

# Thèse de Doctorat

## Marine GOUX

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes et de l'Université de Liège  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

**Écoles doctorales :** Biologie-Santé (Nantes) & Sciences biomédicales et pharmaceutiques (Liège)

**Discipline :** Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique

**Unités de recherche :**

Unité Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines  
UMR CNRS 6286 Equipe Ingénierie moléculaire et glycobiologie  
Université de Nantes – Faculté des Sciences Bât. 09  
2 rue de la Houssinière – 44322 Nantes, France

Centre de Recherches du Cyclotron  
Université de Liège – Sart-Tilman Bât. 30  
Allée du 6 août – 4000 Liège, Belgique

**Soutenue le** 04 décembre 2015

## Fonctionnalisation de protéines alternatives aux anticorps appliquée à l'imagerie médicale en oncologie

### JURY

**Rapporteurs :** **Vincent DIVE**, Docteur, Commissariat à l'Energie Atomique de Saclay, France  
**Serge GOLDMAN**, Professeur, Université Libre de Bruxelles, Belgique

**Examineurs :** **Frank BOURY**, Professeur, MINT UMRS INSERM 1066, Université d'Angers, France  
**Samuel VOCCIA**, Docteur – Directeur Scientifique, ANMI SA, Belgique

**Directeurs de Thèse :** **Charles TELLIER**, Professeur, UFIP UMR CNRS 6286, Université de Nantes, France  
**André LUXEN**, Professeur, Centre de Recherches du Cyclotron, Université de Liège, Belgique

**Encadrant de Thèse :** **Mathieu CINIER**, Docteur – Directeur Scientifique, Affilogic SAS, France



NanoFar

European Doctorate in nanomedicine  
and pharmaceutical innovation



# **Fonctionnalisation de protéines alternatives aux anticorps appliquée à l'imagerie médicale en oncologie**

Marine Goux



Thèse de doctorat soutenue le 04 décembre 2015 en vue de l'obtention du grade de docteur de l'Université de Nantes et de docteur de l'Université de Liège. Thèse de doctorat soutenue financièrement par la Région Pays de la Loire dans le cadre du programme Erasmus-Mundus NanoFar.

A mes familles.

A Nadège et Tony.



“Everyone you will ever meet knows something you don't.”

- Bill Nye





## Remerciements

Je tiens à remercier les différents membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci au professeur Serge Goldman et au docteur Vincent Dive d'avoir approuvé ce mémoire. Merci au docteur Samuel Voccia d'avoir consenti à intégrer le jury en dernière minute. Merci au professeur Frank Boury de m'avoir acceptée au sein du master TIF, d'avoir participé à la création du consortium NanoFar et d'avoir permis la rencontre entre les différents membres (étudiants, chercheurs et professionnels) grâce aux « NanoFar Autumn School ». Merci également d'avoir accepté de présider le jury de thèse.

J'adresse également mes sincères remerciements aux professeurs Charles Tellier et André Luxen pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire alors que je n'avais aucune notion (ou presque) en biologie moléculaire, microbiologie, chimie des métaux, radiochimie, imagerie médicale ou encore culture cellulaire. Un grand merci à Olivier Kitten pour m'avoir intégrée au sein de la société Affilogic lors du stage en entreprise réalisé au cours de ma deuxième année. Merci au docteur Mathieu Cinier pour ses conseils et son soutien tout au long de ces trois années.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, les docteurs Maxime Culot et Clémence Queffelec, d'avoir assisté aux différentes réunions. Je tiens à remercier plus particulièrement Clémence pour m'avoir soutenue, conseillée et surtout pour avoir sacrifié un stylo à pointe de diamant afin d'ouvrir mes ampoules de  $\text{GaCl}_3$  !

Un grand merci aux différentes personnes que j'ai pu rencontrer ou revoir au cours de ce projet de thèse. Merci aux UFIPiens, Affilogiciens et ex-biocat pour avoir créé une ambiance plus ou moins studieuse dans nos bureaux, que ce soit dans les officiels (bât. 08, 09 et 25) ou les officieux (Tapazinc, Delirium, Café de l'île et le Labo). Je n'oublierai pas nos séances karaoké (salade de fruit jolie, jolie, jolie ♪), les soirées jeux (les elfes sont des fourbes), les footings ou encore les divers déménagements qui ont su nous maintenir en forme. J'ai aussi pu retrouver la fine équipe de stagiaires M1 de l'U3B, je remercie Simon et Denis le franco-serbe-canadien pour leurs blagues quasi-incompréhensibles, sans oublier Maxime qui aurait pu gagner le prix du meilleur interprète de Britney Spears (ou Frankie Vincent, au choix). Merci au plus vieux membre de l'U3B/UFIP, David I<sup>er</sup>, pour ses conseils qu'ils soient d'ordres scientifique ou littéraire. Bonne chance pour cette première année loin de Nantes ! Merci aux autres personnes du bureau (Amina, Amélie, Diane, Valia, Natka, Johann II et les stagiaires bulgares) pour leur bonne humeur et (surtout !) vos « miscake » (nous attendons toujours ceux de Samir !!!). Je remercie également les bioinfos, et plus particulièrement Johann I, Swap, Magalou (et Edouard) et Muschi, pour leur

gentillesse et leur disponibilité. Merci à Florian le doctorant-stagiaire et Brendan pour avoir supporté Denis. Je remercie également Eloïse d'avoir passé quelques-unes de ses pauses café dans la cafétéria du bâtiment 09 et de m'avoir aidé à tenir le rythme de début de thèse. Merci aux UFIPiens d'adoption, Kévin et Johann le chimiste, pour avoir égayé mes soirées et/ou matinées au labo. Et bien sûr, je remercie tout le personnel, les étudiants (doctorants, post-docs et stagiaires) et l'ensemble des chercheurs de l'UFIP, pour leur aide précieuse !

Je remercie également les Affilogiciens pour m'avoir aussi bien accueillie, que ce soit pendant ma période de stage ou même avant, avec les vendredis pizza, les feux de camp, les attaques subites de boules de panda, de fléchettes en mousse (et oui Mathieu, on ne peut pas recharger deux pistolets Nerf en même temps quand on a les deux mains prises !) ou encore de bombes carbo'. Merci aux anciens (Olivier, MatThieu, Simon, NadEUgUEU, Justine, Anaëlle, Pinkmony), aux moyen-vieux (ChloEU, Ariane, Astrid) et aux petits nouveaux (Anne, Léo et Jessy, Nathalie, Fanny).

Au cours de mon année loin du Frouzistan<sup>1</sup>, j'ai rencontré de nombreuses personnes qui m'ont aidée à améliorer mon parler wallon de Lièèch agrémenté de « Oufti ! » (à prononcer Euuftè), mais aussi de fricadelles, frites « de chez la vieille avec la crappy façade verte », gaufres de chez Polux, lacquemants, croustillons, spéculoos, et autres boulets sauce lapin. Merci à Tac (Sylvestre), M. Tartine (Corentin), M. Kaisin (Geoffroy), Marlies, Jean (et les autres doctorants du +4), Sophie, François, Franco, Benjamin, Ernesto, Guillaume, Mélissa, ainsi que le personnel du CRC et du CMMI.

Un merci tout particulier à Nadège et Corinne pour avoir traqué les fautes d'orthographe résiduelles !

Merci à ma famille pour leur confiance et leur soutien dans ce projet, et ce, depuis le jour où j'ai fabriqué ma première potion magique. Merci à mon chéri pour m'avoir supportée et soutenue au cours de ces trois ans, et pour avoir survécu à cette année loin de moi.

---

<sup>1</sup> France

## Sommaire

Tables des illustrations.....	13
Abréviations.....	17
Code des acides aminés.....	19
Chapitre 1 : Utilisation des protéines en imagerie appliquée à l'oncologie.....	23
1.1.    L'imagerie en oncologie.....	23
1.2.    Radiomarquage des protéines.....	28
1.3.    Les protéines alternatives aux anticorps.....	37
1.4.    Objectifs et organisation du travail de thèse.....	46
Chapitre 2 : Génération d'un système de co-expression pour la phosphorylation <i>in vivo</i> de Nanofitine.....	51
2.1.    Introduction.....	51
2.2.    Choix des vecteurs et de la souche.....	52
2.3.    Phosphorylation <i>in vivo</i> des Nanofitines H4P et H4HP4.....	54
2.4.    Optimisation de la phosphorylation.....	56
2.5.    Purification des phosphoprotéines.....	59
2.6.    Conclusion.....	64
Chapitre 3 : Mise au point d'une étiquette peptidique phosphorylable pour la chélation de cations trivalents.....	69
3.1.    Introduction.....	69
3.2.    Optimisation de l'étiquette phosphorylable.....	72
3.3.    Etudes de la phosphorylation des étiquettes peptidiques LBT.....	77
3.4.    Etudes de complexation des LBT modifiés avec des cations.....	83
3.5.    Conclusion et perspectives.....	92
Chapitre 4 : Imagerie fonctionnelle de Nanofitine.....	97
4.1.    Introduction.....	97
4.2.    Marquage régiospécifique de la Nanofitine B10-Cys.....	98
4.3.    Le modèle animal EGFR : un double modèle tumoral.....	104
4.4.    Biodistribution de la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys.....	106
4.5.    Ciblage tumoral.....	112
4.6.    Conclusion et perspectives.....	114
Chapitre 5 : Conclusion et perspectives.....	117
5.1.    Conclusion concernant le travail de thèse.....	117
5.2.    Perspectives quant à l'utilisation des Nanofitines en clinique.....	119

Chapitre 6 : Matériel et méthodes.....	121
6.1. Composition des tampons, solutions et milieux.....	121
6.2. Amorces et souches bactériennes .....	122
6.3. Génie génétique.....	124
6.4. Production et purification des protéines .....	129
6.5. Etudes de la phosphorylation .....	134
6.6. Etudes de chélation .....	138
6.7. Marquage des Nanofitines .....	142
6.8. Imagerie fonctionnelle de Nanofitine .....	145
Bibliographie.....	149
Annexes.....	165
Annexe 1 : Alignement des séquences Uniprot des EGFR humain (P00533) et murin (Q01279) selon le logiciel Multalin.....	165
Annexe 2 : Récapitulatif des radiotraceurs anti-EGFR existants.....	167
Annexe 3 : Produits et matériel.....	168
Annexe 4 : Tableau de scores souris .....	170
Annexe 5 : Productions scientifiques.....	171

## Tables des illustrations

Figure 1 : Images fusionnées PET/CT et PET/MRI d'un patient avec un glioblastome multiforme .....	24
Figure 2 : Schéma des détecteurs SPECT et PET.....	25
Figure 3 : Représentation schématique d'un radiotracer composé d'un vecteur et d'un radioélément.....	26
Figure 4 : Illustrations des trois principales stratégies de radiomarquage des protéines.....	29
Figure 5 : Exemples de réactions de marquage impliquant la fonction amine primaire des résidus lysine.....	30
Figure 6 : Exemples de réactions de marquage impliquant la fonction thiol des résidus cystéine.....	31
Figure 7 : Iodation directe des résidus tyrosine et histidine présents sur une immunoglobuline.....	31
Figure 8 : Iodation d'une immunoglobuline via l'utilisation d'un groupement prosthétique.....	32
Figure 9 : Groupements prosthétiques utilisés pour le marquage au fluor-18.....	33
Figure 10 : Fluoration d'une immunoglobuline via l'utilisation d'un groupement prosthétique.....	33
Figure 11 : Constante thermodynamique de stabilité et constantes cinétiques.....	34
Figure 12: Constantes d'affinité des métaux pour les agents de chélation.....	35
Figure 13: Structure PDB 1K2V du complexe DFO mésylate-Fe(III).....	36
Figure 14 : Taille des vecteurs et temps de demi-vie biologique.....	38
Figure 15 : Taille des vecteurs,absorption tumorale et temps de demi-vie biologique.....	39
Figure 16 : Alternatives aux anticorps développées contre des récepteurs à activité TK.....	41
Figure 17 : De Sac7d aux Nanofitines.....	43
Figure 18 : Applications des Nanofitines dans les domaines des biotechnologies, de l'imagerie et de l'in vivo.....	44
Figure 19 : Marquage régiosélectif de la Nanofitine anti-lysozyme H4 par du <sup>18</sup> F-FBEM.....	45
Figure 20: Schéma reprenant l'objectif principal de la thèse consistant au développement d'un nouvel outil diagnostique en oncologie.....	47
Figure 21 : Phosphorylation in vitro de la Nanofitine anti-lysozyme H4P par la CKII $\alpha$ .....	51
Figure 22 : Constructions générées pour le développement du système de co-expression in vivo.....	53
Figure 23 : Validation de la construction du pNF2 et fonctionnalité de la protéine H4HP4.....	54
Figure 24 : Co-transformation des Escherichia coli TOP10 par les vecteurs pNF et pCKII $\alpha$ .....	55
Figure 25 : Phosphorylation in vivo de la protéine H4P.....	56

Figure 26 : Optimisation de la phosphorylation in vivo de la protéine H4P par variation de la concentration en arabinose. ....	57
Figure 27 : Phosphorylation ex-vivo de la protéine H4HP4.....	58
Figure 28 : Purification des Nanofitines H4P et H4P-P phosphorylée in vitro sur résine de Fe(III)-NTA ou Ga(III)-NTA.....	60
Figure 29 : Purification des Nanofitines H4P4-P phosphorylées in vivo ou ex-vivo sur résine de Fe(III)-NTA ou Ga(III)-NTA.....	61
Figure 30 : Charge nette des différentes protéines.....	63
Figure 31 : Détermination du taux de phosphorylation de la protéine H4P4-P.....	64
Figure 32 : Types de liaison s'établissant entre un ion calcium(II) et le groupement carboxylate des résidus aspartate (Asp-) ou glutamate (Glu-).....	69
Figure 33 : Structures des motifs en doigt à zinc et EF-hand. ....	70
Figure 34 : Caractéristiques des peptides mimétiques. ....	73
Figure 35 : Représentation schématique des hypothèses concernant la chélation du terbium(III) par les peptides 2P, 3P et 4P. ....	74
Figure 36 : Structure du LBT nommé « peptide 1 » et chélaté au terbium(III).....	76
Figure 37 : Expression de la protéine LBT+.....	77
Figure 38 : Substitution des résidus acide glutamique par des résidus sérine-phosphorylés. ....	78
Figure 39 : Phosphorylation in vitro des protéines H4P et LBT2-2S avec différentes concentration en CKII $\alpha$ . SDS-PAGE 17%.....	80
Figure 40 : Phosphorylation in vitro des mutants LBT3-2S et LBT4-2S. SDS-PAGE 17%. ....	82
Figure 41 : Phosphorylation in vitro des mutants LBT4-2S et LBT5-1S. (A) SDS-PAGE 17%. ....	83
Figure 42 : Etude de chélation des Nanofitines fusionnées LBT avec du terbium(III). ....	84
Figure 43 : Courbes de titration et constantes de dissociation pour le terbium(III) à pH7 des différentes Nanofitines anti-lysozyme H4 fusionnée aux LBT.....	85
Figure 44 : Schéma de l'étude de compétition avec du [Zr(NTA) $_2$ ].....	87
Figure 45 : Compétition entre le terbium(III) et le zirconium(IV) à pH7.....	88
Figure 46 : Affinité pour le terbium(III) des différentes Nanofitines anti-lysozyme H4 fusionnées aux LBT.....	90
Figure 47 : Etude de compétition entre le gallium(III) et le terbium(III) pour les protéines LBT+ et LBT1. ....	90
Figure 48 : Etude de compétition entre le terbium(III) et le gallium(III) pour les protéines LBT4, LBT5, LBT4-2SP et LBT5-1SP. ....	91
Figure 49 : Schéma du radiomarquage de la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys par du $^{18}\text{F}$ -FBEM. ....	98
Figure 50 : SDS-PAGE de la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys.....	99

Figure 51 : Schéma réactionnel de l'action du TCEP sur les dimères de Nanofitine B10-Cys.....	99
Figure 52 : Marquage à froid de la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys avec du <sup>19</sup> F-FBEM.....	100
Figure 53 : Analyse en spectrométrie de masse (ESI-Q-TOF) des fractions récoltées à 23 minutes en HPLC après 45 min de réaction et calculs des masses molaires associées à la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys.....	101
Figure 54 : Synthèse automatisée du <sup>18</sup> F-FBEM.....	102
Figure 55 : Schéma de marquage de la Nanofitine sur billes magnétiques. ....	103
Figure 56 : Stabilité in vitro de la Nanofitine radiomarquée à 37°C.....	104
Figure 57 : Suivi de la pousse des tumeurs H520 et A431 injectées dans des souris balb/c nude. ....	105
Figure 58 : Immunohistochimie en fluorescence de coupes de tumeurs H520 et A431 implantées sur les souris modèle EGFR. ....	106
Figure 59 : Cinétique d'absorption des Nanofitines anti-EGFR B10-Cys dans le modèle EGFR et les souris saines.....	107
Figure 60 : Biodistribution de la Nanofitine <sup>18</sup> F-FBEM-Cys-B10 injectée avec approximativement 20 µg de B10-Cys à 2h30 après injection.....	108
Figure 61 : Métabolisme de la Nanofitine anti-EGFR radiomarquée <sup>18</sup> F-FBEM-Cys-B10. ....	110
Figure 62 : Cinétique d'absorption des Nanofitines anti-EGFR B10-Cys et anti-lysozyme H4-Cys radiomarquées avec du <sup>18</sup> F-FBEM .....	111
Figure 63 : Ciblage de la tumeur EGFR-positive par la Nanofitine anti-EGFR radiomarquée <sup>18</sup> F-FBEM-Cys-B10.....	112
Figure 64 : Rapport d'absorption de la Nanofitine <sup>18</sup> F-FBEM-Cys-B10 injectée dans les souris modèle EGFR.....	113
Figure 65 : Vecteurs pLBT générés par mutagenèse dirigée .....	125
Figure 66 : Les vecteurs de type pAFG, pNF et pLBT dérivant du vecteur pQE30.....	128
Figure 67 : Schéma de purification des phosphoprotéines sur résine de Fe(III)-NTA. ....	135
Figure 68 : Etapes de la synthèse automatisée du <sup>18</sup> F-FBEM.....	143

Tableau 1 : Principaux radioéléments utilisés en imagerie nucléaire .....	26
Tableau 2 : Principaux radiotraceurs utilisés en clinique pour le diagnostic de cancers [15, 16, 17, 18, 19].....	28
Tableau 3 : Alternatives aux anticorps développées pour l'imagerie nucléaire des récepteurs à activité TK.....	42
Tableau 4 : Caractéristiques des vecteurs choisis pour la co-expression.....	52
Tableau 5 : Caractéristiques physicochimiques et constantes de stabilité du nickel(II), du fer(III) et du gallium(III).....	59
Tableau 6 : Séquences des différents peptides synthétiques utilisés.....	72
Tableau 7 : Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission du terbium(III) et des acides aminés aromatiques. ....	75
Tableau 8 : Séquences des différentes étiquettes générées par l'équipe d'Imperiali.....	76
Tableau 9 : Première génération de mutants par mutagenèse dirigée pour la phosphorylation de l'étiquette LBT.....	79
Tableau 10 : séquences compatibles avec la phosphorylation de la deuxième sérine.....	81
Tableau 11 : séquences compatibles avec la phosphorylation de la première sérine. ....	81
Tableau 12 : Deuxième génération de mutants pour la phosphorylation de l'étiquette LBT. ....	81
Tableau 13 : Troisième génération de mutants pour la phosphorylation de l'étiquette LBT.....	82
Tableau 14 : Paramètres physicochimiques du gallium(III), du zirconium(IV) et du terbium(III), et constantes de stabilité pour le NTA.....	86
Tableau 15 : Cancers présentant une surexpression d'EGFR [204].....	97
Tableau 16: Liste des tampons.....	121
Tableau 17 : Amorces générées pour les besoins du projet.....	122
Tableau 18 : Souches d'Escherichia coli utilisées.....	123
Tableau 19 : Protocole et mix de PCR classique.....	124
Tableau 20: Vecteurs et inserts obtenus par PCR.....	124
Tableau 21 : Mix mutagenèse dirigée.....	125
Tableau 22 : Propriétés physicochimiques des Nanofitines produites. ....	132
Tableau 23 : Concentration massique en BSA.....	136
Tableau 24 : Exemple de tableau préparatif pour la titration des protéines possédant un LBT	139
Tableau 25 : Etapes de la synthèse automatisée du <sup>18</sup> F-FBEM. ....	143
Tableau 26 : Produits chimiques.....	168
Tableau 27 : Matériel et kit.....	168



## Abréviations

<b>6HisTag</b>	Etiquette hexa-histidine
<b>AA</b>	Acide aminé
<b>FB-précurseur</b>	Sel d'acide pentaméthylbenzyl(4-triméthylammonium)benzoate trifluorométhanesulfonique
<b>CBT</b>	Cyanobenzothiazole
<b>CKII<math>\alpha</math></b>	Unité $\alpha$ de la caséine kinase II humaine
<b>CV</b>	Volume de résine ( <i>Column Volume</i> )
<b>CT</b>	Tomodensitométrie ( <i>Computerized Tomography</i> )
<b>NC</b>	Nombre de coordination
<b>DECP</b>	Diethylcyanophosphonate
<b>DFO</b>	Desferrioxamine B
<b>DIPEA</b>	Diisopropylethyl amine
<b>DOTA</b>	Acide 1,4,7,10-Tétrazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique
<b>DTPA</b>	Acide diéthylène triamine penta acétique
<b>Effet EPR</b>	Effet augmenté de perméabilité et de rétention ( <i>Enhanced Permeability and Retention effect</i> )
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétraacétique
<b>EGFR</b>	Récepteur au facteur de croissance épithélial ( <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> )
<b>FBEM</b>	N-[2-(4-fluorobenzamido) éthyle] maléimide
<b>FDG</b>	2-désoxy-2-fluoro-D-glucose
<b>HEPES</b>	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
<b>HER</b>	Récepteur au facteur de croissance épithélial humain ( <i>Human Epidermal growth factor Receptor</i> )
<b>HYNIC</b>	Acide 6-hydrazinopyridine-3-carboxylique
<b>IMAC</b>	chromatographie d'affinité <i>via</i> des ions métalliques ( <i>Immobilized-Metal Affinity Chromatography</i> )
<b>IPTG</b>	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
<b>IRM</b>	Imagerie par Résonance Magnétique
<b>K<sub>D</sub></b>	Constante de dissociation
<b>Kryptofix 222</b>	4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosane
<b>LBT</b>	Etiquette de fixation aux lanthanides ( <i>Lanthanide-Binding Tag</i> )
<b>MES</b>	Acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique
<b>MM</b>	Masse molaire
<b>NOTA</b>	Acide 1,4,7-Triaza-cyclononane-1,4,7-triacétique
<b>NTA</b>	Acide nitrilotriacétique
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>p.i.</b>	Après injection/post-injection
<b>PCR</b>	Réaction en chaîne par polymérase
<b>PET</b>	Tomographie par émission de positon ( <i>Positron Emission Tomography</i> )
<b>PMSF</b>	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
<b>RN</b>	Radioélément
<b>SDS</b>	Sodium dodécyle sulfate
<b>SDS-PAGE</b>	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
<b>SPECT</b>	Tomographie d'émission monophotonique ( <i>Single-Photon Emission Computed Tomography</i> )
<b>TagP4</b>	Etiquette peptidique tétraphosphorylable
<b>TCEP</b>	Tris(2-carboxyethyl)phosphine

<b>TEMED</b>	<i>N,N,N',N'</i> -Tétraméthyléthylènediamine
<b>TFA</b>	Acide trifluoroacétique
<b>Xylénol orange</b>	3,3'-Bis[N,N-bis(carboxyméthyl)aminométhyl]-o-cresolsulfonephthalein tetrasodium salt

## Code des acides aminés

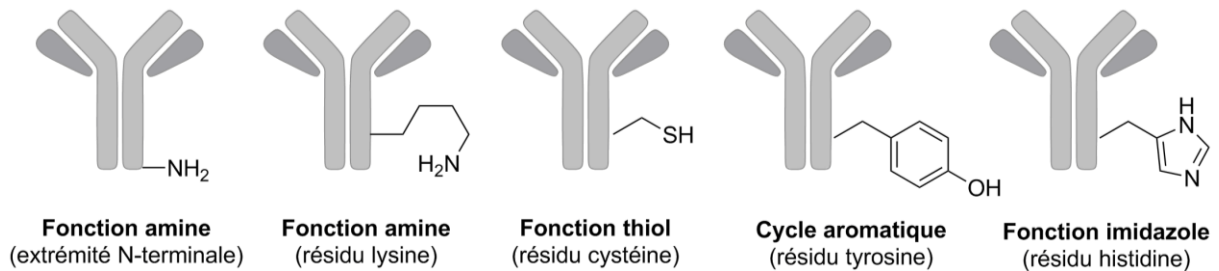
<b>A</b>	<b>Ala</b>	Alanine	<b>N</b>	<b>Asn</b>	Asparagine
<b>C</b>	<b>Cys</b>	Cystéine	<b>P</b>	<b>Pro</b>	Proline
<b>D</b>	<b>Asp</b>	Acide aspartique/aspartate	<b>Q</b>	<b>Gln</b>	Glutamine
<b>E</b>	<b>Glu</b>	Acide glutamique/glutamate	<b>R</b>	<b>Arg</b>	Arginine
<b>F</b>	<b>Phe</b>	Phénylalanine	<b>S</b>	<b>Ser</b>	Sérine
<b>G</b>	<b>Gly</b>	Glycine	<b>pS</b>	<b>pSer</b>	Sérine phosphorylée
<b>H</b>	<b>His</b>	Histidine	<b>T</b>	<b>Thr</b>	Thréonine
<b>I</b>	<b>Ile</b>	Isoleucine	<b>V</b>	<b>Val</b>	Valine
<b>K</b>	<b>Lys</b>	Lysine	<b>W</b>	<b>Trp</b>	Tryptophane
<b>L</b>	<b>Leu</b>	Leucine	<b>Y</b>	<b>Tyr</b>	Tyrosine
<b>M</b>	<b>Met</b>	Méthionine			



---

## UTILISATION DES PROTEINES EN IMAGERIE APPLIQUEE A L'ONCOLOGIE

---



Cette partie fait l'état des lieux concernant le marquage des protéines et leur utilisation en imagerie appliquée à l'oncologie.



## Chapitre 1 : Utilisation des protéines en imagerie appliquée à l'oncologie

### 1.1. L'imagerie en oncologie

#### 1.1.1. Intérêt de l'imagerie en oncologie

En 2012, les maladies cancéreuses ont touché 14 millions de personnes dans le monde avec une mortalité de 8,2 millions. L'Organisation Mondiale de la Santé prévoit une augmentation de 70% des cas au cours des deux prochaines décennies [1]. Ces maladies se caractérisent par la prolifération rapide et anarchique de cellules anormales pouvant être disséminées dans l'ensemble de l'organisme. La détection et le traitement des cancers à un stade précoce sont cruciaux pour la survie des patients. Plus de 90% des patients diagnostiqués précocement d'un cancer colorectal, du sein ou des ovaires gagnent environ 5 ans de vie supplémentaire [2].

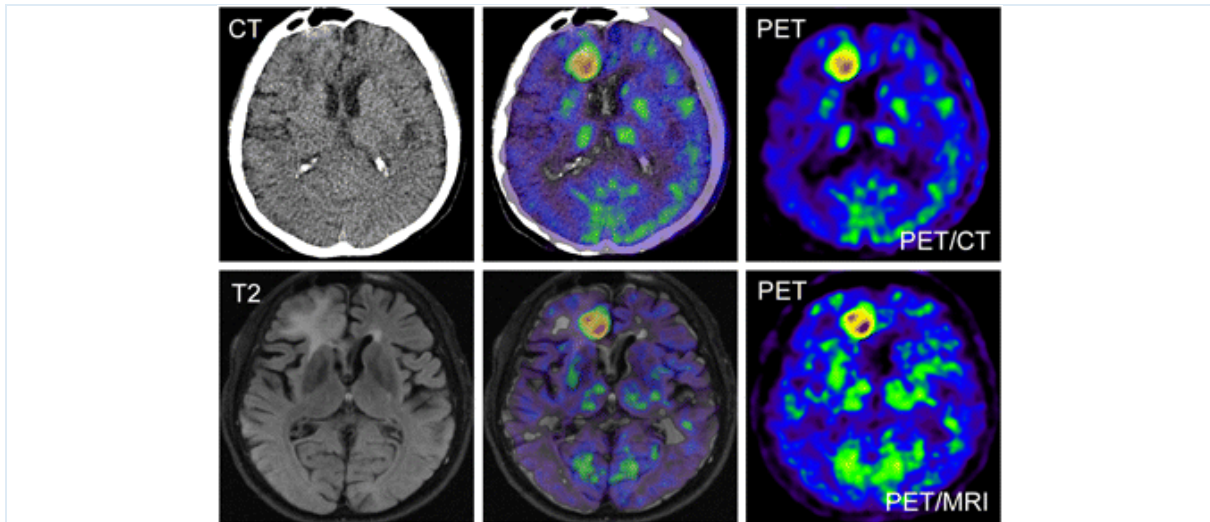
Les récents progrès en biochimie et biologie moléculaire ont permis la découverte de nouveaux biomarqueurs impliqués dans le développement tumoral. Les tumeurs sont le résultat de modifications génétiques affectant l'expression et/ou l'intégrité des protéines permettant l'activation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, l'angiogenèse et le développement de métastases [3, 4]. Les changements moléculaires, tant au niveau génétique que protéique, sont exploités pour le diagnostic et le traitement du cancer. Classiquement, la caractérisation des tumeurs se fait par immunohistochimie ou *via* des techniques de biologie moléculaire à partir d'échantillons biologiques obtenus par biopsie (exérèse de la tumeur) ou par prélèvement de liquide cytologique (frottis, ponctions, lavages broncho-alvéolaires). Ces techniques particulièrement invasives ne permettent pas d'obtenir un diagnostic moléculaire fiable du fait de l'hétérogénéité tumorale.

#### 1.1.2. Les différentes techniques d'imagerie médicale

L'imagerie médicale rassemble les techniques non-invasives permettant de réaliser en routine des diagnostics et de suivre l'évolution du traitement chez un patient sans avoir recours à un prélèvement biologique. En oncologie, les méthodes d'imagerie structurale sont combinées aux méthodes d'imagerie moléculaire afin d'obtenir des informations à la fois anatomique et fonctionnelle (métabolisme, physiopathologie, etc.).

### 1.1.2.1. L'imagerie structurelle

L'imagerie structurelle regroupe les techniques permettant de visualiser les structures anatomiques, telles que les techniques de résonance magnétique nucléaire (imagerie par résonance magnétique, IRM), tomodensitométrie (CT), radiologie ou encore échographie.



**Figure 1 : Images fusionnées PET/CT et PET/IRM d'un patient avec un glioblastome multiforme. D'après [5]**

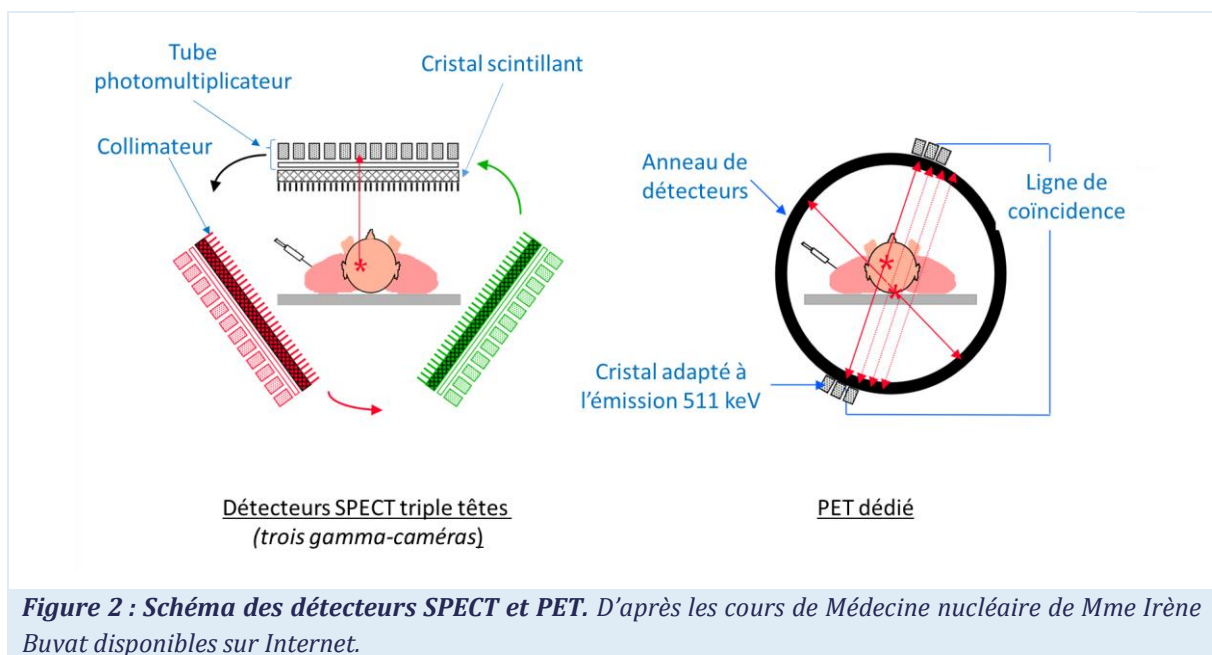
Les techniques CT et IRM permettent la détection de tumeurs ayant un diamètre supérieur à 1 cm (Figure 1). Le CT utilise l'absorption des rayons X par les tissus et permet ainsi de dissocier les tissus grâce à quatre niveaux de contraste en fonction des degrés de densité (du plus foncé au plus clair : air>eau>graisse>os). Contrairement au CT, l'IRM n'expose pas le patient aux radiations (2 à 10 mSv/examen CT [6]). Cette technique utilise un champ magnétique qui excite les atomes d'hydrogène présents dans les tissus contenant des molécules d'eau et mesure le temps que mettent ces molécules à retourner à leur état d'équilibre. Elle permet de différencier les tissus mous (ligaments, tendons, organes, etc.) et d'appréhender l'hétérogénéité des tumeurs et la présence de métastases.

### 1.1.2.2. L'imagerie moléculaire

L'imagerie moléculaire permet le ciblage, *via* un radiotracer, de biomarqueurs exprimés à la surface des cellules ou d'étudier le métabolisme des organes, des tissus ou des cellules grâce aux techniques de tomographie par émission de positons (PET) ou par émission de photon unique (SPECT). L'imagerie SPECT utilise des radioéléments à émission  $\gamma$  dont le rayonnement est détecté par des gamma-caméras planes tournant autour du patient (Figure 2). Les gamma-caméras sont constituées : d'un collimateur ne laissant passer que les rayonnements émis perpendiculairement



à la surface de la gamma-caméra, d'une surface de cristaux de NaI et d'un tube photomultiplicateur. Les images 2D obtenues sont reconstruites en 3D grâce à un algorithme permettant ensuite de localiser les organes ayant absorbés le plus de radiotraceurs. L'imagerie PET est basée sur la détection antiparallèle de deux photons émettant une énergie de 511 keV. La dégradation du noyau radioactif d'un radioélément à émission  $\beta^+$  provoque l'émission d'un positon capable de se recombinaison avec un électron du milieu. La réaction libère ensuite deux photons gamma dans des directions opposées avec un angle de  $180^\circ$  et une énergie de 511 keV. Une série de détecteurs gamma en couronne permet d'enregistrer les photons émis simultanément, selon une ligne de coïncidence, et d'identifier la position de leur lieu d'émission après reconstruction algorithmique (Figure 2).



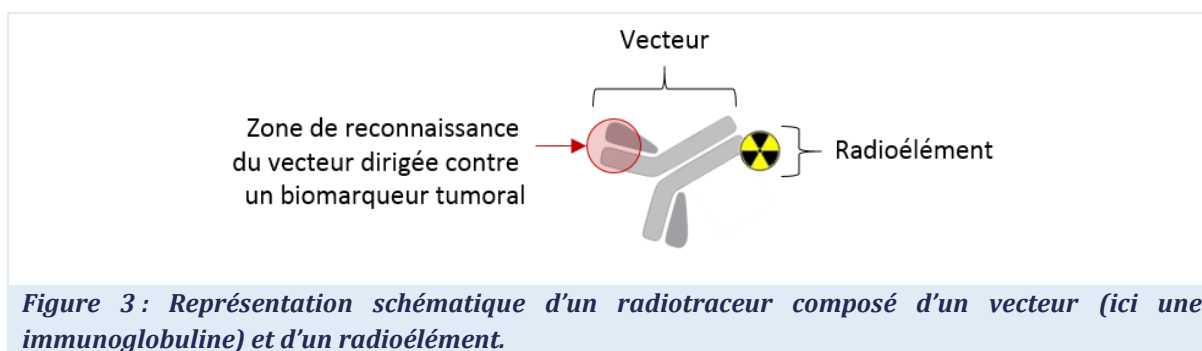
Malgré le fait que les deux techniques utilisent des détecteurs à scintillation, l'imagerie PET offre une sensibilité plus importante avec un meilleur rapport signal sur bruit que l'imagerie SPECT. L'enregistrement du signal en imagerie PET n'est obtenu que lorsqu'il y a détection d'une paire de photon, contrairement à l'imagerie SPECT où l'ensemble des signaux sont enregistrés. De plus, l'énergie émise par les radioéléments à émission  $\beta^+$  est plus importante que pour les radioéléments à émission  $\gamma$  (140 keV contre 511 keV) permettant de traverser plus facilement les tissus. Les principaux radioéléments utilisés en oncologie pour les imageries PET et SPECT sont résumés dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Principaux radioéléments utilisés en imagerie nucléaire.**

Radioélément	Temps de demi-vie	Activité massique <sup>(2)</sup> (MBq/g)	Emission principale	Obtention	Imagerie
<b>Carbone-11</b>	20,38 min	3,10.10 <sup>13</sup>	β+	Cyclotron	PET
<b>Gallium-68</b>	1,13 h	1,51.10 <sup>12</sup>	β+	Générateur	PET
<b>Fluor-18</b>	1,83 h	3,52.10 <sup>12</sup>	β+	Cyclotron	PET
<b>Technecium-99m</b>	6,01 h	1,95.10 <sup>11</sup>	γ	Générateur	SPECT
<b>Cuivre-64</b>	12,7 h	1,43.10 <sup>11</sup>	β+	Cyclotron	PET
<b>Iode-123</b>	13,2 h	7,14.10 <sup>10</sup>	γ	Cyclotron	SPECT
<b>Yttrium-86</b>	14,74 h	9,15.10 <sup>10</sup>	β+	Cyclotron	PET
<b>Indium-111</b>	2,8 j	1,55.10 <sup>10</sup>	γ	Cyclotron	SPECT
<b>Zirconium-89</b>	3,3 j	1,64.10 <sup>10</sup>	β+	Cyclotron	PET
<b>Iode-124</b>	4,2 j	9,28.10 <sup>9</sup>	β+	Cyclotron	PET

### 1.1.3. Les radiotraceurs usuels

Selon le code de la santé publique, un radiopharmaceutique est un « médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs isotopes radioactifs incorporés à des fins médicales » qui peuvent être diagnostiques ou thérapeutiques. Concernant le travail de thèse présenté ici, nous considérerons qu'un radiotraceur est un radiopharmaceutique constitué d'un vecteur ciblant spécifiquement un ou plusieurs biomarqueurs exprimés à la surface des cellules tumorales et d'un radioélément permettant la visualisation de la cible en imagerie (Figure 3).



**Figure 3 : Représentation schématique d'un radiotraceur composé d'un vecteur (ici une immunoglobuline) et d'un radioélément.**

Le radiotraceur est obtenu après radiosynthèse du radioélément et/ou du groupement prosthétique, marquage de la biomolécule et purification du radiotraceur. Une formulation du composé pharmaceutique est réalisée si besoin et un contrôle qualité du produit final est effectué avant d'injecter le radiotraceur au patient.

<sup>2</sup> L'activité massique ou activité spécifique est calculée selon la formule suivante :  $A_s$  (en Bq/g) =  $(N/MM) \times (\ln 2/t_{1/2})$ , avec N : nombre d'Avogadro, MM : masse molaire et le temps de demi-vie exprimé en seconde.

Les facteurs à prendre en considération concernant le choix du radioélément sont : le temps de demi-vie physique, le type d'émission, son activité massique et sa disponibilité (générateur de paillasse, cyclotron, etc.). Le temps de demi-vie physique du radioélément doit être en accord avec le temps de demi-vie biologique du vecteur, la durée de synthèse du radiotracer et l'application *in fine* du radiotracer. En effet, si le temps de demi-vie physique est plus court que le temps de synthèse, il faudra débiter l'expérimentation avec une activité plus importante engendrant ainsi une exposition considérable pour le manipulateur. De plus, plus le temps entre la synthèse et l'injection sera important, plus la quantité en composés non-radioactifs sera élevée, diminuant ainsi l'activité spécifique du radiotracer. Certains des radiotraceurs utilisés comme agents d'imagerie moléculaire en clinique pour le diagnostic des cancers et le suivi des patients sont résumés dans le [Tableau 2](#).

Le radiotracer le plus communément utilisé en imagerie PET est le  $^{18}\text{F}$ -fluorodésoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG). En ciblant le récepteur au glucose (GLUT-1) [7, 8], il permet d'évaluer le métabolisme du glucose de certains organes, comme le cœur, le foie et le cerveau, mais également de certaines tumeurs. Dans plusieurs études, il a été montré que le  $^{18}\text{F}$ -FDG pouvait se retrouver au niveau des sites inflammatoires [8, 9, 10, 11, 12] pouvant aboutir à des résultats faux-positifs [13]. L'utilisation du  $^{18}\text{F}$ -FDG ne se basant que sur le métabolisme du glucose utilisant le transporteur GLUT-1, il ne permet pas de dépister les cellules tumorales n'exprimant pas ou peu GLUT-1 (sarcomes, mélanomes, hépatoblastomes, lymphomes, etc.) [14] ou lorsque le patient est en hyperglycémie [13]. Il est alors nécessaire de coupler les études de PET/ $^{18}\text{F}$ -FDG avec une technique d'imagerie structurelle et une biopsie de la masse observée pour effectuer un diagnostic *in vitro*.

Ces constats ont favorisé le développement de nouveaux traceurs ciblant spécifiquement, et avec une forte affinité, des marqueurs tumoraux présents à la surface des cellules et non plus des cibles intracellulaires liées au métabolisme des masses tumorales. Les nouveaux radiotraceurs possèdent comme vecteurs principaux : des anticorps, leur fragment  $\text{F}(\text{ab}')_2$  ou des peptides permettant de discriminer plus facilement les tissus sains des tumeurs.

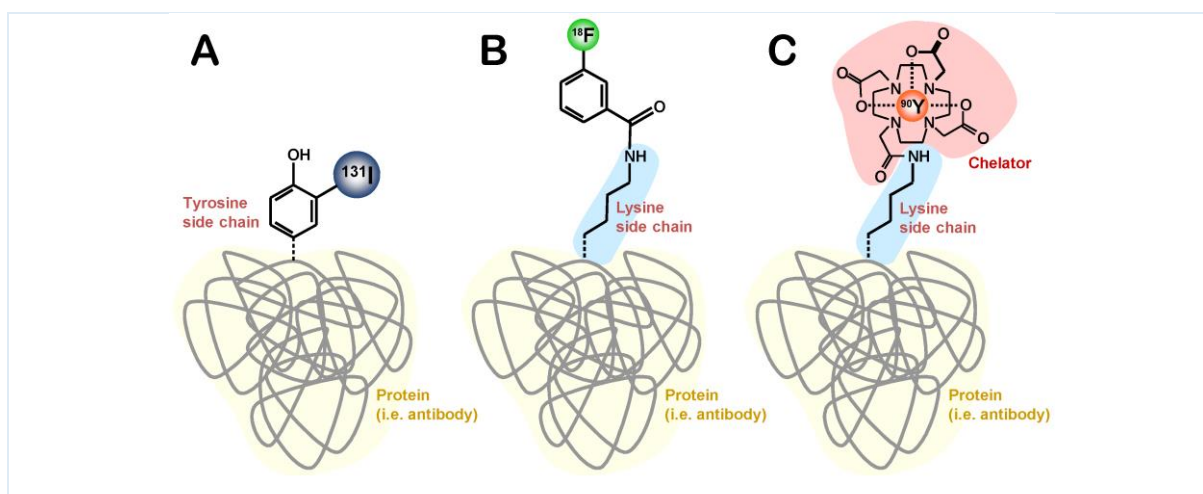
**Tableau 2 : Principaux radiotraceurs utilisés en clinique pour le diagnostic de cancers [15, 16, 17, 18, 19].**

Nom commercial	Radioélément	Vecteur	Cible	Applications
<b>OncoScint (Satumomab)</b>	<sup>111</sup> In	Anticorps	Glycoprotéine 72 associée aux tumeurs (TAG-72)	Cancer du côlon et des ovaires
<b>ProstaScint (Capromab)</b>	<sup>111</sup> In	Anticorps	Glutamate carboxypeptidase II	Cancer de la prostate
<b>Zevalin (Ibritumomab)</b>	<sup>111</sup> In	Anticorps	Antigène CD20 des lymphocytes B	Lymphome non-hodgkinien
<b>CEA-scan (Arcitumomab)</b>	<sup>99m</sup> Tc	F(ab') <sub>2</sub>	Antigène carcino-embryonnaire	Cancer du sein et du colon
<b>Verluma (Nofetumomab)</b>	<sup>99m</sup> Tc	F(ab') <sub>2</sub>	TAG-40	Cancer du poumon à petites cellules
<b>Edotreotide (DOTATOC)</b>	<sup>68</sup> Ga	Peptide	Récepteur à la somastatine	Tumeur neuro-endocrinienne
<b>OctreoScan (DTPAOC)</b>	<sup>111</sup> In	Peptide	Récepteur à la somastatine	Tumeur neuro-endocrinienne et lymphome
<b>Cardiolite (MIBI)</b>	<sup>99m</sup> Tc	Petite molécule	Glycoprotéine-P	Cancer du sein
<b>FDOPA</b>	<sup>18</sup> F	Petite molécule	Récepteur dopaminergique	Gliome
<b>FLT</b>	<sup>18</sup> F	Petite molécule	Thymidine kinase	Prolifération cellulaire
<b>FMISO</b>	<sup>18</sup> F	Petite molécule	-	Marqueur de l'hypoxie
<b>MetaTrace FDG</b>	<sup>18</sup> F	Petite molécule	Récepteur au glucose GLUT-1	Marqueur du métabolisme
<b>Scintiscan (MIBG)</b>	<sup>123</sup> I	Petite molécule	Récepteur adrénergique	Neuroblastome

## 1.2. Radiomarquage des protéines

Le marquage des protéines, qu'il soit radioactif ou non, fait intervenir le plus souvent un couplage non-régiosélectif (Figure 4). Dans cette partie, nous illustrerons les couplages chimiques ayant lieu sur les résidus lysine et cystéine des anticorps (partie 1.2.1), l'halogénéation des protéines et plus particulièrement le marquage direct sur résidus tyrosine ou histidine (partie 1.2.2). Une particularité concerne le radiomarquage à l'aide des radiométaux qui nécessite

l'utilisation d'agents de chélation. Nous avons donc inclus une partie concernant la chimie des radiométaux et leur chélation (partie 1.2.3). Afin de simplifier la compréhension des différents schémas, un seul exemplaire de chaque résidu a été représenté par protéine.



**Figure 4 : Illustrations des trois principales stratégies de radiomarquage des protéines. (A) Marquages direct et (B) indirect par insertion d'un groupement prosthétic ou (C) par complexation. Les différentes techniques permettent l'incorporation de résidus halogènes ((A) iode ou (B) fluor) ou (C) de radiométaux. Image tirée de [20].**

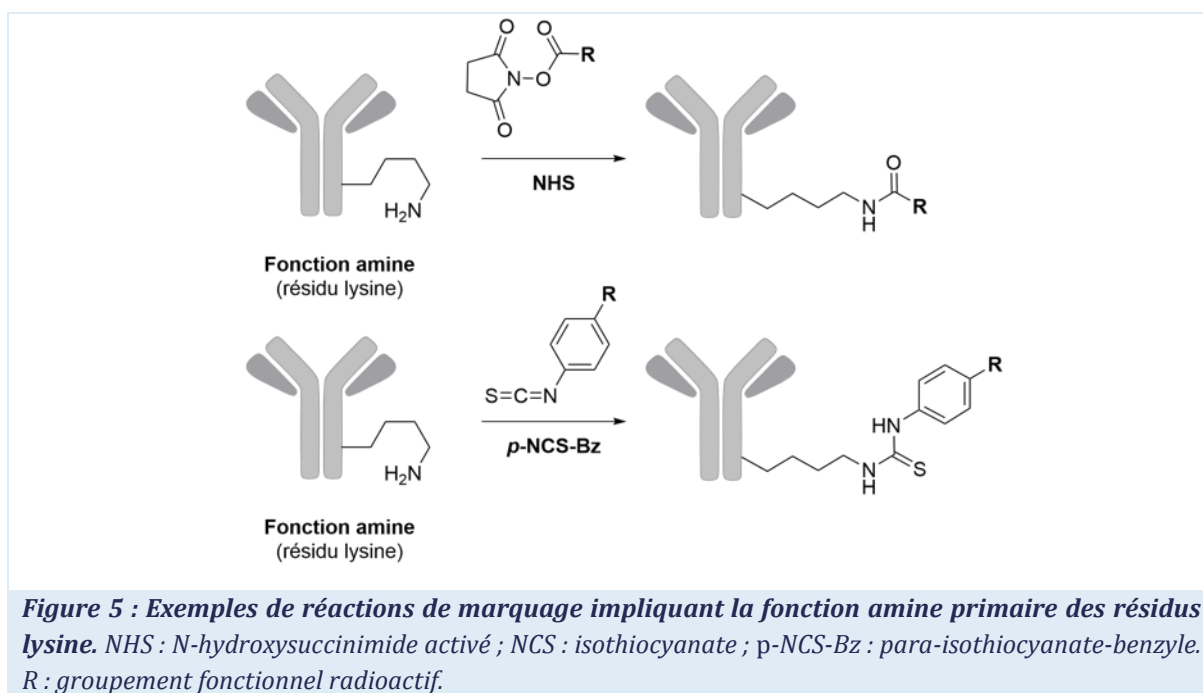
### 1.2.1. Conjugaison aux biomolécules : Acides aminés et fonctions chimiques impliqués

Que ce soit pour l'halogénéation des protéines *via* des groupements prosthétiques (partie 1.2.2) ou l'insertion de cages pour la chélation de radiométaux (partie 1.2.3), les stratégies développées font appel aux différentes fonctions chimiques présentes sur les chaînes latérales des acides aminés, et aux extrémités N-terminale (fonction amine primaire) et C-terminale (fonction acide carboxylique) de la protéine. Classiquement, les fonctions les plus utilisées sont les fonctions amine primaire (résidu lysine et extrémité N-terminale) et thiol (résidu cystéine).

#### 1.2.1.1. Fonction amine primaire

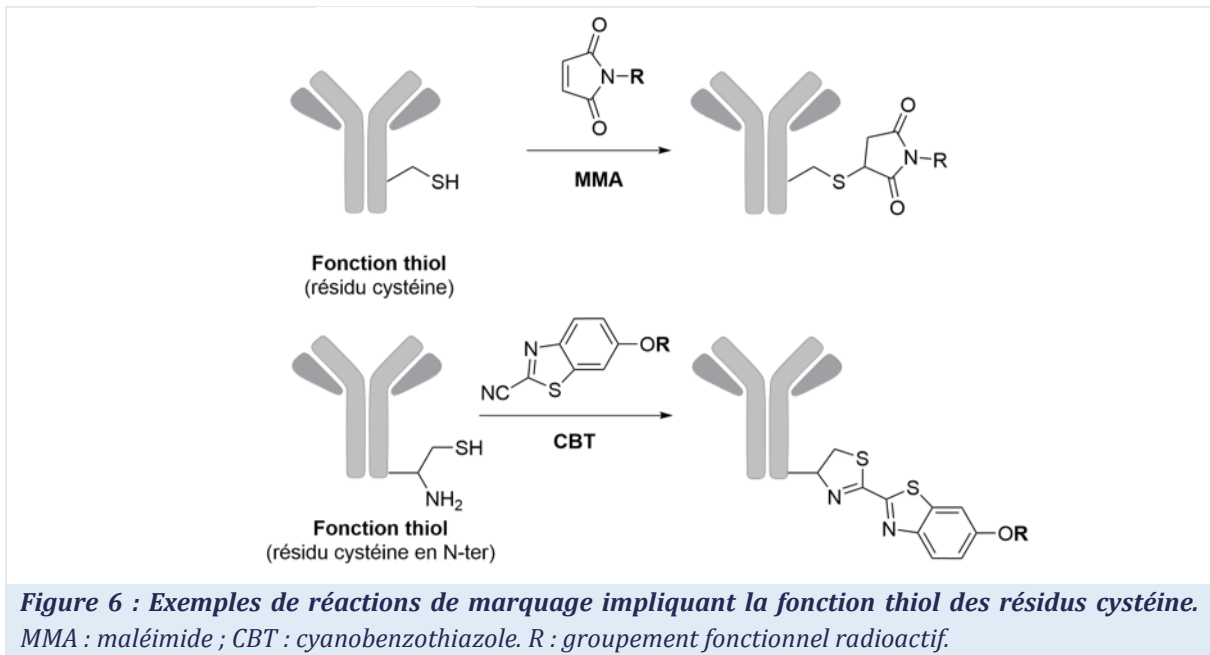
Dans les conditions physiologiques (pH 7,4, 37°C, force ionique modérée), la chaîne latérale des résidus lysine est chargée positivement (pKa = 10,54) et exposée à la surface de la protéine. La fonction amine est donc facilement accessible pour la conjugaison avec des groupements dérivés d'esters de N-hydroxysuccinimide activés (ester du NHS) ou d'isothiocyanate (NCS) (Figure 5). L'halogénéation des protéines *via* l'utilisation de réactif de Bolton-Hunter contenant un ester du NHS permet l'acylation de la fonction amine primaire des résidus lysine et conduit à la formation d'une liaison amide stable [21]. Des exemples d'applications sont présentés dans les Figure 8 et Figure 9 de la partie 1.2.2. Les dérivés de NCS,

comme le *p*-NCS-Bz, sont généralement utilisés pour la conjugaison à des agents de chélation (partie 1.2.3) par établissement d'une liaison thio-urée entre le groupement NCS et la fonction amine libre des résidus lysine ou de l'extrémité N-terminale (Figure 5) [20].



#### 1.2.1.2. Fonction thiol

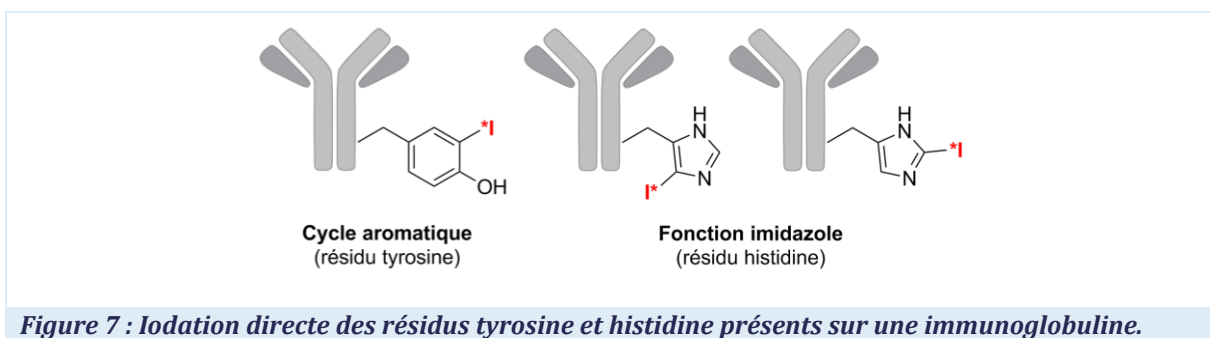
Contrairement aux résidus lysine, la chaîne latérale des résidus cystéine est souvent impliquée dans le repliement des protéines (formation de ponts disulfure). Afin de pouvoir rendre accessible la fonction thiol des résidus cystéine, il est nécessaire de réduire les résidus cystine formés. Ceci est rendu possible par action d'un agent réducteur comme le dithiothréitol (DTT), le  $\beta$ -mercaptoéthanol ou l'acide 3,3',3''-phosphanetriyltripropanoïque (TCEP). La stratégie de marquage la plus répandue consiste à utiliser la capacité de la fonction thiol des résidus cystéine à réagir spontanément avec un groupement maléimide (MMA) selon la réaction de Michaël [22]. La réaction de condensation entre la fonction cyano d'un dérivé du cyanobenzothiazole (CBT) et la fonction thiol d'un résidu cystéine permet également l'insertion de groupements prosthétiques préalablement halogénés (Figure 6 et Figure 9 de la partie 1.2.2).



### 1.2.2. Halogénéation des biomolécules

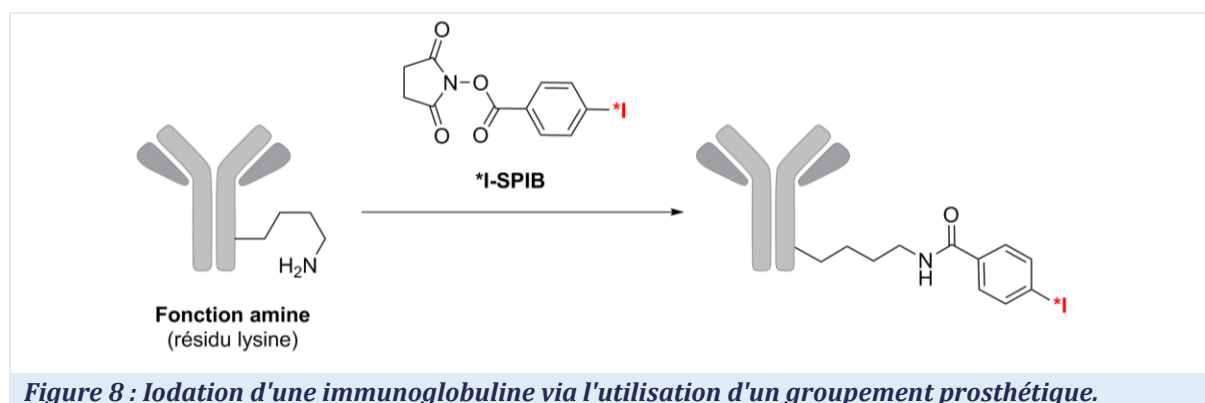
#### 1.2.2.1. Iodation des protéines et peptides

Classiquement, l'iodation des protéines est réalisée de manière directe sur les résidus tyrosine ou histidine par substitution électrophile [20, 23]. Elle permet d'obtenir des informations importantes au cours du développement d'un radiopharmaceutique que ce soit pour des études de biodistribution ou d'imagerie. La réaction fait intervenir un agent oxydant, comme le Iodogen®, qui va activer l'atome d'iode radioactif (\*I). Le radionucléide oxydé va ensuite réagir avec un doublet électronique et provoquer le départ d'un atome d'hydrogène sous la forme d'ion H<sup>+</sup>. L'\*I va se retrouver en ortho du groupement hydroxyle du résidu tyrosine et en position 2 ou 4 de la fonction imidazole du résidu histidine (Figure 7).



Lors d'applications en imagerie, l'injection d'un diabody anti-HER2 marqués à l'<sup>124</sup>I a montré une accumulation d'\*I dans les organes exprimant le symport sodium/iodure (estomac, thyroïde et glandes salivaires) [24] par action de l'enzyme « iodotyrosine déhalogénase 1 » [20].

Afin de limiter l'action de l'enzyme, une stratégie consiste à marquer de manière indirecte la protéine *via* l'utilisation de groupements prosthétiques (ou réactifs de Bolton-Hunter). Les groupements vont permettre le radiomarquage des protéines à température ambiante et en absence de solvant [20]. Parmi les groupements prosthétiques les plus utilisés pour l'iodation des biomolécules, nous pouvons citer le \*I-N-succinimidyl-3-iodobenzoate (\*I-SIB) et le \*I-N-succinimidyl-4-iodobenzoate (\*I-SPIB) se couplant aux biomolécules *via* une fonction ester du NHS (Figure 8). L'utilisation du groupement prosthétique  $^{125}\text{I}$ -SPIB<sup>(3)</sup> a notamment permis le marquage de deux Nanofitines anti-CD138 [15], d'un *Affibody* anti-EGFR [25] et d'un *Affibody* anti-HER2 [26].



### 1.2.2.2. Fluoration des protéines et peptides

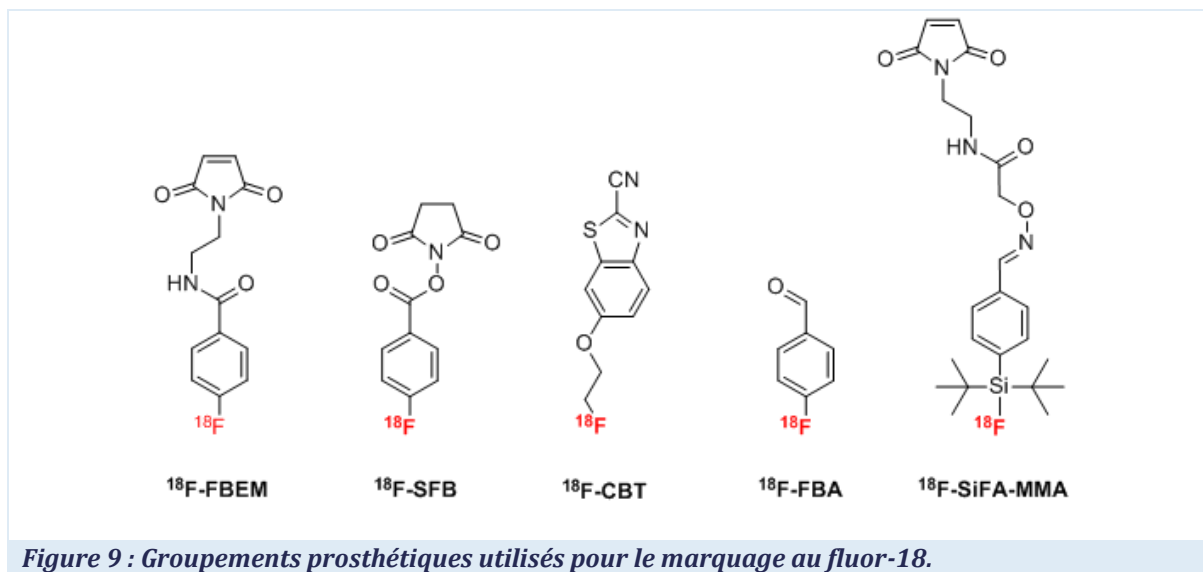
L'halogénéation des protéines peut également être réalisée à l'aide du fluor-18. La fluoration des protéines a principalement lieu de manière indirecte *via* l'utilisation de groupements prosthétiques. Une liste non-exhaustive de ces groupements est présentée en Figure 9. A l'instar de l'iodation indirecte, le couplage sur les fonctions amine primaire a lieu grâce à l'utilisation de dérivés d'ester du NHS. Parmi les plus couramment utilisés nous pouvons citer le  $^{18}\text{F}$ -N-succinimidyl-4-fluorobenzoate ( $^{18}\text{F}$ -SFB).

Une autre technique consiste à former une oxime en faisant réagir la fonction aldéhyde du  $^{18}\text{F}$ -fluorobenzaldéhyde ( $^{18}\text{F}$ -FBA) avec la fonction amine primaire des résidus lysine. Le  $^{18}\text{F}$ -FBA a également permis de radiomarquer de manière régiosélective un *Affibody* anti-HER2 par formation d'une oxime entre la fonction aldéhyde du groupement prosthétique et la fonction

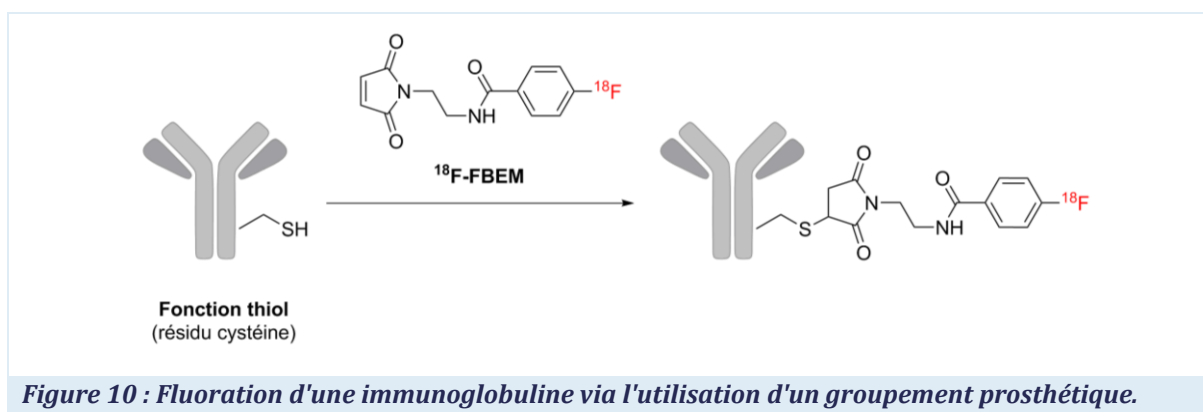
<sup>3</sup> L'iode-125, malgré son émission de rayon gamma, n'est que très peu utilisé en imagerie SPECT, car l'énergie délivrée est trop faible pour être détectée correctement par les gamma-caméras. La biodistribution des molécules et protéines marquées à l' $^{125}\text{I}$  peut néanmoins être évaluée par comptage de la radioactivité dans les organes après sacrifice des souris lors des études pré-cliniques.



aminooxy préalablement insérée sur le groupement thiol d'un résidu cystéine grâce à une fonction MMA [27].



Le marquage des biomolécules peut également être réalisé par utilisation d'accepteurs silylés, comme le SiFA-MMA. Après couplage sur les fonctions thiol, une réaction de substitution nucléophile permet l'établissement d'une liaison entre l'atome de silicium du groupement prosthétique et un atome de fluor-18 [20, 28, 29]. Cependant, l'introduction du groupement porteur de l'atome est très hydrophobe ce qui va modifier les propriétés physicochimiques voire biologiques de la protéine. Une autre stratégie pour le marquage des biomolécules consiste à utiliser la capacité de la fonction thiol des résidus cystéine à réagir spontanément avec un groupement MMA (Figure 10) dans les conditions physiologiques [22]. Cette technique a notamment été utilisée pour le marquage d'*Affibody* via le groupement prosthétique N-2-(4-<sup>18</sup>F-fluorobenzamido)éthyle maléimide (<sup>18</sup>F-FBEM) [30, 31, 27]. Un autre exemple de ce marquage est la réaction de condensation existant entre le groupement cyano du <sup>18</sup>F-2-cyanobenzothiazole (<sup>18</sup>F-CBT) et la fonction thiol d'un résidu cystéine [29, 32].



### 1.2.3. Les radiométaux

#### 1.2.3.1. Chimie des métaux

Les cations acides, comme le gallium(III), l'indium(III) l'yttrium(III) et le zirconium(IV), précipitent sous forme d'hydrocolloïdes à pH neutre en absence d'agents complexant appropriés. Pour cette raison, il est nécessaire d'utiliser des agents de chélation permettant à la fois la stabilisation du cation par chélation et le radiomarquage de la protéine. Cet agent de couplage doit être adapté au nombre de coordination que peut établir chaque métal. Les métaux cuivre(II), gallium(III), yttrium(III), indium(III) et zirconium(IV) peuvent établir, respectivement, entre 4-6, 4-6, 6-9, 4-8 et 4-9 liaisons de coordination en milieu aqueux [33]. La réaction de couplage entre l'agent de complexation et la biomolécule a lieu *via* l'insertion d'une fonction MMA ou d'un groupement *p*-NCS-Bz sur l'agent de chélation qui réagiront respectivement avec les fonctions thiol ou amine primaire présentes sur la protéine (voir partie 1.2.1).

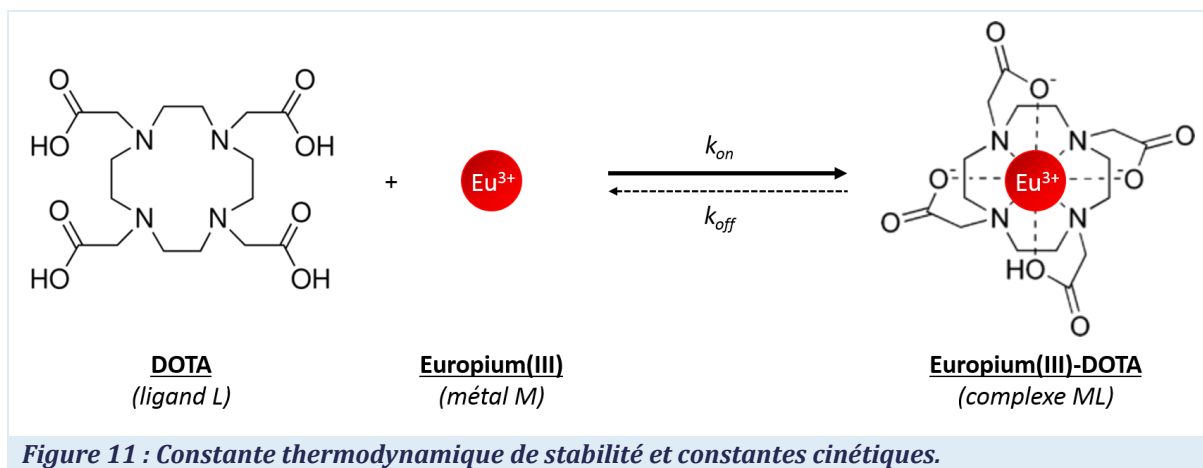
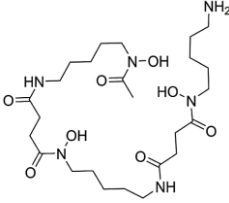
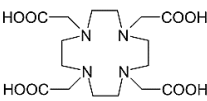
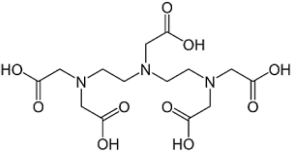
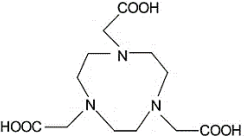


Figure 11 : Constante thermodynamique de stabilité et constantes cinétiques.

A l'instar des groupements prosthétiques pour l'halogénéation des protéines, l'agent de chélation doit assurer la stabilité *in vivo* du radiotracer dans les conditions physiologiques. L'affinité pour le métal est déterminée par les constantes thermodynamiques de formation ( $K_{ML}$ ) et de dissociation ( $K_d$ ). La constante de formation correspond au rapport entre les constantes cinétiques d'association ( $k_{on}$ ) et de dissociation ( $k_{off}$ ) (Figure 11). *In vivo*, l'agent de chélation doit posséder une forte affinité pour le radioélément (grand  $K_{ML}$ ) avec une cinétique de dissociation lente (petit  $k_{off}$ ) pour éviter les échanges avec les ions présents dans l'organisme (phénomène de trans-chélation ou de trans-méallation) (Figure 12).

				
	DFO	DOTA	DTPA	NOTA
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	23,98	22,2/22,7	21,4	19,8/21,8/21,6
<b>Ga<sup>3+</sup></b>	28,6	21,3	25,5/24,3	31
<b>Y<sup>3+</sup></b>	-	24,3/24,4/24,9	21,2/22/22,5	-
<b>Zr<sup>4+</sup></b>	ND	ND	35,8/36,9	-
<b>In<sup>3+</sup></b>	21,4	23,9	29/29,5	26,2
<b>Tc<sup>5+</sup></b>	-	-	ND	-

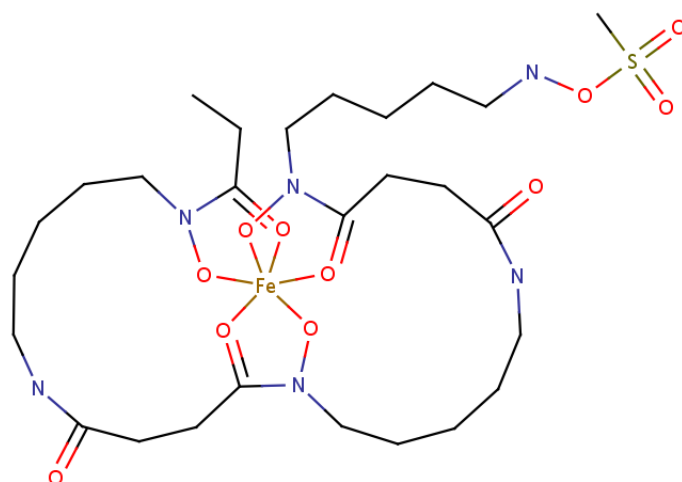
**Figure 12: Constantes d'affinité (logK<sub>ML</sub>) des métaux pour les agents de chélation.** avec  $K_{ML}=[ML]/[M][L]$ .  
 ND : complexe existant, mais constante d'affinité non-déterminée. [33, 34, 35, 36]

### 1.2.3.2. Les agents de chélation acyclique

L'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA) est un agent de chélation acyclique, de type octadentate et dérivé de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA). En fonction du radiométal mis en contact, le DTPA peut établir entre 6 et 8 liaisons de coordination en conditions douces (pH neutre à température ambiante) [20, 33]. Il peut être directement couplé sur les fonctions amine primaire d'une protéine ou d'un peptide, mais cela conduit à la perte d'un des groupements acide carboxylique nécessaire à la stabilité de la liaison Métal-DTPA [37]. Classiquement le DTPA est fonctionnalisé par un NCS permettant la conjugaison aux biomolécules par établissement d'une liaison thio-urée entre le groupement NCS et la fonction amine libre des résidus lysine ou de l'extrémité N-terminale des protéines [20]. Un inconvénient majeur à l'utilisation du DTPA et de ses dérivés comme agent de radiomarquage est l'ouverture du complexe de chélation provoquant la dissociation avec le radiométal [20], notamment dans le cas d'une chélation avec les cations Cu(II) et Ga(III) [37].

Un autre agent de chélation acyclique hexadentate et bifonctionnel utilisé pour le marquage des biomolécules est la desferrioxamine B (Desferal®, DFO) [37, 38, 39, 33]. La DFO est un peptide d'origine bactérienne utilisé en clinique pour chélater le fer et l'aluminium dans le compartiment sanguin. La présence de trois fonctions hydroxamates permet l'établissement de 6 liaisons de coordination entre la DFO et le fer(III) (Figure 13). Une des extrémités de la DFO possède une fonction amine permettant la conjugaison aux biomolécules. Cette capacité à fixer les

métaux est utilisée pour chélater certains radiométaux notamment le gallium-68 et le zirconium-89 [39, 40, 41].



**Figure 13: Structure PDB 1K2V du complexe DFO mésylate-Fe(III).  $\text{Log}(K_{LM})=30,4$  ( $K_{ML} = [\text{ML}]/[\text{M}][\text{L}]$ )**

### 1.2.3.3. Les agents de chélation macrocyclique

Afin de diminuer la cinétique de dissociation entre les agents de chélation et les radiométaux, de nouvelles cages de type macrocyclique ont été développées. Parmi celles-ci, nous pouvons retrouver l'acide 1,4,7,10-tétrazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tétraacétique (DOTA) et l'acide 1,4,7-triaza-cyclononane-1,4,7-triacétique (NOTA) [33]. Le DOTA est un agent de chélation de type octodentate possédant quatre fonctions amine et quatre fonctions acide carboxylique. Classiquement, la chélation se réalise à pH acide et à des températures élevées (80-100°C). Le pH dépendant principalement du radiométal, il est nécessaire de réaliser un compromis entre le pH optimal pour la complexation et la quantité d'hydrocolloïdes formée à pH élevé. A pH acide, les fonctions chimiques de l'agent de chélation seront protonées rendant difficile la chélation avec les cations [42]. Contrairement aux cations Cu(II) et Ga(III) qui ne couvrent que 6 des 8 liaisons laissant libre une extrémité carboxylique, la chélation avec les cations Y(III) et In(III) permet de compléter la sphère de coordination du DOTA [37]. Pour les ions ayant une petite taille, comme le Cu(II) (57-73 pm) et le Ga(III) (47-62 pm) [33], il a été développé un dérivé du DOTA, le NOTA, pouvant établir les six liaisons de coordination nécessaires à la stabilité du complexe avec ces radiométaux à température ambiante [37, 33].

#### 1.2.3.4. Le cas particulier du technetium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ )

Le technétium(VII) est élué du générateur sous forme de  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetate ( $\text{TcO}_4^-$ ). Après réduction à l'état d'oxydation +5, il peut être chélaté au DTPA ou à l'acide 2-hydrazinonicotinique (HYNIC) préalablement conjugué à la biomolécule [43]. Une autre technique consiste à utiliser les cœur-carbonylés. Le technetium-99m se retrouve sous la forme  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  avec un degré d'oxydation +1 et peut se fixer directement sur le noyau imidazole des résidus histidine [44] ou la fonction thiol des résidus cystéine [37].

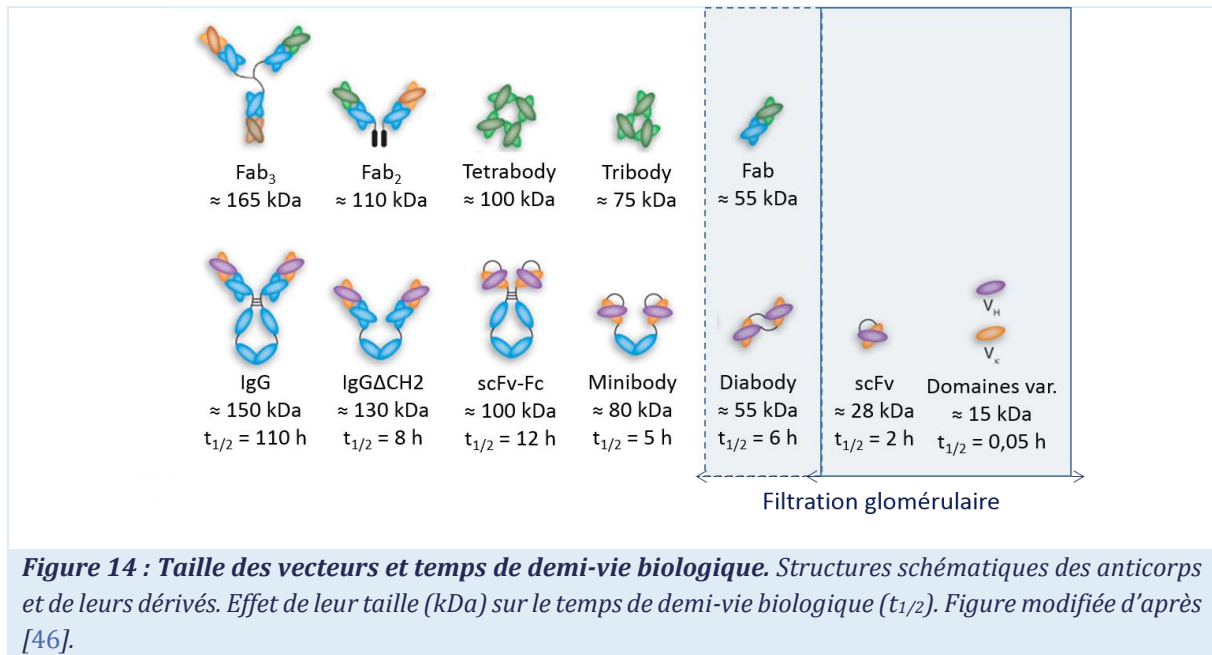
### 1.3. Les protéines alternatives aux anticorps

#### 1.3.1. Le radiotracteur idéal en imagerie appliquée à l'oncologie

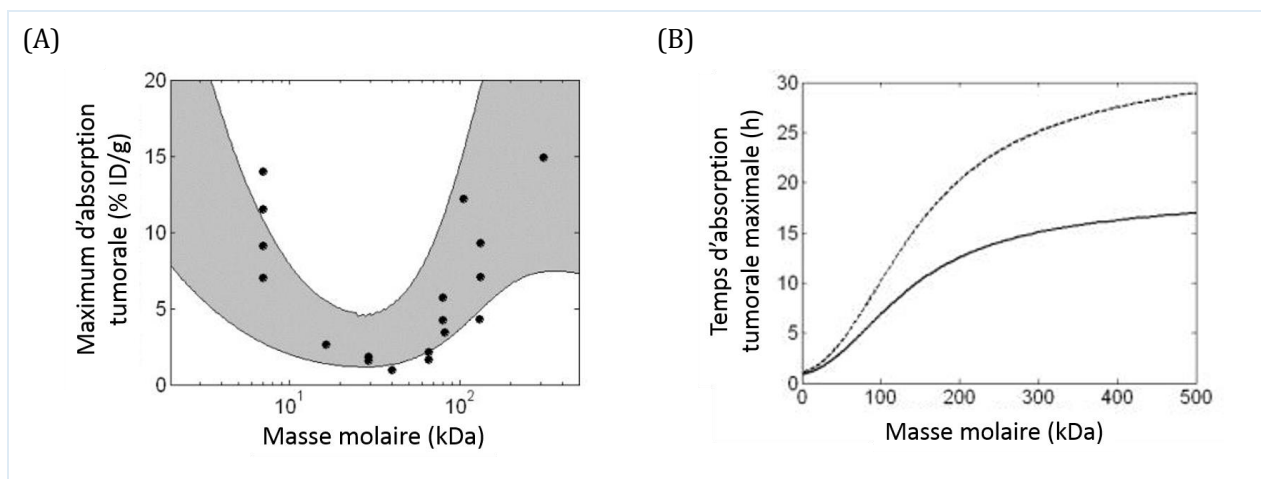
Comme précisé plus tôt, un radiotracteur est composé de deux parties, un vecteur permettant de cibler de manière efficace et spécifique les cellules tumorales, et un radioélément dont le temps de demi-vie physique est applicable au temps de demi-vie biologique du vecteur. Le radiotracteur idéal en imagerie moléculaire doit permettre l'obtention d'un bon contraste dans un temps bref pour avoir un protocole clinique court (<un jour). Dans cette optique, il est recommandé d'utiliser des vecteurs qui seront rapidement éliminés de l'organisme tout en étant retenus pour une période de temps prolongée au niveau du site cible. De ce fait, ils doivent être conjugués à des radioéléments au temps de demi-vie physique court (Tableau 1, Tableau 3).

##### 1.3.1.1. Importance de la taille du vecteur

En pharmacocinétique, le terme « temps de demi-vie biologique » définit le temps au bout duquel 50% de la molécule administrée est éliminée du compartiment sanguin par l'organisme. La détermination de ce paramètre est réalisée en mesurant la concentration du composé à différents temps dans le plasma d'un individu. Après administration par voie intraveineuse, le médicament est directement distribué à l'ensemble de l'organisme et est soit filtré directement par le glomérule, nous parlons alors de clairance rénale, soit métabolisé au niveau du foie. La limite de filtration du glomérule étant comprise entre 30 et 70 kDa [45], les anticorps et les protéines d'affinité ayant une taille supérieure à 70 kDa auront un temps de circulation plus long que les biomolécules d'une taille inférieure à 20 kDa (Figure 14) [46].



En oncologie, le temps de résidence des composés pharmaceutiques joue un rôle important lors de leur application, et ce, notamment en thérapeutique. L'absorption tumorale des protéines d'affinité ayant un poids moléculaire >70 kDa sera d'autant plus importante que la clairance de ces biomolécules sera lente (Figure 22A) [47]. La protéine d'affinité aura plus de chance de se fixer aux biomarqueurs exprimés à la surface des cellules tumorales. En revanche, pour des applications en imagerie, il est nécessaire que les radionucléides restent dans le sang le moins de temps possible, afin d'obtenir le meilleur contraste entre la tumeur et les autres organes, mais également pour limiter les doses radioactives délivrées aux organes sains. L'utilisation de protéines d'un poids moléculaire supérieur à 70 kDa devient alors contraignante. Il est nécessaire d'attendre plusieurs heures, voire plusieurs jours, pour obtenir une absorption tumorale suffisante permettant de discriminer de manière satisfaisante la masse tumorale des organes sains (Figure 22B). En imagerie, ce contraste est évalué en calculant le ratio entre le signal obtenu pour la tumeur et celui obtenu pour les organes sains. Concernant les protéines d'une taille inférieure à 20 kDa, elles atteignent leur maximum de rétention plus rapidement que les grosses molécules (Figure 22B) avec une absorption tumorale similaire (Figure 22A) [47]. De plus, elles possèdent une demi-vie biologique très faible (≈ 3 min) (Figure 14) [46] permettant d'obtenir une image satisfaisante plus rapidement que lors de l'utilisation de protéines d'affinité ayant un poids moléculaire supérieur à 70 kDa.



**Figure 15 : Taille des vecteurs, absorption tumorale et temps de demi-vie biologique. (A) Effet de la taille des vecteurs anti-HER2, dérivés ou non des anticorps, marqués au <sup>99m</sup>Tc, <sup>64</sup>Cu et <sup>111</sup>In sur l'absorption tumorale. Tirée de [47]. (B) Effet de la taille des vecteurs anti-HER2 sur leur temps d'absorption maximale. Marquage à l'<sup>125</sup>I en trait plein. Marquage à l'<sup>99m</sup>Tc en pointillés. Figures tirées de [47].**

Zahnd *et al.* ont montré pour des DARPin anti-HER2 que la taille du vecteur et son affinité pour la cible jouent un rôle important au niveau de l'absorption tumorale. Pour une DARPin de 14,5kDa, le ratio entre la tumeur HER2-positif et le sang est supérieur à 60 24 h après injection pour une affinité de 90 pM (8% ID/g dans la tumeur 24 h p.i.) et 48h après injection pour une affinité de 270 nM (6,5% ID/g dans la tumeur 48h p.i.). L'ajout d'un groupement PEG permet d'augmenter le temps de résidence des DARPin, ce qui permet d'augmenter l'absorption tumorale (13,4% ID/g 24 h p.i.), mais diminue le ratio tumeur/sang [48].

### 1.3.1.2. Spécificité de ciblage et affinité du vecteur pour le biomarqueur tumoral

L'affinité du vecteur pour le biomarqueur ciblé doit permettre l'accumulation spécifique du radiotracer dans les tumeurs pour éviter les réactions croisées et les résultats faux-positifs. Tolmatchev *et al.* ont montré que la détection de tumeurs HER2-positives dépendait autant de la quantité de récepteurs exprimés à la surface de la cellule tumorale que de l'affinité du radiotracer pour sa cible. Pour des cellules ayant une expression du récepteur HER2 supérieure à 10<sup>6</sup>, le radiotracer, constitué d'un Affibody anti-HER2 marqué à l'indium-111, doit posséder une affinité pour le récepteur de l'ordre du nanomolaire. Par contre, si l'expression est inférieure, il est nécessaire d'avoir une affinité inférieure au nanomolaire [49].

### 1.3.1.3. Stabilités radiochimique et biologique du radiotracer

Le radiotracer doit avoir une haute stabilité structurale vis-à-vis du marquage radioactif et ce marquage doit être stable dans les fluides biologiques. Comme précisé dans la partie

« marquage radioactif des protéines », le radiomarquage avec des radiométaux peut parfois être instable. Par effet de trans-chélation (ou trans-métallation), le radiométal peut être échangé avec un cation présent dans le compartiment sanguin. Le radioélément va ensuite s'accumuler dans les organes non-ciblés. Il est donc nécessaire de choisir l'agent de chélation le plus adapté au radioélément choisi. Il est intéressant de noter que le radiomarquage des anticorps peut avoir lieu sur plusieurs types d'acides aminés (lysine, cystéine, tyrosine, histidine), l'extrémité N-terminale ou encore les régions glycosylées des anticorps. Ces résidus étant présents sur l'ensemble de la protéine, le radiomarquage se réalise alors de manière non-spécifique et l'agent de chélation peut se retrouver au niveau du site actif de celle-ci et empêcher la reconnaissance des cellules tumorales. Afin d'éviter son inactivation par les cellules de l'immunité, il est important de vérifier l'immunogénicité du vecteur.

En résumé, le radiotraceur idéal doit permettre la détection et le suivi de la croissance tumorale en ciblant exclusivement, et avec une forte affinité, les biomarqueurs exprimés à la surface des cellules tumorales sans affecter les tissus adjacents (ciblage actif). Il doit pouvoir être stable dans les fluides biologiques et être furtif vis-à-vis du système immunitaire (non-immunogène). Il doit être de petite taille pour pénétrer rapidement dans les tumeurs de manière passive par effet EPR<sup>(4)</sup> (*Enhanced Permeability and Retention effect*), se fixer de manière active sur les cellules tumorales et ne doit pas s'accumuler dans les organes sains. Sa petite taille doit permettre l'obtention d'un bon contraste dans un temps bref en éliminant rapidement les radiotraceurs non-fixés.

### 1.3.2. Les alternatives aux anticorps en imagerie moléculaire

Les anticorps et leurs fragments sont souvent optimisés pour des applications thérapeutiques. Leur affinité importante pour leur cible permet de les utiliser à des fins diagnostiques *in vitro* [19, 50, 51]. Lors d'une application *in vivo*, ils montrent une lente accumulation dans les tumeurs, une clairance sanguine lente et une accumulation aspécifique dans les tissus sains [39]. Cela est dû en partie à leur taille importante, mais également à la présence du fragment Fc des anticorps entiers provoquant la rétention de ces agents d'imagerie dans certains tissus, comme le foie, *via* les récepteurs anti-Fc [50]. De ce fait, ils ne sont pas les

---

<sup>4</sup> L'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) est un phénomène utilisé pour cibler de manière passive les tumeurs. En effet, l'endothélium tumoral présente des fenestrations permettant l'absorption de macromolécules (jusqu'à 200 nm) dans le milieu interstitiel (effet de perméabilité). D'autre part, le drainage lymphatique étant déficient, les macromolécules sont retenues au sein de la tumeur diminuant ainsi leur clairance (rétention).



vecteurs idéaux pour des applications en imagerie contrairement aux peptides et aux petites protéines ayant une taille inférieure à 70 kDa (limite de filtration du glomérule) [45].

Au cours des deux dernières décennies, il a été développé de nombreuses protéines de faible poids moléculaire ciblant spécifiquement des récepteurs membranaires surexprimés par les cellules tumorales et leurs ligands (Figure 16). Parmi ces récepteurs, nous retrouvons principalement ceux de la famille à activité tyrosine-kinase (TK) impliqués dans l'activation de voies de signalisation entraînant la prolifération cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, l'angiogenèse et le développement de métastases [3, 4]. Parmi ces protéines membranaires nous pouvons citer trois des quatre récepteurs aux facteurs de croissance épithéliaux humains (EGFR, HER2 et HER3), le récepteur au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire de type 2 (VEGFR2) et son ligand de type A (VEGF-A), le récepteur au facteur de croissance des hépatocytes (HGFR ou MET) et son ligand (HGF), et le récepteur au facteur de croissance *insuline-like* 1 (IGF-1R) [52]. Actuellement, plusieurs alternatives aux anticorps sont en cours d'essai clinique, comme l'*Adnectin* anti-VEGFR2 (CT-322, phase II) [53], l'*Affibody* anti-HER2 (ABY-025, phase II) [59, 54], l'*Anticalin* anti-VEGF (PRS-050-PEG40, Phase I) [55], et les *DARPin* bispécifiques anti-VEGF/anti-HGF (MP0250, Phase I) [56] et anti-VEGF (MP0112, phase II) [57, 58].

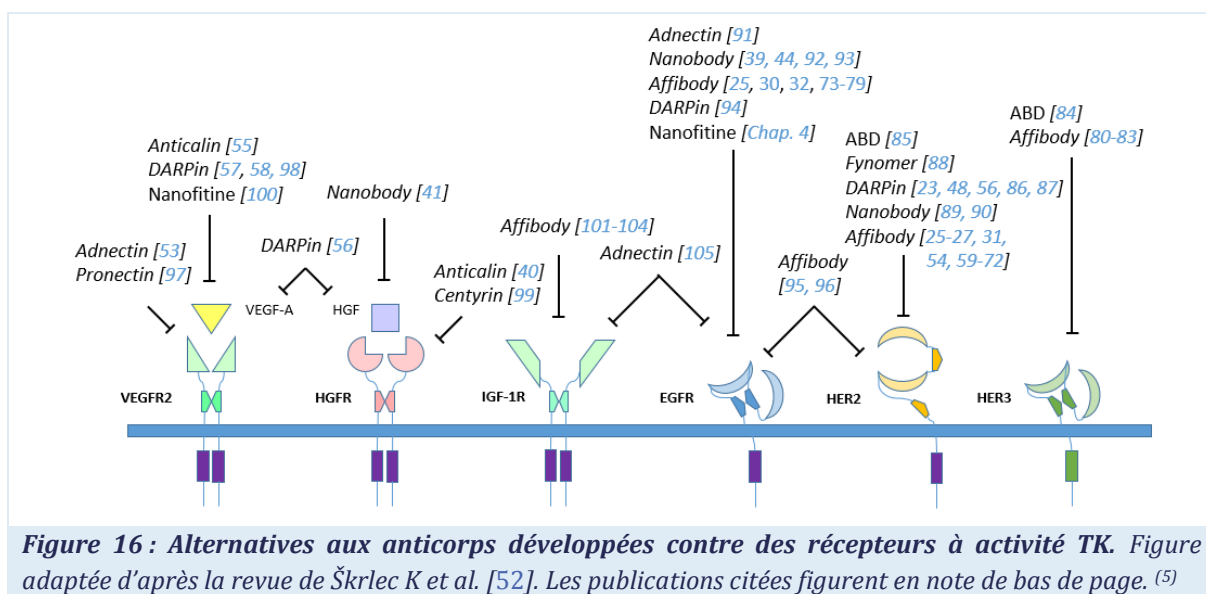


Figure 16 : Alternatives aux anticorps développées contre des récepteurs à activité TK. Figure adaptée d'après la revue de Škrlec K et al. [52]. Les publications citées figurent en note de bas de page. <sup>(5)</sup>

La majorité de ces protéines a été développée pour être utilisée comme outil thérapeutique, diagnostique ou théranostique à la place des anticorps avec un nombre de résidus

<sup>5</sup> Publications citées dans la figure : 23, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 39, 40, 41, 44, 48, 53, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 105, 106.

variant entre 40 (*Armadillo repeat proteins*) et 180 (*Anticalin*) acides aminés [52], et une affinité pour leur cible entre 1 pM et 100 nM [30]. Appliquées à l'imagerie, les protéines alternatives aux anticorps permettent d'obtenir une image de qualité supérieure dans un temps plus court que lors de l'utilisation des anticorps. La possibilité de générer *in vitro* ces protéines permet l'insertion d'étiquettes ou d'acides aminés spécifiques à la conjugaison de groupements prosthétiques ou à la chélation de radiométaux de manière régiospécifique sans affecter la capacité de fixation ou l'activité biologique de la biomolécule. Cette stratégie a déjà été développée avec les *Affibody* et les *DARPin* via l'insertion génétique d'un résidu cystéine pour la chélation d'un groupement possédant une fonction MMA ou d'une étiquette peptidique pour la chélation du technetium-99m (Tableau 3).

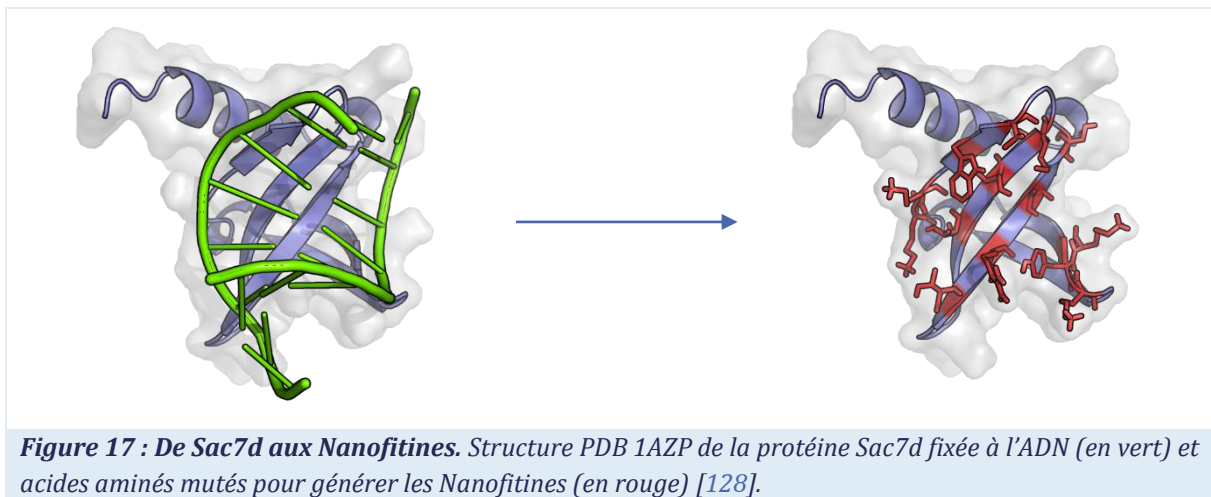
**Tableau 3 : Alternatives aux anticorps développées pour l'imagerie nucléaire des récepteurs à activité TK.**

Charpente	Cible	RN*	GP/AC	AA	Réf.	
<b>Affibody</b>	EGFR	<sup>125</sup> I	SPIB	Lys, N-ter	25	
		<sup>18</sup> F	FBEM, CBT	Cys	30, 32	
		Al <sup>18</sup> F <sub>3</sub>	NOTA-MMA	Cys	32	
		<sup>64</sup> Cu, <sup>111</sup> In	DOTA-MMA	Cys	79, 75, 77	
		<sup>111</sup> In	DTPA-NCS	Lys, N-ter	76, 25	
	HER2	<sup>125</sup> I	SPIB	Lys, N-ter	26	
		<sup>18</sup> F	FBA	Aminoxy-Cy	27	
		<sup>18</sup> F	SiF-MMA, FBEM	Cys	31, 27	
		Al <sup>18</sup> F <sub>3</sub>	NOTA-MMA	Cys	62, 27	
		<sup>68</sup> Ga, <sup>111</sup> In	NOTA-MMA	Cys	62	
		<sup>111</sup> In	DOTA-MMA	Cys	59, 54, 65, 68	
		<sup>68</sup> Ga, <sup>111</sup> In	DOTA, NOTA	N-ter	61, 66, 67	
		<sup>99m</sup> Tc	-	Gly-Gly-Gly-Cys	69	
		<sup>99m</sup> Tc	-	Gly-(D)Ala-Gly-Gly	70, 71	
		<sup>99m</sup> Tc	-	Cys	64, 68, 72	
		HER3	<sup>111</sup> In	NOTA-MMA	Cys	82
			<sup>99m</sup> Tc	-	His-Glu-His-Glu-His-Glu	83
		IGF-1R	<sup>111</sup> In	DOTA-MMA	Cys	103
			<sup>64</sup> Cu	NOTA-MMA	Cys	104
	<sup>99m</sup> Tc	-	His-Glu-His-Glu-His-Glu	102		
	<b>Anticalin</b>	HGFR	<sup>89</sup> Zr	DFO-Bz-NCS	Lys, N-ter	40
<b>DARPin</b>	HER2	<sup>125</sup> I	-	Tyr	23	
		<sup>111</sup> In	DOTA-MMA	Cys	23	
		<sup>99m</sup> Tc	-	6HisTag	48	
<b>Nanobody</b>	EGFR	<sup>68</sup> Ga, <sup>89</sup> Zr	DFO-Bz-NCS	Lys, N-ter	39	
		<sup>99m</sup> Tc	-	6HisTag	92, 93, 44	
	HER2	<sup>99m</sup> Tc	-	6HisTag	89	
		<sup>68</sup> Ga	NOTA-NCS	Lys, N-ter	90	
	HGF	<sup>89</sup> Zr	DFO-Bz-NCS	Lys, N-ter	41	
<b>Nanofitine</b>	EGFR	<sup>18</sup> F	FBEM	Cys	Chapitre 4	

RN\* : radioélément, GP : groupement prosthétique, AC : agent de chélation, AA : acide aminé.

### 1.3.3. Les Nanofitines : charpentes protéiques alternatives aux anticorps

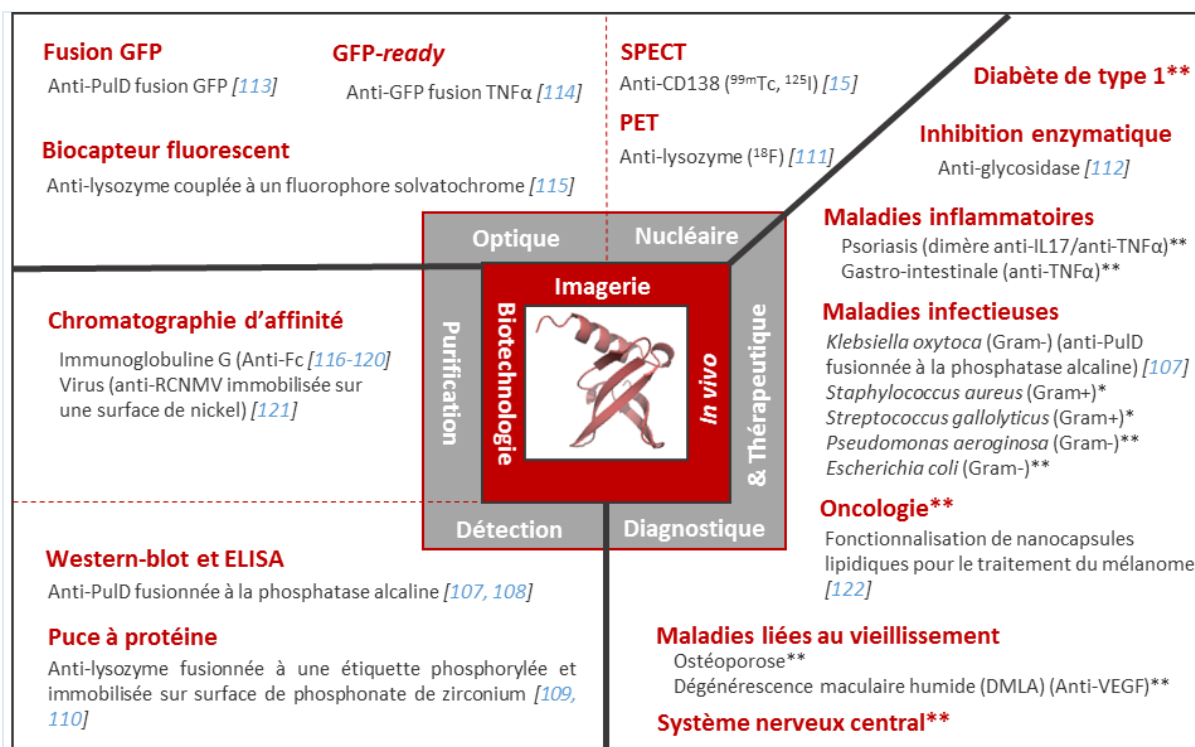
Les Nanofitines<sup>(6)</sup> sont de petites protéines alternatives aux anticorps générées à façon par l'entreprise Affilogic. Elles dérivent structurellement des protéines Sac7d et Sso7d membres de la famille des protéines de 7 kDa fixant l'ADN double-brin et issues respectivement des archées hyperthermophiles et acidophiles *Sulfolobus acidocaldarius* [107] et *Sulfolobus solfataricus* [116]. Les protéines Sac7d et Sso7d sont constituées d'une chaîne polypeptidique exempte de résidus cystéine dont le repliement compact et thermodynamiquement stable confère une haute stabilité thermique (90,4°C pour Sac7d et 100,2°C pour Sso7d) et chimique (de 0 à 12 pour Sac7d et jusqu'à 13 pour Sso7d) [120] aux Nanofitines. Le rôle supposé des protéines Sac7d et Sso7d est de protéger l'ADN contre les hautes températures et l'acidité des milieux dans lesquels évoluent les archées du genre *Sulfolobus*. La fusion de la protéine Sso7d à la pFu polymérase, nommée Phusion, permet notamment de protéger l'ADN contre les hautes températures lors des « Réactions en Chaîne par Polymérase » (PCR) [123].



Les Nanofitines sont obtenues après mutations aléatoires de 10 à 14 des résidus présents au niveau de la surface d'interaction avec l'ADN double-brin des protéines Sac7d et Sso7d [118] (Figure 17) ou par élongation et mutation des boucles qui seront impliquées dans la reconnaissance de la cible [112, 124]. Les protéines sont ensuite sélectionnées par *ribosome display* contre la cible voulue [125]. Il a ainsi été développé des Nanofitines contre plus de quarante cibles [100] avec une affinité pour leur cible allant jusqu'au picomolaire [107]. La

<sup>6</sup> Les Nanofitines sont également connues sous le nom d'Affitines.

charpente conservée de Sac7d et Sso7d confère aux Nanofitines une grande stabilité vis-à-vis du pH, de certains agents chaotropes et de la température [107]. Les caractéristiques physicochimiques des Nanofitines permettent d'envisager leur utilisation pour de nombreuses applications thérapeutiques dont le traitement des maladies inflammatoires du tractus intestinal par administration orale (Figure 18) [100].



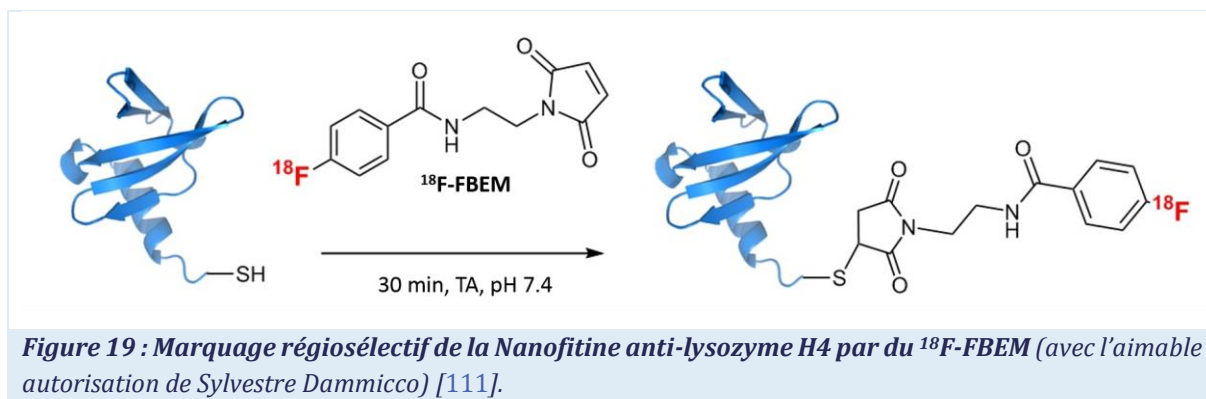
**Figure 18 : Applications des Nanofitines dans les domaines des biotechnologies, de l'imagerie et de l'in vivo.** \* : Projet NanoFar 2014-06-C3, \*\* : site Internet de la société Affilogic [100]. Figure adaptée pour les Nanofitines d'après la revue de Löfblom J. et al. [101]. Les publications citées figurent en note de bas de page. (7)

La surface de fixation se trouvant sur les feuillets et la première boucle, il est facile d'ajouter par ingénierie moléculaire à l'une des extrémités un élément permettant la fixation sur une surface, le marquage régiospécifique ou encore la fusion d'une Nanofitine avec un partenaire protéique. Cette stratégie a été utilisée pour la fixation de la Nanofitine anti-lysozyme H4 sur une surface de phosphonate de zirconium *via* une étiquette peptidique phosphorylée [110] ou la fixation de la Nanofitine anti-RCNMV sur une surface de nickel *via* l'étiquette hexa-histidine [121]. L'insertion d'un résidu cystéine en bout de chaîne a permis l'ajout d'un fluorophore

<sup>7</sup> Publications citées dans la figure : 15, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122.

solvatochrome réagissant avec les groupements thiols [115] ou d'un groupement prosthétique radiomarqué *via* une fonction MMA [111] sur la Nanofitine anti-lysozyme H4<sup>(8)</sup>. En tant que partenaire de fusion, les Nanofitines peuvent être utilisées comme outils de détection *in vitro* [107, 108, 113, 114] ou dans des micro-organismes vivants [107].

La petite taille des Nanofitines et leur robustesse permettent d'envisager leur utilisation pour des applications en imagerie moléculaire. Avec une taille inférieure à 20 kDa, elles ont une meilleure pénétration tissulaire que les anticorps et sont éliminées rapidement de l'organisme. L'affinité pour leur cible étant comparable à celle des anticorps, ces protéines permettraient l'obtention d'un bon contraste entre le tissu ciblé et les autres tissus en peu de temps. Deux Nanofitines anti-CD138 (A6 et A872) ont déjà été radiomarquées de manière directe et indirecte avec de l'<sup>125</sup>I, et par du <sup>99m</sup>Tc pour le diagnostic des myélomes multiples par imagerie SPECT et biodistribution [15]. Les marquages ayant eu lieu sur les résidus lysine, histidine et tyrosine, ils ont induit une perte d'activité de la Nanofitine A872 [15]. Une nouvelle stratégie de marquage régiosélectif de Nanofitines a été réalisée au sein du Centre de Recherches du Cyclotron (CRC) en partenariat avec l'entreprise Affilogic. Cette stratégie consiste à insérer génétiquement un résidu cystéine à l'extrémité C-terminale d'une Nanofitine et à réaliser ensuite le couplage avec le groupement prosthétique <sup>18</sup>F-FBEM [111] (Figure 19).

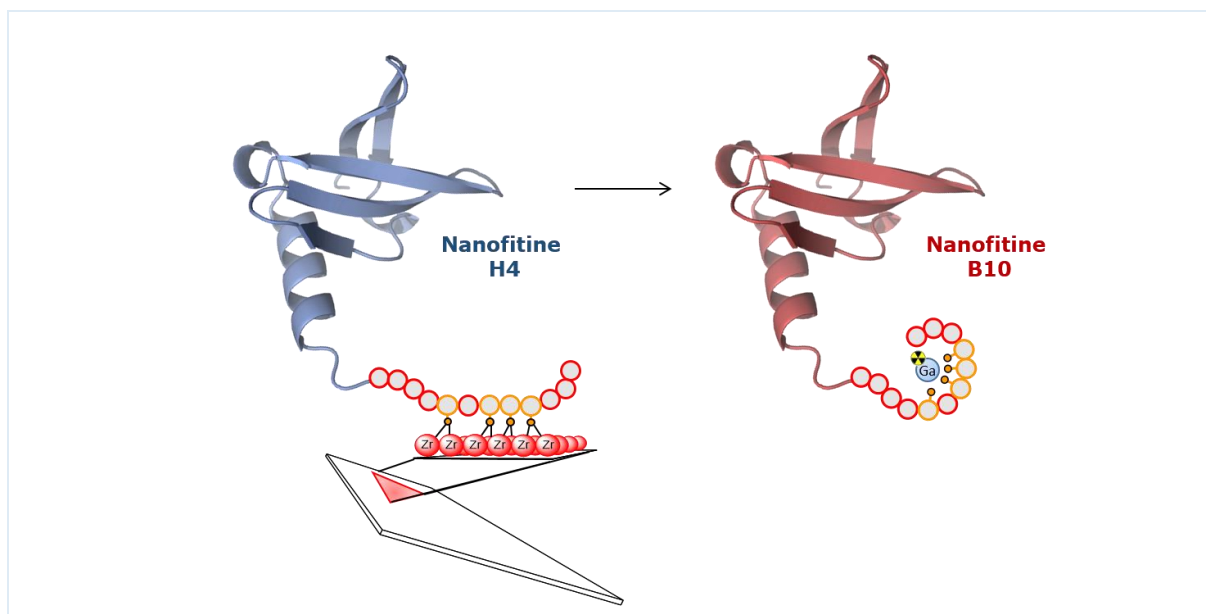


<sup>8</sup> Cette stratégie est développée dans le Chapitre 4 du présent manuscrit.

## 1.4. Objectifs et organisation du travail de thèse

Les anticorps et leurs fragments sont souvent optimisés pour des applications thérapeutiques. Malgré une forte accumulation dans les tumeurs grâce à leur forte affinité, leur clairance lente ne permet pas d'obtenir un bon contraste en imagerie *in vivo* en un temps court, faisant des anticorps des vecteurs non-idéaux pour ce type d'application. Leur radiomarquage ayant lieu le plus souvent sur des acides aminés présents sur l'ensemble de la protéine (partie 1.2.1), il se réalise alors de manière non-spécifique et peut conduire à l'inactivation de sa capacité de reconnaissance moléculaire.

Le présent travail de thèse s'inscrit dans le cadre du développement d'un nouvel outil de diagnostic et de suivi en oncologie permettant l'obtention d'images *in vivo* de tumeurs dans un délai en accord avec le confort du patient (en réduisant le temps entre l'injection et l'acquisition d'images). Suivant cet objectif, mon travail de thèse s'est articulé autour de l'utilisation des Nanofitines comme alternative aux anticorps en les radiomarquant à l'aide d'un radioisotope de faible demi-vie physique, comme le gallium-68. Dans un premier temps ([Chapitre 2](#) et [Chapitre 3](#)), nous nous sommes intéressés au développement d'une nouvelle méthode de radiomarquage par le gallium-68 ne nécessitant pas d'étape de modification chimique de la protéine à marquer. Ces travaux s'inscrivent dans la continuité de précédentes recherches ayant abouti au développement d'une étiquette peptidique tétra-phosphorylable *in vitro* dont les groupements phosphates permettent l'établissement de liaisons de coordination avec des métaux. Ainsi, le [Chapitre 2](#) décrit le développement d'un système permettant la phosphorylation *in vivo* de l'étiquette préalablement fusionnée à une Nanofitine en co-exprimant la protéine chimère résultante en présence d'une kinase. Le [Chapitre 3](#) reprend les travaux visant à l'optimisation de l'étiquette peptidique, initialement développée pour l'ancrage de protéines sur des surfaces de phosphonate de zirconium, pour la chélation de radiométaux en solution. Enfin, dans un second et dernier temps, nous avons évalué dans le [Chapitre 4](#) la capacité d'une Nanofitine anti-EGFR à cibler de manière spécifique *in vivo* les tumeurs EGFR-positives à l'aide d'un modèle de xénogreffe portant deux tumeurs, une tumeur EGFR-positive et une tumeur EGFR-négative.



**Figure 20:** Schéma reprenant l'objectif principal de la thèse consistant au développement d'un nouvel outil diagnostique en oncologie. La Nanofitine en bleu représentant la Nanofitine anti-lysozyme H4 et en rouge la Nanofitine anti-EGFR B10.

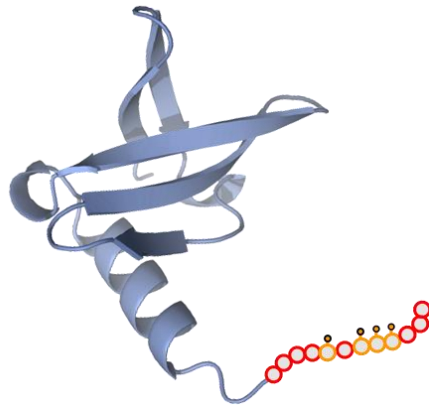




---

GENERATION D'UN SYSTEME DE CO-  
EXPRESSION POUR LA PHOSPHORYLATION  
*IN VIVO* DE NANOFITINE

---



Les expérimentations présentées dans ce chapitre ont été réalisées avec l'aide technique d'Alain Defontaine et Amina Fateh. Les résultats obtenus font l'objet d'une publication intitulée « *In vivo phosphorylation of a peptide tag for protein purification* » et acceptée au sein de la revue scientifique « *Biotechnology Letters* ».

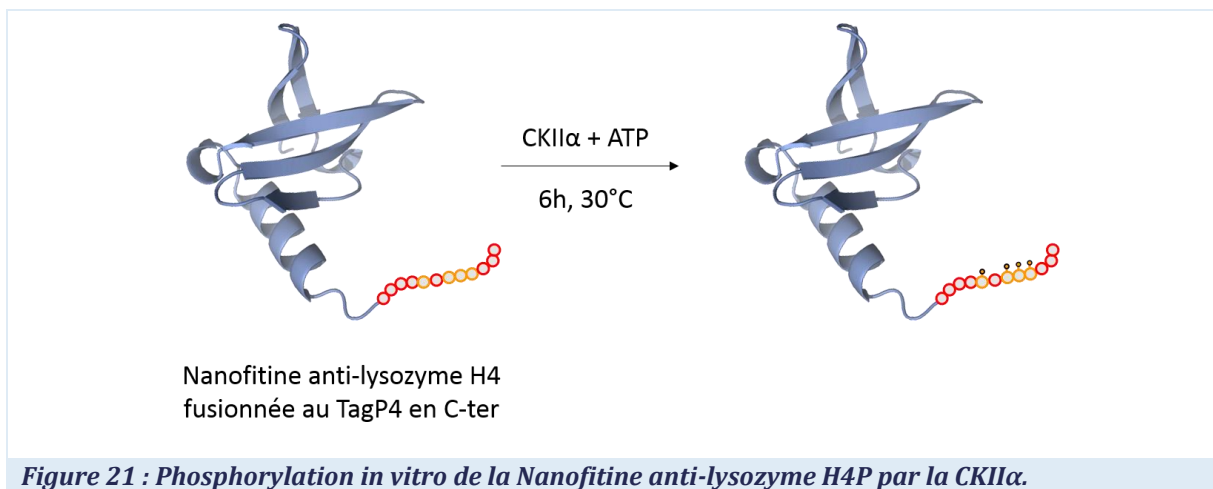


## Chapitre 2 : Génération d'un système de co-expression pour la phosphorylation *in vivo* de Nanofitine

### 2.1. Introduction

La génération d'une étiquette tétra-phosphorylable *in vitro* (EEDSDSSSEDE, TagP4) par l'unité alpha de la caséine kinase humaine II (CKII $\alpha$ ) permettant la fixation de manière forte à des surfaces de phosphonate de zirconium. Elle a été réalisée au sein du laboratoire UMR CNRS 6286 [110, 129]. L'établissement de liaisons entre l'oxygène des groupements phosphate du TagP4 et les ions Zr(IV) présents sur des surfaces de phosphonate de zirconium a permis une immobilisation stable et orientée de la Nanofitine anti-lysozyme H4 fusionnée génétiquement au TagP4 pour la préparation de puces à protéines [110, 129, 130]. Nous voulons utiliser la capacité naturelle des phosphates à établir des liaisons fortes avec certains cations métalliques, comme le gallium(III), le zirconium(IV) ou le fer(III), pour marquer de manière régiosélective les Nanofitines avec du gallium-68.

Dans les travaux précédents, les protéines, Nanofitine et CKII $\alpha$ , étaient produites séparément et purifiées grâce à une résine de nickel(II) complexée à l'acide nitrilotriacétique (NTA) (Ni(II)-NTA). Cette purification était rendue possible grâce à l'affinité existant entre le nickel(II) et l'étiquette hexa-histidine (6HisTag) présente sur les deux protéines. La phosphorylation du TagP4 était réalisée *in vitro* en présence d'adénosine triphosphate (ATP) et de la CKII $\alpha$  (Figure 21). La kinase était ensuite éliminée par précipitation en chauffant le milieu réactionnel à 70°C. La Nanofitine tétra-phosphorylée était finalement purifiée sur résine Ni(II)-NTA (cf. : [Matériel et Méthodes](#)).



Afin de diminuer le nombre d'étapes de purification, nous proposons dans ce chapitre une stratégie qui consiste à co-exprimer au sein d'une même bactérie hôte la CKII $\alpha$  et la Nanofitine H4 fusionnée au tagP4. Pour se faire, nous nous sommes inspirés des systèmes de biotinylation *in vivo* existants, dans lesquels une protéine est fusionnée à un peptide de biotinylation, l'Avitag, et co-exprimée avec l'enzyme de biotinylation BirA [131, 132, 133, 134]. Nous avons choisi de travailler avec deux types de vecteurs. Le premier est un dérivé du vecteur pBAD33 et le second du vecteur pQE30 exprimant respectivement la CKII $\alpha$  et la Nanofitine anti-lysozyme H4 fusionnée au TagP4. Les vecteurs pQE30 et pBAD33 possèdent des marqueurs de sélection et des promoteurs différents permettant d'exprimer les protéines de manière individuelle [135] (Tableau 4).

**Tableau 4 : Caractéristiques des vecteurs choisis pour la co-expression.**

Vecteur	Marqueur de sélection	Promoteur
pQE30	Résistance à l'ampicilline	T5
pBAD33	Résistance au chloramphénicol	araBAD

## 2.2. Choix des vecteurs et de la souche

### 2.2.1. Du vecteur transcriptionnel pBAD33 au vecteur traductionnel pCKII $\alpha$

Le système d'expression du pBAD33 est constitué du promoteur *araBAD* ( $P_{BAD}$ ) et de la protéine régulatrice AraC. Le promoteur  $P_{BAD}$  possède peu de fuite d'expression et est régulé de manière fine par l'arabinose [136, 137], plus la concentration en arabinose sera élevée, plus l'expression sera importante [138, 139]. Le vecteur pBAD33 ne possédant pas de séquence Shine-Dalgarno (RBS), il ne peut être utilisé directement pour la production de protéines. Nous avons alors transformé ce vecteur transcriptionnel en vecteur traductionnel en respectant le modèle d'un vecteur commercial équivalent (pBAD/His, Invitrogen). Nous avons inséré dans le vecteur pBAD33 la séquence du RBS huit bases en amont du codon d'initiation (ATG). Afin de contrôler finement l'expression de la CKII $\alpha$ , nous avons choisi de cloner le gène codant pour la CKII $\alpha$  dans ce nouveau vecteur. L'expression de protéines dans des vecteurs de type pBAD nécessite l'utilisation d'une souche d'*Escherichia coli* qui ne dégrade pas l'arabinose [136, 138, 139]. Deux souches d'*Escherichia coli* Ara- sont conseillées pour la production de protéines *via* des vecteurs pBAD par la société Invitrogen, il s'agit des souches TOP10 et LM194 [140, 141].

La création du vecteur traductionnel a été réalisée en plusieurs étapes. La première a consisté à générer un insert encadré des sites de restriction MluI et SacI comprenant le promoteur

araBAD et le RBS selon le modèle du vecteur pBAD/His. Un second insert comprenant la séquence codante de la CKII $\alpha$  (sans 6HisTag) encadrée par les sites de restriction des enzymes Sac1 et HindIII a ensuite été généré. L'étape suivante a consisté à liguer les deux inserts décrits précédemment pour générer un seul insert encadré par les sites de restriction MluI et HindIII. Le produit de ligation, obtenu après amplification et digestion, a été sous-cloné dans le vecteur pBAD33 également linéarisé par digestion avec les enzymes MluI et HindIII. Le vecteur résultant a été nommé pCKII $\alpha$  (Figure 22). La production et la fonctionnalité de la CKII $\alpha$  ont été validées lors des expériences de co-expression. L'absence d'étiquette du 6HisTag permet d'éviter la co-purification de la kinase et de la protéine à phosphoryler lors des expériences de co-expression.

### 2.2.2. Les vecteurs permettant l'expression de la Nanofitine anti-lysozyme H4

Nous avons choisi pour les vecteurs qui devront exprimer la Nanofitine anti-lysozyme H4 fusionnée à l'étiquette phosphorylable des vecteurs dérivés du pQE30 dont l'expression est induite par l'ajout d'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) dans le milieu de culture. Son induction n'étant pas modulable, il y aura alors production massive de la protéine d'intérêt en présence d'IPTG. Le vecteur d'origine, pNF1, permet l'expression de la Nanofitine anti-lysozyme H4 sous la forme d'une double protéine de fusion avec un 6HisTag à l'extrémité N-terminale (N-ter) et le TagP4 en C-ter [110]. Cette protéine est nommée H4P et sa forme phosphorylée H4P-P.

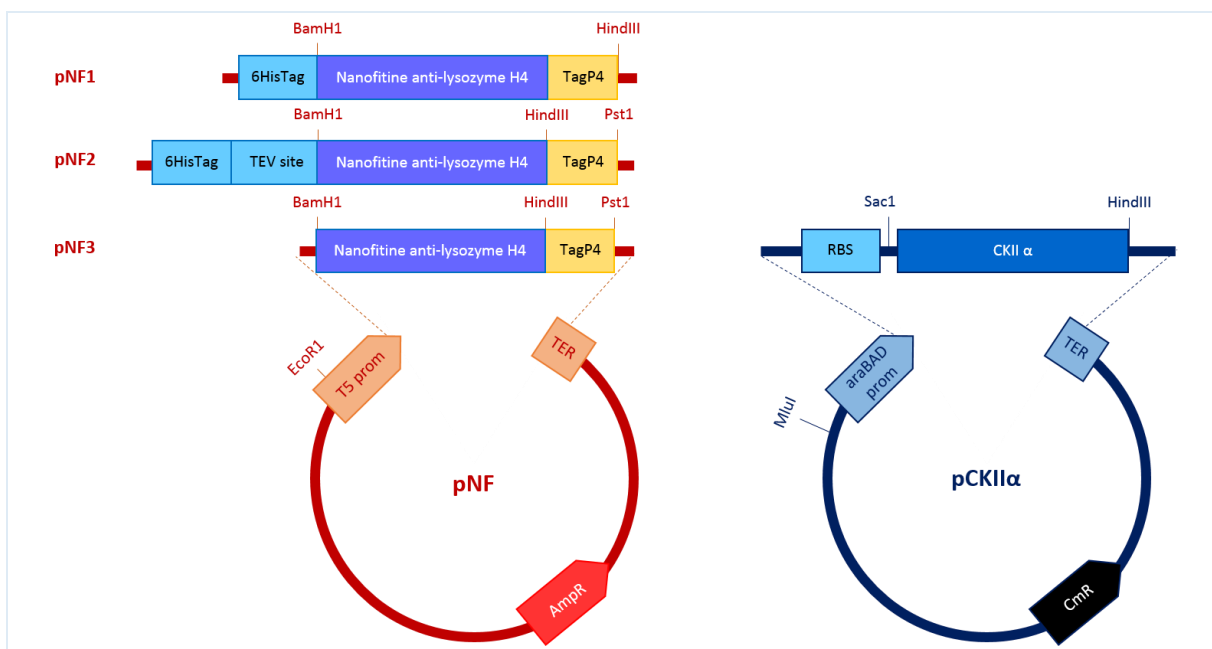


Figure 22 : Constructions générées pour le développement du système de co-expression in vivo.

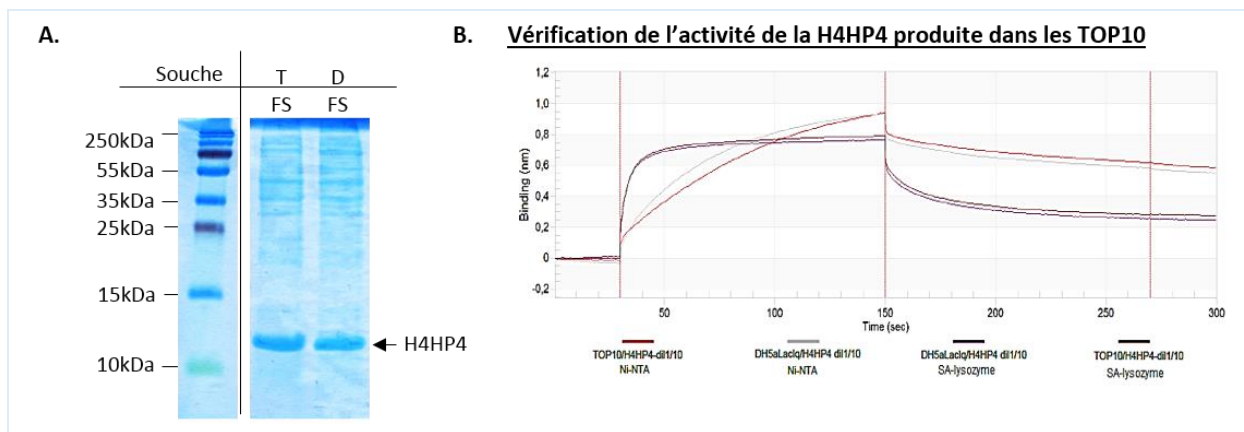
Pour pouvoir éliminer l'étiquette 6HisTag, qui pourrait interférer avec les expériences de chélation, nous avons créé un second vecteur avec un site de clivage reconnu par la protéase TEV

entre l'étiquette 6HisTag et la Nanofitine. Ce vecteur possède le TagP4 en C-ter entre les sites de restriction HindIII et Pst1. Nous avons cloné la séquence de la Nanofitine H4 issue de pNF1 entre les sites BamH1 et HindIII. Ce nouveau vecteur, nommé pNF2, permet d'exprimer la protéine H4HP4 (Figure 22). Après purification sur Ni(II)-NTA, il sera alors possible de retirer le 6HisTag si besoin et d'utiliser directement le TagP4 pour la purification de la protéine d'intérêt phosphorylée nommée H4HP4-P.

### 2.3. Phosphorylation *in vivo* des Nanofitines H4P et H4HP4

#### 2.3.1. Production de Nanofitines dans les TOP10

Concernant le développement du système de co-expression, nous avons choisi de travailler avec la souche d'*E. coli* Ara- TOP10. Traditionnellement, la production des Nanofitines étant réalisée dans des *E. coli* DH5 $\alpha$ LacI<sup>q</sup>, nous avons donc voulu valider l'utilisation des TOP10 pour l'expression des Nanofitines H4P et H4HP4. Pour se faire, nous avons transformé des souches d'*E. coli* TOP10 et DH5 $\alpha$ LacI<sup>q</sup> avec le pNF2 et avons analysé les fractions solubles obtenues après induction IPTG par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE). Nous avons observé la présence d'une protéine surexprimée entre 10 et 15 kDa (Figure 23A) correspondant à la taille attendue pour la Nanofitine H4HP4 (11 424,5 Da). La fonctionnalité de cette protéine a également été vérifiée par interférométrie de surface (Figure 23B).



**Figure 23 : Validation de la construction du pNF2 et fonctionnalité de la protéine H4HP4.** A. SDS-PAGE 17% des fractions solubles (5µL) après production de H4HP4 dans des TOP10 ou des DH5 $\alpha$ LacI<sup>q</sup>. FS : fraction soluble, T : TOP10, D : DH5 $\alpha$ LacI<sup>q</sup>. B. Courbes d'affinité de la H4HP4 pour le lysozyme et le Ni(II)-NTA obtenues par interférométrie de surface avec des biosenseurs lysozyme-streptavidine et Ni(II)-NTA. Les échantillons testés sont les fractions solubles diluées au dixième après production de H4HP4 dans des TOP10 ou des DH5 $\alpha$ LacI<sup>q</sup>.

Quel que soit le type de souche utilisé, nous observons des courbes de fixation et de dissociation semblables. Par ailleurs, la présence du site TEV, ne semble pas gêner la capacité de capture de la Nanofitine vis-à-vis de sa cible, le lysozyme. Après purification sur résine Ni(II)-NTA,

nous avons phosphorylé *in vitro* les protéines H4P et H4HP4, et les avons utilisées comme contrôle lors de l'analyse des expériences *in vivo*.

### 2.3.2. Co-expression des Nanofitines et de l'unité $\alpha$ de la caséine kinase II

Dans un premier temps les TOP10 sont rendues compétentes par la technique SEM [142] et transformées par le vecteur pCKII $\alpha$ . Après sélection sur LB-agar supplémenté en chloramphénicol, la présence du vecteur est vérifiée par séquençage. Les bactéries TOP10/pCKII $\alpha$  sont ensuite rendues compétentes par la technique TSS [143] et transformées avec un vecteur pNF1 ou pNF2 (Figure 24). Après sélection sur LB-agar supplémenté en ampicilline et chloramphénicol, la présence des vecteurs pNF et pCKII $\alpha$  est vérifiée par séquençage.

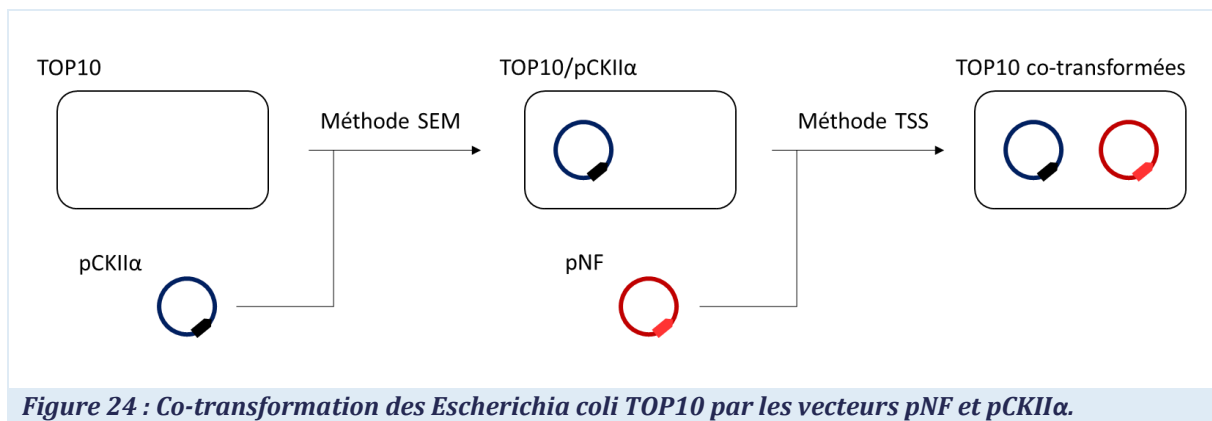


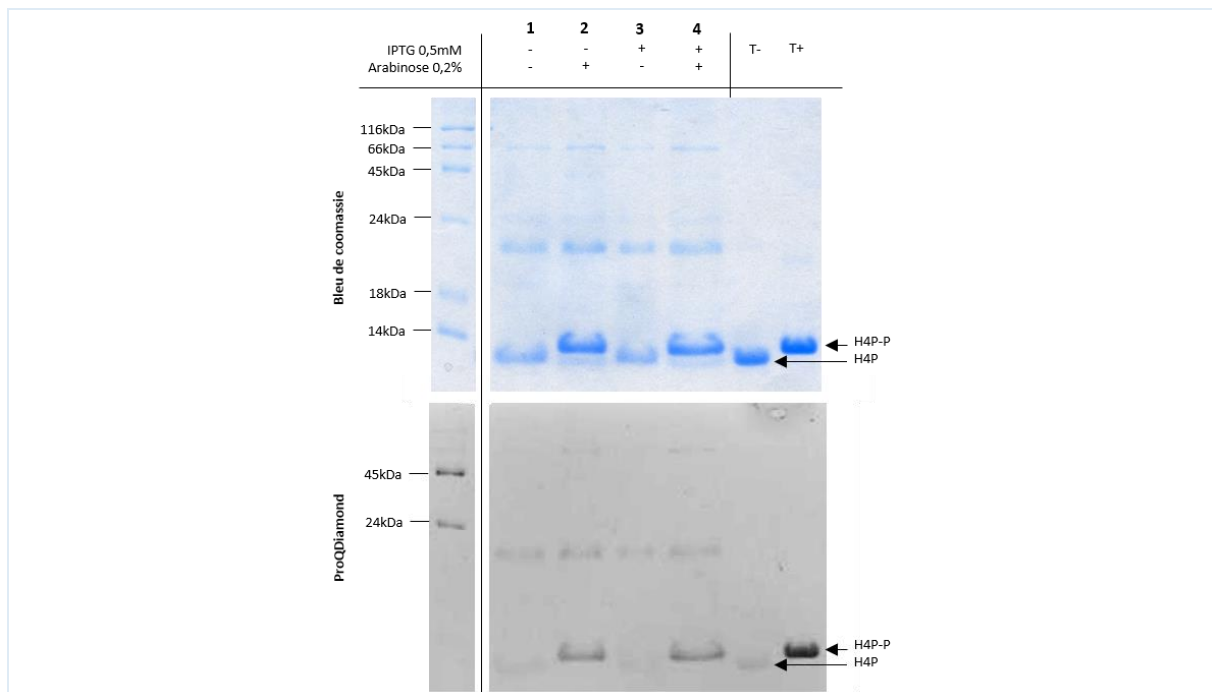
Figure 24 : Co-transformation des *Escherichia coli* TOP10 par les vecteurs pNF et pCKII $\alpha$ .

Les TOP10 co-transformées sont mises en culture dans un milieu supplémenté à la fois en ampicilline et en chloramphénicol. La production des protéines est induite par addition de 0,5 mM d'IPTG [110] et/ou 0,2% d'arabinose [137]. Les fractions obtenues après purification sur résine Ni(II)-NTA sont analysées en SDS-PAGE. La Figure 25 reprend les résultats obtenus pour la protéine H4P.

Sur le gel polyacrylamide coloré en bleu de Coomassie, nous observons un retard de migration entre les échantillons témoins non-phosphorylés et phosphorylés *in vitro*. En absence d'induction (puit 1), nous observons en SDS-PAGE, après coloration en bleu de Coomassie, la présence d'une bande correspondant à la taille de la Nanofitine H4P (MM = 9614,5 Da) pouvant être due à la fuite d'expression du promoteur T5 [144]. En présence uniquement d'arabinose (puit 2), nous observons un décalage de la bande correspondant à la Nanofitine phosphorylée suggérant que le TagP4 a été phosphorylé et qu'il y a co-expression d'une CKII $\alpha$  fonctionnelle. Lorsque les cultures sont induites uniquement en présence d'IPTG (puit 3), nous observons une bande présentant une migration similaire au produit observé en absence d'induction, validant ainsi que

la bande observée en absence d'induction correspond à la protéine non-phosphorylée. Quand la culture est co-induite (puit 4), nous observons une bande au même niveau que lors de la simple induction en présence d'arabinose suggérant la présence d'une protéine phosphorylée pour les cultures induites en présence d'arabinose.

La phosphorylation de la Nanofitine a ensuite été confirmée pour les échantillons co-induits (puit 4) et induits uniquement avec de l'arabinose (puit 2) grâce à un colorant spécifique des phosphoprotéines, le ProQDiamond. La présence d'une deuxième bande de faible intensité observable en coloration bleu de Coomassie, non-détectée en ProQDiamond et se trouvant à la même hauteur que la protéine témoin non-phosphorylée suggère que la phosphorylation n'est pas complète.



**Figure 25 : Phosphorylation in vivo de la protéine H4P.** Gel de polyacrylamide à 17% coloré au ProQDiamond puis au bleu de Coomassie. Dépôt de 2  $\mu$ g d'échantillon purifié sur résine Ni(II)-NTA. T- : Protéine H4P, T+ : Protéine H4P-P phosphorylée in vitro.

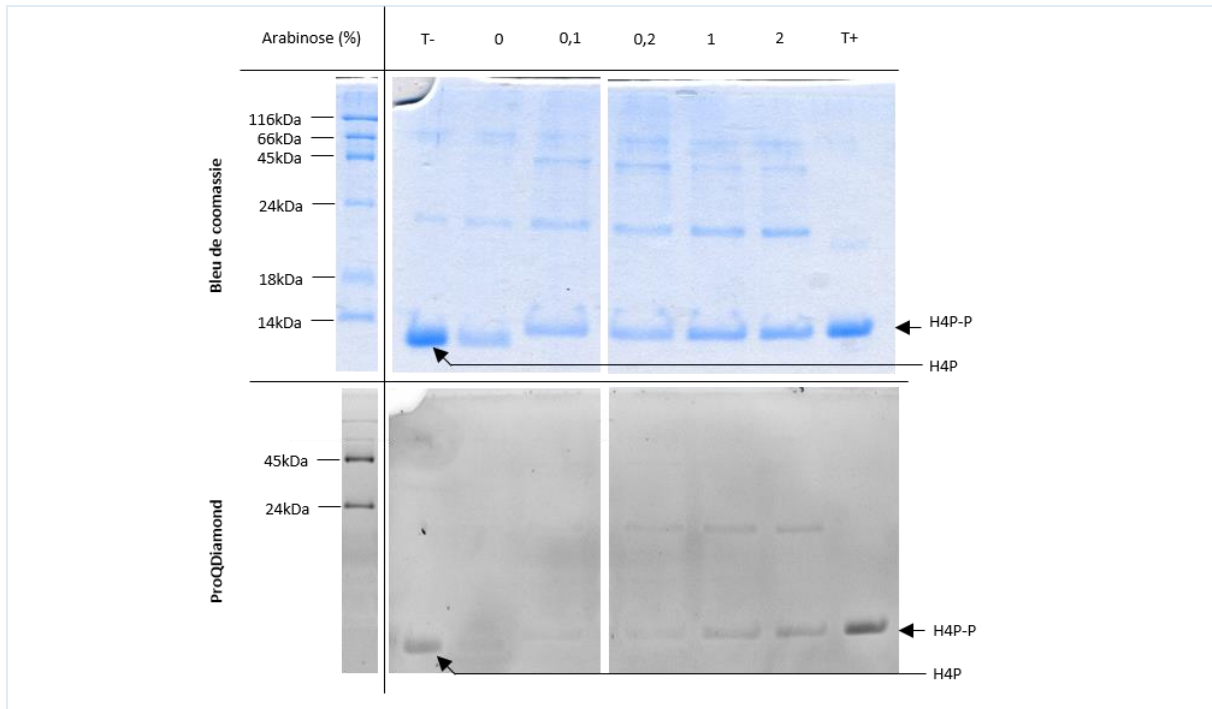
## 2.4. Optimisation de la phosphorylation

### 2.4.1. Variation de la concentration en arabinose

Le fait que la phosphorylation soit incomplète pourrait suggérer un rapport de production entre les Nanofitines et la CKII $\alpha$  non optimal. Une voie d'amélioration potentielle consiste à induire en différé les différentes protéines [145]. Nous avons essayé de modifier l'ordre des ajouts d'inducteur dans le milieu de culture, mais quel que soit l'ordre d'induction, nous n'avons pas



observé de différences significatives entre les essais. Pour moduler le rapport d'expression de la CKII $\alpha$ /Nanofitine, nous avons fixé la quantité d'IPTG à 0,5 mM et ajouté une quantité variable d'arabinose (de 0,1% à 2%). Les résultats obtenus pour la protéine H4P sont présentés dans la Figure 26.



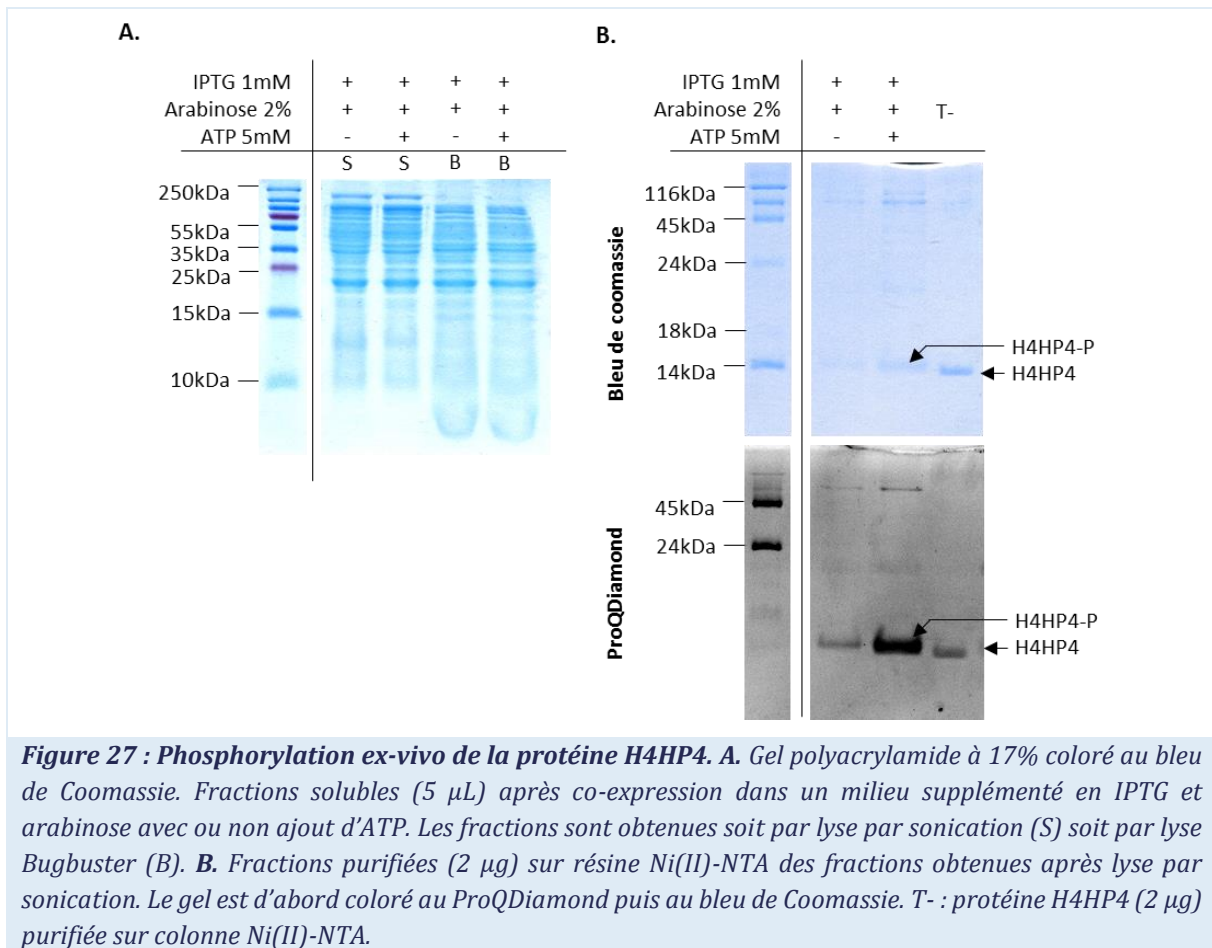
**Figure 26 : Optimisation de la phosphorylation *in vivo* de la protéine H4P par variation de la concentration en arabinose.** SDS-PAGE des fractions purifiées sur Ni(II)-NTA obtenues après cultures des TOP10 co-transformées pNF1 et pCKII $\alpha$ . Dépôts de 2  $\mu$ g de protéines. L'induction a été réalisée en présence de 0,5 mM d'IPTG et une quantité variable d'arabinose. T- : H4P, T+ : H4P-P phosphorylée *in vitro*.

La présence d'un décalage de bande en bleu de Coomassie dès 0,1% suggère que la phosphorylation commence en présence d'une faible concentration en CKII $\alpha$  et que le décalage de bande a lieu dès la première phosphorylation. L'augmentation du signal observé en coloration ProQDiamond peut être interprétée comme une augmentation de la quantité de protéines phosphorylées ou du taux de phosphorylation. Cette observation est en accord avec les propriétés régulatrices des vecteurs de type pBAD [137]. La coloration en ProQDiamond montre alors que la phosphorylation *in vivo* est plus importante avec 2% d'arabinose (Figure 26).

#### 2.4.2. Phosphorylation *ex-vivo*

Une autre hypothèse en lien avec la phosphorylation incomplète serait que la concentration intracellulaire en ATP est insuffisante pour permettre la production des deux protéines et la phosphorylation de la Nanofitine. Par analogie aux travaux de co-expression de BirA et d'un peptide à biotinyler [146], une solution est de poursuivre la phosphorylation *ex-vivo*

de la Nanofitine en ajoutant de l'ATP dans la fraction soluble. Après co-expression des Nanofitines H4P et H4HP4 en présence de 2% d'arabinose, la fraction soluble obtenue après lyse par sonication est supplémentée avec 5 mM d'ATP et incubée sur la nuit à 30°C. Les échantillons sont ensuite chauffés à 75°C, pour faire précipiter les protéines endogènes, et les Nanofitines sont purifiées sur résine Ni(II)-NTA. Les résultats obtenus pour la protéine H4HP4 sont présentés dans la [Figure 27](#).



Nous avons analysé en SDS-PAGE les fractions solubles obtenues après la lyse avant chauffage à 75°C ([Figure 27A](#)). Lors de l'utilisation du Bugbuster pour la lyse bactérienne, nous obtenons un précipité important après une nuit à 30°C, qui est absent lorsque la lyse est effectuée par sonication. Nous avons donc choisi la sonication comme mode de lyse par la suite pour les études de phosphorylation *ex-vivo*. Nous avons également analysé par SDS-PAGE les fractions obtenues après purification Ni(II)-NTA. Lorsque le gel est coloré avec du bleu de Coomassie, nous n'observons pas de différence significative entre les échantillons obtenus avant ou après phosphorylation *ex-vivo*. Lorsque les gels sont colorés avec du ProQDiamond, nous observons une bande d'une plus forte intensité pour l'échantillon phosphorylé *ex-vivo* ([Figure 27B](#)). Ce résultat

suggère qu'il y a augmentation du taux de phosphorylation après ajout d'ATP et que cette étape favorise l'obtention de la Nanofitine multi-phosphorylée.

## 2.5. Purification des phosphoprotéines

### 2.5.1. Génération des résines Fe(III)-NTA et Ga(III)-NTA

La présence de l'étiquette 6HisTag sur les différentes Nanofitines permet de purifier sélectivement ces protéines. Voulant utiliser les protéines phosphorylées pour la chélation de radiométaux appliquée à l'imagerie médicale *in vivo*, il est nécessaire d'obtenir un produit le plus pur possible. Ainsi, nous voulons purifier de manière efficace les Nanofitines phosphorylées. Traditionnellement, la purification des protéines se réalise par chromatographie d'affinité *via* des ions métalliques (IMAC) [147, 148]. La purification des protéines possédant une étiquette 6HisTag se réalise grâce à des billes d'agarose fonctionnalisées avec de l'acide nitrilotriacétique (NTA). Le NTA est un agent de chélation tétradentate pouvant établir quatre liaisons de coordination avec les ions nickel(II) [149, 150]. Les ions Ni(II) une fois chélatés au NTA fixent les protéines His-tagées grâce aux deux dernières liaisons de coordination disponibles [150]. Après fixation, les protéines sont éluées par compétition avec un tampon fortement concentré en imidazole.

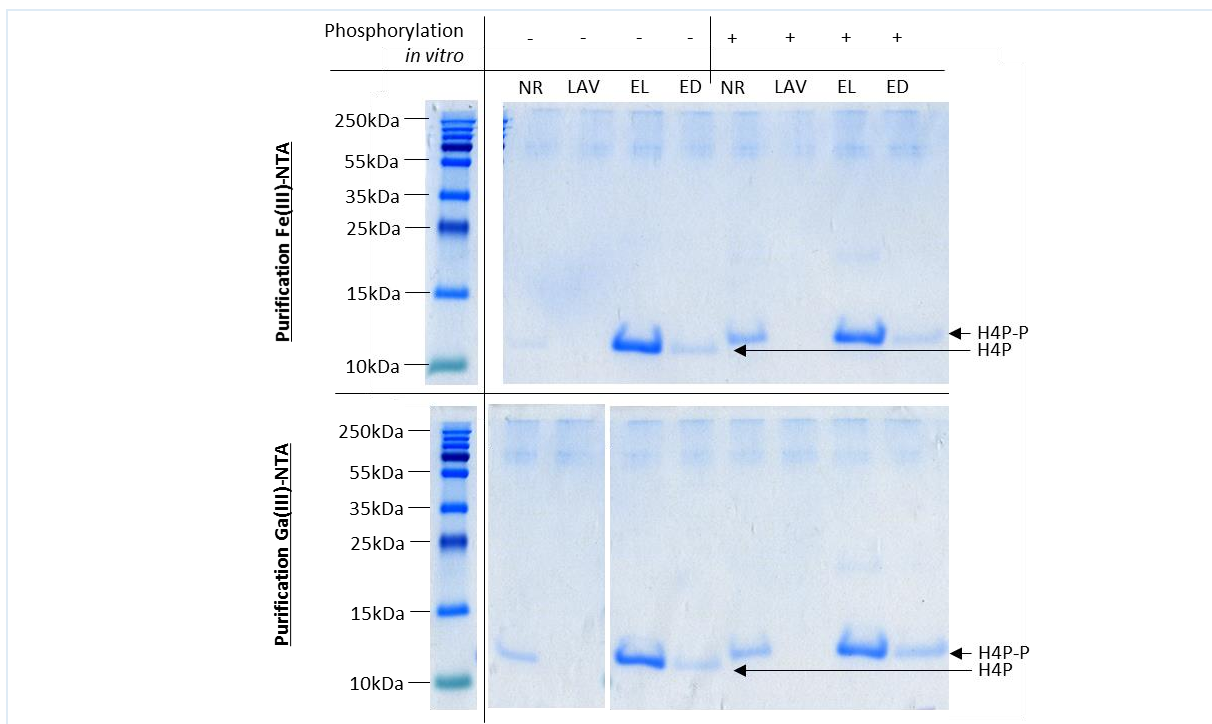
**Tableau 5 : Caractéristiques physicochimiques et constantes de stabilité du nickel(II), du fer(III) et du gallium(III).**

	Rayon ionique (pm)	Nombre de coordination maximal	Constante de stabilité (log <sub>K<sub>ML</sub></sub> )			Réf.
			NTA	EDTA	6HisTag	
<b>Fer(III)</b>	64,5	8	15,87	25,7/25,10	-	151, 152, 153, 154, 157, 158
<b>Gallium(III)</b>	62	6	13,60	21/22/20,27	-	33, 151, 154, 159
<b>Nickel(II)</b>	69	6	11,26/11,54/11	18,56/18,62/19	14	147, 151, 152, 154, 158

Avec  $K_{ML} = [ML] / [M].[L] = 1 / K_D$  (M : métal, L : ligand).

Pour purifier spécifiquement les protéines phosphorylées, nous voulons utiliser la capacité de certains cations à fixer les groupements phosphate. Pour se faire, nous avons généré des résines Fe(III)-NTA et Ga(III)-NTA selon le protocole développé par Machida *et al.* [160]. Le Ga(III) peut établir jusqu'à six liaisons de coordination, quatre de ces liaisons servant à la chélation du métal aux groupements acide iminodiacétique du NTA et les deux autres permettant d'immobiliser les protéines phosphorylées via les groupements phosphates. Le Fe(III) peut établir jusqu'à quatre liaisons de coordination avec les protéines phosphorylées. Pour purifier, les protéines phosphorylées, nous avons utilisé les protocoles développés par Machida *et al.* [160] et

QIAGEN [161] en fixant la concentration en NaCl à 500 mM pour limiter les interactions protéine-protéine. Afin de valider l'utilisation des résines pour la purification de protéines phosphorylées *in vivo* et *ex-vivo*, nous les avons testées avec les protéines H4P-P et H4HP4-P phosphorylées *in vitro*. Après fixation sur les résines Ga(III)-NTA ou Fe(III)-NTA équilibrées avec du tampon MES pH 5.5, les résines sont lavées avec le même tampon et les protéines sont éluées par compétition avec du tampon phosphate 50 mM pH 7.4. Nous avons rajouté une étape de lavage avec de l'EDTA pour décrocher les complexes protéine-cations qui pourraient s'être formés. Les résultats obtenus pour la protéine H4P et sa forme phosphorylée *in vitro* sont présentés dans la Figure 28.

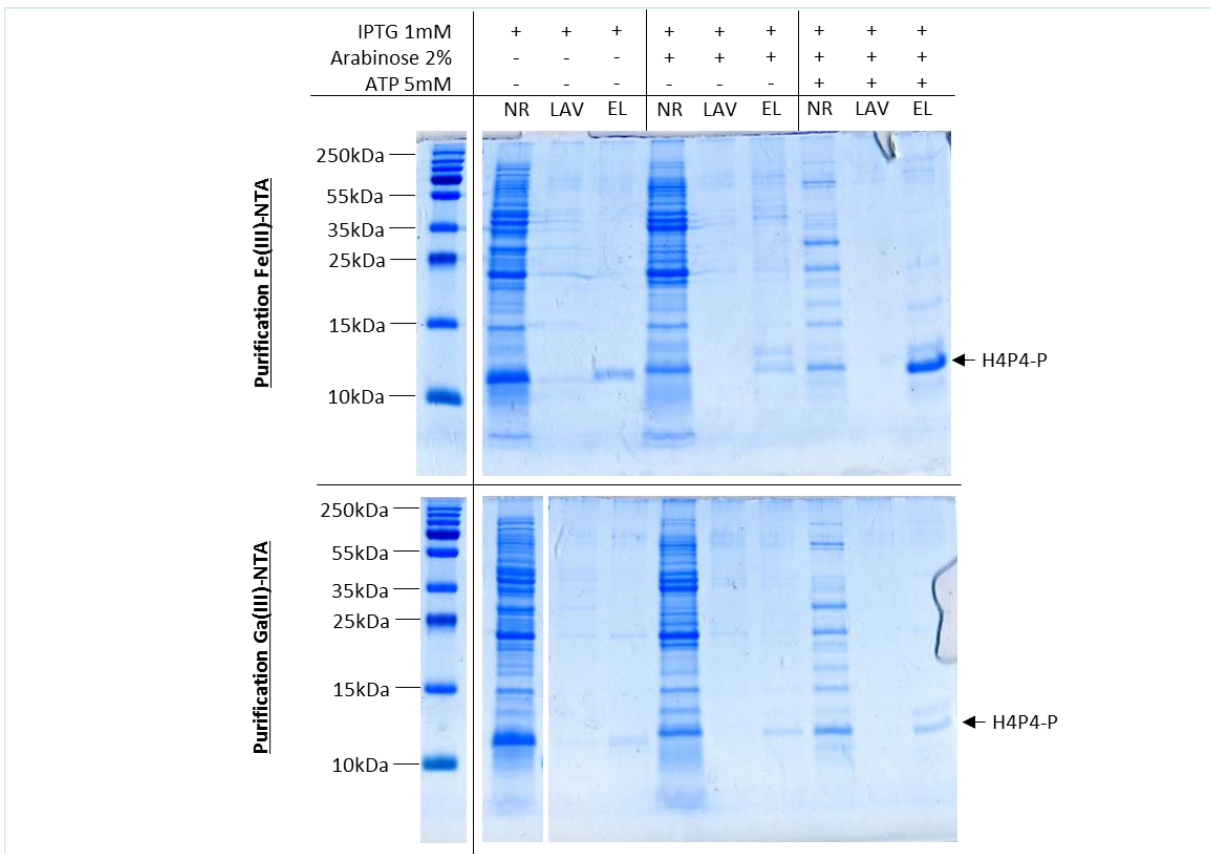


**Figure 28 : Purification des Nanofitines H4P et H4P-P phosphorylée *in vitro* sur résine de Fe(III)-NTA ou Ga(III)-NTA.** Nous avons déposé 5µL d'échantillons dans chaque puits. Les échantillons déposés sur les deux résines sont strictement les mêmes. NR : Fraction non-retendue, LAV : fraction de lavage, EL : Fraction d'éluion, EDTA : fraction obtenue après lavage de la résine avec de l'EDTA 100 mM pH8.

Nous observons la présence des protéines, phosphorylées ou non, majoritairement dans la fraction d'éluion quel que soit le type de résine utilisée. Il est alors possible qu'il y ait fixation *via* un autre élément présent sur la protéine que le TagP4. Il a été montré que le Fe(III) pouvait être chélaté par les résidus histidine [162] et notamment par les étiquettes histidine de plus de trois résidus [148]. Le Ga(III) et le Ni(II) possédant le même nombre de liaisons de coordination (Tableau 5), il est possible que l'étiquette 6HisTag interfère avec la chélation du TagP4.

2.5.2. Un vecteur sans étiquette hexa-histidine

A l'origine, l'étiquette 6HisTag devait être éliminée grâce à la présence du site de clivage TEV et la protéine phosphorylée purifiée sur résine de Ga(III)-NTA ou Fe(III)-NTA. Malheureusement, l'affinité du 6HisTag pour les résines métalliques ne permettrait pas d'obtenir la protéine phosphorylée seule. Nous nous sommes donc affranchis du 6HisTag en générant un nouveau vecteur, nommé pNF3, permettant la production de la protéine H4P4. Pour se faire, nous avons inséré entre les sites BamH1 et Pst1 d'un vecteur sans étiquette la séquence de la Nanofitine H4 fusionnée au TagP4. La protéine résultante, nommée H4P4, ne possédant pas de 6HisTag, ne peut être purifiée que sur résine métallique après phosphorylation *in vivo* ou *ex-vivo*. Après co-expression dans des TOP10 en présence de 1 mM d'IPTG et 2% d'arabinose, nous avons phosphorylé *ex-vivo* les échantillons et les avons purifiés sur les deux types de résine (Figure 29).



**Figure 29 : Purification des Nanofitines H4P4-P phosphorylées *in vivo* ou *ex-vivo* sur résine de Fe(III)-NTA ou Ga(III)-NTA.** SDS-PAGE 17% des fractions purifiées en IMAC obtenues après croissance des *E. coli* co-transformées par les vecteurs pCKIIa et pNF3. L'induction a été réalisée en présence uniquement d'IPTG (puits 1-3), d'IPTG et d'arabinose (puits 4-6) et avec ajout d'ATP dans la fraction soluble (puits 7-9). Nous avons déposé 5µL d'échantillons dans chaque puit. Les échantillons déposés sur les deux résines sont strictement les mêmes. NR : Fraction non-retenue, LAV : fraction de lavage, EL : Fraction d'éluion.

La différence d'intensité entre les différentes fractions d'élution pour les échantillons non-induits, phosphorylés *in vivo* ou *ex-vivo*, peut s'expliquer par le fait que nous avons chauffé les échantillons à 75°C. En faisant précipiter la majorité des protéines endogènes, nous avons limité la fixation non-spécifique des protéines aux différentes résines.

Concernant les échantillons en absence d'induction d'arabinose et phosphorylation *in vivo*, nous observons sur SDS-PAGE la présence de bandes correspondant à la taille des Nanofitines H4P et H4P-P dans les fractions non-retenues et dans les fractions d'élution quel que soit le type de résine utilisée. Pour les expériences de phosphorylation *ex-vivo*, nous observons dans les fractions non-retenues et d'élution la présence d'une bande correspondant à la protéine H4P-P. En comparant les résultats obtenus pour les deux résines, nous remarquons que la bande est d'une intensité plus importante pour les résines Fe(III)-NTA. Après phosphorylation, le TagP4 possède trois atomes d'oxygène donneurs d'électrons par résidu sérine phosphorylé. Entre pH2 et pH7, le TagP4 peut donc établir jusqu'à neuf liaisons de coordination s'il est tétra-phosphorylé. Le Fe(III) pouvant établir plus de liaisons avec le TagP4 que le Ga(III), la résine Fe(III)-NTA peut donc fixer plus fortement les protéines phosphorylées.

### 2.5.3. Détermination du taux de phosphorylation

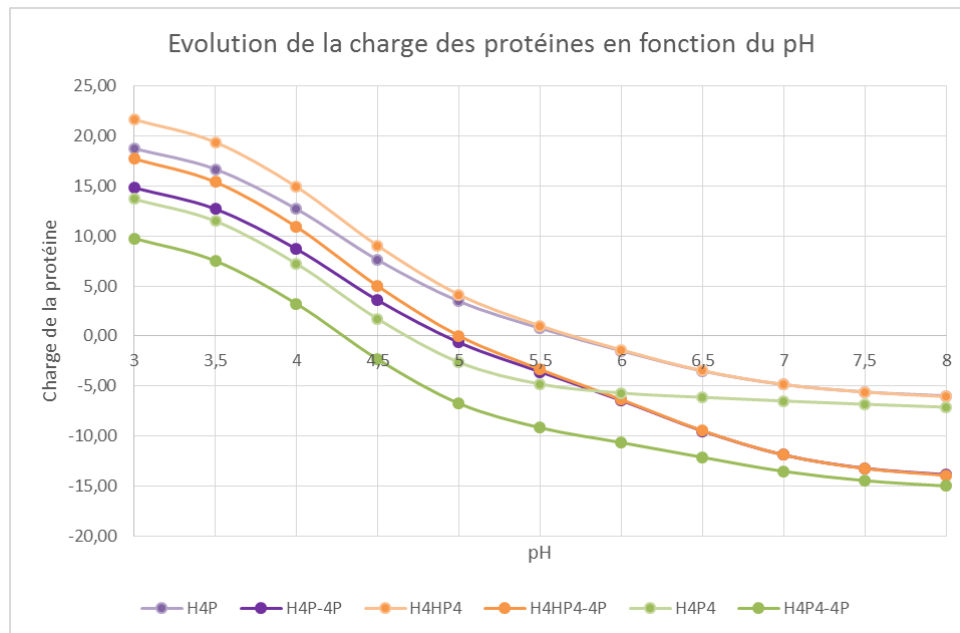
Etant donné que l'étiquette phosphorylable est constituée de quatre résidus sérine et que nous observons sur gel polyacrylamide un retard de migration dès 0,1% d'arabinose, nous ne savons pas si l'ensemble des résidus sérine est phosphorylé, ni quel résidu est phosphorylé. De plus, la coloration ProQDiamond, même si elle permet de colorer spécifiquement les protéines phosphorylées, détecte également les protéines non-phosphorylées lorsqu'elles sont présentes en grande quantité nécessitant l'utilisation d'une autre technique de détection. Afin de déterminer le taux de phosphorylation des protéines d'intérêt, nous avons essayé différentes méthodes électrophorétiques basées sur le pH isoélectrique des protéines. La phosphorylation des résidus sérine de l'étiquette peptidique, par l'ajout de groupements phosphate, va modifier la charge nette de la protéine et donc son pH isoélectrique (Figure 30). En fonction du nombre de groupements phosphate présents, nous pourrions alors déterminer si nous sommes en présence de composés mono-, di-, tri- ou tétra-phosphorylés<sup>9</sup>.

---

<sup>9</sup> Lorsque les protéines sont phosphorylées *in vivo* ou *in vitro*, nous les nommons -P (ex : H4P-P). Lorsque nous connaissons leur état de phosphorylation, nous ajoutons le nombre de phosphorylation (ex : H4P-1P est la forme mono-phosphorylée de la protéine H4P-P).



Protéines	H4P	H4P-4P	H4HP4	H4HP4-4P	H4P4	H4P4-4P
Charge à pH 7	-4,85	-11,88	-4,84	-11,88	-6,49	-13,53



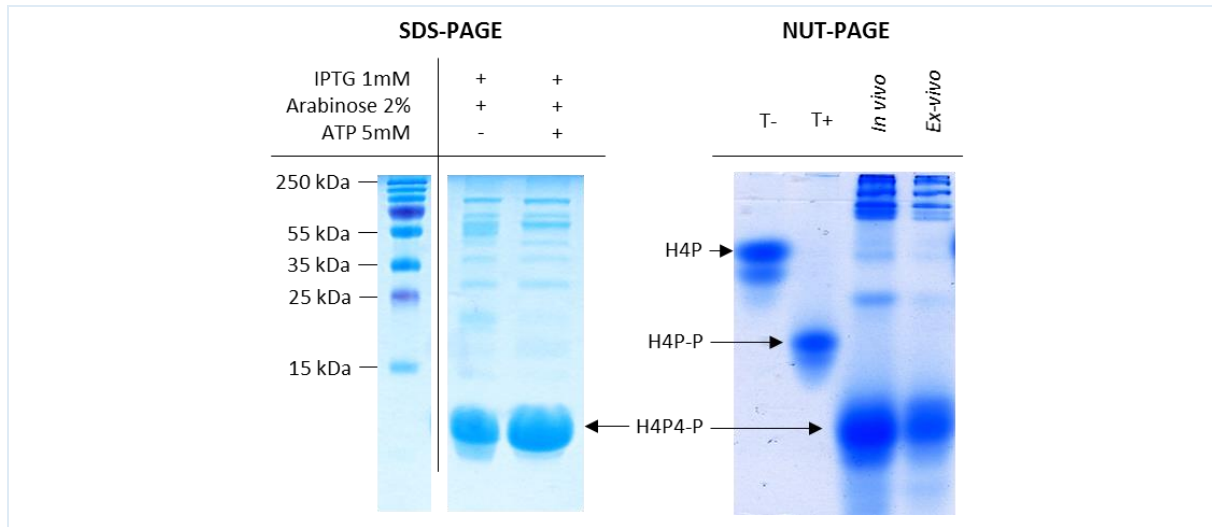
**Figure 30 : Charge nette des différentes protéines.**

La première technique que nous avons essayée était l'isofocalisation en une dimension avec la protéine H4P-P phosphorylée *in vitro*. Les résultats obtenus ne permettent malheureusement pas de différencier de manière certaine les différents états de phosphorylation. Nous obtenons plusieurs bandes que ce soit pour la protéine H4P ou H4P-P phosphorylée *in vitro*. Une technique alternative développée par Buehl *et al.* [163], l'électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant de l'urée et du triton-X (NUT-PAGE), permet de visualiser les différents états d'acétylation ou de phosphorylation des protéines en fonction de leur charge à pH 7 sans utilisation d'ampholytes.

A l'heure actuelle, nous n'avons pas réussi à déterminer le taux de phosphorylation ni les différentes espèces phosphorylées obtenues concernant les expériences de phosphorylation *in vivo* et *ex-vivo* (Figure 31)<sup>10</sup>. Lorsque H4P est déposée seule, il existe une seconde bande située en-dessous de la bande correspondant à la Nanofitine H4P. Il est possible que cette seconde bande

<sup>10</sup> NB : Après rédaction du manuscrit de thèse, nous avons réalisé de nouvelles expérimentations et montré que la protéine était tétra-phosphorylée *in vivo* et *ex-vivo* (voir la publication). La présence d'une bande plus intense en ProQDiamond pour la protéine phosphorylée *ex-vivo* (Figure 27) est peut-être due au fait qu'il y a plus d'échantillons phosphorylés que pour la protéine phosphorylée *in vivo*.

correspondre à une isoforme dans laquelle il existe une méthylation du résidu méthionine à l'extrémité N-terminale de la Nanofitine [129]. Afin de déterminer d'une manière qualitative le nombre de groupements phosphate insérés sur le TagP4, il serait nécessaire de réaliser une étude en spectrométrie de masse.



**Figure 31 : Détermination du taux de phosphorylation de la protéine H4P4-P.** Fractions d'éluion obtenues sur résine Fe(III)-NTA des échantillons phosphorylés *in vivo* et *ex-vivo*, et analysées en SDS-PAGE 17% et NUT-coloré au ProQDiamond. Dépôt de 4  $\mu$ L d'échantillon précipité dans de l'acétone. T- : Protéine H4P, T+ : Protéine H4P-P phosphorylée *in vitro*.

## 2.6. Conclusion

Nous avons réussi à développer un système permettant la production simultanée d'une kinase et d'une protéine fusionnée au TagP4. Cette co-expression permet d'obtenir la protéine phosphorylée *in vivo*. L'efficacité du système a été confirmée par SDS-PAGE par retard de migration de la bande correspondant à la protéine phosphorylée et coloration au ProQDiamond. L'augmentation de la phosphorylation est ensuite réalisée *ex-vivo* en ajoutant de l'ATP dans la fraction soluble sans addition supplémentaire de CKII $\alpha$ . L'étiquette phosphorylée obtenue pourra également être utilisée pour la purification de protéines phosphorylées en IMAC *via* une résine de Fe(III)-NTA. Cependant, concernant notre projet, l'objectif final est d'utiliser le TagP4 pour chélater du gallium-68 en solution. Ne connaissant pas la proportion de cations non-fixés aux billes d'agarose-NTA, notamment pour les résines générées Fe(III)-NTA ou Ga(III)-NTA pour le projet, il est possible que le TagP4 soit déjà chélaté aux cations libres. Nous pourrions alors évaluer la quantité d'ions libres par IMS (*Ion Mobility Spectrometry*) après lavage de la résine avec les différents tampons (sans dépôt de la protéine). Il serait cependant judicieux d'utiliser une autre étiquette de purification ne chélatant pas les métaux comme le StrepTagII pour les études de chélation.



Au cours de cette étude, nous avons été confrontés à plusieurs obstacles dont le principal était le manque de reproductibilité entre les différentes productions, et ce, notamment lors des études de phosphorylation *ex-vivo*. Cette variation inter-lot et la faible proportion de Nanofitines phosphorylées *in vivo* peuvent s'expliquer par la présence de phosphatases dans le lysat bactérien. Une manière de vérifier cette hypothèse serait de reprendre l'étude en ajoutant des inhibiteurs lors de la lyse des bactéries. Il faut également noter que la souche TOP10 utilisée est une souche d'amplification et non de production, ce qui peut expliquer le faible taux d'expression lors des études de co-expression. Pour des expériences futures, il conviendrait de tester la souche de production Ara- LM194.

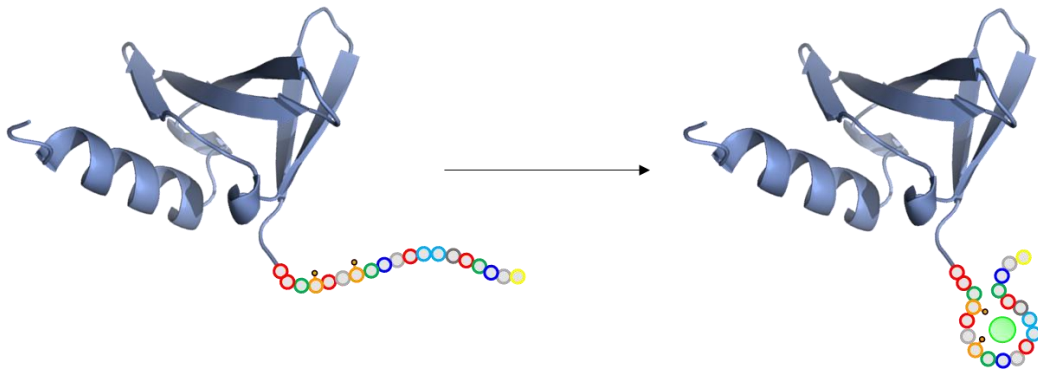
Concernant les techniques électrophorétiques de détection des protéines phosphorylées, en plus de celles basées sur les différences de pH isoélectrique, il existe une méthode, développée par Kinoshita *et al.* [164, 165], utilisant la capacité des cations comme le zinc(II) ou le manganèse(II) à se fixer aux groupements phosphate. Les cations sont couplés à un ligand nommé Phos-Tag avant polymérisation du gel de migration. En contact avec la protéine, le complexe va permettre un retard de migration plus important que lors d'un SDS-PAGE classique.



---

## MISE AU POINT D'UNE ETIQUETTE PEPTIDIQUE PHOSPHORYLABLE POUR LA CHELATION DE CATIONS TRIVALENTS

---



Les expérimentations présentées dans ce chapitre ont été réalisées avec l'aide technique d'Alain Defontaine et d'Amina Fateh. Les résultats obtenus concernant la partie terbium(III) feront l'objet d'une publication.

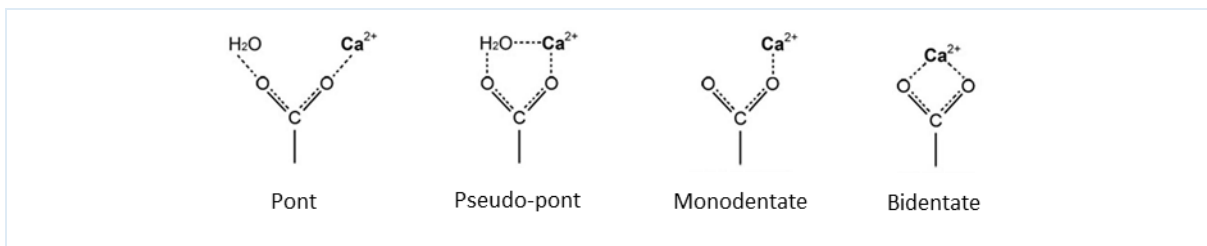


## Chapitre 3 : Mise au point d'une étiquette peptidique phosphorylable pour la chélation de cations trivalents

### 3.1. Introduction

#### 3.1.1. Chélation de métaux par des peptides ou des protéines

De nombreuses protéines présentes naturellement dans les organismes chélatent de manière spécifique les ions présents dans le compartiment sanguin et le cytoplasme des cellules. L'établissement de liaisons ion métallique-protéine est rendu possible grâce à la présence d'atomes donneurs d'électrons sur la chaîne latérale des acides aminés chargés (aspartate (Asp-), glutamate (Glu-) et cystéine déprotonée (Ser-)) et des acides aminés polaires (asparagine (Asn), glutamine (Gln) et histidine (His)) [169, 170]. Les groupements thiolates et carboxylates des résidus chargés vont permettre l'établissement d'une liaison plus forte avec les ions métalliques que les groupements hydroxyle et imidazole des acides aminés polaires [170]. Des exemples de ce types de liaisons s'établissant entre un cation, le calcium(II), et le groupement carboxylate des résidus Asp- et Glu- sont présentés en Figure 32.

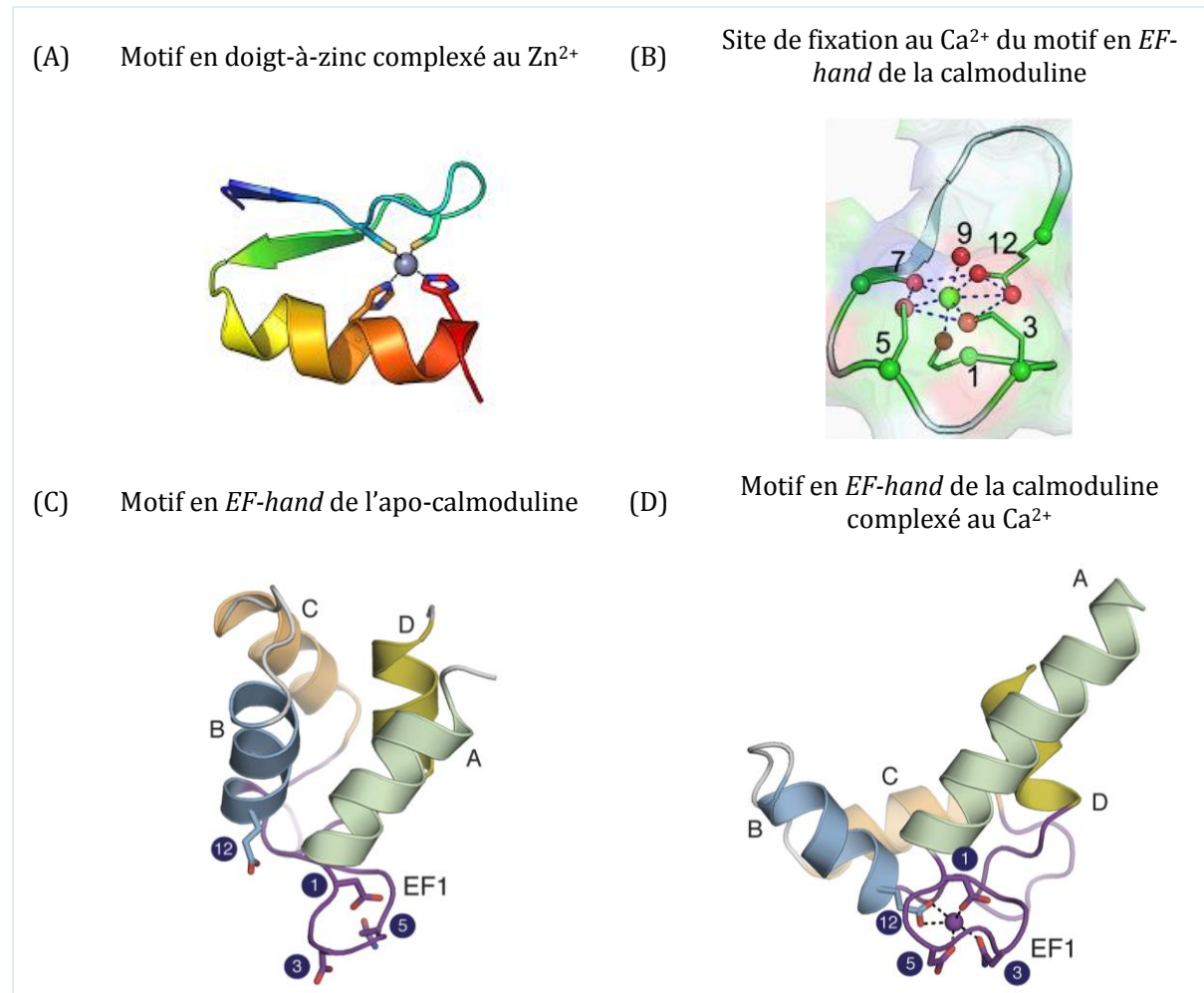


**Figure 32 : Types de liaison s'établissant entre un ion calcium(II) et le groupement carboxylate des résidus aspartate (Asp-) ou glutamate (Glu-). Figure tirée de [171].**

Parmi les domaines protéiques impliqués dans la chélation des ions métalliques, les plus étudiés sont ceux en doigt-à-zinc et en *EF-hand* (Figure 33). Le premier motif adopte une conformation en tétraèdre par établissement de quatre liaisons de coordination avec le zinc(II) ( $NC_{(Zn^{2+})} = 4-6$ <sup>(11)</sup> [172]) (Figure 33A). Le second établit sept liaisons de coordination avec un ion calcium(II) selon une configuration pentagonale bipyramidale ( $NC_{(Ca^{2+})} = 6-8$  [172]) (Figure 33B). Le motif en *EF-hand*, présent en quatre exemplaires dans la calmoduline, est composé de 12 acides

<sup>11</sup> NC : nombre de coordination qu'un ion peut établir avec un ligand. La valeur est généralement établie par études cristallographiques. Elle dépend à la fois de la charge de l'ion, de sa taille et de sa capacité à recevoir des charges, mais également du ligand (taille, charge, denticité (monodentate, bidentate, etc...)) [170].

aminés dont les résidus en position 1, 3, 5, 7, 9 et 12 participent à la formation du site de chélation [173] (Figure 33C et Figure 33D). La séquence consensus du site de chélation est constituée : de trois résidus monodentates en position 1, 3 et 5 (Asp, Asn ou Ser) ; d'un résidu bidentate en position 12 (Asp ou Glu); de la chaîne carbonyle du résidu en position 7 et d'une molécule d'eau stabilisée par le résidu en position 9 [173] (Figure 33B).



**Figure 33 : Structures des motifs en doigt à zinc et EF-hand. (A)** Motif en doigt à zinc tiré de la structure PDB 1AAY [166]. Le site de chélation au zinc(II) est constitué de deux résidus histidine et de deux résidus cystéine. **(B)** Site de chélation au calcium(II) du motif en EF-hand de la calmoduline tiré de [167]. Motif en EF-hand de la calmoduline avant **(C)** et après **(D)** chélation avec le calcium(II) tiré de [168].

### 3.1.2. Phosphorylation et chélation de métaux

Comme précisé dans le chapitre précédent, une étiquette tétra-phosphorylable *in vitro* (TagP4) par l'unité alpha de la caséine kinase humaine II (CKII $\alpha$ ) a été générée au sein du laboratoire UMR CNRS 6286. Fusionnée en C-ter de la Nanofitine anti-lysozyme H4, elle permet la fixation de la protéine sur des surfaces de phosphonate de zirconium *via* l'établissement de

liaisons fortes entre l'oxygène des groupements phosphate du TagP4 et les ions Zr(IV) [110, 129]. Des peptides synthétiques de référence reprenant la séquence du TagP4 avec différents états de phosphorylation (de 0 à 4 résidus sérine-phosphorylés) ont montré que plus le peptide était phosphorylé, plus la liaison établie avec la surface de phosphonate de zirconium semblait forte [130].

L'objectif étant de marquer de manière régiosélective les Nanofitines, nous voulons utiliser la capacité naturelle des phosphates à établir des liaisons fortes avec certains cations métalliques. Nous avons choisi d'étudier les phénomènes de chélation avec des cations comme le gallium(III) et le zirconium(IV), car ceux-ci sont couramment utilisés dans les systèmes de purification des phosphopeptides et phosphoprotéines [160, 174, 175]. De plus, les Nanofitines possèdent une demi-vie biologique inférieure à 5 minutes compatible avec la demi-vie physique du gallium-68. Afin de déterminer s'il existe un phénomène de complexation en solution entre le TagP4 et des ions métalliques, nous avons évalué la capacité du peptide à chélater un cation de la famille des lanthanides : le terbium(III). Contrairement aux cations métalliques comme le Zr(IV) ou le Ga(III), les lanthanides peuvent émettre un signal de luminescence après excitation, qui est accru en présence d'agent de chélation, permettant de suivre la complexation aux étiquettes peptidiques.

### 3.1.3. Les lanthanides

Les lanthanides ( $\text{Ln}^{3+}$ ) sont des cations trivalents représentant les éléments du bloc 4f allant du lanthane-57 au lutécium-71. Ils possèdent une structure électronique de type  $[\text{Xe}]4f^n$  ( $\text{Tb}^{3+} : [\text{Xe}]4f^9 6s^2$ ) [176]. Les  $\text{Ln}^{3+}$  ont un rayon ionique allant de 86 à 122 pm et peuvent établir entre 7 et 9 liaisons de coordination avec des atomes donneurs d'électrons comme l'oxygène ou l'azote [177]. Ces ions possèdent la particularité d'émettre de la luminescence sur un large spectre allant de l'ultraviolet ( $\text{Gd}^{3+}$ ) au proche infra-rouge ( $\text{Pr}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Ho}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$ ) en passant par le visible ( $\text{Tm}^{3+}$  (bleu),  $\text{Tb}^{3+}$  (vert),  $\text{Sm}^{3+}$  (orange),  $\text{Eu}^{3+}$  (rouge), etc.) [178]. La fixation des  $\text{Ln}^{3+}$  à des agents de chélation, comme le DOTA, va empêcher le *quenching* du lanthanide par les groupements -OH des molécules d'eau et entraîner une exaltation de la fluorescence. La luminescence obtenue est due à un transfert d'énergie intramoléculaire entre les couches électroniques *f-f* après excitation à une longueur d'onde comprise entre 320 et 440nm [176]. Le retour à l'état fondamental des  $\text{Ln}^{3+}$  excités est lent, permettant de séparer en « temps résolu » la luminescence du lanthanide de la fluorescence naturelle de l'agent de chélation [176, 179].

## 3.2. Optimisation de l’étiquette phosphorylable

### 3.2.1. Les peptides mimétiques

Afin de simuler les phénomènes de chélation que nous pourrions obtenir avec le TagP4, nous avons utilisé des peptides synthétiques de référence reprenant la séquence de l’étiquette avec différents états de phosphorylation (Tableau 6).

**Tableau 6 : Séquences des différents peptides synthétiques utilisés.**

Nom	Séquence										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>0P</b>	E	E	D	S	D	S	S	S	E	D	E
<b>1P</b>	E	E	D	E	D	D	D	pS	E	D	E
<b>2P</b>	E	E	D	pS	D	D	D	pS	E	D	E
<b>3P</b>	E	E	D	pS	D	D	pS	pS	E	D	E
<b>4P</b>	E	E	D	pS	D	pS	pS	pS	E	D	E

*0P : non-phosphorylé, 1P : mono-phosphorylé, 2P : di-phosphorylé, 3P : tri-phosphorylé, 4P : tétra-phosphorylé, pS : résidu sérine phosphorylé, D : acide aspartique, E : acide glutamique.*

#### 3.2.1.1. Détermination de la structure des peptides

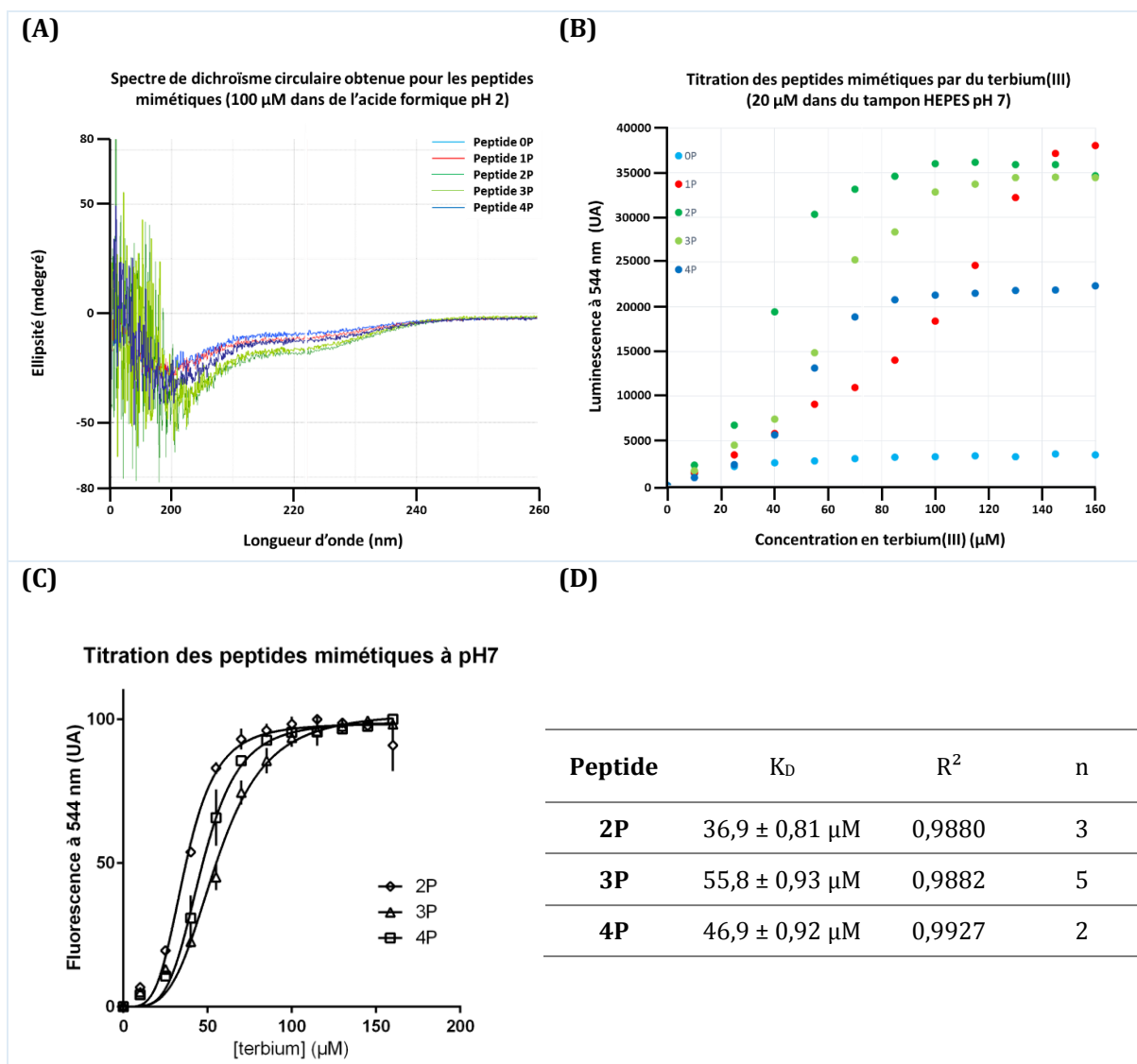
La présence des résidus sérine phosphorylés pouvant influencer sur la conformation des peptides, nous avons réalisé une étude en dichroïsme circulaire. Nous pouvons observer pour le peptide non-phosphorylé (0P), un minimum de signal aux alentours de 200 nm et une absence de dichroïsme sur le reste du spectre UV (Figure 34A). Ce type de résultat est caractéristique des peptides ne présentant pas de structure secondaire définie [169]. Les peptides mono-phosphorylé (1P) et tétra-phosphorylé (4P) présentent sensiblement les mêmes spectres que le 0P. Concernant les peptides di-phosphorylé (2P) et tri-phosphorylé (3P), nous pouvons observer une légère augmentation de la négativité de l’ellipticité vers 225 nm correspondant à la formation de structures secondaires [169]. Cette observation suggère que les peptides 2P et 3P ont une structure favorisant leur repliement et donc la chélation avec les ions.

#### 3.2.1.2. Etude de chélation avec des cations trivalents ou tétravalents

Le TagP4 permettant la fixation sur des surfaces de phosphonate de zirconium, nous avons évalué la capacité de chélation des peptides avec du Zr(IV) en solution. Les phénomènes de chélation pouvant changer la conformation des peptides, nous avons effectué une étude de titration avec du ZrOCl<sub>2</sub> suivie en dichroïsme circulaire. Nous n’avons pas observé de différence significative entre les différents spectres obtenus. Nous avons ensuite réalisé une titration en bioluminescence des peptides en présence d’une quantité croissante de Tb(III). Les premières

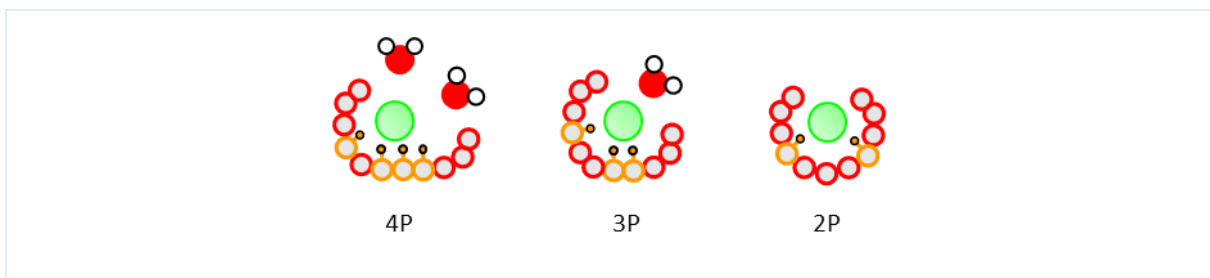


expérimentations ont été réalisées dans les conditions décrites par Tamara Cooper utilisant les longueurs d’onde d’excitation et d’émission du Tb(III) ( $\lambda_{\text{excitation}} = 345 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{émission}} = 544 \text{ nm}$ ) [180]. Le tampon choisi pour cette étude est le tampon T à pH7 contenant de l’acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique (HEPES,  $pK_{a1} \approx 3$ ,  $pK_{a2} = 7,55$ ) et présentant une faible auto-fluorescence et un faible pouvoir chélatant [182, 183].



**Figure 34 : Caractéristiques des peptides mimétiques.** En bleu ciel : peptide 0P ; en rouge : peptide 1P ; en vert foncé : peptide 2P, en vert clair : peptide 3P, en bleu foncé : peptide 4P. (A) Spectre de dichroïsme circulaire des différents peptides à 100  $\mu\text{M}$  dans de l’acide formique 10 mM pH 2 obtenus à 40°C, cuve en quartz, fente de 1 cm. (B) Titration des peptides mimétiques à 20  $\mu\text{M}$  par du Tb(III). Les courbes sont obtenues après soustraction de la fluorescence naturelle des peptides et du Tb(III) (excitation à 235nm, tampon T pH7, 30°C). (C) Lissage des courbes selon l’équation de Hill en fixant le maximum de luminescence à 100. (D) Détermination de la constante de dissociation à l’équilibre selon l’équation de Hill avec un seul site de fixation. Les résultats ont été obtenus à l’aide du logiciel Graphpad. Avec n, le nombre d’expériences réalisées.

Nous pouvons observer sur les courbes de titration (Figure 34B) que la chélation avec les peptides 2P et 3P montrent une luminescence plus importante que pour les autres peptides et notamment le peptide 4P. L’allure en sigmoïde des courbes obtenues suggère un phénomène de coopération entre les peptides en solution pour chélater le Tb(III). Si nous appliquons l’équation de Hill (Figure 34C) pour déterminer la constante de dissociation ( $K_D$ ), les valeurs obtenues sont comprises entre  $36,9 \pm 0,81 \mu\text{M}$  (2P) et  $55,8 \pm 0,93 \mu\text{M}$  (3P) (Figure 34D). Les études de dichroïsme circulaire et de titration ont montré que les peptides 2P et 3P adoptent une conformation spatiale semblant favoriser la chélation avec le Tb(III). Si l’on compare les séquences des peptides 2P, 3P et 4P, il est possible que la présence d’un résidu sérine-phosphorylé en position 6 limite le repliement du peptide 4P (Figure 35). La différence de signal entre les peptides 2P/3P et le peptide 4P pourrait être expliquée par le *quenching* de la luminescence de l’ion Tb(III) par des molécules d’eau. Il serait intéressant de garder un pas de 2 à 3 acides aminés entre les résidus sérine-phosphorylé pour favoriser le repliement du peptide et donc la chélation avec des ions trivalents.



**Figure 35 : Représentation schématique des hypothèses concernant la chélation du terbium(III) par les peptides 2P, 3P et 4P.** En vert : le Tb(III), en jaune-orangé : les résidus sérine-phosphorylé, en rouge : les résidus acide aspartique et acide glutamique. Les molécules d’eau sont représentées par l’assemblage d’une sphère rouge et de deux sphères blanches.

### 3.2.1.3. Limitations à l’utilisation des peptides

Rappelons que l’étiquette phosphorylable TagP4 a été créée pour une phosphorylation efficace par la CKII $\alpha$  afin d’immobiliser des protéines sur une surface de phosphonate de zirconium. Les surfaces de phosphonate de zirconium présentent une densité localement élevée en Zr(IV) prédisposés spatialement pour une interaction efficace avec des groupements phosphates. La chélation des ions en solution, comme le Tb(III), présente des contraintes différentes qui semblent impliquer l’intervention de plusieurs peptides pour lier les cations à l’étiquette phosphorylable (effet de coopération présenté dans la Figure 34)). Notons que pour réaliser les études de titration nous avons dû utiliser des quantités importantes en peptide (20  $\mu\text{M}$ ) pour obtenir un signal supérieur au bruit de fond. Cela est notamment dû au fait que les

peptides synthétiques utilisés ne présentent pas de résidu aromatique (Tableau 7) pouvant servir d'antenne par transfert d'électron [181] pour l'exaltation de la bioluminescence du Tb(III).

**Tableau 7 : Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission du terbium(III) et des acides aminés aromatiques.**

	<b>Terbium(III)</b>	<b>Tryptophane</b>	<b>Tyrosine</b>	<b>Phénylalanine</b>
$\lambda_{\text{excitation}}$	345 nm	280 nm	274 nm	257 nm
$\lambda_{\text{émission}}$	544 nm	348 nm	303 nm	282 nm

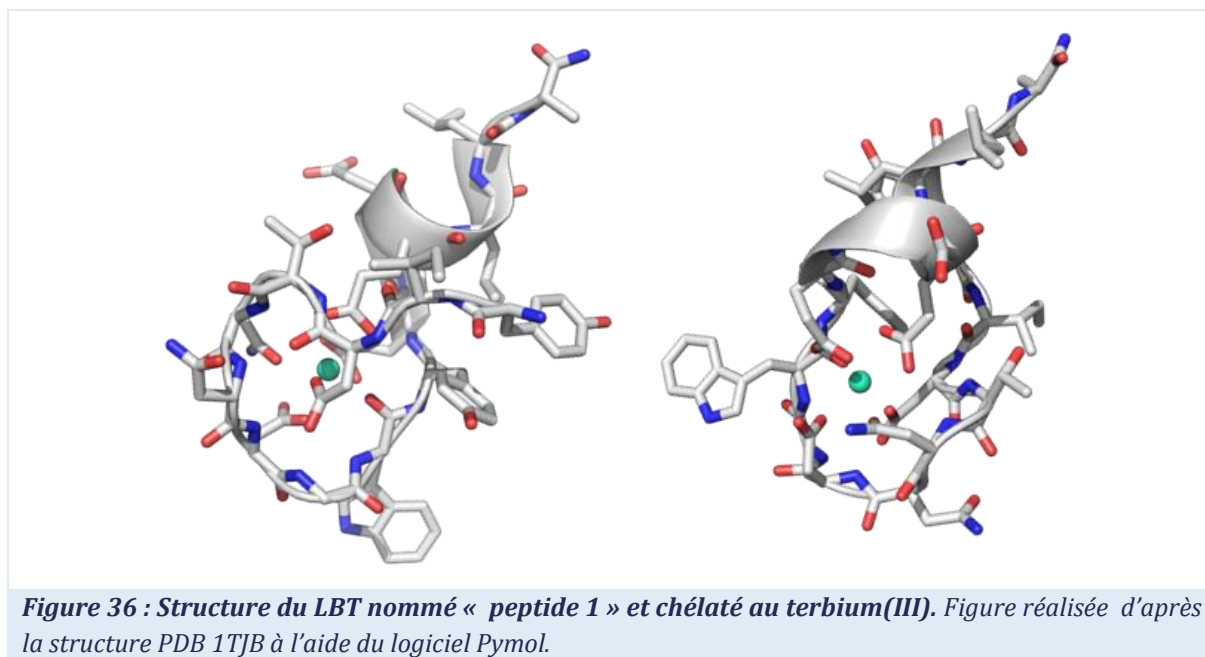
### 3.2.2. Les étiquettes de fixation aux lanthanides (LBT)

Nous avons montré dans la partie précédente grâce à des études de chélation mettant en jeu des peptides synthétiques et le Tb(III) que la séquence du TagP4 n'était pas optimale pour la chélation de cations en solution. L'introduction de résidus sérine, tyrosine ou thréonine phosphorylés permet de générer ou de modifier la capacité de certains peptides à fixer les ions métalliques [169, 192]. L'introduction d'un résidu tyrosine-phosphorylé dans la séquence d'un peptide dérivé du motif *EF-hand* a permis de convertir sa spécificité pour les lanthanides vers d'autres cations comme l'uranyle(II) [192]. Suivant la même stratégie, nous voulons optimiser une séquence de fixation déjà décrite et la rendre phosphorylable pour la chélation de Tb(III) pour ainsi permettre la chélation de cations métalliques comme le Zr(IV) ou Ga(III). Nous avons choisi de travailler avec les étiquettes de fixation aux lanthanides (*lanthanide-binding tags*, LBT).

Les LBT sont des étiquettes peptidiques de 15 à 25 acides aminés obtenues par mutagenèse dirigée du motif de fixation au calcium de l'*EF-hand*. Elles sont sélectionnées pour leur capacité à complexer en solution les lanthanides tels que le Tb(III) ou l'Eu(III) avec une affinité de l'ordre du nanomolaire [179, 184, 185, 187, 188, 189, 190, 191]. Fusionnées à des protéines, elles permettent d'étudier leur structure, leur fonction et leur dynamique par des études de spectroscopies RMN, de cristallographie par rayon X et de luminescence [184].

Le site de chélation des LBT est constitué de deux résidus acide aspartique (Asp, D) monodentates en position 4 et 8, ainsi que de deux résidus acide glutamique (Glu, E) bidentates en position 12 et 15 (Figure 36). Le repliement du LBT et la formation de la cage sont assurés par la présence d'acides aminés hydrophobes en positions 2, 11 et 16 [187, 189, 190] et de résidus glycine (Gly, G) en position 9 et 13. La structure indole de la chaîne latérale du tryptophane (Trp, W) en position 10 et le cycle aromatique de la tyrosine (Tyr, Y) en position 11 font de ces résidus de bons électrons pi-donneur [184] permettant de visualiser la chélation en servant d'antenne. L'excitation à une longueur d'onde de 280 nm permet le transfert d'énergie entre le tryptophane

et le Tb(III) et offre ainsi une luminescence optimale permettant la visualisation de la chélation [179, 185, 187].



De nombreuses mutations du LBT « peptide 1 » ont été réalisées afin d'augmenter son affinité pour le Tb(III) (Tableau 8). Langdon J. Martin [190] a montré que l'on pouvait muter le résidu Asp14 en glycine, proline, sérine ou asparagine sans affecter de manière significative la capacité de fixation aux lanthanides. De la même manière, le résidu asparagine (Asn, N) en position 7 peut être muté en alanine, acide aspartique, acide glutamique ou glycine. Le résidu Tyr11 a été muté en isoleucine et le résidu Leu17 en tyrosine augmentant ainsi l'affinité pour le Tb(III) d'un facteur 1,5 ( $K_D$ (peptide1) = 57 nM,  $K_D$ (sLBT2) = 38 nM). La perte du cycle aromatique provoque la diminution de la fluorescence [189] qui est toutefois rétablie par mutation de la Tyr2 en phénylalanine avec une augmentation concomitante de l'affinité pour le Tb(III) ( $K_D$ (sLBT3) = 18 nM) [189].

**Tableau 8 : Séquences des différentes étiquettes générées par l'équipe d'Imperiali.**

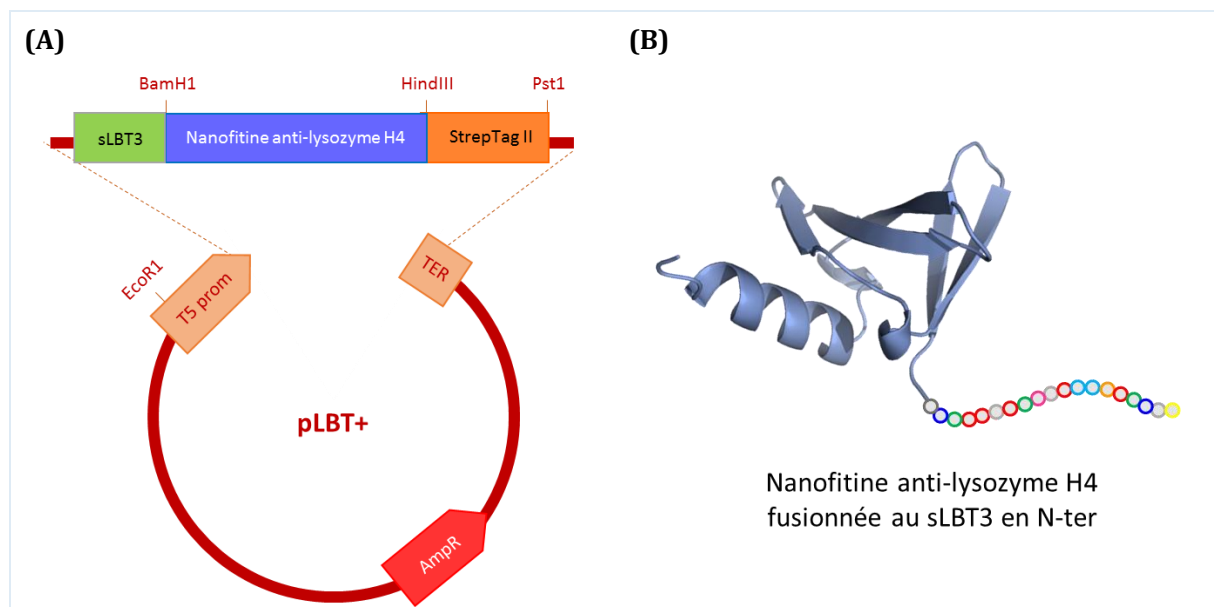
Nom	Séquence de l'étiquette																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<b>Peptide 1</b>	G	Y	I	D	T	N	N	D	G	W	Y	E	G	D	E	L	L	A
<b>sLBT2</b>	G	Y	I	D	T	N	N	D	G	W	I	E	G	D	E	L	Y	A
<b>sLBT3</b>	G	F	I	D	T	N	N	D	G	W	I	E	G	D	E	L	Y	A

Les résidus impliqués dans le repliement et/ou la chélation des lanthanides et/ou l'émission du signal en luminescence sont mis en couleur. En blanc : Les résidus pouvant être mutés. F : résidu phénylalanine (Phe), I : résidu isoleucine (Ile), T : résidu thréonine (Thr), L : résidu leucine (Leu), A : résidu alanine (Ala).

### 3.3. Etudes de la phosphorylation des étiquettes peptidiques LBT

#### 3.3.1. Génération de Nanofitine fusionnée aux LBT

Nous avons choisi de travailler à partir de la séquence du sLBT3 [189, 193] afin de la rendre phosphorylable et permettre la chélation de radiométaux (Tableau 8). Le sLBT3 est une étiquette *cysteine-free* possédant une affinité de 18 nM pour le Tb(III) lorsqu'elle est sous forme de peptide en solution, et de 2,4 nM (premier site) et 23 nM (deuxième site) lorsque deux copies du tag sont fusionnées génétiquement à l'ubiquitine [189]. Afin de faciliter les manipulations, nous avons choisi de fusionner génétiquement cette étiquette à la Nanofitine anti-lysozyme H4. La protéine choisie possède un taux de production élevé, ainsi qu'une forte stabilité thermique et chimique. L'utilisation de la H4 permet la mise au point des conditions expérimentales pour la chélation des cations à pH acide.



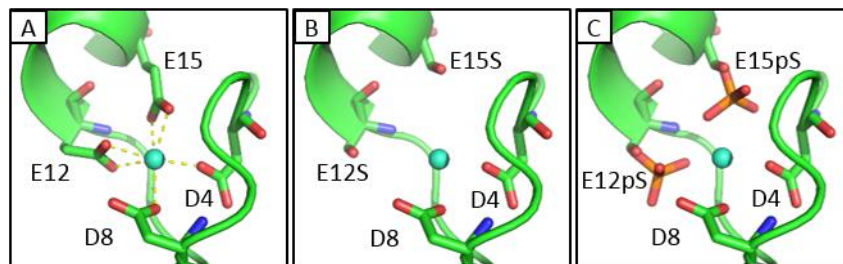
**Figure 37 : Expression de la protéine LBT+.** (A) Schéma du vecteur pLBT+ permettant l'expression de la protéine LBT+. (B) Représentation de la Nanofitine anti-lysozyme H4 fusionnée au sLBT3 à l'extrémité N-terminale (LBT+). Figure obtenue à partir de la structure PDB 1AZT de la protéine Sac7d. Les acides aminés correspondants à l'étiquette sLBT3 en N-ter sont représentés par des cercles de couleur. En gris foncé : résidu Ala, en bleu moyen : résidus Tyr ou Phe, en vert : résidus Leu ou Ile, en rouge : résidus Asp ou Glu, gris clair : résidus Gly, en rose : résidu Trp, en cyan : résidu Asn, en jaune : résidu Met, en jaune-orangé : résidu Thr.

Pour se faire, nous avons généré un vecteur dérivé du pQE30 permettant l'expression de la H4 sous la forme d'une double protéine de fusion avec la séquence du sLBT3 à l'extrémité N-terminale (N-ter) et l'étiquette de purification StrepTagII en C-ter (Figure 37). Cette séquence permet de s'affranchir de l'étiquette poly-histidine classiquement utilisée pour la purification de protéines pouvant intervenir dans les phénomènes de chélation (voir partie 2.5). La protéine

résultante est nommée LBT+ <sup>(12)</sup>. Afin d'avoir un témoin négatif lors des études de titration, nous avons produit la H4 fusionnée uniquement avec le StrepTagII en C-ter. La protéine obtenue est nommée LBT-.

### 3.3.2. Insertion de résidus phosphorylables dans le site de chélation d'un LBT

Les étiquettes de fixation aux lanthanides reprenant la séquence de l'*EF-Hand*, leur site de chélation est constitué des résidus acide aspartique (D, Asp) en positions 4 et 8, ainsi que des résidus acide glutamique (E, Glu) en positions 12 et 15 (Figure 38A). Les résidus Asp jouant le rôle d'agent de chélation monodentate et les résidus Glu d'agent de chélation bidentate [189]. Nous avons fait l'hypothèse que la substitution des deux résidus Glu par des résidus sérine phosphorylés (pSer, pS) permettrait de restaurer un encombrement similaire pour la complexation de cations métalliques (Figure 38C), tout en renforçant l'affinité pour les ions Zr(IV) et Ga(III). A l'instar des résidus Glu, les groupements phosphate, entre pH 2 et pH 7, peuvent établir deux liaisons avec les cations par la présence de deux oxygènes se partageant une charge négative (le troisième étant protoné).



**Figure 38 : Substitution des résidus acide glutamique par des résidus sérine-phosphorylés. (A)** Site de chélation du peptide 1 d'après la structure cristallographique PDB 1TJB. Les liaisons établies entre le Tb(III) (en cyan) et les oxygène (en rouge) des résidus acides aspartique et glutamique sont signalés en jaune. **(B)** Substitution des résidus acide glutamique en positions 12 et 15 par des résidus sérine. **(C)** Phosphorylation des résidus sérine. Modèles obtenus par modification de la structure PDB 1TJB à l'aide du logiciel Pymol.

Pour la phosphorylation *in vitro* des résidus sérine (Ser, S) en positions 12 et 15, nous avons travaillé avec la sous-unité catalytique  $\alpha$  de la caséine kinase II (CKII $\alpha$ ). La séquence consensus de la CKII $\alpha$ , déterminée par Meggio *et al.* [194] préconise la présence en +3 d'un résidu acide (D/E/pS/phospho-tyrosine/phospho-thréonine) ainsi que l'absence d'acide aminé basique

<sup>12</sup> L'ensemble des séquences protéiques est données dans le Matériel et Méthodes.

(histidine/lysine/arginine) entre les sites -1 et +4. Considérant l’introduction des résidus sérine en positions 12 et 15, il conviendra donc de muter le résidu Ala18 en acide aspartique afin de favoriser la phosphorylation du résidu Ser15. La phosphorylation du premier résidu permettra de créer l’environnement favorable à la phosphorylation du résidu Ser12. Le résidu Thr5 pouvant présenter un site de phosphorylation potentiel non désiré, nous avons choisi de rendre silencieuse cette position en le mutant en alanine. Nous avons ensuite généré le mutant LBT2-2S possédant les deux résidus sérine en positions 12 et 15 (Tableau 9).

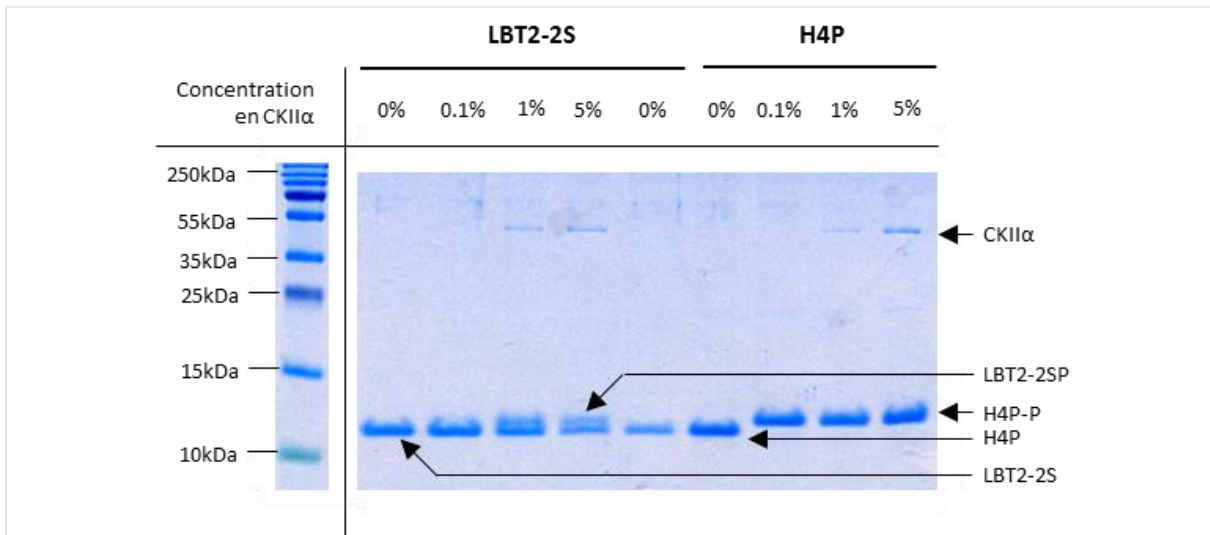
**Tableau 9 : Première génération de mutants par mutagenèse dirigée pour la phosphorylation de l’étiquette LBT.**

Nom	Séquence de l’étiquette																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<b>LBT+</b>	G	F	I	D	T	N	N	D	G	W	I	E	G	D	E	L	Y	A
<b>LBT1</b>	G	F	I	D	T	N	N	D	G	W	I	E	G	D	E	L	Y	E
<b>LBT2</b>	G	F	I	D	A	N	N	D	G	W	I	E	G	D	E	L	Y	E
<b>LBT2-2S</b>	G	F	I	D	A	N	N	D	G	W	I	S	G	D	S	L	Y	E

*LBT+ : Nanofitine anti-lysozyme H4 fusionnée génétiquement à l’étiquette peptidique sLBT3+, LBT1 : mutant LBT+ A18E, LBT2 : mutant LBT1 T5A, LBT2-2S : mutant LBT2 E12S/E15S.*

La phosphorylation *in vitro* du mutant LBT2-2S a ensuite été testée en présence d’une quantité variable de kinase (Figure 39). Nous pouvons observer, par retard de migration, sur un gel polyacrylamide 17% en présence de SDS que la phosphorylation de la protéine témoin H4P a lieu dès 0,1% en CKII $\alpha$ . La présence de deux bandes pour la protéine LBT-2S semble indiquer une phosphorylation incomplète de l’étiquette.





**Figure 39 : Phosphorylation in vitro des protéines H4P et LBT2-2S avec différentes concentration en CKII $\alpha$ .** SDS-PAGE 17%. Dépôt des échantillons (2  $\mu$ g) directement après phosphorylation des fractions purifiées sur résine Ni(II)-NTA ou Streptactin. Nous avons choisi comme témoin de phosphorylation la protéine H4P décrite dans le chapitre précédent. Pour la suite des expériences, la concentration en CKII $\alpha$  a été fixée à 1%.

### 3.3.3. Optimisation de la phosphorylation des résidus sérine

#### 3.3.3.1. Génération des mutants LBT3 et LBT4

La phosphorylation du mutant LBT2-2S semblant être incomplète, nous avons cherché à améliorer la séquence de l'étiquette pour la rendre phosphorylable. Nous avons donc analysé les différentes séquences reconnues par la CKII $\alpha$  et mis en relief quatre séquences pouvant se rapprocher de celle du sLBT3 fusionnée à la Nanofitine H4, celles des protéines Myf-5 [194], nm HC Myosin B [194], Cam1P [192] et C1R [194].

En comparant les séquences de la Myf-5 et de la nm HC Myosine B avec celle du LBT2-2S (Tableau 10), nous avons pu remarquer que les motifs phosphorylés par la CKII $\alpha$  étaient nettement chargés négativement (présence de résidus S, E et D) favorisant la phosphorylation du résidu sérine. Meggio *et al.* ont déterminé que la probabilité de phosphorylation d'une sérine était plus grande lorsqu'un résidu acide aspartique ou glutamique était présent en position +1 et/ou +2 [194]. Afin d'augmenter l'environnement acide autour de la Ser15, nous avons muté le résidu Tyr18 (en +2 de la sérine) en acide aspartique. Nous avons ainsi généré les mutants LBT3 et LBT3-2S possédant respectivement les résidus Glu12/Glu15/Asp18 et Ser12/Ser15/Asp18 à partir des vecteurs pLBT2 et pLBT2-2S.



**Tableau 10 : séquences compatibles avec la phosphorylation de la deuxième sérine.**

	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7
<b>LBT2-2S</b>	I	S	G	D	S	L	Y	E	G	S	V	K
<b>Myf-5</b>	R	Y	I	E	S	L	Q	E	L	L	R	
<b>nm HC Myosine B</b>	L	E	G	A	S	L	E	L	S	D	D	

De la même façon nous avons travaillé sur l’environnement du résidu Ser12. En comparant les séquences des protéines LBT3-2S, Cam1P et C1R (Tableau 11), nous avons pu observer que si nous voulions avoir un résidu antenne en -2, il était préférable d’insérer un résidu tyrosine plutôt qu’un tryptophane. Nous avons donc muté le résidu Trp10 en tyrosine.

**Tableau 11 : séquences compatibles avec la phosphorylation de la première sérine.**

	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6
<b>LBT3-2S</b>	D	A	N	N	D	G	W	I	S	G	D	S	L	D	E
<b>Cam1P</b>	D	K	D	G	D	G	Y	I	T	A	A	E			
<b>C1R</b>					S	G	Y	I	S	S	L	E	Y	P	S

Nous avons ainsi généré les mutants LBT4 et LBT4-2S possédant respectivement les résidus Tyr10/Glu12/Glu15 et Tyr10/Ser12/Ser15 à partir des vecteurs pLBT3 et pLBT3-2S (Tableau 12).

**Tableau 12 : Deuxième génération de mutants pour la phosphorylation de l’étiquette LBT.**

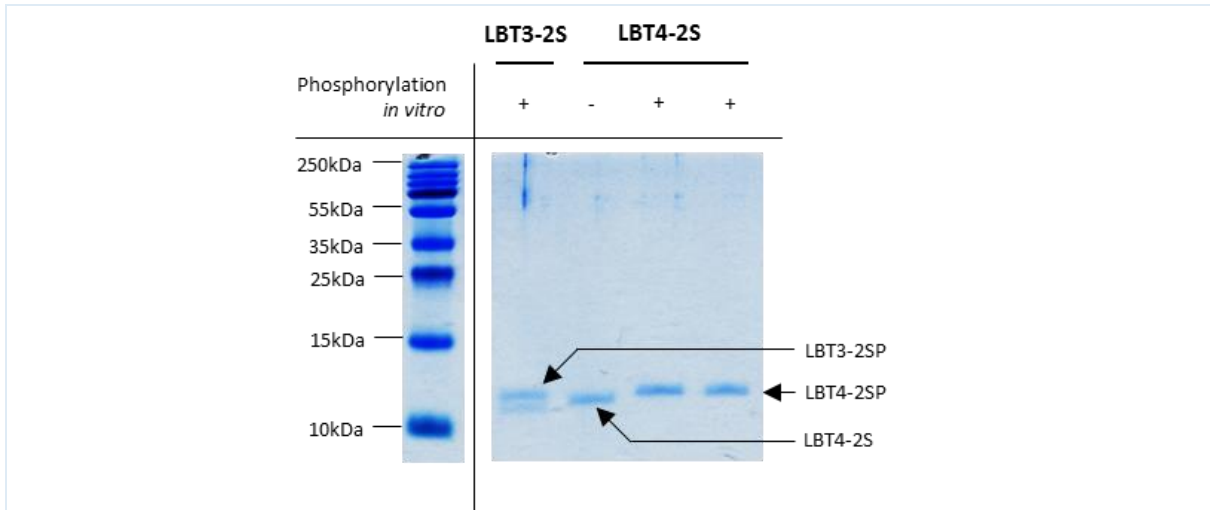
Nom	Séquence de l’étiquette																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<b>LBT3</b>	G	F	I	D	A	N	N	D	G	W	I	E	G	D	E	L	D	E
<b>LBT4</b>	G	F	I	D	A	N	N	D	G	Y	I	E	G	D	E	L	D	E
<b>LBT3-2S</b>	G	F	I	D	A	N	N	D	G	W	I	S	G	D	S	L	D	E
<b>LBT4-2S</b>	G	F	I	D	A	N	N	D	G	Y	I	S	G	D	S	L	D	E

*LBT3 : mutant LBT2 Y17D, LBT4 : mutant LBT3 W10Y, LBT3-2S : mutant LBT2-2S Y17D, LBT4-2S : mutant LBT3-2S W10Y.*

### 3.3.3.2. Phosphorylation des mutants

Nous avons évalué en SDS-PAGE la capacité des mutants à être phosphorylés *in vitro*. Nous observons pour le mutant LBT3-2S la présence de deux bandes suggérant que la phosphorylation est incomplète. Concernant le mutant LBT4-2S, le suivi de phosphorylation montre la disparition de la bande correspondant à la protéine non phosphorylée au profit de l’apparition d’une bande à

migration retardée. Cela laisse supposer que la phosphorylation est complète (Figure 40). Cette observation a ensuite été confirmée par électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant de l’urée et du triton-X (NUT-PAGE) (Figure 41B).



**Figure 40 : Phosphorylation *in vitro* des mutants LBT3-2S et LBT4-2S. SDS-PAGE 17%. Dépôts de 2 µg de protéines obtenues à partir du mélange réactionnel après phosphorylation des fractions purifiées sur résine Streptactin.**

### 3.3.3.3. Monophosphorylation de l’étiquette LBT (LBT5)

Afin de déterminer si la présence d’un seul résidu sérine phosphorylé est suffisante pour la chélation avec le Tb(III), nous avons créé le mutant LBT5-1S possédant uniquement le site de phosphorylation concernant le résidu sérine en position 12 (Tableau 13).

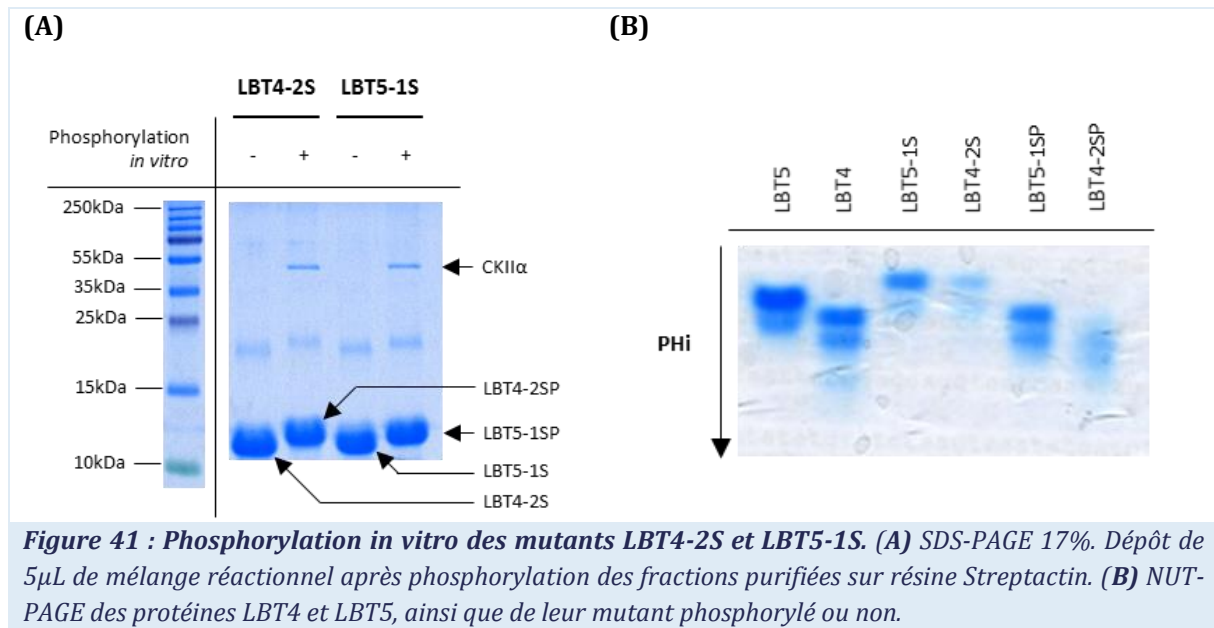
**Tableau 13 : Troisième génération de mutants pour la phosphorylation de l’étiquette LBT.**

Nom	Séquence de l’étiquette																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<b>LBT5</b>	G	F	I	D	A	N	N	D	G	Y	I	E	G	D	E	L	Y	E
<b>LBT5-1S</b>	G	F	I	D	A	N	N	D	G	Y	I	S	G	D	E	L	Y	E

*LBT5* : mutant LBT2 W10Y, *LBT-1SP* : mutant LBT5 E12S.

La phosphorylation *in vitro* de la protéine a été évaluée en SDS-PAGE et NUT-PAGE (Figure 41). Le décalage de la bande en SDS-PAGE valide la phosphorylation du mutant LBT5-1S. Le décalage ayant lieu dès la première phosphorylation, nous ne savons pas si le mutant LBT4-2S est mono- ou di-phosphorylé (partie 2.4.1). En NUT-PAGE, les protéines non-phosphorylées LBT5-1S et LBT4-2S ont le même temps de migration. Lorsqu’elles sont phosphorylées *in vitro*, nous

observons un décalage plus important pour la protéine LBT4-2SP suggérant que celle-ci est di-phosphorylée.



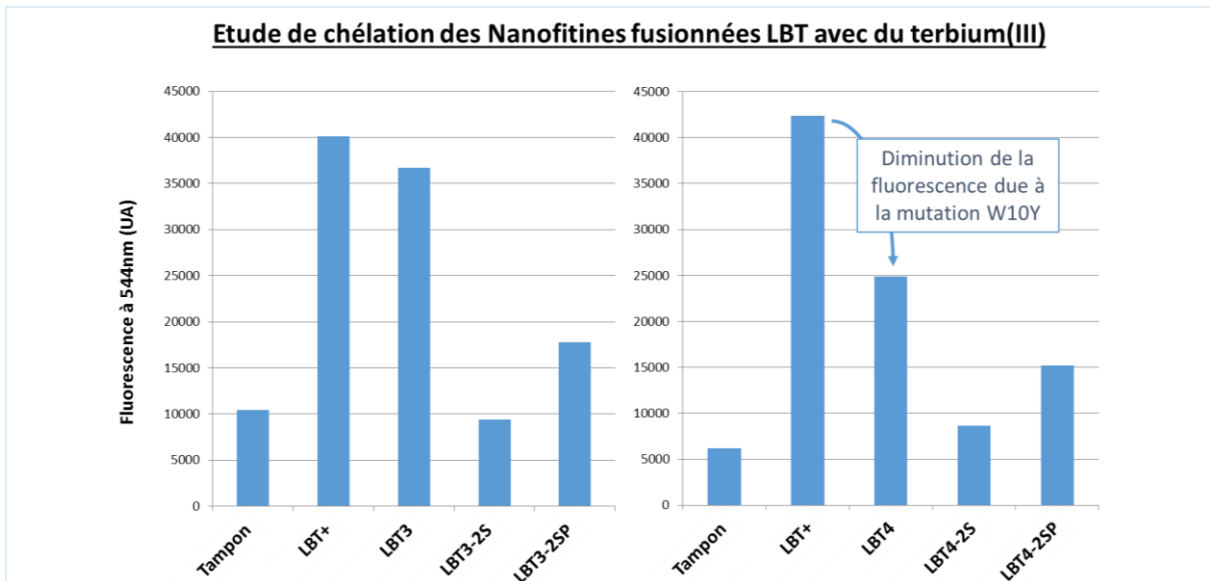
**Figure 41 : Phosphorylation in vitro des mutants LBT4-2S et LBT5-1S. (A) SDS-PAGE 17%. Dépôt de 5 $\mu$ L de mélange réactionnel après phosphorylation des fractions purifiées sur résine Streptactin. (B) NUT-PAGE des protéines LBT4 et LBT5, ainsi que de leur mutant phosphorylé ou non.**

### 3.4. Etudes de complexation des LBT modifiés avec des cations

#### 3.4.1. Complexation avec un lanthanide

##### 3.4.1.1. Chélation des Nanofitines fusionnées LBT par du terbium(III)

Dans un premier temps, nous avons voulu nous assurer, de manière qualitative, que l’introduction des mutations n’était pas délétère vis-à-vis de la capacité de chélation du LBT. Nous avons incubé les différentes protéines avec deux équivalents de Tb(III) (Figure 42). La diminution du signal entre les protéines LBT+ et LBT4 peut s’expliquer par le fait que nous avons muté le Trp10 en tyrosine. La structure indole de la chaîne latérale du tryptophane permet d’exciter un plus grand nombre d’électrons que le cycle aromatique de la tyrosine. Le résidu tryptophane a donc un meilleur rôle d’antenne que le résidu tyrosine. Nous pouvons observer pour les protéines LBT3-2S et LBT4-2S une fluorescence du même ordre que celle du tampon, montrant ainsi qu’il y a perte de la capacité de chélation entre les protéines et le lanthanide lorsque les résidus acide glutamique sont mutés en sérine.

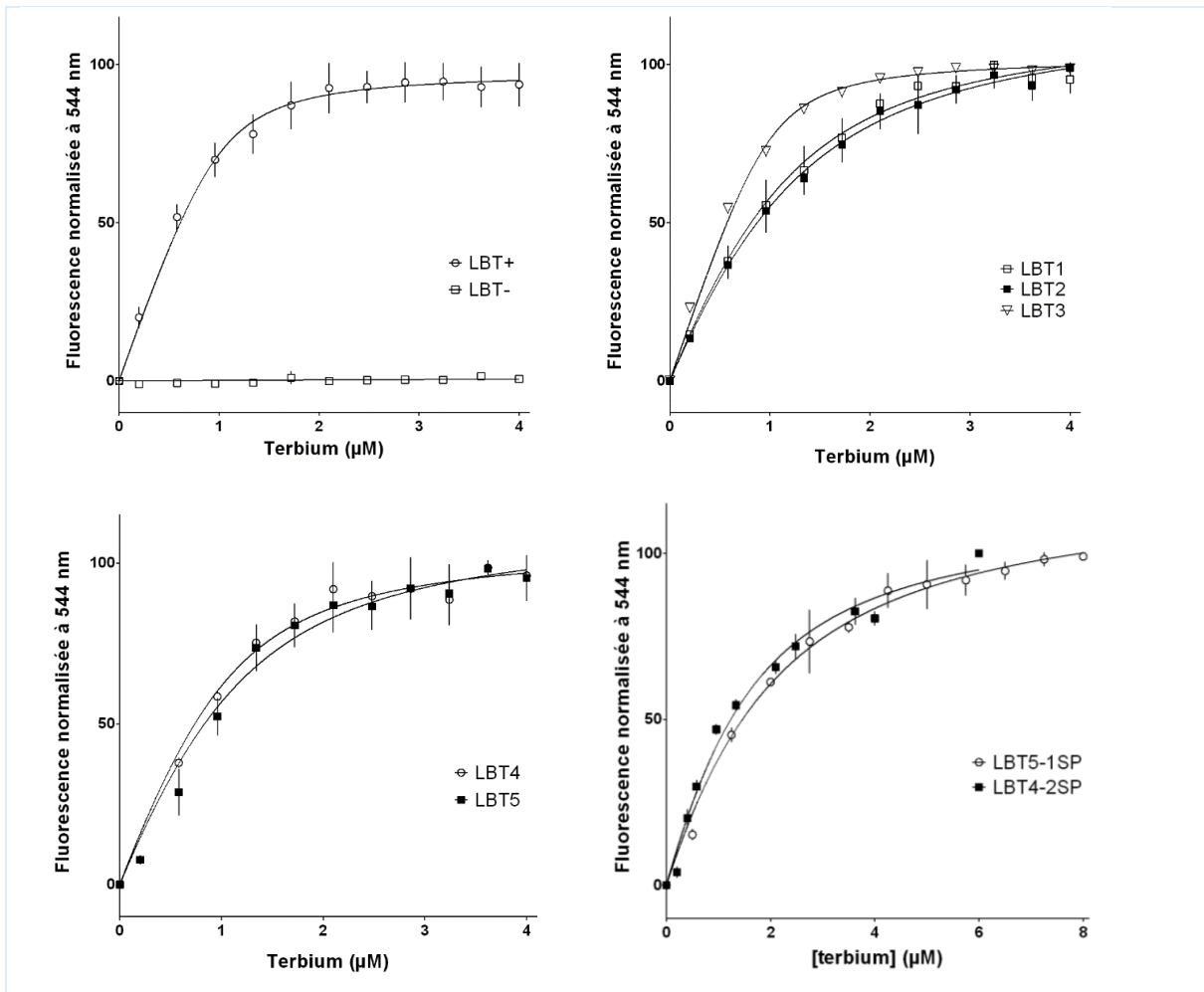


**Figure 42 : Etude de chélation des Nanofitines fusionnées LBT avec du terbium(III).** Les échantillons (500 nM) sont mis en présence de TbCl<sub>3</sub> (1 μM). Les mesures ont été réalisées dans du tampon T pH7. Ces mesures ont été réalisées une fois.

Malgré une phosphorylation incomplète (Figure 40), le mutant LBT3-2SP montre une augmentation de la luminescence comparée à celle observée pour le mutant non-phosphorylé. Le résultat obtenu suggère qu'il y a chélation du Tb(III) par la protéine phosphorylée. Concernant le mutant phosphorylé LBT4-2SP, nous observons également une augmentation du signal lorsque celui-ci est mis en contact avec du Tb(III). Cependant, bien que supérieur à celui observé pour le mutant LBT3-2SP, le signal reste inférieur à celui observé pour le mutant LBT4. Le mutant ayant une phosphorylation complète, la présence de résidus phosphorylés semble diminuer l'affinité pour le Tb(III) à pH7.

#### 3.4.1.2. Titration des Nanofitines fusionnées LBT par du terbium(III)

Nous avons réalisé une étude de titration avec du Tb(III) en exposant le mélange réactionnel à la longueur d'onde de  $280 \pm 10$  nm, permettant d'exciter à la fois les résidus tryptophane ( $\lambda_{\text{excitation}} = 280$  nm) et tyrosine ( $\lambda_{\text{excitation}} = 274$  nm) [180, 190]. Par effet antenne, le lanthanide permet de visualiser la chélation et de déterminer les différentes constantes de dissociation à l'équilibre ( $K_D$ ) associées aux protéines H4 fusionnées aux étiquettes LBT mutées (Figure 43).



Protéine	Séquence	$K_D$	$R^2$	n
LBT+	G F I D T N N D G W I E G D E L Y A	$99 \pm 26$ nM	0,9693	4
LBT1	G F I D T N N D G W I E G D E L Y E	$494 \pm 79$ nM	0,9817	3
LBT2	G F I D A N N D G W I E G D E L Y E	$607 \pm 93$ nM	0,9823	3
LBT3	G F I D A N N D G W I E G D E L D E	$87 \pm 11$ nM	0,9953	3
LBT4	G F I D A N N D G Y I E G D E L D E	$303 \pm 61$ nM	0,9768	3
LBT5	G F I D A N N D G Y I E G D E L Y E	$499 \pm 127$ nM	0,9584	3
LBT5-1SP	G F I D A N N D G Y I p S G D E L Y E	$1,49 \pm 0,15$ μM	0,9813	4
LBT4-2SP	G F I D A N N D G Y I p S G D p S L D E	$1,02 \pm 0,12$ μM	0,9834	4

**Figure 43 : Courbes de titration et constantes de dissociation pour le terbium(III) à pH7 des différentes Nanofitines anti-lysozyme H4 fusionnées aux LBT.** Les mesures ont été réalisées dans du tampon T à pH7 avec une concentration en protéine fixée à 1μM et une concentration croissante en TbCl<sub>3</sub>. Afin de faciliter l'interprétation des résultats, le maximum de fluorescence pour les protéines titrées avec du Tb(III) a été fixé à 100. Les résultats ont été obtenus à l'aide du logiciel GraphPad (voir équation [186] dans la partie Matériel et méthodes).

En comparant les  $K_D$  des protéines LBT+, LBT1 et LBT2, nous pouvons observer que l’affinité pour le Tb(III) est divisée par cinq pour le LBT1 et par six pour le LBT2 par rapport au LBT+. Il semblerait que les résidus Ala18 et Tyr5 participent à la chélation entre les protéines et le Tb(III), en améliorant la géométrie du site de fixation, certainement lors de la formation du cœur hydrophobe. La mutation du résidu Tyr17 en acide glutamique semble favoriser la chélation du Tb(III). Le tryptophane en position 10 jouant un rôle dans l’ancrage du Tb(III) dans le site de chélation des LBT [187, 189], il est alors possible que sa mutation en tyrosine modifie l’affinité du LBT4 pour le Tb(III). Nous pouvons observer pour cette protéine une diminution du  $K_D$  d’un facteur 3,5 entre le LBT3 et le LBT4. Le rétablissement du résidu tyrosine en position 17 divise par 5 l’affinité pour le lanthanide entre le LBT2 et le LBT5, confirmant le fait que l’acide glutamique inséré en position 17 favorise la chélation du Tb(III).

### 3.4.2. Complexation avec des cations métalliques

Il a été montré avec le « Peptide 1 »<sup>[13]</sup> que plus le rayon ionique du lanthanide est petit, plus l’affinité est importante ( $K_D[\text{La}^{3+}] = 4 \mu\text{M}$  (103,2 pm) ;  $K_D[\text{Tb}^{3+}] = 57 \text{ nM}$  (92 pm)) [185, 188]. Etant donné que le Ga(III) et le Zr(IV) possèdent respectivement un rayon ionique de 62 pm et de 74 pm, il est possible que l’affinité pour ces ions soit plus importante que pour le Tb(III) qui possède en rayon ionique de 92 pm (Tableau 14).

**Tableau 14 : Paramètres physicochimiques du gallium(III), du zirconium(IV) et du terbium(III), et constantes de stabilité pour le NTA.**

	<b>Rayon ionique (pm)</b>	<b>Nombre de liaison de coordination avec l’eau</b>	<b>Constante de stabilité pour le NTA (<math>\log_{K_{ML}}</math>)</b>	<b>Réf.</b>
<b>Ga(III)</b>	62	6	13,60	33, 151, 154
<b>Zr(IV)</b>	74	8	20,80	33, 154, 155
<b>Tb(III)</b>	92	8	11,25	156

Avec  $K_{ML} = [ML] / [M].[L] = 1/K_D$  (M : métal, L : ligand).

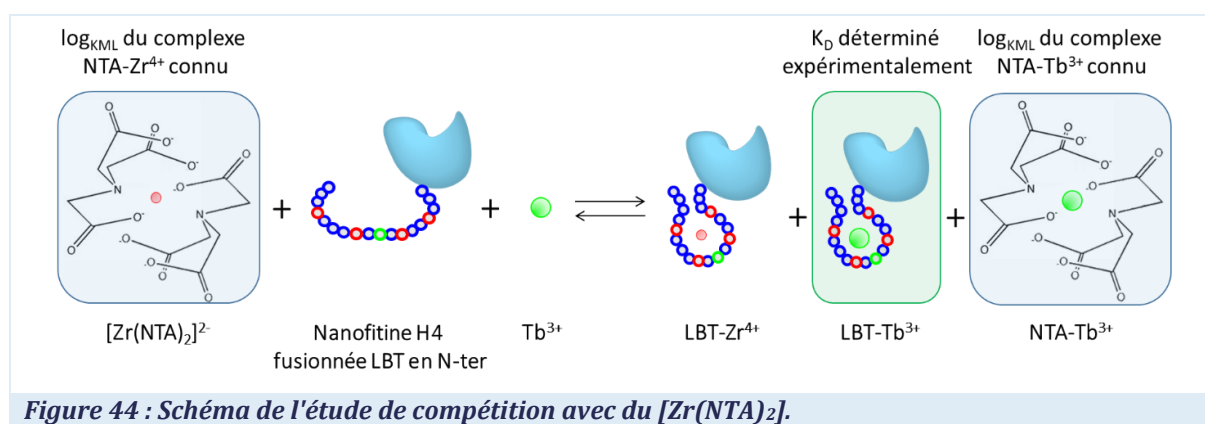
Afin de déterminer si les différentes mutations appliquées à la séquence du LBT+ ont un impact sur la chélation des cations métalliques, nous avons réalisé des études de compétition en complexant au préalable les protéines avec du Zr(IV) ou le Ga(III), puis en titrant le complexe obtenu avec du Tb(III). Si l’affinité pour ces cations est plus importante que le lanthanide pour

<sup>13</sup> Le « Peptide 1 » correspond au LBT dont la structure cristallographique est présentée dans la Figure 36 et la séquence dans le Tableau 8.

l'étiquette peptidique, il y aura une diminution de la luminescence comparée à celle obtenue pour le Tb(III).

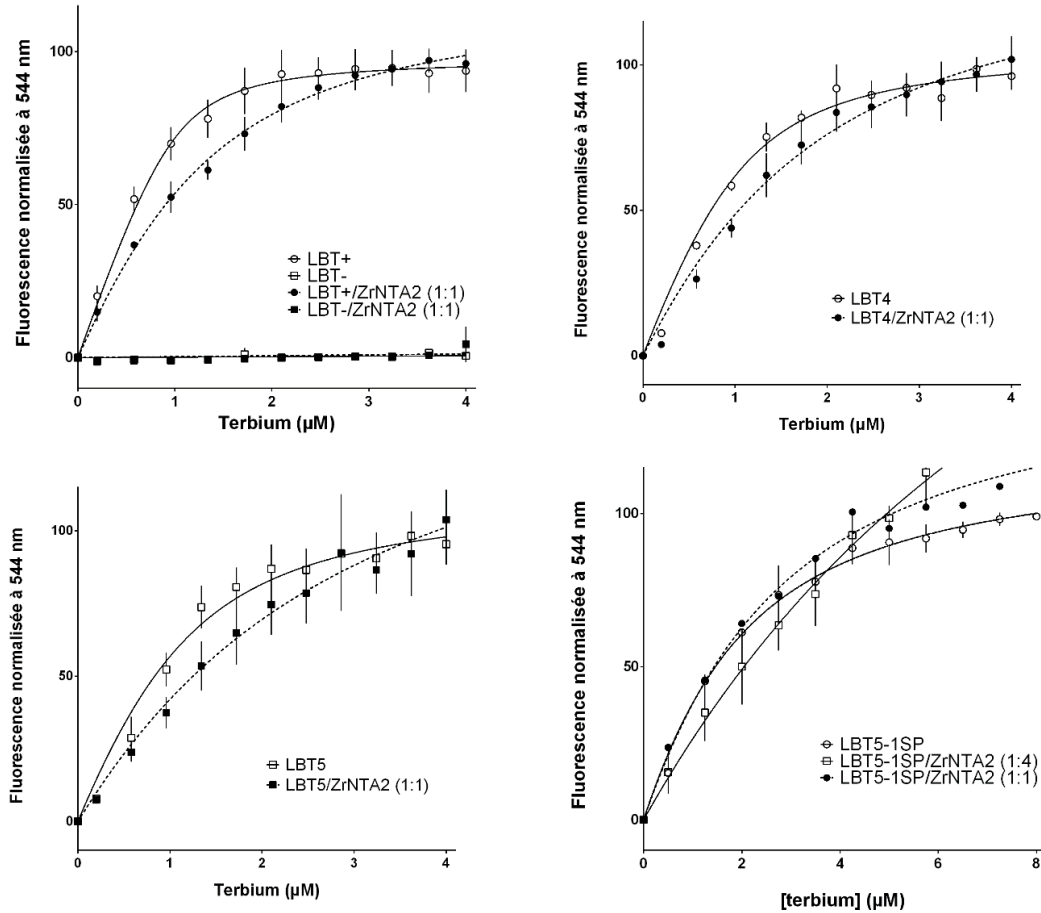
### 3.4.2.1. Compétition entre le terbium(III) et le zirconium(IV)

Le Zr(IV) est soluble sur une gamme de pH  $\in [1,0 ; 3,0[$ . En dehors de ces pH, il se complexe à des entités  $\text{OH}^-$  et précipite sous forme d'hydrocolloïdes  $\text{Zr}(\text{OH})_4$  [195]. En dessous de pH 3, les résidus acide aspartique ( $\text{pK}_a = 3,9$ ) et glutamique ( $\text{pK}_a = 4,2$ ) sont sous forme protonée, la chélation avec les ions métalliques sera donc plus forte. De plus, si nous voulons comparer la chélation des protéines avec le Tb(III) et les autres cations, il est plus intéressant de rester dans les conditions expérimentales optimales développées par Langdon J. Martin. Un moyen de stabiliser le Zr(IV) à pH 7 est de le complexer à un agent de chélation comme le NTA (Figure 44).



Nous avons alors synthétisé le complexe  $[\text{Zr}(\text{NTA})_2]$  selon le protocole développé par Larsen et Adams [196]. Après avoir mis en contact de manière équimolaire les protéines fusionnées avec une solution de  $[\text{Zr}(\text{NTA})_2]$ , nous avons titré le mélange réactionnel avec une quantité variable de Tb(III). Les résultats obtenus pour les protéines LBT-, LBT+, LBT4, LBT5 et LBT5-1SP sont présentés sous forme de courbes dans la Figure 45.

En comparant les courbes obtenues pour l'ensemble des LBT lors des études de titration et de compétition, nous pouvons observer une diminution de l'affinité apparente de la protéine pour le Tb(III) en présence de  $\text{Zr}(\text{NTA})_2$ . Cette observation laisse supposer qu'il y a bien chélation entre le LBT et le Zr(IV), mais que l'équilibre est déplacé lorsque des concentrations plus importantes en Tb(III) sont ajoutées. Concernant le témoin négatif, le LBT-, les études de titration et de compétition présentent le même profil. Cette observation montre que s'il existe un effet de trans-chélation entre le Tb(III) et le Zr(IV), vis-à-vis du NTA, celui-ci n'est pas visible lorsque l'on excite le mélange réactionnel à 280 nm.



Protéine (1 μM)	Terbium(III) seul		Compétition avec du [Zr(NTA) <sub>2</sub> ]		
	K <sub>D</sub>		K <sub>D</sub>	R <sup>2</sup>	n
<b>LBT+</b>	99 ± 26 nM		682 ± 79 nM (1:1)	0,9858	3
<b>LBT1</b>	494 ± 79 nM		2,09 ± 0,33 μM (1:1)	0,9830	3
<b>LBT2</b>	607 ± 93 nM		3,82 ± 0,98 μM (1:1)	0,9678	3
<b>LBT3</b>	87 ± 11 nM		623 ± 70 nM (1:1)	0,9905	3
<b>LBT4</b>	303 ± 61 nM		1,26 ± 0,26 μM (1:1)	0,9706	3
<b>LBT5</b>	499 ± 127 nM		2,26 ± 0,76 μM (1:1)	0,9584	3
<b>LBT5-1SP</b>	1,49 ± 0,15 μM		2,21 ± 0,41 μM (1:1) 10,2 ± 2,53 μM (1:4)	0,9847 0,9622	1 3

**Figure 45 : Compétition entre le terbium(III) et le zirconium(IV) à pH7.** Les mesures ont été réalisées en incubant pendant 15 min la protéine en présence de [Zr(NTA)<sub>2</sub>]. Les courbes de titration sont obtenues en ajoutant une quantité croissante de TbCl<sub>3</sub>. Afin de faciliter l'interprétation des résultats, le maximum de fluorescence sur la plaque a été à 100 et a permis la normalisation des autres valeurs (excepté pour LBT5-1SP où le maximum de fluorescence est fixé à 100 pour la courbe de titration en présence de Tb(III) seul). Les résultats ont été obtenus à l'aide du logiciel GraphPad.



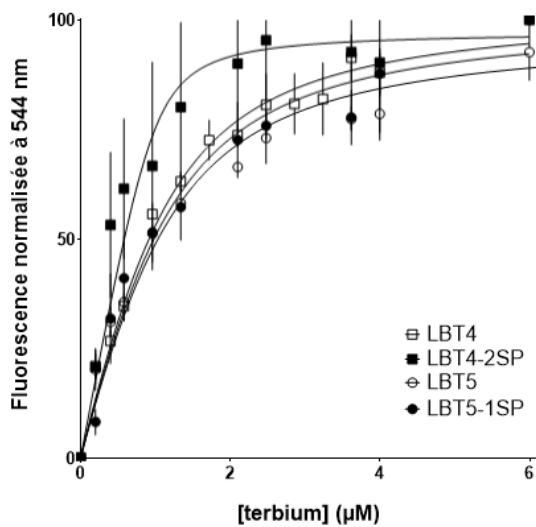
Cependant, si nous voulons déterminer la proportion d'ions Tb(III) chélatés au NTA, il serait intéressant de réaliser une étude de compétition dans les mêmes conditions mais en excitant la plaque à 345 nm, puis à 280 nm. Connaissant la constante d'affinité des LBT pour le Tb(III) et la constante d'affinité apparente obtenue lors des études de compétition (Figure 45), nous pourrions ainsi déterminer une constante d'affinité approximative des LBT pour le Zr(IV).

#### 3.4.2.2. Compétition entre le terbium(III) et le gallium(III)

Etant donné que la détermination de la constante d'affinité des LBT pour le Zr(IV) sous forme de  $Zr(NTA)_2$  demeure complexe du fait des multiples équilibres de complexation en jeu (Figure 44), nous avons voulu tester la compétition entre le Tb(III) et le Ga(III). Tout comme le Zr(IV), le Ga(III) précipite en solution sous la forme d'hydrocolloïdes  $Ga(OH)_3$ . La fenêtre de pH recommandée pour la chélation du gallium-68 aux cages DOTA est comprise entre 4 et 5,5 [33]. Les tampons préférentiellement utilisés pour la chélation des cations sont le tampon HEPES, l'acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique (MES) et les tampons acétate de sodium ou d'ammonium, avec un pH compris entre 4,5 et 6,5 [37, 20]. Les tampons MES et HEPES, développés par Norman Good *et al.* dans les années 60, présentent une faible auto-fluorescence et un faible pouvoir chélatant [182, 183]. Le tampon MES, qui possède une gamme de pH allant de 5.5 à 6.5 [183], a déjà été utilisé pour la chélation de l'indium(III) aux cages DOTA et DTPA [197] en remplacement des tampons acétate classiquement utilisés pour la chélation de radiométaux [37, 20].

Pour nos études de compétition avec le Ga(III), nous avons choisi de travailler avec le tampon WPP contenant du MES ( $pK_a = 6,19$ ) [183]. Il a été utilisé à pH 5,5 dans le chapitre précédent pour la purification sur colonnes de Fe(III) ou Ga(III) des phosphoprotéines. Le pH pouvant affecter les  $pK_a$  des différents acides aminés impliqués dans la chélation des cations, nous avons déterminé les constantes de dissociation des différentes protéines pour le Tb(III) dans du tampon WPP à pH 5.5. Les résultats obtenus sont résumés dans la Figure 46. Alors que l'affinité pour le Tb(III) semble avoir diminuée pour les protéines LBT+ et LBT1 à pH 5,5, celle-ci est augmentée pour la protéine LBT5-1SP avec un  $K_D$  de l'ordre de 500 nM contre 1  $\mu$ M à pH 7. La protéine LBT4-2SP quant à elle possède un  $K_D$  d'une valeur inférieure à 100 nM. Il semblerait que le nombre de résidus sérine-phosphorylés joue sur l'affinité pour le Tb(III).

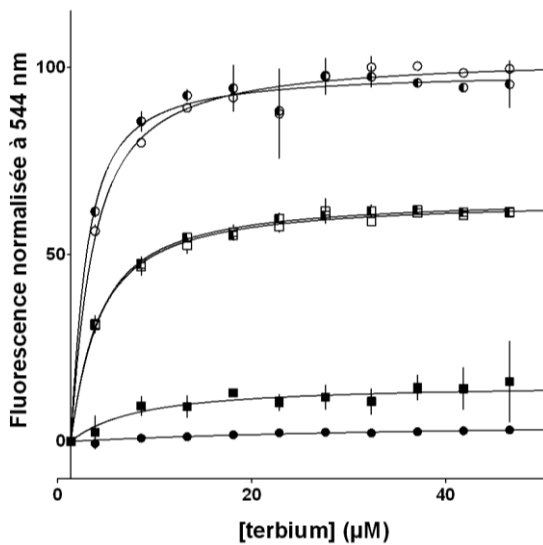
**Titration des mutants LBT4 et LBT5 dans du tampon pH 5.5**



**Constantes de dissociation des mutants pour le Tb(III) dans du tampon pH 5.5**

Protéine	$K_D$	$R^2$	n
LBT+	$1,75 \pm 0,20 \mu\text{M}$	0,9832	2
LBT1	$2,35 \pm 0,19 \mu\text{M}$	0,9904	2
LBT4	$457 \pm 74 \text{ nM}$	0,9713	3
LBT5	$500 \pm 89 \text{ nM}$	0,9603	3
LBT5-1SP	$513 \pm 114 \text{ nM}$	0,9575	3
LBT4-2SP	$36 \pm 27 \text{ nM}$	0,9215	3

**Figure 46 :** Affinité pour le terbium(III) des différentes Nanofitines anti-lysozyme H4 fusionnées aux LBT. Les mesures ont été réalisées dans du tampon WPP à pH 5.5 avec une concentration en protéine fixée à  $1\mu\text{M}$  et une concentration croissante en  $\text{TbCl}_3$ . Afin de faciliter l’interprétation et la comparaison entre les résultats, le maximum de fluorescence pour les protéines titrées avec du Tb(III) a été fixé à 100. Les résultats ont été obtenus à l’aide du logiciel GraphPad. n : nombre d’essais réalisés.



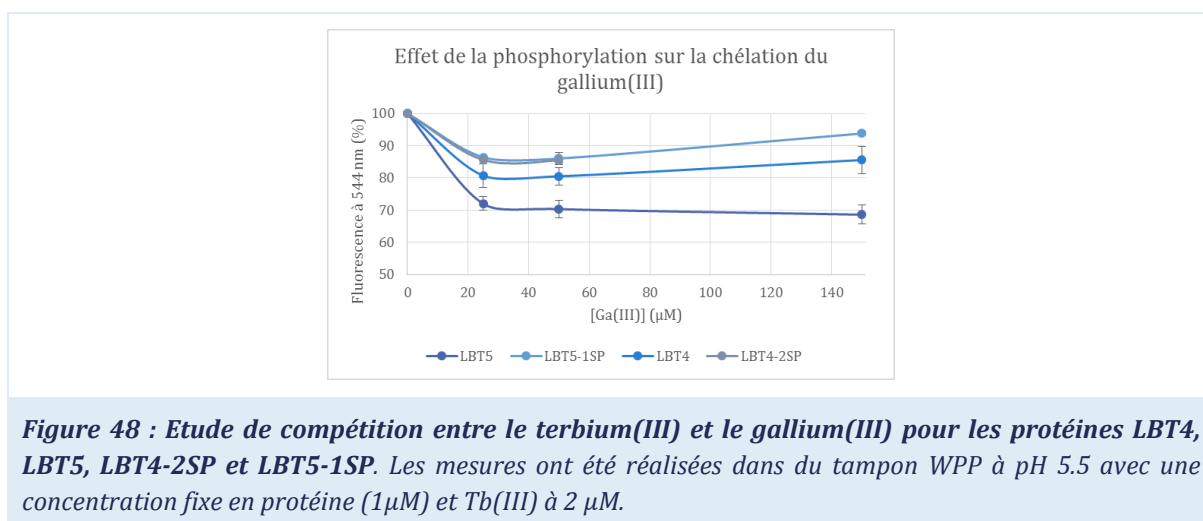
- LBT+
- LBT+/GaCl3 (1:1000)
- LBT1
- LBT1/GaCl3 (1:1000)
- ◐ LBT+/GaCl3 (1:1)
- ◑ LBT1/GaCl3 (1:1)

**Figure 47 :** Etude de compétition entre le gallium(III) et le terbium(III) pour les protéines LBT+ et LBT1. Les mesures ont été réalisées dans du tampon WPP à pH 5.5 avec une concentration en protéine fixée à  $1\mu\text{M}$  et une concentration croissante en  $\text{TbCl}_3$ . Le maximum de fluorescence obtenu pour le LBT+ titré avec le Tb(III) a été fixé à 100 et a servi à normaliser le reste des données. Les résultats ont été obtenus à l’aide du logiciel GraphPad.

Après avoir mis en contact la protéine LBT+ avec une solution de  $\text{GaCl}_3$ , nous avons titré le mélange réactionnel avec une quantité variable de Tb(III). Les résultats préliminaires obtenus pour les protéines LBT+ et LBT1 sont présentés dans la Figure 47. En comparant les signaux

obtenus lors de la titration des protéines seules par le Tb(III), nous pouvons observer une diminution de la fluorescence de 40% à pH 5,5 entre le LBT+ et le LBT1. Le résultat obtenu confirme que le résidu Ala18 est bien impliqué dans la chélation du Tb(III) par la séquence peptidique. Concernant les études de compétition, nous pouvons observer pour les deux protéines qu'il n'y a pas de différence significative en présence ou en absence de Ga(III) à 1  $\mu\text{M}$ . L'absence de signal obtenu pour les compétitions avec 1 mM de Ga(III) permet de montrer qu'il y a bien chélation du Ga(III) par l'étiquette LBT, mais qu'il faut un large excès de Ga(III) pour déplacer complètement le complexe LBT-Tb<sup>3+</sup>. Le besoin d'ajouter le Ga(III) en excès suggère que la constante d'affinité pour cet ion métallique est comprise entre 1  $\mu\text{M}$  et 1 mM.

L'objectif étant de montrer que l'insertion de résidu phosphorylé permet de rétablir le site de chélation de l'étiquette peptidique et d'augmenter l'affinité pour les radiométaux, nous avons réalisé une étude de compétition entre le Tb(III) et le Ga(III) pour les protéines LBT4-2SP et LBT5-1SP. Après incubation avec une quantité variable de Ga(III) (de 0 à 150  $\mu\text{M}$ ), du Tb(III) a été ajouté à une concentration finale de 2  $\mu\text{M}$  (Figure 48). Nous avons ainsi pu observer une diminution de la fluorescence après l'ajout de Ga(III). Cette diminution de la fluorescence a lieu pour une concentration en Ga(III) comprise entre 0 et 25  $\mu\text{M}$  suggérant que l'équilibre est déplacé à ces concentrations et que la constante de dissociation du complexe LBT-Ga<sup>3+</sup> est comprise entre 0 et 25  $\mu\text{M}$ . Nous avons ensuite réalisé le même type d'étude de compétition en titrant la protéine avec une concentration en Ga(III) comprise entre 0 et 50  $\mu\text{M}$  en présence de 5  $\mu\text{M}$  de Tb(III). Lorsque nous sommes en présence de Ga(III) à 50  $\mu\text{M}$ , nous obtenons pour les protéines phosphorylées un signal de fluorescence supérieur à celui obtenu pour les protéines sans Ga(III). Nous ne sommes donc pas dans les conditions expérimentales optimales pour déterminer les constantes d'affinité pour le Ga(III) et nous n'avons malheureusement pas réussi à reproduire les résultats précédents.



**Figure 48 : Etude de compétition entre le terbium(III) et le gallium(III) pour les protéines LBT4, LBT5, LBT4-2SP et LBT5-1SP. Les mesures ont été réalisées dans du tampon WPP à pH 5.5 avec une concentration fixe en protéine (1 $\mu\text{M}$ ) et Tb(III) à 2  $\mu\text{M}$ .**

### 3.5. Conclusion et perspectives

Au cours de cette étude nous avons généré de nombreux mutants permettant la chélation du terbium(III) avec une affinité pour le lanthanide allant de 90-600 nM à pH 7 et 450 nM–2,5  $\mu$ M à pH 5.5. L'insertion de résidus phosphorylés a montré une diminution de l'affinité à pH 7 entre les mutants LBT5 ( $\approx$  500 nM) et LBT5-1SP ( $\approx$  1,5  $\mu$ M). A l'inverse, en se plaçant à pH 5.5, nous avons pu observer une augmentation de l'affinité entre les mutants LBT4 ( $\approx$  500 nM) et LBT4-2SP ( $\approx$  50 nM). Cette augmentation de l'affinité à pH 5.5 est d'autant plus importante que le nombre de résidus phosphorylés augmente ( $K_D(\text{LBT5-1SP}) \approx$  500 nM,  $K_D(\text{LBT4-2SP}) \approx$  50 nM). Au cours de cette étude, nous avons été confrontés à plusieurs obstacles dont le principal était le manque de reproductibilité concernant les études de titration ou de compétition à pH 5,5 avec les mutants phosphorylés et plus particulièrement avec le LBT4-2SP.

La présence des deux groupements phosphate semble changer la conformation de l'étiquette et modifie sa capacité de chélation. Il serait alors judicieux de réaliser des études de titration avec un cation stable à pH 7 et ayant un rayon ionique proche de celui du Ga(III) (NC = 4-6, rayon ionique : 47-62 pm), comme le Cu(II) (NC = 4-6, rayon ionique : 57-73 pm) [33]. Il faudrait alors choisir un autre ion lanthanide pour suivre les études de titration, comme l'Eu(III) ou le Sm(III), le Tb(III) émettant un rayonnement vers 544 nm (vert) proche de la couleur de l'ion Cu(II) en solution (bleu). Nous pourrions également changer de radiométal pour réaliser les images *in vivo*, le cuivre-64 étant un émetteur de positon avec un temps de demi-vie physique de 12,7 h permettant l'acquisition d'images PET sur une journée.

Si nous voulons utiliser les étiquettes phosphorylées LBT5-1SP et LBT4-2SP pour des manipulations *in vivo*, il est alors nécessaire de vérifier la stabilité des complexes LBT-Ga<sup>3+</sup> et LBT-Cu<sup>2+</sup> vis-à-vis d'autres ions présents dans le compartiment sanguin, comme le Fe(II/III) ou le Ca(II), ou des agents de chélation naturels (transferrine, etc.). Pour se faire, il sera nécessaire de complexer la Nanofitine fusionnée LBT avec du gallium-68 et d'évaluer la stabilité du radiotracer obtenu à 37°C dans du sérum fœtal bovin (FBS) et du tampon phosphate salin à pH 7 (PBS). Le suivi est réalisé ensuite par chromatographie sur couche mince (radio-TLC) ou chromatographie en phase liquide à haute performance (radio-HPLC). Cette dernière technique permet également de vérifier si la protéine servant de vecteur se fixe aux protéines plasmatiques. Une fois la stabilité dans le FBS validée, il est nécessaire d'évaluer la stabilité du radiotracer au contact avec des agents de chélation, comme l'EDTA, et de cations, comme le Ca(II) dans les concentrations plasmatique ( $\approx$  1,8 mM) [170].

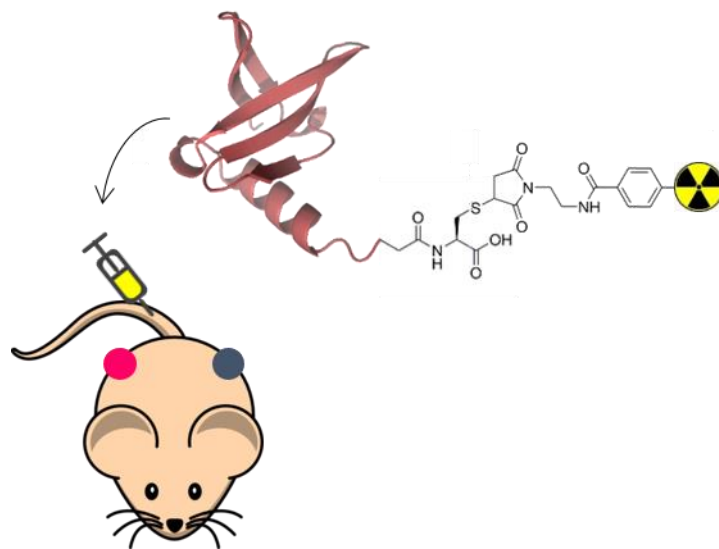
Cependant, il est important de noter que le radiotracer étudié est composé d'une Nanofitine fusionnée à l'étiquette peptidique LBT et d'un atome de gallium-68 (ou de cuivre-64). La protéine utilisée comme vecteur (i.e. la Nanofitine) possédant un temps de circulation très court (environ 5 minutes), si les complexes LBT-Ga<sup>3+</sup> et LBT-Cu<sup>2+</sup> présentent une constante de vitesse de dissociation ( $k_{off}$ ) suffisamment faible, la stabilité peut toutefois être suffisante pour réaliser les études d'imagerie. Il sera cependant nécessaire d'évaluer la toxicité des ions radiométalliques seuls et du radiotracer dans l'organisme.



---

## IMAGERIE FONCTIONNELLE DE NANOFITINE

---



Les expérimentations présentées dans ce chapitre ont été réalisées avec l'aide des plateformes du CMMI (cultures cellulaires et injection des cellules dans les souris) et du CRC (injection de la Nanofitine radiomarquée dans les souris, imagerie et biodistribution). Les résultats obtenus feront l'objet d'une publication.





## Chapitre 4 : Imagerie fonctionnelle de Nanofitine

### 4.1. Introduction

Le récepteur au facteur de croissance épithélial humain de type 1 (EGFR ou HER1) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine-kinase [3] membre d'une famille de quatre protéines structurellement apparentées (de HER1 à HER4) [198] et impliquées dans le développement normal des tissus d'origine épithéliale. Ces récepteurs, présents sous forme de monomères inactifs, vont changer de conformation en présence de leur ligand et permettre leur homo- ou hétéro-dimérisation. La formation de dimères va entraîner le dépliement de l'extrémité carboxylique intracellulaire et permettre l'activation du récepteur par transphosphorylation des résidus tyrosine [199, 200]. Leur dimérisation va entraîner l'activation d'une cascade de signalisation contrôlant l'angiogenèse, la survie, l'adhésion, la prolifération, la différenciation et la division cellulaires [3, 4, 201, 202, 203]. EGFR est fréquemment retrouvé surexprimé et/ou muté dans un large nombre de tumeurs épithéliales, incluant les carcinomes des voies respiratoires supérieures, du sein, du côlon, du poumon, de la prostate, du rein, de l'ovaire, du cerveau, du pancréas et de la vessie [204, 205, 206] (Tableau 15).

**Tableau 15 : Cancers présentant une surexpression d'EGFR [204].**

Cancer	Augmentation de l'expression d'EGFR (%)
Voies respiratoires supérieures (tête et cou)	80-100
Col de l'utérus	80-100
Colorectal	70-90
Rein	50-90
Pancréas	30-90
Sein	15-90
Poumon à non à petites cellules	40-80
Prostate	40-80
Estomac	20-80
Ovaire	35-70
Gliome	40-50

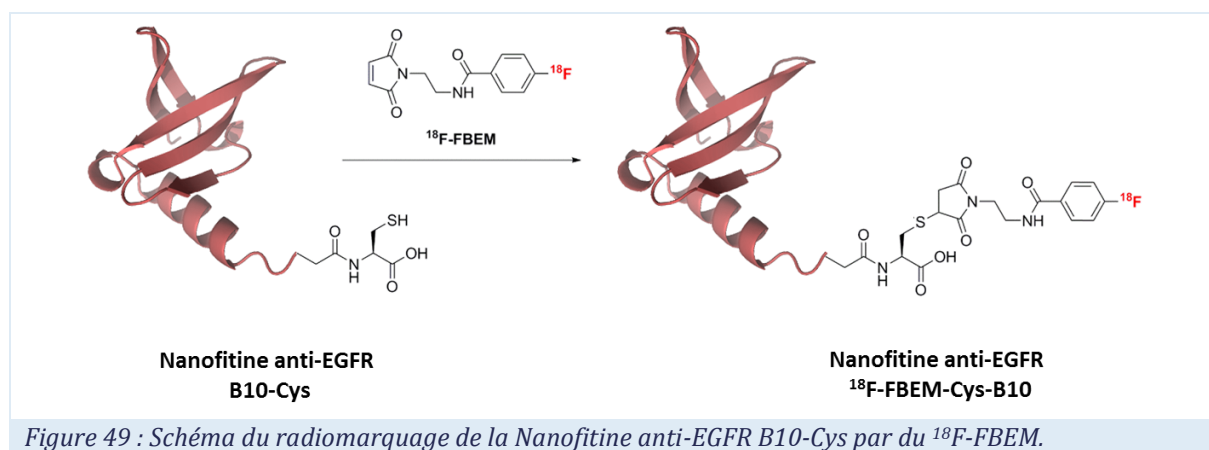
Classiquement, le diagnostic et le suivi des patients sur-exprimant EGFR se réalisent *via* des techniques d'immunohistochimie ou de biologie moléculaire sur des échantillons biologiques. Des stratégies d'imagerie ont été développées avec succès pour déterminer le niveau d'expression de l'EGFR *in vivo* sans avoir recours à un prélèvement biologique. L'utilisation d'anticorps reconnaissant avec une forte affinité le récepteur, comme le Cetuximab, permet de distinguer les masses tumorales EGFR-positives [19, 51] entre 16 et 24 h après injection [39, 127]. La lente clairance du radiotracer est due en partie à la taille importante des anticorps, mais également à

la présence du fragment Fc provoquant la rétention de ces agents d'imagerie dans certains tissus, comme le foie, *via* les récepteurs anti-Fc [50]. L'utilisation de fragments F(ab')<sub>2</sub> permet de s'affranchir de la présence du fragment Fc, mais leur taille supérieure à 70 kDa [45] entraîne un long temps de circulation plasmatique [126]. De petites protéines alternatives aux anticorps ont été développées pour la visualisation *in vivo* des tumeurs sur-exprimant EGFR (Annexe 2 : Récapitulatif des radiotraceurs anti-EGFR existants.), comme les *Affibody* Z1907 [30, 32, 25, 79, 77], Z2377 [75] et Z955 [76], ainsi que les *Nanobody* 7C12 [92, 93], 7D12 [93, 39] et 8B6 [44].

## 4.2. Marquage régiospécifique de la Nanofitine B10-Cys

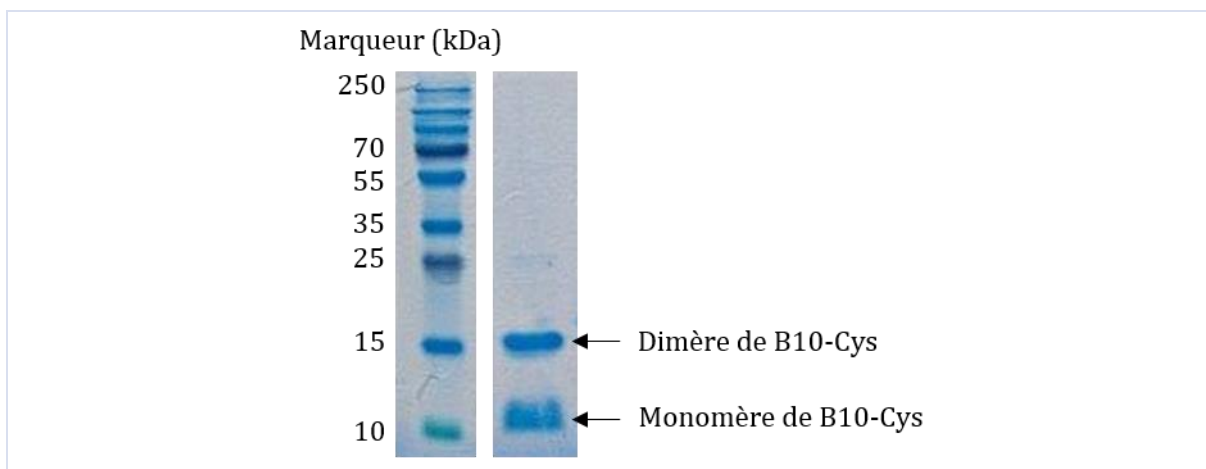
### 4.2.1. Génération de Nanofitine anti-EGFR

La Nanofitine anti-EGFR B10 a été sélectionnée par l'entreprise Affilogic pour sa capacité à cibler de manière spécifique *in vitro* l'EGFR humain avec une affinité de 27,6 nM sans pénétrer à l'intérieur des cellules tumorales [207]. Afin de valider l'utilisation de cette Nanofitine comme outil de diagnostic et de suivi de traitement, nous voulons marquer au <sup>18</sup>F la protéine B10 selon la technique développée par Dammicco *et al.* pour le radiomarquage de la Nanofitine anti-lysozyme H4-Cys [111]. Pour se faire, nous avons générée par génie génétique la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys qui possède à l'extrémité N-terminale une étiquette hexa-histidine (6HisTag) et en C-terminale un résidu cystéine éloigné de la séquence de la protéine par un résidu glycine (Figure 49). L'insertion d'un résidu cystéine unique en bout de chaîne a notamment été utilisée pour le radiomarquage régiosélectif à l'aide du <sup>18</sup>F-FBEM des *Affibody* anti-EGFR Z1907 [30], et anti-HER2 Z342 [31] et Z2891 [27].



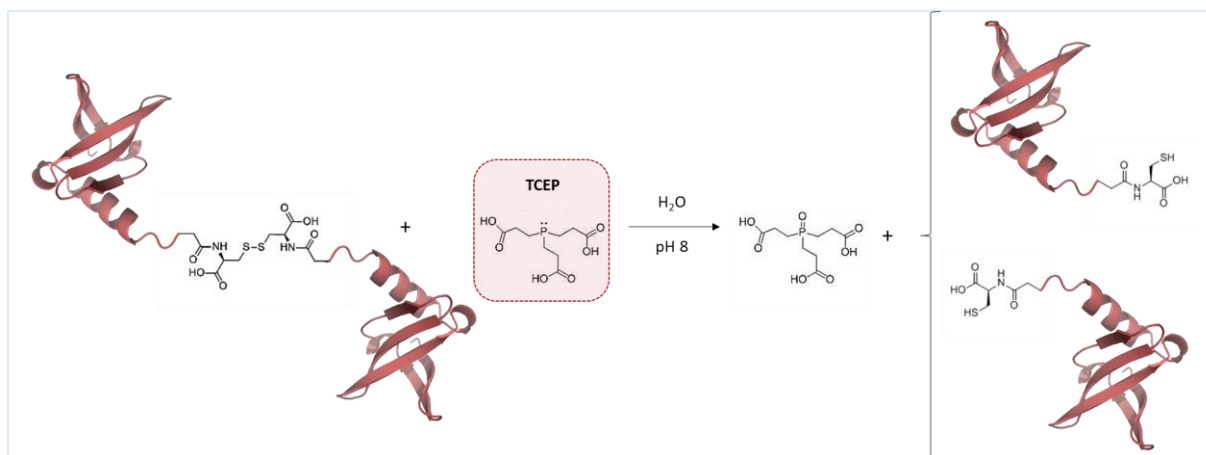
La présence du 6HisTag va permettre l'immobilisation de la Nanofitine sur des billes magnétiques fonctionnalisées avec du Ni(II)-NTA (Figure 55). Le couplage au groupement

prosthétique  $^{18}\text{F}$ -FBEM se réalisera ensuite de manière spontanée et régiosélective entre la fonction thiol du résidu cystéine [22] et la fonction maléimide du  $^{18}\text{F}$ -FBEM (Figure 49).



**Figure 50 : SDS-PAGE de la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys.** Dépôt de 2  $\mu\text{g}$  de protéine sur SDS-PAGE 17% en condition non-dénaturante (sans  $\beta$ -mercaptoéthanol) après purification sur résine Ni(II)-NTA superflow de la fraction soluble obtenue après production de la Nanofitine en *E. coli* DH5 $\alpha$ LacI<sup>q</sup>.

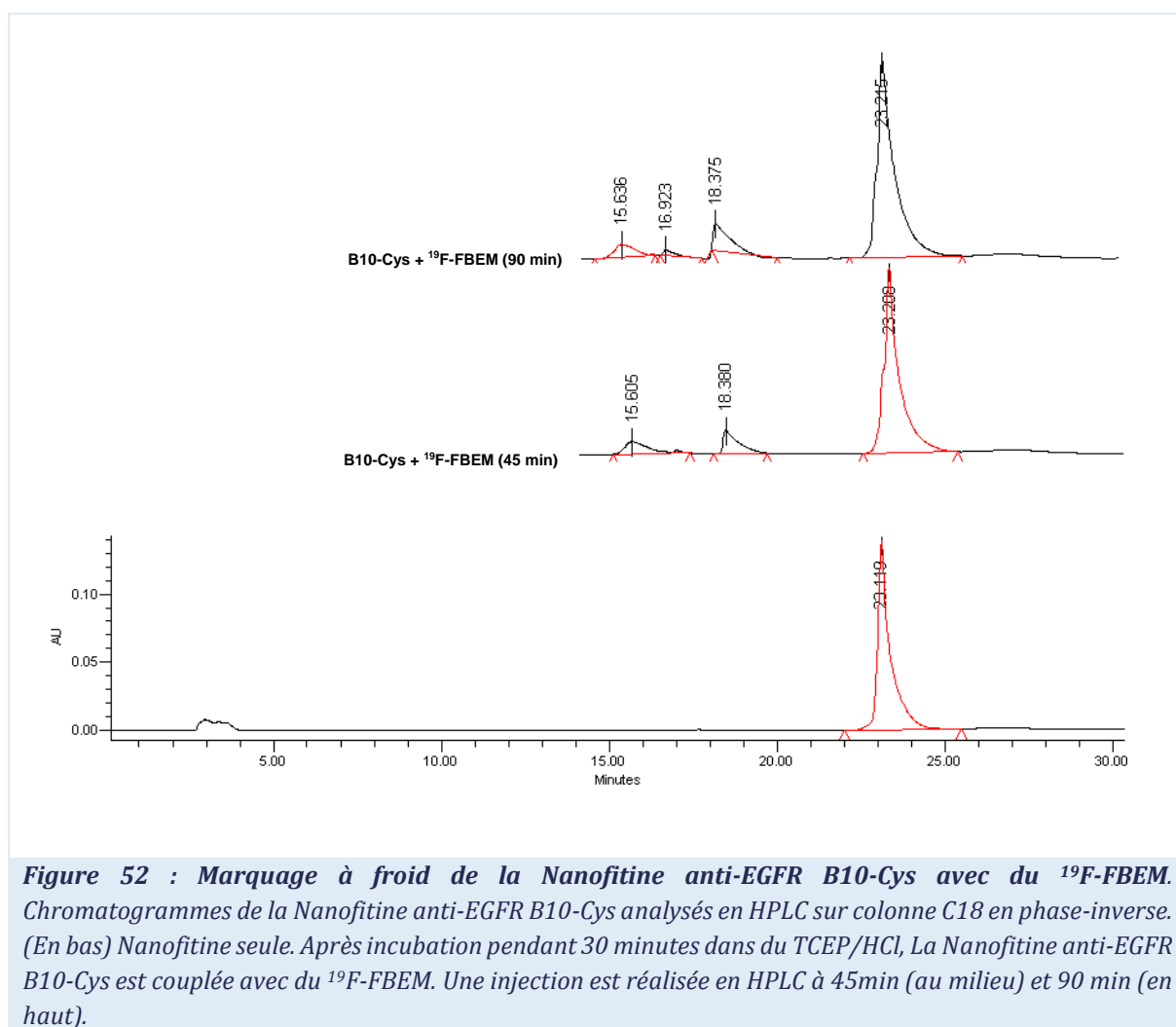
L'insertion du résidu cystéine en bout de chaîne va également entraîner la formation spontanée de ponts disulfures entre les protéines (Figure 50). La formation des dimères de Nanofitine en solution va empêcher la conjugaison entre la fonction maléimide des groupements  $^{19}\text{F}$ -FBEM ou  $^{18}\text{F}$ -FBEM et le résidu cystéine de la B10-Cys. Il est alors nécessaire d'utiliser un agent réducteur *thiol-free* tel que le tris(2-carboxyéthyle)phosphine (TCEP) (Figure 51), afin de réduire les dimères de Nanofitines et rendre les résidus cystéine disponibles pour la réaction de marquage.



**Figure 51 : Schéma réactionnel de l'action du TCEP sur les dimères de Nanofitine B10-Cys.**

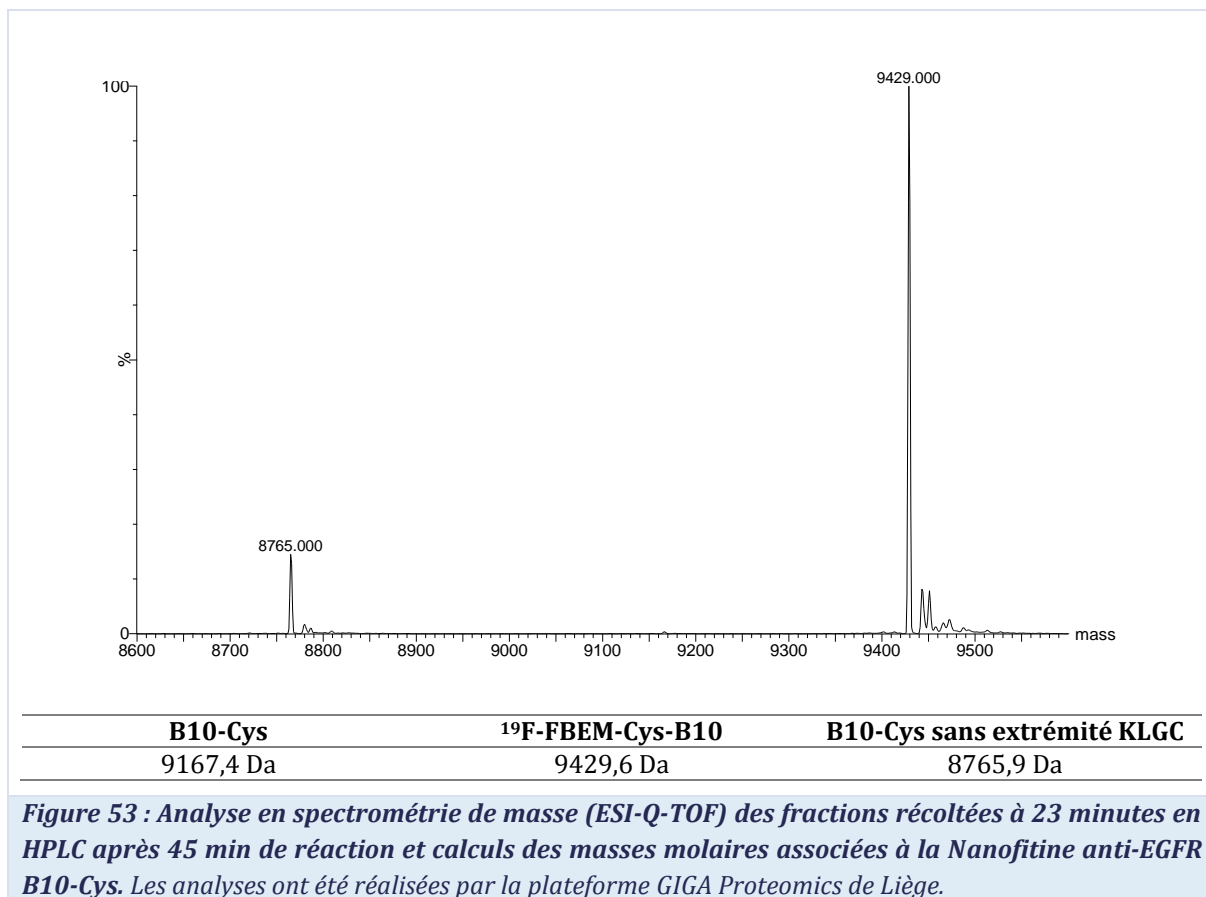
#### 4.2.2. Marquage à froid de la Nanofitine avec du $^{19}\text{F}$ -FBEM

Afin de vérifier la faisabilité du marquage de la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys par le  $^{18}\text{F}$ -FBEM, un marquage à froid de la protéine a été réalisé avec le groupement prosthétique non-radioactif  $^{19}\text{F}$ -FBEM. Après incubation avec l'agent réducteur, la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys est mise en contact avec le  $^{19}\text{F}$ -FBEM pendant 90 min. Le mélange réactionnel est ensuite injecté en HPLC après 45 et 90 minutes d'incubation. Sur les différents chromatogrammes obtenus, nous pouvons observer la présence d'un pic majoritaire ayant un temps de rétention de 23 min, ainsi que trois pics minoritaires ayant comme temps de rétention respectifs : 16 min, 17 min et 18 min (Figure 52).



La détermination des produits correspondant aux différents temps de rétention a été réalisée en injectant le  $^{19}\text{F}$ -FBEM seul, le  $^{19}\text{F}$ -FBEM en présence de TCEP et le  $^{19}\text{F}$ -FBEM incubé pendant 90 minutes dans du tampon phosphate pH 8. Les pics à 16, 17 et 18 minutes

correspondent respectivement au  $^{19}\text{F}$ -FBEM qui a réagi avec le TCEP [208], au  $^{19}\text{F}$ -FBEM hydrolysé en présence d'ions  $\text{OH}^-$  [209] et au  $^{19}\text{F}$ -FBEM encore intègre présent en excès, l'injection de la Nanofitine seule donnant un temps de rétention de 23 min. Le pic majoritaire présent à 45 et 90 minutes peut correspondre à la protéine couplée ou non au  $^{19}\text{F}$ -FBEM. Afin de valider la réaction de couplage entre la Nanofitine et le  $^{19}\text{F}$ -FBEM, nous avons analysé en spectrométrie de masse les échantillons ayant un temps de rétention de 23 min obtenus pour les deux temps d'incubation (Figure 53).

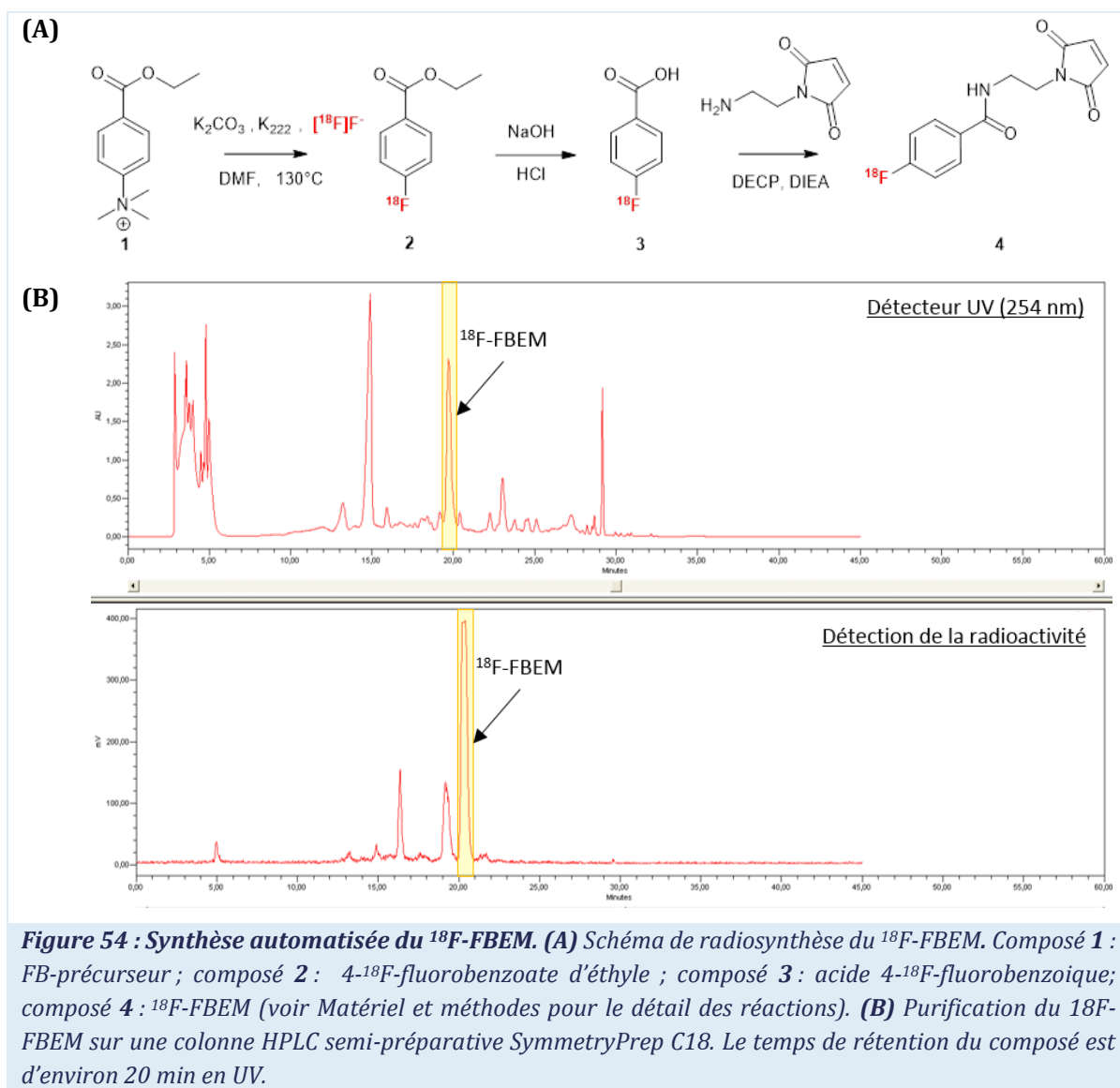


Nous pouvons observer sur les spectres de masses obtenus la présence d'un pic majoritaire de masse  $9429 \pm 0,9$  Da correspondant à la masse attendue pour la protéine couplée au  $^{19}\text{F}$ -FBEM. Nous supposons que la présence d'un pic minoritaire de masse  $8765 \pm 0,9$  Da pourrait correspondre à la Nanofitine clivée en C-terminal au niveau du site HindIII (EK↓KL) par une protéase Lysine-spécifique (*Trypsin-like*) présente dans le cytoplasme des DH5 $\alpha$ LacI $\lambda$ .

#### 4.2.3. Marquage à chaud de la Nanofitine et stabilité *in vitro*

Après détermination du temps de rétention du composé  $^{19}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 par HPLC, nous avons couplé la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys avec du  $^{18}\text{F}$ -FBEM. Pour se faire, nous avons

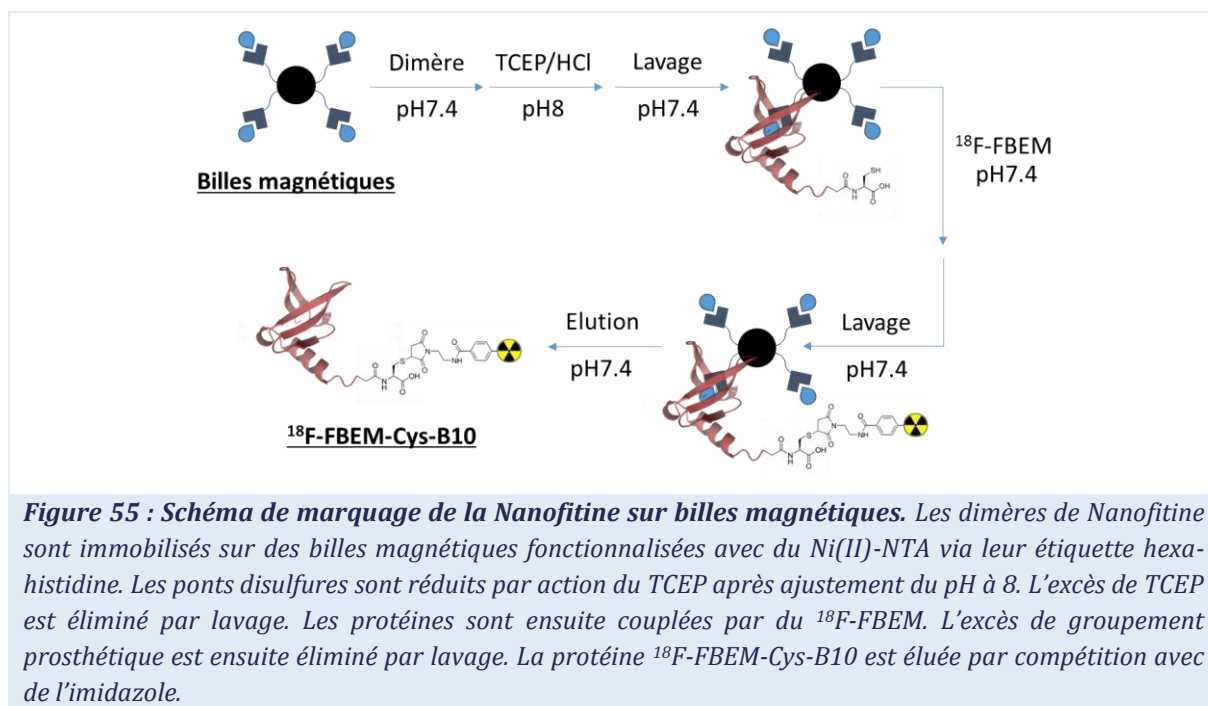
synthétisé de manière automatisée le groupement prosthétique. Après purification sur une colonne HPLC, nous avons obtenu le  $^{18}\text{F}$ -FBEM avec un rendement corrigé<sup>14</sup> de  $30 \pm 3\%$  ( $n = 6$ ) (Figure 54).



La Nanofitine anti-EGFR B10-Cys a ensuite été couplée au  $^{18}\text{F}$ -FBEM selon la méthode développée par Dammicco *et al.* [111] (Figure 55). Après fixation sur des billes magnétiques fonctionnalisées avec du Ni(II)-NTA, du TCEP a été rajouté au milieu afin de réduire les ponts disulfure établis entre les dimères de Nanofitines. Le pH du milieu est ensuite fixé à 8 pour

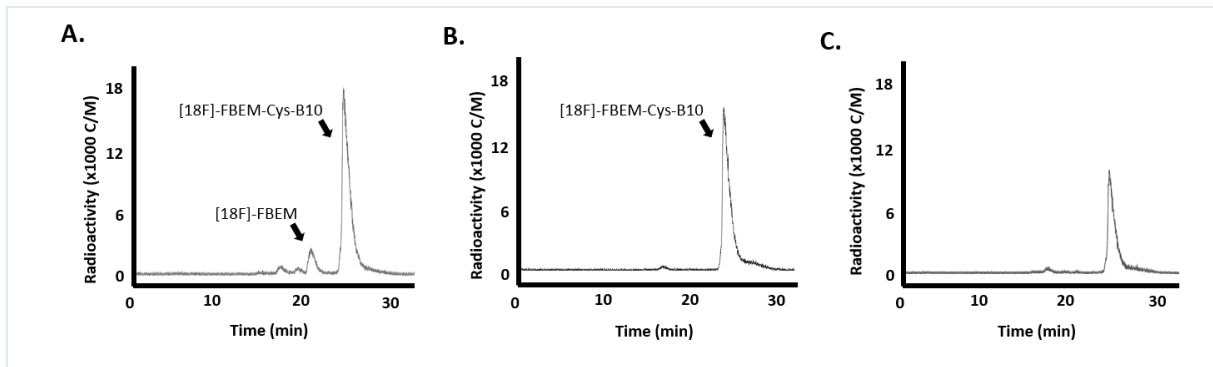
<sup>14</sup> Les rendements corrigés présentés dans ce chapitre tiennent compte de la demi-vie physique du radioélément (voir la partie Matériel et Méthodes pour la formule utilisée).

favoriser la réaction. Le TCEP résiduel est éliminé par des lavages avec du tampon phosphate à pH 7,4. Le  $^{18}\text{F}$ -FBEM, dilué dans le tampon, est rapidement mis en contact avec les Nanofitines. Le  $^{18}\text{F}$ -FBEM en excès est éliminé par des lavages. Les protéines sont ensuite éluées en présence d'imidazole. Nous avons ainsi obtenu la Nanofitine anti-EGFR radiomarquée  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 avec un rendement corrigé de  $45 \pm 14\%$  ( $n = 6$ ) correspondant à environ 50 ng de  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 en présence de 100  $\mu\text{g}$  de Nanofitine B10-Cys non-marquée.



#### 4.2.4. Stabilité *in vitro* de la Nanofitine radiomarquée

L'objectif étant d'utiliser la Nanofitine  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 comme radiotracer en imagerie *in vivo*, il est alors nécessaire de vérifier sa stabilité dans les conditions physiologiques (pH 7,4, 37°C), mais également vis-à-vis des protéines plasmatiques. Nous avons incubé à 37°C la Nanofitine  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 à la fois dans du sérum fœtal bovin (FBS) et dans du tampon phosphate salin pH 7,4 (PBS). La stabilité du radiotracer a ensuite été évaluée par radio-HPLC (Figure 56).



**Figure 56 : Stabilité *in vitro* de la Nanofitine radiomarquée à 37°C. (A) Co-injection en radio-HPLC du  $^{18}\text{F}$ -FBEM (temps de rétention de 20 min) et de la Nanofitine radiomarquée (temps de rétention de 23 min) dans du PBS. (B) Injection en radio-HPLC de la Nanofitine radiomarquée après incubation pendant 2h dans du FBS et (C) pendant 2h30 dans du PBS.**

La présence d'un pic, avec un temps de rétention de 23 min, a ainsi été observée après 2h d'incubation dans du FBS ou 2h30 dans du PBS (la diminution du pic étant dû à la décroissance radioactive du fluor-18). La co-injection de  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 et de  $^{18}\text{F}$ -FBEM a permis de déterminer que le pic observé correspond à la protéine radiomarquée. Le pic ayant la même allure sur l'ensemble des chromatogrammes, ces études permettent d'affirmer que la Nanofitine anti-EGFR  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 est stable dans les conditions physiologiques et ne se fixe pas aux protéines plasmatiques. Elle peut donc être injectée dans des souris pour réaliser des études d'imagerie jusqu'à 2h30 post-injection (p.i.).

### 4.3. Le modèle animal EGFR : un double modèle tumoral

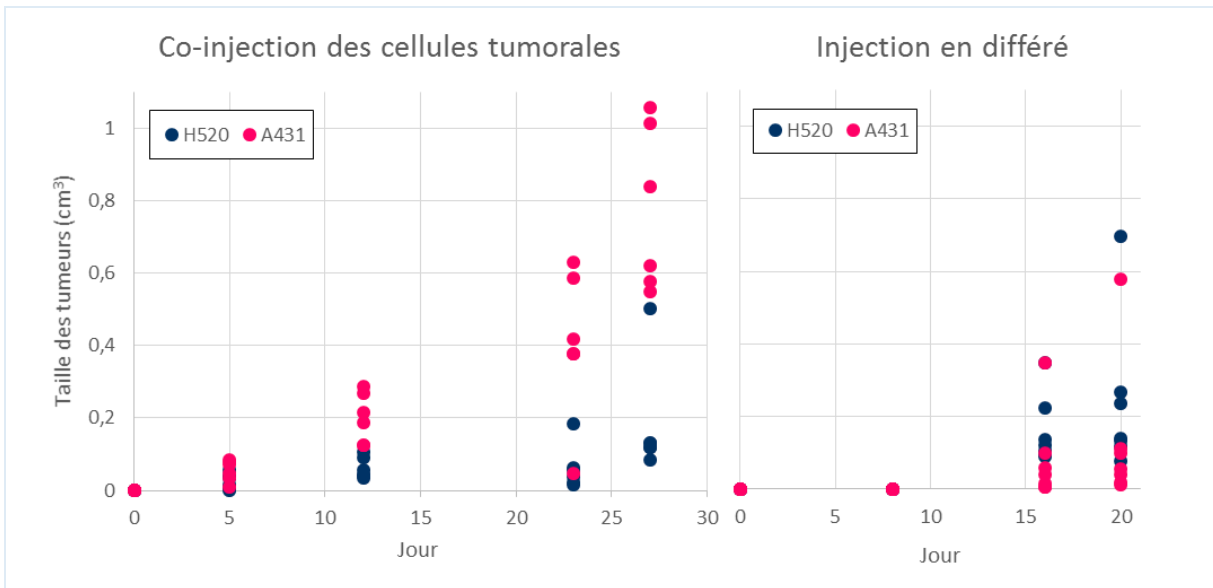
#### 4.3.1. Choix des lignées cellulaires

Voulant vérifier la spécificité *in vivo* de la Nanofitine anti-EGFR radiomarquée  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10, nous avons choisi de créer un modèle animal portant à la fois une lignée tumorale EGFR-positif et une EGFR-négative. Classiquement, le modèle animal exploité pour la validation des protéines d'affinité anti-EGFR en imagerie utilise une lignée cellulaire humaine issue d'un carcinome épidermoïde de la peau nommée A431 (ATCC, CRL-1555). Ces cellules présentent une expression du récepteur EGFR de l'ordre de 2.000.000 de récepteurs par cellule [206, 44]. Nous avons donc choisi cette première lignée cellulaire comme témoin positif pour les expérimentations *in vivo*. La seconde lignée cellulaire sélectionnée est issue d'un carcinome humain de poumon à cellules squameuses nommée H520 (ATCC, HTB-182). Ces cellules sont considérées comme étant EGFR-négatives, car elles ne sont pas reconnues par les anticorps anti-EGFR que ce soit en immunohistochimie [210], en cytométrie en flux, en test MTT ou encore en western-blot sur lysats totaux [211, 212, 213].



#### 4.3.2. Mise en place du modèle animal EGFR

Les différentes lignées cellulaires sélectionnées étant d'origine humaine, nous avons choisi une souche de souris immunodéficiente pour faciliter la pousse des tumeurs. Les lignées cellulaires A431 et H520 ont été co-injectées en sous-cutanée dans les flancs droit et gauche, respectivement, de souris balb/c nude. Le suivi de pousse des tumeurs a ensuite été réalisé en mesurant la taille des masses tumorales à l'aide d'un vernier (Figure 57).



**Figure 57 : Suivi de la pousse des tumeurs H520 et A431 injectées dans des souris balb/c nude. (A gauche) Co-injection de  $5 \cdot 10^6$  de cellules A431 (flanc droit) et H520 (flanc gauche) ( $n = 6$ ). (A droite) Injection dans le flanc gauche de souris balb/c nude de  $5 \cdot 10^6$  cellules H520. A J+8, injection dans le flanc droit de  $5 \cdot 10^6$  cellules A431 ( $n = 7$ ). La taille des tumeurs a été mesurée à l'aide d'un vernier et la taille calculée en émettant l'hypothèse que les tumeurs sont de forme ellipsoïde (voir Matériel et Méthodes pour la formule utilisée).**

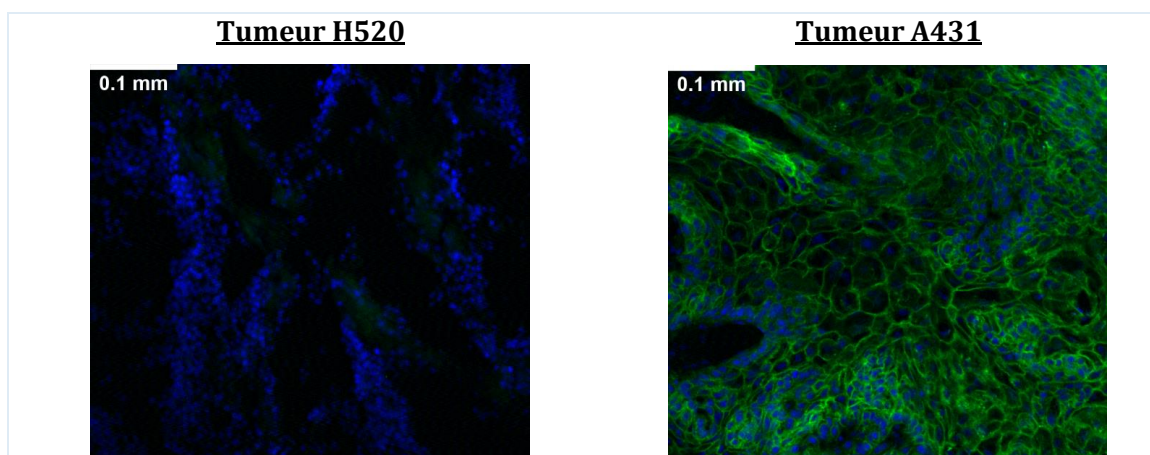
Nous avons pu observer que les tumeurs A431 atteignaient leur taille limite<sup>15</sup> plus rapidement que les tumeurs H520. Une limitation à l'utilisation du modèle co-injecté est que les tumeurs A431, du fait de leur taille, sont en parties nécrosées et risqueraient de montrer une image faussée d'absorption de la protéine. Afin d'avoir des tailles de tumeurs plus homogènes, nous avons choisi d'injecter en différé les cellules H520 et A431. Trois semaines après injection de  $5 \cdot 10^6$  de cellules H520, nous avons injecté le même nombre de cellules A431. Nous avons

<sup>15</sup> Limite de  $1 \text{ cm}^3$  fixée par la commission d'éthique animale de l'Université de Liège.

obtenu des tumeurs A431 avec un volume compris entre 76 et 697 mm<sup>3</sup>, et des tumeurs H520 avec un volume compris entre 12 et 577 mm<sup>3</sup>.

#### 4.3.3. Validation du modèle par immunohistochimie

Le microenvironnement tumoral influant sur l'expression des récepteurs à la surface des cellules *in vitro* ou *in vivo*, il est nécessaire de vérifier l'expression d'EGFR après injection des lignées tumorales dans les souris balb/c nude. Après sacrifice des animaux, l'expression du récepteur EGFR à la surface des cellules tumorales a été vérifiée par immunohistochimie en fluorescence sur des coupes cryopréservées et fixées de tumeurs (Figure 58). Les images superposées obtenues montrent la présence d'EGFR à la surface des cellules tumorales A431 et son absence à la surface des cellules H520. Ces résultats indiquent que le modèle de double-injection tumorale (nommé modèle EGFR) est pertinent si nous voulons comparer l'absorption de la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys radiomarquée, et ainsi valider sa reconnaissance spécifique *in vivo*.

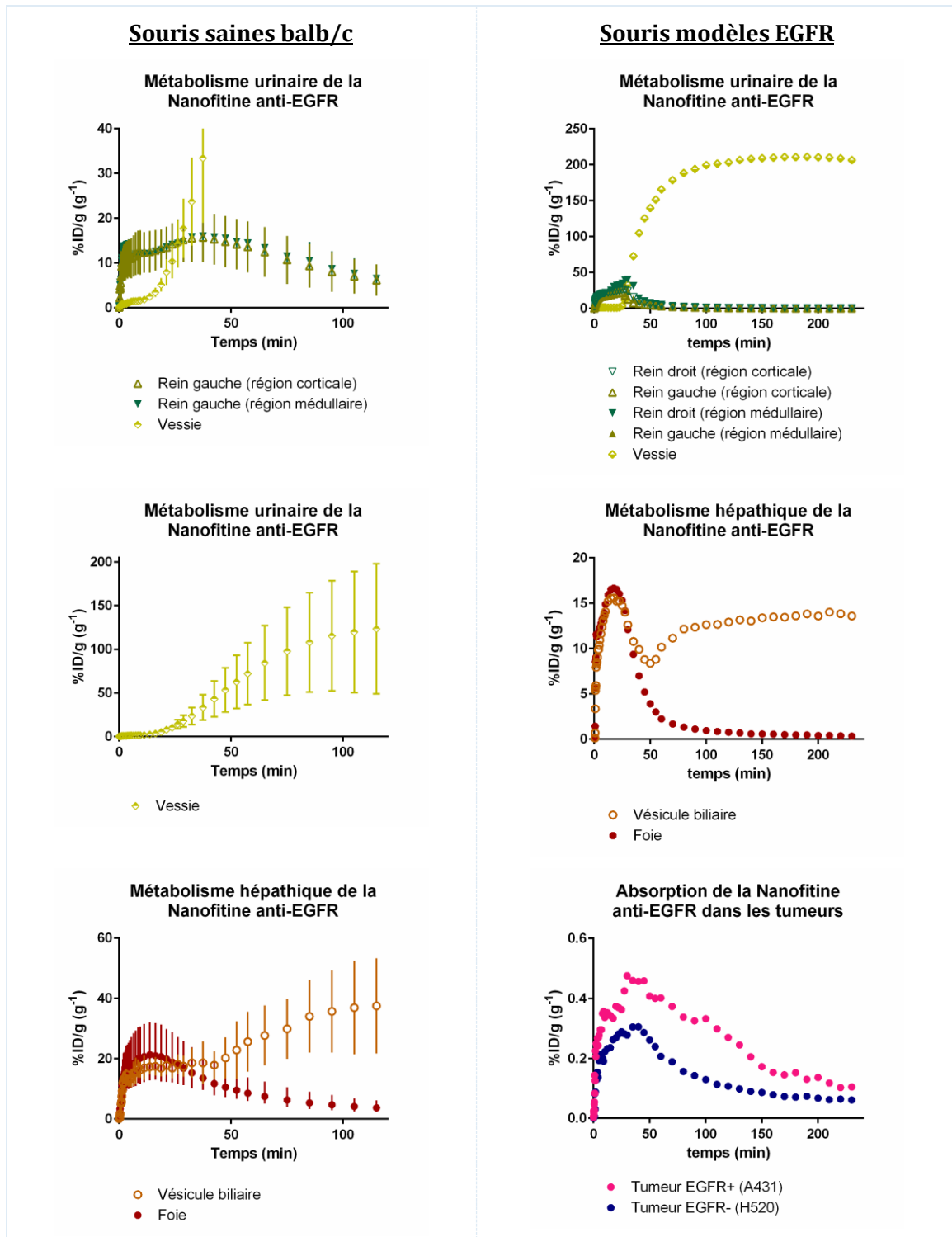


**Figure 58 : Immunohistochimie en fluorescence de coupes de tumeurs H520 (à gauche) et A431 (à droite) implantées sur les souris modèle EGFR. (a) Le niveau d'expression du récepteur EGFR a été évalué en colorant les coupes de tumeurs cryopréservées avec un anticorps de lapin dirigé contre le récepteur EGFR humain et un anticorps de chèvre anti-lapin couplé à de l'AlexaFluor 488 (vert). Les coupes ont été recolorées avec du DAPI afin de visualiser les noyaux (bleu).**

#### 4.4. Biodistribution de la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys

##### 4.4.1. Absorption de la Nanofitine anti-EGFR dans les organes

Une fois la stabilité de la Nanofitine radiomarquée dans le sérum fœtal bovin validée, nous avons injectée la Nanofitine <sup>18</sup>F-FBEM-Cys-B10 dans des souris saines (souche balb/c) et dans des souris modèle EGFR. Nous avons ainsi évalué l'absorption au cours du temps de la Nanofitine pendant 2h dans les souris balb/c et 4h dans le modèle EGFR (Figure 59).

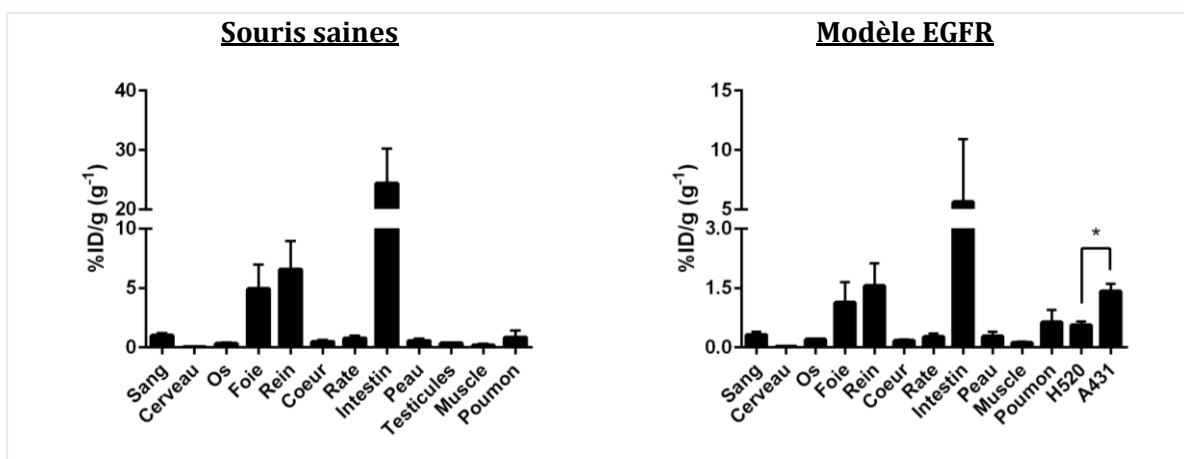


**Figure 59 : Cinétique d'absorption des Nanofitines anti-EGFR B10-Cys dans le modèle EGFR et les souris saines.** Les données sont exprimées en pourcentage de dose injectée par gramme d'organe [% ID/g]. Les résultats sont obtenus à partir des images superposées IRM et PET dynamique (2h pour les souris saines et 4h pour le modèle EGFR) après injection de 13-25 MBq (souris saines n=5) 22,6 MBq (modèle EGFR n=1) de Nanofitines radiomarquées.

Les tumeurs étant implantées dans la partie supérieure de l'animal, il est important de pouvoir les distinguer des autres organes comme le foie. L'étude de 4h a montré qu'à 120 minutes après

injection nous avons peu d'activité dans les organes du métabolisme (reins et foie) et un maximum d'activité dans les organes excréteurs (vessie et vésicule biliaire). Les courbes d'absorption pour les tumeurs suggèrent qu'il y a suffisamment d'activité à 120 min pour discriminer la tumeur EGFR-positive de la tumeur EGFR-négative. Nous avons donc choisi de faire nos études en statique à 120 min.

La biodistribution du radiotracer a ensuite été évaluée 2h30 après injection. Pour se faire, nous avons sacrifié les souris après imagerie PET et IRM, récupéré les organes d'intérêt et compté la radioactivité résiduelle à l'aide d'un compteur gamma. Les résultats obtenus pour les deux souches de souris montrent un profil similaire avec une forte rétention de la radioactivité dans les organes sièges du métabolisme des protéines (cf. partie 4.4.2) et une faible absorption de la  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 dans les autres organes (Figure 60).



**Figure 60 : Biodistribution de la Nanofitine  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 injectée avec approximativement 20  $\mu\text{g}$  de B10-Cys à 2h30 après injection.** Les données sont exprimées en pourcentage de dose injectée par gramme d'organe [% ID/g]  $\pm$  SD (n = 4) après injection en intraveineuse de la protéine radiomarquée dans des balb/c (à gauche) et dans le modèle EGFR (à droite). \*: Le  $P < 0.05$  est évalué selon un test de Mann-Whitney.

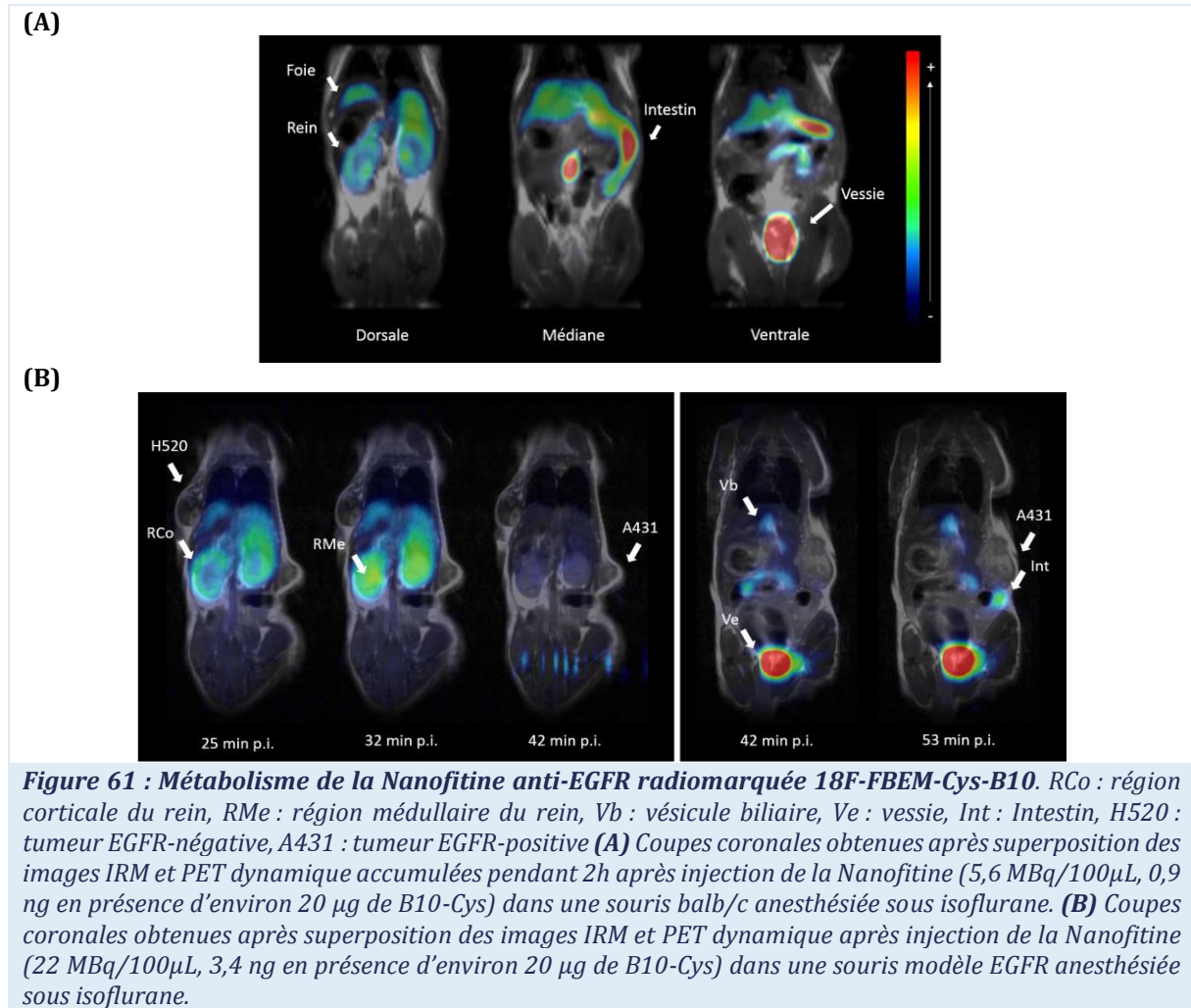
La faible présence de radioactivité dans les os ( $0,20 \pm 0,01\%$  ID/g pour le modèle EGFR et  $0,32 \pm 0,09\%$  ID/g pour les balb/c) indique qu'il n'y a pas de défluoration *in vivo* du radiotracer. Malgré la petite taille de la Nanofitine (environ 3 nm de diamètre), il y a peu de radioactivité retrouvée au niveau des muscles ( $0,12 \pm 0,03\%$  ID/g dans le modèle EGFR et  $0,18 \pm 0,13\%$  ID/g dans les balb/c) et de la peau ( $0,28 \pm 0,12\%$  ID/g dans le modèle EGFR et  $0,55 \pm 0,17\%$  ID/g dans les balb/c), indiquant une absence de pénétration passive de la protéine radiomarquée dans les tissus. La faible proportion de radioactivité dans le cerveau ( $0,02 \pm 0,01\%$  ID/g pour le modèle EGFR et  $0,05 \pm 0,02\%$  ID/g pour les balb/c) et le cœur ( $0,17 \pm 0,03\%$  ID/g pour le modèle EGFR et  $0,48 \pm 0,14\%$  ID/g) montre qu'il n'y a pas d'accumulation dans les organes sensibles. De même

la faible présence de radioactivité retrouvée au niveau plasmatique ( $0,32 \pm 0,07\%$  ID/g pour le modèle EGFR et  $0,99 \pm 0,20\%$  ID/g pour les balb/c) et de la rate ( $0,27 \pm 0,08\%$  ID/g pour le modèle EGFR et  $0,77 \pm 0,22\%$  ID/g pour les balb/c) montre l'innocuité de la Nanofitine par non-activation de la réponse immunitaire adaptative.

#### 4.4.2. Métabolisme des Nanofitines couplées au $^{18}\text{F}$ -FBEM

Les études de biodistribution ont montré une accumulation de la radioactivité dans les organes impliqués dans le métabolisme des protéines avec une absorption de :  $0,17 \pm 0,03\%$  ID/g (modèle EGFR) et  $6,56 \pm 2,40\%$  ID/g (balb/c) pour les reins,  $1,13 \pm 0,52\%$  ID/g (modèle EGFR) et  $4,92 \pm 2,06\%$  ID/g (balb/c) pour le foie,  $5,61 \pm 5,29\%$  ID/g (modèle EGFR) et  $24,39 \pm 5,85\%$  ID/g (balb/c) pour les intestins (Figure 60). Les différences observées entre les deux souches de souris peuvent notamment s'expliquer par le fait que les souris balb/c sont des souris saines et que les souris modèles EGFR ont reçu une injection de cellules tumorales, la présence des tumeurs pouvant modifier le métabolisme des souris.

La superposition des images obtenues en PET dynamique et IRM montre une accumulation préférentielle de la radioactivité dans les organes régissant les métabolismes urinaire (vessie, régions corticale et médullaire des reins) et hépatique (foie, vésicule biliaire et intestins) (Figure 61). Au cours du temps, nous pouvons observer au niveau des reins, une accumulation de la radioactivité tout d'abord dans la région corticale du rein, puis médullaire et ensuite dans la vessie (Figure 61B). La Nanofitine anti-EGFR B10-Cys couplée au  $^{18}\text{F}$ -FBEM possède une masse moléculaire inférieure à 30kDa, est hydrophile (LogP négatif) et est chargée positivement à pH plasmatique. Ces différentes caractéristiques permettent à la Nanofitine d'être filtrée au niveau du glomérule (région corticale du rein). Nous pouvons alors supposer, à l'instar des autres protéines de faible poids moléculaire, qu'elle est métabolisée au niveau du tube proximal (région médullaire du rein) et que les fragments peptidiques et acides aminés résultants sont ensuite relargués dans la circulation systémique et dans les voies excrétrices (vessie) [45].



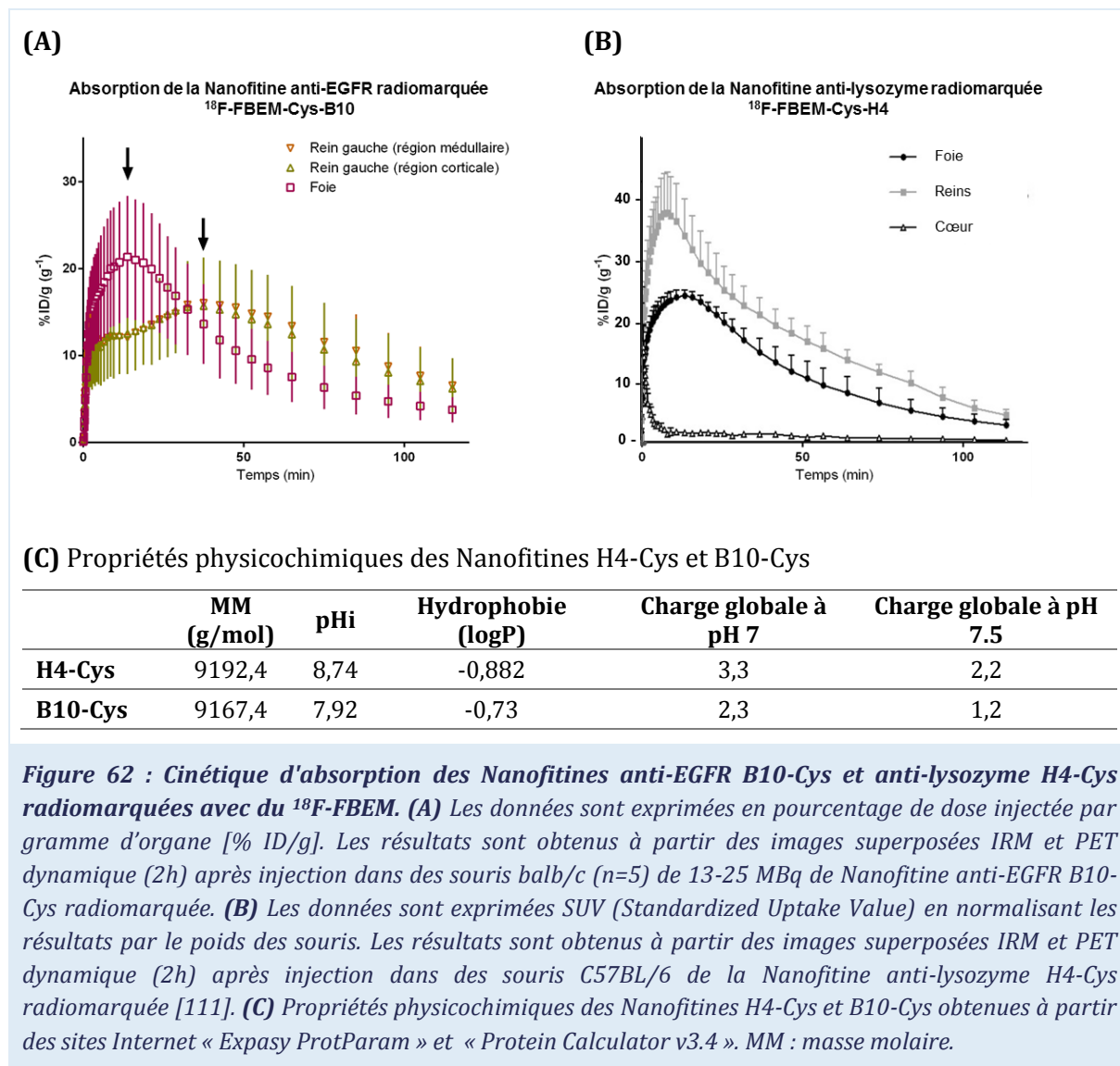
Après pénétration des protéines dans les hépatocytes, les vésicules endocytotiques fusionnent avec les lysosomes ou directement avec la membrane du canalicule biliaire. Les protéines sont ensuite métabolisées par des peptidases en fragments peptidiques et acides aminés renvoyés dans la circulation sanguine pour être éliminés par les voies d'excrétion classiques (poumons, peau, reins), ajoutés au pool d'acides aminés de l'organisme ou excrétés par exocytose dans la vésicule biliaire (élimination par les intestins) [45].

#### 4.4.3. Réactions croisées entre les récepteurs EGFR humain et murin

Contrairement à la Nanofitine anti-lysozyme H4-Cys radiomarquée, présentant un maximum de radioactivité dans les reins et le foie à 10-15 minutes après injection dans des souris C57BL/6 (Figure 62B), nous pouvons observer pour la Nanofitine  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 un maximum d'absorption à 13 min dans le foie et à 37 min dans les reins après injection dans des souris balb/c (Figure 62A). Les propriétés physicochimiques (poids, moléculaire, hydrophobicité,



pl) de ces deux Nanofitines étant très proches (Figure 62C), la différence de biodistribution provient donc essentiellement de la cible pharmacologique de la Nanofitine anti-EGFR B10.

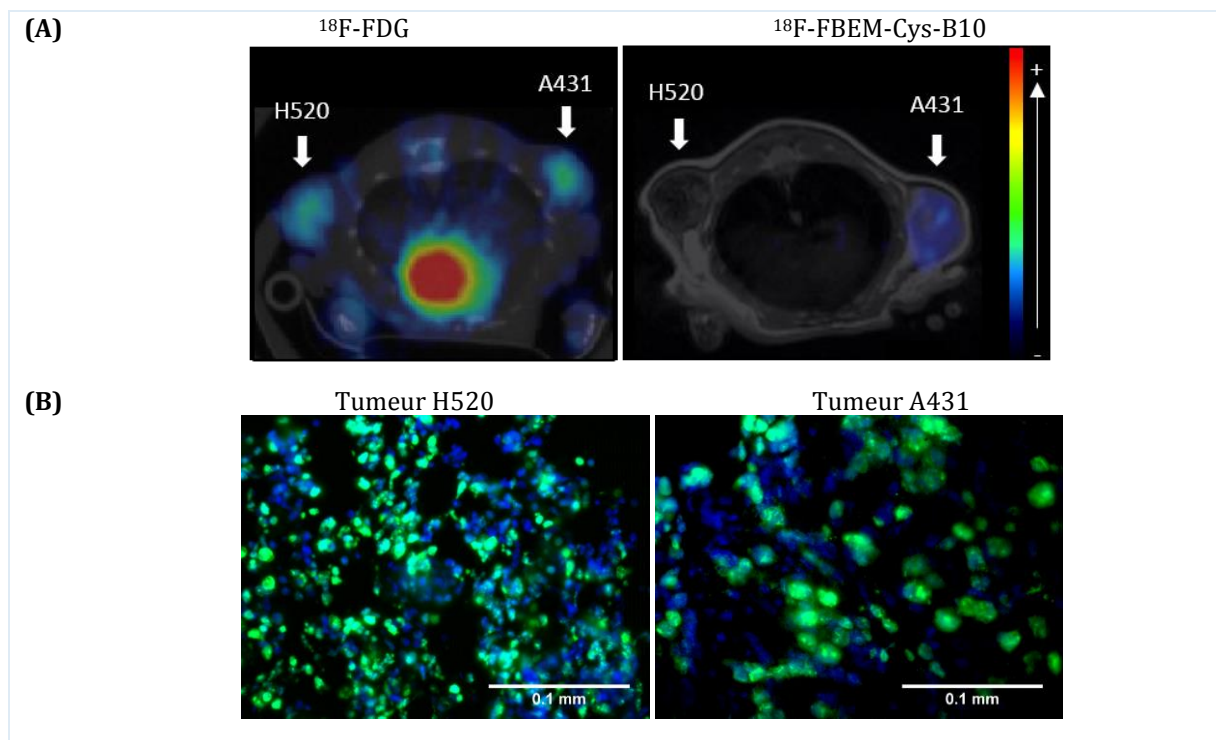


Les séquences protéiques des récepteurs EGFR humain et murin possédant 90,3% de similarités (Annexe 1), il est probable que la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys reconnaisse le récepteur EGFR murin fortement exprimé dans le foie [77]. Des études d'interférométrie de surface réalisées par l'entreprise Affilogic ont montré que la Nanofitine B10 possède une affinité pour l'EGFR humain de 27 nM et pour l'EGFR murin de 83 nM [207]. L'affinité pour le récepteur murin crée alors un phénomène de réaction croisée permettant d'expliquer en partie le métabolisme préférentiellement hépatique de la Nanofitine anti-EGFR.

## 4.5. Ciblage tumoral

### 4.5.1. Activité métabolique des tumeurs

Les tumeurs A431 ayant montré une tendance à la nécrose lors des études de pousse, il est nécessaire de vérifier l'activité métabolique de chaque tumeur à l'aide du  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG). Les images superposées PET/CT obtenues 1h après injection montrent une rétention similaire du  $^{18}\text{F}$ -FDG, suggérant ainsi que les deux tumeurs ont une activité métaboliquement équivalente (Figure 63A). Après injection de la Nanofitine  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 et sacrifice des souris, les tumeurs sont récupérées dans un fluide cryoprotecteur. La prolifération cellulaire des tumeurs est ensuite vérifiée en immunohistochimie en fluorescence par détection du facteur de prolifération cellulaire KI67 (Figure 63B). Les résultats obtenus permettent de confirmer que les deux types de tumeur ont une activité proliférative.

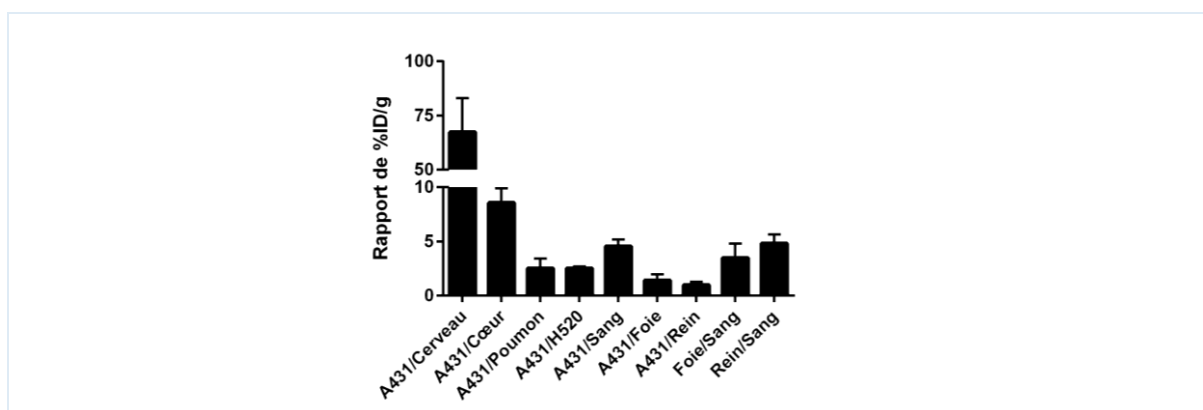


**Figure 63 : Ciblage de la tumeur EGFR-positif par la Nanofitine anti-EGFR radiomarquée  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10. (A) (à gauche) Coupes transversales superposées PET statique et CT 1h après injection de  $^{18}\text{F}$ -FDG (9 MBq). (à droite) Coupes transversales superposées PET statique et IRM obtenues 2h après injection de la Nanofitine  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 (19 MBq/100 $\mu\text{L}$ , 2,9 ng) avec approximativement 20  $\mu\text{g}$  de B10-Cys froid. (B) Immunohistochimie en fluorescence des tumeurs H520 (à gauche) et A431 (à droite) implantées sur les souris modèle EGFR. Détection de l'antigène KI67 (marqueur de prolifération présent en phase G1, S, G2 et M du cycle cellulaire) via un anticorps de rat anti-KI67 et un anticorps de chèvre anti-rat couplé à de l'AlexaFluor 488 (vert). Les coupes ont été recolorées avec du DAPI afin de visualiser les noyaux (bleu).**



#### 4.5.2. Absorption spécifique de la tumeur EGFR-positive

Après injection de la Nanofitine dans des souris modèle EGFR, nous observons en image superposée PET/IRM une accumulation de la radioactivité plus importante dans la tumeur A431 que dans la tumeur H520 (Figure 63A). Le comptage de la radioactivité montre une rétention significativement plus importante de la Nanofitine ( $P < 0,05$ ) dans les tumeurs EGFR-positives A431 ( $1,42 \pm 0,18\%$  ID/g) que dans les tumeurs EGFR-négatives H520 ( $0,56 \pm 0,10\%$  ID/g) avec un rapport d'absorption A431/H520 de  $2,53 \pm 0,18$  à 2h30 après injection (Figure 64). Cette accumulation dans les tumeurs A431 est similaire à celle observée avec l'*Affibody* anti-EGFR radiomarqué  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-Z1907 co-injecté avec une grande quantité d'*Affibody* anti-EGFR froid Ac-Cys-Z1907 ( $0,97 \pm 0,42\%$  ID/g à 3h après injection, 2-3  $\mu\text{g}$  de protéines radiomarquées pour 500  $\mu\text{g}$  de protéines froides) [30].



**Figure 64 : Rapport d'absorption de la Nanofitine  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 injectée dans les souris modèle EGFR.** Les données sont exprimées en ratio de pourcentage de dose injectée par gramme d'organe [% ID/g]  $\pm$  SD 2h30 après injection ( $n = 4$ ).

Le rapport d'absorption A431/sang ( $4,55 \pm 0,63$ ) confirme que les Nanofitines sont de bonnes protéines alternatives aux anticorps en ce qui concerne l'imagerie de tumeur, car celles-ci montrent généralement un rapport tumeur/sang en-dessous de deux 24 h après injection dans des modèles tumoraux avec A431 [214, 213]. Ce rapport reste proche de celui de l'*Affibody*  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-Z1907 co-injecté avec une grande quantité d'*Affibody* anti-EGFR froid ( $7,76 \pm 1,29$  à 3h après injection) [30]. Les rapports d'absorption A431/foie ( $1,43 \pm 0,52$ ), A431/rein ( $0,98 \pm 0,29$ ), foie/sang ( $4,80 \pm 1,05$ ) et rein/sang ( $6,74 \pm 2,30$ ) montrent une forte métabolisation de la Nanofitine pouvant expliquer le faible ratio A431/sang. Plus la Nanofitine sera métabolisée vite, moins il y aura de protéines disponibles pour se fixer sur la tumeur.

#### 4.5.3. Absorption non-spécifique dans la tumeur EGFR-négative

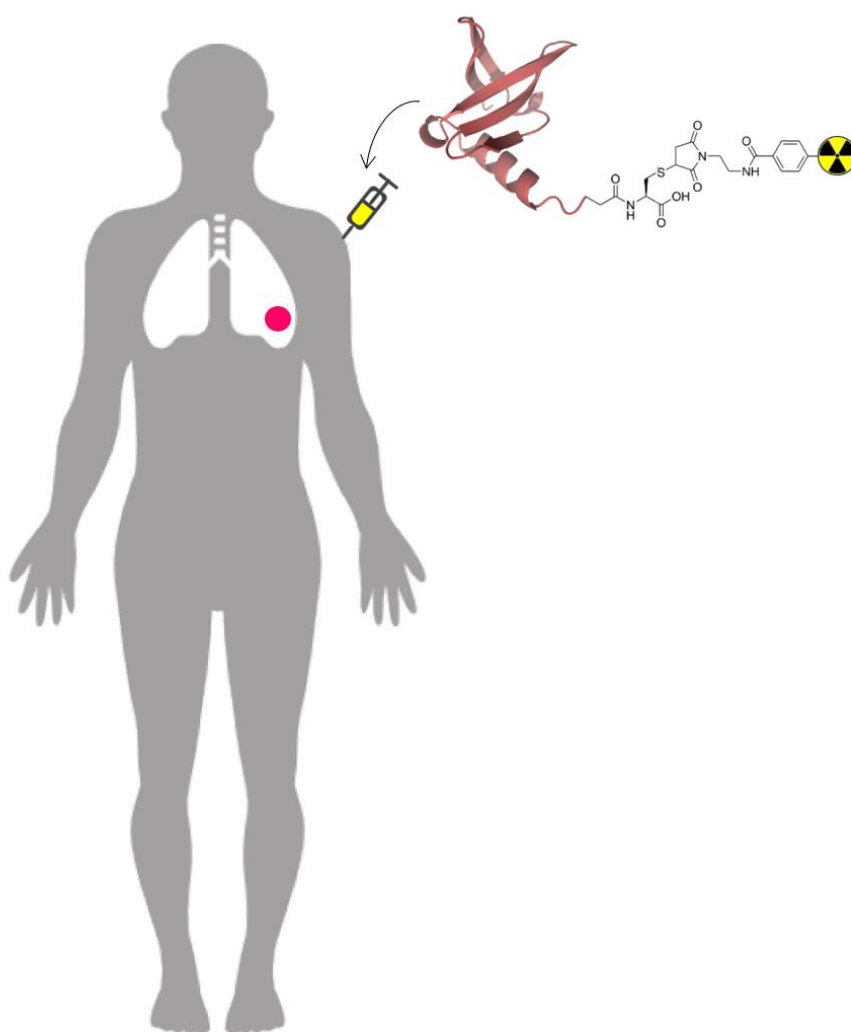
L'absorption non spécifique de la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys dans la tumeur EGFR-négative H520 peut être due à l'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*). L'endothélium vasculaire des tumeurs présente de larges fenestrations permettant l'absorption de macromolécules dans le milieu interstitiel des tumeurs et diminuant ainsi leur clairance. L'effet EPR a déjà été décrit lors de l'utilisation d'anticorps dans le diagnostic tumoral et est largement utilisé pour le traitement des cancers *via* des nanoparticules.

#### 4.6. Conclusion et perspectives

Au cours de ces travaux, nous avons réussi à marquer de manière régiosélective la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys avec un rendement radiochimique corrigé de  $45 \pm 14\%$  ( $n = 6$ ) (correspondant à environ 50 ng de Nanofitine marquée en présence de 100  $\mu\text{g}$  de Nanofitine non-marquée). La Nanofitine anti-EGFR B10-Cys ne pénétrant pas à l'intérieur des cellules A431, elle permet l'utilisation de ce nouveau radiopharmaceutique pour le *monitoring* de patient lors d'une thérapie dirigée spécifiquement contre les tumeurs EGFR-positives. La faible proportion de Nanofitine radiomarquée permet la saturation des EGFR endogènes (90,3% de similitude entre les récepteurs EGFR murin et humain) et le ciblage spécifique de la tumeur A431. L'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) va provoquer l'absorption non-spécifique des protéines dans la tumeur H520 et la fixation sur la tumeur A431, il y aura de fait moins de radioactivité disponible pour les organes du métabolisme. Un moyen d'augmenter la quantité de Nanofitine marquée serait de générer les Nanofitines par synthèse chimique et de les coupler directement au groupement prosthétique.

Le faible temps de demi-vie du fluor (110 min) et la petite taille de la Nanofitine ont permis l'acquisition des images PET 2h30 maximum après injection. Le faible ratio existant entre la tumeur A431 et le sang s'explique par la faible demi-vie de la protéine. Ce rapport peut être amélioré en augmentant l'affinité de la Nanofitine pour sa cible (par maturation d'affinité de la Nanofitine anti-EGFR B10 en *ribosome-display*) ou en créant des homo-dimères de Nanofitine anti-EGFR. Les temps de demi-vie biologique de ces homo-dimères étant similaire, nous garderons l'avantage d'une clairance rapide tout en favorisant le ciblage de la tumeur A431 par recrutement de plusieurs récepteurs à la surface des cellules tumorales.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES





## Chapitre 5 : Conclusion et perspectives

### 5.1. Conclusion concernant le travail de thèse

En accord avec le confort du patient, le radiotracer idéal pour l'imagerie en oncologie doit combiner une clairance rapide, une absorption tumorale efficace et un ciblage spécifique des cellules cancéreuses, permettant ainsi l'obtention d'une image avec un bon rapport tumeur sur bruit peu de temps après administration du radiotracer. Dans cette étude, nous avons introduit l'utilisation de Nanofitines comme nouveaux vecteurs en imagerie moléculaire pour le suivi non-invasif de patient en oncologie. Les Nanofitines possèdent un profil pharmacocinétique optimal avec un temps de demi-vie biologique très court et une forte affinité pour leur cible. La Nanofitine sélectionnée cible une protéine extracellulaire impliquée dans le développement et l'expansion des masses tumorales, l'EGFR, avec une affinité de l'ordre de la dizaine de nanomolaire. Le temps de demi-vie biologique de la protéine étant très court et l'application *in fine* du radiotracer étant de l'imagerie, nous avons choisi de la radiomarquer avec un radioélément possédant une demi-vie physique inférieure à 24 h. Ayant uniquement à disposition un scanner utilisant la technique de la PET pour les études d'imagerie, nous nous sommes orientés vers des émetteurs  $\beta^+$  produits au sein du Centre de Recherches du Cyclotron à Liège, le fluor-18 et le gallium-68. Le radiomarquage des vecteurs protéiques ou peptidiques à l'aide de  $^{18}\text{F}$  ou  $^{68}\text{Ga}$  s'effectue le plus souvent de manière indirecte en utilisant des groupements prosthétiques ou des cages de chélation. Les acides aminés, résidus lysine et cystéine, impliqués dans les réactions de couplage étant présents sur l'ensemble de la protéine, le radiomarquage se réalise alors de manière non-spécifique. Un autre aspect à prendre en compte est l'accessibilité en milieu hospitalier aux différents radioéléments. Le gallium-68 étant obtenu à l'aide d'un générateur de paillasse, il sera en théorie plus accessible que le fluor-18 obtenu par cyclotron.

L'objectif du présent travail de thèse était de développer un nouvel outil de suivi des patients en oncologie à l'aide d'une Nanofitine anti-EGFR marquée de manière site-spécifique, sans étape de couplage chimique, à un radioisotope de faible demi-vie physique, le gallium-68. L'idée initiale était d'éviter l'étape de marquage chimique des protéines, en produisant directement une Nanofitine fusionnée génétiquement avec un peptide capable de chélater le radioisotope. Au sein du laboratoire UFIP, UMR CNRS 6286, une étiquette peptidique phosphorylable, permettant l'immobilisation de Nanofitines phosphorylées sur des surfaces de phosphonate de zirconium, avait été développée. Les liaisons établies entre le cation métallique

Zr(IV) et les phosphates de la protéine phosphorylée étant stables, nous voulions utiliser cette capacité naturelle pour la chélation de cations métalliques en solution.

Dans la première partie de la thèse ([Chapitre 2](#)), nous avons réussi à développer un système bactérien permettant la co-expression d'une kinase et d'une Nanofitine fusionnée génétiquement à l'étiquette peptidique décrite précédemment. Après purification sur résine de fer(III), nous avons obtenu la Nanofitine phosphorylée *in vivo*. Dans le [Chapitre 3](#), nous avons montré grâce à des études de chélation mettant en jeu des peptides synthétiques et un lanthanide, le terbium(III), que la séquence de l'étiquette peptidique utilisée précédemment n'était pas optimale pour la chélation de cations en solution. En nous inspirant de séquences phosphorylées par la kinase et de la séquence d'une étiquette de fixation aux lanthanides, nous avons généré de nombreux mutants permettant la chélation du terbium(III) avec une affinité allant de 90 à 600 nM à pH 7 et de 450 nM à 2,5 µM à pH 5,5. L'insertion de résidus phosphorylables *in vitro* à la place des résidus acide glutamique (Glu) présents dans le site de chélation s'est accompagnée d'un travail sur l'environnement autour des résidus sérine pour favoriser leur phosphorylation par l'unité  $\alpha$  de la caséine kinase II humaine. Nous avons montré lors des études de titration une diminution de l'affinité pour le terbium(III) à pH 7 entre les mutants contenant les résidus Glu ( $\approx$  500 nM) et le mutant mono-phosphorylé ( $\approx$  1,5 µM). A l'inverse, en se plaçant à pH 5,5, nous avons pu observer une augmentation de l'affinité entre les mutants contenant les résidus Glu ( $\approx$  500 nM) et le mutant di-phosphorylé ( $\approx$  50 nM). L'augmentation de l'affinité à pH 5,5 est d'autant plus importante pour le terbium(III) que le nombre de résidus phosphorylés augmente. Les études de compétition réalisées à pH 5,5 entre le terbium(III) et le gallium(III) suggèrent néanmoins que l'affinité pour le gallium(III) reste faible (de l'ordre du micromolaire). De plus, le manque de reproductibilité observé à pH 5,5 pour les études de titration ou de compétition concernant les mutants phosphorylés laisse penser que le pH de l'étude n'est pas le plus adapté pour la chélation des cations. Il serait alors plus judicieux de travailler avec un cation possédant un rayon ionique proche de celui du gallium(III) et stable à pH 7, comme le cuivre(II). Le cuivre-64 étant un émetteur  $\beta^+$  avec un temps de demi-vie physique de 12,7 h, il permettrait la réalisation d'études en imagerie sur la journée. L'obtention d'une structure du complexe LBT diphosphorylé avec le Tb(III) serait intéressante pour contrôler le mode de chélation avec le métal et orienter les modifications ultérieures à effectuer sur cette séquence pour renforcer les interactions.

Dans le [Chapitre 4](#), nous avons réussi à radiomarquer au fluor-18 de manière régiosélective la Nanofitine anti-EGFR Cys-B10 en utilisant la fonction thiol d'un résidu cystéine unique inséré à l'extrémité C-terminale de la protéine et la fonction maléimide du groupement prosthétique  $^{18}\text{F}$ -FBEM. Les études de biodistribution et d'imagerie PET ont montré une faible

accumulation du radiotracer résultant,  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10, dans les organes sains lors de l'injection dans des souris saines ou dans des souris modèle EGFR. Les ratios exprimés entre les organes sièges du métabolisme et le sang confirment que les Nanofitines ont une faible demi-vie biologique. En imagerie PET sur les souris modèle EGFR, nous avons pu observer une meilleure rétention de la protéine  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 dans la tumeur sur-exprimant EGFR comparée à l'absorption dans la tumeur EGFR-négative. Les études de biodistribution ont également montré qu'il y avait presque cinq fois plus de radioactivité dans la tumeur EGFR-positif que dans le sang 2h30 après injection. L'anticorps anti-EGFR Cetuximab présentant un ratio tumeur EGFR-positif/sang en-dessous de 2 une journée après injection, nous pouvons affirmer que la  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 est une bonne alternative à l'utilisation d'anticorps pour l'imagerie *in vivo* de tumeurs EGFR-positives. Grâce à son faible poids moléculaire et son ciblage spécifique *in vivo*, la Nanofitine  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 a montré une pénétration tumorale prompte et efficace avec une clairance plasmatique rapide, permettant ainsi l'obtention d'images tumorales avec un bon contraste dans un court délai après injection. L'ensemble des résultats obtenus suggère que les radiotraceurs conçus à l'aide de Nanofitines, comme le  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10, ont un fort potentiel clinique quant à leur utilisation en imagerie et suivi thérapeutique des patients en oncologie.

Au cours des différentes études présentées, nous avons montré qu'il était possible d'utiliser une étiquette phosphorylée *in vitro* ou *in vivo* pour chélater des ions en solution, et que la Nanofitine anti-EGFR pouvait être utilisée comme agent d'imagerie grâce à son faible poids moléculaire et sa forte affinité pour EGFR. L'objectif final étant d'étendre la stratégie de marquage *chemistry-free* développée dans le chapitre 3 au marquage de la Nanofitine anti-EGFR, il faudrait compléter ce travail de thèse en vérifiant la stabilité du complexe Nanofitine-radiométal formé *in vitro* (études de trans-chélation/trans-métallation, stabilité à 37°C dans du tampon et du plasma, etc.), puis *in vivo* dans des souris saines et des souris modèle EGFR en ayant comme contrôle l'injection du radioélément seul.

## 5.2. Perspectives quant à l'utilisation des Nanofitines en clinique

Les images TEP obtenues avec un bon contraste dans le chapitre 4 ont permis de valider la preuve de concept quant à l'utilisation des Nanofitines en tant qu'outil en imagerie médicale, mais également en tant qu'outil pour le développement préclinique de Nanofitines à visée thérapeutique.

Les premières images PET de Nanofitines ont été obtenues pour une Nanofitine qui ne pénètre pas à l'intérieur des cellules tumorales. Si nous voulons utiliser les Nanofitines à des fins

radiothérapeutiques, la faible demi-vie biologique permettrait de limiter la dose de radiations délivrées aux organes sains. Dans cette optique, il serait intéressant de travailler sur l'augmentation de l'affinité de la Nanofitine pour sa cible par maturation d'affinité. La génération d'homo- ou d'hétéro-dimères de Nanofitine pourrait également favoriser la fixation sur différents récepteurs exprimés à la surface des cellules tumorales et donc la pénétration cellulaire. Les radioéléments utilisés en radiothérapie sont les émetteurs  $\alpha$  (bismuth-213 ( $t_{1/2} = 45,6$  min), astate-211 ( $t_{1/2} = 7,2$  h), etc.) et les émetteurs  $\beta^-$  (cuivre-67 ( $t_{1/2} = 2,6$  j), lutétium-177 ( $t_{1/2} = 6,7$  j), yttrium-89 ( $t_{1/2} = 2,7$  j), etc.). La grande proportion de radiométaux ( $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{89}\text{Y}$ , etc.) laisse supposer que nous pourrions utiliser la stratégie développée dans ce manuscrit qui consiste à utiliser des protéines phosphorylées pour la chélation de cations à condition de pouvoir augmenter l'affinité de l'étiquette peptidique pour ces métaux. Une stratégie permettant de favoriser la fixation de la Nanofitine à sa cible serait d'augmenter le temps de résidence de la protéine. L'ajout d'un domaine de fixation à l'albumine a ainsi permis de diviser par trois l'absorption rénale et de multiplier par deux l'absorption tumorale d'un *Affibody* anti-HER2 [60].

Une autre stratégie pour l'application thérapeutique consiste à fonctionnaliser des nanovecteurs contenant une drogue anti-cancéreuse, comme les nanocapsules lipidiques ou les liposomes, avec des Nanofitines. Les nanovecteurs fonctionnalisés ayant une taille supérieure à 70 kDa, ils devraient avoir un temps de résidence plus important et, grâce à leur spécificité, les Nanofitines devraient permettre le ciblage efficace des cellules tumorales. La présence de plusieurs protéines d'affinité à la surface des nanovecteurs devrait pouvoir favoriser la fixation aux cellules.



## Chapitre 6 : Matériel et méthodes<sup>16</sup>

### 6.1. Composition des tampons, solutions et milieux

*Tableau 16: Composition des tampons, solutions et milieux*

Nom	Composition	pH
<b>Eluant QMA</b>	4.5 mg Kryptofix 222/500 $\mu$ L CH <sub>3</sub> CN + 0.69 mg K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /80 $\mu$ L H <sub>2</sub> O	-
<b>Milieu A431</b>	500 mL de milieu DMEM HG supplémenté en L-glutamine, 50 mL de FBS désactivé et 5 mL de Pénicilline-Streptomycine	-
<b>Milieu H520</b>	500 mL de milieu RPMI supplémenté en L-glutamine, 50 mL de FBS désactivé et 5 mL de Pénicilline-Streptomycine	-
<b>Milieu LB</b>	10 g/L de tryptone, 5 g/L de levure, 10 g/L de NaCl	7
<b>Milieu LB-Agar</b>	15 g d'agar/L de milieu LB	7
<b>Milieu LB-TSS</b>	16.5 mM PEG-6000, 104 mM MgSO <sub>4</sub> , 703.5 mM DMSO	-
<b>PBS</b>	10 mM tampon phosphate, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl	7,4
<b>Solution DPEA</b>	20 $\mu$ L DIPEA dans 4 ml dans CH <sub>3</sub> CN/Et <sub>2</sub> O (1:1)	-
<b>Solution D Pro-Q</b>	20% CH <sub>3</sub> CN/50 mM AcONa	4
<b>Solution F Pro-Q</b>	MeOH 50%/CH <sub>3</sub> COOH 10%	-
<b>Solution Maléimide-DECP</b>	10 mg de trifluoroacétate de <i>N</i> -(2-Aminoethyl) maléimide dans 4 ml CH <sub>3</sub> CN/Et <sub>2</sub> O (1:1) + 20 $\mu$ L DECP (60 $\mu$ mol)	-
<b>Solution P</b>	20 mg de FB-précurseur dans 1 mL DMF	-
<b>Tampon A</b>	150 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 50 mM imidazole	7,4
<b>Tampon B</b>	150 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole	7,4
<b>Tampon E</b>	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2.5 mM D-desthiobiotine	8
<b>Tampon EM</b>	150 mM Hydrogénophosphate de disodium, 300 mM imidazole	8
<b>Tampon EPP</b>	50 mM phosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), 500 mM NaCl	7,4
<b>Tampon P</b>	50 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 10% glycerol, 1,25 mM DTT, 0.01% Triton X-100	7,5
<b>Tampon R</b>	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM HABA, 1 mM EDTA	8
<b>Tampon T</b>	20 mM HEPES, 100 mM NaCl	7
<b>Tampon 10x Tris/Glycine/SDS</b>	250 mM Tris, 1,92 M glycine, 1% SDS	8,3
<b>Tampon W</b>	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl	8
<b>Tampon WM</b>	200 mM Hydrogénophosphate de disodium	7,4
<b>Tampon WPP</b>	50 mM MES, 500 mM NaCl	5,5
<b>TB+</b>	10 mM PIPES, 250 mM KCl, 15 mM CaCl <sub>2</sub> , 55 mM MnCl <sub>2</sub>	6,7
<b>TBS-500</b>	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl	7,4

<sup>16</sup> Les références des produits ainsi que les fournisseurs sont fournis en Annexe 3 : Produits et matériel.

## 6.2. Amorces et souches bactériennes

**Tableau 17 : Amorces générées pour les besoins du projet**

Nom	Séquence 5' -> 3'
<b>Primer 01</b>	ATTGTAGACCAAAGCCATGACAAAAACG
<b>Primer 02</b>	TACAATGAGCTCCATGGTTAATTCCTCCTGTTAGCCCAAAAAACGGGTATGG
<b>Primer 03</b>	ATTGTAGAGCTCATGTCCGGTCCGGTCC
<b>Primer 04</b>	TACAATAAGCTTAAGCTT TACTA CTGCTGAGC
<b>Primer 05</b>	ATTGTAGTCGACCTAGCCAAGCTTAATTAATGACTGAGCCTGCAGTTGGACTCCTGTTG ATAGAT
<b>Primer 06</b>	CCAAGCTAGCTTGGATTCTC
<b>Primer 07</b>	CACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAAC
<b>Primer 08</b>	TACAATCTGCAGTCATTACTCATCTTCGGAGGAGGAGTCGGAATCTTCTTCAAGCTTGG CTAGGTCCGAC
<b>Primer 09</b>	ACCATCACGGATCCGTCAAGGTGAAATTC
<b>Primer 10</b>	CCATATAAAGCTTTTTCTCGCGTTCCGCACGCGCTAACATATCTAATAACTCTTTCGGG GC
<b>Primer 11</b>	CTCATCCGCCAAAACAG
<b>Primer 12</b>	TACAATGGATCCTGCATATAGTTCATCTCCTTCTATCCATCCATCATTTGTTGTATCTA TAAATCCCATGGTTAATTTCTCCTCTTAAATG
<b>Primer 13</b>	GAACTATATGAAGGATCCGTC
<b>Primer 14</b>	GACGGATCCTTCATATAGTTC
<b>Primer 15</b>	GGGATTTATAGATGCGAACAATGATGGATG
<b>Primer 16</b>	CATCCATCATTGTTTCGCATCTATAAATCCC
<b>Primer 17</b>	CGAACAATGATGGATGGATATCTGGAGATTCTCTATATGAAGGATCCGTC
<b>Primer 18</b>	GACGGATCCTTCATATAGAGAATCTCCAGATATCCATCCATCATTGTTCCG
<b>Primer 19</b>	GAGATTCTCTAGATGAAGGATCC
<b>Primer 20</b>	GGATCCTTCATCTAGAGAATCTC
<b>Primer 21</b>	GAGATGAACTAGATGAAGGATCC
<b>Primer 22</b>	GGATCCTTCATCTAGTTCATCTC
<b>Primer 23</b>	GAACAATGATGGATACATATCTGGAGATTC
<b>Primer 24</b>	GAATCTCCAGATATGTATCCATCATTGTTTC
<b>Primer 25</b>	GAACAATGATGGATACATAGAAGGAGATG
<b>Primer 26</b>	CATCTCCTTCTATGTATCCATCATTGTTTC
<b>Primer 27</b>	CATAGAAGGAGATGAACTATATGAAGGATCCGTC
<b>Primer 28</b>	GACGGATCCTTCATATAGTTCATCTCCTTCTATG
<b>Primer 29</b>	CATATCTGGAGATGAACTATATGAAGGATCCGTC
<b>Primer 30</b>	GACGGATCCTTCATATAGTTCATCTCCAGATATG
<b>Primer 31</b>	GGATGTTAATGACTGAGCCTGCAGTTG
<b>Primer 32</b>	GAACTGCGGGTGGCTCCAGCTTGCCATAGTTAATTTCTCCTCTTAAATGAATTC
<b>Primer 33</b>	TGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAGGATCCGTCAAGGTGAAATTC
<b>Primer 34</b>	CAACTGCAGGCTCAGTCATTAACATCCAAGCTTTTTCTCGCGTTCGCG

**Tableau 18 : Souches d'*Escherichia coli* utilisées**

<b>E. coli</b>	<b>Génotype</b>	<b>Résistance aux antibiotiques</b>
<b>BL21(DE3)</b>	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Aucune
<b>TOP10</b>	F <sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-	Aucune
<b>DH5αLacI<sup>q</sup></b>	F <sup>+</sup> proA+B+ lacI <sup>q</sup> Δ lacZ M15/ fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV gal R(zgb-210::Tn10)TetS endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5	Kanamycine à 25 µg/mL

### 6.3. Génie génétique

#### 6.3.1. Techniques utilisant la « Réaction en Chaîne par Polymérase » (PCR)

##### 6.3.1.1. Génération de l'insert 1 par PCR pour la création du vecteur pCKII $\alpha$

**Tableau 19 : Protocole et mix de PCR classique**

	Pour 1 échantillon	Pour 3 échantillons	Programme	
Eau MilliQ sans DNase/RNase	36 $\mu$ L	108 $\mu$ L	98°C	30 sec
Tampon phusion HF 5x	10 $\mu$ L	30 $\mu$ L	98°C	10 sec
Mix dNTPs (10 mM)	1 $\mu$ L	3 $\mu$ L	<b>51°C<sup>17</sup></b>	30 sec
Amorce sens (10 $\mu$ M) : Primer 01	1 $\mu$ L	3 $\mu$ L	72°C	2 min 30
Amorce anti-sens (10 $\mu$ M) : Primer 02	1 $\mu$ L	3 $\mu$ L	72°C	5 min
Phusion polymérase (2U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L	1.5 $\mu$ L	14°C	$\infty$

Du « mix PCR » (49,5  $\mu$ L) est mis en contact dans chaque tube PCR avec du pBAD33 (0,5  $\mu$ L, entre 50 et 150ng) ou de l'eau MilliQ DNase/RNase free (0,5 $\mu$ L). L'amplification est ensuite contrôlée par dépôt des échantillons sur un gel d'agarose<sup>18</sup> à 1,5% contenant du GelGreen® (5 $\mu$ L/50mL de solution d'agarose). Les échantillons sont ensuite purifiés sur gel d'agarose à l'aide du kit QIAquick® gel extraction kit<sup>19</sup>. L'ADN est élué avec de l'eau préalablement chauffée à 65°C et la concentration évaluée par mesure de l'absorbance à 260nm *via* un Nanodrop. Le produit de PCR est ensuite digéré par les enzymes de restriction MluI et SacI<sup>20</sup> (voir partie « Digestion par les enzymes de restriction »).

**Tableau 20: Vecteurs et inserts obtenus par PCR**

Produit obtenu	Matrice	Amorces	Température d'hybridation	Enzymes de restriction	Insert	Vecteur digéré
<b>Insert 2</b>	puc57-gCKII	Primer 03 Primer 04	51°C	SacI et HindIII	CKII	-
<b>pCKII<math>\alpha</math></b>	Insert 1 + Insert 2	Primer 01 Primer 04	51°C	MluI et HindIII	RBS-CKII	pBAD33
<b>pAFG17</b>	pAFG06	Primer 05 Primer 06	55°C	SalI et NheI	MCS	pAFG06
<b>pAFG18</b>	pAFG17	Primer 07 Primer 08	55°C	BamH1 et Pst1	MCS-TagP4	pAFG17
<b>pNF2</b>	pNF1	Primer 09 Primer 10	55°C	BamH1 et HindIII	H4	pAFG18
<b>pAFG10-LBT</b>	pAFG10	Primer 07 Primer 12	53°C	EcoR1 et BamH1	LBT	pAFG10

<sup>17</sup> Varie en fonction des amorces (voir Tableau 3).

<sup>18</sup> Si le nombre de paires de bases de l'échantillon est  $\leq$  500pb, un gel à 1.5% en agarose est réalisé. Sinon, il est conseillé de faire un gel agarose à 1%.

<sup>19</sup> S'il n'y a qu'une bande apparente, le produit de PCR est purifié à l'aide du QIAquick® PCR purification kit.

<sup>20</sup> Les enzymes varient en fonction des sites de restriction présents dans les amorces (voir Tableau 1 et 3).

6.3.1.2. Création des mutants LBT par mutagenèse dirigée

**Tableau 21 : Mix mutagenèse dirigée**

	Pour 1 échantillon	Pour 3 échantillons	Programme	
Eau MilliQ sans DNase/RNase	41 µL	123 µL	95°C	30 sec
Tampon Pfu + MgSO <sub>4</sub> 10x	5 µL	30 µL	95°C	30 sec
Mix dNTPs (10 mM)	1 µL	3 µL	50°C	1 min
Amorce sens (10 µM) : Primer 01	1 µL	3 µL	68°C	7 min
Amorce anti-sens (10 µM) : Primer 02	1 µL	3 µL	14°C	∞
Pfu polymérase	1 µL	3 µL		

Du « mix mutagenèse dirigée » (49 µL) est mis en contact dans chaque tube PCR avec de la matrice (1µL, entre 20 et 50ng) ou de l'eau MilliQ DNase/RNase free (1µL). Après réalisation du programme PCR, 1µL d'enzyme de restriction DpnI est ajouté à chaque tube PCR afin de digérer les vecteurs natifs. L'incubation est réalisée pendant 1h à 37°C. La réaction de PCR est ensuite contrôlée par dépôt des échantillons sur un gel d'agarose à 1% contenant du GelGreen® (5µL/50mL de solution d'agarose). Des DH5αLacI<sup>a</sup> sont transformées avec les échantillons préalablement purifiés à l'aide du kit « MinElute® PCR Purification Kit ». Une pré-culture de chaque colonie est réalisée en incubant une colonie dans 10 mL de LB supplémenté en ampicilline. Après incubation à 37°C pendant une nuit, un stock glycérol est réalisé en mettant dans un cryotube de 2 mL 700 µL de pré-culture et 300 µL de glycérol à 80%. Le stock glycérol obtenu est conservé à -80°C. Après extraction plasmidique, la séquence du vecteur est vérifiée par séquençage automatisé (société GATC) en utilisant l'amorce Primer 06.

Vecteur obtenu	Amorces	Matrice
<b>pLBT1</b>	Primer 13 et Primer 14	pLBT+
<b>pLBT2</b>	Primer 15 et Primer 16	pLBT1
<b>pLBT2-2S</b>	Primer 17 et Primer 18	pLBT2
<b>pLBT3-2S</b>	Primer 19 et Primer 20	pLBT2-2S
<b>pLBT3</b>	Primer 21 et Primer 22	pLBT2
<b>pLBT4-2S</b>	Primer 23 et Primer 24	pLBT3-2S
<b>pLBT4</b>	Primer 25 et Primer 26	pLBT3
<b>pLBT5</b>	Primer 27 et Primer 28	pLBT3
<b>pLBT5-1S</b>	Primer 29 et Primer 30	pLBT3-2S

**Figure 65 : Vecteurs pLBT générés par mutagenèse dirigée**

### 6.3.2. Digestion par les enzymes de restriction

L'ensemble des réactions de digestion a été réalisé avec des enzymes FastDigest dans un volume réactionnel de 100  $\mu$ L. Nous avons digéré entre 2-3  $\mu$ g de vecteur pour obtenir une quantité suffisante d'insert et de matrice digérés après une purification sur gel. De la phosphatase alcaline FastAP est ajoutée dans le tube contenant la matrice à digérer. Après incubation à 37°C, le produit de digestion est vérifié sur un gel d'agarose (1.5% :  $\leq$  500pb, 1% :  $>$  500pb) contenant du GelGreen® (5 $\mu$ L/50mL de solution d'agarose). Les échantillons sont ensuite purifiés soit à l'aide d'un kit de purification de produit PCR lorsqu'il n'y a qu'une bande apparente (QIAquick® PCR purification kit), soit à l'aide d'un kit de purification sur gel d'agarose s'il y a plusieurs bandes apparentes (QIAquick® gel extraction kit). L'ADN est élué avec de l'eau préalablement chauffée à 65°C. La concentration en ADN est évaluée par mesure de l'absorbance à 260nm *via* un Nanodrop®. Les échantillons peuvent être stockés à -20°C.

### 6.3.3. Ligation

Les réactions de ligation ont été réalisées avec 100ng de matrice digérée et 20ng d'insert à l'aide de la T4 DNA ligase dans un volume réactionnel de 10 $\mu$ L. Un témoin négatif sans insert est réalisé. La ligation est réalisée en incubant le mélange réactionnel à température ambiante pendant 30min. La ligase est inactivée par chauffage (10 min, 65°C). Les vecteurs vides sont éliminés par digestion via l'enzyme FastDigest KpnI<sup>21</sup> (1 $\mu$ L) en présence de MgCl<sub>2</sub> (50mM, 6 $\mu$ L) dans un volume réactionnel de 40 $\mu$ L. Après incubation (15 min, 37°C), l'enzyme est inactivée par chaleur (5min, 80°C) et le produit de ligation peut être utilisé pour transformer des bactéries.

### 6.3.4. Bactéries compétentes et transformation bactérienne

#### 6.3.4.1. Préparation des bactéries TOP10 compétentes : Méthode SEM [142]

Une carotte du stock glycérol de TOP10 est inoculée dans 10 mL de milieu LB<sup>22</sup> et incubée sur la nuit à 37°C sous agitation. La pré-culture obtenue est ensuite ajoutée à du milieu LB (0,1 mL de pré-culture par L de LB). Après incubation à 37°C jusqu'à  $0,4 < DO_{600nm} < 0,5$ , la culture est transférée dans des tubes Falcon™ de 50mL pré-refroidis. Le culot obtenu après centrifugation (15 min, 2500g, 4°C) est repris en chambre froide par agitation douce dans 2 mL de TB+ froid.

---

<sup>21</sup> Il est nécessaire de choisir un site de restriction enzymatique présent dans le site de multi-clonage du vecteur vide et absent de l'insert.

<sup>22</sup> Dans le cas de l'utilisation de DH5 $\alpha$ LacI<sup>q</sup>, il faut supplémenter le milieu LB avec de la kanamycine à 25  $\mu$ g/mL.

Après 15 min d'incubation à 4°C, le volume est complété à 16 mL avec du TB+. Le mélange réactionnel est ensuite agité doucement et incubé dans la glace pendant 15 min. Le culot obtenu après centrifugation (15 min, 2500g, 4°C) est repris dans 4 mL de TB+ froid et incubé dans la glace pendant 15 min. Les tubes sont ensuite regroupés et 560 µL de DMSO ajoutés. Les bactéries compétentes sont aliquotées en fraction de 50 µL et stockées à -80°C.

#### *6.3.4.2. Préparation des bactéries TOP10/pCKIIα compétentes : Méthode TSS [143]*

Une carotte du stock glycérol de TOP10/ pCKIIα est inoculée dans 10 mL de milieu LB supplémenté en chloramphénicol à 10 µg/mL et incubée sur la nuit à 37°C sous agitation. La pré-culture obtenue est ensuite ajoutée à du milieu LB supplémenté en chloramphénicol (200 µL de pré-culture pour 10 mL de milieu). Après incubation à 37°C jusqu'à  $0,4 < DO_{600nm} < 0,5$ , la culture est aliquotée en fraction de 1 mL. Le culot obtenu après centrifugation (5 min, 4500 g) est repris dans la glace avec 200 µL de LB-TSS. Les bactéries compétentes sont ensuite transformées avec le vecteur pCKIIα.

#### *6.3.4.3. Transformation bactérienne*

Du produit de ligation (5 µL) ou du vecteur purifié (20-100 ng) est ajouté à un aliquot de bactéries rendues compétentes selon la technique SEM ou TSS. Un choc thermique est réalisé en incubant les bactéries 30 min dans la glace, 50 s à 42°C (bain-marie) et 2 min de nouveau dans la glace. Du milieu LB (800 µL) est ajouté et l'ensemble est incubé 1 h à 37°C sous agitation. Après centrifugation (4500g, 5min, TA), le surnageant est éliminé par retournement. Le culot est ensuite re-suspendu avec le restant de milieu et étalé sur des boîtes LB-Agar supplémentées avec les antibiotiques nécessaires au maintien des sélections bactériennes et plasmidiques. Les boîtes sont incubées sur la nuit à 37°C.

#### *6.3.5. Extraction plasmidique des vecteurs dérivés de pQE30*

Des pré-cultures sont réalisées à partir de bactéries transformées ou d'un glycérol bactérien (1 colonie/10mL de LB supplémenté avec de l'ampicilline à 100 µg/mL). Après centrifugation (3220g, 10min, 4°C), le surnageant est éliminé et le vecteur extrait du culot bactérien grâce au QIAquick® spin miniprep kit. L'ADN est élué avec de l'eau préalablement chauffée à 65°C et sa concentration évaluée par mesure de l'absorbance à 260nm. Les échantillons sont envoyés pour séquençage à l'entreprise GATC.

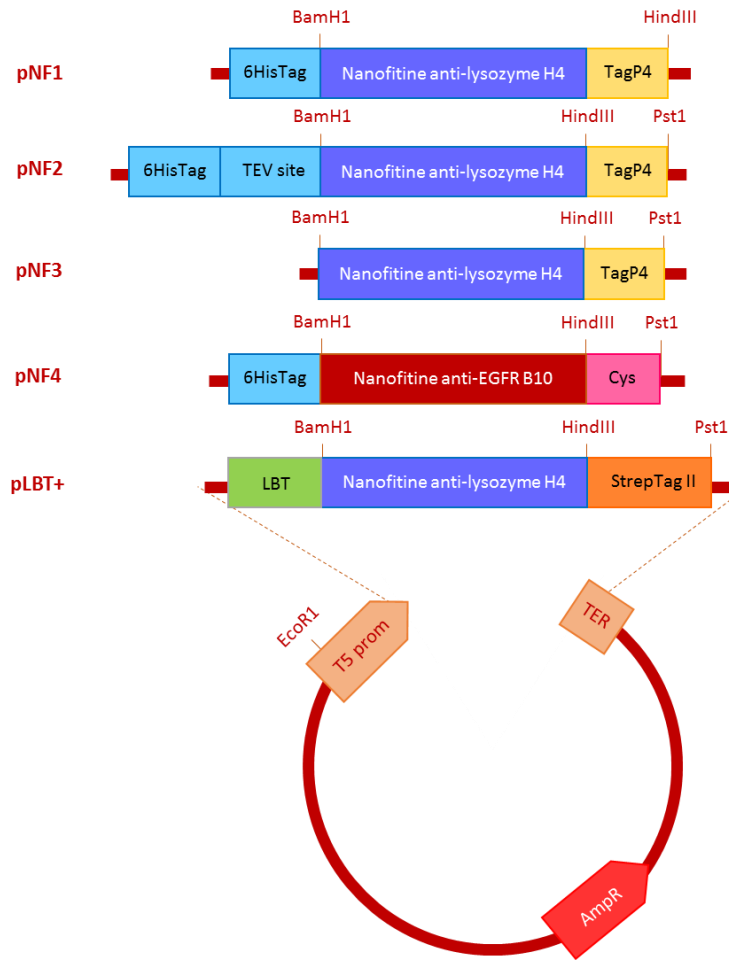


Figure 66 : Les vecteurs de type pAFG, pNF et pLBT dérivant du vecteur pQE30



## 6.4. Production et purification des protéines

### 6.4.1. Expression des Nanofitines

#### 6.4.1.1. Production des Nanofitines en *DH5αLacI*<sup>a</sup>

En milieu stérile, 200mL de LB, supplémenté avec de l'ampicilline (100 µg/mL), de la kanamycine<sup>23</sup> (25 µg/mL) et 0,1% en glucose, sont inoculés avec un volume de pré-culture nécessaire pour obtenir une  $DO_{600nm} \approx 0.07$ . La culture est incubée à 37°C sous agitation jusqu'à obtenir une  $0,6 < DO_{600nm} < 0,8$ . La production de la Nanofitine est induite par ajout de 100µL d'IPTG à 1M et incubation sur la nuit à 30°C sous agitation. Les cultures sont ensuite centrifugées (45 min, 3220 g, 4°C) et les Nanofitines sont purifiées selon leur étiquette de purification.

*NB : Pour les manipulations de co-expression les bactéries sont cultivées dans un milieu supplémenté en glucose (0,1%), ampicilline (100 µg/mL) et chloramphénicol (10 µg/mL). L'induction est réalisée avec de l'IPTG et de l'arabinose. Si la Nanofitine ne possède que le TagP4, se référer à la partie « Phosphorylation ex-vivo » pour la purification.*

#### 6.4.1.2. Purification des protéines possédant un 6HisTag

Les culots sont repris dans du tampon A (tampon de lavage) (5 mL/g de culot). De la DNaseI (5 µg/mL de tampon) et du Bugbuster® 10x (100 µL/mL de tampon) sont ajoutés et le mélange est incubé 1h sous agitation à 20°C. Après centrifugation (20min, 12 000 g, 4°C), le surnageant, correspondant à la fraction soluble, est récupéré et transféré dans un tube Falcon™ de 50mL. Dans une colonne, de la résine Ni(II)-NTA Superflow à 50% (1 mL à 50% => volume de résine (CV) = 500 µL, capacité 30 mg/mL de résine) est équilibrée avec 10 CV de tampon A. La fraction soluble est ensuite déposée (max 10CV) et la fraction non-retenue (notée NR) récupérée. La résine est lavée avec du tampon A (10 fractions de 1 CV = 10 \* 1 CV) et les fractions de lavage récupérées (notées LAV1 à LAV10). La protéine est ensuite éluée par compétition par excès d'imidazole avec 6 \* 1 CV de tampon B (tampon d'éluion) et les fractions d'éluion récupérées (notées EL1 à EL6). La concentration en protéines est évaluée par spectrophotométrie à 280 nm avec un Nanodrop® et la pureté des fractions d'éluion est évaluée par SDS-PAGE 17% en déposant

---

<sup>23</sup> Si production en TOP10, seulement de l'ampicilline.

2 µg de protéines/puit. Après migration, les fractions les plus concentrées sont rassemblées et concentrées sur Vivaspin 3kDa si nécessaire.

*NB : Les protéines possédant un StrepTagII sont purifiées sur résine StrepTactin superflow (capacité 3-15 mg/mL de résine) avec le tampon de lavage W. La protéine est éluée par compétition par excès de d-desthiobiotine avec 6 \* 0,5 CV de tampon E. La résine est ensuite régénérée en ajoutant du tampon R (solution commerciale contenant de l'EDTA) selon le protocole fournit par le fournisseur (IBA Technologies).*

#### 6.4.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE)

La technique du SDS-PAGE est réalisée en condition dénaturante (élimination des liaisons hydrogène) et permet de séparer les espèces protéiques en fonction de leur poids moléculaire. Les Nanofitines étant des petites protéines, nous avons choisi une concentration en polyacrylamide de 17% permettant de séparer les protéines de faible poids moléculaire.

	<b>Gel de migration</b>	<b>Gel de concentration</b>
<b>Acrylamide</b>	17%	5%
<b>Tris 100 mM pH 8,8</b>	3,8 mL	-
<b>Tris 100 mM pH 6,8</b>	-	630 µL
<b>SDS 10%</b>	150 µL	50 µL
<b>APS 10%</b>	150 µL	50 µL
<b>TEMED</b>	6 µL	5 µL
<b>Volume total</b>	15 mL	5 mL

Les échantillons (volume échantillon + qsp 15 µL avec de l'eau + 5 µL de tampon de charge) sont chauffés à 95°C pendant 5 min en présence de bleu de charge (5 µL). La présence de β-mercaptoéthanol dans le bleu de charge permet de réduire les ponts disulfures. Après une migration de 90 min à 150 V, les gels sont colorés soit au bleu de Coomassie soit au ProQDiamond®.

#### 6.4.3. Coloration des gels polyacrylamide à 17%

##### 6.4.3.1. Au bleu de coomassie : « Fast Protocol »

Les gels sont mis dans les cuves de migration et recouverts de tampon Tris/Glycine/SDS 1x. Les échantillons et 5µL de marqueur de taille PageRuler™ Plus sont déposés dans les puits. Une

fois la migration réalisée (90 min à 150V), les gels sont immergés dans de l'eau (100 mL) et chauffés au four micro-ondes (cuisson douce, 2 min) (x2). Les gels sont colorés dans du PageBlue™ (50 mL, chauffer au four micro-ondes (cuisson douce, 1 min) et ensuite décolorés dans de l'eau (100 mL, 3 h).

#### *6.4.3.2. Double coloration ProQDiamond et bleu de Coomassie*

Une fois les gels mis dans les cuves de migration et recouverts de tampon Tris/Glycine/SDS 1x. Les échantillons et 7µL de marqueurs de taille PeppermintStick™ (2µL de marqueur + 5µL de tampon de charge). Une fois la migration réalisée (90 min à 150V), les gels sont immergés dans 100mL de solution F Pro-Q pendant 30min sous agitation. Le bain est changé et les gels immergés de nouveau dans 100mL de solution F Pro-Q et incubés sur la nuit sous agitation. Les gels sont lavés trois fois dans 100 mL d'eau MilliQ pendant 10min, puis immergés dans 50mL de Pro-Q® Diamond. L'ensemble est chauffé au four à micro-ondes (cuisson douce) pendant 40s, puis les gels mis à agiter pendant 10min. Les gels sont de nouveau chauffés au four à micro-ondes pendant 20s et mis à agiter 10min. Les gels sont décolorés dans 100mL de solution D Pro-Q pendant 30min (x2) et lavés dans 100mL d'eau pendant 10min (x2). Les bandes représentant les protéines phosphorylées sont révélées à l'aide d'un GelDoc (BIORAD) en mode UV/trans (exposition 3s). Les gels sont ensuite incubés en présence de 50mL de PageBlue™ sur la nuit sous agitation. Les gels sont décolorés le lendemain dans de l'eau.

6.4.4. Propriétés physicochimiques des Nanofitines produites

**Tableau 22 : Propriétés physicochimiques des Nanofitines produites.<sup>24</sup>**

Nom	MM (g/mol)	Coeff. Ext. Mol.	pHi	Vecteur	Séquence protéique
<b>H4P</b>	9614,5	13980	5,61	pNF1	MRGSHHHHHHGSVKVFFWNGE EKEVDTSKIVVVKRAGKSVLFYD DNGKNGYGDVTEKDAPKELLDML ARAEREDSDSSEDE
<b>H4HP4</b>	11424,5	15470	5,65	pNF2	MRGSHHHHHHSSGRENLYFQGSV KVFFWNGEKEVDTSKIVVVKR AGKSVLFYDDNGKNGYGDVTEKD APKELLDMLARAEREKKLEEDSDS SSEDE
<b>H4P4</b>	9119,1	13980	4,66	pNF3	MGSVKVFFWNGEKEVDTSKIV VVKRAGKSVLFYDDNGKNGYGD VTEKDAPKELLDMLARAEREKKL EEDSDSSEDE
<b>B10-Cys</b>	9167,4	6990	7,92	pNF4	MRGSHHHHHHGS-B10-KLGC
<b>LBT-</b>	9164,4	19480	7,93	pLBT-	MGSVKVFFWNGEKEVDTSKIV VVKRAGKSVLFYDDNGKNGYGD VTEKDAPKELLDMLARAEREKKL AGSWSH PQFEK
<b>LBT+</b>	11175,5	26470	5,01	pLBT+	MGFIDTNDGWIEGDELYAGSVK VKFFWNGEKEVDTSKIVVVKRA GKSVLFYDDNGKNGYGDVTEKDA PKELLDMLARAEREKKLAGSWSH PQFEK
<b>LBT1</b>	11233,5	26470	4,89	pLBT1	MGFIDTNDGWIEGDELYEGSVK VKFFWNGEKEVDTSKIVVVKRA GKSVLFYDDNGKNGYGDVTEKDA PKELLDMLARAEREKKLAGSWSH PQFEK
<b>LBT2</b>	11203,5	26470	4,89	pLBT2	MGFIDANNDGWIEGDELYEGSVK VKFFWNGEKEVDTSKIVVVKRA GKSVLFYDDNGKNGYGDVTEKDA PKELLDMLARAEREKKLAGSWSH PQFEK
<b>LBT2-2S</b>	11119,4	26470	5,16	pLBT2-2S	MGFIDANNDGWISGDSLIEGSVK VKFFWNGEKEVDTSKIVVVKRA GKSVLFYDDNGKNGYGDVTEKDA PKELLDMLARAEREKKLAGSWSH PQFEK
<b>LBT3</b>	11155,4	24980	4,79	pLBT3	MGFIDANNDGWIEGDELDEGSVK VKFFWNGEKEVDTSKIVVVKRA GKSVLFYDDNGKNGYGDVTEKDA PKELLDMLARAEREKKLAGSWSH PQFEK
<b>LBT3-2S</b>	11071,3	24980	4,99	pLBT3-2S	MGFIDANNDGWISGDSLDEGSVK VKFFWNGEKEVDTSKIVVVKRA

<sup>24</sup> Les paramètres physicochimiques ont été calculés selon le site Internet « ExPASy ProtParam ».

					GKSVLFIYDDNGKNGYGDVTEKDA PKELLDMLARAEREKKLAGSWSH PQFEK
<b>LBT4</b>	11132,4	20970	4,79	pLBT4	MGFIDANNDGYIEGDELDEGSVK VKFFWNGEKEVDTSKIVWVKRA GKSVLFIYDDNGKNGYGDVTEKDA PKELLDMLARAEREKKLAGSWSH PQFEK
<b>LBT4-2S</b>	11048,3	20970	4,99	pLBT4-2S	MGFIDANNDGYISGDSLDEGSVK VKFFWNGEKEVDTSKIVWVKRA GKSVLFIYDDNGKNGYGDVTEKDA PKELLDMLARAEREKKLAGSWSH PQFEK
<b>LBT5</b>	11180,4	22460	4,89	pLBT5	MGFIDANNDGYIEGDELYEGSVK VKFFWNGEKEVDTSKIVWVKRA GKSVLFIYDDNGKNGYGDVTEKDA PKELLDMLARAEREKKLAGSWSH PQFEK
<b>LBT5-1S</b>	11138,4	22460	5,01	pLBT5-1S	MGFIDANNDGYISGDELYEGSVK VKFFWNGEKEVDTSKIVWVKRA GKSVLFIYDDNGKNGYGDVTEKDA PKELLDMLARAEREKKLAGSWSH PQFEK

## 6.5. Etudes de la phosphorylation

### 6.5.1. Phosphorylation *ex-vivo*

#### 6.5.1.1. Génération de résine de Fe(III)-NTA à 50% [160]

*Elimination du nickel(II)* : De la résine Ni(II)-NTA Superflow est culotée puis reprise dans quatre fois son volume en eau. Après centrifugation (1100 *g*, 2 min), le culot est repris dans trois fois son volume dans une solution d'EDTA à 100mM pH8. La résine est centrifugée (1100 *g*, 2 min) et reprise dans quatre fois son volume en eau. L'étape de chélation avec de l'EDTA est répétée jusqu'à décoloration complète de la résine. L'EDTA est ensuite éliminé en centrifugeant (1100 *g*, 2 min) et reprenant la résine avec de l'eau (x3).

*Fixation des ions fer(III)* : Après centrifugation (1100 *g*, 2 min), le culot est repris dans quatre fois son volume en solution de FeCl<sub>3</sub> 100mM (100mL de solution pour 10mL de résine). La résine est centrifugée (1100 *g*, 2 min) et le culot repris dans quatre fois son volume en acide acétique 0.1% (x3). Cette étape permet d'éliminer les ions fer(III) non-fixés. Après quatre lavages avec de l'eau (centrifugation à 1100 *g* pendant 2 min), les billes sont reprises dans 1 volume d'EtOH à 30%. La suspension à 50% peut se stocker 40jours à 4°C.

#### 6.5.1.2. Phosphorylation *ex-vivo* et purification des protéines obtenues

Après centrifugation (partie 6.4.1.1), les culots obtenus après co-expression sont repris dans du TBS-500 (5 mL/g de culot). De la DNaseI (5 µg/mL de tampon) et du PMSF à 100 mM (100 µL/mL de tampon) sont ajoutés et les bactéries lysées soit par sonication (pulse 6, intensité 80, par tranche de 2min), soit par chauffage (80°C, 15min). La fraction de lyse est obtenue après centrifugation (20 min, 12000 *g*, 4 °C) en transférant le surnageant dans un tube Falcon™ de 50mL. De l'ATP est ensuite ajouté pour être à 5 mM final. Des aliquots de 500µL sont réalisés et incubés sur la nuit à 30 °C sous agitation. Les protéines endogènes et la CKIIα sont précipitées en chauffant le mélange réactionnel pendant 15min à 75°C. Les fractions sont regroupées et centrifugées (20 min, 12000*g*, 4°C). Le surnageant, correspondant à la fraction soluble, est récupéré et transféré dans un tube Falcon™ de 50mL.

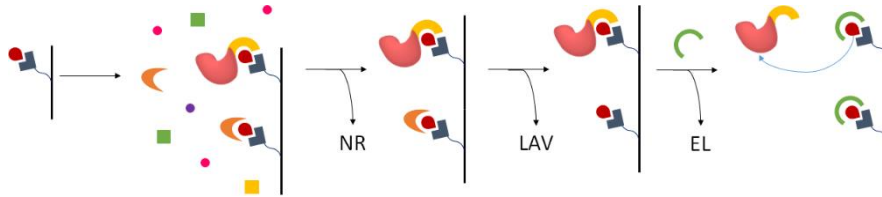


Figure 67 : Schéma de purification des phosphoprotéines sur résine de Fe(III)-NTA. Des billes d'agarose sont fonctionnalisées avec du NTA (en gris) et du Fe(III) (en rouge). La Nanofitine fusionnée TagP4 est schématisée en rose et jaune. La d-desthiobiotine est en vert.

Le tampon est changé par du tampon WPP grâce à des PD-10 *via* le “Gravity Protocol” selon le protocole du fournisseur (GE Healthcare). De la résine Fe(III)-NTA à 50% (1 mL à 50% pour 30 mL de lysat -> CV = 500 µL) est ajoutée à l'éluat obtenu après changement du tampon (maximum 20 CV). L'ensemble est incubé minimum 1h sur agitateur rotatif, puis transféré dans une colonne. La fraction non-retenue (notée NR) est récupérée. La résine est lavée avec 10 \* 2 CV de tampon WPP et les fractions de lavage (notées LAV1 à LAV10) récupérées. Les phosphoprotéines sont éluées par compétition et variation de pH avec 10 \* 0,5 CV de tampon EPP. Les fractions d'éluat (notées EL1 à EL10) sont récupérées et leur concentration déterminée au Nanodrop® à 280nm. La pureté des fractions d'éluat est évaluée par SDS-PAGE 17% en déposant 2 µg de protéines/puit. Après migration, les fractions les plus concentrées sont rassemblées et concentrées sur Vivaspin 3kDa si nécessaire.

## 6.5.2. Phosphorylation *in vitro* des Nanofitines avec 6HisTag

### 6.5.2.1. Phosphorylation *in vitro*

	Pour 1 échantillon	Pour 3 échantillons
<b>Tampon P 5x</b>	20 µL	60 µL
<b>ATP</b>	5 mM	5 mM
<b>Protéine</b>	100 µM	100 µM
<b>Eau MilliQ</b>	Qsp 100 µL	qsp 300 µL
<b>CKIIα</b>	1 nmol (0,1 %)	3 nmol (0,1 %)

Le mix de phosphorylation (100 µL) est réparti dans des tubes PCR et incubé 6h à 30°C, puis 10min à 70°C pour dénaturer la CKIIα. Un témoin négatif est réalisé en ajoutant de l'eau à la place de la CKIIα dans le mix.

### 6.5.2.2. Purification en mini-colonne

De la résine Ni(II)-NTA (CV = 45µL) et 100µL de tampon A sont ajoutés aux 100µL de mélange réactionnel préalablement transférés dans un eppendorf. L'ensemble est incubé sur un agitateur rotatif pendant 1h30. Les échantillons sont ensuite déposés sur des mini-colonnes. Après 1 min d'attente, les colonnes sont centrifugées (5min à 1100g) et la fraction non-retenue (notée NR) récupérée. La résine est lavée avec 250µL de tampon A. Après 1 min d'attente, les colonnes sont centrifugées (5min à 1100g) et la fraction de lavage (notée LAV) récupérée. La protéine phosphorylée est ensuite éluée par compétition avec 250µL de tampon B. Après 1 min d'attente, les colonnes sont centrifugées (5min à 1100g) et la fraction d'éluion (notée EL) récupérée. La quantité de protéine est évaluée en réalisant un dosage BCA, si la concentration en protéine est trop faible, concentrée la fraction EL à l'aide de Vivaspin® 3kDa.

*NB : Les protéines possédant soit une étiquette StrepTagII soit une étiquette TagP4 phosphorylée sont purifiées de la même manière avec leurs tampons respectifs. Pour les protéines avec uniquement le TagP4, 300µL de tampon WPP sont ajoutés aux 100µL de mélange réactionnel après phosphorylation in vitro.*

### 6.5.2.3. Dosage BCA

Une solution d'acide bicinchonique (Sigma Aldrich) est diluée à 50% (v/v) dans de l'eau et une solution de CuSO<sub>4</sub> à 4% (Sigma Aldrich, 20 µL /mL de solution à 50%) est ajoutée. Une gamme étalon est réalisée avec de la BSA (Promega) allant de 2000 à 31,25 µg/mL. Dans une plaque 96 puits, 100 µL du mélange acide bicinchonique 50%/CuSO<sub>4</sub> 4% (100 µL) est mis en contact avec 4µL de la gamme étalon ou 4µL des échantillons à tester.

**Tableau 23 : Concentration massique en BSA**

[BSA] (µg/mL)	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Gamme</b>	0	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000

La plaque est incubée dans un lecteur de plaque LABSYSTEM iEMS (BIORAD) à 37°C pendant 30min (homogénéisation toutes les 10min pendant 20s) et l'absorbance est lue à 562nm. Afin de faciliter le traçage de la courbe étalon, l'absorbance obtenue pour 0 µg/mL de BSA est soustrait à l'ensemble de la plaque. La courbe étalon permet ensuite de déterminer la concentration massique de l'échantillon testé.



6.5.3. Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant de l'urée et du triton-X (*Neutral Urea Triton-polyacrylamide gel electrophoresis (NUT-PAGE)*)

La technique du NUT-PAGE [163] permet de séparer les espèces protéiques en fonction de leur charge à pH 7. La présence des groupements phosphate va modifier le pHi des protéines. Elles vont donc migrer plus ou moins loin en fonction du nombre de groupements phosphate ajoutés.

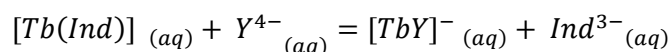
	<b>Gel de migration</b>	<b>Gel de concentration</b>
<b>Urée</b>	6 M	6 M
<b>Acrylamide</b>	17%	9%
<b>MOPS</b>	100 mM pH7	100 mM pH8
<b>Triton X-100</b>	0,37% (v/v)	0,37% (v/v)
<b>APS</b>	0,027% (m/v)	0,06% (m/v)
<b>TEMED</b>	0,13% (v/v)	0,3% (v/v)

Les échantillons sont précipités à l'aide d'une solution d'acétone à 80% et incubés à -20°C pendant 1h. Après centrifugation (30 min, 20 000g, 4°C), les culots sont séchés sous vide et repris dans de l'eau MilliQ. Avant dépôt sur le gel, 3 volumes de tampon de charge [Urée 6 M, MOPS 60 mM pH8, glycérol 5%, bleu de bromophénol 0,15%] sont ajoutés aux échantillons (le volume maximal par puits est de 20 µL). Après une migration de 20mn à 125V et une de 16h à 50V dans du tampon MOPS [MOPS 22 mM pH7, imidazole 100mM], la présence des protéines est révélée par coloration en bleu de Coomassie.

## 6.6. Etudes de chélation

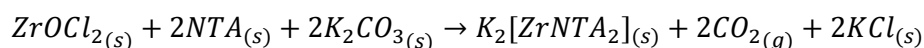
### 6.6.1. Titration colorimétrique des solutions de TbCl<sub>3</sub> et GaCl<sub>3</sub>

La concentration des solutions contenant des ions métalliques (TbCl<sub>3</sub>, ZrOCl<sub>2</sub>, GaCl<sub>3</sub> et ZrNTA<sub>2</sub>) a été évaluée par titrage colorimétrique à l'aide de xylénol orange.



Dans un bécher, 1 mL d'une solution de chlorure de terbium ou de chlorure de gallium est dilué avec 49 mL de tampon acétate pH 5. Quelques gouttes de xylénol orange à 0.05% (p/v) sont ajoutées et les solutions sont titrées avec une solution d'EDTA à 5 mM jusqu'à ce que la couleur des solutions à titrer passe du rouge violacé au jaune. Une fois la concentration en cations trivalents déterminée, des aliquots à 100 mM dans de l'HCl 1 M sont réalisés et stockés à -20°C.

### 6.6.2. Synthèse du potassium bis(nitriloacetato)zirconate(IV) [196]



Dans un ballon, une solution à 2,5 mM en ZrOCl<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O (5 mmol, 1 éq.) dans de l'eau (20 mL) est réalisée sous agitation. Une solution du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15 mmol, 3 éq.) est ajoutée progressivement à une solution à 5 mM en NTA dans de l'eau (10 mmol, 20 mL, 2 éq.). Une fois le mélange devenu translucide, il est ajouté au ballon contenant le zirconium. L'eau est ensuite éliminée sur un évaporateur rotatif et le solide séché à la pompe à vide. Le ballon est ensuite placé dans de la glace et dissout dans 3 mL d'eau MilliQ. Après filtration sur Büchner, le solide est lavé avec 5 mL d'eau MilliQ.

La solution est de nouveau mise sur évaporateur rotatif et le solide à sécher à la pompe à vide. Le ballon est placé dans de la glace et dissout dans 3 mL d'eau MilliQ. Après filtration sur Büchner, le solide est re-suspendu dans 5 mL d'eau MilliQ. La présence d'ion chlorure (test au nitrate d'argent) et d'ion zirconium (test du xylénol orange) est testée dans le ballon et dans le filtrat. Les étapes d'évaporation et séchage sont réalisées jusqu'à obtenir un solide sans traces d'ions chlorure (test nitrate d'argent négatif). L'eau résiduelle est ensuite éliminée à l'évaporateur rotatif et le solide séché à la pompe à vide.

### 6.6.3. Luminescence des protéines

#### 6.6.3.1. Titration par le terbium(III)

Après vérification sur SDS-PAGE 17%, les fractions d'éluion des protéines purifiées sur colonne de StrepTactin sont rassemblées et concentrées à l'aide des Vivaspins 500 3kDa. Les manipulations sont réalisées dans des plaques blanches 96 puits à fond plat. Pour chaque concentration en Tb(III), un témoin sans protéine ainsi qu'un témoin contenant la protéine LBT sont préparés. Les produits sont ajoutés dans l'ordre suivant : le volume de tampon T nécessaire pour être à 100 µL final, la protéine ou le peptide, puis le Tb(III). Le mélange est homogénéisé en faisant des aspirations-refoulements à la pipette. La plaque est ensuite passée au lecteur de plaque TECAN Infinite® M1000.

**Tableau 24 : Exemple de tableau préparatif pour la titration des protéines possédant un LBT<sup>25</sup>**

Puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
V Tb <sup>3+</sup> à 8µM (µL)	50	45,3	40,5	35,8	31,0	26,3	21,5	16,8	12,0	7,3	2,5	0
V LBT+ à 2µM (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
V tampon (µL)	0	4,8	9,5	14,3	19,0	23,8	28,5	33,3	38,0	42,8	47,5	50
V total (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
[Tb <sup>3+</sup> ] (µM)	4	3,62	3,24	2,86	2,48	2,10	1,72	1,34	0,96	0,58	0,20	0
[protéine] (µM)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Nb d'équivalent	4	3,62	3,24	2,86	2,48	2,1	1,72	1,34	0,96	0,58	0,2	0

#### Programme et paramètres :

- température fixée à 30°C
- Agitation pendant 1 seconde de manière linéaire, amplitude 2 mm, fréquence 70,8 rpm.
- Incubation 15 minutes à 30°C.
- Cinétique de 20 cycles avec une pause de 1 min entre chaque.
  - Agitation pendant 1 seconde de manière linéaire, amplitude 2 mm, fréquence 70,8 rpm.

---

<sup>25</sup> Pour les titrations de peptide, la concentration de la solution mère en Tb(III) est fixée à 500 µM et en peptide à 40 µM. Pour les mutants LBT avec résidus sérine phosphorylés, la concentration de la solution mère en Tb(III) est fixée à 16 µM et en protéine à 2 µM.

- Excitation à  $280 \pm 10$  nm (mode fluorescence TRF) <sup>26</sup>
- Lecture à  $544 \pm 20$  nm après 50  $\mu$ s d'attente pendant 900  $\mu$ s (12 lectures).
- Fréquence du flash : mode 2 (100 Hz), gain optimal (100%), label 2.
- Position du Z en manuel (20000  $\mu$ m)

### 6.6.3.2. Calcul de la constante de dissociation et lissage des courbes de titration

Après soustraction de la fluorescence du Tb(III) seul (ligne sans protéine/peptide) et de la fluorescence naturelle de la protéine (puits sans Tb(III)), les résultats obtenus sont traités via le logiciel GraphPad. Le  $F_{max}$  et le  $K_d$  sont obtenus selon la formule suivante :

$$F_{obs} = F_{max} \times \left( \frac{(C_p + C_L + K_d) - \sqrt{(C_p + C_L + K_d)^2 - 4C_p C_L}}{2C_p} \right)$$

Avec :

- $F_{obs}$  : Fluorescence observée correspondant à la fluorescence de la fraction de ligand libre et couplé à la protéine.
- $F_{max}$  : Fluorescence maximale.
- $C_p$  : Concentration initiale en protéine (en  $\mu$ M).
- $C_L$  : Concentration initiale en Tb(III) (en  $\mu$ M).
- $K_d$  : Constante de dissociation (en  $\mu$ M).

### 6.6.3.3. Etudes de compétition

#### **En présence de [Zr(NTA)<sub>2</sub>] :**

Dans un eppendorf, la protéine à titrer et le [Zr(NTA)<sub>2</sub>] sont mis en quantité équimolaire et le volume complété avec du tampon T pour être à 2  $\mu$ M final. Dans une plaque blanche 96 puits, le mélange est titré avec du Tb(III) de la même manière que pour les solutions protéiques seules. Le mélange est homogénéisé en faisant des aspirations-refoulements à la pipette. La plaque est ensuite passée au lecteur de plaque TECAN Infinite® M1000.

---

<sup>26</sup> Pour les études de titration de peptides la longueur d'onde d'excitation est fixée à  $345 \pm 10$  nm.

**En présence d'une quantité fixe de GaCl<sub>3</sub> :**

Dans un eppendorf, la protéine à titrer et le GaCl<sub>3</sub> sont mis en quantité équimolaire et le volume complété avec du tampon WPP pour être à 2 μM final. Dans une plaque blanche 96 puits, le mélange est titré de avec du Tb(III) de la même manière que pour les solutions protéiques seules. Le mélange est homogénéisé en faisant des aspirations-refoulements à la pipette. La plaque est ensuite passée au lecteur de plaque TECAN Infinite® M1000.

**En présence d'une quantité variable de GaCl<sub>3</sub> :**

Dans un eppendorf, la protéine à titrer est mise en contact avec une quantité variable de GaCl<sub>3</sub> et le volume complété avec du tampon WPP pour être à 2 μM final en protéine. Dans une plaque blanche 96 puits, le mélange est mis en contact avec une quantité fixe de Tb(III) à 2 μM final. Le mélange est homogénéisé en faisant des aspirations-refoulements à la pipette. La plaque est ensuite passée au lecteur de plaque TECAN Infinite® M1000.

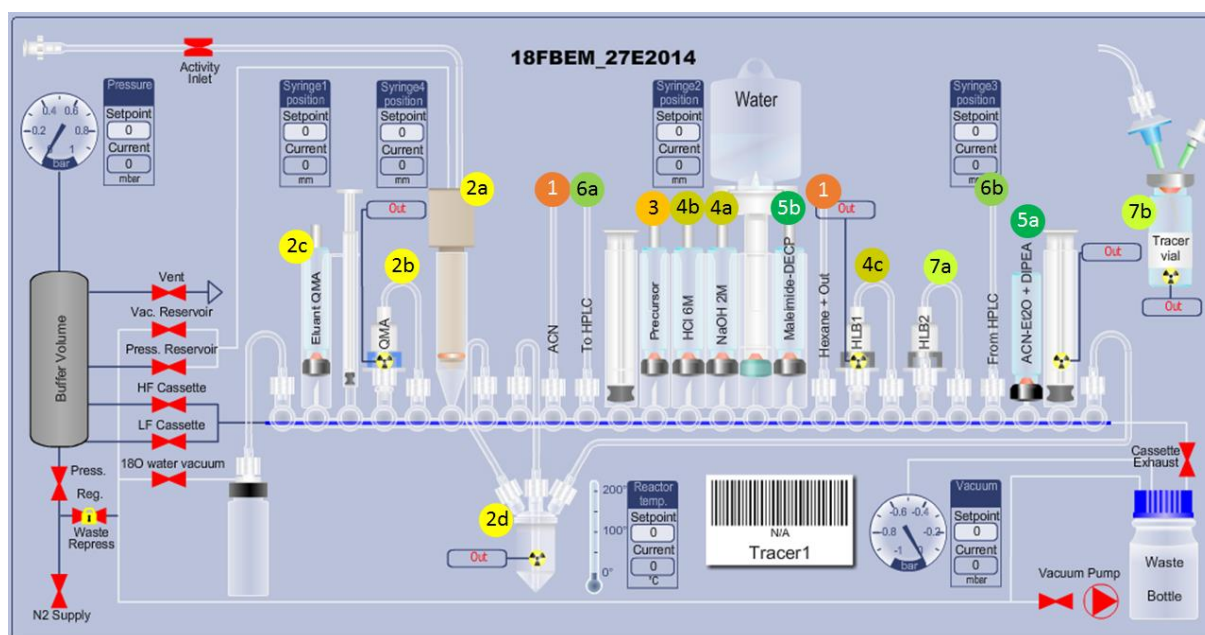
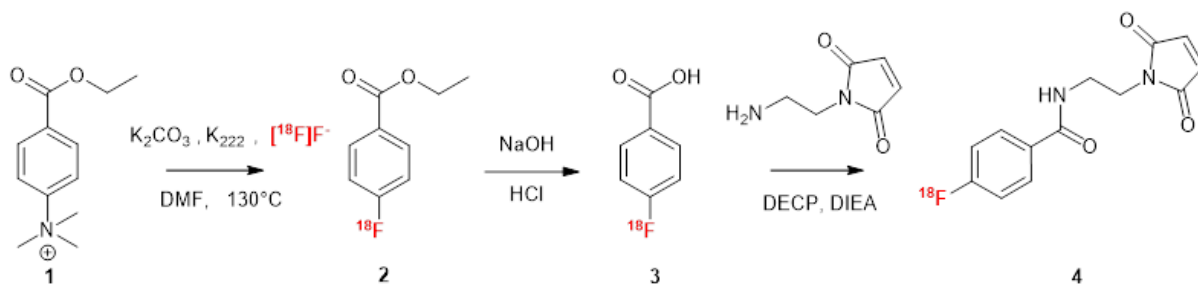
## 6.7. Marquage des Nanofitines

### 6.7.1. Marquage froid de la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys

Dans un eppendorf, une suspension de Nanofitine (10 nmol, 100  $\mu$ L tampon phosphate) est mise en contact avec du TCEP/HCl dilué dans du tampon phosphate (10  $\mu$ eq, 30 min, 25°C). Du  $^{19}\text{F}$ -FBEM dilué dans le plus petit volume possible d'acétonitrile (20  $\mu$ eq, 1h30, 25°C) est ajouté. Le mélange réactionnel (20  $\mu$ L) est injecté sur une Jupiter C18 et analysé en gradient HPLC avec un débit de 1 mL/min (Solvant A : 5% acétonitrile/0.1% TFA, Solvant B : 100% acétonitrile) (100-60% solvant A de 0 à 20 min, 60-0% solvant A de 20 à 25min et 0-100% solvant A de 25 à 30min). Les temps de rétention des pics visibles en UV sont identifiés et ceux correspondant à la Nanofitine marquée envoyés à la plateforme GIGA Proteomics (Liège) pour analyse en spectrométrie de masse (ESI-Q-TOF).

### 6.7.2. Marquage chaud de la Nanofitine anti-EGFR B10-Cys

#### 6.7.2.1. Synthèse du $^{18}\text{F}$ -FBEM



**Figure 68 : Etapes de la synthèse automatisée du  $^{18}\text{F}$ -FBEM.**

**Tableau 25 : Etapes de la synthèse automatisée du  $^{18}\text{F}$ -FBEM.**

N°	Etapes
1	La cassette est mise en place dans le module FASTlab, ainsi que les flacons contenant l'acétonitrile et l'hexane. A l'aide d'un test cassette, la présence éventuelle de fuite est vérifiée. <i>NB : Mettre en place le vial contenant la solution D, et connecter les flacons contenant l'hexane (dans un plomb) et l'acétonitrile après le « test cassette ».</i>
2	L'eau fluorée du cyclotron est transférée vers la colonne QMA échangeuse d'anion. Les ions $^{18}\text{F-F}^-$ sont ensuite élués avec l'éluant QMA et transférés vers le réacteur. La formation du complexe $^{18}\text{F-F-Kryptofix222}$ et la présence d'acétonitrile permettent d'évaporer le milieu réactionnel par la formation d'un azéotrope.
3	Après évaporation du milieu réactionnel, la solution P (composé <b>1</b> ) est ajoutée et l'ensemble est chauffé à 130°C pendant 10 min. Le composé <b>2</b> est obtenu par substitution nucléophile.
4	La fonction ester du composé <b>2</b> est ensuite hydrolysée en ajoutant 1 mL de NaOH 2M. L'ajout de 2 mL d'HCl à 4 M permet d'arrêter la réaction. Le milieu réactionnel est envoyé sur la cartouche HLB1 après dilution avec de l'eau. La cartouche est lavée avec de l'eau et séchée avec 5 mL d'hexane sous flux d'azote.
5	L'acide 4- $^{18}\text{F}$ -Fluorobenzoïque (composé <b>3</b> ) est ensuite élué avec 4 mL de solution DIPEA et transféré dans le réacteur. La solution est évaporée pendant 5 min à 60°C sous flux d'azote. La réaction de couplage se réalise par ajout des 3mL de solution Maléimide-DECP. Le milieu est chauffé pendant 20 min à 60°C sous flux d'azote jusqu'à obtenir un volume de 1 mL.
6	Après dilution dans de l'eau, le mélange réactionnel est injecté sur une colonne HPLC semi-préparative SymmetryPrep C18 avec un débit de 4 mL/min. Le pic sortant est collecté à environ 20min et correspondant au $^{18}\text{F}$ -FBEM (composé <b>4</b> ).
7	Le $^{18}\text{F}$ -FBEM est récupéré sur la cartouche HLB2 qui est séchée avec 5mL d'hexane et flux d'azote. Le $^{18}\text{F}$ -FBEM est élué avec 4 mL d'acétonitrile avec un rendement radiochimique corrigé de $30 \pm 3\%$ (n = 6).

#### 6.7.2.2. Marquage des Nanofitines anti-EGFR B10-Cys

Dans un eppendorf, des billes magnétiques His-mag (100  $\mu\text{L}$ ) sont lavées avec du tampon WM. Une suspension de Nanofitine B10-Cys préalablement diluée dans du tampon WM (100  $\mu\text{L}$ , 10 nmol, 30min, 25°C) est ajoutée et mise en présence de TCEP/HCl dilué dans du tampon WM (50 $\mu\text{eq}$ ). Le pH est ensuite ajusté à 7.9-8 et le mélange réactionnel est incubé sous agitation (30min, 25°C). Les billes sont ensuite lavées avec du tampon WM.

Le  $^{18}\text{F}$ -FBEM est repris dans 200 $\mu\text{L}$  de tampon WM et mis en contact avec les billes (20min, 25°C). Les billes sont une nouvelle fois lavées avec du tampon WM jusqu'à obtenir une activité dans le lavage < à 0.5 % de l'activité mise en contact avec les billes. Les Nanofitines  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 sont éluées par compétition avec 100 $\mu\text{L}$  de tampon EM (5min, 25°C) avec un rendement de marquage corrigé de  $45 \pm 14\%$ , correspondant à  $0,062 \pm 0,022\%$  de Nanofitines marquées (n=6).

La stabilité *in vitro* est évaluée en incubant les  $^{18}\text{F}$ -FBEM-Cys-B10 (10  $\mu\text{L}$ , 1,8-5,4 MBq) dans du PBS pH7,4 ou du FBS (200  $\mu\text{L}$ , 37°C, 2 h). Différents prélèvements de 20 $\mu\text{L}$  sont réalisés et analysés en gradient radio-HPLC sur une Jupiter C18 avec un débit de 1mL/min (Solvant A : 5% acétonitrile/0.1% TFA, Solvant B : 100% acétonitrile) (100-60% solvant A de 0 à 20 min, 60-0% solvant A de 20 à 25min et 0-100% solvant A de 25 à 30min).

### 6.7.3. Calculs de rendement

#### 6.7.3.1. Rendement radiochimique corrigé

Le rendement radiochimique corrigé correspond à la quantité de radioactivité obtenue en fin de synthèse par rapport à la quantité de radioactivité à l'origine en tenant compte du temps de décroissance du radioélément.

$$\text{Rend}^t \text{ corrigé (\%)} = \frac{A_{t_1} e^{\left( (t_0 - t_1) * \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \right)}}{A_{t_2} e^{\left( (t_0 - t_2) * \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \right)}} * 100 = \frac{A_{t_1} e^{\left( (t_0 - t_1) * \frac{0,693}{110} \right)}}{A_{t_2} e^{\left( (t_0 - t_2) * \frac{0,693}{110} \right)}} * 100$$

#### 6.7.3.2. Rendement de marquage de la Nanofitine

Le rendement de marquage corrigé de la protéine correspond à la quantité de  $^{18}\text{F}$  obtenue dans la fraction d'éluion en fin de marquage par rapport à la quantité de Nanofitine d'origine.

$$\begin{aligned} \text{Rend}^t (\%) &= \frac{\text{Act. spé. } ^{18}\text{F} (\text{MBq/mol}) * \text{Act. fin de marquage} (\text{MBq}) * 10^9}{\text{Quantité de Nanofitine en solution} (\text{nmol})} * 100 \\ &= \frac{6,34 * 10^{13} * \text{Activité fin de marquage} (\text{MBq}) * 10^9}{10} * 100 \end{aligned}$$



## 6.8. Imagerie fonctionnelle de Nanofitine

L'ensemble des manipulations animales a été réalisé en accord avec les comités d'éthique de l'Université de Liège et du Centre de Microscopie et d'Imagerie Moléculaire de l'Université Libre de Bruxelles et de l'Université de Mons.

### 6.8.1. Mise en place d'un modèle animal

Les cellules A431 et H520 sont cultivées dans des flasques dans du milieu A431 ou H520 à 37°C en atmosphère humide (95% air, 5% CO<sub>2</sub>) et repiquées une fois par semaine. Les cellules (5.10<sup>6</sup>/100µL PBS) sont injectées en sous-cutanée dans le flanc droit (A431) et gauche (H520) de souris balb/c nude (femelles, 6-8 semaines) anesthésiées sous isoflurane (4% pour l'induction et 1.5-2% pour le maintien). Les souris, nommées modèle EGFR, sont replacées dans leur cage sous lampe IR avec surveillance jusqu'au réveil complet. Les souris sont observées quotidiennement et un tableau de scores est complété toutes les semaines (un exemple est donné en [annexe 2](#)). Si la taille des tumeurs atteint 1cm<sup>3</sup>, ou que les souris montrent des signes de prostration ou d'anorexie (perte de poids > 20%), pour des tumeurs ayant été implantées il y a trois mois et/ou si le score atteint 5, les souris sont sacrifiées sous isoflurane par dislocation cervicale suivie d'une décapitation. La taille des tumeurs est évaluée à l'aide d'un vernier. Le volume des tumeurs est calculé en approximant le volume d'une tumeur à celui d'un ellipsoïde.

$$V_{tumeur} (cm^3) = \left(\frac{4}{3}\pi * \frac{longueur (mm)}{2} * \frac{largeur (mm)}{2} * \frac{largeur (mm)}{2}\right)/1000$$

### 6.8.2. Immunohistochimie des tumeurs

Après sacrifice des souris Balb/c nude EGFR, les tumeurs sont récupérées dans un milieu d'enrobage OCT et congelées à -80°C. Les tumeurs sont ensuite découpées en tranche de 15µm *via* un cryostat. Après élimination de l'OCT par rinçage avec du PBS, les coupes sont fixées grâce à du paraformaldéhyde 4% (TA, 20min). Après rinçage dans du PBS, les antigènes sont ensuite démasqués par du citrate de sodium 10mM pH6 (95°C, 5min) et les membranes, après lavage dans du PBS, sont perméabilisées avec du Triton X-100 0.1% dans du PBS (TA, 30min). Le blocage des sites non-spécifiques est réalisé en incubant les sections avec une solution de Triton X100 0.1% dans du PBS et contenant 10% sérum de chèvre dilué dans du PBS (150µL/section) (TA, 1h). Les lames sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire anti-EGFR humain produit chez le lapin (1/20<sup>ème</sup> dans une solution de Triton X100 0.1% dans du PBS contenant 10% sérum de chèvre dilué dans du PBS, 150µL/section) (4°C, O/N). A l'abri de la lumière, les lames sont rincées dans

du PBS et incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin produits chez la chèvre et couplés à l'AlexaFluor 488 (1/400<sup>ème</sup> dans une solution de Triton X100 0.1% dans du PBS contenant 10% sérum de chèvre dilué dans du PBS, 150µL/section) (TA, 2h). Après lavage dans du PBS, les noyaux cellulaires sont mis en évidence grâce à une solution DAPI 0.5µg/mL (TA, 5min).

***NB:** L'anticorps anti-KI67 a été dilué au 1/500<sup>ème</sup> dans une solution de Triton X-100 0.1% dans du PBS contenant 10% sérum de chèvre dilué dans du PBS. Il est ensuite révélé par une l'anticorps secondaire anti-lapin produits chez la chèvre et couplés à l'AlexaFluor 488.*

### 6.8.3. Imagerie

L'ensemble des manipulations en imagerie est réalisé sous anesthésie gazeuse isoflurane à 1.5-2% dans l'air.

#### 6.8.3.1. Biodistribution

Des souris Balb/c (sept mâles), anesthésiées sous isoflurane (4% pour l'induction et 1.5-2% pour le maintien), reçoivent une injection de 2-6MBq de Nanofitines marquées et diluées dans du sérum physiologique stérile. Une acquisition PET dynamique est ensuite réalisée pendant 2h suivie d'une IRM en coupe coronale. Les souris sont sacrifiées par décapitation et les organes d'intérêt récupérés (sang, cerveau, cœur, foie, poumon, rein, intestin, peau, os, muscle, testicule et rate). La radioactivité résiduelle est ensuite comptée dans les organes grâce à un compteur gamma et le taux d'absorption de chaque organe (% ID/g) est ensuite calculé en supposant que la densité des organes est de 1 (1 g = 1 mL).

$$SUV = \frac{\text{Activité présente dans la ROI (en kBq/mL)}}{\text{Activité injectée (en kBq)/masse de l'individu(en g)}}$$

$$\%ID/g \text{ (en } g^{-1}\text{)} = \frac{\text{Activité présente dans la ROI (en kBq/mL)} * 100}{\text{Activité injectée (en kBq)}}$$

#### 6.8.3.2. Marquage des tumeurs

Des souris modèle EGFR (sept femelles), préalablement mises à jeun pendant 18h, sont placées sous lampes IR jusqu'à ce que la température des cages atteigne 34°C. Une heure après chauffage, les souris sont anesthésiées sous isoflurane (4% pour l'induction et 1.5-2% pour le maintien). La concentration plasmatique en glucose est mesurée en prélevant une goutte de sang dans la veine caudale avant l'injection intrapéritonéale de 6-9 MBq de <sup>18</sup>F-FDG. Une heure après

injection, une acquisition PET statique est réalisée pendant 10min suivie d'un CT en coupe transversale. Les souris sont ensuite placées sous oxygène et lampes IR jusqu'à leur réveil complet. Elles sont ensuite replacées dans leurs cages avec nourriture et enrichissement.

Dans les cinq jours qui suivent, les mêmes souris préalablement anesthésiées sous isoflurane (4% pour l'induction et 1.5-2% pour le maintien) reçoivent une injection de 13-25 MBq de Nanofitines marquées diluées dans du sérum physiologique stérile. Deux heures après injection, une acquisition PET statique est réalisée pendant 10min suivie d'une IRM en coupe transversale. Les souris sont sacrifiées par décapitation et les organes d'intérêt récupérés (sang, cerveau, cœur, foie, poumon, rein, intestin, peau, os, muscle et rate), ainsi que les tumeurs. La radioactivité résiduelle est ensuite comptée dans les organes et les tumeurs grâce à un compteur gamma. Le taux d'absorption de chaque organe (% ID/g) est ensuite calculé.



## Bibliographie

1. Organisation mondiale de la santé (2015) Aide-mémoire N°297, consulté le 04 mars 2015 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>).
2. Cancer Research UK (2015), Why is early diagnosis important?, consulté le 22 juillet 2015 (<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-symptoms/why-is-early-diagnosis-important>).
3. Da Cunha Santos G. *et al.* (2011) EGFR gene status in cytological samples of nonsmall cell lung carcinoma: controversies and opportunities, *Cancer cytopathology* 119, pp. 80-91.
4. Smouse J. *et al.* (2009) EGFR mutations are detected comparably in cytologic and surgical pathology specimens of nonsmall cell lung cancer, *Cancer* 117, pp. 67-72.
5. Boss A. *et al.* (2010) Hybrid PET/MRI of intracranial masses: initial experiences and comparison to PET/CT, *Journal of Nuclear Medicine* 51, pp. 1198-1205.
6. Diffen (2015) CT vs. MRI, consulté le 22 juillet 2015 ([http://www.diffen.com/difference/CT\\_Scan\\_vs\\_MRI](http://www.diffen.com/difference/CT_Scan_vs_MRI)).
7. Avril N. (2004) GLUT1 expression in tissue and <sup>18</sup>F-FDG uptake, *Journal of Nuclear Medicine* 45, pp. 930-932.
8. Mochizuki T. *et al.* (2001) FDG uptake and glucose transporter subtype expressions in experimental tumor and inflammation models, *Journal of Nuclear Medicine* 42, pp. 1551-1555.
9. Yamada S. *et al.* (1995) High accumulation of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in turpentine-induced inflammatory tissue, *Journal of Nuclear Medicine* 36, pp. 1301-1306.
10. Bucerius J. *et al.* (2014) Arterial and fat tissue inflammation are highly correlated: a prospective <sup>18</sup>F-FDG PET/CT study, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 41, pp. 934-945.
11. Ishimori T. *et al.* (2002) Increased <sup>18</sup>F-FDG uptake in a model of inflammation: Concanavalin A-Mediated lymphocyte activation, *Journal of Nuclear Medicine* 43, pp. 658-663.
12. Kubota R. *et al.* (1992) Intratumoral Distribution of fluorine-18-Fluorodeoxyglucose *in vivo*: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography, *Journal of Nuclear Medicine* 33, pp. 1972-1980.
13. Chung J.-H. *et al.* (2004) Overexpression of Glut1 in lymphoid follicles correlates with false-positive <sup>18</sup>F-FDG PET results in lung cancer staging, *Journal of Nuclear Medicine* 45, pp. 999-1003.
14. Carvalho K. *et al.* (2011) GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker, *Clinics* 66, pp. 965-972.
15. Matous E. (2014) *Développement d'une Affitin anti-CD138 comme nouvel outil pour l'imagerie phénotypique*, Thèse de doctorat de l'Université de Nantes (France).

16. Mier W. et Haberkorn U. (2011) Radiotracer I: Standard Tracer. *Small Animal Imaging Basics and Practical Guide*, Chap. 18, pp. 237–246.
17. Friedman M. (2008) *Affibody molecules targeting the epidermal growth factor receptor for tumor imaging applications*. Thèse de doctorat du Royal Institute of Technology of Stockholm (Suède).
18. Wällberg H. (2011) *Design and Evaluation of Radiolabeled Affibody Tracers for Imaging of HER2-expressing tumors*. Thèse de doctorat du Royal Institute of Technology of Stockholm (Suède).
19. Schechter N. R. *et al.* (2004) Radiation dosimetry of <sup>99m</sup>Tc-labeled C225 in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck, *Journal of Nuclear Medicine* 45, pp. 1683-1687.
20. Sugiura G. *et al.* (2014) Radiolabeling strategies for tumor-targeting proteinaceous drugs, *Molecules* 19, pp. 2135-2165.
21. Abello N. *et al.* (2007) Selective acylation of primary amines in peptides and proteins, *Journal of Proteom Research* 6, pp. 4770–4776.
22. Kim Y. *et al.* (2008) Efficient site-specific labeling of proteins *via* cysteines, *Bioconjugate Chemistry* 19, pp. 786-791.
23. Goldstein R. *et al.* (2015) Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2 molecular imaging, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 42, pp. 288-301.
24. Robinson M. *et al.* (2005) Quantitative immuno-positron emission tomography imaging of HER2-positive tumor xenografts with an iodine-124 labeled anti-HER2 diabody, *Cancer Research* 65, pp. 1471-1478.
25. Tolmachev V. (2009) Affibody molecules for epidermal growth factor receptor targeting *in vivo*: aspects of dimerization and labeling chemistry, *Journal of Nuclear Medicine* 50, pp. 274-283.
26. Orlova A. *et al.* (2006) Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding Affibody molecule, *Cancer Research* 66, pp. 4339-4348.
27. Glaser M. *et al.* (2013) Three methods for <sup>18</sup>F labeling of the HER2-binding affibody molecule Z(HER2:2891) including preclinical assessment, *Journal of Nuclear Medicine* 54, pp. 1981–1988.
28. Flagothier J. (2014) *Développement de nouvelles méthodes de marquage au fluor-18 pour peptides et oligonucléotides en vue de leurs études par tomographie par émission de positons*, Thèse de doctorat de l'Université de Liège (Belgique).
29. Liang G. *et al.* (2010) A biocompatible condensation reaction for controlled assembly of nanostructures in living cells, *Nature Chemistry* 2, pp. 54–60.

30. Miao Z. *et al.* (2012) PET of EGFR expression with an  $^{18}\text{F}$ -labeled affibody molecule, *Journal of Nuclear Medicine* 53, pp. 1110–1118.
31. Kramer-Marek G. *et al.* (2012) PET of HER2-positive pulmonary metastases with  $^{18}\text{F}$ -ZHER2:342 Affibody in a murine model of breast cancer: comparison with  $^{18}\text{F}$ -FDG, *Journal of Nuclear Medicine* 53, pp. 939-946.
32. Su X. *et al.* (2014) Comparison of two site-specifically  $^{18}\text{F}$ -labeled affibodies for PET imaging of EGFR positive tumors, *Molecular Pharmaceutics* 11, pp. 3947-3956.
33. Wadas T. *et al.* (2011) Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium and zirconium for PET and SPECT imaging of disease, *Chemical Reviews* 110, pp. 2858–2902.
34. Deri M. *et al.* (2013) PET Imaging with  $^{89}\text{Zr}$ : from radiochemistry to the clinic, *Nuclear Medicine and Biology* 40, pp. 3–14.
35. Domagal-Goldman S. *et al.* (2009) Quantum chemical study of the Fe(III)-desferrioxamine B siderophore complex—Electronic structure, vibrational frequencies, and equilibrium Fe-isotope fractionation, *Geochimica and Cosmochimica Acta* 73, pp. 1–12.
36. Price E. W. et Orvig C. (2014) Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chemical Society Reviews* 43, pp. 260–290.
37. Haubner R. et Decristoforo C. (2011) Radiotracer II: Standard Tracer. *Small Animal Imaging Basics and Practical Guide*, Chap. 19, pp. 247–266.
38. Vugts D. *et al.* (2011)  $^{89}\text{Zr}$ -labeled compounds for PET imaging guided personalized therapy, *Drug Discovery Today: Technologies* 8, pp. 53-61.
39. Vosjan M. *et al.* (2011) Facile labelling of an anti-epidermal growth factor receptor Nanobody with  $^{68}\text{Ga}$  via a novel bifunctional desferal chelate for immuno-PET, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 38, pp. 753–63.
40. Terwisscha van Scheltinga A. *et al.* (2014) In vivo visualization of MET tumor expression and anticalin biodistribution with the MET-specific anticalin  $^{89}\text{Zr}$ -PRS-110 PET tracer, *Journal of Nuclear Medicine* 55, pp. 665-671.
41. Vosjan M. *et al.* (2012) Nanobodies targeting the hepatocyte growth factor: potential new drugs for molecular cancer therapy, *Molecular Cancer Research* 11, pp. 1017-1025.
42. Zhu X. et Lever S. Z. (2002) Formation kinetics and stability studies on the lanthanide complexes of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 23, pp. 1348-1356.
43. Adak S. *et al.* (2012) Radiotracers for SPECT imaging: current scenario and future prospects, *Radiochimica Acta* 100, pp. 95–107.
44. Huang L. *et al.* (2008) SPECT imaging with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled EGFR-specific nanobody for in vivo monitoring of EGFR expression, *Molecular Imaging and Biology* 10, pp. 167–175.

45. Vugmeyster Y. *et al.* (2012) Pharmacokinetics and toxicology of therapeutic proteins: Advances and challenges, *World Journal of Biological Chemistry* 3, pp. 73-92.
46. Hollinger P. et Hudson P. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains, *Nature Biotechnology* 23, pp. 1126-1137.
47. Schmidt M. et Wittrup K. (2009) A modeling analysis of the effects of molecular size and binding affinity on tumor targeting, *Molecular Cancer Therapeutics* 8, pp. 2861-2871.
48. Zahnd C. *et al.* (2010) Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size, *Cancer research* 70, pp. 1595–1605.
49. Tolmachev V. *et al.* (2012) Tumor targeting using Affibody molecules: interplay of affinity, target expression level, and binding site composition, *Journal of Nuclear Medicine* 53, pp. 953-960.
50. Sihver W. *et al.* (2014) Radiolabeled Cetuximab Conjugates for EGFR Targeted Cancer Diagnostics and Therapy, *Pharmaceuticals* 7, pp. 311–338.
51. Schechter N. R. *et al.* (2003) Assessment of epidermal growth factor receptor with 99mTc – ethylenedicycysteine – C225 monoclonal antibody, *Anti-Cancer Drugs* 14, pp. 49–56.
52. Škrlec K. *et al.* (2015) Non-immunoglobulin scaffolds: a focus on their targets, *Trends in Biotechnology* 33, pp. 408 – 418.
53. Tolcher A. *et al.* (2011) Phase I and Pharmacokinetic Study of CT-322 (BMS-844203), a Targeted Adnectin Inhibitor of VEGFR-2 Based on a Domain of Human Fibronectin, *Clinical cancer research* 17, pp. 363-371.
54. Ahlgren S. *et al.* (2010) Targeting of HER2-expressing tumors Affibody molecule with a fundamentally reengineered scaffold, *Journal of Nuclear Medicine* 51, pp. 1131–1138.
55. Mross K. (2013) First-in-human phase I study of PRS-050 (Angiocal), an Anticalin targeting and antagonizing VEGF-A, in patients with advanced solid tumors, *PLoS One* 8.
56. Molecular Partners (2015) MP0250 and MP0274, consulté le 23 juillet 2015 (<http://www.molecularpartners.com/our-products/mp0250mp0274/>).
57. Souied E. *et al.* (2014) Treatment of exudative age-related macular degeneration with a designed ankyrin repeat protein that binds vascular endothelial growth factor: a phase I/II study, *American Journal of Ophthalmology* 158, pp. 724-732.
58. Campochiaro P. *et al.* (2013) Treatment of diabetic macular edema with a designed Ankyrin repeat protein that binds vascular endothelial growth factor: A phase I/II study, *American Journal of Ophthalmology* 155, pp. 697-704.
59. Sörensen J. *et al.* (2014) First-in-human molecular imaging of HER2 expression in breast cancer metastases using the <sup>111</sup>In-ABY-025 Affibody molecule, *Journal of Nuclear Medicine* 55, pp. 730-735.



60. Orlova A. *et al.* (2013) Site-specific radiometal labeling and improved biodistribution using ABY-027, a novel HER2-targeting affibody molecule-albumin-binding domain fusion protein, *Journal of Nuclear Medicine* 54, pp. 961–968.
61. Baum R. *et al.* (2010) Molecular imaging of *HER2*-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic <sup>111</sup>In- or <sup>68</sup>Ga-labeled Affibody molecules, *Journal of Nuclear Medicine* 51, pp. 6892-6897.
62. Heskamp S. *et al.* (2012) Imaging of human epidermal growth factor receptor type 2 expression with <sup>18</sup>F-labeled Affibody molecule ZHER2:2395 in a mouse model for ovarian cancer, *Journal of Nuclear Medicine* 53, pp. 146-153.
63. Wållberg H. *et al.* (2010) Evaluation of the radiocobalt-labeled [MMA-DOTA-Cys61]-ZHER2:2395(-Cys) affibody molecule for targeting of HER2-expressing tumors, *Molecular Imaging and Biology* 12, pp. 54-62.
64. Ahlgren S. *et al.* (2009) Targeting of HER2-expressing tumors with a site-specifically <sup>99m</sup>Tc-labeled recombinant affibody molecule, ZHER2:2395, with C-terminally engineered cysteine, *Journal of Nuclear Medicine* 50, pp. 781-789.
65. Ahlgren S. *et al.* (2008) Evaluation of Maleimide Derivative of DOTA for Site-Specific Labeling of Recombinant Affibody Molecules, *Bioconjugate Chemistry* 19, pp. 235–243.
66. Malmberg J. *et al.* (2012). Comparative evaluation of synthetic anti-HER2 Affibody molecules site-specifically labelled with <sup>111</sup>In using N-terminal DOTA, NOTA and NODAGA chelators in mice bearing prostate cancer xenografts, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 39, pp. 481–492.
67. Strand J. *et al.* (2013) Influence of macrocyclic chelators on the targeting properties of (<sup>68</sup>Ga)-labeled synthetic affibody molecules: comparison with (<sup>111</sup>In)-labeled counterparts, *PLoS one* 8.
68. Altai M. *et al.* (2013) In vivo and in vitro studies on renal uptake of radiolabeled affibody molecules for imaging of HER2 expression in tumors, *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 28, pp. 187-195.
69. Lindberg H. *et al.* (2012) Evaluation of a HER2-targeting Affibody molecule combining an N-terminal HEHEHE-tag with a GGGC chelator for <sup>99m</sup>Tc-labelling at the C terminus, *Tumor Biology* 33, pp. 641-651.
70. Zhang J. *et al.* (2015) Monitoring therapeutic response of human ovarian cancer to trastuzumab by SPECT imaging with <sup>99m</sup>Tc-peptide-ZHER2:342, *Nuclear Medicine and Biology* 42, pp. 541 – 546.
71. Zhang J. *et al.* (2014) Evaluation of <sup>99m</sup>Tc-peptide-ZHER2:342 Affibody® molecule for in vivo molecular imaging, *The British Journal of Radiology* 87.

72. Ahlgren S. *et al.* (2010) Kit formulation for  $^{99m}\text{Tc}$ -labeling of recombinant anti-HER2 Affibody molecules with a C-terminally engineered cysteine, *Nuclear Medicine and Biology* 37, pp. 539 – 546.
73. Häggblad Sahlberg S. *et al.* (2012) The effect of a dimeric Affibody molecule ( $\text{Z}_{\text{EGFR}:1907}$ )<sub>2</sub> targeting EGFR in combination with radiation in colon cancer cell lines, *International Journal of Oncology* 40, pp. 176-184.
74. Malmberg J. *et al.* (2011) Imaging agents for in vivo molecular profiling of disseminated prostate cancer--targeting EGFR receptors in prostate cancer: comparison of cellular processing of [ $^{111}\text{In}$ ]-labeled affibody molecule  $\text{Z}(\text{EGFR}:2377)$  and cetuximab, *International Journal of Oncology* 38, pp. 1137-1143.
75. Tolmachev V. *et al.* (2010) Imaging of EGFR expression in murine xenografts using site-specifically labelled anti-EGFR  $^{111}\text{In}$ -DOTA- $\text{Z}(\text{EGFR}:2377)$  Affibody molecule: aspect of the injected tracer amount, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 37, pp. 613-622.
76. Nordberg E. *et al.* (2008) In vivo and in vitro uptake of  $^{111}\text{In}$ , delivered with the Affibody molecule ( $\text{Z}_{\text{EGFR}:955}$ )<sub>2</sub>, in EGFR expressing tumour cells, *Oncology Reports* 19, pp. 853-857.
77. Miao Z *et al.* (2010) Small-animal PET imaging of human epidermal growth factor receptor positive tumor with a  $^{64}\text{Cu}$  labeled affibody protein, *Bioconjugate Chemistry* 21, pp. 947–954.
78. Gong H. *et al.* (2010) *In vivo* imaging of xenograft tumors using an epidermal growth factor receptor–specific affibody molecule labeled with a near-infrared fluorophore, *Neoplasia* 12, pp. 139–149.
79. Zhao P. *et al.* (2013) Molecular imaging of hepatocellular carcinoma xenografts with epidermal growth factor receptor targeted Affibody probes, *BioMed Research International* 2013.
80. Göstring L. *et al.* (2012) Cellular effects of HER3-specific affibody molecules, *PLoS ONE* 7.
81. Malm M. *et al.* (2013) Inhibiting HER3-mediated tumor cell growth with Affibody molecules engineered to low picomolar affinity by position-directed error-prone PCR-like diversification, *PLoS One* 8.
82. Andersson K. *et al.* (2015) Comparative evaluation of  $^{111}\text{In}$ -labeled NOTA-conjugated affibody molecules for visualization of HER3 expression in malignant tumors, *Oncology Reports* 34, pp. 1042-1048.
83. Orlova A. *et al.* (2014) Imaging of HER3-expressing xenografts in mice using a ( $^{99m}\text{Tc}$ )(CO) 3-HEHEHE-Z HER3:08699 affibody molecule, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 41, pp. 1450-1459.

84. Nilvebrant J. *et al.* (2013) Development and characterization of small bispecific albumin-binding domains with high affinity for ErbB3, *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, pp. 3973-3985.
85. Nilvebrant J. *et al.* (2014) Engineering of bispecific affinity proteins with high affinity for ERBB2 and adaptable binding to albumin, *PLoS ONE* 9.
86. Houlihan G. *et al.* (2015) Directed evolution of anti-HER2 DARPins by SNAP display reveals stability/function trade-offs in the selection process, *Protein Engineering, Design and Selection* 28, pp. 269-279.
87. Zahnd C. *et al.* (2007) A designed ankyrin repeat protein evolved to picomolar affinity to Her2, *Journal of Molecular Biology* 369, pp. 1015–1028.
88. Brack S. *et al.* (2014) A bispecific HER2-Targeting FynomAb with superior antitumor activity and novel mode of action, *Molecular Cancer Therapeutics* 13, pp. 2030-2039.
89. Vaneycken I. *et al.* (2011) Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer, *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 25, pp. 2433–2446.
90. Xavier C. *et al.* (2013) Synthesis, preclinical validation, dosimetry, and toxicity of <sup>68</sup>Ga-NOTA-anti-HER2 Nanobodies for iPET imaging of HER2 receptor expression in cancer, *Journal of Nuclear Medicine* 54, pp. 776-784.
91. Iacob R. *et al.* (2014) The influence of adnectin binding on the extracellular domain of epidermal growth factor receptor, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 25, pp. 2093-2102.
92. Gainkam L. *et al.* (2011) Correlation between epidermal growth factor receptor-specific nanobody uptake and tumor burden: a tool for noninvasive monitoring of tumor response to therapy, *Molecular Imaging and Biology* 13, pp. 940–948.
93. Gainkam L. *et al.* (2008) Comparison of the biodistribution and tumor targeting of two <sup>99m</sup>Tc-labeled anti-EGFR nanobodies in mice, using pinhole SPECT/micro-CT, *Journal of Nuclear Medicine* 49, pp. 788–795.
94. Boersma Y. L. *et al.* (2011) Bispecific designed ankyrin repeat proteins (DARPins) targeting epidermal growth factor receptor inhibit A431 cell proliferation and receptor recycling, *Journal of Biological Chemistry* 286, pp. 41273–41285.
95. Ekerljung L. *et al.* (2012) Generation and evaluation of bispecific affibody molecules for simultaneous targeting of EGFR and HER2, *Bioconjugate Chemistry* 23, pp. 1802-1811.
96. Friedman M. *et al.* (2009) Engineering and characterization of a bispecific HER2xEGFR-binding affibody molecule, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 54, pp. 121-131.

97. Protelica (2013) Next-generation VEGFR-2 Antagonists, consulté le 23 juillet 2015 (<http://www.protelica.com/page-26>).
98. Stahl A. *et al.* (2013) Highly potent VEGF-A-antagonistic DARPin as anti-angiogenic agents for topical and intravitreal applications, *Angiogenesis* 16, pp. 101-111.
99. Diem M. *et al.* (2014) Selection of high-affinity Centyrin FN3 domains from a simple library diversified at a combination of strand and loop positions, *Protein Engineering, Design and Selection* 27, pp. 419-429.
100. Affilogic (2015) Pipeline, consulté le 24 juillet 2015, (<http://www.affilogic.com/pipeline>).
101. Löfblom J. *et al.* (2010) Affibody molecules: engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications, *Federation of European Biochemical Societies Letters* 584, pp. 2670–2680.
102. Orlova A. *et al.* (2013) [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>-(HE)<sub>3</sub>-Z<sub>IGF1R:455L</sub>, a new Affibody conjugate for visualization of insulin-like growth factor-1 receptor expression in malignant tumours, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 40, pp. 439-449.
103. Tolmachev V. *et al.* (2012) Imaging of insulinlike growth factor type 1 receptor in prostate cancer xenografts using the affibody molecule <sup>111</sup>In-DOTA-Z<sub>IGF1R:455L</sub>, *Journal of Nuclear Medicine* 53, pp. 90-97.
104. Su X. *et al.* (2015) PET imaging of insulin-like growth factor type 1 receptor expression with a (64)Cu-labeled Affibody molecule, *Amino Acids* 47, pp. 1409-1419.
105. Li J. *et al.* (2010) Selection of affibody molecules to the ligand-binding site of the insulin-like growth factor-1 receptor, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 55, pp. 99-109.
106. Emanuel S. *et al.* (2011) A fibronectin scaffold approach to bispecific inhibitors of epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor-I receptor, *mAbs* 3, pp. 38–48.
107. Mouratou B. *et al.* (2007) Remodeling a DNA-binding protein as a specific in vivo inhibitor of bacterial secretin PulD, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, pp. 17983–17988.
108. Krehenbrink M. *et al.* (2008) Artificial binding proteins (Affitins) as probes for conformational changes in secretin PulD, *Journal of Molecular Biology* 383, pp. 1058–1068.
109. Cinier M. *et al.* (2009) Bisphosphonate adaptors for specific protein binding on zirconium phosphonate-based microarrays, *Bioconjugate Chemistry* 20, pp. 2270–2277.
110. Cinier M. *et al.* (2012) Engineering of a phosphorylatable tag for specific protein binding on zirconium phosphonate based microarrays, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 17, pp. 399-407.
111. Dammicco S. *et al.* (en cours d'écriture) Regiospecific radiolabeling of Nanofitin on Ni Magnetic Beads with [<sup>18</sup>F]FBEM and in vivo PET studies.

112. Correa A. *et al.* (2014) Potent and specific inhibition of glycosidases by small artificial binding proteins (Affitins), *PLoS ONE* 9.
113. Buddelmeijer N. *et al.* (2009) Type II secretion system secretin PulD localizes in clusters in the *Escherichia coli* outer membrane, *Journal of Bacteriology* 191, pp. 161–168.
114. Huet S. *et al.* (2015) Use of the Nanofitin alternative scaffold as a GFP-ready fusion tag, *PLoS ONE* 10.
115. Miranda F. *et al.* (2011) Reagentless fluorescent biosensors from artificial families of antigen binding proteins, *Biosensors and Bioelectronics* 26, pp. 4184–4190.
116. Gera N. *et al.* (2011) Highly stable binding proteins derived from the hyperthermophilic Sso7d scaffold, *Journal of Molecular Biology* 409, pp. 601-616.
117. Gera N. *et al.* (2012) Design of pH sensitive binding proteins from the hyperthermophilic Sso7d scaffold, *PLoS One* 7.
118. Béhar G. *et al.* (2013) Tolerance of the archaeal Sac7d scaffold protein to alternative library designs: characterization of anti-immunoglobulin G Affitins, *Protein Engineering, Design and Selection* 26, pp. 267–275.
119. Béhar G. *et al.* (2014) Switching an anti-IgG binding site between archaeal extremophilic proteins results in Affitins with enhanced pH stability, *Journal of Biotechnology* 192, pp. 123-129.
120. Mouratou B. *et al.* (2015) Artificial affinity proteins as ligands of immunoglobulins, *Biomolecules* 5, pp. 60-75.
121. Hussain M. *et al.* (2013) Avidity-mediated virus separation using a hyperthermophilic affinity ligand, *Biotechnology Progress* 29, pp. 237–246.
122. Resnier P. (2014) *Nano-Vectorisation de siRNA via des nanocapsules lipidiques : contournement de la résistance du mélanome aux chimiothérapies conventionnelles*, Thèse de doctorat de l'Université d'Angers (France).
123. Wang Y *et al.* (2004) A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance *in vitro*, *Nucleic Acids Research* 32, pp. 1197–1207.
124. Pacheco S. *et al.* (2014) Affinity transfer to the archaeal extremophilic Sac7d protein by insertion of a CDR, *Protein Engineering, Design and Selection* 27, pp. 431-438.
125. Mouratou B. *et al.* (2012) Ribosome display for the selection of Sac7d scaffolds, *Methods in Molecular Biology* 805, Chap. 18, pp. 315–331.
126. Turker N. S. *et al.* (2014) An EGFR targeted PET imaging probe for the detection of colonic adenocarcinomas in the setting of colitis, *Theranostics* 4, pp. 893–903.
127. Ping Li W. *et al.* (2008) Receptor-binding, biodistribution, and metabolism studies of <sup>64</sup>Cu-DOTA-cetuximab, a PET-imaging agent for epidermal growth-factor receptor-positive tumors, *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 23, pp. 158–171.

128. Robinson H. *et al.* (1998) The hyperthermophile chromosomal protein Sac7d sharply kinks DNA, *Nature* 392, pp. 202-205.
129. Cinier M. (2009) *Nouvelles stratégies d'ancrage de protéines sur une surface de phosphonate de zirconium*, Thèse de doctorat de l'Université de Nantes (France).
130. Liu H. *et al.* (2014) Design and optimization of a phosphopeptide anchor for specific immobilization of a capture protein on zirconium phosphonate modified supports, *Langmuir* 30, pp. 13949-13955.
131. Li Y. et Sousa R. (2012) Novel system for in vivo biotinylation and its application to crab antimicrobial protein scygonadin, *Biotechnology Letters* 34, pp. 1629–1635.
132. Avidity (2015) Reaction conditions for biotin ligase (BirA enzyme). Avidity *Protocols*, consulté le 09 août 2015. ([https://www.avidity.com/sites/default/files/protocol-pdf/Reaction%20conditions%20for%20BirA%20biotin%20ligas e.pdf](https://www.avidity.com/sites/default/files/protocol-pdf/Reaction%20conditions%20for%20BirA%20biotin%20ligas%20e.pdf))
133. Terpe K. (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems, *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, pp. 523–533.
134. Cull M. G. et Schatz P. J. (2000) Biotinylation of proteins *in vivo* and *in vitro* using small peptide tags, *Methods in Enzymology* 326, pp. 430–440.
135. Scheich C. *et al.* (2007) Vectors for co-expression of an unrestricted number of proteins, *Nucleic Acids Research* 35.
136. Rotem E. *et al.* (2010) Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, pp. 12541–12546.
137. Guzman L. M. *et al.* (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter, *Journal of Bacteriology* 177, pp. 4121–4130.
138. Khlebnikov A. *et al.* (2001) Homogeneous expression of the P(BAD) promoter in *Escherichia coli* by constitutive expression of the low-affinity high-capacity AraE transporter, *Microbiology* 147, pp. 3241–3247.
139. Studier F. W. (2006) Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures, *National Institutes of Health* 41, pp. 207–234.
140. Invitrogen (2010) pBAD/His A, B, and C & pBAD/Myc-His A, B, and C, Catalogue V430-01 et V440-01.
141. Samuelson J. (2011) Expression systems. In *Production of Membrane Proteins: Strategies for Expression and Isolation*, Chap. 1, pp. 11–36.
142. Inoue H. *et al.* (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene* 96, pp. 23–28.



143. Chung C. T. *et al.* (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, pp. 2172–2175.
144. Blommel P. *et al.* (2009) Enhanced bacterial protein expression during auto-induction obtained by alteration of lac repressor dosage and medium composition, *Biotechnology Progress* 23, pp. 585–598.
145. Conte E. *et al.* (2011) pGOODs: new plasmids for the co-expression of proteins in *Escherichia coli*, *Biotechnology Letters* 33, pp. 1815–1821.
146. Chapman-Smith A. *et al.* (1994) Expression, biotinylation and purification of a biotin-domain peptide from the biotin carboxy carrier protein of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase, *Biochemical Journal* 302, pp. 881–887.
147. Knecht S. *et al.* (2009) Oligohis-tags: mechanisms of binding to Ni<sup>2+</sup>-NTA surfaces, *Journal of Molecular Recognition* 22, pp. 270–279.
148. Liu H. *et al.* (2003) Molecular simulations to determine the chelating mechanisms of various metal ions to the His-tag motif: a preliminary study, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 21, pp. 31–41.
149. Anderegg G. (1982) Critical survey of stability constants of NTA complexes, *Pure and Applied Chemistry* 54, pp.2693–2758.
150. Russell B. *et al.* (2005) Comparison of HisDetector™ Nickel-NTA Enzyme Conjugates with Other Methods for the Detection of His-Tagged Fusion Proteins in Western Blots, *KPL Application note 1–6*.
151. Enyedy E. *et al.* (2004). Complexation of desferricoprogen with trivalent Fe, Al, Ga, In and divalent Fe, Ni, Cu, Zn metal ions: effects of the linking chain structure on the metal binding ability of hydroxamate based siderophores, *Journal of Inorganic Biochemistry* 98, pp. 1957–1966.
152. Eby G. (2006) Stability Constants (log K<sub>1</sub>) of Various Metal Chelate, consulté le 07 août 2015 ([http://www.coldcure.com/html/stability\\_constants.html](http://www.coldcure.com/html/stability_constants.html)).
153. Bauer I. et Knölker H. (2008) Iron Complexes in Organic Chemistry. *Iron Catalysis in Organic Chemistry*, Chap. 1, pp. 1–28.
154. Dojindo (2015) Metal chelate, consulté le 31 juillet 2015, ([http://www.dojindo.com/Images/Product%20Photo/Chelate Table of Stability Constants.pdf](http://www.dojindo.com/Images/Product%20Photo/Chelate%20Table%20of%20Stability%20Constants.pdf)).
155. Elsevier (2005) *Chemical Thermodynamics of Compounds and Complexes of U, Np, Pu, Am, Tc, Se, Ni and Zr With Selected Organic Ligands*, p. 654.
156. Grum D. (2013) Design of a Modular Protein-Based MRI Contrast Agent for Targeted Application, *PLoS One* 8.

157. Jiang D. *et al.* (2010) Ternary complexes of iron, amyloid- $\beta$  and nitrilotriacetic acid: binding affinities, redox properties, and relevance to iron-induced oxidative stress in Alzheimer's disease, *Biochemistry* 48, pp. 323–343.
158. Chen X. *et al.* (2012) Chemical Application of displacement principle for detecting heavy metal ions and EDTA using microcantilevers, *Sensors Actuators B: Chemical* 161, pp. 203–208.
159. Sun Y. *et al.* (1996) Indium(III) and Gallium(III) complexes of bis(aminoethanethiol) ligands with different denticities: stabilities, molecular modeling, and *in vivo* behavior, *Journal of Medicinal Chemistry* 39, pp. 458-470.
160. Machida M. *et al.* (2007) Purification of phosphoproteins by immobilized metal affinity chromatography and its application to phosphoproteome analysis, *Federation of European Biochemical Sciences Journal* 274, pp. 1576–1587.
161. QIAGEN (2011) *PhosphoProtein Handbook. Sample and Assay Technologies* (Vol. 2nd edition).
162. Nair N. *et al.* (2010) NMR Studies of zinc, copper, and iron binding to histidine, the principal metal ion complexing site of amyloid- $\beta$  peptide, *Journal of Alzheimer's disease* 20, 57-66.
163. Buehl C. *et al.* (2014) Resolving acetylated and phosphorylated proteins by neutral urea Triton-polyacrylamide gel electrophoresis: NUT-PAGE, *Biotechniques* 57, pp. 72-80.
164. Kinoshita E. *et al.* (2012) Phos-tag SDS-PAGE systems for phosphorylation profiling of proteins with a wide range of molecular masses under neutral pH conditions, *Proteomics* 12, pp. 192-202.
165. Kinoshita E. *et al.* (2006) Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins, *Molecular and Cellular Proteomics* 5, pp. 749–757.
166. Malito E. (2015) Protein folds and motifs, consulté le 11 septembre 2015 (<http://www.stampcollectingproject.org/other-stuff-1/folds-and-motifs>)
167. Zhou Y. *et al.* (2009) Viral calciomics: Interplays between Ca<sup>2+</sup> and virus, *Cell Calcium* 46, pp. 1-17.
168. Iwig J. *et al.* (2013) Structural analysis of autoinhibition in the Ras-specific exchange factor RasGRP1, *eLife* 2.
169. Liu L. et Franz K. (2007) Phosphorylation-dependent metal binding by  $\alpha$ -synuclein peptide fragments, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 12, pp. 234-247.
170. Dudev T. et Lim C. (2014) Competition among Metal Ions for Protein Binding Sites: Determinants of Metal Ion Selectivity in Proteins, *Chemical Reviews* 114, pp 538–556.
171. Jones E. *et al.* (2008) An altered mode of calcium coordination in methionine-oxidized calmodulin, *Biophysical Journal* 95, pp. 5268-5280.



172. Kaufman Katz A. *et al.* (1996) Calcium ion coordination: a comparison with that of beryllium, magnesium, and zinc, *Journal of American Chemistry Society* 118, pp. 5752-5763.
173. Lewit-Bentley A. et Réty S. (2000) EF-hand calcium-binding proteins, *Current Opinion in Structural Biology* 10, pp. 637–643.
174. Aryal U. *et al.* (2008) Optimization of immobilized gallium(III) ion affinity chromatography for selective binding and recovery of phosphopeptides from protein digests, *Journal of Biomolecular Techniques* 19, pp. 296–310.
175. Feng S. *et al.* (2007) Immobilized zirconium ion affinity chromatography for specific enrichment of phosphopeptides in phosphoproteome analysis, *Molecular & Cellular Proteomics* 6, pp. 1656–1665.
176. Bünzli J. (2004) Luminescent lanthanide probes as diagnostic and therapeutic tools. *Metal Ions in Biological Systems* 42, Chap. 2, pp. 39–76.
177. Turro C. *et al.* (2003) Lanthanide ions as luminescent probes of proteins and nucleic acids, *Metals Ions in Biological Systems* 40, pp. 323–354.
178. Comby S. et Bünzli J.-C. (2007) Lanthanide near-infrared luminescence in molecular probes and devices. *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths* 37, Chap. 235, pp. 217-470.
179. Franz K. *et al.* (2003) Lanthanide-binding tags as versatile protein co-expression probes, *ChemBioChem* 4, pp. 265–271.
180. Cooper T. (2009) *Fluorescent Assay Technologies for G-protein Interactions*. Thèse de doctorat de l'Université publique d'Adélaïde (Australie).
181. Ghisaidoobe A. et Chung S. (2014) Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques, *International Journal of Molecular Sciences* 15, pp. 22518-22538.
182. Faller P. *et al.* (2012) Methods and techniques to study the bioinorganic chemistry of metal-peptide complexes linked to neurodegenerative diseases, *Coordination Chemistry Reviews* 256, pp. 2381–2396.
183. Yu Q. *et al.* (1997) Avoiding interferences from Good's buffers: a contiguous series of noncomplexing tertiary amine buffers covering the entire range of pH3–11, *Analytical Biochemistry* 253, pp. 50–56.
184. Barthelmes K. *et al.* (2012) Engineering Encodable Lanthanide-Binding Tags (LBTs) into Loop Regions of Proteins, *Journal of American Chemistry Society* 133, pp. 808–819.
185. Nitz M. *et al.* (2003) A powerful combinatorial screen to identify high-affinity Terbium(III)-binding peptides, *ChemBioChem* 4, pp. 272–276.

186. Sharpe T. (2012) Derivation of general function for single-site binding, *Biozentrum Biophysics Facility* ([http://www.biozentrum.unibas.ch/fileadmin/redaktion/Forschung/Research\\_Groups/BF/Protocols/Binding\\_Fit.pdf](http://www.biozentrum.unibas.ch/fileadmin/redaktion/Forschung/Research_Groups/BF/Protocols/Binding_Fit.pdf))
187. Nitz M. *et al.* (2004) Structural origin of the high affinity of a chemically evolved lanthanide-binding peptide, *Angewandte Chemie International Edition* 43, pp. 3682–3685.
188. Wöhnert J *et al.* (2003) Protein alignment by a coexpressed lanthanide-binding tag for the measurement of residual dipolar couplings, *Journal of American Chemistry Society* 125, pp. 13338–13339.
189. Martin L. *et al.* (2007) Double-Lanthanide-Binding Tags : design, photophysical properties, and NMR applications, *Journal of American Chemistry Society* 129, pp. 7106–7113.
190. Martin L. (2008) Development of Lanthanide-Binding Tags (LBTs) as powerful and versatile peptides for use in studies of proteins and protein interactions, Thèse de doctorat du *Massachusetts Institute of Technology* (Boston, Massachusetts, USA).
191. Clark S. *et al.* (2008) Interleukin-1 receptor antagonist penetrates human brain at experimentally therapeutic concentrations, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28, pp. 387–394.
192. Pardoux R *et al.* (2012) Modulating uranium binding affinity in engineered calmodulin EF-Hand peptides: effect of phosphorylation, *PLoS One* 7.
193. Silvaggi N. *et al.* (2007) Double-lanthanide-binding tags for macromolecular crystallographic structure determination, *Journal of American Chemistry Society* 129, pp. 7114–7120.
194. Meggio F. et Pinna L. (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2 ? *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 17, pp. 349–368.
195. Cho H. (2006) *Chemistry of tetravalent plutonium and zirconium: Hydrolysis, solubility, colloid formation and redox reactions* Thèse de doctorat de l'Université de Heidelberg (Allemagne).
196. Larsen E. et Adams A. (1967) Potassium bis(nitrilotriacetato)zirconate(IV), *Inorganic Syntheses* 10, pp. 7–8.
197. Brom M. *et al.* (2012) Improved labelling of DTPA- and DOTA-conjugated peptides and antibodies with <sup>111</sup>In in HEPES and MES buffer, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging research* 2.
198. Mass R. *et al.* (2004) The HER receptor family: a rich target for therapeutic development, *International Journal of Radiation, Oncology, Biology, Physics* 58, pp. 932–940.
199. Steinkamp M. *et al.* (2014) ErbB3 is an active tyrosine kinase capable of homo- and heterointeractions, *Molecular and cellular biology* 34, pp. 965–977.

200. Lammerts van Bueren J. *et al.* (2012) The antibody zalutumumab inhibits epidermal growth factor receptor signaling by limiting intra- and intermolecular flexibility, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, pp. 6109-6114.
201. Brand T. *et al.* (2012) The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer, *Discovery Medicine* 12, pp. 419-432.
202. Avraham R. et Yarden Y. (2011) Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops, *Nature reviews Molecular cell biology* 12, pp. 104-117.
203. Nyati M. *et al.* (2006) Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy, *Nature Reviews Cancer* 6, pp. 876-885.
204. Rivera F. *et al.* (2008) Current situation of Panitumumab, Matuzumab, Nimotuzumab and Zalutumumab, *Acta oncologica* 47, pp. 9-19.
205. Ladanyi M. et Pao W. (2008) Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond, *Modern pathology* 21, pp. 16-22.
206. Roovers R. C. *et al.* (2007) Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies, *Cancer immunology immunotherapy* 56, pp. 303-317.
207. Goux M. *et al.* (en cours d'écriture) Nanofitin as a new imaging agent for diagnosis of over-EGFR expressing tumour, *Journal of Nuclear Medicine*.
208. Shafer D. *et al.* (2000) Reaction of tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) with maleimide and  $\alpha$ -haloacyl groups: anomalous elution of TCEP by gel filtration, *Analytical Biochemistry* 282, pp. 161-164.
209. Kahn N. (1984) Kinetics and mechanism of the alkaline hydrolysis of maleimide, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 73, pp. 1767-1771.
210. Nakajima T. *et al.* (2014) Orthotopic lung cancer murine model by nonoperative transbronchial approach, *The Annals of Thoracic Surgery* 97, pp. 1771-1775.
211. Tang Z. *et al.* (2008) Dual MET-EGFR combinatorial inhibition against T790M-EGFR-mediated erlotinib-resistant lung cancer, *British Journal of Cancer* 99, pp. 911-922.
212. Weiss G. J. *et al.* (2008) EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines, *Annals of Oncology* 19, pp. 1053-1059.
213. Raben D. *et al.* (2005) The effects of Cetuximab alone and in combination with radiation and/or chemotherapy in lung cancer, *Clinical Cancer Research* 15, pp. 795-805.
214. Li C. *et al.* (2015) A novel multivalent  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled EG2-C4bp $\alpha$  antibody for targeting the epidermal growth factor receptor in tumor xenografts, *Nuclear Medicine and Biology* 42, pp. 547-554.



## Annexes

### Annexe 1 : Aligement des séquences Uniprot des EGFR humain (P00533) et murin (Q01279) selon le logiciel Multalin.

1							70
EGFR (HER1)	MRPSGTAGAA	LLALLAALCP	ASRALEEKV	CQGTSNKLTQ	LGTFEDHFLS	LQRMFNCEV	VLGNLEITYV
EGFR_Murin	.....RTT	..V..T...A	.GG.....	.....R...	.....	....Y.....	.....
71							140
EGFR (HER1)	QRNYDLSFLK	TIQEVAGYVL	IALNTVERIP	LENLQIIRGN	MYYENSYALA	VLSNYDANKT	GLKELPMRNL
EGFR_Murin	.....	.....	.....	.....	AL...T...	I...GT.R.	..R.....
141							210
EGFR (HER1)	QEILHGAVRF	SNNPALCNVE	SIQWRDIVSS	DFLSNMSMDF	QNHLGSCQKC	DPSCPNGSCW	GAGEENCQKL
EGFR_Murin	....I.....	....I...MD	T.....QN	V.M.....L	.S.PS.P..	.....	.G.....
211							280
EGFR (HER1)	TKIICAQCS	GRCRGKSPSD	CCHNQCAAGC	TGPRESCLV	CRKFRDEATC	KDTCPLMLY	NPTTYQMDVN
EGFR_Murin	.....	H....R...	.....	.....	.Q..Q....	.....	.....
281							350
EGFR (HER1)	PEGKYSFGAT	CVKCKPRNYV	VDHGSCVRA	CGADSYEMEE	DGVRKCKKCE	GPCRKVCNGI	GIGEFKDSLS
EGFR_Murin	.....	.....	.....	..P.Y..V..	..I.....D	.....	.....T..
351							420
EGFR (HER1)	INATNIKHFK	NCTSIGDLH	ILPVAFRGDS	FTHTPPLDPQ	ELDILKTVKE	ITGFLLIQAW	PENRTDLHAF
EGFR_Murin	.....	Y..A.....	.....K...	..R.....R	..E.....	.....	..D.W.....
421							490
EGFR (HER1)	ENLEIIRGRT	KQHGFSLAV	VSLNITSLGL	RSKLEISDGD	VIISGNKNC	YANTINWKKL	FGTSGQTKI
EGFR_Murin	.....	.....	.G.....	.....	.....R...	.....	...PN.....
491							560
EGFR (HER1)	ISNRGENSCK	ATGQVCHALC	SPEGCWGPEP	RDCVSCRNV	RGRECVKCN	LLEGEPREFV	ENSECIQCHP
EGFR_Murin	MN..A.KD..	.VMH..NP..	.S.....	.....Q...	.....E...	I.....	.....
561							630
EGFR (HER1)	ECLPQAMNIT	CTGRGPDNCI	QCAHYIDGPH	CVKTCFAGVM	GENNTLVWKY	ADAGHVCHLC	HPNCTYGCTG
EGFR_Murin	.....	.....	.....	.....I.	.....	...NN.....	..A.....A.
631							700
EGFR (HER1)	PGLEGCP--	NGPKIPSIAT	GMVGALLLL	VVALGIGLFM	RRRHIVRKRT	LRLLQEREL	VEPLTPSGEA
EGFR_Murin	...Q..EVWP	S.....	.I..G..FIV	.....	.....	.....	.....
701							770
EGFR (HER1)	PNQALLRILK	ETEFKKIKVL	GSGAFGTVYK	GLWIPEGEKV	KIPVAIKELR	EATSPKANKE	ILDEAYVMAS
EGFR_Murin	....H.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
771							840
EGFR (HER1)	VDNPHVCRL	GICLTSTVQL	ITQLMPFGCL	LDYVREHKDN	IGSQYLLNWC	VQIAKGMNYL	EDRRLVHRDL
EGFR_Murin	.....	.....	.....Y...	.....	.....	.....	.....
841							910
EGFR (HER1)	AARNVLVKT	QHVKITDFGL	AKLLGAEKE	YHAEGGKVI	KWMALESILH	RIYTHQSDVW	SYGVTWELM
EGFR_Murin	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
911							980
EGFR (HER1)	TFGSKPYDGI	PASEISSILE	KGERLPQPP	CTIDVYMIMV	KCWMIDADSR	PKFRELIIEF	SKMARDPQRY
EGFR_Murin	.....	...D.....	.....	.....	.....	.....L..	.....
981							1050
EGFR (HER1)	LVIQGDERMH	LPSPTDSNFY	RALMDEEDMD	DVVDADAYLI	PQQGFFSSPS	TSRTPLLSSL	SATSNNSTVA
EGFR_Murin	.....	.....	.....E	.....	.....N...	.....	.....
1051							1120
EGFR (HER1)	CIDRNLQSC	PIKEDSFLQR	YSSDPTGALT	EDSIDDTFLP	VPEYINQSV	KRPAGSVQNP	VYHNQPLNPA

EGFR\_Murin ..N...--.. RV...A.... .....V. ..N...A... ....V..... .....H..  
1121 1190  
EGFR (HER1) PSRDPHYQDP HSTAVGNPEY LNTVQPTCVN STFDSPAHWA QKGSHQISLD NPDYQQDFFP KEAKPNGIFK  
EGFR\_Murin .G..L...N. ..N..... ..A....LS .G.N...L.I .....M... .....T.....  
1191 1212  
EGFR (HER1) GSTAENAEYL RVAPOSSEFI GA  
EGFR\_Murin .P..... ..P..... ..

## Annexe 2 : Récapitulatif des radiotraceurs anti-EGFR existants.

Les manipulations ont été réalisées sur des souris portant des cellules tumorales A431. Pour l’Affibody Z2377, la manipulation a été réalisée avec les souches Hep3B (sur-expression EGFR), PLC5 (EGFR-positive) et HepG2 (EGFR-négative). Pour les fragments Cetuximab-F(ab')<sub>2</sub>, les manipulations ont été réalisées sur la souche CT-26. \* : spike de 30 µg, \*\* : blocking avec 300 µg, \*\*\* : blocking avec 500 µg.

Nom	Marquage	Ratio tumeur/sang	Absorption de la tumeur positive (% ID/g)	Temps p.i.	Réf
<b>Cetuximab</b>	<sup>64</sup> Cu-DOTA	1,82	22,92	48h	[127]
<b>Cetuximab</b>	<sup>64</sup> Cu-DOTA	1,12	18,49	24 h	[127]
<b>Cetuximab***</b>	<sup>64</sup> Cu-DOTA	0,54	10,69	24 h	[127]
<b>Cetuximab-F(ab')<sub>2</sub></b>	<sup>64</sup> Cu-DOTA	-	4,42% SUV	24 h	[126]
<b>Nanobody 7C12</b>	<sup>99m</sup> Tc	16,35	6,54	1h	[92]
<b>Nanobody 7C12</b>	<sup>99m</sup> Tc	21,69	9,11	1h30	[93]
<b>Nanobody 7D12</b>	<sup>99m</sup> Tc	6,41	6,09	1h30	[93]
<b>Nanobody 7D12</b>	<sup>68</sup> Ga-DFO	14,4	6,1	2h	[39]
<b>Nanobody 7D12</b>	<sup>89</sup> Zr-DFO	35,2	7,6	2h	[39]
<b>Affibody Z1907</b>	<sup>125</sup> I-PIB	2,07	2,48	4h	[25]
<b>Affibody Z1907</b>	<sup>125</sup> I-PIB	6,50	0,26	24 h	[25]
<b>Affibody Z1907</b>	<sup>18</sup> F-FBEM	1,05	3,94	3h	[30]
<b>Affibody Z1907</b>	<sup>111</sup> In-DTPA	14,57	3,35	4h	[25]
<b>Affibody Z1907</b>	<sup>111</sup> In-DTPA	95,60	2,39	24 h	[25]
<b>Affibody Z1907</b>	<sup>64</sup> Cu-DOTA	1,00	11,71	4h	[77]
<b>Affibody Z1907</b>	<sup>64</sup> Cu-DOTA	<5	8,52 (Hep3b)/6,46 (PLC5)	24 h	[79]
<b>Affibody Z2377</b>	<sup>111</sup> In-DOTA	?	?	?	[75]
<b>Affibody Z1907*</b>	<sup>18</sup> F-CBT	1,41	4,08	3h	[32]
<b>Affibody Z1907**</b>	<sup>18</sup> F-CBT	1,28	2,34	3h	[32]
<b>Affibody Z1907***</b>	<sup>18</sup> F-FBEM	8,08	0,97	3h	[30]
<b>Affibody Z1907*</b>	Al <sup>18</sup> F-NOTA	2,02	4,77	3h	[32]
<b>Affibody Z1907***</b>	<sup>64</sup> Cu-DOTA	5,35	6,15	4h	[77]
<b>Affibody (Z1907)<sub>2</sub></b>	<sup>125</sup> I-PIB	1,73	1,9	4h	[25]
<b>Affibody (Z1907)<sub>2</sub></b>	<sup>125</sup> I-PIB	11,50	0,46	24 h	[25]
<b>Affibody (Z1907)<sub>2</sub></b>	<sup>111</sup> In-DTPA	13,50	2,43	4h	[25]
<b>Affibody (Z1907)<sub>2</sub></b>	<sup>111</sup> In-DTPA	39,47	1,5	24 h	[25]
<b>Affibody (Z950)<sub>2</sub></b>	<sup>111</sup> In-DTPA	9,50	3,8	4h	[76]

### Annexe 3 : Produits et matériel

L'ensemble des produits chimiques proviennent de chez Sigma-Aldrich (hors spécification).

**Tableau 26 : Produits chimiques.**

Nom	Numéro CAS	Fournisseur	Nom	Numéro CAS	Fournisseur
<b>Acide ascorbique</b>	50-81-7	VWR	<b>d-Desthiobiotine</b>	533-48-2	IBA technologies
<b>Agarose</b>	9012-36-6	Eurogentec	<b>EDTA solution étalon</b>	139-33-3	Fluka
<b>FB-précurseur</b>	124915-06-6	Centre de Recherches du Cyclotron	<b>FBEM</b>	1089194-09-1	Centre de Recherches du Cyclotron
<b>D-(+)-glucose</b>	50-99-7	Fluka	<b>NTA</b>	139-13-9	Fluka

**Tableau 27 : Matériel et kit.**

Nom	Fournisseur	Nom	Fournisseur
<b>Amorces oligonucléotidiques</b>	Eurofins	<b>PBS pH7.4 (solution stérile)</b>	Life Technologies
<b>Billes His-mag sepharose™ Ni</b>	GE Healthcare	<b>PD-10</b>	GE Healthcare
<b>Bugbuster® 10x</b>	Novagen	<b>Pénicilline-Streptomycine (10000U/mL)</b>	Life Technologies
<b>Caméra gel agarose XCD-SX910 v2.20E</b>	SONY	<b>PeppermintStick™ (marqueur de taille)</b>	Life technologies
<b>Cellules A431 (ATCC® CRL-1555™)</b>	ATCC	<b>Peptides</b>	Proteogenix
<b>Cellules H520 (ATCC® HTB-182™)</b>	ATCC	<b>Phosphatase alcaline FastAP</b>	Thermo Scientific
<b>Coloration PageBlue™</b>	Fermentas	<b>Plaques 96 puits fond plat transparentes</b>	Greiner Bio-one
<b>Coloration Pro-Q® Diamond</b>	Life technologies	<b>Plaques 96 puits fond plat blanches</b>	Greiner bio-one
<b>CT120 eXplore</b>	Triton Imaging	<b>Polymérase Pfu</b>	Thermo Scientific
<b>Dialyse Slide-a-lyzer mini 2KDa 100µL</b>	Fisher Scientific	<b>Polymérase Phusion (2U/µL)</b>	Thermo Scientific
<b>DMEM HG supplémenté en L-glutamine</b>	Life Technologies	<b>QIAprep® spin miniprep kit</b>	QIAGEN
<b>DNAseI (10mg/mL)</b>	Sigma	<b>QIAquick® Gel Extraction Kit</b>	QIAGEN
<b>Eau MilliQ 15MΩ (station)</b>	MilliPore	<b>QIAquick® PCR purification kit</b>	QIAGEN
<b>Eau MilliQ 18MΩ (station)</b>	MilliPore	<b>RPMI 1640 supplémenté en L-glutamine</b>	Life Technologies
<b>Eau stérile</b>		<b>Sonificateur Vibra Cell 75022</b>	Bioblock Scientific
<b>Electrophorèse Agarose Mini-Sub® Cell GT</b>	BIORAD	<b>Souris Balb/c</b>	CHU Liège
<b>Electrophorèse SDS Mini-PROTEAN® tetra cell</b>	BIORAD	<b>Souris Balb/c nude</b>	Charles Rivers
<b>Enzyme de restriction DpnI</b>	Thermo Scientific	<b>Spectrofluorimètre FP 6500</b>	Jasco



<b>Enzymes de restriction Fast Digest</b>	Thermo Scientific	<b>Spectrophotomètre UV-2401 PC</b>	Shimadzu
<b>FASTlab multi-tracer</b>	GE Healthcare	<b>Spectropolarimètre 810</b>	Jasco
<b>FBS inactivé par chauffage approuvé U.E.</b>	Life Technologies	<b>Strep-Tactin superflow® 50%</b>	IBA technologies
<b>Filtre Minisart 0.2µm PES 1.7cm<sup>2</sup></b>	Sartorius	<b>SymmetryPrep C18 (7.8x300 mm; 7 µm)</b>	Waters
<b>Gamma Counter Automatic Wizard<sup>2</sup></b>	Perkin Elmer	<b>T4 DNA ligase</b>	Thermo Scientific
<b>GelGreen® 10 000X</b>	Invitrogen	<b>T5 exonuclease (10U/µL)</b>	
<b>IRM 9.4T</b>	Agilent	<b>Tampon de charge protéine</b>	
<b>ISO Buffer (5x)</b>		<b>Tampon de charge ADN</b>	Fermentas
<b>Lecteur de plaque Infinite® M-1000</b>	TECAN	<b>Tampon de migration protéine</b>	
<b>Lecteur de plaque LabSystem iEMS</b>	BIORAD	<b>Tampon Pfu + MgSO<sub>4</sub> (10X)</b>	Fermentas
<b>Marqueur de taille ADN SM1263</b>	Fermentas	<b>Tampon Phusion HF 5x</b>	Thermo Scientific
<b>Marqueur de taille ADN SmartLadder</b>	Eurogentec	<b>Tampon R/EDTA (Régénération)</b>	IBA technologies
<b>MicroCal Auto-iTC 200</b>	Malvern	<b>Taq ligase (40U/µL)</b>	NEB
<b>MicroPET Focus 120</b>	Siemens	<b>TBE</b>	
<b>MinElute® Reaction Cleanup Kit</b>	QIAGEN	<b>Thermocycleur MJ Mini™ Personal</b>	BIORAD
<b>Mix dNTP 10µM</b>	Thermo Scientific	<b>Trans-illuminateur gel agarose</b>	
<b>Nanodrop</b>		<b>Trypsine EDTA 0.05%</b>	Life Technologies
<b>Ni(II)-NTA superflow® 50%</b>	QIAGEN	<b>Vecteurs pAFG06, pAFG08, pAFG10, pAFG30, pNF4</b>	Affilogic SAS
<b>PageRuler™ Plus (marqueur de taille)</b>	Thermo Scientific	<b>Vecteurs pNF1, puc57-gCKII</b>	UFIP
<b>pBAD33 (ATCC®87402)</b>	ATCC	<b>Vivaspin-500 3kDa</b>	GE Healthcare

Annexe 4 : Tableau de scores souris

Nom et numéro :		Date de début d'expérience :			
Paramètre	Description	Score	Date	Date	Date
Apparence	Œil vif	0			
	Pelage hirsute et terne	1			
	Voûtée	2			
Comportement (sans toucher la cage)	Active, interagit avec l'environnement	0			
	Légère diminution de l'activité, moins interactive	1			
	Diminution prononcée de l'activité, isolée	2			
	Automutilation, hyperactivité ou immobilité	3			
Comportement (en touchant la cage)	S'éloigne rapidement	0			
	Bouge lentement ou réagit de manière exagérée	1			
	S'éloigne ou bout d'un moment	2			
	Ne bouge pas, ne réagit pas	3			
« Body condition Score »	Normal	0			
	Maigre	1			
	Squelettique	2			
Métastase	Absence	0			
	Présence	HEP			
TOTAL : (si ≥ 5, HEP)					

## Annexe 5 : Productions scientifiques

### Publications

- **Marine Goux et al.** (acceptée) *In vivo* phosphorylation of a peptide tag for protein purification, *Biotechnology Letters*.
- **Marine L. Goux et al.** (en cours d'écriture) Nanofitin as a new imaging agent for diagnosis of over-EGFR expressing tumour.
- Sylvestre Dammico, **Marine L. Goux et al.** (en cours d'écriture) Regiospecific radiolabeling of Nanofitin on Ni Magnetic Beads with [<sup>18</sup>F]FBEM and *in vivo* PET studies.

### Posters

- BioForum 2015 (Liège, Belgique) : Strategies of regioselective radiolabeling of Nanofitin binder for imaging
- NanoFar Autumn School 2014 (Bruxelles, Belgique) : Regioselective labeling of Nanofitin by using a phosphorylated peptide tag
- EDBS 2013 (Nantes, France) : A new approach in protein phosphorylation for Nanofitin radiolabeling
- NanoFar Autumn School 2013 (Saint-Jacques de Compostelle, Espagne) : Development of an *in vivo* phosphorylation system in *Escherichia coli*

### Communication orale

- NanoFar Autumn School 2012 (Angers, France) : Targeting of Nanofitin through the blood brain barrier for the PET imaging of the central nervous system





# Thèse de Doctorat

Marine GOUX

## Fonctionnalisation de protéines alternatives aux anticorps appliquée à l'imagerie médicale en oncologie

Functionalization of protein scaffolds as alternatives to antibodies for medical imaging in oncology

### Résumé

La tomographie par émission de positon (TEP) est une technique d'imagerie médicale permettant le diagnostic et le suivi de patient en oncologie. L'utilisation des anticorps et de leurs fragments pour le ciblage de biomarqueurs en TEP présente de nombreuses difficultés liées notamment à leur clairance lente (taille >100 kDa). Leur marquage, faisant intervenir principalement des réactions peu spécifiques, conduit à un mélange hétérogène de produits et parfois à l'inactivation des protéines.

Le développement d'un nouvel outil de suivi *in vivo* des patients à l'aide de petites protéines alternatives aux anticorps, les Nanofitines (NF), permet de s'affranchir des contraintes liées à la taille (NF ≈ 10 kDa). La mise en place d'une stratégie de marquage originale et site-spécifique d'une NF sans étape de couplage chimique a d'abord été envisagée dans cette étude.

L'approche est basée sur la capacité naturelle des phosphates à fixer des cations métalliques. L'insertion génétique d'une étiquette peptidique phosphorylable, *in vivo* ou *in vitro*, a permis la chélation d'un lanthanide en solution, le Tb(III), avec une affinité de l'ordre du  $\mu\text{M}$ . La seconde génération d'étiquettes peptidiques obtenues par mutagenèse a permis la chélation du Tb(III) avec une affinité d'environ 500 nM à pH7 et 50 nM à pH5,5, et une affinité pour le Ga(III) de l'ordre du  $\mu\text{M}$  à pH5,5. Parallèlement, la biodistribution et le ciblage spécifique *in vivo* d'une NF anti-EGFR radiomarquée à l'aide du  $^{18}\text{F}$ -FBEM ont été évalués dans un double modèle tumoral murin. Les images TEP obtenues avec un bon contraste ont permis de valider la preuve de concept quant à l'utilisation des NF en tant qu'outil en imagerie médicale.

### Mots clés

Nanofitine, protéine alternative aux anticorps, étiquette peptidique, phosphorylation, chélation de métaux, radiomarquage, imagerie TEP, EGFR.

### Abstract

Positron-emission tomography (PET) is a medical imaging technique allowing diagnosis and therapy response monitoring in oncology. Biomarker targeting for PET imaging with antibodies, or their fragments, shows a lot of issues due to their slow blood clearance (size >100 kDa). Moreover, radiolabelling, which often occurs on lysines, is non-regioselective and leads to a heterogeneous mixture of products and sometimes protein inactivation.

The development of new molecular probes for patient monitoring with small protein scaffolds as alternatives to antibodies, such as Nanofitins (NF), overcomes the limitations related to the size of the targeting agent (NF ≈ 10 kDa). We considered the use of a chemistry-free chelating system consisting of a highly phosphorylatable peptide tag to chelate radiometals, such as gallium-68.

The approach is based on the natural ability of phosphate to interact strongly with metal ion. Genetically fused to a NF, the phosphorylatable peptide tag (phosphorylated *in vivo* or *in vitro*) allowed chelation of a lanthanide in solution, the Tb(III), with an affinity in the  $\mu\text{M}$  range. The second generation of peptide tag, artificially derived from a sequence of calcium-binding proteins, gave an affinity for Tb(III) around 500 nM and 50 nM at pH7 and pH5.5 respectively ; and affinity for Ga(III) was obtained in the  $\mu\text{M}$  range at pH5.5. Meanwhile, biodistribution studies and specific *in vivo* targeting of an anti-EGFR NF radiolabelled with  $^{18}\text{F}$ -FBEM were evaluated in a double tumour-bearing mice model. PET images, obtained with a good tumour-to-background contrast, provided the preclinical proof-of-concept that NF are efficient molecular imaging probes in oncology.

### Key Words

Nanofitin, alternative protein scaffold to antibodies, peptide tag, phosphorylation, metal chelation, radiolabelling, PET imaging, EGFR.