	F	R	Y	I	G	E	E	K	E	V	D	T	S	K	I	K	K	V	W	R	I	L	A	Y	C	P	Q	A	V	F	F	T	Y	D	D	N	G	K	T	G	R	G	V	V	A	E	N	D	A	P	K	E	L	L	D	M	L	A	R	A	E	R	E	K	K	L	N

Figure 54 Alignement des séquences peptidiques de A6 et A8 isolées à partir d'un criblage par ELISA.

Nous pouvons constater que les séquences des Affitins A6 et A8 sont très proches, toutefois elles diffèrent par quatre acides aminés. Le premier se situe au niveau de la boucle en position 28 (A6 possède une leucine, et A8 une proline), puis au niveau de la position 49 où A6 possède un glutamate et A8 une leucine, en position 51 (A6 : alanine et A8 : leucine) et enfin en position 53 où A6 possède une asparagine et A8 une sérine.

3.3. Production de l'Affitin A6 comme protéine de fusion avec la GFP pour la détection en cytofluorimétrie

Nous disposons au sein du laboratoire d'un vecteur autorisant l'expression des Affitins sous forme de protéines de fusion couplées à la GFP (« Green Fluorescent Protein »). Afin de contrôler la reconnaissance de CD138 dans un contexte natif (exprimé à la surface membranaire) et d'expérimenter la possibilité de réaliser un crible d'Affitins par cytofluorimétrie, l'Affitin A6 est cloné dans ce vecteur

d'expression. La protéine de fusion permet de détecter la fixation de l'Affitin sur une lignée cellulaire exprimant CD138 grâce à la luminescence de la GFP.

Afin de déterminer le niveau d'affinité de l'Affitin A6 pour CD138 exprimé à la surface membranaire de cellules, un marquage des lignées cellulaires disponibles au sein du laboratoire, LP1 et Adam, est réalisé avec différentes concentrations de A6-GFP. La lignée LP1 exprime le CD138 et la lignée Adam sert ici de lignée négative (CD138⁻). Les intensités de médianes de fluorescence (IMF) obtenues pour chacune des concentrations protéiques sont utilisées pour déterminer le K_d (constante de dissociation) d'A6-GFP pour CD138 (Figure 55).

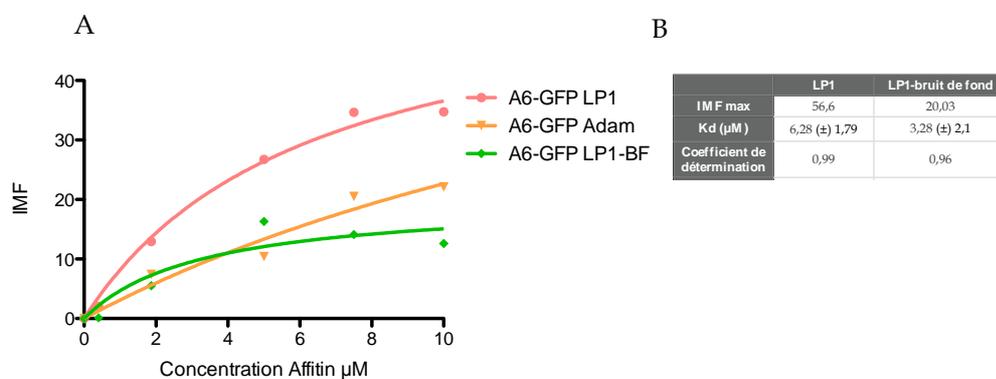


Figure 55 A) Courbes de saturation pour les lignées LP1 et Adam obtenues avec la protéine de fusion A6-GFP. B) Résultats obtenus pour la détermination du K_d

Les IMF enregistrées pour la lignée Adam correspondent au bruit de fond puisque cette lignée n'exprime pas le CD138. La soustraction des IMF obtenues sur la lignée Adam à celles de la lignée LP1 (A6-GFP LP1-BF) permet d'obtenir une meilleure approximation du K_d d'A6 pour son ligand. Le K_d estimé sur la lignée CD138⁺ (LP1) est de 3,3 μ M.

Conclusion

Le criblage rapide d'un échantillon du pool de sélection n°7 a permis de sélectionner quelques clones d'Affitins présentant une spécificité de fixation sur le CD138 recombinant. Ce résultat obtenu en ELISA a mis également en évidence

l'importance de la conformation de la cible pour la reconnaissance des Affitins. Le clonage d'une de ces Affitins (A6) dans un vecteur d'expression permettant de la produire sous forme de protéine de fusion couplée à la GFP a autorisé l'étude de la fixation sur son ligand dans un contexte natif par cytofluorimétrie. Les résultats obtenus montrent une affinité relativement faible de l'Affitin A6 pour CD138 exprimé par la lignée LP1 (de l'ordre de 3 μ M). Ces résultats montrent la faisabilité de l'analyse de la fixation des Affitins contre CD138 présenté dans un contexte natif par cytofluorimétrie. Ils permettent de promouvoir la réalisation d'un criblage du pool de sélection sur cellules entières. En revanche, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que la GFP serait à l'origine d'une perte d'affinité de l'Affitin A6 pour CD138.

Ainsi, pour réaliser un criblage par cytofluorimétrie, nous allons nous attacher dans un premier temps à la sélection et la caractérisation de lignées cellulaires disponibles au sein de notre laboratoire. Puis suite à la production des Affitins présentes au sein du pool de sélection n°7 nous procéderons à leur criblage en utilisant un anticorps anti-6-His couplé à la phycoérythrine.

III. Caractérisation des lignées cellulaires pour l'expression de CD138 et de la β 2m

Plusieurs lignées cellulaires de cancers humains sont sélectionnées et caractérisées pour leur expression du CD138 humain et pour la β 2 microglobuline humaine par cytométrie en flux (Figure 56).

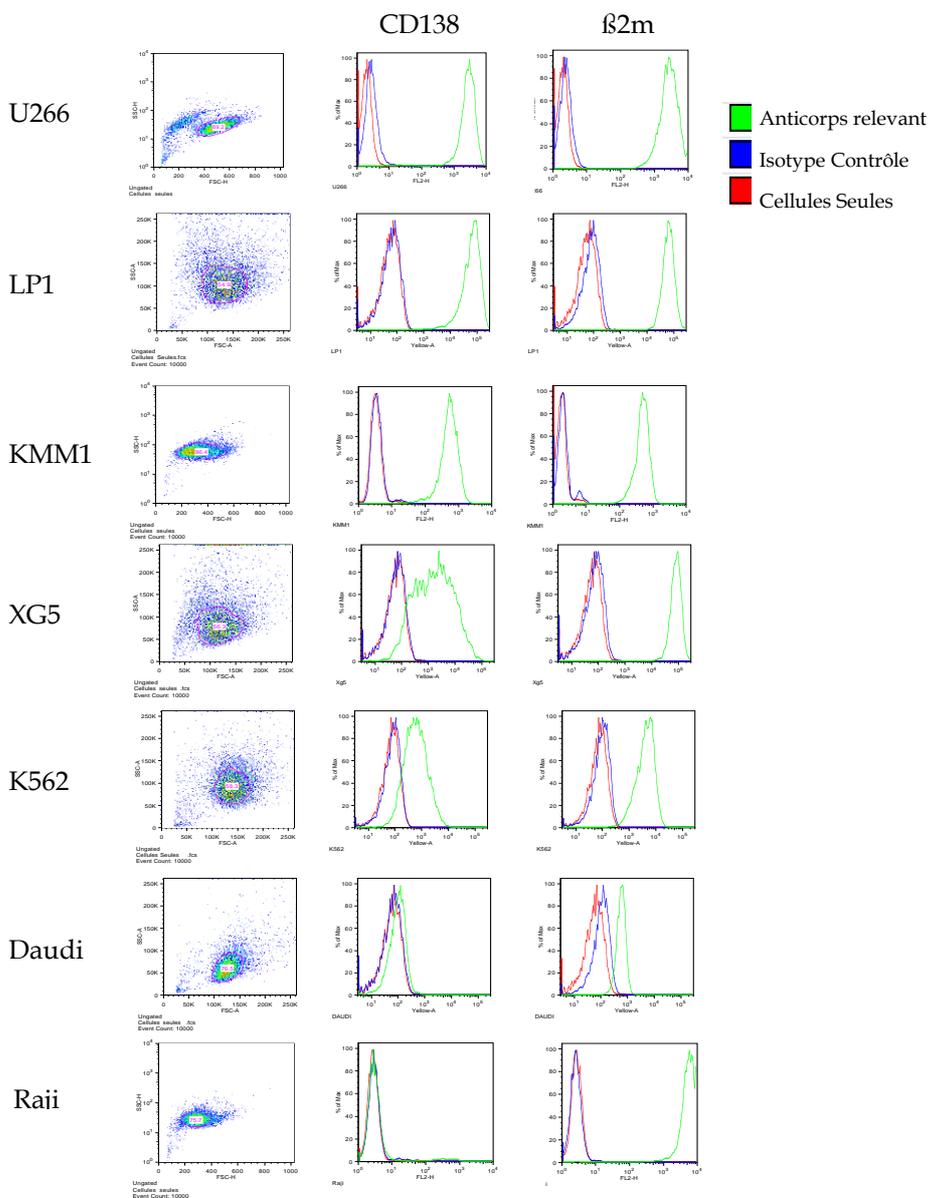


Figure 56: Cytogrammes pour les lignées cellulaires montrant les marquages obtenus avec les anticorps anti-CD138 (MI15) et anti- β 2m (6H4).

L'objectif de ce criblage est la sélection de lignées cellulaires positives et négatives pour le CD138 et de connaître, notamment pour les lignées n'exprimant pas CD138, le niveau d'expression de la β 2m en vue de réaliser un contre criblage. Nous utilisons l'anticorps MI15 couplé à la phycoérythrine (PE) pour la révélation de CD138 à la surface membranaire et de l'anticorps 6H4 produit au sein de notre

	Type cellulaire et organisme	CD 138 humain				β 2m humaine		
		Cellules seules	Isotype contrôle	MI15	Ratio spécifique/non spécifique	Isotype contrôle	6H4	Ratio spécifique/non spécifique
U266	Myélome multiple humain	2	2	2943	1 472	2	2 864	1 240
LP1	Myélome multiple humain	54	52	71341	1 372	54	68 782	1 269
KMM1	Myélome multiple humain	2	3	1685	562	2	509	260
XG5	Myélome multiple humain	58	54	1688	31	75	89 330	1 191
K562	Myélome multiple humain	73	83	590	7	97	4 515	47
Daudi	Lymphome B humain	58	62	100	2	108	590	5
Raji	Lymphome B humain	3	3	3	1	3	5 777	2 311
Molt-4	Lymphome T humain	2	3	3	1	2	3 786	1 683

laboratoire pour la révélation de la β 2m. L'anticorps murin 6H4 est révélé lors d'un deuxième marquage à l'aide d'un anticorps anti-souris couplé à la PE. Le marquage spécifique de chaque anticorps est contrôlé à l'aide d'un isotype contrôle. L'ensemble des résultats est présenté dans le Tableau 11 ainsi que dans la Figure 56.

Tableau 11: IMF obtenues pour la révélation de CD138 humain et de la β 2m humaine pour différentes lignées cellulaires.

Ces informations nous permettent de choisir les lignées intéressantes pour le criblage du pool de sélection ainsi que pour la caractérisation des Affitins issues de ce criblage. Concernant l'expression de CD138, les lignées U266 et LP1 présentent une forte expression avec des ratios signal spécifique/non spécifique entre 1300 et 1500. Un niveau d'expression intermédiaire est retrouvé pour la lignée KMM1 avec un ratio calculé à 562. La lignée XG5 présente une expression de CD138 faible avec un ratio de 31 et un signal très faible est observé pour la lignée K562 avec un ratio de

7. Enfin, les lignées Daudi, Raji et Molt-4 ne présentent aucune expression pour CD138.

Concernant l'expression de la $\beta 2m$, toutes les lignées sont positives, elles présentent toutefois des niveaux d'expression différents. Les ratios les plus faibles sont obtenus pour les lignées KMM1, K562 et Daudi avec respectivement 260, 47 et 5 d'IMF. L'expression de la $\beta 2m$ à la surface membranaire des lignées U266, LP1, XG5 et Molt4 est du même ordre de grandeur avec en moyenne un ratio de 1345. La lignée Raji quant à elle présente un niveau d'expression très élevé avec un ratio égal à 2311 soit deux fois supérieur, voir 50 fois supérieur comparé aux autres lignées cellulaires.

Par conséquent les lignées U266, et LP1 présentent des niveaux d'expression de CD138 intéressant pour être utilisées pour le criblage et la caractérisation d'Affitins anti-CD138. Le contre criblage peut être effectué en utilisant les lignées Raji et Molt-4 qui n'expriment pas le CD138 à leur surface, mais présentent un haut niveau d'expression de la $\beta 2m$ permettant ainsi la détection d'éventuelle Affitins anti- $\beta 2m$ au sein des protéines criblées.

1. Production et criblage par cytofluorimétrie des clones issus du clonage du pool de sélection

1.1. Production et purification des Affitins pour le crible de la sélection

Les processus de productions et de purifications sont décrits dans le matériels et méthodes. La qualité de production et de purification des clones est contrôlée en déposant 20 µL de l'éluât de la colonne d'affinité sur un gel SDS-PAGE. La Figure 57 montre la production de 8 Affitins qui correspondent aux bandes aux alentours de 10 kilodaltons (kDa).

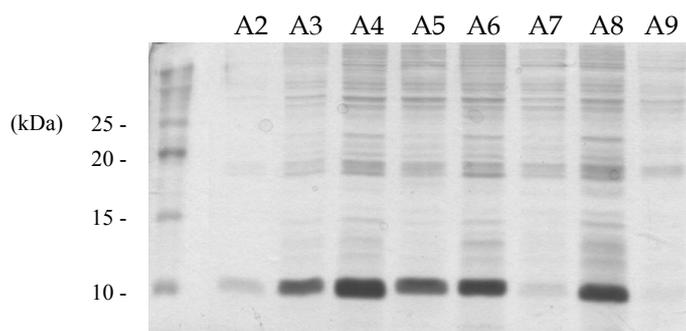


Figure 57 Gel SDS-PAGE 15% avec dépôts de 8 productions d'Affitins en plaque deep well après purification sur IMAC.

1.2. Criblage des Affitins sur la lignée LP1 (CD138⁺) par cytofluorimétrie

La sélection par ribosome display a été réalisée avec la protéine de fusion recombinante biotinyllée (CD138-β2m). Afin de sélectionner les Affitins pouvant reconnaître CD138 dans un contexte natif (exprimé à la surface membranaire) le

criblage du pool de sélection est réalisé par cytofluorimétrie en utilisant la lignée cellulaire LP1.

Les cellules LP1 sont comptées et reprises avec du PBS-BSA 0,1% à 1 million/mL, et 150 000 cellules sont déposées dans une plaque 96 puits à fond conique. 100 μ L d'éluât de chaque Affitin obtenue après production en milieu liquide et purifiée sur colonne d'affinité, sont utilisés pour un marquage des cellules pendant 1 heure à 4°C.

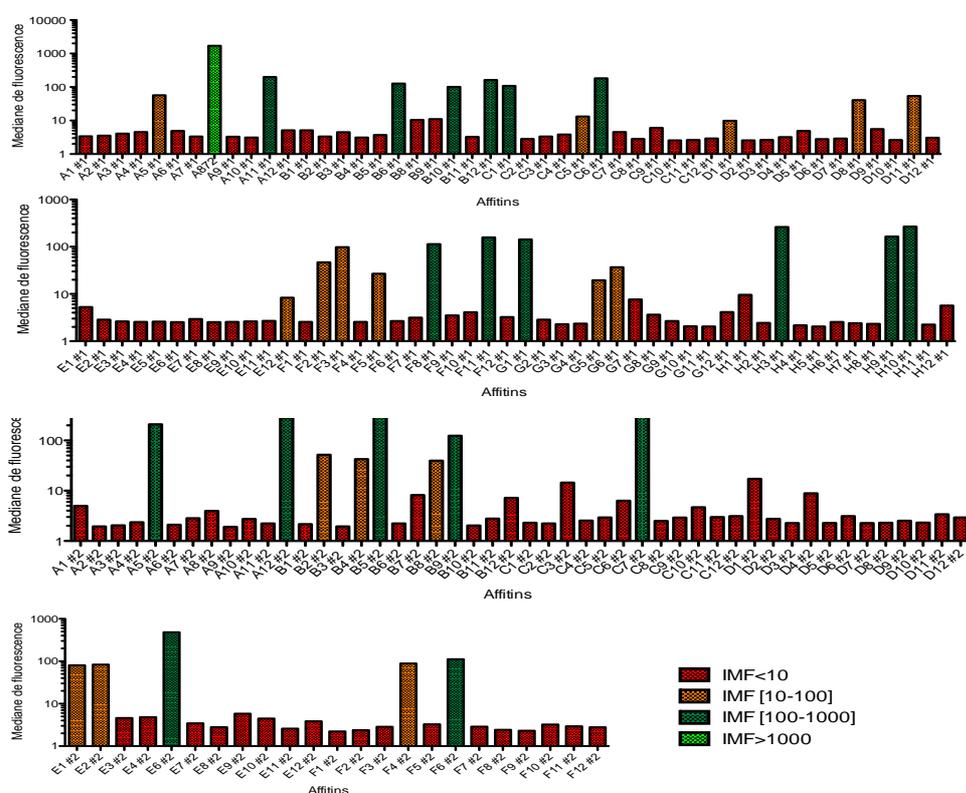


Figure 58 Histogramme des médianes de fluorescence obtenues lors du criblage du pool de sélection d’Affitins contre la lignée cellulaire LP1.

Après des lavages en PBS-BSA 0,1%, la présence des Affitins à la membrane est révélée en utilisant un anticorps anti-6-His couplé à la phycoérythrine. La Figure 58 regroupe l’ensemble des résultats obtenus lors du criblage de 168 Affitins.

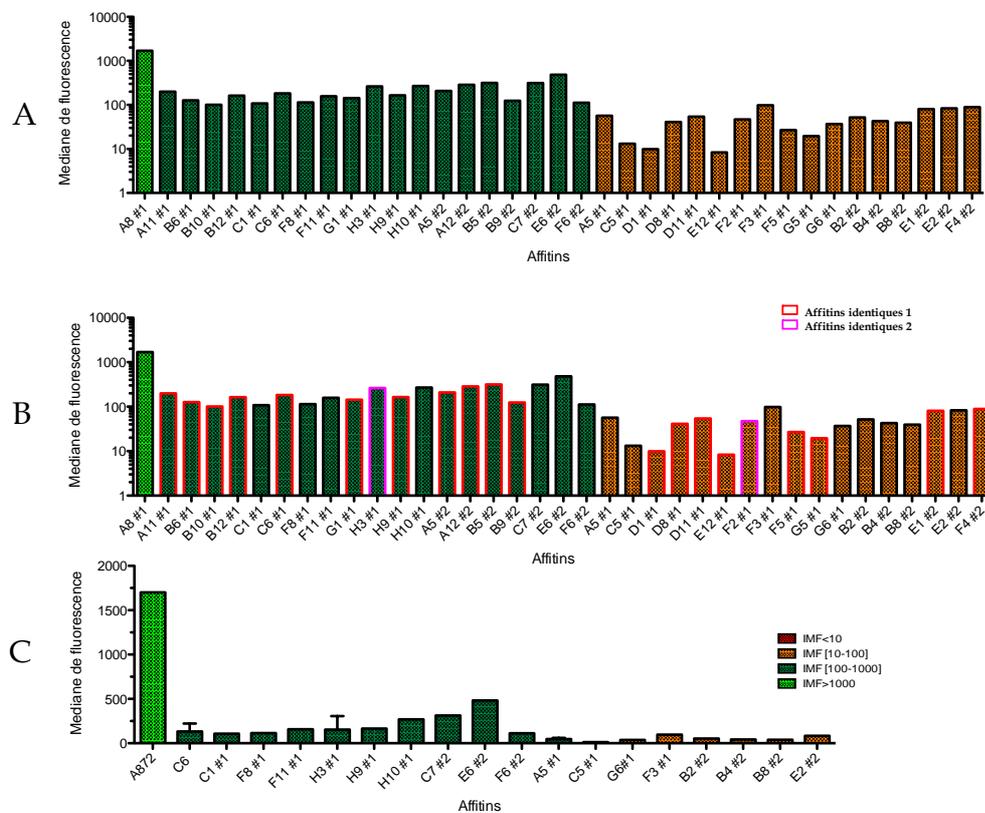


Figure 59 A) Affitins sélectionnées lors du criblage du pool#7. B) Clones identiques. C) Clones sélectionnés contre CD138+/LP1 (échelle linéaire).

Le crible de 168 Affitins par FACS a permis d'en sélectionner 37 présentant des signaux positifs (minimum : 9,9 et maximum : 1700 d'IMF). En effet les Affitins donnant une médiane de fluorescence supérieure à 10 sont considérées comme potentiellement intéressantes (Figure 59 A) et sont sélectionnées pour des études plus approfondies notamment un séquençage. Les résultats de séquençage ont permis de mettre en évidence la présence d'Affitins identiques (Figures 59 B). La Figure 59 C représente les résultats obtenus à l'aide d'un axe des ordonnées sous une échelle linéaire.

1.3. Alignement des séquences peptidiques des Affitins positives contre CD138

Les séquences nucléotidiques obtenues après séquençage permettent, après traduction *in silico*, de réaliser un alignement de séquences protéiques comme montré dans la (Figure 60) où la séquence de Sac7d est prise comme référence.

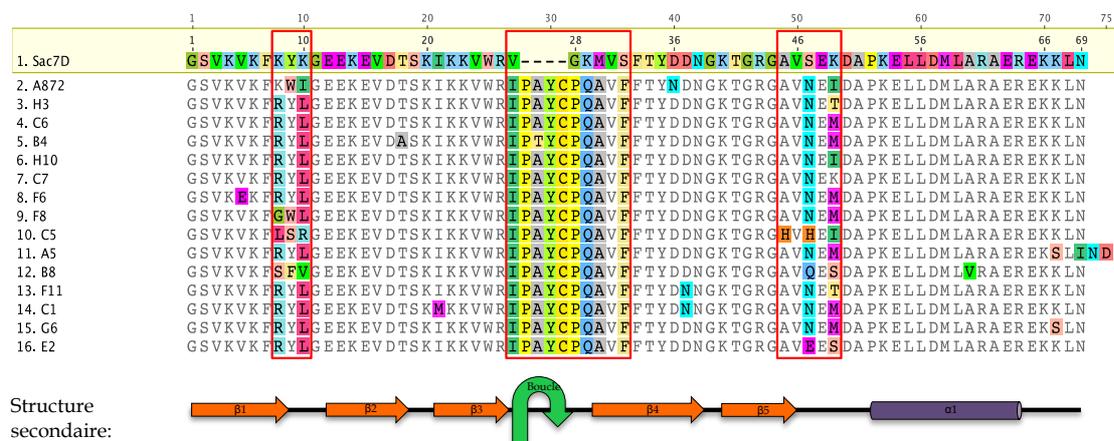


Figure 60 : Alignement des séquences peptidiques des Affitins sélectionnées contre CD138

L'alignement des séquences peptidiques permet de mettre en évidence que toutes les Affitins sélectionnées contre CD138 appartiennent à la même famille. En effet comme mentionné dans la première partie des résultats, différentes banques d’Affitins sont utilisées pour réaliser la sélection en ribosome display. Nous pouvons observé que les zones de variabilité des Affitins sélectionnées correspondent aux codons dégénérés de la banque L4 mis en évidence par les encadrés rouge de la Figure 60.

Les trois premiers codons dégénérés (position 8, 9 et 10) présentent 5 séquences différentes. La plus représentée (73%) est composée des acides aminés Arg-Tyr-Leu. Les quatre séquences restantes sont observées pour les Affitins A872,

F8, C5 et B8 avec respectivement Lys-Trp-Ile, Gly-Trp-Leu, Leu-Ser-Arg et Ser-Phe-Val. Le deuxième encadré rouge de la Figure 60 englobe les 9 codons soumis à la variabilité (position 27 à 34 et position 36). Nous pouvons observer que la séquence est identique pour l'ensemble des Affitins sélectionnées, sauf pour B4 qui possède un Thr en position 29 à la place d'une Ala. De plus, nous pouvons observer pour l'ensemble des séquences la présence d'une cystéine unique en position 31. Enfin, sept séquences différentes sont retrouvées au niveau de la troisième zone soumise à la variabilité (position 45, 47 et 49). La séquence AVNEM est retrouvée dans 47% des Affitins. La séquence AVNEI est retrouvée dans les Affitins A872 et H10, la séquence AVNET est présente au sein des Affitins H3 et F11. Enfin les Affitins C7, C5, B8 et E2 présentent respectivement les séquences suivantes : AVNEK, HVHEI, AVQES, AVNET et AVEES. Nous pouvons observer que certains acides aminés présents hors des encadrés sont mutés comparés à la séquence originale de Sac7d. Ces variabilités s'expliquent par l'insertion de mutations lors des étapes de PCR réalisées au cours de la sélection. De plus, l'Affitin A5 possède 2 acides aminés supplémentaires dans la partie C terminale, qui s'explique par la délétion d'une adénine conduisant à lecture d'un codon correspondant à une sérine en position 67 et à un décalage du cadre ouvert de lecture. La construction d'arbre phylogénique permet en outre de mieux appréhender le lien de parenté entre les différentes Affitins (Figure 61).

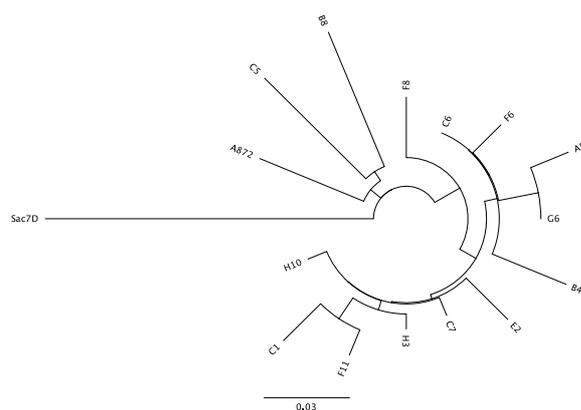


Figure 61 : Arbre de distance permettant de définir la phylogénie des Affitins

1.4. Production et purification des Affitins se fixant sur CD138

Toutes les Affitins présentant une IMF supérieure à 10 lors du premier crible sont produites en plus grande quantité (volume de culture : 100 mL) puis purifiées dans un premier temps à l'aide d'une colonne IMAC puis dans un deuxième temps à l'aide d'une colonne de gel filtration (Sephadex 75) qui permet la séparation des protéines contenues dans une solution en fonction de leur masse moléculaire. Cette technique permet de purifier chaque Affitin et ainsi d'obtenir les protéines dans le tampon de notre choix avec un niveau de pureté important. Pour la purification des clones sélectionnés, nous utiliserons un tampon TBS 1X supplémenté en DTT (1 mM) afin de prévenir la formation de pont disulfure intramoléculaire. De plus la chromatographie nous permet de caractériser chaque clone à l'aide de son profil d'élution et de son rendement de production. La mesure en continu de l'absorbance à 280 nm à la sortie de la colonne réglée à 2 ml/minute permet d'obtenir les chromatogrammes de chaque Affitin présentés dans la Figure 60.

Les pics d'élutions correspondants aux Affitins sont collectés et le dosage au nanodrop de chaque solution permet le calcul de la concentration protéique et du rendement de production exprimé en mg/L de culture chez *E. coli* (Tableau 12)

Affitin	Poids moléculaire (Da)	Nombre d'acide aminé	pI	Rendement de production: mg/L culture
A872	9611	83	9,52	30,22
H3	9605	83	9,33	14,04
C6	9635	83	9,33	12,40
B4	9635	83	9,33	15,62
H10	9617	83	9,33	21,31
C7	9632	83	9,48	13,93
F6	9665	83	9,10	29,07
F8	9559	83	9,13	24,99
C5	9630	83	9,37	8,19
A5	9822	85	8,76	22,12
B8	9534	83	9,13	5,31
F11	9604	83	9,52	12,16
C1	9652	83	9,52	4,67

Tableau 12 : Caractéristiques physiques des Affitins sélectionnées et leurs rendements de production chez *E. coli*.

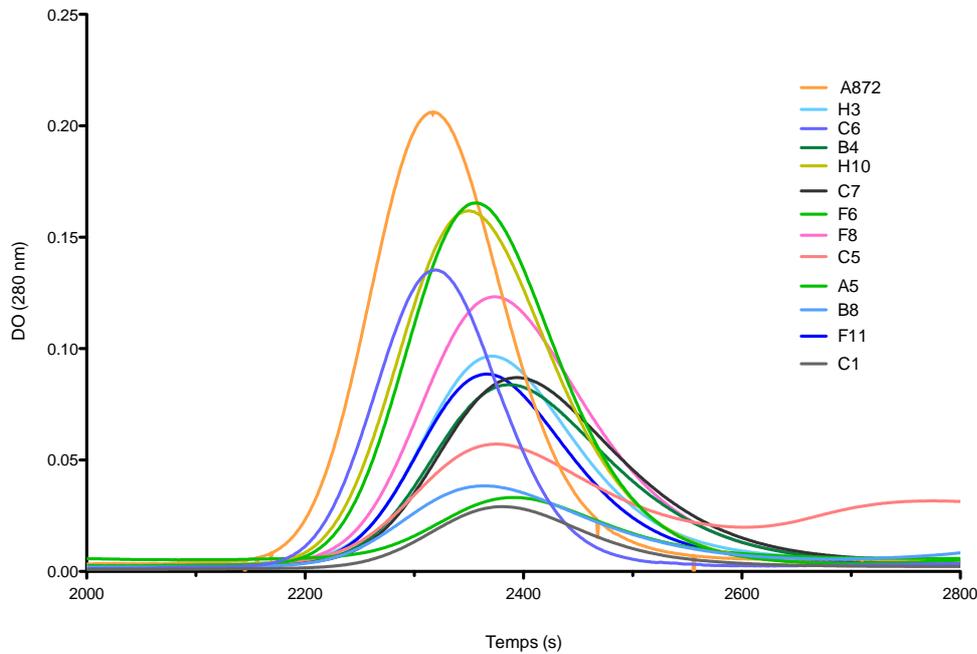


Figure 62 : Chromatogrammes des Affitins sélectionnées contre CD138, représentation de la DO_{280nm} en fonction du temps.

L'analyse des chromatogrammes de gel filtration des Affitins montre des profils d'élution similaires (Figure 62). Elles se présentent toutes sous forme monomérique sans formation d'agrégats. Néanmoins nous observons des rendements de productions différents en fonction des Affitins. Le rendement de production moyen de ces protéines est calculé à 16 mg/L de culture, avec un rendement minimal de 4,67mg/L de culture pour C1 et un rendement maximal obtenu pour A872 avec 30,22 mg/L de culture.

1.5. Mesure de l'affinité de fixation des Affitins sur cellules CD138⁺ et cellules CD138⁻

Pour la partie suivante, la lignée U266 est utilisée comme lignée CD138⁺, et la lignée Raji comme lignée négative pour CD138. Pour rappel ces deux lignées sont caractérisées pour l'expression de CD138 et de la β 2m dans le chapitre III des résultats (Figure 56 et Tableau 10).

La séquence nucléotidique obtenue après le séquençage des préparations d'ADN plasmidiques permet de déterminer la concentration de chaque protéine en solution en calculant le coefficient molaire d'absorption théorique. Nous pouvons dès lors mesurer l'affinité de chaque Affitin pour son récepteur. L'étude des intensités de médianes de fluorescence en fonction de la concentration en Affitin sur différentes lignées cellulaires permet de déterminer les paramètres de liaison de chaque ligand sur son récepteur exprimé à la surface cellulaire (cf. matériels et méthodes). En outre la spécificité de liaison est montrée à l'aide de lignées cellulaires n'exprimant pas CD138.

L'ensemble des Affitins produites et purifiées sur tamis moléculaire ainsi qu'une Affitin non spécifique sont incubées une heure à 4°C sur les lignées U266 et Raji. Les intensités de médiane de fluorescence sont calculées pour chacune des concentrations d'Affitin sur un maximum de 10.000 cellules. La Figure 63 ainsi que le Tableau 13 montrent respectivement les courbes de saturation pour les Affitins positives pour les lignées U266 et Raji ainsi que la détermination de leur constante d'affinité à partir des courbes de saturation.

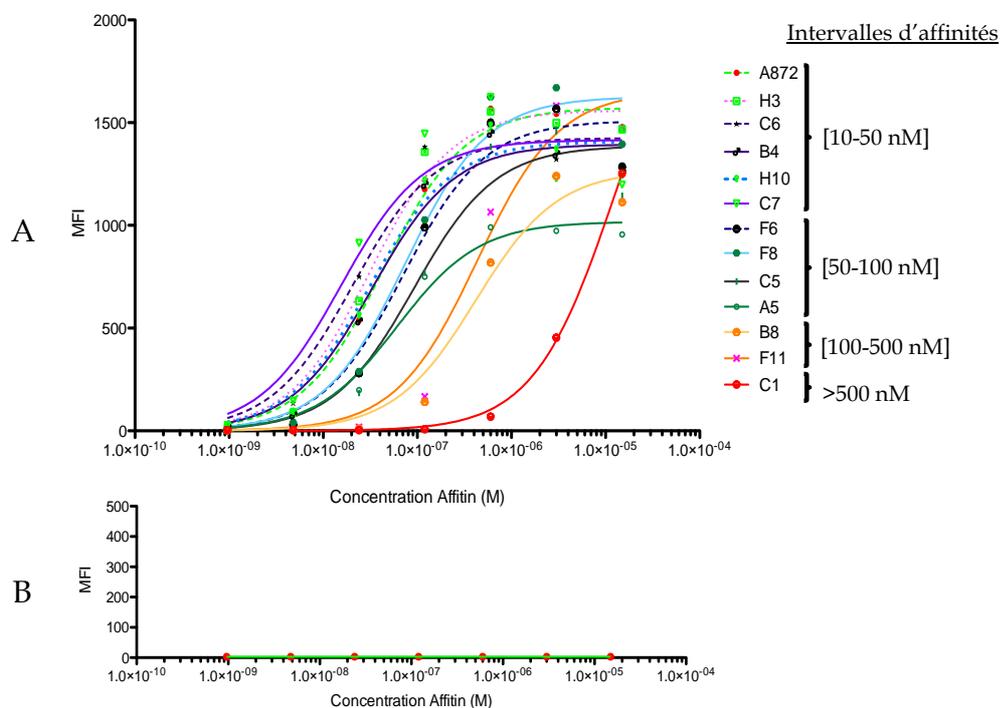


Figure 63 : Courbes de saturation obtenues sur la lignée U266 A) et sur la lignée Raji B), montrant les intensités de médiane de fluorescence en fonction de la concentration des Affitins sélectionnées contre CD138.

Nous observons une augmentation de l'IMF en fonction de la concentration pour les 13 Affitins testées pour la lignée U266 et aucun marquage n'est observé concernant la lignée Raji.

Affitin	A872	F11	H3	F6	C6	F8	B4
IMF max	1573	1655	1560	1510	1425	1626	1394
K_d (nM)	43,63 (±) 6,8	432,23 (±) 14,3	31,84 (±) 0,7	70,16 (±) 23,5	20,85 (±) 0,7	74,19 (±) 24,3	31,42 (±) 0,9
Coefficient de détermination	0,99	0,97	0,98	0,97	0,96	0,97	0,97
Affitin	H10	C7	C5	A5	B8	C1	
IMF max	1409	1416	1387	1018	1270	2328	
K_d (nM)	31,42 (±) 0,9	15,49 (±) 0,8	92,07 (±) 37,0	61,34 (±) 1,5	417,5 (±) 146,2	12780 (±) 1511	
Coefficient de détermination	0,97	0,90	0,95	0,98	0,97	0,99	

Tableau 13 : Ensemble des données obtenues pour la détermination des K_d (nM) des Affitins sélectionnées contre CD138

Conclusion

Le crible de 168 Affitins par FACS a permis d'en sélectionner 37 présentant des signaux positifs. Parmi ces 37 Affitins, une même séquence est retrouvée 19 fois (11% des Affitins criblées), et une autre séquence est retrouvée deux fois. In fine, 13 Affitins différentes sont produites puis purifiées à l'aide d'une chromatographie d'affinité suivie d'une filtration sur gel. Leurs rendements de production sont calculés et des gammes de concentrations sont utilisées pour réaliser des courbes de saturation afin de déterminer le niveau d'affinité pour CD138 dans un contexte natif en calculant leur K_d .

Les valeurs obtenues permettent de classer les Affitins dans différents intervalles d'affinité comme montrés dans la Figure 63. Nous avons sélectionné 6 Affitins présentant des K_d compris entre 10 et 50 nM (A872, H3, C6, B4, H10 et C7), 4 Affitins avec un K_d entre 50 et 100 nM (F6, F8, C5 et A5), 2 Affitins avec K_d entre 100 et 500 nM (B8 et F11) et enfin 1 Affitin avec un K_d supérieur à 500 nM (C1).

Le taux de production important d'A872, son profil d'éluion, ainsi que son affinité pour CD138 de l'ordre de la dizaine de nanomolaires nous a amené à choisir cette Affitin pour réaliser des études plus approfondies dans l'objectif de mieux la caractériser pour son développement comme vecteur radio-marqué.

IV. Etudes approfondies de l’Affitin anti-CD138 : A872

1. Etude de la spécificité et de l’affinité sur différentes lignées cellulaires humaines par cytofluorimétrie

Suite au criblage par FACS de 168 Affitins issues du pool de sélection, l’Affitin A872 est sélectionnée pour être étudiée plus spécifiquement. Des gammes de concentrations protéiques sont préparées et testées sur plusieurs lignées cellulaires présentant différents niveaux d’expression de CD138. Les lignées cellulaires utilisées pour cette partie ont été décrites précédemment au cours du chapitre III des résultats, excepté pour la lignée MDN. Il s’agit d’une lignée issue d’un patient atteint d’une leucémie à plasmocytes qui a été générée par l’équipe de Catherine Pellat (CRCNA). Cette lignée cellulaire présente une expression de CD138 avec un ratio d’IMF calculé pour signal MI15/isotype contrôle = 450 (Figure 64).

La Figure 62 regroupe les cytogrammes obtenus pour le marquage des lignées cellulaires U266, LP1, KMM1, MDN, Molt-4 et Raji avec l’anticorps MI15 et l’Affitin A872. Nous pouvons observer les IMF obtenues pour les cellules seules, l’isotype contrôle utilisé pour l’anticorps ou pour l’Affitin (respectivement IgG1 κ couplé PE ou Affitin C5 révélé avec l’anti-6-His PE) ainsi que les IMF obtenus pour MI15 et A872. La Figure 65 permet de visualiser l’ensemble des IMF obtenues pour chaque lignée en fonction de la concentration en Affitin A872.

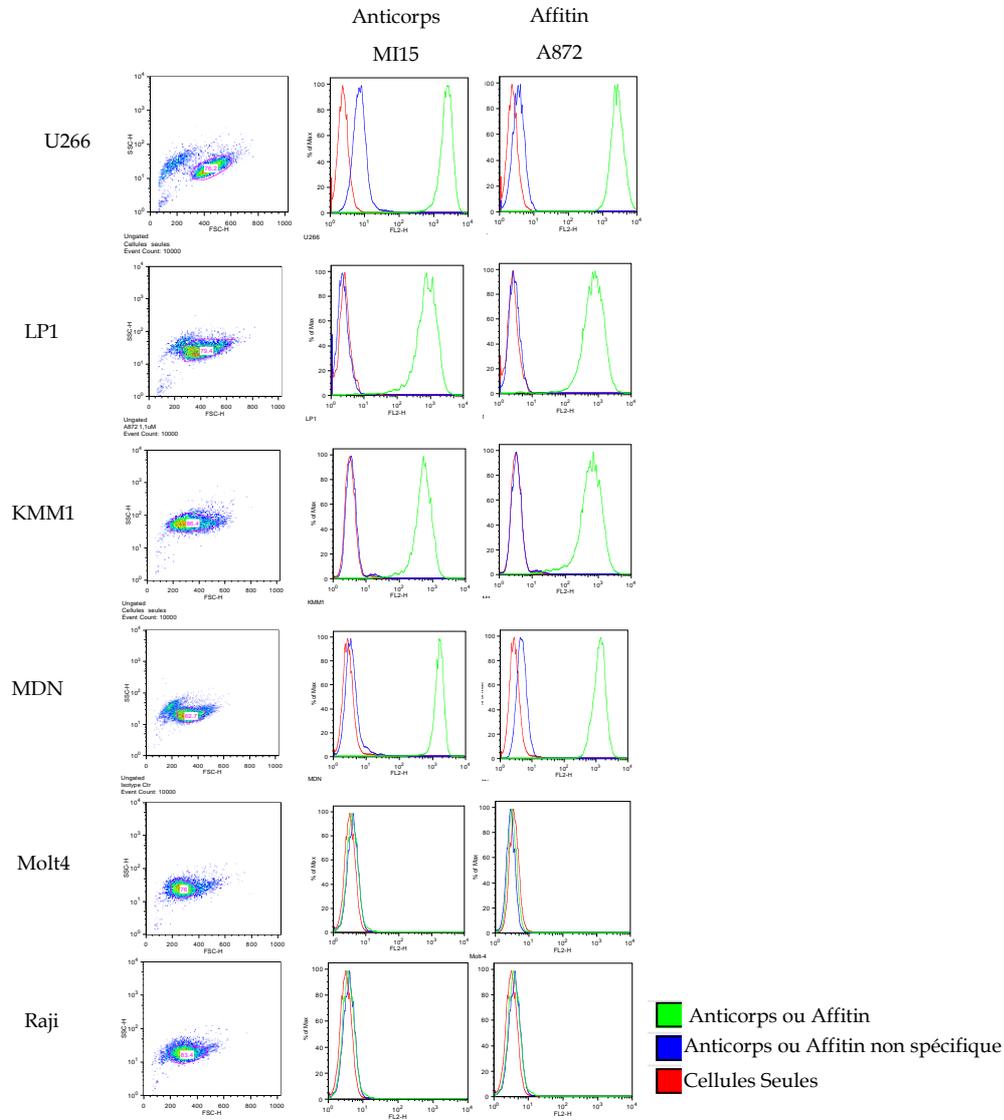


Figure 64 Cytogrammes regroupant les résultats obtenus pour les marquages de CD138 avec l'anticorps MI15 et Affitin A872 sur six lignées cellulaire différentes.

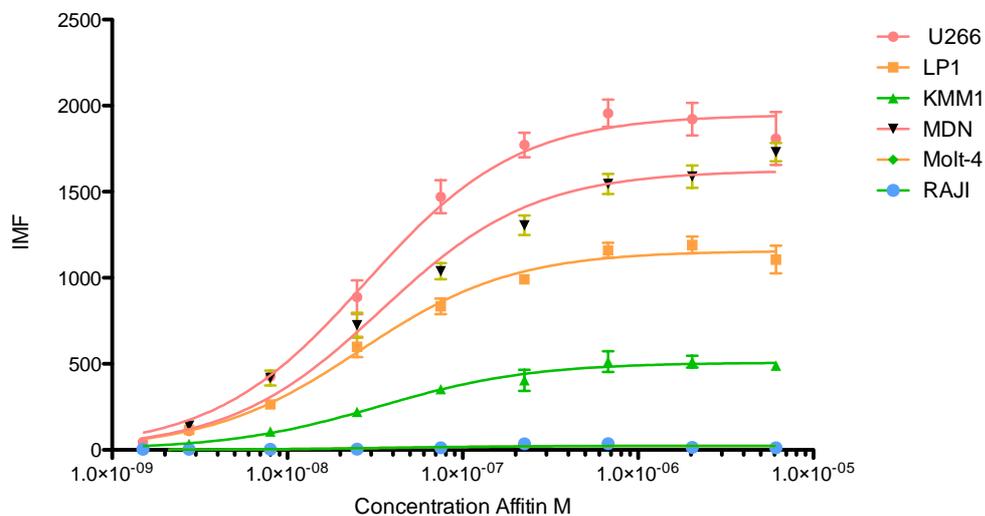


Figure 65 Courbes de saturation représentant les intensités de médiane de fluorescence en fonction de la concentration de l’Affitin A872 pour des lignées CD138⁺ (U266, LP1, KMM1, MDN) et CD138⁻ (Molt-4 et Raji)

Ces résultats montrent une spécificité de fixation d’A872 sur les lignées CD138⁺ comparées aux lignées cellulaires n’exprimant pas CD138. Les intensités de médiane de fluorescence maximum varient d’une lignée à l’autre dans la mesure où elles sont fonction du nombre de récepteurs présents à la surface membranaire (Figure 65). Nous pouvons remarquer que cette variation d’IMF max est identique à celle observée pour l’anticorps MI15 (Figure 64).

	U266	LP1	KMM1	MDN
IMF max	1948	1157	507,5	1626
Kd (nM)	28,0 (±) 0,35	26,0 (±) 0,31	33,6 (±) 0,57	34,3 (±) 0,47
Coefficient de détermination	0,98	0,97	0,96	0,97

Tableau 14 : Résultats obtenus lors du calcul de la constance d’affinité d’A872 pour les différentes lignées cellulaires.

Les valeurs d'IMF obtenus pour chaque lignée cellulaire permettent de calculer la constante de dissociation d'A872 (Tableau 14). Son K_d est estimé entre 26 et 34 nM en fonction des lignées cellulaires.

2. Etude de réactivité croisée sur différentes lignées cellulaires

Deux lignées cellulaires : 5T33 et CHO-CD138^{Canin+} exprimant respectivement CD138 murin et canin sont utilisées afin d'étudier une possible réactivité croisée d'A872. La lignée CHO non transfectée par le gène codant pour le CD138 canin est utilisée comme contrôle négatif. Le marquage des différentes lignées est réalisé avec une gamme de concentration d'A872.

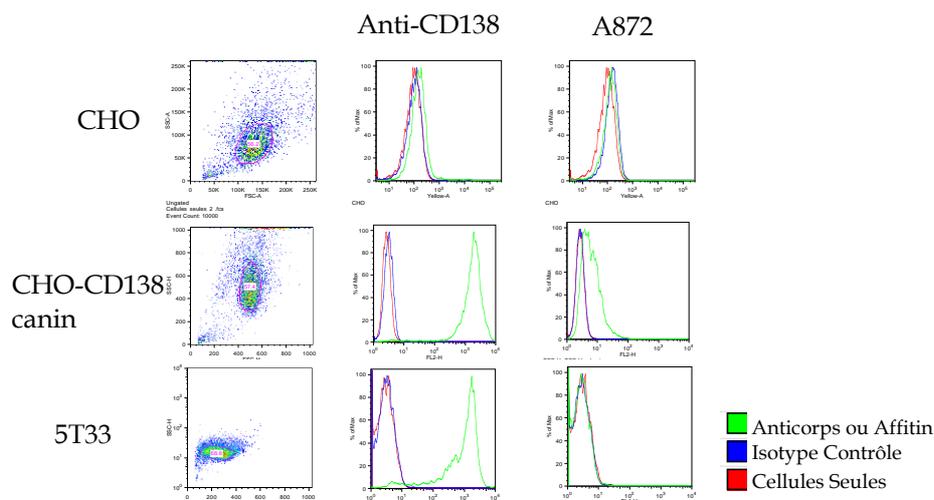


Figure 66 Cytogrammes décrivant le marquage d'A872 (5 µM) sur des lignées cellulaires exprimant CD138 murin et canin.

	Type cellulaire et organisme	Anti-CD 138			Affitin	
		Cellules seules	Isotype contrôle	Anti-CD 138 murin (9e7)	Isotype contrôle	A872
CHO	Epithélium ovarien hamster	92,8	104	151	151	132
CHO-CD138 canin	Epithélium ovarien hamster	2,62	3,08	1946	2,67	5,52
5T33	Myélome multiple murin	2,46	2,76	1263	3,22	3,62

Tableau 15: IMF obtenues pour les différentes lignées cellulaires utilisées pour l'étude de réactivité croisée.

Les résultats de la Figure 66 et le tableau 15 montrent que l'Affitin A872 ne se fixe pas sur CD138 murin ni CD138 canin indépendamment de la concentration testée. En effet, pour les lignées cellulaires CHO-CD138 canin et 5T33 exprimant respectivement le CD138 canin et murin (ratio signal spécifique/non spécifique : 648 pour CHO-CD138 et 457 pour la 5T33) nous n'observons aucun déplacement significatif de l'IMF pour l'Affitin A872 (ratio égal à 2 pour CHO-CD138 et 1 pour la 5T33).

Au regard des expérimentations réalisées, soit le marquage sur les lignées humaine, murine et canine, on constate que A872 ne présente pas de réactivité croisée pour les espèces murine ou canine et est donc spécifique au CD138 humain.

3. Etude de la stabilité d'A872

3.1. Stabilité chimique et thermique

Un des intérêts majeurs de la charpente protéique des Affitins est leur grande stabilité thermique et chimique, ce qui leur confère un avantage par rapport aux anticorps qui restent fragiles à toute dénaturation pouvant être occasionnée lors d'un processus de marquage radioactif.

L'objectif visé de ce travail est de réaliser un marquage radioactif d'une Affitin anti-CD138 afin de bénéficier de sa petite taille moléculaire pour réaliser des images phénotypiques chez le petit animal. Avant les essais de marquage il est nécessaire

d'explorer la stabilité de la protéine d'intérêt aux changements de tampon (acide ou basique) et de température (chauffage jusqu'à 100°C) afin de s'assurer de l'innocuité de ces traitements sur son activité biologique. L'Affitin A872 est par conséquent soumise à différents traitements puis un test en cytofluorométrie avec une gamme de concentration sur les lignées cellulaires U266 et Raji est réalisé.

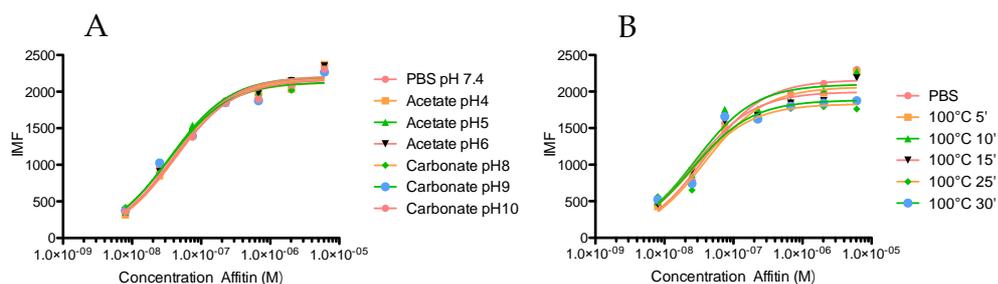


Figure 67: Mesure de l'activité biologique d'A872 après 12 heures d'incubation à température ambiante dans un tampon acétate et carbonate à différents pH (A), et après chauffage à 100°C jusqu'à 30 minutes en tampon acétate pH=4 (B) sur la lignée U266.

La Figure 67 regroupe les résultats obtenus pour le marquage de la lignée cellulaire U266 avec A872 après incubation en tampon acétate ou tampon carbonate pendant 12 heures, ou après chauffage en tampon acétate pH=4 à 100°C de 5 minutes à 30 minutes. Les IMF enregistrées en fonction de la concentration en Affitin obtenus pour les protéines ayant subies ces différents traitements restent inchangées et aucun marquage n'est observé pour la lignée Raji. Ces résultats mettent en évidence la conservation de l'activité biologique et sa stabilité de l'Affitin à la fois en milieu acide ou basique et après chauffage à 100°C en milieu acide.

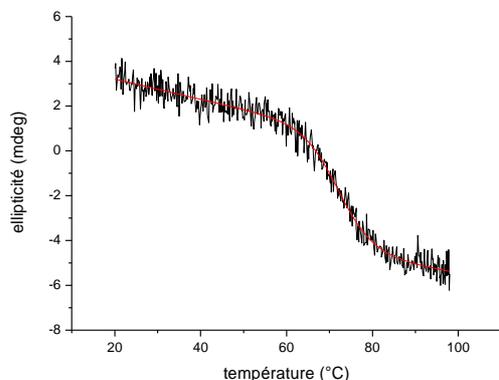


Figure 68 Etude de la stabilité thermique par dichroïsme circulaire

Une étude de stabilité thermique par dichroïsme circulaire permet de calculer la T_m (température de fusion) de la protéine à $72,3^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$), soit la température à laquelle 50% de la structure protéique est dénaturée (Figure 68). Un chauffage de la protéine à 100°C déstructure par conséquent quasiment la totalité des protéines. La conservation de l'activité biologique d'A872 après un chauffage de 100°C pendant 30 minutes démontre une capacité de renaturation après une dénaturation.

Les études de marquage avec A872 et sa révélation à la surface membranaire à l'aide d'un anticorps anti-6-HIS couplé à la phycoérythrine sont également réalisées sur la lignée contrôle Raji et en utilisant l'Affitin C5 comme protéine irrelevante. Les résultats restent inchangés par rapport à ceux obtenus lors des études précédentes.

3.2. Stabilité dans du sérum humain à 37°C

Pour observer la stabilité de l'Affitin A872 dans le sérum, celle-ci est incubée dans du sérum humain à 37°C de 15 à 60 minutes. Puis A872 est reprise dans du PBS à différentes concentrations pour réaliser un marquage sur les lignées cellulaires U266 et Raji. Les intensités de médiane de fluorescences obtenues pour la lignée U266 sont présentées dans la Figure 69, et aucun marquage n'est observé pour la lignée Raji.

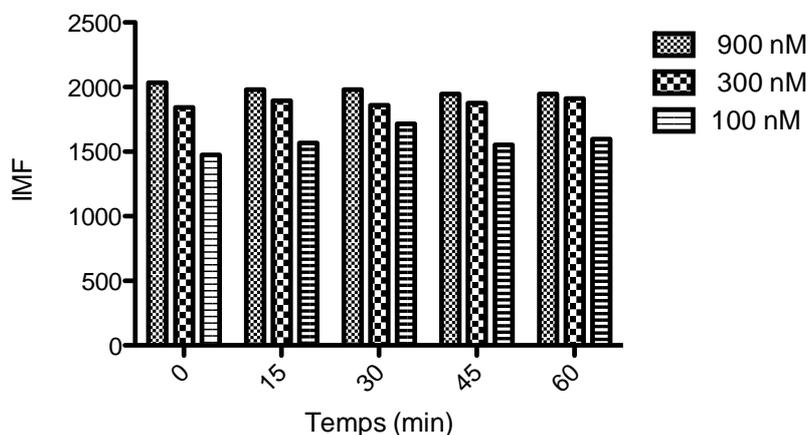


Figure 69 Histogrammes des IMF obtenues après marquage des cellules U266 par A872 incubé pendant différents temps dans du sérum humain à 37°C.

L'incubation d'A872 dans du sérum humain à 37°C jusqu'à 60 minutes n'a aucun effet sur son activité biologique car il n'y a pas de variation significative de l'IMF en fonction du temps d'incubation. La protéine présente donc une bonne résistance aux protéases contenues dans le sérum.

4. Etude de microscopie confocal

4.1. Production d'A872 sous forme de protéine de fusion couplée à la GFP

Comme réalisé précédemment avec l'Affitin A6, le gène codant pour l'Affitin A872 est cloné dans un vecteur d'expression permettant de produire la protéine fusionnée à la GFP. Après vérification de la séquence protéique, la protéine de fusion est produite, purifiée et utilisée pour réaliser des marquages sur des lignées cellulaires afin d'effectuer des mesures en cytofluorimétrie et en microscopie confocal. La Figure 70 représente une modélisation de la structure tridimensionnelle d'A872-GFP ainsi qu'un alignement des séquences peptidiques des protéines A872, A872-GFP et GFP.

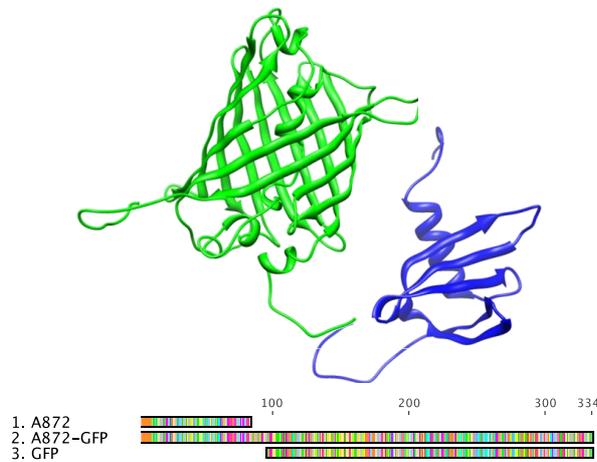


Figure 70 Modélisation de structure tridimensionnelle de la protéine de fusion A872-GFP ainsi que l'alignement de sa séquence peptidique avec A872 et la GFP

4.2. Mesure en cytofluorimétrie de la protéine A872-GFP sur les lignées U266, KMM1 et Raji

Des gammes de concentrations protéiques sont préparées à partir de la solution mère d'A872-GFP pour effectuer un marquage sur les lignées CD138⁺ (U266 et KMM1) et la lignée CD138⁻ (Raji). Une Affitin non spécifique couplée à la GFP est utilisée comme contrôle négatif.

Les courbes de saturation obtenues après compilation des données enregistrées sont représentées dans la figure 71. Une baisse importante de l'IMF max est observée, en raison du rendement quantique de la GFP par rapport à la phycoérythrine. Cependant, une baisse significative d'affinité est également observée pour la protéine de fusion comparée à A872 seul. Une approximation du K_d pour A872-GFP sur les lignées U266 et MDN donne respectivement 1,9 μ M et 1,5 μ M.

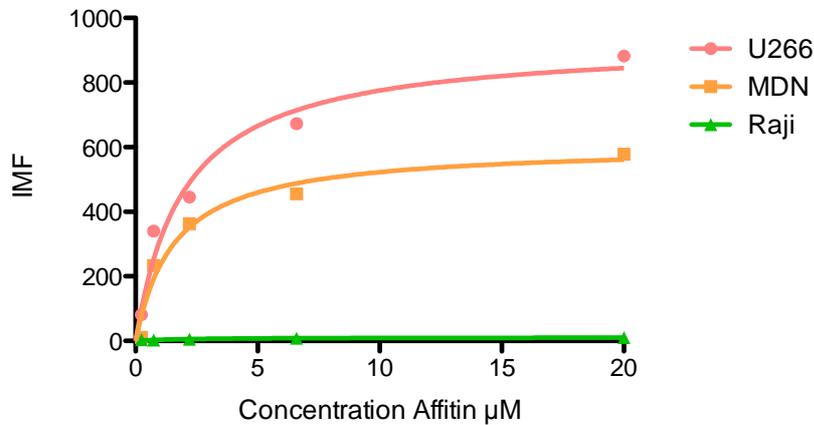


Figure 71 : Courbes de saturation d'IMF en fonction de la concentration en A872-GFP pour les lignées cellulaires U266, KMM1 et Raji.

4.3. Utilisation d'A872-GFP comme outil pour la microscopie

Malgré la perte d'affinité observée en cytofluorimétrie, l'Affitin A872 fusionnée à la GFP présente toujours une spécificité pour CD138 et peut, par conséquent être utilisée comme outil de marquage, notamment pour réaliser des clichés en microscopie confocal qui permettront d'étudier plus précisément la fixation de l'Affitin A872 sur son récepteur.

Les lignées cellulaires U266 et Raji sont utilisées pour cette étude. Les cellules sont marquées avec la protéine de fusion A872-GFP et C5-GFP (Affitin non spécifique) ainsi qu'avec l'anticorps anti-CD138 B-B4 couplée dylight 640 utilisé ici comme témoin positif.

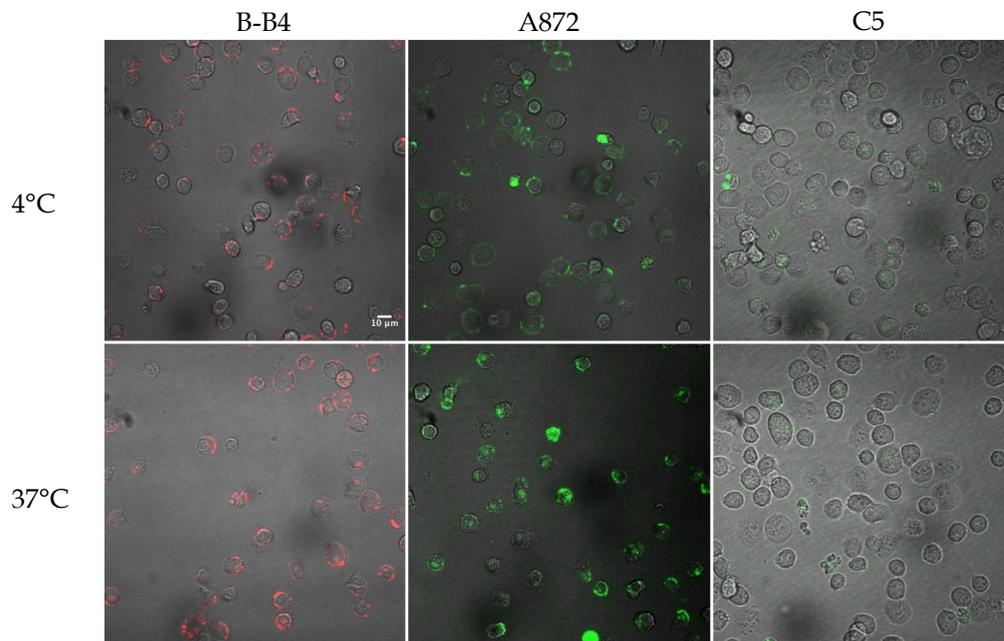


Figure 72 : Clichés de microscopie réalisés sur la lignée U266 avec A872-GFP, ainsi que C5-GFP et B-B4 couplé dylight 640.

Les clichés regroupés dans la Figure 72 montrent un marquage membranaire très net pour la lignée U266. L'intensité du marquage reste inchangé en fonction de la température, cependant davantage de protéines internalisées sont observées lorsque les cellules sont incubées à 37°C lors du marquage avec l'Affitins A872 ou avec l'anticorps anti-CD138 B-B4 (Figure 74). De plus, nous n'observons aucun marquage membranaire pour l'Affitin non spécifique C5 - GFP pour la lignée U266 (Figure 72).

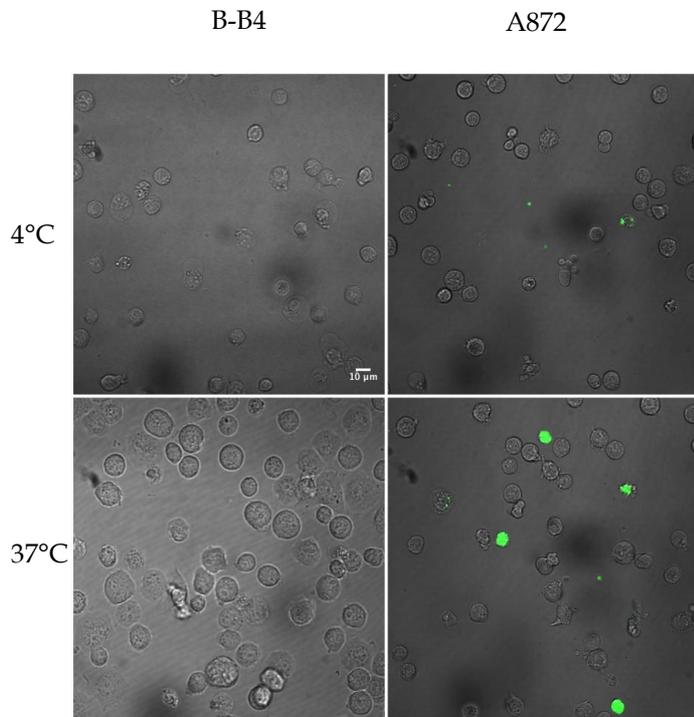


Figure 73 : Clichés de microscopie réalisés sur la lignée Raji avec A872-GFP, ainsi que B-B4 couplé dylight 640.

Les clichés de microscopie réalisés sur la lignée contrôle Raji après incubation avec l'anticorps B-B4 et l'Affitin A872 ne montrent aucun marquage (Figure 73). Les points fluorescents observés pour les marquages avec A872 correspondent à des cellules mortes ayant absorbées de l'Affitin A872-GFP.

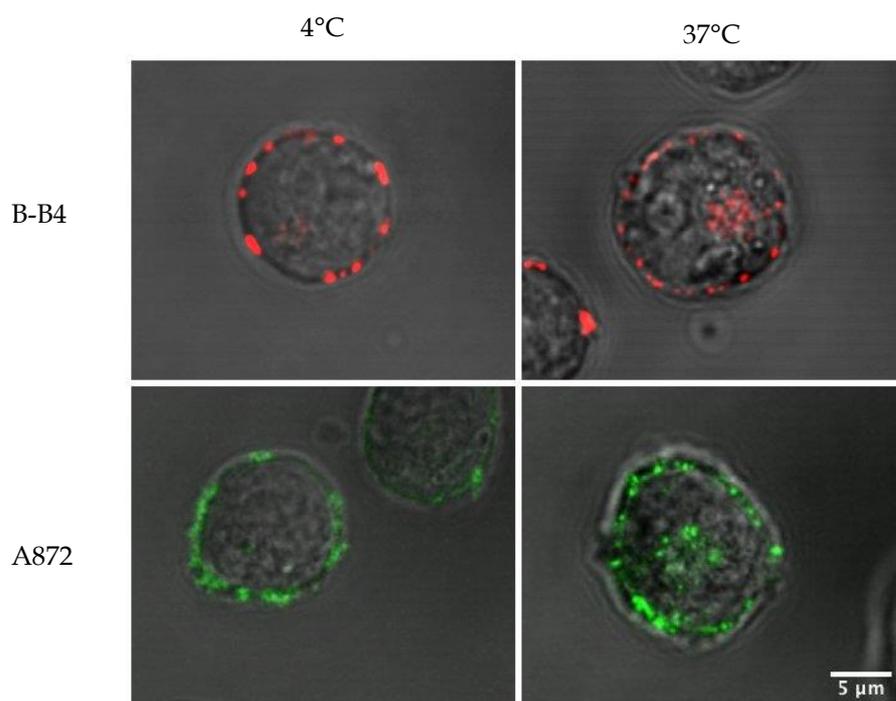


Figure 74: Clichés de microscopie montrant des cellules U266 marquées avec A872-GFP et avec B-B4 à 4°C ou à 37°C.

4.4. Etude de redistribution de fluorescence après photoblanchiment

Le matériel technique mis à disposition au sein de la plateforme de microscopie permet également de réaliser des études de redistribution de fluorescence après photoblanchiment ou FRAP (« Fluorescence recovery after photobleaching »). Cette technique permet d'étudier la mobilité moléculaire d'une protéine fluorescente en inhibant de manière irréversible sa fluorescence dans une zone de fixation membranaire restreinte à l'aide d'un flash lumineux. Une analyse de la cinétique de la récupération de la fluorescence apportée par l'Affitin, correspondant aux molécules s'étant redistribuées dans la zone blanchie, permet une appréciation de la dynamique de CD138 au sein de la membrane plasmique (Figure 75).

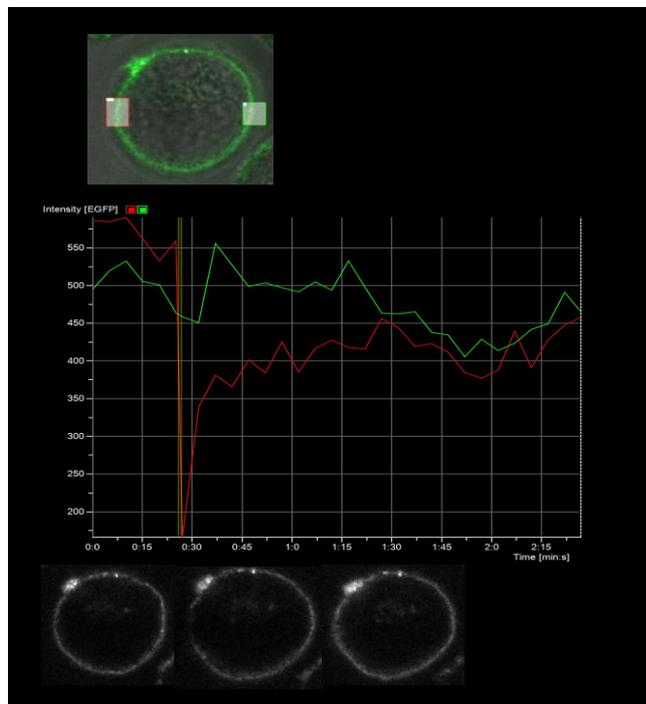


Figure 75 : Cinétique de redistribution de fluorescence après photoblanchiment avec clichés photographiques montrant les zones membranaires sélectionnées ainsi que la disparition de la fluorescence sur la zone de blanchiment

Après le blanchiment de la zone sélectionnée (encadré rouge) on observe un retour de la fluorescence au niveau contrôle (encadré vert) au bout d'une minute. Même si il est nécessaire de réaliser cette expérience sur plusieurs cellules afin d'obtenir des données statistiquement exploitables, cet essai permet néanmoins d'apprécier la dynamique de CD138 dans son contexte membranaire.

V. Etude *in vivo* des Affitins

1. Biodistribution de l’Affitin A6 après marquage à l’iode 125

Parallèlement au criblage du pool de sélection n°7 par cytofluorimétrie, une étude de la biodistribution de l’Affitin A6 est réalisée. Le marquage radioactif de protéines peut être réalisé à l’aide de l’iode 125 qui est habituellement utilisé pour la plupart des analyses immunochimiques. Cet isotope a une demi-vie longue (59,4 jours) et émet un rayonnement γ de faible énergie (35 keV). Le radiomarquage de l’Affitin est effectué à l’aide d’un précurseur stannique méthylié (SnMe_3 : N-succinimidyl 3-triméthylstannyl-benzoate) (cf. matériels et méthodes). Le précurseur est dans un premier temps marqué à l’iode 125 puis, après purification sur une colonne d’HPLC il est couplé à l’Affitin par une réaction de substitution nucléophile réalisée sur les amines primaires de la protéine.

Après réaction et purification, 500 μg d’Affitin ont été radiomarkés et nous avons injecté 3,7 μg d’Affitin par souris en intraveineux pour réaliser l’étude de biodistribution. Pour chaque temps (5’, 15’, 30’, 1 h, 2h, 4h, 7h, 16h, 24h et 72h) nous avons utilisés 3 souris KaLwRij naïves. Suite à l’injection de l’Affitin radiomarkée les souris sont sacrifiées, les organes sont prélevés, pesés et un comptage de la radioactivité est réalisé. Le traitement des informations obtenues permet de représenter le pourcentage de dose injectée par gramme pour chaque organe sous forme d’histogrammes dans les Figures 76 et 77. Les résultats obtenus mettent en évidence une pharmacocinétique rapide de l’Affitin. Cinq minutes après l’injection 40% de la dose injectée est présente au niveau des reins. Dix minutes après, le pourcentage de dose injectée passe à 16% et continue à diminuer pour atteindre 2,4% à 2 heures. Nous observons donc une élimination rénale importante de la protéine sans accumulation. Vingt cinq pourcent de la dose injectée est retrouvée dans le foie à 5 minutes, le pourcentage augmente jusqu’à 35% à 15 minutes puis diminue pour atteindre 6% à 2 heures et 1,6% à 4 heures (Figure 78). Comme pour le rein aucune accumulation n’est observée pour cet organe. Concernant les autres organes explorés,

un pourcentage maximum de 13% est observé dans la rate à 5 minutes, il passe à 6,8% à 30 minutes et à 3% à 2 heures. La même pharmacocinétique est observée dans les autres organes comme les poumons, l'intestin, l'estomac ou le cœur qui correspond à la perfusion des organes par le sang véhiculant l'Affitin radiomarquée.

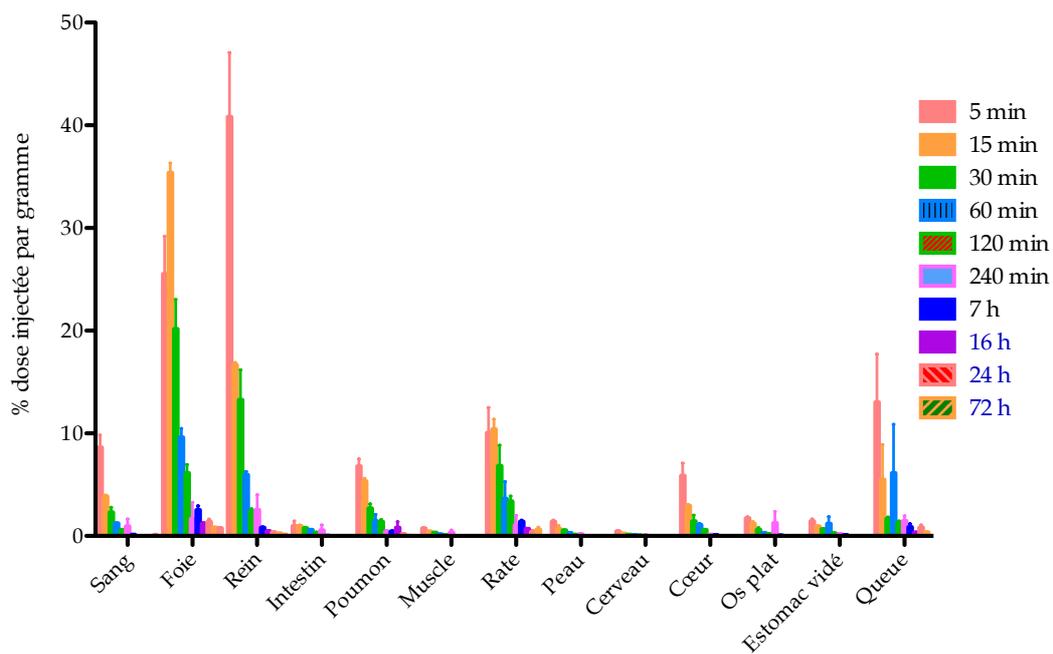


Figure 76: Biodistribution de l'Affitin A6 marquée à l'iode 125 dans des souris KaLwRij naïves de 5 minutes à 72 heures après injection par voie intraveineuse.

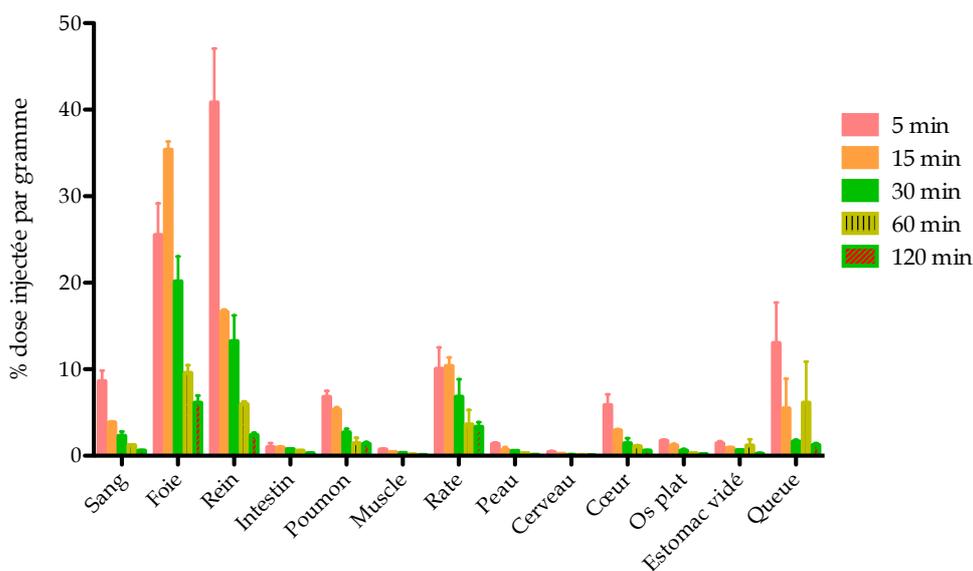


Figure 77: Biodistribution de l’Affitin A6 marquée à l’iode 125 dans des souris KaLwRij naïves de 5 minutes à 2 heures après injection par voie intraveineuse.

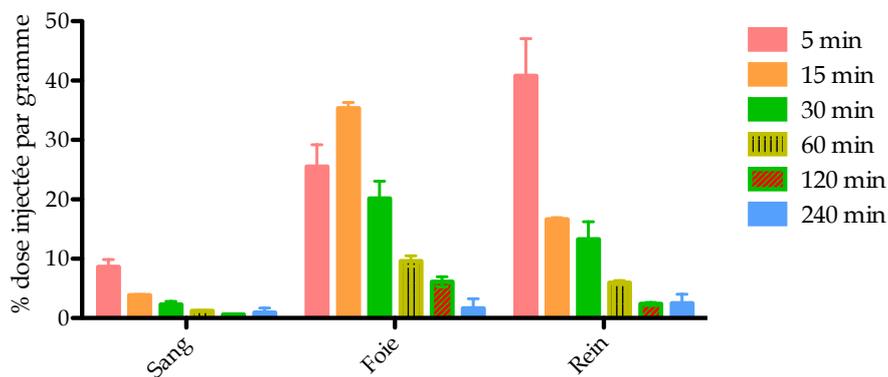


Figure 78: Biodistribution de l’Affitin A6 marquée à l’iode 125 dans des souris KaLwRij naïves de 5 minutes à 4 heures.

La Figure 77 montre la biodistribution de l’Affitin A6 pour l’ensemble des organes de 5 minutes à 2 heures post-injection, et la Figure 78 présente la radioactivité comptée au niveau du sang, du foie et du rein de 5 minutes à 4 heures après l’injection.

2. Biodistribution d'A872 dans un modèle de xéngreffe de cellules MDN en sous cutané chez la souris CB17-SCID

2.1. Descriptif du model utilisé

15 souris CB17-SCID âgées d'un mois sont injectées en sous-cutané avec 10 millions de cellules MDN. Suite à l'injection des cellules cancéreuses, le développement d'une masse tumorale est observé (Figure 79 B). Les volumes tumoraux sont mesurés extemporanément à la biodistribution et sont présentés dans la figure 79 A, le volume moyen est calculé à 490 mm³.

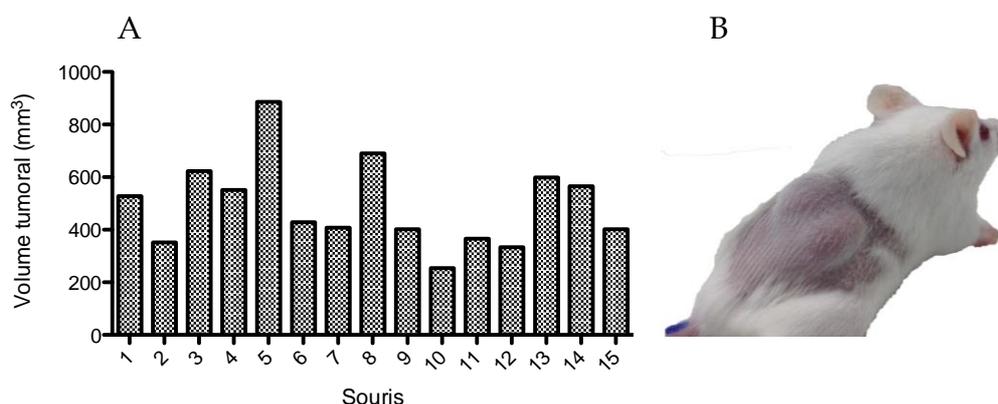


Figure 79: A) Histogramme présentant les volumes tumoraux des souris utilisées pour la biodistribution. B) Photo d'une souris CB17-SCID avec une xéngreffe de cellules MDN en sous cutanée.

Dans l'objectif de mieux caractériser le modèle animal utilisé, nous avons révélé l'expression de CD138 à l'aide de l'anticorps B-B4 en réalisant un marquage direct sur une coupe histologique de tumeur (Figure 80). De plus, une coloration hémateïne éosine safran (HES) est réalisée sur des coupes histologiques de rein, de foie et de tumeur (Figure 81). Le marquage de B-B4 sur une coupe histologique de tumeur issue de notre modèle murin met en évidence une expression membranaire de CD138. La coloration HES sur les coupes histologiques de tumeur permet

d'observer la présence de vaisseaux sanguins indifférenciés et anormaux (absence d'endothélium bordant les vaisseaux) (Figure 81 C et D) comparés aux vaisseaux normaux observés dans les coupes histologiques du rein ou du foie (Figure 81 A et B). De plus nous pouvons observer une densité cellulaire très importante au niveau des coupes tumorales due à une pression interstitielle importante.

B-B4

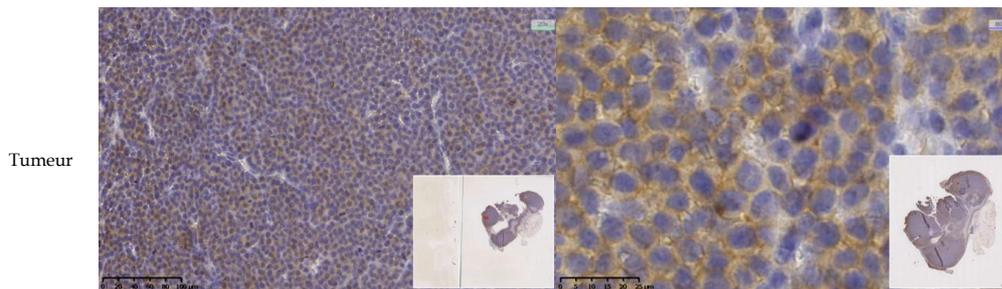


Figure 80 : Clichés de coupes histologiques avec révélation de CD138 dans la tumeur à l'aide de l'anticorps B-B4 utilisé en marquage direct sur la coupe histologique, grossissement x20 et x80.

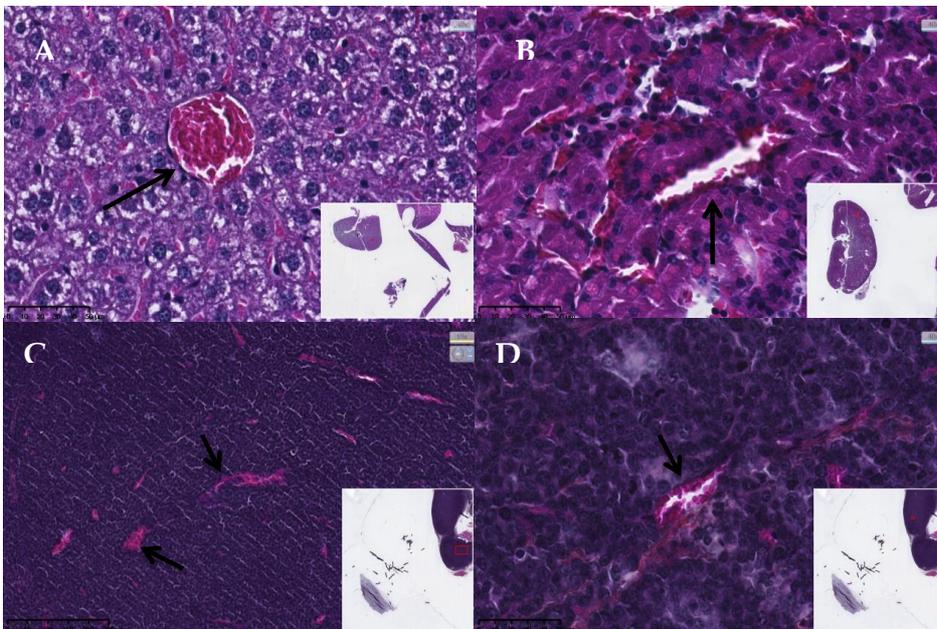


Figure 81 : Coloration HES sur coupes histologiques de foie (A), de rein (B) x40 et de tumeur (C x10 et D x40).

2.2. Biodistribution de l'Affitin A872

Après développement tumoral, les souris sont injectées en intraveineux avec 10 µg d'A872 (protéine nue) ou 10 µg d'Affitin C5 servant ici de protéine contrôle. Suite à l'injection intraveineuse des Affitins les souris sont sacrifiées à différents temps : 30, 60, 90, et 120 minutes. Ces temps de cinétique sont choisis au regard des résultats précédemment obtenus pour la biodistribution de l'Affitin A6. La tumeur et les organes (reins, foie, rate, poumons) sont prélevés pour chaque souris et conservés dans du formol 4% pendant 24 heures. Tous les organes et les tumeurs sont inclus en paraffine et des coupes histologiques sont ensuite réalisées. La présence des Affitins est mise en évidence à l'aide d'un anticorps anti-6-His couplé HRP.

Les résultats des Figure 82 et 83 mettent en évidence un marquage de l'Affitin A872 spécifique de la tumeur. Nous observons en effet un marquage tumoral très important jusqu'à 60 minutes après l'injection. Pour les temps plus tardifs, la fixation au niveau de la tumeur diminue mais elle est toujours visible à 90 ainsi qu'à 120 minutes après l'injection. La présence d'A872 est clairement mise en évidence dans les reins 30 minutes post-injection. Au temps 60 minutes et aux temps plus tardifs, aucun marquage n'est observé au niveau du rein ce qui traduit l'élimination rénale de la protéine et l'absence d'accumulation au niveau de cet organe. Enfin aucune fixation de la protéine n'est observée au niveau du foie pour l'ensemble des temps sélectionnés. Ces résultats sont en accord avec la biodistribution de l'Affitin A6.

Les résultats obtenus pour la biodistribution de l'Affitin C5 sont présentés dans les Figures 84 et 85. Nous pouvons observer la présence de l'Affitin au niveau du rein 30 minutes après son injection en intraveineux. La protéine est rapidement

éliminée et elle n'est plus observée pour des temps plus tardifs. Concernant les coupes histologiques de tumeurs ou de foies aucun marquage n'est observé.

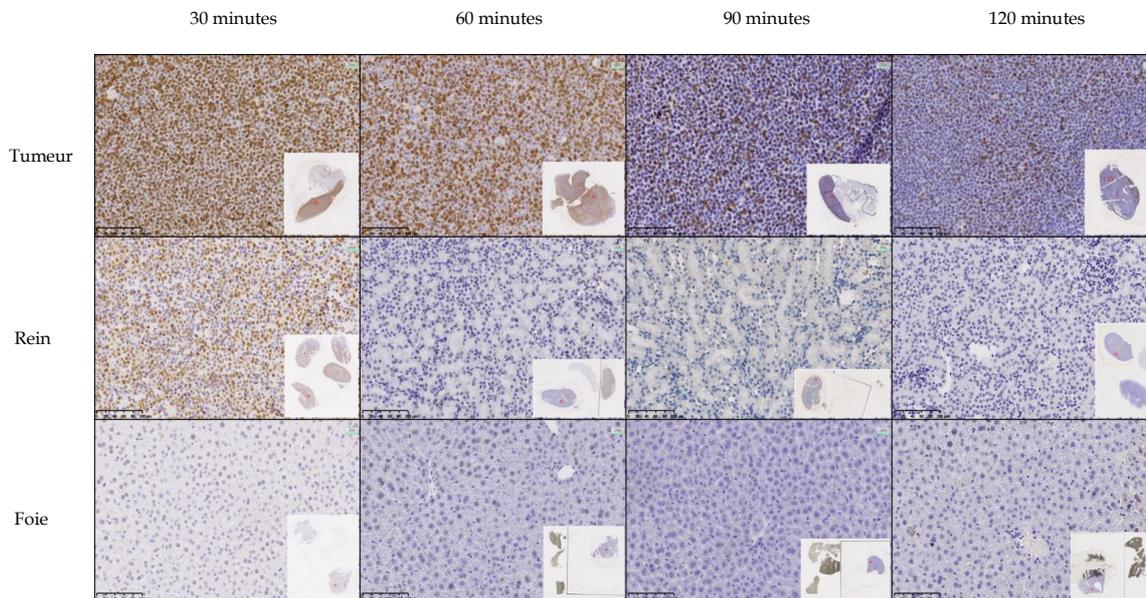


Figure 83 : Clichés de coupes histologiques avec révélation d'A872 dans les tumeurs, reins, et foies à l'aide de l'anticorps anti-6-His à différents temps après injection par voie intraveineuse, grossissement x20.

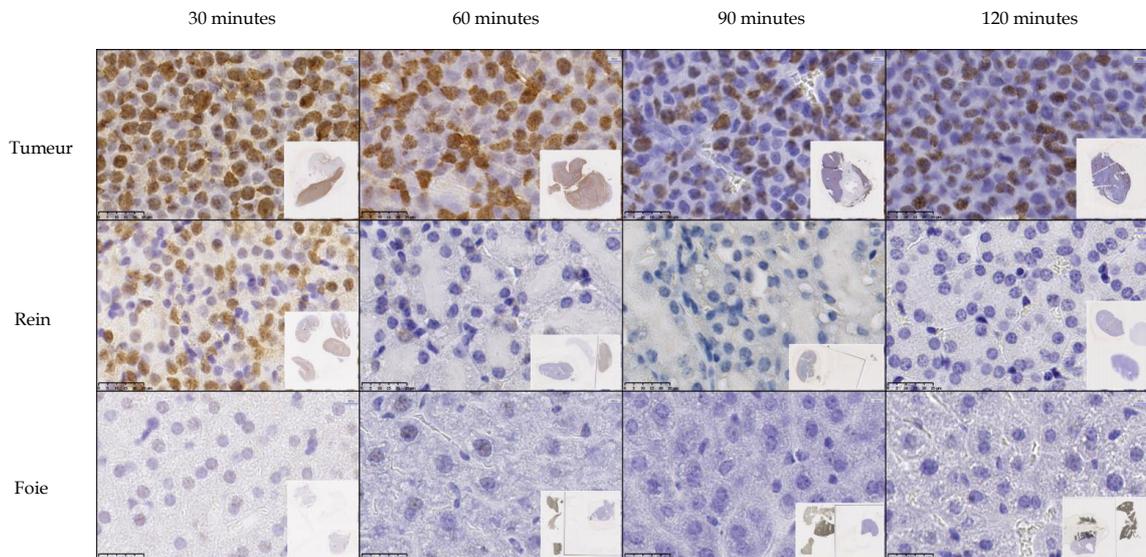


Figure 82 : Clichés de coupes histologiques avec révélation d'A872 dans les tumeurs, reins, et foies à l'aide de l'anticorps anti-6-His à différents temps après injection par voie intraveineuse, grossissement x80.

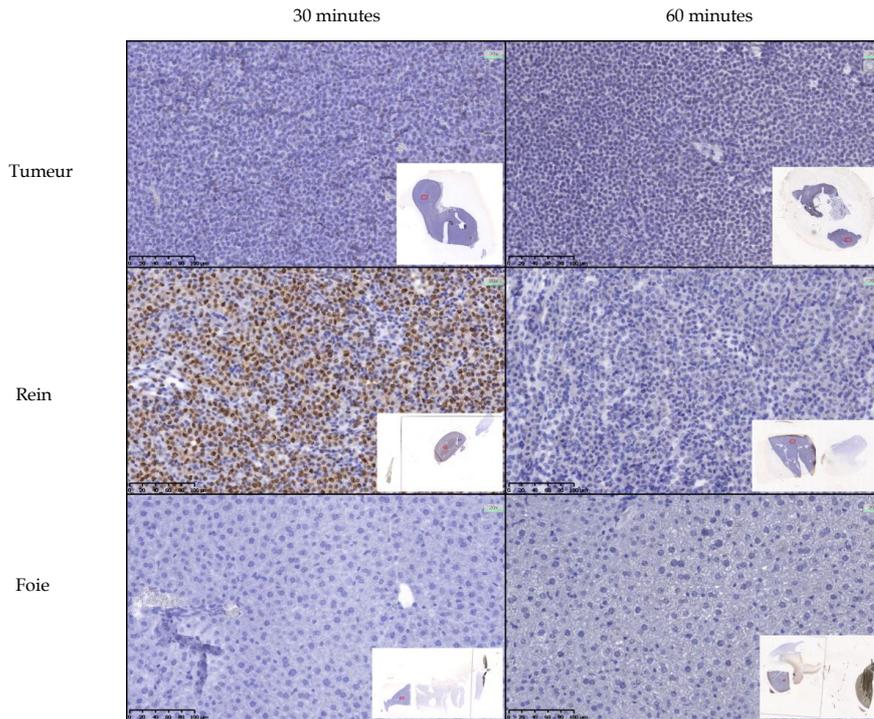


Figure 84 : Clichés de coupes histologiques avec révélation de l’Affitin C5 dans les tumeurs, reins, et foies à l’aide de l’anticorps anti-6-His à différents temps après injection par voie intraveineuse, grossissement x20.

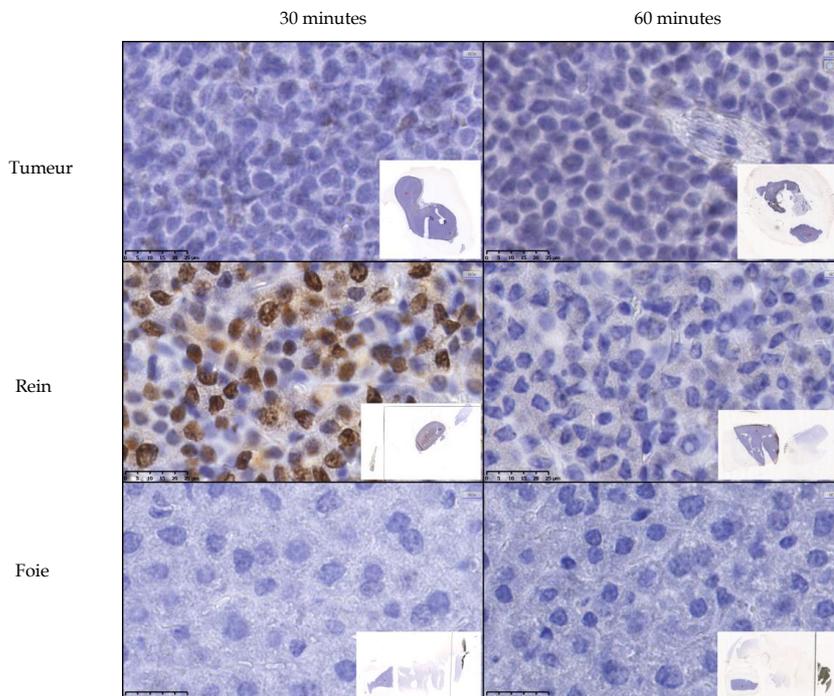


Figure 85: Clichés de coupes histologiques avec révélation de l’Affitin C5 dans les tumeurs, reins, et foies à l’aide de l’anticorps anti-6-His à différents temps après injection par voie intraveineuse, grossissement x80.

L
'injection

n par voie intraveineuse de l’Affitin à boucle A6 après son marquage à l’¹²⁵I dans des souris KaLwRij naïves a permis de mettre en évidence une biodistribution rapide de ce scaffold. Le faible poids moléculaire des Affitins autorise une élimination glomérulaire importante et aucune accumulation dans les organes des souris n’est observée.

L’injection par voie intraveineuse de l’Affitin anti-CD138 A872 dans un modèle murin xénogénique a démontré son efficacité de ciblage sur les cellules tumorales exprimant CD138 *in vivo*. De plus, A872 n’a montré aucune fixation aspécifique dans les organes périphériques explorés comme les reins, le foie, la rate, ou les poumons. Par conséquent le ciblage tumoral rapide de cette Affitin anti-CD138 cumulé à son élimination rénale rapide, nous autorise à penser que cette protéine est un bon candidat pour être utilisée comme vecteur d’isotopes radioactifs à demi-vie courte dans l’objectif de réaliser de l’imagerie phénotypique.

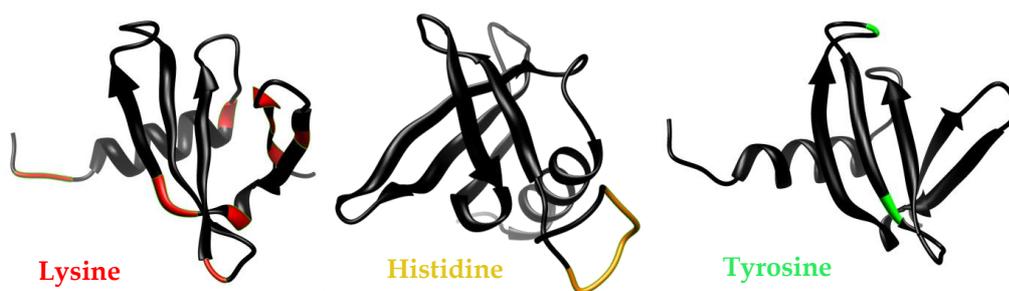
VI. Etude du radiomarquage de l’Affitin A872

L’objectif de cette partie de la thèse est d’obtenir un radiomarquage de l’Affitin A872 sans que celui-ci n’interfère avec son activité biologique, soit la reconnaissance de CD138 exprimé à la surface membranaire.

1. Marquage de l’Affitin A872 avec l’iodogène et le SIB

Deux types de marquage sont réalisées avec l’iode-125 : un marquage avec une méthode à l’iodogène, l’autre méthode utilise un synthon le SIB qui est marqué à ^{125}I , puis couplé à la protéine.

Concernant la première méthode, de l’iodure-125 (NaI) est oxydé en iode 125 (I_2) qui attaque les chaînes latérales de la tyrosine et de l’histidine par substitution électrophile (Figure 86). La seconde méthode utilise un synthon marqué à l’iode 125, le SIB, qui cible les amines primaires des chaînes latérales des résidus lysines. La figure 44 permet de visualiser pour chacune des méthodes de marquages, la zone de



l’Affitin A872 impliquée.

Figure 86: Modélisations de la structure protéique de l’Affitin A872 montrant la présence des résidus lysines (11), histidines (6) et tyrosines (2).

Suite à l'incubation de l'Affitin dans les solutions réactives permettant le marquage radioactif de la protéine, la protéine marquée est séparée du produit de marquage libre par gel filtration. Les fractions contenant la protéine marquée sont récupérées et la concentration protéique de la solution est déterminée. Afin de vérifier le maintien de l'activité biologique de la protéine marquée, nous réalisons un test scatchard pour les protéines radiomarquées.

Les essais de réactivité biologique sont réalisés avec la lignée cellulaire U266 et la lignée contrôle Raji. Les Affitins radiomarquées à l'iode 125 par la méthode de l'iodogène ou à l'aide du SIB sont utilisées pour faire des gammes de concentrations. Les protéines sont ensuite incubées 1 heure à 4°C avec 150 000 cellules. De plus, nous procédons à l'ajout d'Affitins « froides » en large excès (x50) pour les différents points de concentrations utilisés, ce qui permet de déterminer le bruit de fond de l'expérience qui correspond à la fixation non spécifique des Affitins. Les cellules sont ensuite séparées du surnageant de marquage à l'aide d'un mélange de dibutyl phthalate/paraffine et d'une centrifugation à 12000 tr/min pendant 3 minutes. L'activité radioactive fixée au niveau des cellules est ensuite comptée à l'aide d'un compteur gamma pendant 10 secondes. La compilation des données obtenues nous permet de tracer les courbes de fixation (Figure 87). Les résultats obtenus montrent une augmentation du nombre de cpm en fonction de la concentration en Affitin sans plateau de saturation. En outre la droite correspondant au bruit de fond de l'expérience est quasiment identique à celle obtenue pour la fixation spécifique des Affitins sur les cellules. Par conséquent nous pouvons conclure à la perte de l'activité des Affitins radiomarquées.

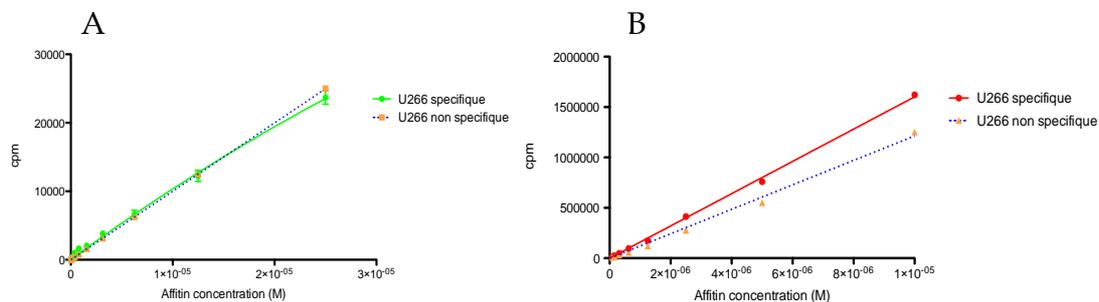


Figure 87: A) courbe de fixation obtenue avec A872 marquée à l'iodogène B) courbe de fixation obtenue avec A872 marquée avec du SIB.

Conclusion sur les marquages à sites multiples :

Les techniques de marquages utilisés permettent de cibler plusieurs types de résidus présents au sein de la séquence protéique d'A872 (Figure 86). Certains de ces résidus sont présents en quantité importante comme la lysine (11 résidus soit 13,3% des acides aminés de la protéine) et peuvent potentiellement être essentiel pour l'activité de la protéine. Au regard des expériences menées, l'utilisation des résidus lysines, tyrosines et potentiellement histidines pour le marquage radioactif induit une perte de l'activité biologique de l'Affitin A872.

Afin de confirmer les résultats obtenus après radiomarquage au SIB ou à l'iodogène, nous avons envisagé de réaliser un marquage direct à l'aide d'un fluorochrome l'Alexa Fluor 680. Comme le SIB, ce composé va réagir sur les amines primaires de la protéine. Suite au marquage de l'Affitin (cf. matériels et méthodes) nous réalisons un test en cytofluorimétrie pour A872 marquée à l'Alexa 680 (Figure 88).

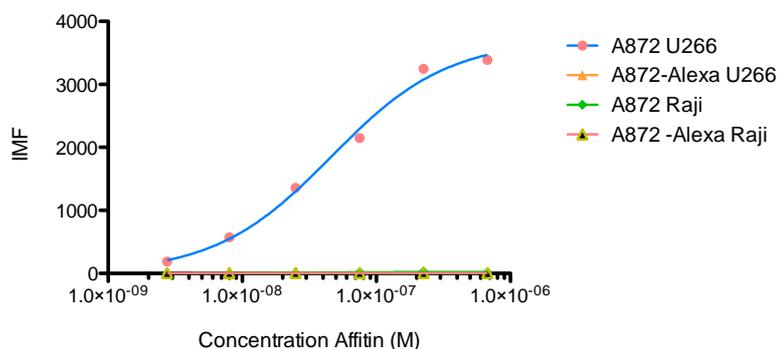


Figure 88: Courbe de saturation obtenues pour le marquage des lignées U266 et Raji avec A872 et A872-Alexa-680.

Les résultats obtenus pour le marquage des lignées cellulaires U266 et Raji avec A872 marquée à l’Alexa-680 sont présentés dans la Figure 86. Le protocole de marquage des cellules est identique à celui précédemment utilisé, A872 nu révélée à l’aide de l’anticorps anti-6His couplé PE est utilisé en contrôle.

A l’instar des résultats obtenus après de radiomarquage au SIB ou avec l’iodogène, nous observons une perte de l’activité de l’Affitin A872 après son marquage fluorescent à l’Alexa 680.

Afin de résoudre cette difficulté de marquage, il est nécessaire de développer de nouvelles approches permettant de réaliser le marquage de l’Affitin sur un site unique n’interférant pas avec son activité biologique. Le marquage sur site unique peut être réalisé en utilisant un résidu déjà présent dans la séquence protéique, ou bien être inséré par manipulation génétique ou chimique. La partie suivante décrit les stratégies mises en œuvre pour tenter de réaliser un marquage orienté de l’Affitin A872.

2. Mise en place de stratégies pour l'utilisation d'un site unique de marquage sur l'Affitin A872

Plusieurs stratégies sont envisagées pour réaliser un marquage radioactif de l'Affitin sur un site de unique de marquage.

2.1. Marquage de radio élément via la fonction thiol

Le résidu cystéine possède sur son groupement radicale une fonction thiol (-SH) pouvant potentiellement servir comme site de couplage. La stratégie du couplage sur le thiol d'une cystéine n'est valable qu'à condition d'une part, de disposer d'une cystéine libre au sein de la séquence protéique (non oxydée sous forme de pont disulfure) et d'autre part que celle-ci ne soit pas nécessaire à la fixation de la protéine sur son ligand. L'Affitin A872 possède une cystéine au niveau de la boucle, Figure 89), il est nécessaire de produire la protéine A872 en remplaçant la cystéine présente au niveau de la boucle par des acides aminés équivalents afin de vérifier que l'activité biologique de cette dernière n'est pas affectée. Après vérification, une cystéine pourra être placée en N terminal ou C terminal de la protéine pour réaliser un marquage ciblé.

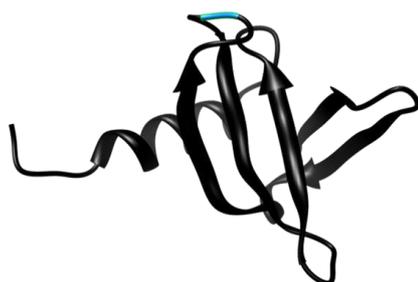


Figure 89: Modélisation de la structure d'A872 et mise en évidence de la présence de la cystéine dans la boucle

a) Mutations dirigées sur A872 pour la génération de clones cystéine-

Les processus de mutagenèses dirigées réalisés sont détaillés dans le matériels et méthodes. Les différentes préparations sont envoyées à séquencer et après traduction *in silico* permettent de réaliser l'alignement de la Figure 90.

	1	10	20	30	40	50	60	70	83																																																																							
1. A872	M	R	G	S	H	H	H	H	H	G	S	V	K	V	K	F	K	W	I	G	E	K	V	D	T	S	K	I	K	K	W	R	I	P	A	Y	C	P	Q	A	P	F	F	T	Y	N	D	N	G	K	T	G	R	G	A	V	N	E	I	D	A	P	K	E	L	L	D	M	L	A	R	A	E	R	E	K	K	L	N	
2. A872-C41A	M	R	G	S	H	H	H	H	H	G	S	V	K	V	K	F	K	W	I	G	E	E	K	V	D	T	S	K	I	K	K	W	R	I	P	A	Y	A	P	Q	A	V	F	F	T	Y	N	D	N	G	K	T	G	R	G	A	V	N	E	I	D	A	P	K	E	L	L	D	M	L	A	R	A	E	R	E	K	K	L	N
3. A872-C41G	M	R	G	S	H	H	H	H	H	G	S	V	K	V	K	F	K	W	I	G	E	E	K	V	D	T	S	K	I	K	K	W	R	I	P	A	Y	G	P	Q	A	V	F	F	T	Y	N	D	N	G	K	T	G	R	G	A	V	N	E	I	D	A	P	K	E	L	L	D	M	L	A	R	A	E	R	E	K	K	L	N
4. A872-C41M	M	R	G	S	H	H	H	H	H	G	S	V	K	V	K	F	K	W	I	G	E	E	K	V	D	T	S	K	I	K	K	W	R	I	P	A	Y	M	P	Q	A	V	F	F	T	Y	N	D	N	G	K	T	G	R	G	A	V	N	E	I	D	A	P	K	E	L	L	D	M	L	A	R	A	E	R	E	K	K	L	N
5. A872-C41S	M	R	G	S	H	H	H	H	H	G	S	V	K	V	K	F	K	W	I	G	E	E	K	V	D	T	S	K	I	K	K	W	R	I	P	A	Y	S	P	Q	A	V	F	F	T	Y	N	D	N	G	K	T	G	R	G	A	V	N	E	I	D	A	P	K	E	L	L	D	M	L	A	R	A	E	R	E	K	K	L	N

Figure 90 Alignement des séquences peptidiques obtenues après mutation du résidu cystéine en position 41.

Nous pouvons observer que la cystéine présente en position 41 au sein de la séquence A872 a été remplacée par une alanine, une glycine, une méthionine et une sérine respectivement au sein des clones A872-C41A, A872-C41G, A872-C41M et A872-C41S.

b) Production et marquage des lignées cellulaires U266 et Raji avec les clones A872 cystéine -

Après contrôle de la séquence nucléotidique, les différents mutants sont produits et purifiés sur IMAC et tamis moléculaire. Le gel SDS-PAGE de la Figure 91 permet de visualiser les 4 mutants d'A872 produits suite au remplacement de la cystéine en position 41, par une sérine, une glycine, une méthionine et enfin une alanine.

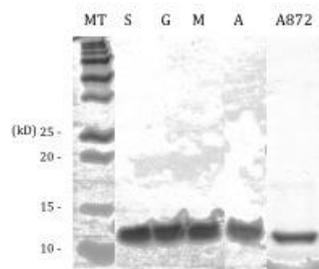


Figure 91 Gel SDS-PAGE à 15% avec les clones cystéine⁻ d'A872

Des gammes de concentrations protéiques sont préparées à partir de ces échantillons et utilisées pour réaliser des marquages en cytofluorimétrie sur les lignées LP1, KMM1 et Raji. La Figure 92 rassemble les principaux résultats obtenus sous forme de cytogrammes. La fixation d'A872 observée par les augmentations de médianes de fluorescence pour les lignées LP1 et KMM1 (CD138⁺) n'est plus observable pour les mutants dépourvus de cystéine en position 41, et ce, quelque soit le résidu peptidique mis à la place, ou la concentration testée (essais jusqu'à 20µM).

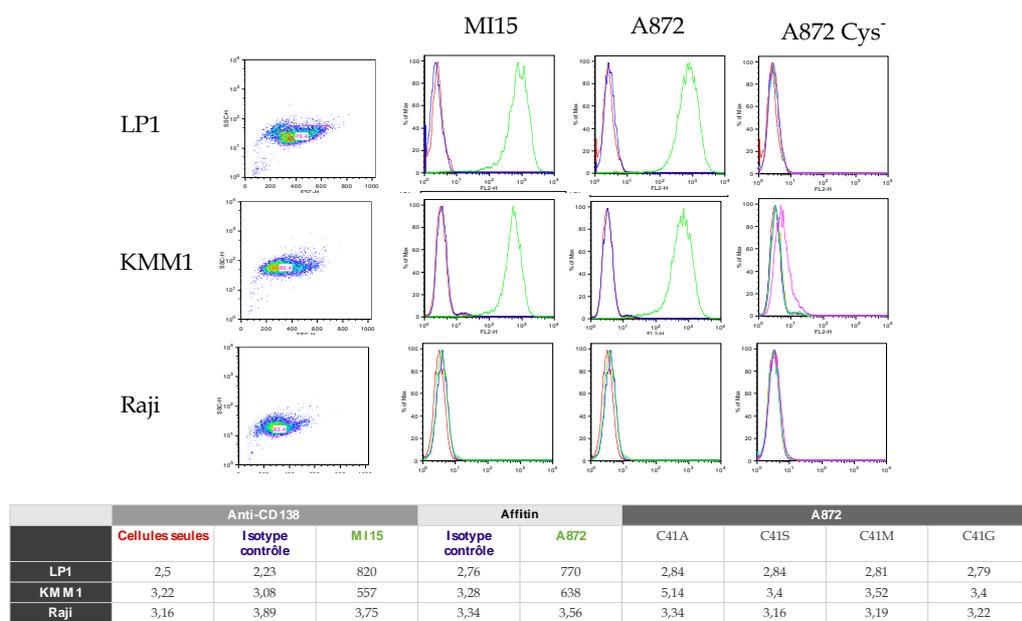


Figure 92: Cytogrammes et IMF obtenus sur les lignées cellulaires LP1, KMM1 et Raji avec A872 à 100 nM et les mutants A872 Cys⁻ à 10 µM.

Conclusion

La production et le marquage en cytofluorimétrie des mutants dépourvus du résidu cystéine présent dans la boucle d'A872 a d'une part mis en évidence l'importance de cet acide aminé pour la reconnaissance de CD138 à la surface membranaire et d'autre part démontré l'impossibilité d'utiliser ce résidu pour réaliser un radiomarquage en utilisant un groupement thiol.

2.2. Le marquage au technétium 99m (^{99m}Tc) sur l'étiquette histidine

Le ^{99m}Tc est le radioisotope le plus communément utilisé en médecine nucléaire à usage diagnostique. C'est un métal de transition artificiel d'une demi vie de 6,023 heures qui présente un intérêt médical pour l'analyse scintigraphique car il émet un rayon gamma pur d'une énergie de 140 keV adapté aux γ -camera. Les Affitins sont dotées d'une étiquette 6-His exploitée pour leur purification. Cette séquence présente en N-terminal peut être utilisée pour y coupler un atome de ^{99m}Tc au moyen d'un composé tricarbonyl ($^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$) [252]. La Figure 93 montre la présence de l'étiquette 6-His en N terminal de l'Affitin A872.



Figure 93 Affitin A872 marquée avec l'étiquette 6-His en N-terminal

Le $^{99m}\text{TcO}_4$ est produit à partir d'un générateur de molybdène ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$), puis à l'aide du « sestamibi labelling kit CRS », le $^{99m}\text{TcO}_4$ est transformé en composé tricarbonyl et incubé avec l'Affitin A872 à 52°C pendant 1 heure. La Figure 94 illustre la synthèse

du composé tricarbonyl ainsi que la réaction avec le résidu histidine.

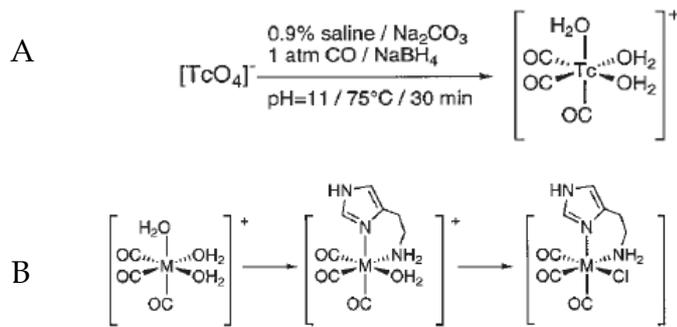
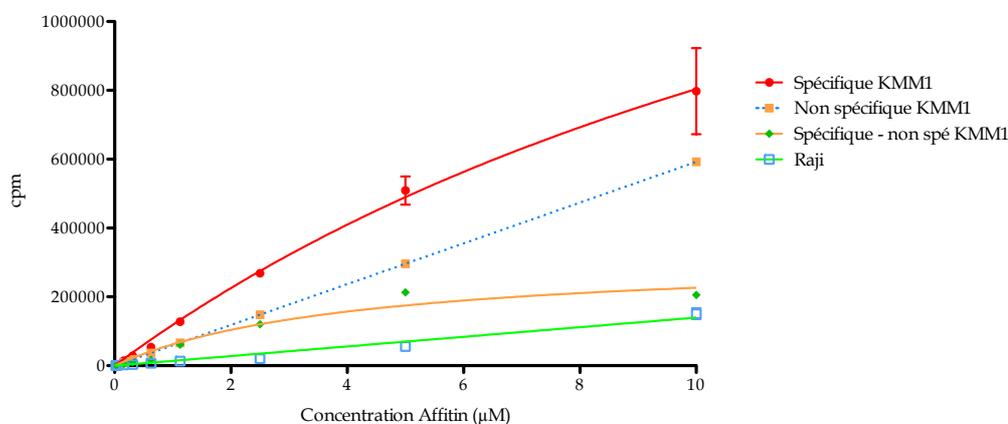


Figure 94 : A) synthèse du composé tricarbonyl B) réaction du tricarbonyl sur un résidu histidine. D'après P. Schubiger et al. 1999.

L'Affitin radiomarquée est purifiée sur une colonne de gel filtration (PD10). Les fractions d'élutions correspondantes à la protéine sont collectées et la quantification totale de la radioactivité ainsi que le rendement de marquage (réalisé par chromatographie) permet d'estimer la concentration protéique de la solution d'A872 radiomarquée. Les lignées KMM1 et Raji sont utilisées pour réaliser un scatchard afin de déterminer la capacité de reconnaissance de l'Affitin pour CD138. Selon le procédé décrit précédemment, une gamme de concentration d'A872 radiomarquée est préparée puis le marquage des lignées cellulaires est réalisé à 4°C pendant 1 heure. Suite à la séparation des culots cellulaires du surnageant, un comptage de la radioactivité est effectué à l'aide d'un compteur gamma. La compilation des données mesurées permet de tracer les courbes présentées dans la Figure 95.

Figure 95 : Courbe de fixation obtenue avec A872 marquée au ^{99m}Tc ainsi que la droite montrant le bruit de fond de l'expérience sur les lignées KMM1 et Raji



Le comptage des Affitins radiomarquées fixées sur les cellules KMM1 permet d'obtenir la courbe « spécifique KMM1 », la fixation aspécifique sur cette lignée cellulaire est calculée par l'ajout d'Affitins froides aux plus basses concentrations puis en effectuant une projection sur l'ensemble des concentrations à l'aide d'une régression linéaire. Ce bruit de fond peut être soustrait du signal spécifique obtenu autorisant le tracé « spécifique-non spécifique. » Cette courbe correspond à l'affinité des Affitins marquées par le ^{99m}Tc . Le calcul d'un K_d peut être effectué à l'aide d'une régression non linéaire et donne une approximation de $4,1 \mu\text{M} (\pm) 1,6$ avec un $R^2=0,95$. Une baisse importante de l'affinité pour CD138 est observée par rapport aux mesures réalisées par cytofluorimétrie.

Cette baisse d'affinité pourrait être due à un nombre trop important d'atomes radioactifs fixés sur la protéine et cacher les sites de reconnaissances. Afin de vérifier cette hypothèse le nombre de moles de ^{99m}Tc par rapport au nombre de moles d'Affitin peut être calculé. Suite à la purification de l'Affitin radioactive une activité de $0,5 \text{ MBq}$ est mesurée ce qui correspond à $1,56 \cdot 10^{13}$ atomes radioactifs, soit $2,59 \cdot 10^{-11}$ moles. Nous avons utilisé pour l'expérience $45 \cdot 10^{-9}$ moles d'Affitin. Par conséquent nous pouvons déduire qu'il y a approximativement 1 Affitin / 1800 qui est radiomarquée, ce qui correspond habituellement aux rapport de marquage obtenue au sein du laboratoire. Ce calcul exclu donc l'hypothèse d'un nombre d'atome radioactif trop important par rapport au nombre d'Affitin.

Pour tenter de comprendre si la diminution d'affinité observée est due aux conditions de marquages utilisées ou à la fixation de l'atome radioactif sur la protéine, nous avons réalisé une analyse par cytofluorimétrie. Suite à la décroissance radioactive, l'Affitin marquée au technétium est utilisée pour réaliser un marquage sur les lignées

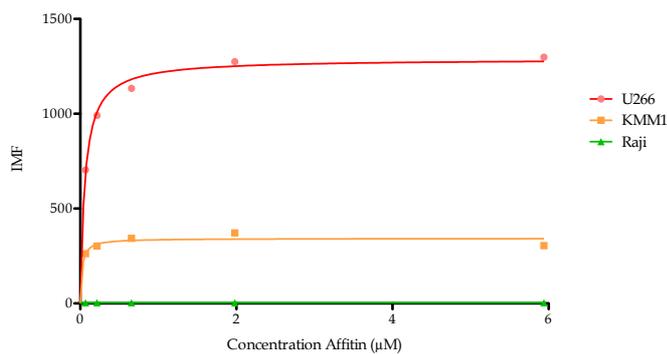
U266,

Raji. La

présente les

obtenues

de la



KMM1 et

Figure 96

IMF

en fonction

concentration en Affitin pour les lignées U266, KMM1 et Raji.

Figure 96: Courbes de saturation pour les lignées U266, KMM1 et Raji après marquage avec A872 marquée au ^{99m}Tc

Nous pouvons observer une fixation de l'Affitin sur les lignées exprimant CD138 à des niveaux comparables à ceux préalablement observés. L'affinité de l'Affitin est calculée après avoir réalisé une régression non linéaire. Elle est comprise entre 20 et 60 nM avec un $R^2=0,98$.

Conclusion :

L'analyse des résultats obtenus nous permet de penser que la fixation d'un atome de ^{99m}Tc sur l'Affitin A872 diminue son affinité. Le faible nombre d'atomes radioactifs comparé au nombre d'Affitin permet d'exclure l'hypothèse d'un nombre d'atomes radioactifs trop important fixé sur la protéine. De plus, le test réalisé par cytofluorimétrie montre que les Affitins ont gardées leur affinité, permettant de valider leur haute stabilité en milieu de marquage. L'utilisation du composé tricarbonyl permettrait de cibler plus spécifiquement les résidus histidine présents en N terminal de la protéine. Cependant d'autres résidus présents dans la séquence protéine comme la méthionine, les amines primaires ou notamment le résidu cystéine présente au niveau de la boucle de l'Affitin peut potentiellement réagir avec le composé tricarbonyl [253]. En effet, la position de cette cystéine la rend particulièrement accessible et augmente par conséquent sa réactivité. Comme nous l'avons démontré précédemment ce résidu est essentiel à la fixation d'A872 sur CD138. Ainsi, la fixation du tricarbonyl sur la cystéine provoquerait la perte de l'immunoréactivité d'A872. Nous mesurons néanmoins une activité spécifique de la protéine radiomarquée qui pourrait correspondre aux Affitins ayant été radiomarquée au niveau des histidines, et conservé ainsi leur affinité. Cependant nous sommes incapable de déterminer le pourcentage d'Affitins radiomarquées au niveau de la cystéine ou au niveau des histidines. Par conséquent nous commettons une erreur lors du calcul de la concentration pour le test scatchard en considérant que toutes les protéines sont immunoréactives.

2.3. Marquage radioactif par une stratégie de chimie « click »

Depuis 2002, date de sa découverte, la chimie « click » ou CuAAC (cycloaddition 1,3 dipolaire catalysée par le cuivre (I) entre un azoture (R-N_3) et un alcyne ($\text{R-C}\equiv\text{CH}$)) a suscité un grand intérêt en raison de son efficacité et de ses multiples champs d'applications. Le domaine de prédilection de cette réaction est toute fois celui des biotechnologies où elle permet notamment de réaliser la fixation

d'atome radioactif de façon régiosélectif. En effet, il est possible de placer en substitution d'une méthionine un acide aminé non naturel possédant une triple liaison (L-Homopropargylglycine : HPG) qui pourra réagir avec un azoture et ainsi obtenir notre protéine d'intérêt avec un chélatant autorisant le marquage radioactif. Cependant la séquence peptidique d'A872 contient deux méthionines : une en position 1 et l'autre en position 72. La substitution par l'HPG ne doit être réalisée uniquement sur la méthionine en position 1 afin de garantir la présence d'un seul chélatant par protéine et l'immunoréactivité maximale de l'Affitin. Pour y parvenir nous avons dans un premier temps réalisé la substitution de la méthionine en position 72 par trois acides aminés différents (Figure 97).

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	83																																																																							
1. A872	M	R	G	S	H	H	H	H	H	G	S	V	K	V	K	F	K	W	I	G	E	E	K	E	V	D	T	S	K	I	K	K	W	R	I	P	A	Y	C	P	Q	A	V	F	F	T	Y	N	D	N	G	K	T	G	R	G	A	V	N	E	I	D	A	P	K	E	L	L	D	M	L	A	R	A	E	R	E	K	K	L	N
2. M72I	M	R	G	S	H	H	H	H	H	G	S	V	K	V	K	F	K	W	I	G	E	E	K	E	V	D	T	S	K	I	K	K	W	R	I	P	A	Y	C	P	Q	A	V	F	F	T	Y	N	D	N	G	K	T	G	R	G	A	V	N	E	I	D	A	P	K	E	L	L	D	I	L	A	R	A	E	R	E	K	K	L	N
3. M72L	M	R	G	S	H	H	H	H	H	G	S	V	K	V	K	F	K	W	I	G	E	E	K	E	V	D	T	S	K	I	K	K	W	R	I	P	A	Y	C	P	Q	A	V	F	F	T	Y	N	D	N	G	K	T	G	R	G	A	V	N	E	I	D	A	P	K	E	L	L	D	L	L	A	R	A	E	R	E	K	K	L	N
4. M72V	M	R	G	S	H	H	H	H	H	G	S	V	K	V	K	F	K	W	I	G	E	E	K	E	V	D	T	S	K	I	K	K	W	R	I	P	A	Y	C	P	Q	A	V	F	F	T	Y	N	D	N	G	K	T	G	R	G	A	V	N	E	I	D	A	P	K	E	L	L	D	V	L	A	R	A	E	R	E	K	K	L	N

Figure 97: Alignement des séquences peptidiques obtenues après mutation du résidu méthionine en position 72.

Les mutations réalisées sur l'Affitin A872 par mutagenèse dirigée ont été vérifiées par séquençage. L'alignement des séquences de la Figure 100 montre les clones d'A872 M72I, M72L et M72V mutés respectivement en position 72 par une isoleucine, une leucine et une valine. L'activité biologique de ces trois nouveaux mutants a été validée par cytofluorimétrie en utilisant les lignées cellulaires U266 et Raji (Figure 98).

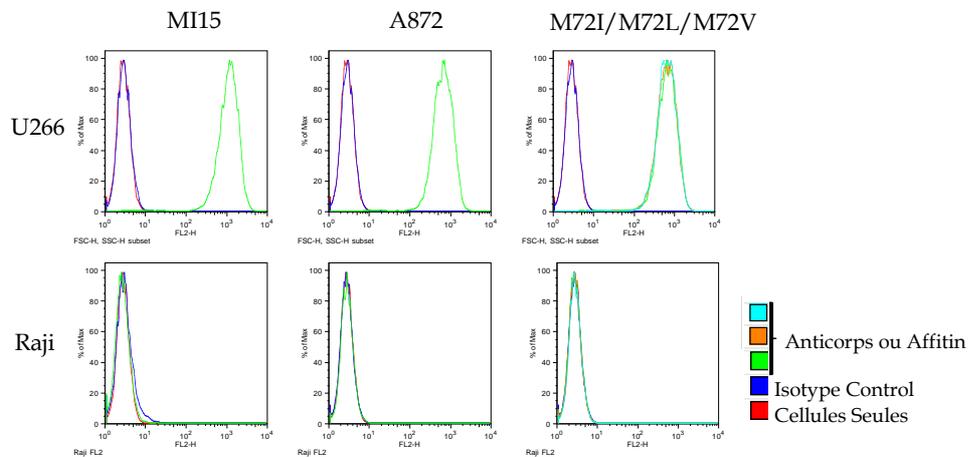


Figure 98 : Cytogrammes regroupe les résultats obtenus pour le marquage des lignées U266 et Raji avec l’anticorps anti-CD138 MI15, l’Affitin A872 et pour les clones M72I, M72L et M72V.

Les déplacements d’IMF obtenus pour les Affitins dans la Figure 98 sont ceux obtenus pour une concentration protéique de 100 nM. Nous obtenons une IMF de 679 pour A872 de 685, 673 et 682 pour respectivement M72I, M72L et M72V sur la lignée cellulaire U266. Aucun déplacement d’IMF n’est observé pour la lignée cellulaire Raji. Le clone de M72L est sélectionné pour être produit dans un milieu minimum contrôlé permettant la substitution de la méthionine en position 1 par l’HPG. Suite à la production de ce clone, nous procédons à une purification de la lyse bactérienne sur colonne d’affinité, et un contrôle de l’activité biologique de la protéine par cytofluorimétrie est effectué. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 99.

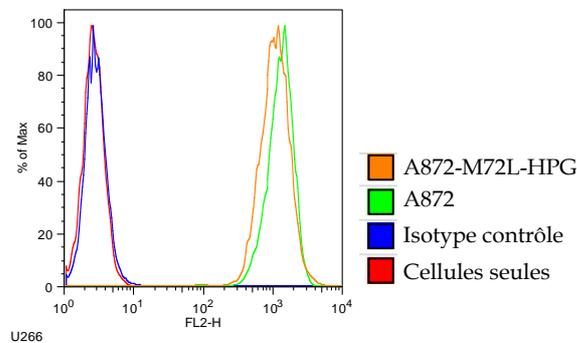


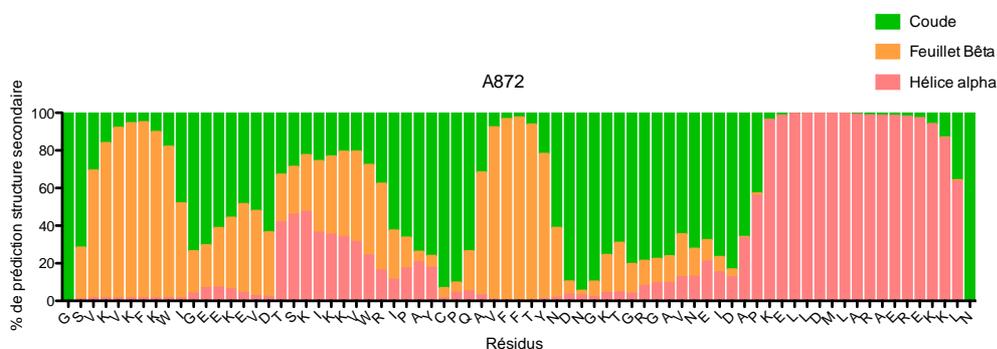
Figure 99 : Cytogramme présentant les déplacements d’IMF obtenus pour l’Affitin A872-M71L-HPG comparé à A872.

L'IMF obtenue pour A872 est de 1370 à 100 nM et est de 1114 pour A872-M72L-HPG avec une estimation de la concentration faite à 100 nM. Ces résultats préliminaires permettent de confirmer le maintien de l'activité biologique de l'Affitin A872 après la substitution de la méthionine en position 1 par l'acide aminé non naturel HPG. Il reste cependant à réaliser la purification de ce clone sur tamis moléculaire et déterminer par spectrométrie de masse le pourcentage d'incorporation de l'acide HPG au sein de séquence d'A872. Nous procéderons ensuite à la réaction de click permettant de fixer sur la protéine *via* l'HPG du azido-monoamide-DOTA autorisant la chélation de différents métaux radioactifs.

VII. Modélisation structurale par informatique

Il existe actuellement un grand nombre de serveurs qui offrent la possibilité d'obtenir la structure tertiaire d'une protéine par modélisation 3D *in silico*. La prédiction de la structure protéique peut se faire par homologie en se basant sur des séquences protéiques dont la structure a été déterminée par cristallographie et qui sont accessibles sur PDB (protein data bank). Les modélisations suivantes ont été réalisées à l'aide du serveur RaptorX.

A l'aide des séquences protéiques des Affitins anti-CD138 obtenues après le criblage par cytofluorimétrie nous avons pu modéliser la structure tertiaire de chaque Affitin. La Figure 100 présente les pourcentages de prédiction des structures secondaires pour l'Affitin A872. Nous pouvons observer que les feuillets bêta 1 et 4, l'hélice alpha, et la boucle de l'Affitin sont prédits avec un pourcentage supérieur à 90%. Les autres parties de la protéine possèdent un pourcentage de prédiction moins important, mais la modélisation structurale consécutive nous permet néanmoins



d'apprécier la configuration 3D de la protéine.

Figure 100: Histogramme représentant les pourcentages de prédiction des structures secondaires de l'Affitin A872.

Des pourcentages de prédiction similaires ont été obtenus pour les autres Affitins modélisées. La superposition des structures protéiques des Affitins **A872**, **C6** et **B4** permet d'obtenir la Figure 101.

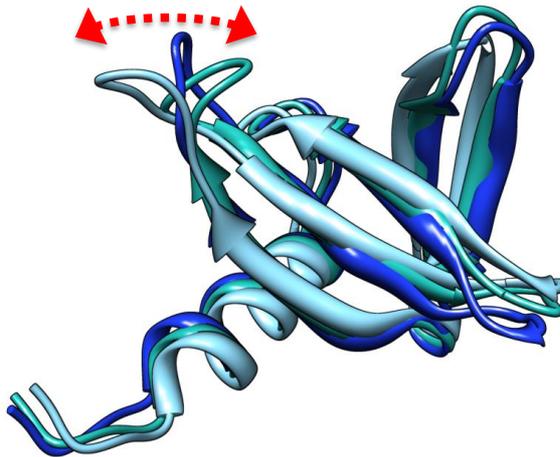


Figure 101 : Superposition des prédictions structurales des Affitins A872, C6 et B4

En accord avec la promiscuité des séquences peptidiques des Affitins nous pouvons constater que les structures prédites sont très proches. Nous observons également que la boucle des Affitins peut être prédite avec une orientation variable (flèche rouge). Ces résultats permettent de mettre en évidence la flexibilité de la boucle de cette famille d'Affitins.

Résultats supplémentaires

I. Etude sur la possibilité d'un couplage d'une biotine bi-fonctionnelle via un AVITag

Afin de réaliser un marquage régio-sélectif il est possible d'insérer une étiquette appelée AVITag composée de 15 acides aminés (GLNDIFEAQKIEWHE), qui peut être ajoutée par génie moléculaire en C-terminal de la protéine à marquer. Cette séquence d'acides animés est reconnue par l'enzyme BirA qui est capable de réaliser une substitution électrophile entre l'amine primaire de la lysine et la biotine. Ce système permet d'obtenir un marquage spécifique de la protéine en évitant une biotinylation aléatoire qui pourrait potentiellement inactiver la protéine. L'utilisation d'une biotine couplée à un chélateur comme le DOTA pourrait permettre d'effectuer un radiomarquage localisé.

1. Production d'A872 avec un AVITag

Afin de générer l'Affitin A872 couplée au tag de fusion « AVITag » le gène codant pour la protéine est inséré dans le cadre ouvert de lecture d'un plasmide contenant la séquence de biotinylation AVITag en C-terminal. Après la ligation de l'insert, l'amplification et la préparation de l'ADN plasmidique, la construction est vérifiée par séquençage. La Figure 102 montre l'alignement de séquences par rapport à la séquence de référence A872.



Figure 102 Alignement d'A872-AVITag comparé à la séquence de référence A872

La biotinylation de la lysine en position 94 comme montré dans la Figure 103 est réalisé par substitution nucléophile de l'amine *in-vivo* lors de la production de la protéine par des bactéries *E. coli* possédant le plasmide d'expression codant pour la biotine ligase : BirA. Il est également possible de réaliser cette réaction *in vitro* en utilisant la protéine BirA purifiée.



Figure 103 illustration de la biotinylation du résidu lysine de l'AVITag en C-terminal de l'Affitin A872

Suite à sa production l'Affitin A872-AVITag-Biot est purifiée sur colonne IMAC et sur tamis moléculaire (S75). La fraction correspondante à la protéine d'intérêt est récupérée puis dosée par lecture de densité optique au Nanodrop. Un marquage en cytofluorimétrie est ensuite effectué sur différentes lignées.

2. Contrôle de l'activité biologique d'A872-AVITag-Biot

Pour contrôler le maintien de l'activité biologique d'A872-AVITag-Biot, une gamme de concentration est préparée et utilisée pour réaliser un marquage des lignées cellulaires U266, KMM1 et Raji. Les IMF sont rassemblées dans le graphique de la Figure 104 montrant les courbes de saturation obtenues comparées à celle d'A872.

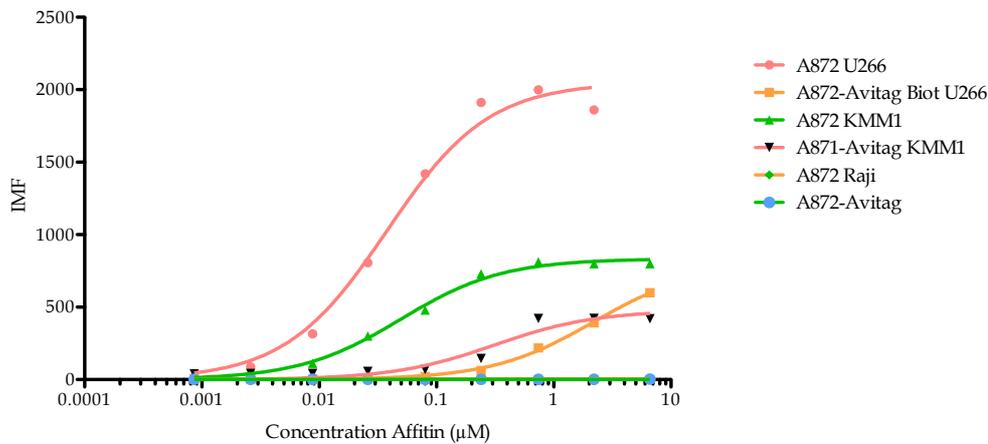


Figure 104 Courbes de saturation pour la protéine A872-AVITag-Biot comparée à A872 pour les lignées U266, KMM1 et Raji.

Ces courbes permettent de calculer les Kd de l’Affitin biotinylée, les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 16.

	U266		KMM1	
	A872	A872-AVITag-Biot	A872	A872-AVITag-Biot
IM F max	2051	794	833,9	478,2
Kd (nM)	37,0 (±) 0,58	2174 (±) 174,7	49,73 (±) 0,55	313,6 (±) 121,7
Coefficient de détermination	0,98	0,99	0,99	0,93

Tableau 16: Approximation des affinités d’A872-AVITag-Biot sur les lignées cellulaires U266 et KMM1

Nous pouvons observé une baisse importante de l’affinité de l’Affitin biotinylée, en réalisant la moyenne des Kd obtenues pour les lignées U266 et KMM1 nous pouvons estimer l’affinité à 1,2 µM.

II. Marquage et analyse par cytofluorimétrie de cellules cancéreuses de patients

Nous avons eu l'opportunité de réaliser un marquage avec l'Affitin A872 sur des cellules d'un myélome multiple ainsi que d'une leucémie à plasmocytes issues directement de prélèvements sur des patients. Ces cellules nous ont été transmises par Catherine Pellat-Deceunynck qui travaille au sein du laboratoire U892 et qui est en lien avec le laboratoire d'analyse biologique du CHU de Nantes.

Les cellules sont marquées à l'aide de l'Affitin A872 et de l'anticorps anti-CD138 MI15 qui sert ici de contrôle positif. Nous utilisons comme à l'habitude des isotypes contrôles à la fois pour l'anticorps et pour l'Affitin. Les résultats des marquages obtenus sont présentés dans la Figure 105.

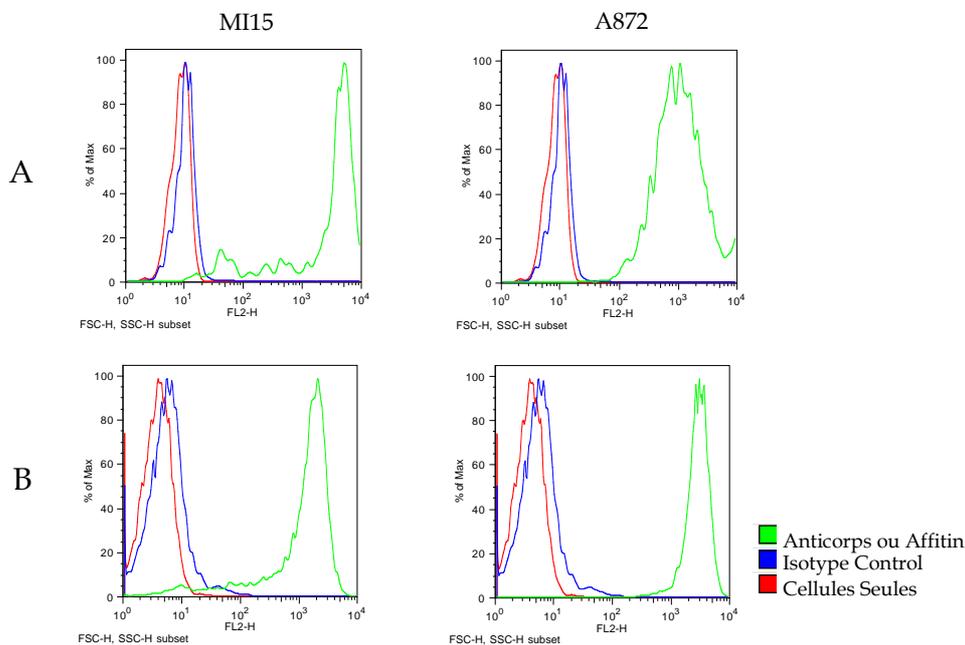


Figure 105 : Cytogrammes présentant les déplacements de fluorescence obtenus pour MI15 et A872 avec : A) Cellules d'un patient atteint d'un myélome multiple B) Cellules d'un patient atteint d'une leucémie à plasmocytes

Nous pouvons observer que les cellules cancéreuses isolées à partir des patients atteints d'un myélome multiple ou d'une leucémie à plasmocytes présentent une expression importante de CD138 comme le montrent les résultats obtenus avec l'anticorps MI15. Nous constatons également que l'Affitin A872 marque de façon importante à la fois les cellules issues du patient atteint de myélome multiple et celles issues du patient atteint d'une leucémie à plasmocytes.

III. Génération d'une banque de seconde génération par une stratégie « d'error prone PCR » et sélection par « off-rate »

Nous avons réalisé la génération d'une banque de seconde génération dans l'objectif d'effectuer une maturation d'affinité par « off-rate selection ». Cette stratégie peut en effet permettre l'obtention de ligands de très hautes affinités à partir d'une sélection ayant déjà évoluée vers un tropisme particulier. La partie suivante regroupe les principaux résultats obtenus pour la génération de banques de seconde génération et leur utilisation dans une stratégie de sélection par « off-rate selection » à l'aide du ribosome display.

1. Génération d'une banque de seconde génération

Suite au premier crible d'Affitins par ELISA plusieurs ADN codant pour les Affitins pouvaient être utilisés comme armature fondatrice pour la génération d'une nouvelle banque. Dans l'objectif de potentialiser l'obtention d'Affitins de très hautes affinités, nous avons utilisé trois types de matrices. La première est issue de la séquence codante pour l'Affitin A6, la seconde est un pool de séquences réalisé à partir des 8 Affitins présentant les meilleurs signaux lors du test ELISA (Figure 53). Enfin l'ensemble du pool de sélection n°7 incluant la totalité des Affitins. Ces différentes matrices sont utilisées pour la réalisation d'une PCR permettant d'insérer au sein des séquences amplifiées des mutations à l'aide d'analogues structuraux nucléotidiques ainsi que d'une concentration en Mg^{2+} importante induisant l'augmentation du taux d'erreur de la Taq polymérase en réduisant la spécificité d'appariement des bases nucléotidiques.

Afin de disposer de banques possédant des variants présentant plusieurs niveaux de mutations différentes concentrations d'analogues structuraux sont

utilisés : 5, 10, 20 et 40 μ M. La Figure 106 présente les bandes d'amplification obtenues après une PCR « error prone » suivie par la PCR d'assemblage, pour chaque charpente ADN utilisée. Les bandes d'amplification sont de la taille attendue : 600 pb.

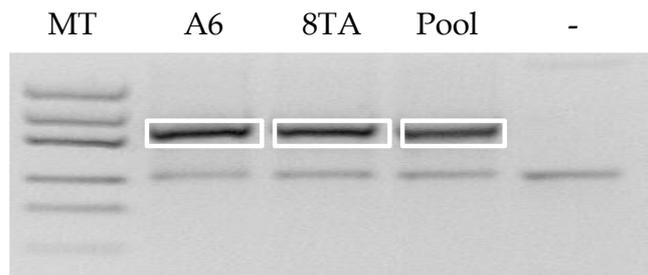


Figure 106 : Gel d'agarose 1,5% présentant les différentes bandes d'amplification obtenues par « error prone » PCR pour chaque charpente ADN utilisées. Les bandes d'intérêt sont entourées par le cadre blanc.

Un séquençage d'une quinzaine de clones par banques générées a été réalisé afin de s'assurer de la diversité des gènes codant pour les Affitins. Ainsi nous avons pu vérifier qu'il y avait en moyenne 1,8 acides aminés mutés par séquence, ce qui est en accord avec les résultats attendus.

2. Sélection d'Affitins par ribosome display à l'aide des banques de secondes générations

La Figure 107 présente l'ensemble des sélections effectuées par ribosome display contre CD138- β 2m avec les banques de seconde génération. Suite à la génération des trois nouvelles banques (pool A6#7, pool 8TA#7 et pool#7) deux tours de sélection par ribosome display sont réalisées en utilisant les mêmes conditions que le tour n°6.

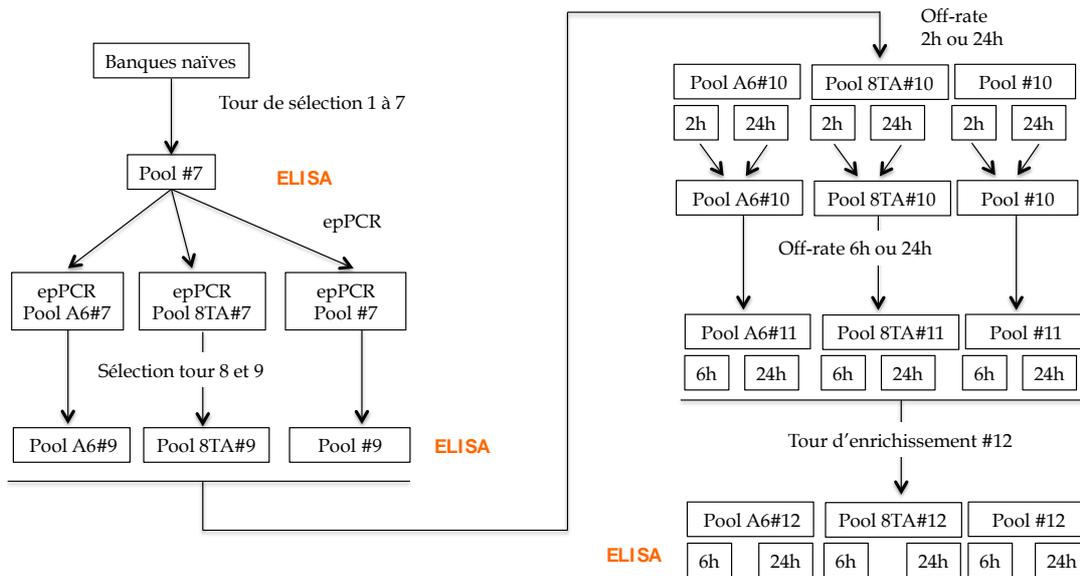


Figure 107 : Schéma des différents tours de sélection réalisés par ribosome display ainsi que la génération des banques de seconde génération. Les vérifications de l'enrichissement des pools de sélection en Affitins anti-CD138 par ELISA sont annotées en orange.

Pour les tours n°10 et n°11 nous réalisons une sélection en « off-rate » qui permet de sélectionner au sein du pool d’Affitins les protéines présentant les affinité les plus importante. Le principe de l’ « off-rate » repose sur une compétition entre la cible biotinylée et non biotinylée. Suite à la traduction, les complexes ternaire (ribosome-ARN-protéine) sont incubés jusqu'à atteindre l'équilibre avec la cible biotinylée. Suite à cette étape, de la protéine cible non-biotinylée est rajoutée en large excès pendant un temps prédéfini. Les Affitins présentant une dynamique de fixation relativement rapide (les K_d les plus importants) se détachent de la cible biotinylée au cours de la compétition et se fixent sur la cible non biotinylée. Les Affitins présentant les meilleurs K_d et notamment avec des K_{off} importants restent fixées à leur cible biotinylée. Lors de la magnétisation des billes, seule la cible biotinylée est récupérée via la streptavidine fixée aux billes. Ainsi suite aux lavages et lors de l'éluion, seuls les ARN codant pour les Affitins présentant des constantes d'affinité les plus importantes seront récupérés. Ce système augmente la probabilité de sélectionner

une Affitin présentant un haut niveau d'affinité pour la cible d'intérêt. Un tour d'enrichissement est réalisé pour clôturer la sélection (tour n°12).

Nous avons contrôlé la présence d'Affitins spécifiques de CD138 au sein des pools de sélection en effectuant un ELISA regroupant les trois banques du tour n°9 ainsi que les banques du tour n°12 (Figure 108).

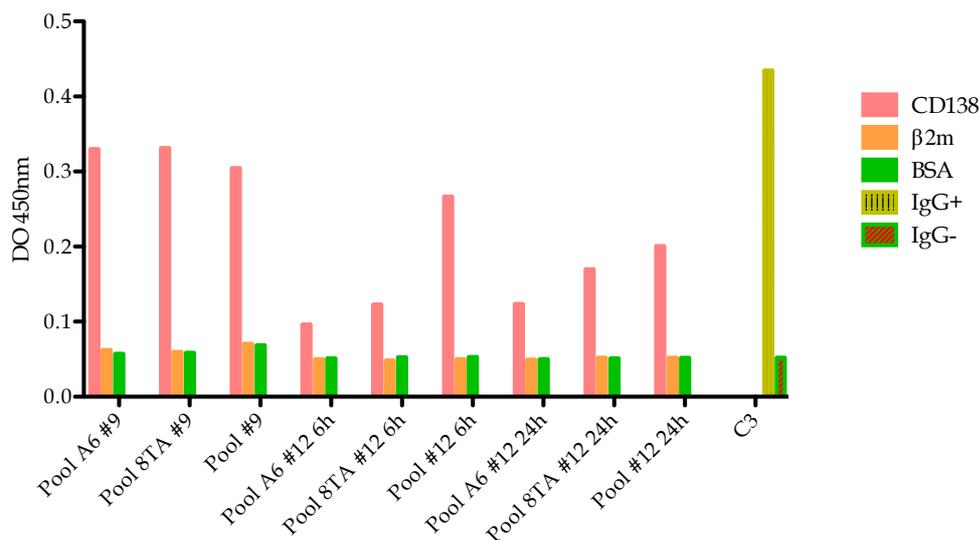


Figure 108 : Histogramme présentant les résultats de ELISA obtenu après traduction des pools de sélection du tour n°9 et des pools de sélection n°12.

Cet ELISA est réalisé selon les conditions déjà décrites précédemment (technique n°2). La traduction de l'ARN codant pour l'Affitin C3 (anti-IgG) est utilisée comme contrôle de l'expérience. Nous pouvons observer que les DO obtenus pour les banques A6, 8TA et Pool du tour n°9 sont quasiment équivalentes et supérieures aux DO obtenus pour les autres banques. Pour le tour n°12 nous observons que la DO est supérieure pour les banques issus du pool, avec toutefois un signal plus important pour le Pool#12 6h. Malgré les différences de DO observées, nous ne pouvons pas conclure qu'en au pool de sélection qui contient les Affitins avec les meilleures affinités. En effet l'augmentation de la DO correspond à la somme

des signaux apportés par chaque Affitin présente sur la cible, indépendamment de son affinité. Par conséquent il est tout à fait possible que le Pool#9 contienne un plus grand nombre d’Affitins anti-CD138 que le Pool#12 24h mais que celles-ci possèdent des affinités moins importantes. Aussi ces résultats obtenus par ELISA permettent seulement de confirmer la présence d’Affitins anti-CD138 dans chaque pool de sélection.

IV. Immunogénicité

Nous sommes actuellement entrain d’expérimenter l’effet immunogène de l’Affitin A872 selon la planification montré dans la Figure 107 A. 10 µg d’Affitin A872 sont injectés par voie intraveineuse dans 3 souris BALB/c à J0, J20 et J40. Parallèlement nous prélevons environ 0,3 mL de sang au niveau du sinus rétro-orbital à J-10 (contrôle), J15, J28, J35, J50 et J57. Suite au prélèvement, le sang est centrifugé et le sérum est conservé à -20°C. Le sérum servira ultérieurement afin de réaliser un ELISA selon le montage de la Figure 107 B dans l’objectif de révéler l’éventuelle présence de IgM ou IgG dirigées contre l’Affitin A872.

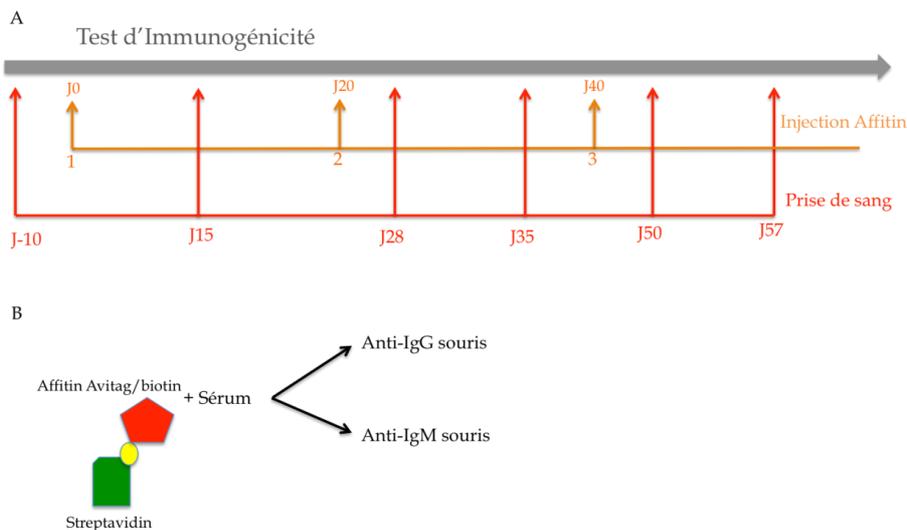


Figure 109 : Test de l'immunogénicité de l'Affitin A872 A) planification des injections d'Affitin par voie intraveineuse ainsi que des prélèvements sanguins B) Schéma du montage en ELISA.

Discussion

Selon l'OMS la baisse récente de la mortalité due au cancer dans certains pays est en partie imputable au dépistage précoce. Outre la sensibilisation des populations à la maladie à l'aide de programmes éducatifs pour la détection des premiers symptômes typiques, l'essor de l'imagerie médicale a grandement contribué à ce phénomène. En effet, l'amélioration des techniques d'imagerie comme l'IRM, le scanner ou la TEP donne aux cliniciens les outils nécessaires à la détection précoce des cancers [32]. A titre d'exemple, nous pouvons citer la mammographie, qui, désormais préconisée systématiquement et précocement dans le cadre de campagnes de sensibilisation, permet un dépistage rapide et diminue de façon importante le nombre de décès par cancer du sein chez la femme.

En outre, les nombreuses études de recherche réalisées au cours des dix dernières années ont permis une amélioration considérable de la connaissance des mécanismes biologiques impliqués dans la genèse des processus tumoraux [2]. La

compréhension d'une partie de ces phénomènes permet de mieux caractériser les différents types de cancers par la mise en évidence de biomarqueurs. Ces biomarqueurs sont particulièrement utiles pour identifier les cellules cancéreuses mais peuvent également être utilisés comme cibles pour des outils de vectorisation. L'analyse histologique et génétique de prélèvements biopsiques est désormais devenu un acte de routine dans le protocole du diagnostic du cancer. Ces analyses visent en effet à mettre en évidence la présence de mutations génétiques ainsi que l'expression de biomarqueurs caractéristiques d'un cancer. Cependant ces analyses sur prélèvements sont non seulement particulièrement invasives et contraignantes pour le patient mais en outre, n'autorisent pas le suivi de l'évolution de la pathologie *in situ*. De plus, si elles permettent de caractériser les cellules contenues dans la biopsie, elles ne permettent nullement d'exclure la présence d'éventuels foyers métastatiques ayant réalisé une modification phénotypique et ne répondant pas à la thérapie mise en place. L'imagerie médicale offre non seulement le bénéfice d'une détection non invasive des lésions tumorales mais offre également la perspective de réaliser prochainement le phénotypage des tumeurs *in situ*, grâce à l'apport de la recherche médicale [26]. Actuellement les appareillages d'imagerie possèdent le niveau technologique suffisant à la génération d'imagerie TEP de haute résolution. De plus l'utilisation de vecteurs radioactifs tels que le ^{18}F -FDG pour l'imagerie TEP permet la mise en lumière des foyers tumoraux possédant une activité métabolique élevée. Néanmoins il demeure essentiel de développer de nouveaux vecteurs capables de cibler spécifiquement les biomarqueurs exprimés par les tumeurs. Ces vecteurs innovants offriront aux cliniciens la capacité de typer les cancers grâce à l'imagerie et constitueront également des outils thérapeutiques, d'où le terme « théranostic ». Ils figurent parmi les enjeux majeurs de l'avenir de la cancérologie et de la médecine personnalisée. C'est en effet, *via* l'amélioration des méthodes de diagnostic et de prise en charge thérapeutique des patients que l'on pourra assurer un net recul de la mortalité due aux nombreux. La conception et la génération de ces nouveaux vecteurs radiomarqués sont complexes et nécessitent le recours à des champs disciplinaires multiples tels que la biologie, la chimie et la physique. Il est en effet primordial, afin de disposer d'un outil performant, de considérer les barrières

physiologiques qui entravent leur biodistribution et d'élaborer des stratégies permettant de surmonter ces obstacles et d'optimiser le ciblage tumoral. De plus, il paraît nécessaire de tenir compte des caractéristiques physiques et chimiques du radioisotope, de la chimie de marquage radioactif utilisée et enfin, de l'affinité du ligand pour l'antigène cible.

La médecine nucléaire nantaise se développe depuis plus de trente ans dans le cadre d'une collaboration constructive du service de médecine nucléaire et du Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers. Le fruit de ce travail commun a permis l'instauration d'équipes pluridisciplinaires regroupant des physiciens, des chimistes, des radio-pharmaciens, des médecins ainsi que des biologistes.

La cancérologie nécessite le développement conjoint, de nouveaux vecteurs pour l'imagerie médicale, et de nouvelles thérapeutiques plus efficaces et mieux tolérées. Notre équipe s'emploie à tenter de répondre à ces enjeux majeurs, en centrant ses recherches sur le développement de stratégies ciblées, notamment par l'utilisation d'anticorps comme outils de vectorisation de rayonnements ionisants, mais également par l'exploration de protéines alternatives telles que les Affitins pour le diagnostic en imagerie médicale.

Dans ce cadre, l'objectif du travail de thèse qui m'était confié consistait à réaliser une sélection d'Affitins par ribosome display contre le CD138 (syndécan-1) [233]. Le CD138 est un protéoglycan exprimé dans plusieurs carcinomes et notamment dans le myélome multiple. L'efficacité de son ciblage pour la thérapie et l'imagerie du myélome multiple a été démontrée au sein de notre groupe de travail [189, 190]. Les Affitins sont de petites protéines pourvues d'une grande stabilité thermique et chimique issues d'une structure protéique en « SH3-like » : Sac7d [246]. La stabilité structurale de Sac7d a permis l'insertion de mutations raisonnées au sein de sa séquence et ainsi la génération de banques de plusieurs types d'une diversité importante (10^{12} variants) [254]. Plusieurs banques d'Affitins ont été utilisées pour la sélection par ribosome display de variants contre le CD138 recombinant produit au sein de notre laboratoire sous forme de protéine de fusion couplée à la β 2m. Suite à

sept tours de sélection, la mise au point d'un criblage par cytométrie en flux nous a permis d'isoler plusieurs Affitins présentant une affinité de l'ordre de la dizaine de nanomolaires pour CD138 exprimé à la surface membranaire d'une lignée cellulaire cancéreuse humaine. Le séquençage des 15 Affitins sélectionnées nous a permis de mettre en évidence leur appartenance à une seule et même famille. En effet les parties variables retrouvées au sein des séquences peptidiques correspondent aux codons dégénérés de la banque L4. Cette banque d'Affitin est caractérisée par une insertion de quatre acides aminés au niveau d'une boucle qui est par conséquent d'une longueur plus importante que celle retrouvée dans la protéine sauvage et offre la possibilité aux Affitins de cette famille d'accéder à des anfractuosités protéiques présentes au niveau de leurs cibles (manuscrit soumis S. Pacheco *et al.*, « Potent and specific inhibition of glycosidases by artificial binding proteins (Affitins) »). De plus, la flexibilité de ces boucles a notamment été mise en évidence à l'aide de la superposition de trois structures d'Affitins générées par bioinformatique. Cette région de la protéine possède 8 codons dégénérés permettant de générer des boucles avec une variabilité peptidique importante. L'ensemble des Affitins sélectionnées possèdent exactement la même séquence au niveau de cette boucle. Ce constat corrélé au fait que seul des Affitins à boucle ont pu être sélectionnées au cours du crible nous permet de penser que cette partie spécifique de la protéine interviendrait dans la fixation des Affitins sur le CD138. Nous avons d'ailleurs pu constater que la cystéine présente au sein de la boucle en position 41 est capitale pour la fixation de l'Affitin A872 sur CD138. En nous appuyant sur les données d'affinité établies par cytométrie ainsi que sur les rendements de production, nous avons sélectionné l'Affitin A872. La fixation spécifique d'A872 sur CD138 a été montrée sur plusieurs lignées cellulaires humaines exprimant CD138 avec des intensités de médiane de fluorescence maximale comparables à celles observées pour l'anticorps anti-CD138 MI15. Des études en cytométrie à l'aide d'une lignée murine exprimant CD138 murin et d'une lignée de CHO exprimant CD138 canin a pu mettre en évidence la spécificité de reconnaissance de l'Affitin A872 pour la forme humaine de CD138. L'étude approfondie de cette Affitin nous a permis de mettre en évidence sa grande stabilité chimique et thermique en condition de marquage radioactif ainsi que lors de son

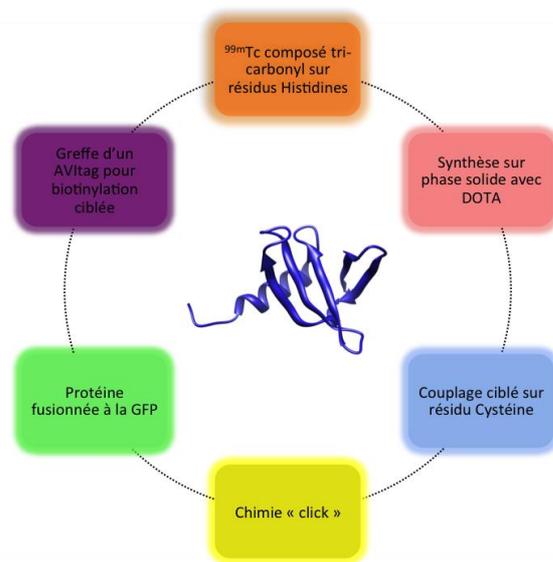
incubation à 37°C avec des protéases contenues dans le sérum humain. L'étude par microscopie de la fixation d'A872 sous forme de protéine de fusion couplée à la GFP sur la lignée U266 a montré un marquage membranaire ainsi qu'une internalisation du complexe ligand-CD138 comparable à celles observées pour l'anticorps anti-CD138 B-B4. Suite à ces expérimentations réalisées *in cellulo*, une étude de biodistribution d'une Affitin à boucle radiomarquée à l'iode 125 (issue du même pool de sélection qu'A872) au sein de souris naïves a démontré la pharmacocinétique, rapide de ce scaffold. La biodistribution de cette structure protéique se caractérise par une élimination rénale importante sans accumulation au niveau des organes. Comme nous l'avons détaillé dans les résultats, le marquage au SIB de l'Affitin A6 a probablement induit la perte de son activité biologique, cependant les résultats obtenus sont particulièrement intéressants afin de qualifier la dynamique de biodistribution. De plus, ces résultats ont été confirmés par immunohistochimie. En nous fondant sur ces premiers résultats de pharmacocinétique, nous avons réalisé une étude de biodistribution dans un modèle murin xénogénique de myélome multiple et démontré par immunohistochimie que l'Affitin A872 est capable de cibler CD138 exprimé par les cellules cancéreuses *in vivo* en présentant un marquage tumoral important jusqu'à 2 heures après son injection par voie intraveineuse. Les résultats obtenus montrent une biodistribution très rapide dans l'organisme avec une accumulation au niveau du foyer tumoral et une élimination rénale importante au cours de la première heure après l'injection, sans accumulation. La présence de l'Affitin dans d'autres organes comme le foie, la rate ou encore les poumons a également été explorée : elle n'était retrouvée dans aucun de ces organes. Il est toutefois important de préciser que nous avons réalisé ces expérimentations dans un modèle xénogénique murin présentant l'expression du CD138 humain uniquement au niveau de la tumeur. Ces résultats permettent néanmoins de valider la spécificité de marquage de cette Affitin sur les cellules cancéreuses exprimant CD138 *in vivo* et montrent que la pharmacocinétique de cette Affitin est compatible avec l'utilisation de radioisotopes à demi-vie courtes. De plus, l'absence de marquage aspécifique notamment au niveau du rein, semble particulièrement prometteur pour l'utilisation de cette Affitin comme vecteur en imagerie TEP. En effet, plusieurs alternatives aux

anticorps telles que les Affibodies ou encore les DARPins ont déjà montré des marquages tumoraux spécifiques importants dans des modèles de xénogreffes en ciblant par exemple le récepteur HER-2 [113, 127]. Cependant le marquage tumoral de ces protéines s'accompagne la plupart du temps d'une irradiation rénale importante due à une accumulation dans cet organe de la protéine vectrice. Le système de biodistribution utilisé lors de nos expériences n'est pas directement comparable à ceux utilisés pour les Affibodies ou pour les DARPins. En effet, hormis l'étude de biodistribution réalisée suite au marquage à l'iode 125 de l'Affitin A6, les résultats de biodistribution mettant en évidence le marquage tumoral d'A872 dans notre modèle murin de myélome ont été obtenus par immunohistochimie. Bien que cette méthode nous ait permis d'étudier le marquage tumoral d'A872 *in vivo*, l'influence que pourrait avoir le radiomarquage de l'Affitin à l'aide de radioisotopes tels que le Gallium-68 ou le Cuivre-64 reste à explorer. Cependant nous disposons désormais d'un outil capable de cibler CD138 spécifiquement dans des conditions *in vivo* avec une cinétique inenvisageable avec un anticorps entier.

Une partie importante de ce travail fut dédiée à l'élaboration de stratégies visant à insérer un site unique de marquage au sein de la séquence protéique. En effet, les premières expériences de radiomarquage utilisant le SIB ou l'iodogène se fixant respectivement sur les lysines et les tyrosines présentes au sein de la séquence protéique ont montré que l'utilisation de ces résidus pour le radiomarquage induisait la perte de la fixation de l'Affitin sur CD138. Ceci peut s'expliquer par la présence de plusieurs lysines et tyrosines au sein de l'Affitin dans des régions potentiellement importantes pour sa fixation sur CD138, par exemple la tyrosine en position 40 au sein

de la
boucle.

Ces



résultats ont pu mettre en évidence la nécessité d'insérer un site unique pour le marquage radioactif de la protéine. Plusieurs stratégies ont ainsi été mises en œuvre (Figure 110).

Figure 110 : Stratégies mises en place pour obtenir un site unique de radiomarquage sur l'Affitin A872

Nous avons étudié la possibilité d'utiliser le thiol d'une cystéine comme élément réactif, en procédant à la substitution de la cystéine en position 41 par différents acides aminés proches chimiquement dans l'objectif de déplacer cette dernière en N ou C terminal. La perte d'activité des différents mutants d'A872 exempts de cystéine en position 41 a montré l'importance de ce résidu pour la fixation d'A872 sur CD138 et l'impossibilité de l'utiliser pour le radiomarquage. Nous avons exploité la présence de l'étiquette 6-His à l'extrémité N terminale de l'Affitin pour réaliser un marquage au technétium 99m à l'aide d'un composé tricarbonyl se fixant préférentiellement sur les résidus histidines. L'analyse des résultats obtenus suite à la réalisation d'un scatchard avec l'Affitin A872 radiomarké a montré une baisse importante de l'affinité de la protéine due très probablement à une faible immunoréactivité. La diminution d'activité observée pour ce marquage est très certainement due à la réactivité chimique de la cystéine qui, renforcée par sa position au niveau de la boucle est rendue particulièrement accessible au composé tricarbonyl. Néanmoins, les résultats obtenus permettent de penser qu'un travail d'optimisation des conditions de marquage doit être effectué. En particulier la quantité de composé tricarbonyl incubée avec l'Affitin lors du marquage pourrait être diminuée et ainsi permettre l'obtention d'une protéine radiomarkée avec une meilleure immunoréactivité. D'autres stratégies ont été envisagées comme l'insertion en partie C terminale d'un AVITag permettant la biotinylation de la protéine de façon ciblée. Ainsi l'utilisation d'une biotine dotée d'un chélatant (ex : DOTA) pourrait permettre, après biotinylation, le marquage sur

site unique de l'Affitin [255]. Les premiers résultats obtenus par cytométrie en flux pour l'Affitin A872-AVITag ont montré une baisse importante de l'affinité comparée à A872, néanmoins cet outil pourra être utilisé pour d'autres applications. Une synthèse sur phase solide de l'Affitin A872 a également été réalisée avec l'insertion d'un DOTA à l'extrémité N terminale. Le passage d'un échantillon de la protéine sur une colonne de gel filtration analytique nous a permis de mettre en évidence un mauvais repliement de la protéine. Il est par conséquent nécessaire d'effectuer un travail de restructuration protéique à l'aide de dialyses successives dans différents tampons pouvant permettre l'obtention de la protéine correctement repliée et fonctionnelle. Enfin nous avons exploré la possibilité de réaliser un marquage de l'Affitin A872 avec une stratégie de chimie « click ». Cette technologie vise à substituer le premier acide aminé de la protéine (méthionine) par un analogue non naturel permettant de réaliser un marquage radioactif orienté, sans perturbation de l'activité biologique de la protéine. Cette étape fut précédée par la synthèse de plusieurs mutants d'A872 dans lesquels la méthionine présente en position 72 a été substituée par une isoleucine, une leucine et une valine. Les trois mutants ont présenté des niveaux de fixation sur CD138 en cytométrie en flux identiques à ceux obtenus pour la protéine originale. Le mutant leucine a été sélectionné et nous avons réalisé sa production dans un milieu minimum autorisant la synthèse de l'Affitin avec l'analogue structural Hpg à la place de la méthionine initialement présente en position 1. La fixation de cette protéine sur CD138 a été analysée par cytométrie en flux et présente une fixation identique à A872. La réaction de « click » qui consiste à fixer un chélateur au niveau du Hpg ainsi que les étapes de radiomarquage et les tests d'immunoréactivité doivent être réalisés. Cependant les résultats préliminaires déjà obtenus sont prometteurs et nous permettent de penser que nous parviendrons rapidement au radiomarquage d'A872 sans altérer son activité biologique.

Au cours de ce travail, nous avons également réalisé une maturation d'affinité par ribosome display en condition d'off-rate à partir de plusieurs mélanges de charpentes nucléotidiques issues du tour de sélection n°7. La maturation d'affinité autorise l'émergence de nouveaux variants possédant potentiellement de meilleures

affinités et l'off-rate permettrait de faciliter le criblage des pools de sélection en triant les Affitins en fonction de leur affinité pour n'en conserver que les meilleures. Les résultats obtenus par ELISA permettent de confirmer la présence d'Affitins spécifiques de CD138 au sein des pools n° 9 et 12. Il sera nécessaire de réaliser le crible de ces différents pools de sélection (n°9 et 12) pour confirmer la présence d'Affitins présentant des niveaux d'affinité plus importants que celles criblées au sein du pool n°7. Une autre méthode peut être envisagée afin d'obtenir, à partir d'un jeu de séquences de base, des protéines ayant une activité d'intérêt améliorée. En effet, il existe des approches *in silico* qui visent à mettre en relation la séquence d'une protéine et son activité. Ainsi dans le cadre d'une collaboration avec Magali Berland (UFIP FRE CNRS 3478) nous avons pu à l'aide d'une méthode innovante explorer un espace de séquences plus large que la part accessible expérimentalement. En effet, même si la technologie du ribosome display nous permet de manipuler des banques de variants très importante (10^{12} clones) nous sommes limités expérimentalement lors des étapes de criblage où un nombre limité de variants sont testés. Le modèle informatique permet quant à lui de réaliser le crible d'un nombre plus important de variants. Une modélisation informatique a été générée à partir des 15 séquences d'acides aminés d'Affitins issues du crible du pool de sélection n°7 et des IMF maximum obtenues pour chacun des clones. Le modèle informatique ainsi construit a permis la prédiction de plusieurs séquences peptidiques et d'une valeur d'IMF maximum associée. La production et le calcul de l'affinité par cytométrie en flux de l'une des séquences prédite avec l'IMF maximum le plus important n'a pas donné de meilleure affinité que celle mesuré avec A872. Néanmoins ce domaine de recherche reste particulièrement intéressant dans la mesure où il permet, à partir d'un modèle informatique, de sélectionner des variants possédant l'activité biologique souhaitée. Ainsi les résultats obtenus au cours de cette étude mériteraient d'être approfondis et pourraient permettre à terme, de faciliter l'obtention de protéines possédant les caractéristiques spécifiques souhaitées.

Actuellement nos travaux de recherches se poursuivent dans le cadre l'immunogénicité des Affitins. Ce critère doit impérativement être pris en compte au

stade le plus précoce possible du développement d'un vecteur. Ce travail vise à explorer la capacité des Affitins à induire une réponse immunitaire. Les résultats obtenus seront utiles pour définir le type de réponse mis en place par l'organisme. D'ores et déjà nous pouvons écarter les réactions sévères de type allergique ou anaphylactique qui n'ont pas été observées lors des deux premières injections d'Affitins par voie intraveineuse ou lors des expérimentations de biodistribution. Un schéma présentant les injections de l'Affitin A872 ainsi que les prélèvements sanguins est proposé dans les résultats supplémentaires. Nous projetons de réaliser un dosage sérique des anticorps IgG et IgM anti-A872 afin de qualifier l'éventuelle réponse humorale mise en place suite aux injections répétées d'A872 chez des souris immunocompétentes.

Les progrès fondamentaux réalisés récemment dans le domaine de la cancérologie résultent non seulement de la rapide évolution des connaissances en biologie mais également des innovations technologiques en matière d'appareils d'imagerie médicale. Il n'en demeure pas moins que pour parvenir à l'objectif consistant à instaurer une réelle et nécessaire personnalisation de la médecine, la recherche doit être poursuivie avec détermination. Les résultats obtenus au cours de la présente étude sont particulièrement prometteurs, dès lors qu'ils permettent d'obtenir des Affitins dirigées contre le CD138, qui offre l'avantage de caractériser plusieurs types de cellules cancéreuses. Le ciblage de ce biomarqueur à l'aide de protéines telles que les Affitins, dotées d'une biodistribution rapide, vectrices de radioisotopes à demi-vie courte, semble être une perspective envisageable afin de générer des images phénotypiques de patients atteints de cancers.

Bibliographie

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Hoeijmakers, J.H., *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 366-74.
4. Balmain, A., *Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays*. Nature reviews. Cancer, 2001. **1**(1): p. 77-82.
5. Cheng, N., et al., *Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(10): p. 1521-33.
6. Hillen, F. and A.W. Griffioen, *Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond*. Cancer metastasis reviews, 2007. **26**(3-4): p. 489-502.
7. Fukumura, D., et al., *Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells*. Cell, 1998. **94**(6): p. 715-25.
8. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
9. Rafii, S., *Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise*. The Journal of clinical investigation, 2000. **105**(1): p. 17-9.
10. Folberg, R., M.J. Hendrix, and A.J. Maniotis, *Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis*. The American journal of pathology, 2000. **156**(2): p. 361-81.
11. Hendrix, M.J., et al., *Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma*. Nature reviews. Cancer, 2003. **3**(6): p. 411-21.
12. Baish, J.W. and R.K. Jain, *Fractals and cancer*. Cancer research, 2000. **60**(14): p. 3683-8.
13. Hashizume, H., et al., *Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness*. The American journal of pathology, 2000. **156**(4): p. 1363-80.
14. Ronnov-Jessen, L., O.W. Petersen, and M.J. Bissell, *Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction*. Physiological reviews, 1996. **76**(1): p. 69-125.
15. Boucher, Y. and R.K. Jain, *Microvascular pressure is the principal driving force for interstitial hypertension in solid tumors: implications for vascular collapse*. Cancer research, 1992. **52**(18): p. 5110-4.
16. Padera, T.P., et al., *Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics*. Science, 2002. **296**(5574): p. 1883-6.
17. Krol, A., et al., *Available volume fraction of macromolecules in the extravascular space of a fibrosarcoma: implications for drug delivery*. Cancer research, 1999. **59**(16): p. 4136-41.
18. Lieleg, O., R.M. Baumgartel, and A.R. Bausch, *Selective filtering of particles by the extracellular matrix: an electrostatic bandpass*. Biophysical journal, 2009. **97**(6): p. 1569-77.

19. Thorne, R.G., et al., *In vivo* diffusion of lactoferrin in brain extracellular space is regulated by interactions with heparan sulfate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008. **105**(24): p. 8416-21.
20. Pluen, A., et al., *Diffusion of macromolecules in agarose gels: comparison of linear and globular configurations*. *Biophysical journal*, 1999. **77**(1): p. 542-52.
21. Nugent, L.J. and R.K. Jain, *Extravascular diffusion in normal and neoplastic tissues*. *Cancer research*, 1984. **44**(1): p. 238-44.
22. Lehman, C.D., et al., *Cancer yield of mammography, MR, and US in high-risk women: prospective multi-institution breast cancer screening study*. *Radiology*, 2007. **244**(2): p. 381-8.
23. Paajanen, H., *Increasing use of mammography improves the outcome of breast cancer in Finland*. *The breast journal*, 2006. **12**(1): p. 88-90.
24. Lee, K.S., et al., *T1 non-small cell lung cancer: imaging and histopathologic findings and their prognostic implications*. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 2004. **24**(6): p. 1617-36; discussion 1632-6.
25. Ferme, C., et al., *Role of imaging to choose treatment*. *Cancer imaging : the official publication of the International Cancer Imaging Society*, 2005. **5 Spec No A**: p. S113-9.
26. Neves, A.A. and K.M. Brindle, *Assessing responses to cancer therapy using molecular imaging*. *Biochimica et biophysica acta*, 2006. **1766**(2): p. 242-61.
27. Stroobants, S., et al., *¹⁸F-FDG-Positron emission tomography for the early prediction of response in advanced soft tissue sarcoma treated with imatinib mesylate (Gleevec)*. *European journal of cancer*, 2003. **39**(14): p. 2012-20.
28. Aboagye, E.O., et al., *Detection of tumor response to chemotherapy by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy: effect of 5-fluorouracil on lactate levels in radiation-induced fibrosarcoma 1 tumors*. *Cancer research*, 1998. **58**(5): p. 1063-7.
29. Brindle, K., *New approaches for imaging tumour responses to treatment*. *Nature reviews. Cancer*, 2008. **8**(2): p. 94-107.
30. Pouget, J.P., et al., *Clinical radioimmunotherapy--the role of radiobiology*. *Nature reviews. Clinical oncology*, 2011. **8**(12): p. 720-34.
31. Jackson, M.R., N. Falzone, and K.A. Vallis, *Advances in Anticancer Radiopharmaceuticals*. *Clinical oncology*, 2013.
32. Fass, L., *Imaging and cancer: a review*. *Molecular oncology*, 2008. **2**(2): p. 115-52.
33. Wahl, R.L., et al., *From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors*. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 2009. **50 Suppl 1**: p. 122S-50S.
34. Cheson, B.D., et al., *Revised response criteria for malignant lymphoma*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2007. **25**(5): p. 579-86.
35. Eriksson, B., et al., *The role of PET in localization of neuroendocrine and adrenocortical tumors*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002. **970**: p. 159-69.
36. Schmidt, M.M. and K.D. Wittrup, *A modeling analysis of the effects of molecular size and binding affinity on tumor targeting*. *Mol Cancer Ther*, 2009. **8**(10): p. 2861-71.

37. Carlson, K., et al., *MR imaging of multiple myeloma in tumour mass measurement at diagnosis and during treatment*. *Acta radiologica*, 1995. **36**(1): p. 9-14.
38. Schirrmeister, H., et al., *Initial results in the assessment of multiple myeloma using 18F-FDG PET*. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 2002. **29**(3): p. 361-6.
39. Zamagni, E., et al., *Prognostic relevance of 18-F FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation*. *Blood*, 2011. **118**(23): p. 5989-95.
40. Walker, R., et al., *Magnetic resonance imaging in multiple myeloma: diagnostic and clinical implications*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2007. **25**(9): p. 1121-8.
41. Nunez Miller, R. and M.A. Pozo, *Non-FDG PET in oncology*. *Clin Transl Oncol*, 2011. **13**(11): p. 780-6.
42. Serdons, K., A. Verbruggen, and G.M. Bormans, *Developing new molecular imaging probes for PET*. *Methods*, 2009. **48**(2): p. 104-11.
43. Reubi, J.C., *Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy*. *Endocr Rev*, 2003. **24**(4): p. 389-427.
44. Benjegard, S.A., et al., *Intraoperative tumour detection using 111In-DTPA-D-Phe1-octreotide and a scintillation detector*. *Eur J Nucl Med*, 2001. **28**(10): p. 1456-62.
45. Virgolini, I., et al., *Procedure guidelines for PET/CT tumour imaging with 68Ga-DOTA-conjugated peptides: 68Ga-DOTA-TOC, 68Ga-DOTA-NOC, 68Ga-DOTA-TATE*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2010. **37**(10): p. 2004-10.
46. Goldenberg, D.M., et al., *Antibody pretargeting advances cancer radioimmunodetection and radioimmunotherapy*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(5): p. 823-34.
47. Le Doussal, J.M., et al., *Targeting of indium 111-labeled bivalent hapten to human melanoma mediated by bispecific monoclonal antibody conjugates: imaging of tumors hosted in nude mice*. *Cancer Res*, 1990. **50**(11): p. 3445-52.
48. Gautherot, E., et al., *Therapy for colon carcinoma xenografts with bispecific antibody-targeted, iodine-131-labeled bivalent hapten*. *Cancer*, 1997. **80**(12 Suppl): p. 2618-23.
49. Gruaz-Guyon, A., et al., *Radiolabeled bivalent haptens for tumor immunodetection and radioimmunotherapy*. *Q J Nucl Med*, 2001. **45**(2): p. 201-6.
50. Goldenberg, D.M., et al., *Use of radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localization of diverse cancers by external photoscanning*. *The New England journal of medicine*, 1978. **298**(25): p. 1384-6.
51. Martin, N.H., *The immunoglobulins: a review*. *Journal of clinical pathology*, 1969. **22**(2): p. 117-31.
52. Schwartz, R.S., *Paul Ehrlich's magic bullets*. *The New England journal of medicine*, 2004. **350**(11): p. 1079-80.
53. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. 1975. *Journal of immunology*, 2005. **174**(5): p. 2453-5.
54. Meeker, T.C., et al., *A clinical trial of anti-idiotype therapy for B cell malignancy*. *Blood*, 1985. **65**(6): p. 1349-63.
55. Shawler, D.L., et al., *Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG*. *Journal of immunology*, 1985. **135**(2): p. 1530-5.

56. Weiner, L.M., *Fully human therapeutic monoclonal antibodies*. Journal of immunotherapy, 2006. **29**(1): p. 1-9.
57. Little, M., et al., *Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies*. Immunology today, 2000. **21**(8): p. 364-70.
58. Stas, P. and I. Lasters, [*Immunogenicity of therapeutic antibodies*]. Medecine sciences : M/S, 2009. **25**(12): p. 1070-7.
59. Hwang, W.Y. and J. Foote, *Immunogenicity of engineered antibodies*. Methods, 2005. **36**(1): p. 3-10.
60. Gelderman, K.A., et al., *Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy*. Trends in immunology, 2004. **25**(3): p. 158-64.
61. Casadevall, A. and L.A. Pirofski, *Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response*. Trends in immunology, 2003. **24**(9): p. 474-8.
62. Rosell, R., et al., *Randomized phase II study of cetuximab plus cisplatin/vinorelbine compared with cisplatin/vinorelbine alone as first-line therapy in EGFR-expressing advanced non-small-cell lung cancer*. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, 2008. **19**(2): p. 362-9.
63. Slamon, D.J., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. The New England journal of medicine, 2001. **344**(11): p. 783-92.
64. Marty, M., et al., *Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2005. **23**(19): p. 4265-74.
65. Mukherji, S.K., *Bevacizumab (Avastin)*. AJNR. American journal of neuroradiology, 2010. **31**(2): p. 235-6.
66. Sinclair, N.R., R.K. Lees, and E.V. Elliott, *Role of the Fc fragment in the regulation of the primary immune response*. Nature, 1968. **220**(5171): p. 1048-9.
67. Amigorena, S. and C. Bonnerot, *Fc receptor signaling and trafficking: a connection for antigen processing*. Immunological reviews, 1999. **172**: p. 279-84.
68. Dickinson, B.L., et al., *Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line*. The Journal of clinical investigation, 1999. **104**(7): p. 903-11.
69. Ghetie, V. and E.S. Ward, *Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn*. Annual review of immunology, 2000. **18**: p. 739-66.
70. Ghetie, V., et al., *Abnormally short serum half-lives of IgG in beta 2-microglobulin-deficient mice*. European journal of immunology, 1996. **26**(3): p. 690-6.
71. Fridman, W.H., et al., *Structural bases of Fc gamma receptor functions*. Immunological reviews, 1992. **125**: p. 49-76.
72. Ghetie, V., et al., *Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis*. Nature biotechnology, 1997. **15**(7): p. 637-40.
73. Dall'Acqua, W.F., et al., *Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences*. Journal of immunology, 2002. **169**(9): p. 5171-80.

74. Wang, W., et al., *Monoclonal antibodies with identical Fc sequences can bind to FcRn differentially with pharmacokinetic consequences*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2011. **39**(9): p. 1469-77.
75. Dostalek, M., et al., *Pharmacokinetics, pharmacodynamics and physiologically-based pharmacokinetic modelling of monoclonal antibodies*. Clinical pharmacokinetics, 2013. **52**(2): p. 83-124.
76. Milenic, D.E., E.D. Brady, and M.W. Brechbiel, *Antibody-targeted radiation cancer therapy*. Nature reviews. Drug discovery, 2004. **3**(6): p. 488-99.
77. Govindan, S.V., et al., *Cancer therapy with radiolabeled and drug/toxin-conjugated antibodies*. Technology in cancer research & treatment, 2005. **4**(4): p. 375-91.
78. Pastan, I., et al., *Immunotoxin therapy of cancer*. Nature reviews. Cancer, 2006. **6**(7): p. 559-65.
79. D. Baty, P.C., *Le point sur les anticorps autorisés en imagerie et en immunothérapie*. Immuno-analyse et Biologie Spécialisée, Octobre 2006. **21**(5): p. 255-263.
80. Artiko, V., et al., *Radioimmunosintigraphy of colorectal carcinomas with 99mTc-labelled antibodies*. Hepato-gastroenterology, 2011. **58**(106): p. 347-51.
81. Ng, D., *Radioimmunotherapy: a brief overview*. Biomedical imaging and intervention journal, 2006. **2**(3): p. e23.
82. Beckman, R.A., L.M. Weiner, and H.M. Davis, *Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors*. Cancer, 2007. **109**(2): p. 170-9.
83. Yokota, T., et al., *Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms*. Cancer research, 1992. **52**(12): p. 3402-8.
84. Holliger, P. and P.J. Hudson, *Engineered antibody fragments and the rise of single domains*. Nature biotechnology, 2005. **23**(9): p. 1126-36.
85. Kenanova, V. and A.M. Wu, *Tailoring antibodies for radionuclide delivery*. Expert opinion on drug delivery, 2006. **3**(1): p. 53-70.
86. Wu, A.M. and P.J. Yazaki, *Designer genes: recombinant antibody fragments for biological imaging*. Q J Nucl Med, 2000. **44**(3): p. 268-83.
87. Hochman, J., D. Inbar, and D. Givol, *An active antibody fragment (Fv) composed of the variable portions of heavy and light chains*. Biochemistry, 1973. **12**(6): p. 1130-5.
88. Buchner, J., I. Pastan, and U. Brinkmann, *A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies*. Anal Biochem, 1992. **205**(2): p. 263-70.
89. Pluckthun, A. and A. Skerra, *Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in Escherichia coli*. Methods Enzymol, 1989. **178**: p. 497-515.
90. Bird, R.E., et al., *Single-chain antigen-binding proteins*. Science, 1988. **242**(4877): p. 423-6.
91. Skerra, A. and A. Pluckthun, *Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli*. Science, 1988. **240**(4855): p. 1038-41.
92. Huhlov, A. and K.A. Chester, *Engineered single chain antibody fragments for radioimmunotherapy*. Q J Nucl Med Mol Imaging, 2004. **48**(4): p. 279-88.
93. Yazaki, P.J., et al., *Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and t84.66 minibody: comparison to radioiodinated fragments*. Bioconj Chem, 2001. **12**(2): p. 220-8.

94. Borsi, L., et al., *Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin*. *Int J Cancer*, 2002. **102**(1): p. 75-85.
95. Carter, P.J., *Potent antibody therapeutics by design*. *Nature reviews. Immunology*, 2006. **6**(5): p. 343-57.
96. Cabilly, S., et al., *Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. **81**(11): p. 3273-7.
97. Nguyen, V.K., et al., *Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation*. *Immunogenetics*, 2002. **54**(1): p. 39-47.
98. Flajnik, M.F., N. Deschacht, and S. Muyldermans, *A case of convergence: why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels?* *PLoS Biol*, 2011. **9**(8): p. e1001120.
99. Vu, K.B., et al., *Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies*. *Mol Immunol*, 1997. **34**(16-17): p. 1121-31.
100. Tijink, B.M., et al., *Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology*. *Mol Cancer Ther*, 2008. **7**(8): p. 2288-97.
101. Arbabi Ghahroudi, M., et al., *Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies*. *FEBS Lett*, 1997. **414**(3): p. 521-6.
102. Harmsen, M.M. and H.J. De Haard, *Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007. **77**(1): p. 13-22.
103. Huang, L., et al., *SPECT imaging with 99mTc-labeled EGFR-specific nanobody for in vivo monitoring of EGFR expression*. *Mol Imaging Biol*, 2008. **10**(3): p. 167-75.
104. Gainkam, L.O., et al., *Correlation between epidermal growth factor receptor-specific nanobody uptake and tumor burden: a tool for noninvasive monitoring of tumor response to therapy*. *Mol Imaging Biol*, 2011. **13**(5): p. 940-8.
105. Vaneycken, I., et al., *Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer*. *FASEB J*, 2011. **25**(7): p. 2433-46.
106. Gronwall, C. and S. Stahl, *Engineered affinity proteins--generation and applications*. *Journal of biotechnology*, 2009. **140**(3-4): p. 254-69.
107. Skerra, A., *Engineered protein scaffolds for molecular recognition*. *J Mol Recognit*, 2000. **13**(4): p. 167-87.
108. Kronqvist, N., et al., *Combining phage and staphylococcal surface display for generation of ErbB3-specific Affibody molecules*. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 2011. **24**(4): p. 385-96.
109. Lofblom, J., et al., *Affibody molecules: engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications*. *FEBS letters*, 2010. **584**(12): p. 2670-80.
110. Nord, K., et al., *Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain*. *Nature biotechnology*, 1997. **15**(8): p. 772-7.
111. Gostring, L., et al., *Cellular effects of HER3-specific affibody molecules*. *PloS one*, 2012. **7**(6): p. e40023.
112. Orlova, A., et al., *On the selection of a tracer for PET imaging of HER2-expressing tumors: direct comparison of a 124I-labeled affibody molecule and trastuzumab in a*

- murine xenograft model*. Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine, 2009. **50**(3): p. 417-25.
113. Ahlgren, S., et al., *Targeting of HER2-expressing tumors using 111In-ABY-025, a second-generation affibody molecule with a fundamentally reengineered scaffold*. Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine, 2010. **51**(7): p. 1131-8.
 114. Strand, J., et al., *Influence of macrocyclic chelators on the targeting properties of (68)Ga-labeled synthetic affibody molecules: comparison with (111)In-labeled counterparts*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70028.
 115. Tolmachev, V., et al., *Tumor targeting using affibody molecules: interplay of affinity, target expression level, and binding site composition*. J Nucl Med, 2012. **53**(6): p. 953-60.
 116. Orlova, A., et al., *Synthetic affibody molecules: a novel class of affinity ligands for molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors*. Cancer research, 2007. **67**(5): p. 2178-86.
 117. Kramer-Marek, G., et al., *68Ga-DOTA-affibody molecule for in vivo assessment of HER2/neu expression with PET*. European journal of nuclear medicine and molecular imaging, 2011. **38**(11): p. 1967-76.
 118. Andrade, M.A., C. Perez-Iratxeta, and C.P. Ponting, *Protein repeats: structures, functions, and evolution*. Journal of structural biology, 2001. **134**(2-3): p. 117-31.
 119. Sedgwick, S.G. and S.J. Smerdon, *The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework*. Trends in biochemical sciences, 1999. **24**(8): p. 311-6.
 120. Stumpp, M.T., H.K. Binz, and P. Amstutz, *DARPin: a new generation of protein therapeutics*. Drug discovery today, 2008. **13**(15-16): p. 695-701.
 121. Binz, H.K., et al., *High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries*. Nature biotechnology, 2004. **22**(5): p. 575-82.
 122. Amstutz, P., et al., *Rapid selection of specific MAP kinase-binders from designed ankyrin repeat protein libraries*. Protein engineering, design & selection : PEDS, 2006. **19**(5): p. 219-29.
 123. Vogel, M., et al., *Designed ankyrin repeat proteins as anti-idiotypic-binding molecules*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2007. **1109**: p. 9-18.
 124. Zahnd, C., et al., *A designed ankyrin repeat protein evolved to picomolar affinity to Her2*. Journal of molecular biology, 2007. **369**(4): p. 1015-28.
 125. Jost, C., et al., *Structural Basis for Eliciting a Cytotoxic Effect in HER2-Overexpressing Cancer Cells via Binding to the Extracellular Domain of HER2*. Structure, 2013.
 126. Zahnd, C., et al., *Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size*. Cancer Res, 2010. **70**(4): p. 1595-605.
 127. Zahnd, C., et al., *Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size*. Cancer research, 2010. **70**(4): p. 1595-605.
 128. Simon, M., et al., *Orthogonal Assembly of a Designed Ankyrin Repeat Protein-cytotoxin conjugate with a clickable serum albumin module for half-life extension*. Bioconjug Chem, 2013.

129. Stahl, A., et al., *Highly potent VEGF-A-antagonistic DARPins as anti-angiogenic agents for topical and intravitreal applications*. *Angiogenesis*, 2013. **16**(1): p. 101-11.
130. Hackel, B.J., A. Kapila, and K.D. Wittrup, *Picomolar affinity fibronectin domains engineered utilizing loop length diversity, recursive mutagenesis, and loop shuffling*. *J Mol Biol*, 2008. **381**(5): p. 1238-52.
131. Getmanova, E.V., et al., *Antagonists to human and mouse vascular endothelial growth factor receptor 2 generated by directed protein evolution in vitro*. *Chemistry & biology*, 2006. **13**(5): p. 549-56.
132. Mamluk, R., et al., *Anti-tumor effect of CT-322 as an adnectin inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2*. *MAbs*, 2010. **2**(2): p. 199-208.
133. Emanuel, S.L., et al., *A fibronectin scaffold approach to bispecific inhibitors of epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor-I receptor*. *MAbs*, 2011. **3**(1): p. 38-48.
134. Skerra, A., *Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities*. *FEBS J*, 2008. **275**(11): p. 2677-83.
135. Skerra, A., *Anticalins as alternative binding proteins for therapeutic use*. *Curr Opin Mol Ther*, 2007. **9**(4): p. 336-44.
136. Beste, G., et al., *Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. **96**(5): p. 1898-903.
137. Schlehuber, S., G. Beste, and A. Skerra, *A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin*. *Journal of molecular biology*, 2000. **297**(5): p. 1105-20.
138. Skerra, A., *Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities*. *The FEBS journal*, 2008. **275**(11): p. 2677-83.
139. Steiner, M., et al., *Tumor-targeting antibody-anticalin fusion proteins for in vivo pretargeting applications*. *Bioconjug Chem*, 2013. **24**(2): p. 234-41.
140. Frampas, E., et al., *Improvement of radioimmunotherapy using pretargeting*. *Front Oncol*, 2013. **3**: p. 159.
141. Kolmar, H., *Natural and engineered cystine knot miniproteins for diagnostic and therapeutic applications*. *Curr Pharm Des*, 2011. **17**(38): p. 4329-36.
142. Kimura, R.H., et al., *Engineered knottin peptides: a new class of agents for imaging integrin expression in living subjects*. *Cancer Res*, 2009. **69**(6): p. 2435-42.
143. Nygren, P.A. and A. Skerra, *Binding proteins from alternative scaffolds*. *Journal of immunological methods*, 2004. **290**(1-2): p. 3-28.
144. Williams, A. and L.G. Baird, *DX-88 and HAE: a developmental perspective*. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*, 2003. **29**(3): p. 255-8.
145. Cicardi, M., et al., *Ecallantide for the treatment of acute attacks in hereditary angioedema*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(6): p. 523-31.
146. Matsuura, T. and T. Yomo, *In vitro evolution of proteins*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2006. **101**(6): p. 449-56.

147. Keefe, A.D. and J.W. Szostak, *Functional proteins from a random-sequence library*. *Nature*, 2001. **410**(6829): p. 715-8.
148. Kotzia, G.A. and N.E. Labrou, *Engineering thermal stability of L-asparaginase by in vitro directed evolution*. *The FEBS journal*, 2009. **276**(6): p. 1750-61.
149. Arnold, F.H., *Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design*. *Nature*, 2001. **409**(6817): p. 253-7.
150. Stemmer, W.P., *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*. *Nature*, 1994. **370**(6488): p. 389-91.
151. Haseltine, E.L. and F.H. Arnold, *Synthetic gene circuits: design with directed evolution*. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 2007. **36**: p. 1-19.
152. Zhao, H., et al., *Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination*. *Nature biotechnology*, 1998. **16**(3): p. 258-61.
153. Hibbert, E.G., et al., *Directed evolution of biocatalytic processes*. *Biomolecular engineering*, 2005. **22**(1-3): p. 11-9.
154. Ermakova-Gerdes, S., S. Shestakov, and W. Vermaas, *Random chemical mutagenesis of a specific psbDI region coding for a luminal loop of the D2 protein of photosystem II in Synechocystis sp. PCC 6803*. *Plant molecular biology*, 1996. **30**(2): p. 243-54.
155. Mohan, U. and U.C. Banerjee, *Molecular evolution of a defined DNA sequence with accumulation of mutations in a single round by a dual approach to random chemical mutagenesis (DuARChEM)*. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 2008. **9**(14): p. 2238-43.
156. Simon, M., U. Zangemeister-Wittke, and A. Pluckthun, *Facile double-functionalization of designed ankyrin repeat proteins using click and thiol chemistries*. *Bioconjug Chem*, 2012. **23**(2): p. 279-86.
157. Tindall, K.R. and T.A. Kunkel, *Fidelity of DNA synthesis by the Thermus aquaticus DNA polymerase*. *Biochemistry*, 1988. **27**(16): p. 6008-13.
158. Beckman, R.A., A.S. Mildvan, and L.A. Loeb, *On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro*. *Biochemistry*, 1985. **24**(21): p. 5810-7.
159. Eckert, K.A. and T.A. Kunkel, *DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction*. *PCR methods and applications*, 1991. **1**(1): p. 17-24.
160. Chaput, J.C., et al., *Creating protein biocatalysts as tools for future industrial applications*. *Expert opinion on biological therapy*, 2008. **8**(8): p. 1087-98.
161. Labrou, N.E., *Random mutagenesis methods for in vitro directed enzyme evolution*. *Current protein & peptide science*, 2010. **11**(1): p. 91-100.
162. Fujii, R., M. Kitaoka, and K. Hayashi, *Error-prone rolling circle amplification: the simplest random mutagenesis protocol*. *Nature protocols*, 2006. **1**(5): p. 2493-7.
163. Fire, A. and S.Q. Xu, *Rolling replication of short DNA circles*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995. **92**(10): p. 4641-5.
164. Gill, P. and A. Ghaemi, *Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review*. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, 2008. **27**(3): p. 224-43.
165. Matsumura, I. and L.A. Rowe, *Whole plasmid mutagenic PCR for directed protein evolution*. *Biomolecular engineering*, 2005. **22**(1-3): p. 73-9.

166. Dufton, M.J., *The significance of redundancy in the genetic code*. Journal of theoretical biology, 1983. **102**(4): p. 521-6.
167. Michnick, S.W., *Protein fragment complementation strategies for biochemical network mapping*. Current opinion in biotechnology, 2003. **14**(6): p. 610-7.
168. Zolghadr, K., U. Rothbauer, and H. Leonhardt, *The fluorescent two-hybrid (F2H) assay for direct analysis of protein-protein interactions in living cells*. Methods in molecular biology, 2012. **812**: p. 275-82.
169. Smith, G.P., *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. Science, 1985. **228**(4705): p. 1315-7.
170. Krebber, C., et al., *Selectively-infective phage (SIP): a mechanistic dissection of a novel in vivo selection for protein-ligand interactions*. Journal of molecular biology, 1997. **268**(3): p. 607-18.
171. Clackson, T. and J.A. Wells, *In vitro selection from protein and peptide libraries*. Trends in biotechnology, 1994. **12**(5): p. 173-84.
172. Mattheakis, L.C., R.R. Bhatt, and W.J. Dower, *An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(19): p. 9022-6.
173. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 818-22.
174. Hanes, J., et al., *Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display*. Nature biotechnology, 2000. **18**(12): p. 1287-92.
175. Becker, N., *Epidemiology of multiple myeloma*. Recent Results Cancer Res, 2011. **183**: p. 25-35.
176. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Multiple myeloma*. Blood, 2008. **111**(6): p. 2962-72.
177. Tian, E., et al., *The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma*. N Engl J Med, 2003. **349**(26): p. 2483-94.
178. Giuliani, N., V. Rizzoli, and G.D. Roodman, *Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition*. Blood, 2006. **108**(13): p. 3992-6.
179. Durie, B.G. and S.E. Salmon, *A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival*. Cancer, 1975. **36**(3): p. 842-54.
180. Dimopoulos, M., et al., *Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3*. Blood, 2011. **117**(18): p. 4701-5.
181. Durie, B.G., *The role of anatomic and functional staging in myeloma: description of Durie/Salmon plus staging system*. European journal of cancer, 2006. **42**(11): p. 1539-43.
182. Edlestyn, G.A., P.J. Gillespie, and F.S. Grebbell, *The radiological demonstration of osseous metastases. Experimental observations*. Clinical radiology, 1967. **18**(2): p. 158-62.
183. Gleeson, T.G., et al., *Accuracy of whole-body low-dose multidetector CT (WBLDCT) versus skeletal survey in the detection of myelomatous lesions, and correlation of*

- disease distribution with whole-body MRI (WBMRI). *Skeletal radiology*, 2009. **38**(3): p. 225-36.
184. Mahnken, A.H., et al., *Multidetector CT of the spine in multiple myeloma: comparison with MR imaging and radiography*. *AJR. American journal of roentgenology*, 2002. **178**(6): p. 1429-36.
 185. Horger, M., et al., *The benefit of using whole-body, low-dose, nonenhanced, multidetector computed tomography for follow-up and therapy response monitoring in patients with multiple myeloma*. *Cancer*, 2007. **109**(8): p. 1617-26.
 186. Hillengass, J., et al., *Prognostic significance of focal lesions in whole-body magnetic resonance imaging in patients with asymptomatic multiple myeloma*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2010. **28**(9): p. 1606-10.
 187. Baur, A., et al., *Diffusion-weighted MR imaging of bone marrow: differentiation of benign versus pathologic compression fractures*. *Radiology*, 1998. **207**(2): p. 349-56.
 188. Bodet-Milin, C., et al., *FDG-PET in the evaluation of myeloma in 2012*. *Diagnostic and interventional imaging*, 2012.
 189. Rousseau, C., et al., *Dosimetry results suggest feasibility of radioimmunotherapy using anti-CD138 (B-B4) antibody in multiple myeloma patients*. *Tumour Biol*, 2012. **33**(3): p. 679-88.
 190. Rousseau, C., et al., *Syndecan-1 antigen, a promising new target for triple-negative breast cancer immuno-PET and radioimmunotherapy. A preclinical study on MDA-MB-468 xenograft tumors*. *EJNMMI Res*, 2011. **1**(1): p. 20.
 191. Cherel, M., et al., *213Bi radioimmunotherapy with an anti-mCD138 monoclonal antibody in a murine model of multiple myeloma*. *J Nucl Med*, 2013. **54**(9): p. 1597-604.
 192. Wijdenes, J., et al., *A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1*. *Br J Haematol*, 1996. **94**(2): p. 318-23.
 193. Dore, J.M., et al., *Identification and location on syndecan-1 core protein of the epitopes of B-B2 and B-B4 monoclonal antibodies*. *FEBS Lett*, 1998. **426**(1): p. 67-70.
 194. Zhan, F., et al., *Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells*. *Blood*, 2002. **99**(5): p. 1745-57.
 195. Perrimon, N. and M. Bernfield, *Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes*. *Nature*, 2000. **404**(6779): p. 725-8.
 196. Whalen, D.M., et al., *Structural insights into proteoglycan-shaped Hedgehog signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(41): p. 16420-5.
 197. Esko, J.D. and U. Lindahl, *Molecular diversity of heparan sulfate*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(2): p. 169-73.
 198. Turnbull, J., A. Powell, and S. Guimond, *Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator*. *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(2): p. 75-82.
 199. Bishop, J.R., M. Schuksz, and J.D. Esko, *Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology*. *Nature*, 2007. **446**(7139): p. 1030-7.
 200. Liu, D., et al., *Dynamic regulation of tumor growth and metastasis by heparan sulfate glycosaminoglycans*. *Semin Thromb Hemost*, 2002. **28**(1): p. 67-78.
 201. Choi, Y., et al., *Syndecans as cell surface receptors: Unique structure equates with functional diversity*. *Matrix Biol*, 2011. **30**(2): p. 93-9.

202. Sasisekharan, R., et al., *Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 521-8.
203. Liu, D., et al., *Tumor cell surface heparan sulfate as cryptic promoters or inhibitors of tumor growth and metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 568-73.
204. Blackhall, F.H., et al., *Heparan sulfate proteoglycans and cancer*. Br J Cancer, 2001. **85**(8): p. 1094-8.
205. Sasisekharan, R. and G. Venkataraman, *Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function*. Curr Opin Chem Biol, 2000. **4**(6): p. 626-31.
206. Kleeff, J., et al., *The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer*. J Clin Invest, 1998. **102**(9): p. 1662-73.
207. Schlessinger, J., et al., *Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization*. Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 743-50.
208. DiGabriele, A.D., et al., *Structure of a heparin-linked biologically active dimer of fibroblast growth factor*. Nature, 1998. **393**(6687): p. 812-7.
209. Mulloy, B. and R.J. Linhardt, *Order out of complexity--protein structures that interact with heparin*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(5): p. 623-8.
210. Chang, Z., et al., *Differential ability of heparan sulfate proteoglycans to assemble the fibroblast growth factor receptor complex in situ*. FASEB J, 2000. **14**(1): p. 137-44.
211. Arikawa-Hirasawa, E., et al., *Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type, is caused by functional null mutations of the perlecan gene*. Nat Genet, 2001. **27**(4): p. 431-4.
212. Ishijima, M., et al., *Perlecan modulates VEGF signaling and is essential for vascularization in endochondral bone formation*. Matrix Biol, 2012. **31**(4): p. 234-45.
213. Rapraeger, A.C., *Molecular interactions of syndecans during development*. Semin Cell Dev Biol, 2001. **12**(2): p. 107-16.
214. Couchman, J.R., L. Chen, and A. Woods, *Syndecans and cell adhesion*. Int Rev Cytol, 2001. **207**: p. 113-50.
215. Kuberan, B., et al., *Light-induced 3-O-sulfotransferase expression alters pineal heparan sulfate fine structure. A surprising link to circadian rhythm*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5053-4.
216. McFall, A.J. and A.C. Rapraeger, *Identification of an adhesion site within the syndecan-4 extracellular protein domain*. J Biol Chem, 1997. **272**(20): p. 12901-4.
217. McQuade, K.J. and A.C. Rapraeger, *Syndecan-1 transmembrane and extracellular domains have unique and distinct roles in cell spreading*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46607-15.
218. Oh, E.S., A. Woods, and J.R. Couchman, *Multimerization of the cytoplasmic domain of syndecan-4 is required for its ability to activate protein kinase C*. J Biol Chem, 1997. **272**(18): p. 11805-11.
219. Beauvais, D.M., et al., *Syndecan-1 regulates alpha5beta1 and alpha5beta3 integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor*. J Exp Med, 2009. **206**(3): p. 691-705.
220. Hayashida, K., W.C. Parks, and P.W. Park, *Syndecan-1 shedding facilitates the resolution of neutrophilic inflammation by removing sequestered CXC chemokines*. Blood, 2009. **114**(14): p. 3033-43.

221. Hayashida, A., S. Amano, and P.W. Park, *Syndecan-1 promotes Staphylococcus aureus corneal infection by counteracting neutrophil-mediated host defense*. J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3288-97.
222. Yang, Y., et al., *Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo*. Blood, 2002. **100**(2): p. 610-7.
223. Chen, D., et al., *Syndecan-1 expression in locally invasive and metastatic prostate cancer*. Urology, 2004. **63**(2): p. 402-7.
224. Klatka, J., *Syndecan-1 expression in laryngeal cancer*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2002. **259**(3): p. 115-8.
225. Lee, S.H., et al., *Prognostic significance of syndecan-1 expression in squamous cell carcinoma of the tonsil*. Int J Clin Oncol, 2013.
226. Lundin, M., et al., *Epithelial syndecan-1 expression is associated with stage and grade in colorectal cancer*. Oncology, 2005. **68**(4-6): p. 306-13.
227. Peretti, T., et al., *Heparanase-2, syndecan-1, and extracellular matrix remodeling in colorectal carcinoma*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2008. **20**(8): p. 756-65.
228. Helpman, L., et al., *Systematic antigenic profiling of hematopoietic antigens on ovarian carcinoma cells identifies membrane proteins for targeted therapy development*. Am J Obstet Gynecol, 2009. **201**(2): p. 196 e1-7.
229. Orecchia, P., et al., *A novel human anti-syndecan-1 antibody inhibits vascular maturation and tumour growth in melanoma*. Eur J Cancer, 2013. **49**(8): p. 2022-33.
230. O'Connell, M.P., et al., *Heparan sulfate proteoglycan modulation of Wnt5A signal transduction in metastatic melanoma cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(42): p. 28704-12.
231. Baba, F., et al., *Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly proliferative breast carcinoma subtype*. Breast Cancer Res Treat, 2006. **98**(1): p. 91-8.
232. Nguyen, T.L., et al., *Syndecan-1 overexpression is associated with nonluminal subtypes and poor prognosis in advanced breast cancer*. Am J Clin Pathol, 2013. **140**(4): p. 468-74.
233. Teng, Y.H., R.S. Aquino, and P.W. Park, *Molecular functions of syndecan-1 in disease*. Matrix Biol, 2012. **31**(1): p. 3-16.
234. Jalkanen, M., et al., *Cell surface proteoglycan of mouse mammary epithelial cells is shed by cleavage of its matrix-binding ectodomain from its membrane-associated domain*. J Cell Biol, 1987. **105**(6 Pt 2): p. 3087-96.
235. Ramani, V.C., et al., *Heparan sulfate chains of syndecan-1 regulate ectodomain shedding*. J Biol Chem, 2012. **287**(13): p. 9952-61.
236. Vlodavsky, I., et al., *Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism?* Trends Biochem Sci, 1991. **16**(7): p. 268-71.
237. Hooper, N.M., E.H. Karran, and A.J. Turner, *Membrane protein secretases*. Biochem J, 1997. **321** (Pt 2): p. 265-79.
238. Werb, Z., *ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology*. Cell, 1997. **91**(4): p. 439-42.
239. Purushothaman, A., et al., *Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis*. Blood, 2010. **115**(12): p. 2449-57.
240. Manon-Jensen, T., Y. Itoh, and J.R. Couchman, *Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding*. FEBS J, 2010. **277**(19): p. 3876-89.

241. Nault, J.C., et al., *Serum proteoglycans as prognostic biomarkers of hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013. **22**(8): p. 1343-52.
242. Peters, W.B., S.P. Edmondson, and J.W. Shriver, *Thermodynamics of DNA binding and distortion by the hyperthermophile chromatin protein Sac7d*. *Journal of molecular biology*, 2004. **343**(2): p. 339-60.
243. Chen, X., et al., *Evolutionary conservation and DNA binding properties of the Ssh7 proteins from Sulfolobus shibatae*. *Sci China C Life Sci*, 2002. **45**(6): p. 583-92.
244. Choli, T., et al., *Isolation, characterization and microsequence analysis of a small basic methylated DNA-binding protein from the Archaeobacterium, Sulfolobus solfataricus*. *Biochim Biophys Acta*, 1988. **950**(2): p. 193-203.
245. Lopez-Garcia, P. and P. Forterre, *Control of DNA topology during thermal stress in hyperthermophilic archaea: DNA topoisomerase levels, activities and induced thermotolerance during heat and cold shock in Sulfolobus*. *Mol Microbiol*, 1999. **33**(4): p. 766-77.
246. Kahsai, M.A., et al., *Stability and flexibility in the structure of the hyperthermophile DNA-binding protein Sac7d*. *Biochemistry*, 2005. **44**(41): p. 13500-9.
247. McAfee, J.G., et al., *Gene cloning, expression, and characterization of the Sac7 proteins from the hyperthermophile Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochemistry*, 1995. **34**(31): p. 10063-77.
248. Edmondson, S.P. and J.W. Shriver, *DNA binding proteins Sac7d and Sso7d from Sulfolobus*. *Methods Enzymol*, 2001. **334**: p. 129-45.
249. David, R., M.P. Richter, and A.G. Beck-Sickinger, *Expressed protein ligation. Method and applications*. *Eur J Biochem*, 2004. **271**(4): p. 663-77.
250. Gao, Y.G., et al., *The crystal structure of the hyperthermophile chromosomal protein Sso7d bound to DNA*. *Nature structural biology*, 1998. **5**(9): p. 782-6.
251. Su, S., et al., *Crystal structures of the chromosomal proteins Sso7d/Sac7d bound to DNA containing T-G mismatched base-pairs*. *Journal of molecular biology*, 2000. **303**(3): p. 395-403.
252. Waibel, R., et al., *Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex*. *Nature biotechnology*, 1999. **17**(9): p. 897-901.
253. Egli, A., et al., *Organometallic 99mTc-aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity*. *J Nucl Med*, 1999. **40**(11): p. 1913-7.
254. Behar, G., et al., *Tolerance of the archaeal Sac7d scaffold protein to alternative library designs: characterization of anti-immunoglobulin G Affitins*. *Protein Eng Des Sel*, 2013. **26**(4): p. 267-75.
255. Inard, C., et al., *Syntheses of functionalized biotin N-1' derivatives: new tools for the control of gene expression with small molecules*. *Bioconjugate chemistry*, 2006. **17**(4): p. 1030-5.

RESUME ET MOTS-CLES

Développement d'une Affitin anti-CD138 comme nouvel outil pour l'imagerie phénotypique

L'imagerie phénotypique dans le domaine de la cancérologie est en plein essor. Notre équipe a utilisé une stratégie originale pour développer une nouvelle classe de protéines affines artificielles, les Affitins. Il s'agit de variants de Sac7d, issue de l'archée *Sulfolobus acidocaldarius*. Ces protéines sont de petite taille (7 kDa), solubles et pourvues d'une très grande stabilité thermique et chimique. Plusieurs études ont permis d'isoler des Affitins de hautes affinités contre différentes protéines d'origine bactérienne ou humaine. En outre, ces protéines peuvent être produites avec un taux d'expression élevé chez *E. coli*. Les Affitins présentent donc des propriétés attractives pour une utilisation en imagerie phénotypique en alternative aux anticorps. A l'aide du ribosome display, nous avons sélectionné des Affitins capables de reconnaître le CD138 humain (syndecan-1) sous forme recombinante. Cette protéine transmembranaire est exprimée dans de nombreux carcinomes et son ciblage présente un réel intérêt pour la thérapie et l'imagerie notamment pour le myélome multiple. Le criblage des Affitins sélectionnées par cytométrie en flux a permis d'isoler plusieurs clones présentant des affinités de l'ordre du nanomolaire. La biodistribution d'une Affitin radiomarquée a montré un temps de demi-vie biologique adapté à l'utilisation des ces protéines pour la vectorisation de radioisotopes à demi-vies courtes souvent utilisés en imagerie nucléaire. De plus, nous avons démontré dans un modèle murin sous-cutané de myélome multiple, que l'Affitin anti-CD138 A872 permet de cibler spécifiquement la tumeur sans accumulation dans les organes périphériques comme le foie ou les reins.

Mots clés: Affitin, Sac7d, alternative aux anticorps, ribosome display, myélome multiple, ciblage tumoral, CD138, imagerie phénotypique, tomographie par émission de positons

Development of an anti-CD138 Affitin as new tool for phenotypic imaging

Phenotypic imaging in oncology is booming. Our team used an original strategy to identify a new class of artificial affinity proteins, the Affitins. These are variants of Sac7d, derived from *Sulfolobus acidocaldarius*. These proteins are small (7 kDa), soluble and have very high thermal and chemical stabilities. Several studies have led to the isolation of high affinity Affitins against different bacterial and human proteins. In addition, these proteins can be produced with a high level of expression in *E. coli*. Therefore, Affitins offer attractive properties for use in phenotypic imaging as alternative to antibodies. Using ribosome display, we selected Affitins against a recombinant form of human CD138 (syndecan-1). This transmembrane protein is expressed in many tumors and its targeting is of real interest for therapy or imaging of multiple myeloma. Screening of selected clones by flow cytometry allowed us to isolate several Affitins with nanomolar affinities. Biodistribution of a radiolabeled Affitin showed a biological half-life suitable for the use of these proteins for the vectorization of radionuclides with short half-lives often used in nuclear imaging. Furthermore, we demonstrated in a subcutaneous mouse model of multiple myeloma that the anti-CD138 Affitin A872 is able to bind specifically to the tumor without accumulation in peripheral organs such as the liver or kidneys.

Keywords: Affitin, Sac7d, antibodies alternatives, ribosome display, multiple myeloma, tumor targeting, phenotypic imaging, positron emission tomography

Matous Etienne

INSERM U892/CNRS UMR 6299-CRCNA

8 quai Moncoussu - BP 70721

44007 Nantes cedex 1