

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Cancérologie

Par

Benjamin CHALOPIN

Développement et caractérisation préclinique d'Affitines anti-CD38 pour l'imagerie par tomographie par émission de positons du myélome multiple

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 9 avril 2021

Unité de recherche : INSERM 1232 (Équipe 13) du CRCINA (Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie de Nantes-Angers)

Rapporteurs avant soutenance :

Sylvie Chalon

Marie-Béatrice Valerio-Lepiniec

Directeur de Recherche, Université de Tours

Maitre de Conférence Universitaire, Université Paris-Saclay

Composition du Jury :

Président : Caroline Bodet-Milin

Examineurs : Sylvie Chalon

Marie-Béatrice Valerio-Lepiniec

Jill Corre

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, CHU de Nantes

Directeur de Recherche, Université de Tours

Maitre de Conférence Universitaire, Université Paris-Saclay

Maitre de Conférence Universitaire-Praticien Hospitalier,
CHU de Toulouse

Dir. de thèse : Frédéric Pecorari

Co-dir. de thèse : Michel Chérel

Chargé de Recherche, Université de Nantes

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Nantes

Remerciements

Aux membres de mon jury

Je vous remercie vivement de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse. Merci à Madame la Docteur Sylvie Chalon et à Madame la Docteur Marielle Valerio d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et pour avoir lu avec attention mon manuscrit. Je souhaite également adresser tous mes remerciements à Madame le Professeur Caroline Bodet-Milin ainsi qu'à Madame la Docteur Jill Corre pour avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse.

À Monsieur le Docteur Frédéric Pécorari, directeur de ma thèse et à Monsieur le Professeur Michel Chérel, co-directeur de ma thèse.

Je vous adresse mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire et m'avoir offert cette opportunité de doctorat. Merci encore pour votre aide, votre bienveillance et votre patience dans l'encadrement de ce travail.

Je tiens également à remercier Madame la Docteur Catherine Pellat-Deceunynck et Monsieur le Docteur François Hindré qui ont fait partie de mon comité de suivi de thèse et qui ont permis d'apporter un autre regard sur ce travail.

Merci au Labex IRON et à l'Université de Nantes pour le financement de ce doctorat.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes, pour l'aide apportée lors de ce doctorat :

Sébastien, merci pour ton aide précieuse notamment lors des expériences d'imagerie. Tes conseils avisés m'auront aidé à aller au bout de ce doctorat. Merci également pour les bons moments passés en ta compagnie.

Merci Clément pour ton aide inestimable à la concrétisation de mon projet. Ta connaissance de l'imagerie médicale et tes suggestions toujours pertinentes auront été grandement appréciées. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière.

Catherine, reçois toute ma gratitude pour ton aide indispensable et tes conseils concernant les expériences d'expérimentations animales. Merci encore pour ta patience et ta bienveillance. Merci également à Sylvia et Pascal pour leur contribution à la partie *in vivo* de mon projet.

Un grand merci Patricia pour le temps passé et toutes les manip réalisées pour mon projet. Ta pédagogie et ta bonne humeur ont été très appréciables durant cette période ! Merci également aux doctorants de la « team chimie », Laurent, Marion et Anne-Sophie pour les bons moments passés ensemble.

Evidemment, un grand merci à l'ensemble de l'équipe 13 (la liste est longue, j'espère qu'ils me pardonneront de ne pas tous les citer) pour leur aide et leur bienveillance. Travailler à vos côtés pendant ces années a été un véritable plaisir.

Merci aux amis qui m'ont soutenu pendant la durée de mon doctorat. Petite pensée aux camarades doctorants, compagnons de ces années parfois difficiles mais inoubliables. A vous Stanimir, Valentina, Petar, Sylvain, Nico, Marisa, Justine. Merci également aux amis de longue date, soutien indéfectible tout au long de cette période. Merci à vous Franck, Marine, Alan, Daniella, Erwann, Marion, Alexis, Pépé, Kev', Coraline, Elena, Gwen, Raph'.

Une pensée et un grand merci à toi Aurélia, pour ton soutien et tes encouragements pendant la période de rédaction.

Merci à mes parents qui m'ont aidé pendant cette longue période. A mon père qui m'a soutenu et a traqué mes trop nombreuses fautes d'orthographe et à ma mère qui m'a également offert tout son soutien. Merci à ma sœur pour tout son soutien et son humour.

Enfin je souhaitais conclure ces remerciements par une pensée pour Ghislaine, disparue pendant la finalisation de mon doctorat. Merci à toi Gigi pour ton aide précieuse, tes conseils avisés et le temps passé à me former. Tu étais une véritable « maman du laboratoire » pour mes camarades doctorants et moi-même. Reçois l'expression de ma gratitude et de toute mon affection pour ces moments passés ensemble.

Table des matières

TABLE DES ILLUSTRATIONS	8
INDEX DES ABREVIATIONS	11
PREAMBULE	13
 INTRODUCTION	 15
 I-LE MYELOME MULTIPLE	 16
A-ÉPIDEMIOLOGIE	16
B-ÉTIOLOGIE DU MYELOME MULTIPLE	17
C-SYMPTOMES CLINIQUES ET STADIFICATION DU MYELOME MULTIPLE	18
D-LE DIAGNOSTIC DU MYELOME MULTIPLE	19
II-CD38, UN BIOMARQUEUR DU MYELOME MULTIPLE	25
A-STRUCTURE DU CD38 HUMAIN	26
B-CD38, UNE PROTEINE A ACTIVITE PLÉIOTROPIQUE	27
C-DISTRIBUTION TISSULAIRE DU CD38 HUMAIN	33
D-CD38, UNE CIBLE POUR L'IMAGERIE ET LA THERAPIE DU MM	34
III-STRATEGIES DE CIBLAGE MOLECULAIRE DES TUMEURS	39
A-LES ANTICORPS	39
B-LES FRAGMENTS D'ANTICORPS	46
C-LES NANOBODIES	48
D-LES ALTERNATIVES AUX ANTICORPS	50
IV-LES AFFITINES, UN NOUVEAU VECTEUR POUR LE CIBLAGE TUMORAL	59
A-ORIGINES ET STRUCTURE	59
B-GENERATION DE BANQUES ET SELECTION DES AFFITINES D'INTERET	60
C-EXEMPLES D'APPLICATIONS DES AFFITINES	62
 OBJECTIFS DE LA THESE	 70
 PARTIE I : DEVELOPPEMENT D'AFFITINES ANTI-CD38	 73
 MATERIELS ET METHODES	 74
I-PRODUCTION ET CONTROLE QUALITE DES PROTEINES RECOMBINANTES CD38 MURIN ET CD38 HUMAIN	74
A-PRODUCTION DES CD38 HUMAIN ET MURIN RECOMBINANTS	74
B-CONTROLE QUALITE DES PROTEINES RECOMBINANTES PRODUITES	77
II-MISE EN PLACE DES SELECTIONS : PREPARATION DES BANQUES DE SEQUENCES ET BIOTINYLATION DES PROTEINES CIBLES	79
A-PREPARATION DES BANQUES DE SEQUENCES D'AFFITINES	79
B-BIOTINYLATION DES PROTEINES RECOMBINANTES RCD38H ET RCD38M	81

III-SELECTION PAR RIBOSOME DISPLAY	83
A-TRANSCRIPTION <i>IN VITRO</i> DES BANQUES ADN L5 ET L6	84
B-EXTRACTION ET PURIFICATION DES ARNm L5 ET L6	85
C-TRADUCTION <i>IN VITRO</i> DES ARNm L5 ET L6	85
D-SELECTION DES AFFINITES D'INTERET	86
E-ELUTION DES ARNm L5 ET L6	88
F-PURIFICATION DES ARNm L5 ET L6	88
G-RETRO-TRANSCRIPTION	88
H-RT-PCR	88
I-CLONAGE DANS PFPRDV2.1	89
J-PCR SUR LIGATION	90
IV-ELISA DE CONTROLE DE L'ENRICHISSEMENT DES BANQUES	92
V-CLONAGE DES BANQUES D'AFFINITES	94
A-LIGATION DES BANQUES L5 ET L6 DANS PFP1001	94
B-TRANSFORMATION BACTERIENNE	95
C-CONSTITUTION DES PLAQUES MERES D'AFFINITES	95
VI-CRIBLAGE DES BANQUES D'AFFINITES	96
A-CRIBLAGE PAR ELISA	96
B-CRIBLAGE PAR CYTOMETRIE EN FLUX	97
VII-PRODUCTION D'AFFINITES A GRANDE ECHELLE	98
VIII-SEQUENÇAGE NGS	100
A-PCR D'AMPLIFICATION	100
B-SEQUENÇAGE NGS	101
C-TRAITEMENT INFORMATIQUE DES SEQUENCES	101
RESULTATS	102
I-PRODUCTION ET CONTROLE QUALITE DES PROTEINES RECOMBINANTES CD38 MURIN ET CD38 HUMAIN	102
A-SELECTION DES CLONES CHO PRODUCTEURS	102
B-CONTROLE DE LA QUALITE DES PROTEINES RECOMBINANTES PRODUITES	102
C-BILAN DE LA PRODUCTION DE RCD38H ET RCD38M	105
II-PREPARATION DES BANQUES DE SEQUENCES ET BIOTINYLATION DE LA PROTEINE CIBLE UTILISEE POUR LES SELECTIONS	105
A-PREPARATION DES BANQUES DE SEQUENCES L5 ET L6	105
B-BIOTINYLATION DE LA PROTEINE RCD38M	106
III-RIBOSOME DISPLAY : SELECTION I CONTRE RCD38M	108
A-PRINCIPE DE LA SELECTION I	108
B-CONTROLE DE L'ENRICHISSEMENT DES BANQUES L5 ET L6 PAR ELISA	108
IV-RIBOSOME DISPLAY : SELECTION II CONTRE RCD38M	110
A-PRINCIPE DE LA SELECTION II	110
B-CONTROLE DE L'ENRICHISSEMENT DES BANQUES L5 ET L6 PAR ELISA	111
C-CRIBLAGE DE LA SELECTION II PAR ELISA	112
D-CRIBLAGE DE LA SELECTION II PAR CYTOMETRIE EN FLUX	114
V-RIBOSOME DISPLAY : SELECTION III CONTRE RCD38M	118
A-PRODUCTION DES AFFINITES C6 ET D7	118
B-PRINCIPE DE LA SELECTION III	118
C-CONTROLE DE L'ENRICHISSEMENT DES BANQUES L5/L6 PAR ELISA	119
D-CRIBLAGE PAR CYTOMETRIE EN FLUX	120
VI-RIBOSOME DISPLAY : SELECTION IV CONTRE CD38M	120
A-PRINCIPE DE LA SELECTION IV	120
B-CONTROLE DE L'ENRICHISSEMENT DES BANQUES L5/L6 PAR ELISA	122
VII-ETUDE DES BANQUES DE SEQUENCES ISSUES DE LA SELECTION II CONTRE RCD38M	123
A-TEST ELISA	123

B-SEQUENÇAGE NGS DE LA BANQUE L5 ISSUE DE LA SELECTION II	125
DISCUSSION	128
 PARTIE II : BIODISTRIBUTION ET IMAGERIE TEP DU CD38	 135
MATERIELS ET METHODES	136
I-MODELE CELLULAIRE 5T33	136
II-MISE EN PLACE ET CARACTERISATION DU MODELE CELLULAIRE 5T33-LUC(+)CD38(+)	137
A-CLONAGE DU CD38 MURIN DANS LE VECTEUR PMX	137
B-TRANSDUCTION DE LA LIGNEE 5T33-LUC(+)	139
C-CLONAGE ET SELECTION DES CLONES 5T33-LUC(+)CD38(+)	140
D-ETUDE <i>IN VIVO</i> DES CLONES 5T33-LUC(+)CD38(+)	141
III-CD38 MURIN : BIODISTRIBUTION ET IMAGERIE TEP	142
A-MODELES MURINS DE MM : MODELE TUMORAL SOUS-CUTANE OU DISSEMINÉ	142
B-COUPPLAGE ET RADIOMARQUAGE DE L'ANTICORPS	143
C-ETUDES DE BIODISTRIBUTION	147
D-ETUDES D'IMAGERIE TEP-TDM	148
IV-STATISTIQUES	149
 RESULTATS	 150
I-MISE EN PLACE ET CARACTERISATION DES LIGNEES CELLULAIRES 5T33-LUC(+)CD38(+)	150
A-CLONAGE ET CARACTERISATION DES CLONES GENERES	150
B-ETUDE <i>IN VIVO</i> DES POPULATIONS 5T33-LUC(+)CD38(+)	151
II-RADIOMARQUAGE ET VALIDATION DE L'ANTICORPS ANTI-CD38 MURIN MAL-DOTA ⁶⁴Cu	155
A-RADIOMARQUAGE DE L'ANTICORPS ANTI-CD38M MAL-DOTA ⁶⁴ Cu	155
B-IMMUNOREACTIVITE ET AFFINITE DE L'ANTICORPS ANTI-CD38M MAL-DOTA ⁶⁴ Cu	155
III-ETUDES DE BIODISTRIBUTION DE L'ANTICORPS ANTI-CD38M MAL-DOTA ⁶⁴Cu	157
A-INJECTION DE 50 µg D'ANTICORPS	157
B-INJECTION DE 160 µg D'ANTICORPS	159
C-CONCLUSION DE L'ETUDE DE BIODISTRIBUTION	161
IV-ETUDES D'IMAGERIE TEP AVEC L'AcM ANTI-CD38M MAL-DOTA ⁶⁴Cu	161
A-ETUDE D'IMAGERIE DANS UNE SOURIS SAINÉ	162
B-ETUDE D'IMAGERIE DANS UN MODELE TUMORAL DE MM SOUS-CUTANE	162
C-ETUDE D'IMAGERIE DANS UN MODELE TUMORAL DE MM DISSEMINÉ	164
D-CONCLUSION DE L'ETUDE D'IMAGERIE	168
 DISCUSSION	 169
 CONCLUSION DU TRAVAIL DE THESE	 174
 BIBLIOGRAPHIE	 176

Table des illustrations

Figures

Figure 1	Radiographies d'un patient atteint de myélome multiple	20
Figure 2	Scanner d'un patient atteint de myélome multiple et présentant de nombreuses lésions lytiques au niveau des vertèbres lombaires	21
Figure 3	A) Vue sagittale en IRM de la colonne vertébrale d'un patient MM présentant de nombreuses lésions (flèches rouges) ainsi qu'une compression de la moelle épinière liée à la fracture pathologique d'une vertèbre thoracique (B).....	22
Figure 4	A) Processus de l'imagerie TEP avec le détail (B) de l'émission β + engendrée par le radionucléide. C) Exemple d'imagerie TEP d'un patient atteint de MM présentant de nombreuses lésions hypermétaboliques (2). La coupe transaxiale montre une vertèbre thoracique présentant une lésion en imagerie TEP (1) et après fusion avec l'imagerie scanner (3).....	22
Figure 5	Organisation de la chaîne polypeptidique de CD38 humain.....	26
Figure 6	Structure du domaine extracellulaire de la protéine CD38 humaine (aa 45 à 300).....	27
Figure 7	Représentation des différentes réactions enzymatiques catalysées par CD38.....	30
Figure 8	Mécanismes enzymatiques de CD38 et implications dans la signalisation calcique intracellulaire.....	32
Figure 9	Mécanismes d'action du daratumumab sur les cellules tumorales.....	35
Figure 10	Exemple d'étude préclinique du daratumumab radiomarqué au zirconium 89 (^{89}Zr -DFO-Daratumumab) dans un modèle murin de MM.....	36
Figure 11	Imagerie TEP-TDM : comparaison du 18F-FDG et du daratumumab radiomarqué au cuivre 64 chez des patients MM.....	37
Figure 12	Structure d'une immunoglobuline G (IgG).....	40
Figure 13	Evolution technologique des anticorps monoclonaux	41
Figure 14	Diversité des effets anti-tumoraux des anticorps monoclonaux	43
Figure 15	Représentation de différents formats d'anticorps.....	48
Figure 16	Immunoglobuline G conventionnelle, IgG simple chaîne lourde de camélidés (HcAb) et Nanobody.....	49
Figure 17	Approches d'ingénierie des protéines et techniques de sélection	52
Figure 18	Origine et structure des Affibodies.	53
Figure 19	Structure des DARPins.....	55
Figure 20	Structure d'une molécule d' α Rep.....	57
Figure 21	Résumé des caractéristiques majeures de différents vecteurs.....	58
Figure 22	Structure et origine des Affitines.....	59
Figure 23	Représentation schématique de la technique de Ribosome Display.....	62
Figure 24	Structure des complexes glycosidases/Affitines anti-glycosidase	64
Figure 25	Comparaison de la purification d'affinité d'IgG humaines réalisée sur colonne de protéine A ou sur colonne d'Affitine anti-IgG.....	67
Figure 26	Biodistribution de l'Affitine A6 radiomarquée à l'iode 125 dans des souris KaLwRij de 5 mn à 72 h après injection par voie intraveineuse	68
Figure 27	Coupes histologiques de tissu tumoral, rénal et hépatique à différents temps après l'injection de l'Affitine A872	69
Figure 28	Carte du plasmide pKCR6 et des inserts CD38.....	75
Figure 29	ELISA par adsorption directe. Schéma expérimental utilisé pour le criblage des surnageants des populations CHO.....	76
Figure 30	ELISA par adsorption directe. Schéma expérimental utilisé lors du test des protéines rCD38h et rCD38m.....	77
Figure 31	Réactions enzymatiques catalysées par CD38 in vivo et in vitro à pH neutre.....	78
Figure 32	Schéma de la construction des banques utilisées pour la sélection par ribosome display.	80
Figure 33	ELISA sandwich. Schéma expérimental utilisé pour tester la biotinylation des protéines rCD38m-biot et rCD38h-biot	82

Figure 34	Représentation schématique de la technique de Ribosome Display.....	84
Figure 35	Carte du plasmide pFPRDV2.1 après clonage des séquences issues de la sélection.....	89
Figure 36	ELISA par adsorption directe. Schéma expérimental utilisé pour contrôler l'enrichissement des banques d'Affitines.....	92
Figure 37	ELISA sandwich. Schéma expérimental utilisé pour contrôler l'enrichissement des banques d'Affitines.....	93
Figure 38	Carte du plasmide pFP1001 après clonage des séquences issues de la sélection.....	94
Figure 39	ELISA par adsorption directe. Schéma expérimental utilisé pour le criblage d'Affitines par ELISA.....	96
Figure 40	Criblage par Cytométrie en flux. Schéma expérimental utilisé pour le criblage sur cellules d'Affitines.....	98
Figure 41	Migration des protéines rCD38h et rCD38m sur gel SDS-PAGE.....	103
Figure 42	Contrôle par ELISA des protéines CD38 murine et humaine recombinantes produites.....	103
Figure 43	Test de cinétique enzymatique des protéines rCD38m et rCD38h.....	104
Figure 44	Migration des banques L5/L6 finales sur gel d'agarose.....	106
Figure 45	Test de rCD38m biotinylé par ELISA et cinétique enzymatique.....	107
Figure 46	Contrôle de l'enrichissement des banques en séquences d'Affitines anti-rCD38m par ELISA à l'issue de la sélection I.....	109
Figure 47	Contrôle de l'enrichissement des banques en séquences d'Affitines anti-rCD38m par ELISA à l'issue de la sélection II.....	112
Figure 48	Criblage de la banque L5 contre rCD38m par ELISA.....	113
Figure 49	Criblage de la banque L6 contre rCD38m par ELISA.....	113
Figure 50	Analyse par gel SDS-PAGE des affitines produites.....	115
Figure 51	Test de l'affinité des Affitines C6, D7, F11 et G5 par cytométrie en flux.....	116
Figure 52	Test de l'affinité des Affitines C6, D7, F11 et G5 pour rCD38m par ELISA.....	117
Figure 53	Contrôle de l'enrichissement des banques en séquences d'Affitines anti-rCD38m par ELISA à l'issue de la sélection III.....	119
Figure 54	Contrôle de l'enrichissement des banques en séquences d'Affitines anti-CD38m par ELISA à l'issue de la sélection IV.....	122
Figure 55	Contrôle de l'enrichissement des banques en séquences d'Affitines anti-rCD38m pendant la sélection II.....	124
Figure 56	Structure des protéines streptavidine et avidine.....	129
Figure 57	Stratégie de sélection conventionnelle et par épitope masking.....	131
Figure 58	Schéma expérimental de l'étude in vivo des populations cellulaires 5T33 ; 5T33-Luc(+) ; 5T33-Luc(+)CD38 ^{low} ; 5T33-Luc(+)CD38 ^{high}	141
Figure 59	Test d'immunoréactivité de l'AcM anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴ Cu.....	146
Figure 60	Protocoles expérimentaux des études de biodistribution de l'AcM anti-CD38 murin mal-DOTA ⁶⁴ Cu.....	147
Figure 61	Protocole expérimental de l'étude d'imagerie TEP de l'AcM anti-CD38 murin mal-DOTA ⁶⁴ Cu.....	149
Figure 62	Caractérisation phénotypique des clones 5T33-Luc(+)CD38(+).....	151
Figure 63	Analyse phénotypique des populations 5T33, 5T33-Luc(+), 5T33-Luc(+)CD38 ^{low} et 5T33-Luc(+)CD38 ^{high} par cytométrie en flux.....	152
Figure 64	Courbes de survie de souris C57BL/KaLwRij greffées.....	154
Figure 65	Contrôle de la pureté radiochimique de l'anticorps anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴ Cu.....	155
Figure 66	Immunoréactivité et affinité de l'anticorps anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴ Cu.....	156
Figure 67	Biodistribution de 50µg d'AcM anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴ Cu dans un modèle murin syngénique de tumeurs sous-cutanées de MM.....	157
Figure 68	Biodistribution de l'AcM anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴ Cu dans les tumeurs CD38- et CD38+.....	158
Figure 69	Biodistribution de 160µg d'AcM anti-CD38m (50µg AcM anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴ Cu + 110 µg AcM anti-CD38m) dans un modèle murin syngénique de tumeurs sous-cutanées de MM.....	159
Figure 70	Biodistribution de l'AcM anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴ Cu dans les tumeurs CD38- et CD38+.....	160
Figure 71	Imagerie immuno-TEP d'une souris C57BL/KaLwRij saine.....	162
Figure 72	Imagerie TEP d'une souris C57BL/KaLwRij greffée en sous-cutanée.....	163
Figure 73	Différentes explorations d'imagerie d'une souris C57BL/KaLwRij greffée en sous-cutanée.....	164
Figure 74	Imagerie TEP-TDM d'une souris C57BL/KaLwRij greffée en IV.....	165
Figure 75	Imagerie BLI et immuno-TEP-TDM de deux souris C57BL/KaLwRij greffées en IV.....	167

Tableaux

Tableau 1	<i>Traceurs investigués en clinique pour l'imagerie TEP/CT de patients MM</i>	<i>24</i>
Tableau 2	<i>Anticorps utilisés en imagerie nucléaire pour l'oncologie approuvés par la FDA ou l'EMA.....</i>	<i>44</i>
Tableau 3	<i>Fragments d'anticorps utilisés en imagerie nucléaire pour l'oncologie approuvés par la FDA ou l'EMA.....</i>	<i>47</i>
Tableau 4	<i>Séquences oligonucléotidiques.....</i>	<i>80</i>
Tableau 5	<i>Détails des paramètres appliqués pendant les tours des différentes sélections réalisées</i>	<i>91</i>
Tableau 6	<i>Détail des différents protocoles utilisés pour la production d'Affitines.....</i>	<i>99</i>
Tableau 7	<i>Paramètres expérimentaux utilisés pour la sélection I contre rCD38m</i>	<i>108</i>
Tableau 8	<i>Paramètres expérimentaux utilisés pour la sélection II contre rCD38m.....</i>	<i>111</i>
Tableau 9	<i>Paramètres expérimentaux utilisés pour la sélection III contre rCD38m</i>	<i>119</i>
Tableau 10	<i>Paramètres expérimentaux utilisés pour la sélection IV contre rCD38m.....</i>	<i>121</i>
Tableau 11	<i>Données obtenues après séquençage NGS de la banque L5 de T0 à T5.....</i>	<i>125</i>
Tableau 12	<i>Résultats d'analyse de la banque L5 de T0 à T5 par le logiciel « Clustering »</i>	<i>126</i>
Tableau 13	<i>Symptômes et lésions observés chez les groupes de souris C57BL/KalwRij greffées</i>	<i>153</i>

Index des abréviations

α Reps : Artificial alpha-helicoïdal repeat proteins

18 F-FDG : [18 F]-fluorodésoxyglucose

A

aa : Acide aminé

AcM : Anticorps monoclonaux/Ac monoclonal

ADCC : Antibody dependent cell cytotoxicity

ADCP : Antibody dependent cell phagocytosis

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADPR : Adénosine diphosphate ribose

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

B

BSA : Bovine serum albumin

C

cADPR : Adenosine diphosphate ribose cyclique

CCM : Chromatographie sur couche mince

CDC : Complement dependent cytotoxicity

CDR : Complementary determining-region

cGDPR : Guanosine diphosphate ribose cyclique

CHO : Chinese hamster ovary

D

DARPins : Designed ankyrin repeat proteins

dNTP : Désoxyribonucléotides triphosphate

DO : Densité optique

E

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

EGF : Epidermal growth factor

EGFR : Epidermal growth factor receptor

ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay

EMA : European Medicine Agency

EpCAM : Epithelial cell adhesion molecule

F

Fab : Fragment antigen binding

Fc : Fragment crystallizable

FcRn : Neo-natal Fc receptor

FDA : Food and Drug Administration

G

GDPR : Guanosine diphosphate ribose

H

HABA : 4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid

HCAbs : heavy-chain antibodies

HER2 : Human epidermal growth factor receptor-2

HGF : Hepatocyte growth factor

HRP : Horseradish peroxidase

I

IC : Immunoconjugués

IFN- γ : Interféron gamma

Ig : Immunoglobulines

IMiD : Immunomodulateur

IP : Inhibiteur du protéasome

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

IRM : Imagerie par résonance magnétique

IV : Injection intraveineuse

L

LB : Luria-Bertani

LT-CSH : Cellules souches

hématopoïétiques à longue durée de vie

M

MDSC : Myeloid derived suppressive cells

MGUS : Monoclonal gammopathy of undetermined significance

MM : Myélome multiple

MO : Moelle osseuse

MPP : Progéniteurs multipotents

N

NAADP : Nicotinic acid adénine dinucléotide phosphate

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Nb : Nanobodies
NGD : Nicotinamide guanine dinucléotide
NGS : Next generation sequencing
Ni-NTA : Nickel-acide nitrilotriacétique
NTP : Nucléotides triphosphate

O

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Économique
OPD : O-Phenylenediamine

P

PBS : Phosphate buffered saline
PCR : Polymerase chain reaction
PECAM-1 : Platelet endothelial cell adhesion Molecul-1
PMN : Particules magnétiques
PSMA : Prostate specific membrane antigen

R

RA : Répétition ankryrine
RANK-L : Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
rCD38h : CD38 humain recombinant
rCD38m : CD38 murin recombinant
rCD38h-biot : CD38 humain recombinant biotinylé

rCD38m-biot : CD38 murin recombinant biotinylé
RFU : Relative fluorescence units
RIT : Radio immuno-thérapie
RMPI : Roswell park memorial institute medium
rpm : Rotation par minute
RT : Rétro-transcription

S

scFv : Single chain Fv
sdAb : Single domain antibody
SPR : Surface plasmon resonance
ST-CSH : Cellules souches hématopoïétiques à courte durée de vie

T

TBS : Tris-buffered saline
TDM : Tomodensitométrie
TEMP : Tomographie par émission monophotonique
TEP : Tomographie par émission de positons
TPC : Two-pore channel
TRPM2 : Transient receptor potential cation channel

V

VEGF : Vascular endothelial growth factor

Préambule

Le cancer est, dans les pays de l'OCDE, la seconde cause de décès après les pathologies cardiovasculaires. Pour l'année 2018, l'Institut National du Cancer estimait que 382 000 nouveaux cas de cancers et 157 400 décès liés au cancer étaient survenus en France métropolitaine. Ces chiffres importants justifient les efforts de santé publique entrepris afin d'améliorer la prévention, le diagnostic et les thérapies afférents à cette pathologie. La recherche a, dans ce contexte, un rôle important à jouer en permettant une meilleure compréhension des mécanismes tumoraux et en favorisant le développement de stratégies innovantes.

L'équipe du Prof. Michel Chérel spécialisée en oncologie nucléaire et au sein de laquelle j'ai effectué mon travail de thèse s'inscrit dans cette dynamique. Les grands axes développés par ce groupe concernent le développement de la radioimmunothérapie, l'étude de nouveaux radioéléments pour l'imagerie et la thérapie ainsi que la caractérisation de nouvelles classes de radiotraceurs dédiés à l'oncologie nucléaire. Mon projet de thèse relève de cette dernière thématique puisqu'il visait au développement de nouveaux vecteurs pour l'imagerie par tomographie par émission de positons (TEP) du myélome multiple (MM).

Le MM représente en effet 10% des hémopathies malignes et demeure aujourd'hui incurable. Divers types d'imagerie médicale sont utilisés en routine (radiographies standard, imagerie par résonance magnétique ou Scanner) pour définir le stade initial de la maladie ainsi que son évolution. Parmi ces différentes modalités, la TEP au [18F]-fluorodésoxyglucose (^{18}F -FDG) présente une valeur ajoutée pour l'évaluation thérapeutique et pronostique de la maladie mais également des limitations, principalement un manque de spécificité, justifiant l'intérêt de la mise en place de nouveaux procédés de vectorisation. Ce constat a donné lieu à de nombreux travaux au sein de notre équipe permettant de mettre en évidence les avantages de l'utilisation de vecteurs spécifiques de biomarqueurs tumoraux pour l'imagerie TEP. Ces travaux se sont dans un premier temps focalisés sur l'utilisation d'anticorps ou de fragments dérivés d'anticorps pour la vectorisation d'isotopes radioactifs émetteurs β^+ . Plus récemment, notre intérêt s'est porté sur une nouvelle classe de vecteurs anticorps mimétiques présentant des propriétés favorables pour le ciblage tumoral appelée Affitine.

Les Affitines sont de nouvelles protéines d'affinité artificielle qui combinent une grande résistance aux protocoles de marquage radioactif et une pharmacocinétique rapide, des propriétés essentielles pour un vecteur qui sont difficilement transposables aux anticorps monoclonaux (AcM). Ces vecteurs sont générés *in vitro* par des techniques de biologie moléculaire permettant l'obtention de protéines spécifiquement affines pour la cible choisie.

Dans le cadre de mon travail de thèse, nous avons choisi de générer des Affitines capables de reconnaître de manière spécifique CD38, une protéine membranaire surexprimée par les cellules tumorales du MM. Notre choix a été notamment conforté par l'utilisation de ce marqueur comme cible pour les nouveaux protocoles d'immunothérapie du MM utilisant les anticorps monoclonaux.

Les buts de mon projet de thèse étaient donc :

- 1) De générer et de caractériser des Affitines spécifiques du CD38, puis de réaliser des images TEP à l'aide de cette nouvelle classe de vecteurs dans un modèle murin de MM.
- 2) De réaliser une étude d'imagerie TEP basée sur l'utilisation d'un anticorps anti-CD38 radiomarqué avec un élément β^+ dans un modèle murin de MM analogue à celui utilisé précédemment.

Ces deux études se complètent et doivent autoriser un premier aperçu du potentiel de l'imagerie phénotypique pour la détection des foyers tumoraux myélomateux. La TEP anticorps anti-CD38, basée sur l'utilisation d'une molécule bien caractérisée dans la littérature, doit servir de référentiel afin d'évaluer la pertinence de l'utilisation des Affitines pour l'imagerie phénotypique du MM.

Dans cette introduction, je reviendrai dans un premier temps sur la pathologie qui m'a servi de modèle pour cette étude : le myélome multiple. J'aborderai ensuite la description du biomarqueur qui m'a servi de cible, le CD38. Les différents types de vecteurs utilisés pour le ciblage tumoral seront décrits dans un troisième temps. Enfin, la dernière partie sera consacrée aux Affitines.

Introduction

I-LE MYELOME MULTIPLE	16
A- <u>EPIDEMIOLOGIE</u>	16
B- <u>ETIOLOGIE DU MYELOME MULTIPLE</u>	17
C- <u>SYMPTOMES CLINIQUES ET STADIFICATION DU MYELOME MULTIPLE</u>	18
D- <u>LE DIAGNOSTIC DU MYELOME MULTIPLE</u>	19
II-CD38, UN BIOMARQUEUR DU MYELOME MULTIPLE	25
A- <u>STRUCTURE DU CD38 HUMAIN</u>	26
B- <u>CD38, UNE PROTEINE A ACTIVITE PLEIOTROPIQUE</u>	27
C- <u>DISTRIBUTION TISSULAIRE DU CD38 HUMAIN</u>	33
D- <u>CD38, UNE CIBLE POUR L'IMAGERIE ET LA THERAPIE DU MM</u>	34
III-STRATEGIES DE CIBLAGE MOLECULAIRE DES TUMEURS	39
A- <u>LES ANTICORPS</u>	39
B- <u>LES FRAGMENTS D'ANTICORPS</u>	46
C- <u>LES NANOBODIES</u>	48
D- <u>LES ALTERNATIVES AUX ANTICORPS</u>	50
IV-LES AFFITINES, UN NOUVEAU VECTEUR POUR LE CIBLAGE TUMORAL	59
A- <u>ORIGINES ET STRUCTURE</u>	59
B- <u>GENERATION DE BANQUES ET SELECTION DES AFFITINES D'INTERET</u>	60
C- <u>EXEMPLES D'APPLICATIONS DES AFFITINES</u>	62
OBJECTIFS DE LA THESE	70

I-Le myélome multiple

Le myélome multiple ou maladie de Kahler est une hémopathie maligne caractérisée par une prolifération clonale de plasmocytes dans la moelle osseuse (MO). Dans la plupart des MM, ces cellules tumorales sécrètent des immunoglobulines monoclonales ou des fragments d'immunoglobuline monoclonale (chaîne légère libre) retrouvés dans le sérum et l'urine. L'accumulation de ces immunoglobulines et les interactions des plasmocytes malins avec les autres cellules de la MO sont à l'origine de dysfonctions pouvant atteindre différents organes. Cette pathologie s'accompagne en effet d'une ostéolyse à l'origine de douleurs osseuses voire de fractures, d'un état de fatigue généralisé, d'une hypercalcémie ainsi que d'insuffisance rénale aiguë [1]. D'autres symptômes peuvent venir compléter ce tableau clinique. Malgré le développement de nouvelles thérapies ciblées, le MM reste une maladie incurable avec une médiane de survie de 5 à 6 ans après diagnostic [2].

A-Epidémiologie

Les données épidémiologiques relatives au MM font état d'environ 160 000 nouveaux cas diagnostiqués par an à l'échelle mondiale. Egalement au niveau mondial et sur la même durée de temps on estime à 100 600 le nombre de décès liés à cette pathologie [3]. De fortes disparités géographiques sont constatées dans la répartition des cas de MM avec une incidence plus élevée dans les pays industrialisés. Les hommes sont plus fréquemment touchés par le MM que les femmes puisqu'ils représentent environ 60% des cas [4], [5].

En France, le MM représente moins de 2% des cancers et 10 à 12% des hémopathies malignes. On estime à 5000 le nombre de nouveaux cas diagnostiqués chaque année pour environ 3000 décès. Le MM touche majoritairement l'adulte après 50 ans avec une incidence qui augmente fortement avec l'âge. L'âge médian du diagnostic est en effet d'environ 70 ans chez les hommes et 74 ans chez les femmes. De manière plus marginale, on retrouve des cas de MM chez des individus plus jeunes puisque 2,8% des cas sont diagnostiqués avant 40 ans [6].

Du fait de son potentiel invalidant et de sa chronicité, le MM est un enjeu de santé publique. Le développement de nouvelles thérapies devrait permettre d'envisager des rémissions complètes dans un futur proche.

B-Etiologie du myélome multiple

La connaissance des processus à l'origine de la transformation maligne des plasmocytes reste fragmentaire. De nombreux travaux ont cependant pu démontrer que la pathogénèse du MM était liée à une accumulation d'erreurs génétiques successives. On retrouve dans la majorité des cas des mutations, des translocations, ainsi que des pertes ou des gains chromosomiques. Ces anomalies vont impacter différents groupes de gènes (gènes suppresseurs ou promoteurs de tumeurs, gènes impliqués dans le cycle cellulaire, gènes de facteur de croissance, gènes de facteur anti-apoptotique) entraînant leur dérégulation et permettant l'acquisition d'un avantage prolifératif pour la cellule [7], [8].

De nombreux travaux tendent à démontrer que les premières anomalies génétiques se produisent au niveau des organes lymphoïdes secondaires lors des processus d'hypermutation somatique et de commutation de classe. Ces anomalies primaires sont responsables de la genèse de plasmocytes présentant une instabilité génétique et sont généralement caractéristiques du stade MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) de la pathologie. D'autres anomalies secondaires peuvent ensuite intervenir et favoriser la progression de la pathologie jusqu'au stade MM [9], [10].

La modification du microenvironnement médullaire par les plasmocytes malins favorise également la progression tumorale. L'une des modifications les plus caractéristiques du MM consiste en une destruction de la matrice osseuse environnant la tumeur [11]. Les cytokines sécrétées par les cellules tumorales (notamment RANK-Ligand, « receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) induisent un déséquilibre de la balance ostéoblastes/ostéoclastes en faveur de ces derniers, ce qui entraîne des phénomènes de destruction de la matrice osseuse. Cette ostéolyse est associée à un relargage de facteurs de croissance qui favorise la progression tumorale initiant ainsi un cercle vicieux entre destruction osseuse et prolifération.

Le MM est donc l'ultime étape d'une accumulation d'erreurs génétiques conférant aux plasmocytes impactés un avantage prolifératif et une résistance aux mécanismes de mort cellulaire programmée. L'accumulation de ces cellules malignes dans la MO et la modification du microenvironnement médullaire qui en découle entraînent des dysfonctionnements ainsi que des phénomènes d'ostéolyse. L'évolution de cette pathologie est rapide et les complications mécaniques liées aux fractures engendrées par l'ostéolyse peuvent contraindre le patient à une immobilisation prolongée. La précocité du diagnostic est donc, comme pour beaucoup de cancers, un enjeu majeur pour la thérapie du MM.

C-Symptômes cliniques et stadification du myélome multiple

Le MM est caractérisé par une prolifération incontrôlée de plasmocytes malins dans la MO accompagnée d'une surproduction d'immunoglobulines. L'accumulation progressive de ces plasmocytes dans la moelle va entraîner une dérégulation de l'hématopoïèse entraînant des phénomènes d'anémie et de leucopénie associés à une destruction de l'os environnant la cavité de la moelle. Cette destruction osseuse peut engendrer une hypercalcémie souvent symptomatique (nausées, vomissements, troubles musculaires). La sécrétion importante d'immunoglobulines monoclonales peut également engendrer des atteintes rénales liées à l'accumulation de ces protéines. Ces différents symptômes cliniques caractéristiques du MM sont regroupés sous l'acronyme CRAB (hyperCalcémie, altération Rénale, Anémie, lésions osseuses (Bone) lytiques) [12].

Le MM est une pathologie évolutive caractérisée par différents stades cliniques [13]. On observe tout d'abord un premier stade asymptomatique nommé gammapathie monoclonale de signification indéterminée ou MGUS. Ce stade est caractérisé par un taux d'immunoglobuline sanguin inférieur à 30g/l, une plasmocytose médullaire inférieure à 10% et une absence des symptômes caractéristiques du MM. Le risque d'évolution du MGUS vers un MM augmente d'environ 1% par an. Cet état précancéreux peut donc ne pas évoluer pendant de nombreuses années et de nombreux patients ne développeront jamais de MM.

La pathologie peut ensuite évoluer vers un autre stade asymptomatique, le MM indolent (ou smoldering MM, SMM). Ce stade, intermédiaire entre le MGUS et le MM est caractérisé par un taux d'immunoglobuline sanguin supérieur à 30g/l, un taux de plasmocytes malins dans la moelle supérieur à 10% et une absence de symptômes caractéristiques du MM. 10% des patients avec un MM indolent développeront un MM dans les 5 ans après le diagnostic.

Le MM proprement dit va se caractériser par un taux d'immunoglobuline sanguin supérieur à 30g/l, une plasmocytose médullaire supérieure à 10% et la présence d'au moins un symptôme clinique parmi les critères « CRAB ».

D-Le diagnostic du myélome multiple

Le MM est le plus souvent découvert de manière fortuite du fait de douleurs osseuses persistantes. La survenue d'une insuffisance rénale aiguë, d'une compression médullaire, d'une hypercalcémie ou encore d'une anémie peuvent aussi révéler la pathologie. Dans certains cas asymptomatiques, le MM est découvert lors d'un examen sanguin ou d'imagerie osseuse. Différents tests sont ensuite pratiqués afin d'affiner le diagnostic (hémogramme, dosage de certains composants, myélogramme).

Du fait des lésions osseuses caractéristiques de la pathologie, l'imagerie va tenir un rôle de première importance dans le diagnostic, la stadification et le suivi des patients atteints de MM [14], [15]. Jusqu'à récemment, la radiographie conventionnelle était la modalité standard d'imagerie dans un contexte de MM. Actuellement, différentes techniques sont utilisées en routine comme le scanner corps entier, l'imagerie par résonnance magnétique (IRM) ou la TEP au ^{18}F -FDG. L'opportunité d'utiliser telle ou telle technique va dépendre du cas clinique envisagé et de l'accessibilité des différents appareils pour un centre hospitalier donné.

a-La radiographie

La radiographie conventionnelle est une technique d'imagerie basée sur l'utilisation de rayons X. Ces rayons sont plus ou moins atténués selon la nature et l'épaisseur des tissus traversés. L'image obtenue par la projection de ces rayons sur un support plan permet de visualiser les différentes structures anatomiques du corps. Cette technique est restée pendant de nombreuses années et jusqu'à récemment l'examen standard utilisé pour le diagnostic et le suivi des patients MM du fait de sa praticité et de son faible coût [16]. Un bilan complet comprenait des radiographies du crâne, du rachis entier, du gril costal, des os longs et du bassin et permettait de mettre en évidence des lésions lytiques chez 80% des patients atteints de MM. Cette modalité d'imagerie présentait cependant des limites : certaines zones pouvaient être difficiles à visualiser du fait de la densité du tissu osseux, la sensibilité était limitée (10 à 20% des lésions n'étaient pas mises en évidence) et il était également difficile de mettre en évidence une réponse au traitement. Le temps nécessaire à la réalisation de cet examen pouvait également être un obstacle chez certains patients douloureux ne pouvant pas rester très longtemps allongés. Pour ces raisons, les centres hospitaliers disposant de l'équipement adéquat préfèrent utiliser des techniques plus sophistiquées comme le scanner, l'IRM ou la TEP-scanner.

Figure 1

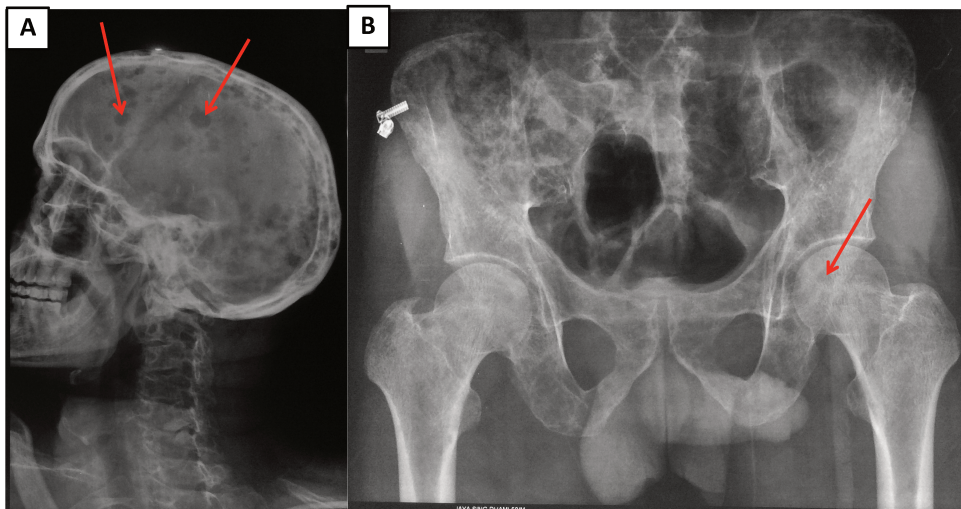


Figure 1 | Radiographies d'un patient atteint de myélome multiple

A) Radiographie crânienne montrant des lésions « à l'emporte-pièce » caractéristiques (flèches rouges). B) Radiographie pelvienne montrant des lésions lytiques (flèche rouge) ainsi qu'une perte généralisée de densité osseuse. Adapté d'après « Case courtesy of Dr Subash Thapa, Radiopaedia.org, rID: 40195 »

b-Le scanner

Le scanner ou tomodensitomètre (TDM) est une technique d'imagerie basée sur l'utilisation des rayons X. A la différence de la radiographie conventionnelle, la source et les capteurs de ces rayons sont mobiles et effectuent une rotation autour du patient. Le traitement informatique des données obtenues permet l'obtention d'images 2D ou 3D des différentes structures anatomiques. Cette modalité d'imagerie apporte de nombreux avantages par rapport à sa contrepartie conventionnelle : l'examen est plus rapide, les éventuelles lésions multiples peuvent être évaluées en une seule fois sans nécessité de repositionner le patient, la sensibilité est accrue et permet de révéler plus de lésions notamment dans des territoires mal visualisés en radiographie standard [17]. Le scanner permet également une meilleure estimation du risque fracturaire et peut mettre en évidence des lésions extramédullaires. L'obtention d'images 3D facilite également la planification de biopsies ou d'actes chirurgicaux. L'utilisation du scanner expose cependant le patient à une dose de radiation de 1,3 à 3 fois supérieure à celle délivrée lors d'un examen de radiographie classique, ce qui peut constituer un risque en cas d'examens répétés. Le développement de nouvelles techniques de scanner « faible dose » peut permettre de pallier à ce problème [18].

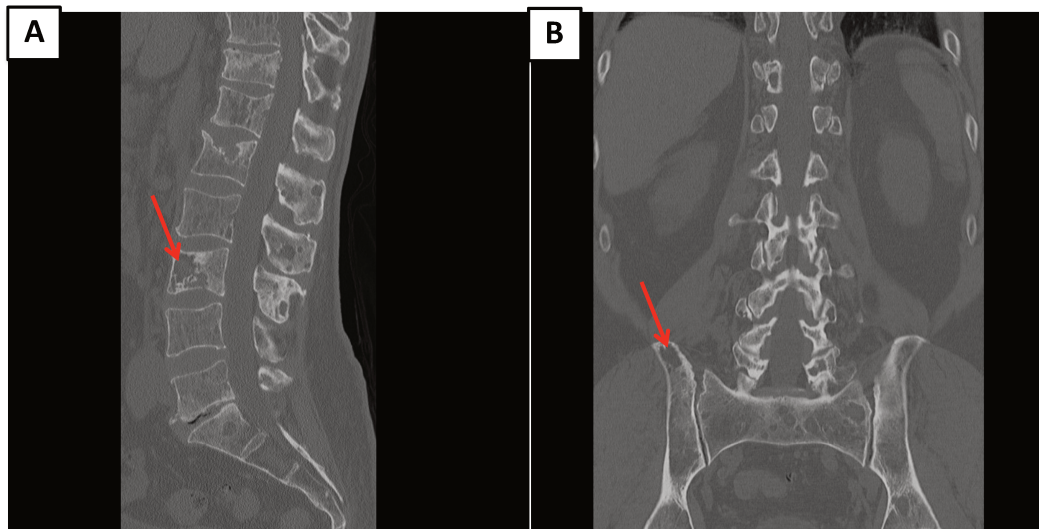
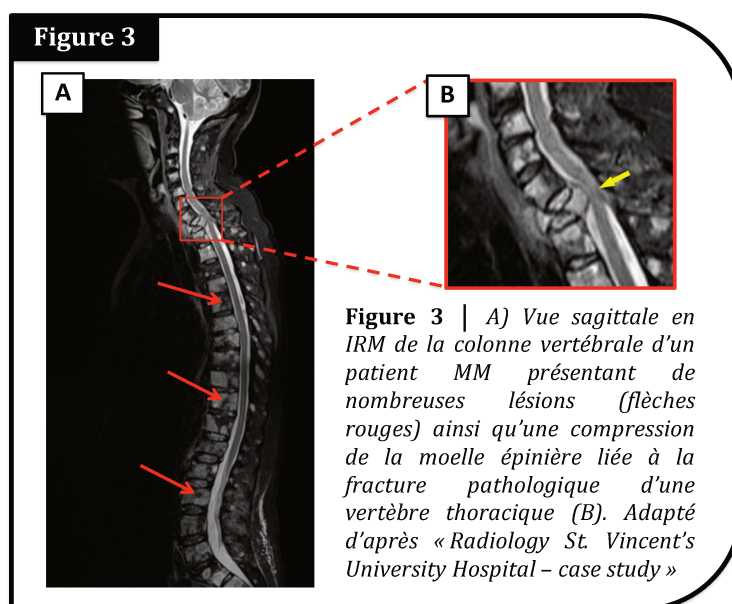


Figure 2 | Scanner d'un patient atteint de myélome multiple et présentant de nombreuses lésions lytiques au niveau des vertèbres lombaires (flèches rouges). A) Vue sagittale. B) Vue coronale. Adapté d'après «Case courtesy of A.Prof Frank Gaillard, Radiopaedia.org, rID: 7682 »

c-L'imagerie par résonnance magnétique

L'IRM est une technique d'imagerie utilisant les propriétés magnétiques des atomes d'hydrogène se trouvant dans les tissus. Ces atomes sont soumis à un puissant champ



magnétique puis mis en résonance par des ondes radio. Les signaux émis à l'arrêt du phénomène de résonnance permettent, après analyse informatique, l'obtention d'images anatomiques en 2D ou 3D. L'IRM va offrir plusieurs avantages comparativement aux techniques décrites précédemment. Cette technologie offre en effet un meilleur contraste que le

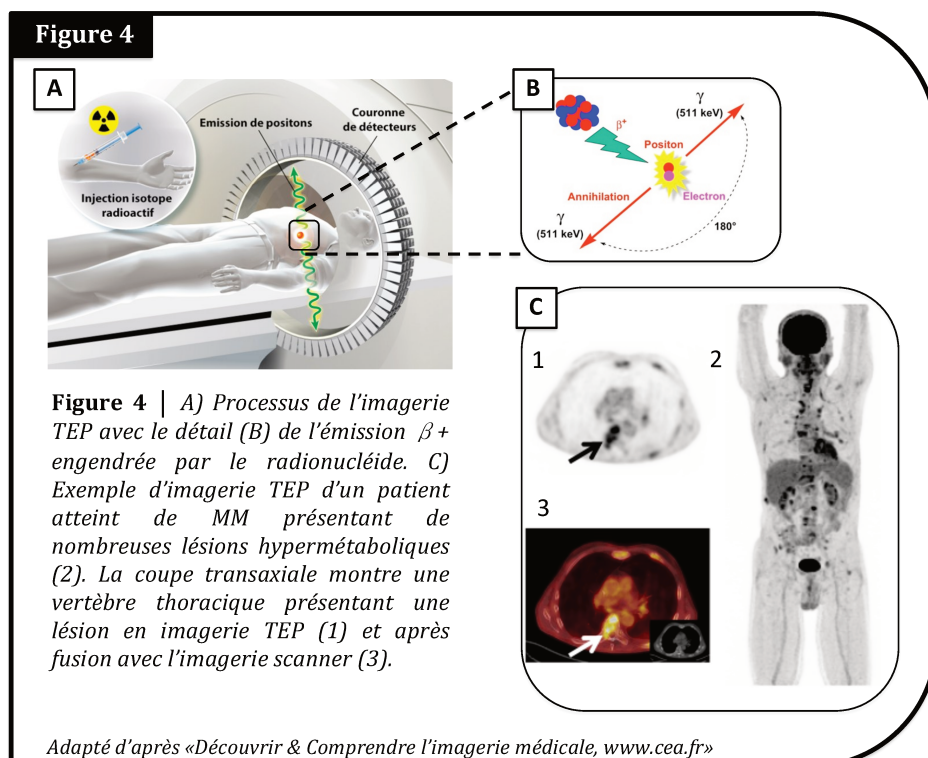
scanner et présente l'avantage de ne pas exposer le patient aux radiations. Elle permet également la visualisation directe des infiltrations médullaires avant l'apparition des lésions osseuses qui en résultent. Il est donc possible de discriminer les fractures résultant du développement d'un MM de celles ayant pour origine une fragilité osseuse liée à l'ostéoporose. Le diagnostic des suspicions de compressions médullaires ou neurologiques est également facilité par l'emploi de cette technologie [19]. L'IRM peut aussi jouer un rôle pronostique.

Différentes études ont en effet montré une corrélation entre la durée de survie des patients et le nombre et l'aspect des lésions observées en IRM [20], [21].

Le coût d'achat et d'entretien de l'appareil constitue cependant un frein à son utilisation. La durée d'examen relativement longue selon les explorations à mener peut également être préjudiciable aux patients douloureux supportant mal le maintien de la position allongée.

d-La TEP scanner au ^{18}F -FDG

La TEP est une modalité d'imagerie corps entier non invasive permettant de visualiser la biodistribution d'une molécule marquée par un émetteur de positons. Du fait de leur instabilité, les isotopes radioactifs utilisés en TEP se désintègrent vers un état stable résultant en l'émission d'un neutrino et d'un positon. Ce dernier parcourt quelques mm dans les tissus environnants jusqu'à dissipation de son énergie cinétique. Le positon interagit alors avec un électron du milieu produisant une réaction d'annihilation au cours de laquelle la masse des deux particules se transforme en deux photons gamma de 511 keV émis dans des directions opposées. Ces rayonnements sont ensuite captés par des détecteurs placés en coïncidence permettant ainsi la localisation du lieu d'émission.



Actuellement, l'un des principaux traceurs utilisés en TEP pour les patients MM est le ^{18}F -FDG, un analogue radiopharmaceutique du glucose dans lequel le groupement hydroxyle du carbone 2 est remplacé par un atome de fluor 18, émetteur de positons. Les tissus tumoraux présentent un métabolisme basé sur un fort taux de glycolyse avec une augmentation des capacités de transport membranaire du glucose et de l'activité des principales enzymes glycolytiques. Cette caractéristique particulière des cellules tumorales favorise la captation massive de glucose ou de son analogue radiomarqué. Une fois dans la cellule, le ^{18}F -FDG subit l'action de l'hexokinase, première enzyme de la glycolyse, pour donner du ^{18}F -FDG-6-phosphate. La modification structurale apportée au niveau du carbone 2 par l'ajout du groupement fluor va cependant empêcher l'action de l'enzyme suivante. Le ^{18}F -FDG-6-phosphate reste ainsi bloqué et s'accumule dans la cellule [22]. L'émission de rayonnements β^+ issus de la désintégration du fluor 18 en oxygène 18 permet, à l'aide de détecteurs, de localiser les foyers tumoraux. Cet examen est généralement couplé à un scanner corps entier afin de préciser les localisations anatomiques des lésions visualisées en TEP (TEP scanner ou PET/CT). Du fait de ces bonnes performances en termes de sensibilité et de résolution, cette technique a été validée ces dernières années dans de nombreuses indications en oncologie (tumeurs solides comme les carcinomes bronchiques, ORL, colorectaux, mélanomes ; hémopathies comme les lymphomes B diffus à grande cellules ou hodgkiniens) [23]. D'autres traceurs peuvent également être utilisés en TEP pour les patients MM de manière plus marginale (cf. **tableau 1**).

Depuis plus d'une décennie, l'intérêt de la TEP scanner au ^{18}F -FDG pour le diagnostic et le suivi des patients MM s'est renforcé. Cette modalité d'imagerie permet en effet une évaluation corps entier du patient en un temps raisonnable (environ 20 à 40 mn d'acquisition) tout en présentant une bonne sensibilité et spécificité pour la détection des lésions médullaires et extramédullaires [24]. La détection des zones osseuses lésées est également possible. Ces avantages sont liés au caractère dual de cette technique qui combine imagerie fonctionnelle (composante TEP) et imagerie anatomique (composante scanner). Des limitations existent cependant pouvant restreindre l'utilisation et l'efficacité de cette modalité d'imagerie. La TEP scanner au ^{18}F -FDG peut présenter des résultats négatifs pour des patients MM dans le cas de tumeurs à faible activité glycolytique fixant faiblement le FDG. A l'inverse, la forte activité glycolytique physiologique de certains tissus sains comme le parenchyme cérébral peut gêner ou empêcher la visualisation de tumeurs situées dans le voisinage immédiat [25]. Enfin, des contraintes de coût, de disponibilité d'appareillage ou de disponibilité de médicaments radiopharmaceutiques peuvent contraindre l'utilisation de la TEP scanner dans certains centres hospitaliers.

Tableau 1 | Traceurs investigués en clinique pour l'imagerie TEP/CT de patients MM

Traceur	Caractéristiques
¹⁸ F-fluorocholine	<u>Principe</u> : La choline est un précurseur de la biosynthèse des phospholipides. La ¹⁸ F-FCH va être captée par les cellules tumorales du fait de l'important remodelage membranaire caractérisant ces tissus. <u>Résultats</u> : Plus sensible que le ¹⁸ F-FDG chez les patients MM réfractaires au traitement ou ayant rechuté.
¹¹ C-choline	<u>Principe</u> : identique à la ¹⁸ F-FCH. <u>Résultats</u> : Plus sensible que le ¹⁸ F-FDG pour la détection des lésions.
¹¹ C-méthionine	<u>Principe</u> : la ¹¹ C-méthionine est un acide aminé radiomarqué dont la rétention va être augmentée dans les cellules tumorales du fait de la synthèse importante d'immunoglobulines. <u>Résultats</u> : le traceur se concentre fortement au niveau des lésions lytiques. Les niveaux de fixation vont être corrélés avec le niveau d'invasion de la MO.
¹⁸ F-fluorothymidine	<u>Principe</u> : la ¹⁸ F-fluorothymidine est un analogue radiomarqué de la thymidine. La ¹⁸ F-fluorothymidine va être captée par les cellules tumorales du fait du niveau important de synthèse ADN caractérisant ces tissus. <u>Résultats</u> : traceur utile pour visualiser la prolifération cellulaire au niveau de la moelle osseuse. Peut également permettre de préciser la nature d'une maladie hématologique.
¹⁸ F-fluorure de sodium	<u>Principe</u> : le ¹⁸ F-fluorure de sodium présente un tropisme osseux. L'intensité de fixation de ce traceur va dépendre de la vascularisation et va refléter le remodelage osseux régnant dans la région considérée. <u>Résultats</u> : le ¹⁸ F-FDG reste plus efficace pour la détection de lésions focales mais le ¹⁸ F-NaF présente de meilleurs résultats pour la visualisation des fractures costales.
¹¹ C-acetate	<u>Principe</u> : le ¹¹ C-acetate est un marqueur du métabolisme lipidique qui est très important dans les cellules myélomateuses. <u>Résultats</u> : les études ont montré de potentiels avantages à son utilisation par rapport au ¹⁸ F-FDG pour la stadification des patient MM nouvellement diagnostiqués.
¹¹ C-4-thiotymidine	<u>Principe</u> : identique à celui de la ¹⁸ F-fluorothymidine. <u>Résultats</u> : plus sensible que le ¹⁸ F-FDG pour la détection des lésions actives.
⁶⁸ Ga pentixafor	<u>Principe</u> : le ⁶⁸ Ga pentixafor est un peptide synthétique spécifique du récepteur CXCR4 surexprimé par les cellules de MM. <u>Résultats</u> : présente de très bonnes caractéristiques pour l'imagerie TEP et une dosimétrie favorable.

D'après Cavo et al, 2017 [26]. Références : **¹⁸F-Fluorocholine** : Cassou-Mounat et al, 2016 [27], **¹¹C-choline** : Nanni et al, 2007 [28], **¹¹C-méthionine** : Dankerl et al, 2007 ; Lucke et al, 2015 ; Lapa et al, 2016 [29]–[31], **¹⁸F-fluorothymidine** : Agool et al, 2006 [32], **¹⁸F-fluorure de sodium** : Ak et al, 2015 [33], **¹¹C-acetate** : Ho et al, 2014 ; Lin et al, 2014 [34], [35] ; **¹¹C-4-thiotymidine** : Okasaki et al, 2015 [36] ; **⁶⁸Ga pentixafor** : Herrmann et al, 2016 [37]

Le développement de nouveaux vecteurs et la recherche de nouvelles cibles constituent des axes de recherche importants afin de perfectionner l'imagerie TEP. Il apparaît en effet primordial d'améliorer le ciblage des cellules tumorales en tirant avantage de caractéristiques qui leur sont propres. La limitation des vecteurs métaboliques et notamment du ¹⁸F-FDG est liée à leur faible spécificité pour les cellules tumorales. Plusieurs pistes existent afin de remédier à ces limitations et sont explorées au sein de l'équipe du Prof. Michel Chérel. Une première piste consiste en la recherche de marqueurs biologiques innovants spécifiques des cellules tumorales. Des travaux précliniques ont notamment été menés dans un modèle murin de MM afin d'évaluer la pertinence du ciblage de CD138 pour l'imagerie [38], [39]. Une seconde piste est la mise au point de nouveaux types de vecteurs présentant des propriétés pharmacocinétiques plus favorables afin de potentialiser le ciblage tumoral.

II-CD38, un biomarqueur du myélome multiple

La recherche de biomarqueurs permettant le ciblage des cellules tumorales est un axe fort de la recherche en cancérologie actuelle. On considère généralement qu'un « bon » biomarqueur doit présenter certaines caractéristiques particulières, indispensables à son utilisation en tant que cible. Il doit notamment être exprimé fortement et uniformément par les cellules tumorales sans présenter d'expression par les tissus sains. La présence d'un tel biomarqueur au niveau des territoires cancéreux doit de plus être commune à la majorité des patients. Enfin, sa fonction dans la biologie de la cellule doit être suffisamment importante pour éviter la mise en place de mécanismes d'échappement. Ces caractéristiques théoriques du biomarqueur idéal sont cependant rarement toutes retrouvées dans la réalité et le chercheur doit alors composer afin d'évaluer la balance bénéfice-risque de l'utilisation de tel ou tel biomarqueur.

Dans le cas du MM, la recherche de biomarqueurs permettant le ciblage des plasmocytes malins s'est avérée être un enjeu majeur pour le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des patients. Dans une grande majorité des cas, on observe en effet la survenue de rechutes après traitement. Certains patients deviennent alors réfractaires aux drogues conventionnellement utilisées pour la thérapie du MM, justifiant les efforts entrepris dans le développement de nouvelles approches de ciblage. Dans ce contexte, différents antigènes comme CD138 (syndecan-1), CD319 (SLAMF7) ou CD269 (BCMA) se sont avérés pertinents pour discriminer les plasmocytes tumoraux. Plus récemment, l'attention de la communauté scientifique s'est portée sur un « nouveau » biomarqueur des plasmocytes malins : le CD38.

Le CD38 est une glycoprotéine de 45kDa exprimée majoritairement à la membrane externe des cellules. Elle présente des fonctions enzymatiques intervenant dans le catabolisme des nucléotides extracellulaires et dans la régulation des flux calciques intracellulaires. CD38 possède également une fonction de récepteur et est impliquée dans des mécanismes d'adhésion cellulaire et de transduction de signaux.

De nombreux travaux ont mis en évidence la pertinence du ciblage du CD38 pour l'imagerie et la thérapie du MM. Cette protéine est en effet surexprimée par les plasmocytes malins et est faiblement ou non exprimée par les cellules des lignées lymphoïdes et myéloïdes ainsi que sur les tissus d'origine non hématopoïétique. Cette expression de surface du CD38 sur les cellules tumorales est de plus retrouvée chez plus de 90% des patients atteints de MM. Ces différentes caractéristiques ainsi que son rôle biologique particulier au sein de la cellule en font une cible de choix pour le ciblage du MM. De nombreux anticorps thérapeutiques monoclonaux ciblant cette protéine ont ainsi été développés dont le daratumumab. Cet anticorps testé en clinique offre des résultats encourageants ouvrant la voie à de nouvelles thérapies associant anticorps monoclonaux et différents agents thérapeutiques (inhibiteurs du protéasome, agents alkylants, drogues épigénétiques...).

A-Structure du CD38 humain

Le CD38 est une protéine de 45kDa exprimée de manière préférentielle à la membrane externe des cellules. Elle est composée d'une chaîne polypeptidique de 300 acides aminés répartis en trois régions différentes comprenant un court domaine intracellulaire (21 aa), un domaine transmembranaire (23aa) et un important domaine extracellulaire (256 aa)(cf. **figure 5**). La partie extracellulaire de CD38 a une forme de « L » et peut être divisée en deux grands domaines : le domaine N-terminal et le domaine C-terminal. Le domaine N-terminal est composé des résidus aminés 45 à 118 et 144 à 200 et se structure en un faisceau de 5 hélices alpha ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$) complété par 2 feuillets β ($\beta 1$, $\beta 3$). Le domaine C-terminal quant à lui est organisé en un feuillet β comprenant 4 segments parallèles ($\beta 2$, $\beta 4$, $\beta 5$ et $\beta 6$) entouré par 2 hélices alpha longues ($\alpha 8$ et $\alpha 9$) et 2 hélices alpha courtes ($\alpha 4$, $\alpha 7$). Cette partie C-terminale est constituée des résidus aminés 119 à 143 et 201 à 300 (cf. **figure 6**). Les 2 grands domaines N et C-terminal sont connectés par une région charnière composée de 3 chaînes peptidiques courtes (résidus 118-119, 143-144 et 200-201) [40], [41]. Six ponts disulfures renforcent la conformation de la protéine [42]. CD38 présente également 4 sites de N-glycosylation [43]. Il est à noter que les motifs saccharidiques de cette protéine comptent pour environ 25% de son poids moléculaire final [44].

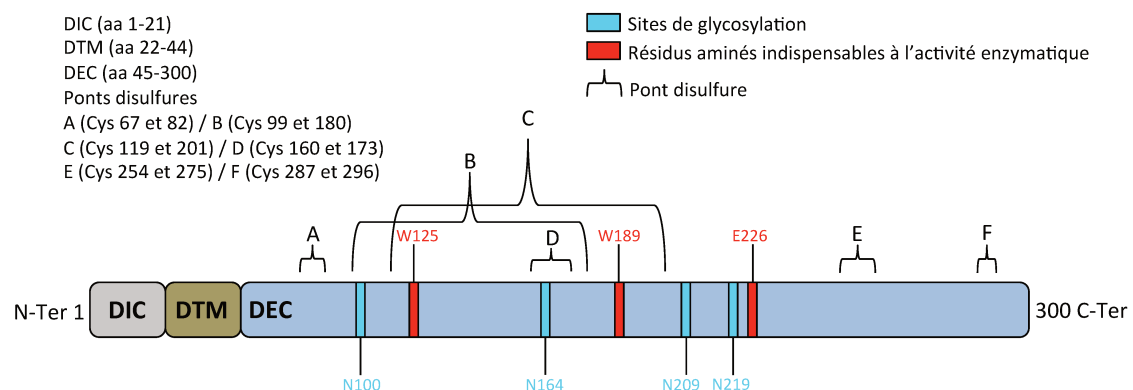


Figure 5 | Organisation de la chaîne polypeptidique de CD38 humain

Cette protéine est divisée en trois domaines. Un domaine intracellulaire (DIC, aa 1 à 21), un domaine transmembranaire (DTM, aa 22 à 44) et un domaine extracellulaire (DEC, aa 45 à 300). Trois résidus W125, W189 et E226 sont responsables de l'activité enzymatique de CD38. Six ponts disulfures (Cys67-Cys82, Cys99-Cys180, Cys119-Cys201, Cys160-Cys173, Cys254-Cys275, Cys287-Cys296) vont stabiliser la conformation de la protéine. Les sites de N-glycosylation sont situés sur quatre résidus asparagines (N100, N164, N209 et N219).

Les différentes fonctions enzymatiques de CD38 (décrites ci-dessous) sont assurées par un unique site catalytique localisé à l'interface des domaines N et C-terminal. La cavité de ce site est formée par le repliement des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du domaine N-terminal et des hélices $\alpha 7$ et du segment $\beta 5$ du domaine C-terminal. Dans cette région, les résidus glutamate 226, tryptophane 125 et tryptophane 189 sont hautement conservés et sont indispensables à l'activité enzymatique du CD38 [45].

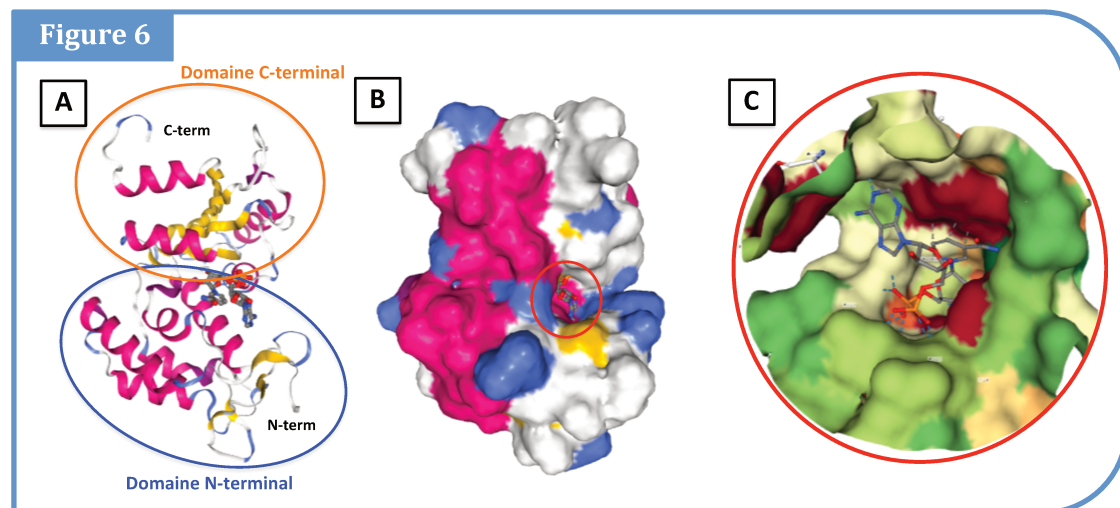


Figure 6 | Structure du domaine extracellulaire de la protéine CD38 humaine (aa 45 à 300). A) Représentation en ruban de la structure tridimensionnelle de la protéine faisant apparaître les hélices α (rose), les hélices π (violet), les segments β (jaune) et les coudes (bleu). B) Représentation en balle et bâtonnet de la structure tridimensionnelle de la protéine (même orientation que la figure A) faisant apparaître le site catalytique (cercle rouge). C) Zoom sur la poche catalytique contenant un nucléoside NAD⁺. Les images ont été générées à l'aide du site «www.uniprot.org».

B-CD38, une protéine à activité pleïotropique

Le CD38 est le plus souvent évoqué pour sa qualité de biomarqueur permettant le ciblage des cellules myélomateuses. L'étude de cette glycoprotéine a cependant permis de mettre en évidence un rôle plus large et des fonctions biologiques multiples. Il a notamment été démontré que CD38 pouvait jouer le rôle de récepteur de surface et intervenir dans la transduction de signaux. De même, ses propriétés enzymatiques particulières font de cette protéine un acteur important pour la production de seconds messagers intervenant dans la signalisation calcique. Différents travaux ont également pu mettre en évidence son rôle dans des phénomènes d'adhésion.

α -Fonction de récepteur

La molécule CD38 présente des fonctions de récepteur et est capable d'intervenir dans la modulation de voies de signalisation cellulaire. Cette propriété particulière de CD38 a été découverte fortuitement par l'observation d'effets prolifératifs induits sur des préparations de cellules mononuclées du sang périphérique après incubation avec un anticorps monoclonal anti-CD38 [46]. De nombreux travaux, menés principalement sur des populations de cellules lymphocytaires, ont ensuite permis d'affiner la compréhension de cette fonction. Le panorama esquissé grâce à ces différentes découvertes est complexe et est toujours en cours d'exploration. Il en ressort cependant que CD38 est une protéine de surface possédant des fonctions de

récepteur et qui agit, la plupart du temps, en synergie avec d'autres récepteurs afin de moduler certaines voies de signalisation. La recherche du partenaire « non substrat » de CD38 a également permis l'identification de CD31 ou PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion Molecule-1), une molécule appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Cette protéine est exprimée majoritairement par les cellules endothéliales et de manière plus marginale par certaines cellules hématopoïétiques dont les lymphocytes et les cellules dendritiques [47]. Il apparaît ainsi que l'engagement de CD38 avec CD31 va permettre de moduler certaines voies de signalisation ainsi que de favoriser certains phénomènes d'adhérence cellulaire qui seront décrits ultérieurement.

Les voies de signalisation induites par la liaison CD38-CD31 dépendent du type cellulaire et du stade de différenciation mais l'on retrouve cependant des caractéristiques communes chez les cellules immunitaires CD38+. Dans ces cellules, la liaison CD38-ligand induit une cascade de signalisation impliquant notamment la protéine ZAP70 et le proto-oncogène c-cbl. On retrouve ces deux substrats phosphorylés après ligation du CD38 dans les cellules T, B et NK favorisant généralement des processus de survie et de prolifération. Ces données semblent suggérer que le CD38 est impliqué dans la régulation fine de la signalisation TCR, BCR et CD16. L'observation d'une colocalisation du CD38 avec ces différents récepteurs à la membrane cellulaire renforce également cette hypothèse. Dans les paragraphes suivants, nous décrirons les voies de signalisation mises en jeu par l'engagement du CD38 dans les populations de cellules immunitaires T, B et NK.

Lymphocytes T

L'implication du CD38 dans la signalisation TCR a été suggérée par l'observation de profils d'expression cytokinique analogues déclenchés suite à un engagement avec leur ligand respectif [48], [49]. La mise en évidence d'une colocalisation membranaire entre ces deux protéines est également venue renforcer cette hypothèse [50]. L'exploration de cette interaction a permis de mettre en évidence l'implication de différents acteurs moléculaires. Il apparaît en effet que l'engagement du CD38 par son ligand aboutit à une phosphorylation complète des chaînes ζ et ϵ du CD3 via une cascade de signalisation impliquant différentes protéines partenaires (Lck, ZAP-70, PLC- γ , PKC). Des événements plus tardifs vont aboutir à l'activation de la voie Raf-1/MAP kinase et à la mobilisation de calcium intracellulaire. Dans ce cadre, le CD38 apparaît comme jouant un rôle de support de la signalisation TCR et va favoriser des mécanismes pro-apoptotiques. Ces événements sont dépendants de la présence d'un complexe TCR fonctionnel [51], [52].

Lymphocytes B

La ligation du CD38 dans les lymphocytes B est à l'origine de signaux de natures différentes selon le stade de différenciation de la cellule. Dans les précurseurs B, l'engagement du CD38 inhibe la prolifération et favorise des mécanismes d'apoptose. La transduction des signaux dans ces cellules implique une dimérisation de CD38 suite à la liaison avec son ligand suivie par une phosphorylation rapide et transitoire de différentes protéines (Syk, PLC- γ , Tec, c-cbl, la sous-unité P85 de la phosphatidylinositol 3-kinase). Ces phénomènes de phosphorylation vont aboutir à l'inhibition de la croissance cellulaire et vont favoriser l'induction de mécanismes apoptotiques [53]. Dans les cellules B matures, on observe des effets inverses, la ligation de CD38 étant suivie d'événements de prolifération et de prévention de l'apoptose. Ces effets sont induits par l'activation d'une voie de signalisation aboutissant au recrutement de NF- κ B [54]. Il a été démontré dans des modèles murins que ces événements étaient dépendants de l'association de CD38 avec le BCR [55].

Cellules NK

Dans les cellules NK, la ligation de CD38 entraîne une cascade de phosphorylations impliquant différentes protéines cytosoliques (CD3- ζ , la chaîne Fc ϵ RI γ , ZAP-70 et le proto-oncogène c-Cbl) aboutissant à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire. On retrouve également ces protéines phosphorylées dans les voies de signalisation dépendantes du CD16. Comme lors de l'engagement de CD16, la signalisation CD38 favorise la sécrétion d'IFN- γ (interféron gamma) et l'induction d'effets cytolytiques propres aux NK [56]. Cette redondance d'action laisse supposer une fonction support de CD38 dans la signalisation médiée par le CD16. L'importance de cette fonction support reste cependant à définir avec précision.

On observe donc une implication de CD38 dans différentes voies de signalisation cellulaire. Les différents travaux ayant permis d'explorer cette signalisation se sont basés sur l'utilisation d'AcM afin d'induire la ligation de CD38. Il a cependant été montré que des résultats équivalents étaient obtenus avec le ligand naturel de CD38, CD31 [57]. Il a également été prouvé que l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire observée dans certaines populations cellulaires suite à l'engagement du CD38 était bien liée à l'activation de voies de signalisation et non pas à l'activité enzymatique de la protéine [55].

b-Fonction enzymatique

Une caractéristique remarquable de la protéine CD38 est sa fonction enzymatique. Cette molécule catalyse en effet différentes réactions impliquant des métabolites dérivés du NAD (Nicotinamide adénine dinucléotide) comme précurseurs. Le type de réaction catalysée dépend de la localisation de CD38 et du pH régnant autour de la molécule. À pH neutre, condition généralement retrouvée au niveau de la membrane extracellulaire ou du cytosol, on observe une

activité ADP-ribosyle cyclase catalysant dans un premier temps la réaction de transformation du NAD⁺ en cADPR (Adénosine diphosphate ribose cyclique) puis, dans un second temps, l'hydrolyse du cADPR en ADPR (Adénosine diphosphate ribose). En milieu acide, condition que l'on retrouve au niveau des compartiments lysosomaux, le CD38 catalyse la réaction de transformation du NADP (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) en NAADP (Nicotinic Acid Adénine Dinucléotide Phosphate) puis son hydrolyse en ADPRP (Adénosine Diphosphoribose Phosphate) (cf. **figure 7**) [41], [57].

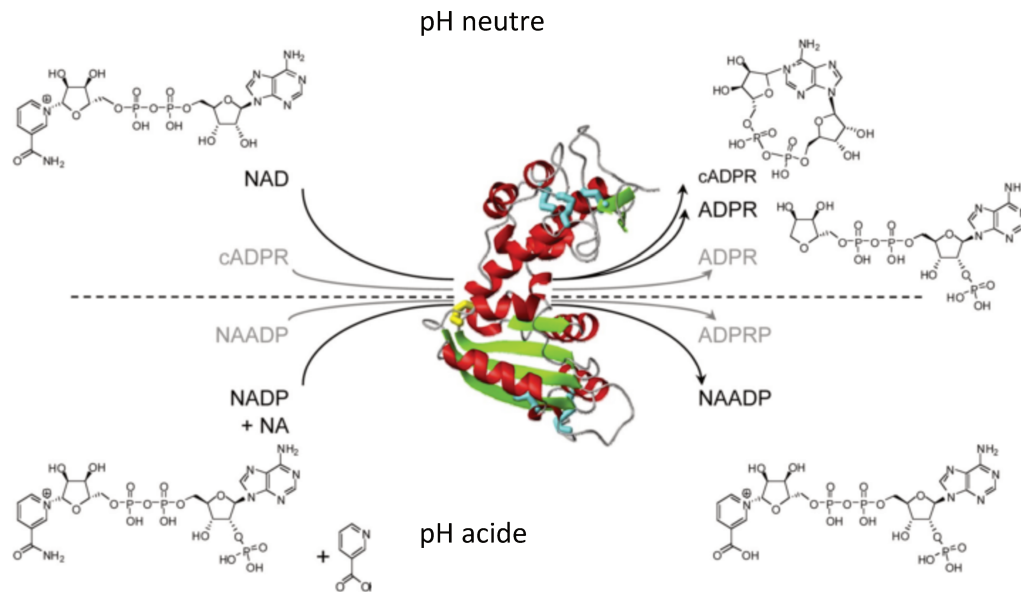


Figure 7 | Représentation des différentes réactions enzymatiques catalysées par CD38
 En condition de pH neutre, CD38 va catalyser la réaction de transformation du NAD⁺ en cADPR puis la linéarisation de ce dernier en ADPR. En condition de pH acide, CD38 va catalyser la réaction de transformation du NADP en NAADP puis l'hydrolyse de ce dernier en ADPRP. D'après Malavasi et al, 2008 [57].

Les métabolites issus de ces différentes réactions agissent comme second messager et permettent le relargage de calcium dans le cytoplasme. Ce relargage calcique peut être induit par le cADPR qui active les récepteurs à la ryanodine, (canaux calciques situés dans la membrane du réticulum endoplasmique) ou par l'ADPR qui abaisse le seuil d'activation de canaux TRPM2 (Transient receptor potential cation channel) exprimés dans la membrane plasmique. Il a également été observé une action du cADPR sur les canaux TRPM2 fonctionnant de manière analogue et en synergie avec l'ADPR [58], [59].

On observe des mécanismes équivalents au niveau du compartiment lysosomal où les métabolites issus de l'activité du CD38 induisent un relargage calcique dans le cytoplasme via l'activation de récepteurs TPC (two-pore channel) localisés dans la membrane de ces organelles [58].

Ces mécanismes de relargage induisent une hausse de la concentration calcique intracytoplasmique permettant l'initiation de différents processus cellulaires comme la contraction, la motilité ou la prolifération (cf. **figure 8**) [60], [61], [62].

De nombreux travaux ont mis en évidence l'implication du CD38 dans la mobilisation des stocks calciques intracellulaires. La mécanistique précise de cette fonctionnalité ne va cependant pas sans poser quelques problèmes conceptuels. En effet, la localisation extracellulaire du site catalytique de CD38 pose question lorsqu'il s'agit d'imaginer les processus permettant la modulation de flux calciques intracellulaires, les substrats de l'enzyme étant majoritairement présents dans le cytosol. Existe-t-il des transporteurs dédiés permettant leur acheminement vers l'extérieur ? Même interrogation concernant les produits de la réaction enzymatique catalysée par CD38 qui se retrouve en théorie dans le milieu extracellulaire.

Deux hypothèses proposant de résoudre ce qui est appelé « le paradoxe topologique de CD38 » font actuellement l'objet de recherches [63].

La première postule l'existence de transporteurs dans la membrane plasmique et dans la membrane des lysosomes permettant le mouvement des substrats et des produits de la réaction enzymatique entre les différents compartiments. De nombreuses données ont montré que la connexine-43 pouvait participer au transport du NAD à travers la membrane et que le cADPR et le NAADP pouvaient être pris en charge par des transporteurs des nucléosides [64], [65]. L'activité de ces transporteurs peut de plus être régulée par différents mécanismes permettant *in fine* une régulation de l'activité de l'enzyme par limitation de l'accès au substrat. C'est par exemple le cas du transport du NAD par la connexine-43 qui est Ca^{2+} dépendant et qui peut être inhibé par des phénomènes de phosphorylation [66].

La deuxième hypothèse explorée consiste en un passage du CD38 d'une forme de type II (protéine transmembranaire orientée vers le milieu extracellulaire) à une forme de type III (orientation vers le milieu intracellulaire) par un mécanisme de flip-flop. Cette hypothèse a été validée par une équipe chinoise qui, à l'aide d'AcM dirigés contre CD38, a réussi à mettre en évidence l'existence d'une forme minoritaire de la protéine orientée en intracellulaire [67].

Il apparaît vraisemblable, au vu de ces différents résultats, d'envisager la cohabitation des formes de types II et III au sein d'une même cellule. Le mécanisme de type III avec le domaine catalytique localisé en intracellulaire n'est pas limité par la disponibilité du substrat et peut être impliqué dans des réponses cellulaires rapides à un stimuli. Le mécanisme de type II au contraire nécessite le transport du substrat et des produits, ce qui le rend plus à même d'intervenir dans des réponses cellulaires plus lentes et prolongées [63].

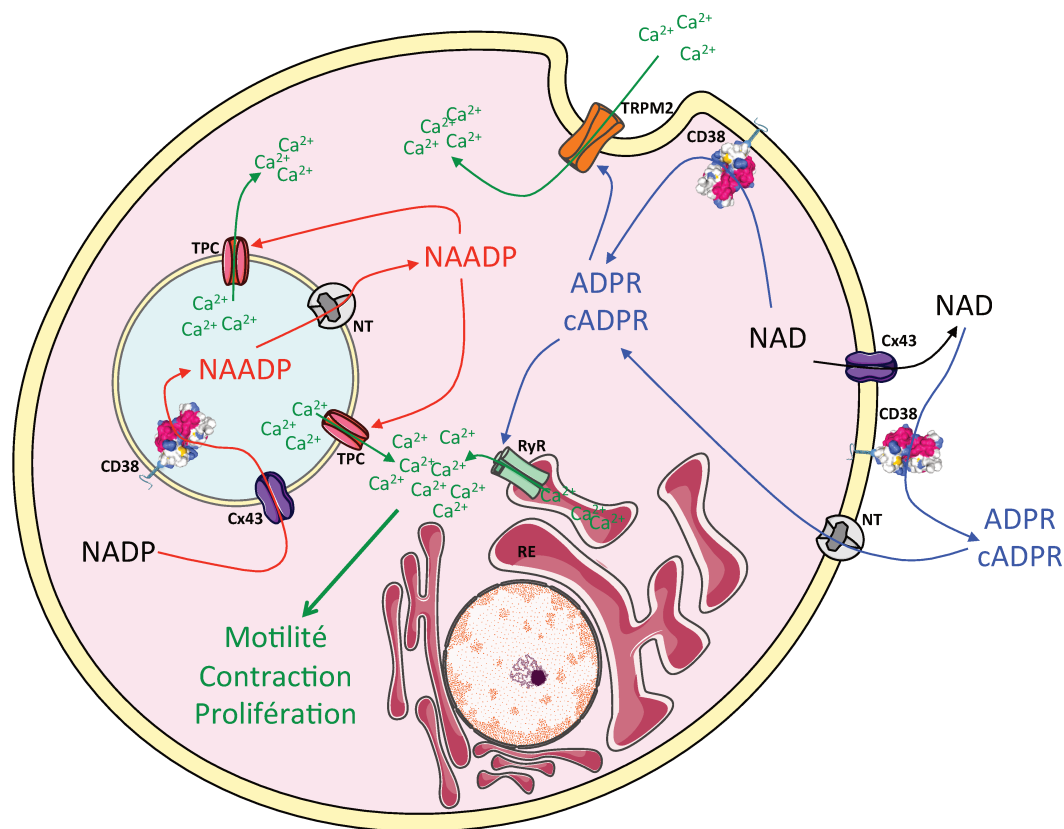


Figure 8 | Mécanismes enzymatiques de CD38 et implications dans la signalisation calcique intracellulaire. Cx43: connexine 43 ; TPC: Two pore channel ; NT: Nucleoside transporter ; TRPM2: Transient receptor potential cation channel M2 ; RyR: récepteur à la ryanodine ; RE: Réticulum endoplasmique. Adapté d'après Fliegert et al, 2007 [59].

c-Fonction de molécule d'adhérence

Dans le contexte de la diapédèse, CD38 joue également le rôle de molécule d'adhésion impliquée dans des interactions hétérotypiques cellule-cellule. Le CD38 agit alors comme une sélectine en participant aux interactions faibles entre le leucocyte CD38+ et la cellule endothéliale CD31+ et va ainsi faciliter l'extravasation lymphocytaire [68], [69].

Il est à noter que ces différentes caractéristiques peuvent conférer au CD38 un rôle aggravant dans certaines pathologies hématologiques. Dans la leucémie lymphoïde chronique, un pourcentage élevé de cellules malignes exprimant CD38 sera corrélé à un mauvais pronostic clinique. Le phénotype CD38+ favorise en effet chez ces cellules des mécanismes de prolifération, de survie et de motilité renforçant l'agressivité de la pathologie [70].

C-Distribution tissulaire du CD38 humain

Dans un contexte physiologique, on retrouve une expression du CD38 à des taux relativement bas dans certains tissus hématopoïétiques. Cette expression est, de manière générale, finement régulée et va dépendre de l'état de différenciation et du niveau d'activation de la cellule. On retrouve également CD38 exprimé à faible fréquence dans certains tissus non hématopoïétiques [57].

a-Tissus hématopoïétiques

Le CD38 est exprimé principalement par les cellules du système immunitaire. On observe une régulation fine de son expression pendant l'hématopoïèse : les cellules souches hématopoïétiques à longue durée de vie (LT-CSH), les CSH à courte durée de vie (ST-CSH) ainsi que les progéniteurs multipotents (MPP) n'expriment pas ce marqueur. Les progéniteurs communs myéloïdes et lymphoïdes issus de la différenciation du MPP sont en revanche CD38+.

Lignée myéloïde

L'expression du CD38 a été observée sur des monocytes circulants ainsi que sur des cellules dendritiques activées. Les cellules NK, les granulocytes ainsi que les ostéoblastes et ostéoclastes sont CD38+.

Lymphocytes T

Le CD38 est exprimé par les thymocytes à différents niveaux selon leur stade de maturation. Lors du stade double négatif (DN) la population CD38+ est minoritaire. Ce pourcentage de thymocytes CD38+ va augmenter considérablement au stade double positif (98%) et reste élevé au stade simple positif (SP) CD4 ou CD8. L'expression du CD38 dans les populations de LT circulants dépend de leur degré d'activation.

Lymphocytes B

L'expression de CD38 est finement régulée pendant l'ontogenèse des lymphocytes B. On observe une forte expression de cette protéine dans les précurseurs B de la moelle osseuse.

Les LB matures naïfs sortant de la moelle osseuse sont CD38-. Après activation de la cellule B dans les organes lymphoïdes secondaires, le CD38 est réexprimé.

On note une absence d'expression de ce marqueur sur les B mémoires et, au contraire, une expression forte sur les plasmocytes.

b-Tissus non-hématopoïétiques :

CD38 est également exprimé à bas niveau par des tissus non hématopoïétiques comme les cellules épithéliales prostatiques, les cellules B du pancréas, les ostéoclastes, ou encore les cellules des muscles striés.

D-CD38, une cible pour l'imagerie et la thérapie du MM

Dans un contexte pathologique, on retrouve une expression forte et uniforme de CD38 sur les plasmocytes malins de plus de 90% des patients [71], [72]. Cette surexpression ainsi que les caractéristiques intrinsèques de CD38 décrites ci-dessus (fonction enzymatique, de récepteur, de molécule d'adhésion) font de cette protéine un biomarqueur d'intérêt pour le ciblage des cellules myélomateuses. Les besoins en thérapies innovantes, notamment pour les patients réfractaires aux drogues utilisées conventionnellement dans le cadre de cette pathologie, ont conduit au développement d'anticorps monoclonaux ciblant le CD38. On peut notamment citer le daratumumab (anticorps monoclonal humain, Genmab), l'isatuximab (anticorps chimérique, Sanofi) et le MOR202 (anticorps humain, MorphoSys) [73] [74].

α-CD38 comme cible pour la thérapie du MM

Le daratumumab est un anticorps humain ciblant le CD38 présentant le développement clinique le plus avancé. Il exerce son activité anti-tumorale via des mécanismes de CDC (Complement dependent cytotoxicity), d'ADCC (Antibody dependent cell cytotoxicity) et d'ADCP (Antibody dependent cell phagocytosis) [75], [76]. En parallèle de ces mécanismes d'action classiques dépendant de la région Fc, deux autres fonctionnalités ont été documentées. L'effet anti-tumoral du daratumumab peut en effet s'exercer par la dérégulation de l'activité enzymatique du CD38 induite par la fixation de l'anticorps [77]. Il a également été observé des effets immunomodulateurs favorisés par l'élimination de cellules immunosuppressives CD38+ (LT régulateur, LB régulateur) dans le voisinage de la tumeur (cf. **figure 9**) [78].

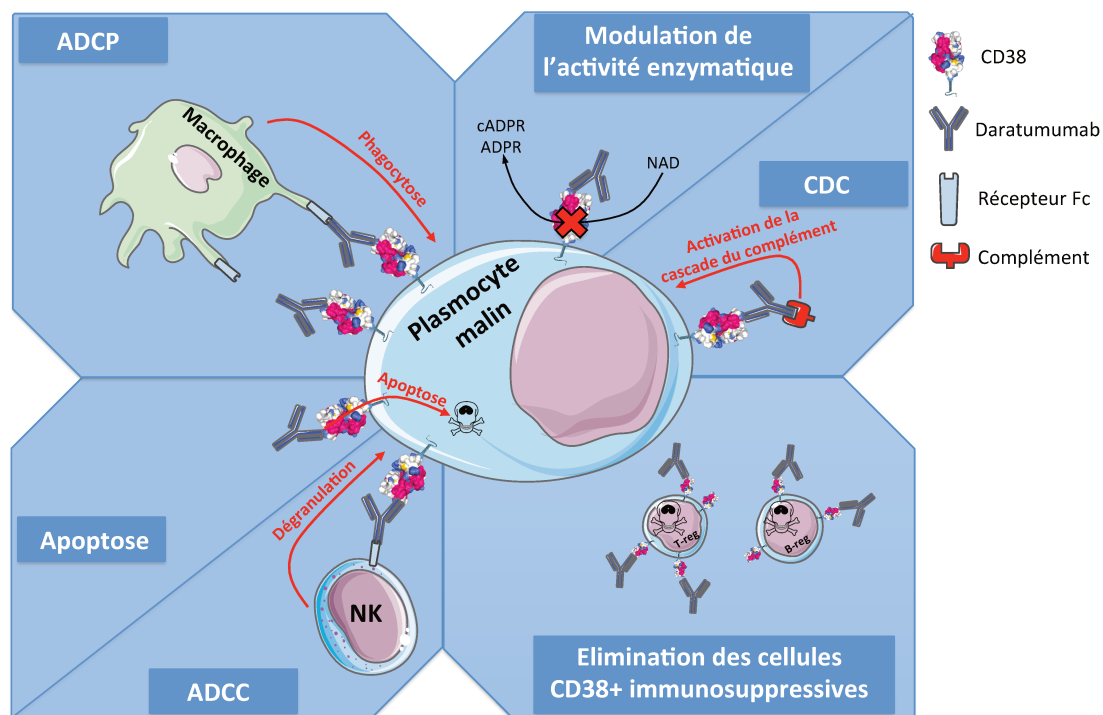


Figure 9 | Mécanismes d'action du daratumumab sur les cellules tumorales

La fixation du daratumumab sur le CD38 exprimé par les cellules myélomateuses peut générer des effets anti-tumoraux directs via différents mécanismes immunitaires (CDC, complément-dépendent cytotoxicity ; ADCP, antibody-dependent cellular phagocytosis ; ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) ainsi que par induction de processus d'apoptose. Le daratumumab exerce également des effets anti-tumoraux via des mécanismes d'immunomodulation. Il favorise notamment la déplétion des populations lymphocytaires régulatrices CD38+ et module l'activité enzymatique du CD38. Adapté d'après Lonial et al, 2015 [2].

Du fait de son fort potentiel anti-tumoral *in-vitro*, plusieurs études cliniques ont été menées afin d'évaluer l'efficacité du daratumumab chez des patients atteints de MM et réfractaires aux traitements conventionnels [74]. Les résultats de ces études ont mis en avant l'absence d'effets secondaires majeurs ainsi que de bons résultats thérapeutiques (on constate une induction d'une réponse partielle ou mieux chez plus de 30% de ces patients multiréfractaires).

Le daratumumab a également été testé en combinaison avec d'autres drogues. L'association avec des agents immunomodulateurs (thalidomide, lénalidomide) et/ou avec des inhibiteurs du protéasome (bortézomib, carfilzomib) a permis d'amplifier la réponse clinique préalablement observée en monothérapie [79], [80].

Les résultats favorables de ces études cliniques ont permis au daratumumab d'être approuvé aux Etats-Unis par la FDA (Food and Drug Administration) et en Europe par l'EMA (European Medicine Agency) en 2015 et 2016 respectivement. L'indication concerne des patients MM ayant préalablement reçu 3 lignes de thérapies incluant un inhibiteur du protéasome (IP) et un immunomodulateur (IMiD) ou qui sont doubles réfractaires à un IP et un IMiD. Il peut être administré en monothérapie ou en combinaison avec d'autres molécules médicamenteuses (chimiothérapies, IMiD, IP).

D'autres anticorps monoclonaux anti-CD38 comme l'isatuximab et le MOR202 ont également fait l'objet d'études cliniques portant sur leur efficacité en combinaison avec des IMiD et des IP.

Là aussi, on retrouve des résultats prometteurs avec une amélioration du pourcentage de réponses partielles au traitement ainsi qu'un accroissement de la durée de survie sans progression de la pathologie [74].

Les résultats cliniques obtenus par l'utilisation du daratumumab ont validé la pertinence du choix de CD38 comme protéine cible pour la thérapie du MM. Parallèlement, des travaux ont été menés afin d'investiguer l'intérêt de ce biomarqueur pour l'imagerie phénotypique du MM.

b-CD38 comme cible pour l'imagerie du MM

Plusieurs équipes ont pu mettre en évidence, dans des modèles précliniques xénogéniques, l'intérêt du CD38 comme cible pour l'imagerie phénotypique du MM. Ces différents groupes ont utilisé le daratumumab comme anticorps anti-CD38 humain de référence couplé avec des radioéléments émetteurs β^+ de demi-vie longue (^{64}Cu ou ^{89}Zr) [81], [82]. Les résultats obtenus ont permis de démontrer la faisabilité technique du couplage du daratumumab avec un radioélément et son absence d'impact sur la capacité de reconnaissance antigénique de l'AcM. Les expériences d'immunoTEP réalisées dans des modèles murins xénogreffés avec l'AcM anti-CD38 radiomarqué se sont révélées particulièrement productives. Les images obtenues lors d'acquisitions immunoTEP de souris présentant des tumeurs sous-cutanées ont en effet permis de valider la conservation de la spécificité et de l'affinité de l'anticorps *in vivo*. Dans des modèles murins de tumeurs disséminées, plus proches de la réalité biologique d'un MM, les différents foyers tumoraux ont pu être visualisés de manière précise (cf. **figure 10**).

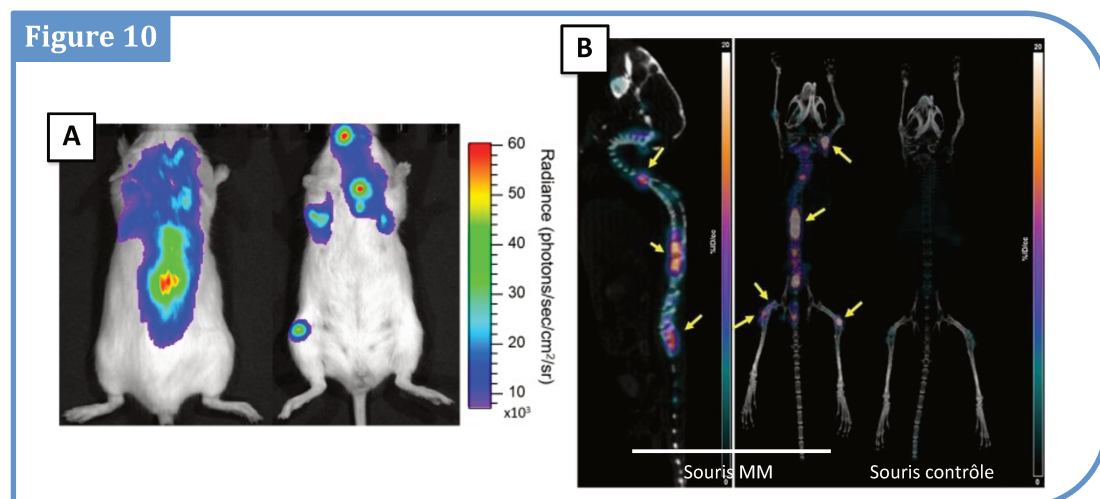


Figure 10 | Exemple d'étude préclinique du daratumumab radiomarqué au zirconium 89 (^{89}Zr]Zr-DFO-Daratumumab) dans un modèle murin de MM

A) Imagerie par bioluminescence d'une souris préalablement greffée avec la lignée de MM humaine CD38+ MM1-S-luciférase permettant la localisation de différents foyers tumoraux disséminés. B) Images TEP/TDM obtenues 7 jours après l'injection du ^{89}Zr]Zr-DFO-Daratumumab dans une souris MM et une souris sans tumeurs (souris contrôle) permettant la visualisation spécifique des foyers tumoraux disséminés. D'après Ghai et al, 2018 [82].

Ces résultats précliniques prometteurs ont amené à la réalisation d'essais cliniques de phase I afin d'évaluer, dans un premier temps, la sécurité et la faisabilité de l'immunoTEP avec le daratumumab radiomarqué au cuivre 64 et, dans un second temps, de comparer cette imagerie à celle obtenue avec le ^{18}F -FDG (NCT#03311828). Les premières données obtenues s'avèrent encourageantes avec une absence d'effets secondaires majeurs et une très bonne détection des foyers myélomateux [83]. Des investigations futures seront menées afin de comparer cette modalité d'imagerie à la référence que constitue l'imagerie métabolique au ^{18}F -FDG. Les premiers éléments apportés par cet essai de phase I sont cependant favorables au daratumumab ^{64}Cu qui semble apporter un gain de sensibilité et de spécificité (cf. **figure 11**).

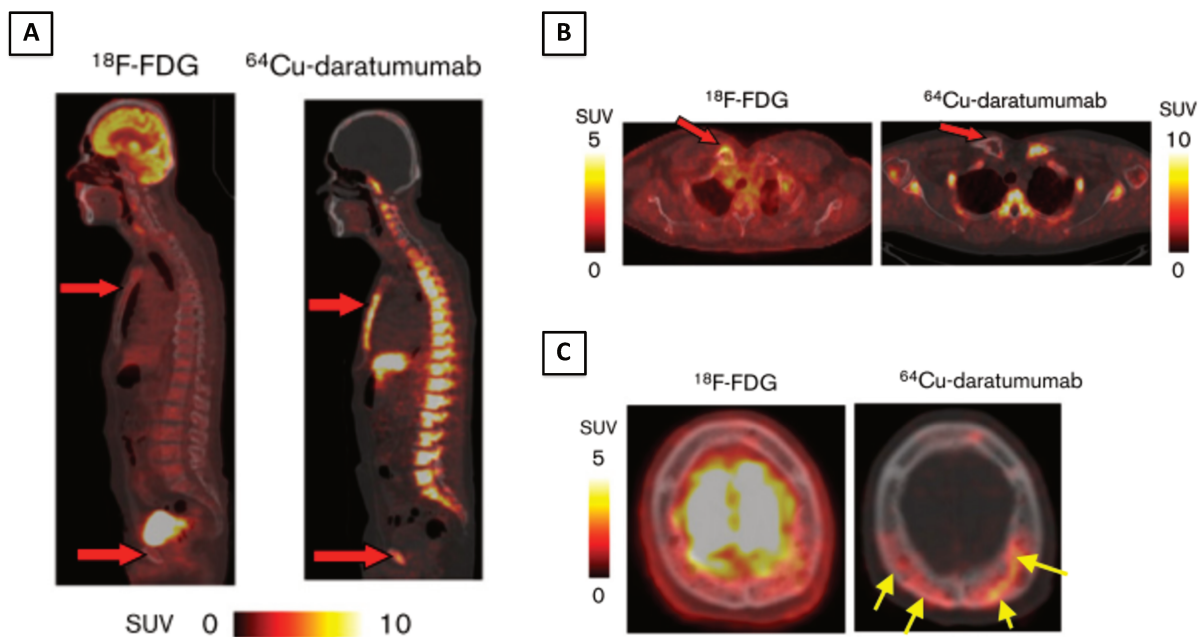


Figure 11 | Imagerie TEP-TDM : comparaison du ^{18}F -FDG et du daratumumab radiomarqué au cuivre 64 chez des patients MM Images obtenues lors du premier essai clinique utilisant le daratumumab radiomarqué au cuivre 64 (^{64}Cu]DOTA-Daratumumab) pour l'imagerie TEP de patients MM (NCT#03311828). A) Images de fusion TEP-TDM en coupe sagittale montrant la fixation du ^{18}F -FDG et du ^{64}Cu -daratumumab au niveau de deux régions du sternum et du bassin (flèches rouges). L'invasion de ces régions par des cellules myélomateuses a été confirmée après examen histologique par biopsie. B) Images de fusion TEP-TDM en coupe transversale montrant une fixation du ^{18}F -FDG mais pas du ^{64}Cu -daratumumab au niveau de la clavicule droite (flèches rouges). L'analyse de cette région par biopsie a montré une absence d'infiltration par des cellules de myélome. C) Images de fusion TEP-TDM en coupe transversale montrant la fixation du ^{18}F -FDG et du ^{64}Cu -daratumumab au niveau de la région crânienne. La captation du ^{18}F -FDG par le parenchyme cérébral empêche la visualisation de lésions osseuses visibles avec le ^{64}Cu -daratumumab (flèches jaunes). Adapté d'après Krishnan et al, 2020 [83].

Le CD38 est donc une protéine présentant des caractéristiques biologiques diverses, intervenant à différents niveaux de la vie cellulaire. Exprimée à haut niveau et de manière uniforme par plus de 90% des plasmocytes malins issus de patients, cette protéine a rapidement suscité un intérêt pour le ciblage des zones tumorales. Nous avons vu que les différents travaux menés ont abouti au développement de plusieurs AcM anti-CD38 dont le daratumumab est le meilleur représentant. Testé en monothérapie ou en combinaison avec d'autres drogues, cet AcM s'est révélé prometteur, permettant l'obtention de réponses cliniques chez de nombreux patients MM jusque-là réfractaires aux thérapies classiques. Ces résultats encourageants ont amené différents groupes à utiliser cet AcM pour la réalisation d'immunoTEP dans des modèles précliniques puis en clinique. Là encore, les résultats se sont avérés prometteurs.

Le large spectre de données maintenant disponibles sur le ciblage du CD38 pour le MM ne laisse donc plus de doutes quant à la pertinence de son utilisation. Les AcM anti-CD38 commerciaux ont montré leur efficacité mais un axe fort d'amélioration pour cibler les zones tumorales serait le développement de nouveaux vecteurs possédant des propriétés pharmacocinétiques plus favorables et pouvant être produits à moindre coût.

Le chapitre suivant se propose de revenir sur les différentes stratégies de ciblage des tissus tumoraux.

III-Stratégies de ciblage moléculaire des tumeurs

Le développement de stratégies de ciblage des tissus tumoraux à des fins diagnostiques et thérapeutiques est l'un des défis majeurs de la recherche en cancérologie actuelle. Les différentes approches développées s'appuient sur les caractéristiques des tumeurs et de leur microenvironnement afin d'acheminer vers la zone pathologique un maximum de principe actif tout en limitant l'exposition des tissus sains. Un bond en avant majeur dans le ciblage actif des cellules tumorales a été accompli avec le développement des anticorps monoclonaux. Ces protéines d'affinité, issues du système immunitaire, possèdent des propriétés de reconnaissance spécifiques rendant pertinente leur utilisation en oncologie. Au cours des quatre dernières décennies, les différents travaux menés autour des AcM combinés aux avancées dans le domaine de l'ingénierie des protéines ont permis l'émergence de nouvelles classes de protéines d'affinité dédiées au ciblage. Des fragments d'anticorps aux protéines d'affinité artificielles, l'éventail des possibilités s'est considérablement élargi permettant d'envisager de nouvelles approches pour la thérapie et le diagnostic en oncologie.

Nous reviendrons donc dans les paragraphes suivants sur ces différentes modalités de ciblage tumoral.

A-Les anticorps

a-Structure des anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines complexes produites par le système immunitaire en réponse à une stimulation par un composant, habituellement étranger, appelé antigène. Historiquement, les anticorps ou immunoglobulines (Ig) sont les premières molécules d'affinité à avoir été utilisées pour le ciblage des antigènes tumoraux [84], [85]. Il existe chez les mammifères cinq classes différentes d'immunoglobulines selon la structure des domaines constants des chaînes lourdes : les IgG, IgA, IgM, IgE et IgD. Ces différents isotypes sont présents dans l'organisme dans des proportions et à des localisations variables selon leur classe. De même, ces Ig présentent des fonctions spécialisées différentes bien que toutes impliquées dans l'immunité [86], [87].

Les immunoglobulines G (IgG) sont les anticorps utilisés pour la thérapie des cancers. Leur structure caractéristique en forme de Y est basée sur l'association de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes identiques (heavy chain – H) et deux chaînes légères identiques (light chain – L) connectées par l'intermédiaire de ponts disulfures. Chaque chaîne lourde est constituée de trois domaines constants (C_H1 à 3) et d'un domaine variable (V_H) et chaque chaîne légère d'un domaine constant (C_L) et d'un domaine variable (V_L) (cf. **figure 12**). C'est la combinaison des domaines variables d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère qui

constitue le site de reconnaissance et de liaison à l'antigène ou paratope tandis que la partie constante formée par l'association des chaînes lourdes est impliquée dans des fonctions effectrices [88].

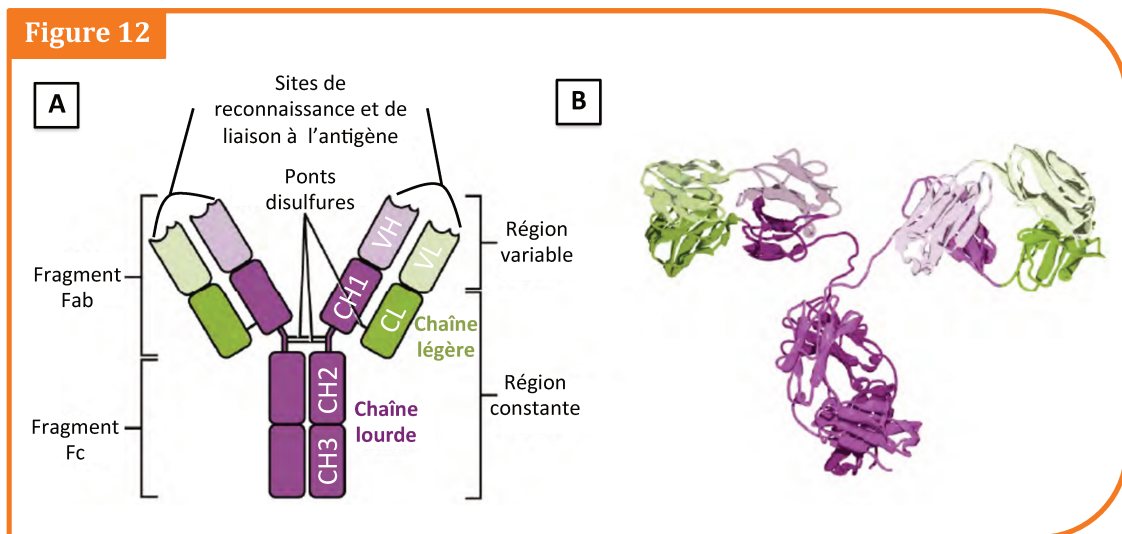


Figure 12 | Structure d'une immunoglobuline G (IgG)

A) Représentation schématique et vue tridimensionnelle (B). Adapté d'après Parker et al, 2016 [239].

D'un point de vue fonctionnel, une IgG peut en effet être divisée en deux parties :

- Une première partie possédant une capacité de reconnaissance et de fixation à l'antigène nommée Fab (Fragment Antigen Binding). Ce fragment est constitué de la chaîne légère assemblée avec les domaines V_H et C_{H1} de la chaîne lourde. La diversité génétique engendrée par les mécanismes de recombinaison des gènes codant ces domaines permet la reconnaissance de cibles multiples. On estime en effet qu'un humain peut produire plus de 10^{12} molécules d'anticorps différentes [89].
- Une seconde partie nommée fragment Fc (Fragment crystallizable) composée de l'association des domaines constants C_{H2} et C_{H3} des deux chaînes lourdes. Ce fragment permet le recrutement d'effecteurs de l'immunité en se liant aux récepteurs Fc (FcR) exprimés par les cellules phagocytaires et cytotoxiques et peut aussi induire l'activation du système du complément [90]. Ces récepteurs Fc jouent également un rôle important dans la pharmacocinétique des IgG en les protégeant du catabolisme intracellulaire et en favorisant leur recyclage. Ainsi, le temps de $\frac{1}{2}$ vie d'une IgG est de 21 jours contre 2,5 à 6 jours pour les autres classes d'Ig [91].

Entre les Fab et le fragment Fc se trouve une région appelée région charnière (hinge en anglais). Cette région assure la connexion entre les deux chaînes lourdes via des ponts disulfures. Elle permet également une grande flexibilité entre les deux branches de l'anticorps favorisant ainsi une fixation optimale de l'antigène [88].

L'utilisation d'anticorps pour le diagnostic et la thérapie du cancer est devenue l'une des stratégies les plus prometteuses de ces dernières années. Ce bond en avant a notamment été rendu possible par le développement de la technique d'hybridome dans les années 1970 [92]. Cette méthode permet de cultiver indéfiniment un clone de cellule productrice d'un seul type d'anticorps appelé dès lors anticorps monoclonal. L'évolution des techniques de génie génétique a ensuite permis de limiter les problèmes d'immunogénicité liés à l'emploi des AcM. Nous sommes passés en une trentaine d'années d'AcM murins immunogènes, peu efficaces pour le recrutement des effecteurs immunitaires et ayant une $\frac{1}{2}$ vie courte à des AcM humanisés voire intégralement humains présentant les caractéristiques inverses (cf. **figure 13**) [93], [94].

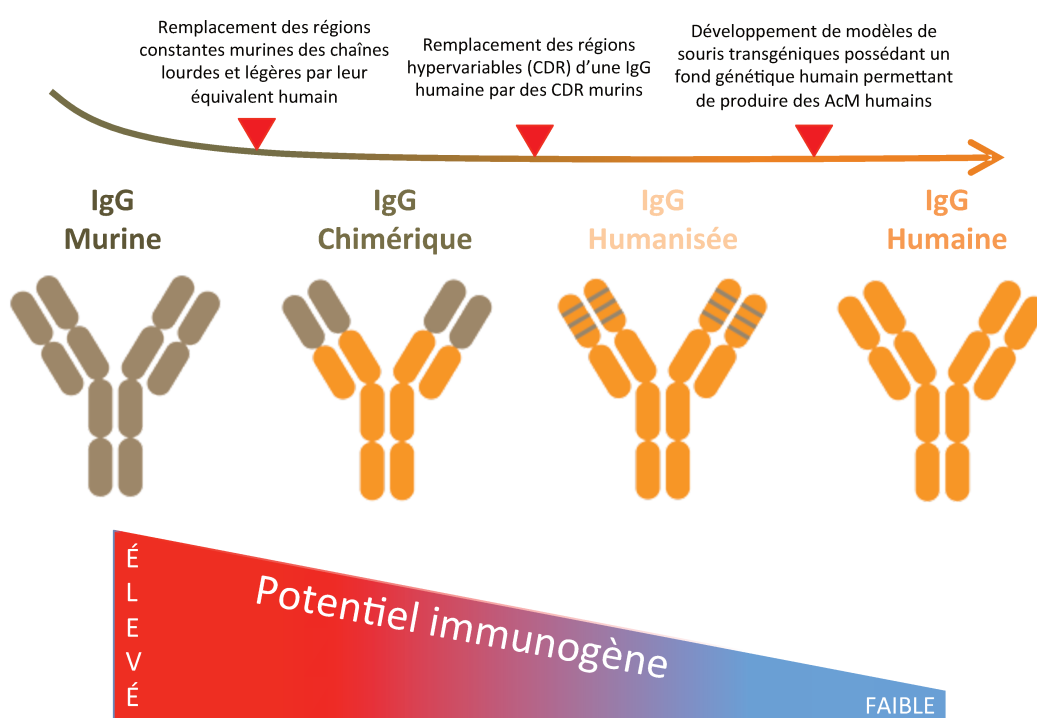


Figure 13 | Evolution technologique des anticorps monoclonaux

Evolution des AcM, des anticorps murins (domaines représentés en marron) aux anticorps humains (domaines représentés en orange).

Rapidement, il est apparu que ces molécules pouvaient non seulement cibler les cellules tumorales mais aussi participer à leur élimination. Les AcM utilisés actuellement en clinique présentent différents mécanismes d'action aboutissant à l'élimination des cellules tumorales.

b-1- Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux

Les AcM utilisés en oncologie peuvent exercer des effets antitumoraux qui aboutissent à la mort des cellules tumorales. Ces effets reposent sur des mécanismes parfois très différents, dépendants de la molécule ciblée et des caractéristiques intrinsèques de l'AcM. Plusieurs modalités d'action ont pu être documentées (cf. **figure 14**) [95].

* La cytotoxicité directe : la fixation de l'AcM sur la cellule cancéreuse induit un effet cytotoxique direct. Différents processus peuvent être mis en jeu :

Effet agoniste : les AcM agonistes ciblent généralement des récepteurs membranaires et entraînent la cellule vers des mécanismes de mort cellulaire. C'est le cas du rituximab dont la fixation induit notamment une mort cellulaire par apoptose [96].

Effet antagoniste : les AcM antagonistes ciblent généralement des récepteurs membranaires et bloquent l'activation du récepteur cible. C'est le cas du trastuzumab qui cible le récepteur HER2 (Human epidermal growth factor receptor-2). La liaison de l'anticorps sur ce récepteur inhibe l'activation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire [97].

* Cytotoxicité dépendante du système immunitaire : cet effet concerne les AcM capables de recruter des effecteurs immunitaires. La partie Fc va jouer un rôle important puisqu'elle est responsable de ce recrutement. Il peut s'agir de la fraction C1q du complément qui entraîne une lyse cellulaire dépendante du complément ou de cellules effectrices exprimant le récepteur FcγRIIA/CD16 telles que les cellules natural killer (NK) et les macrophages. Ces cellules effectrices induisent des phénomènes d'ADCC ou d'ADCP dans le cas des macrophages. Parmi les anticorps capables de recruter ces effecteurs immunitaires, on retrouve le rituximab et le trastuzumab [96], [97].

* Action sur les vaisseaux et les phénomènes immunosuppresseurs liés au microenvironnement : certains AcM peuvent exercer leur action anti-tumorale en agissant au niveau du microenvironnement. On retrouve dans cette catégorie les AcM inhibant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF – Vascular endothelial growth factor) et ses récepteurs, les AcM inhibant les cellules T régulatrices et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC - Myeloid derived suppressive cells) ainsi que les AcM inhibant les cytokines immunosuppressives. Un anticorps représentatif de cette catégorie est le bevacizumab, un AcM dirigé contre le VEGF [98]. Sa liaison au VEGF réduit la disponibilité de ce facteur de croissance entraînant une diminution du phénomène de néoangiogenèse.

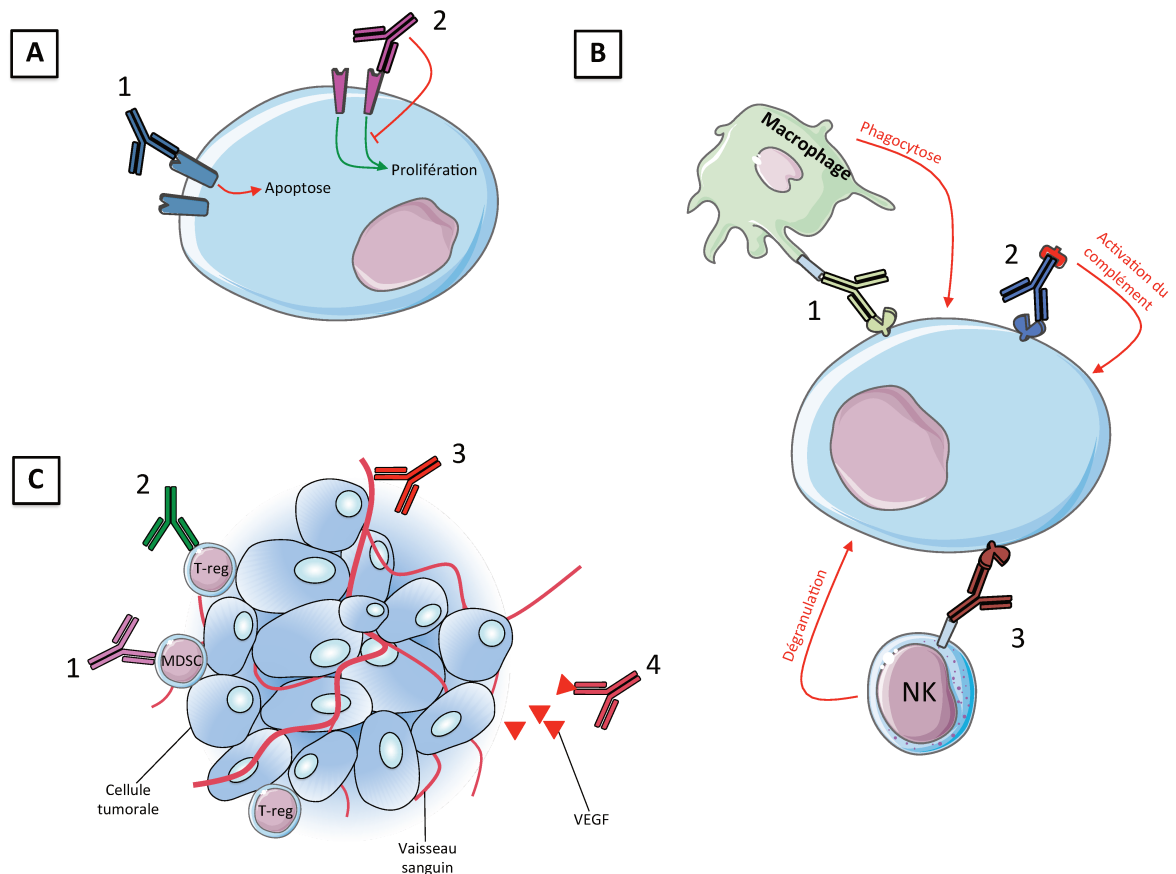


Figure 14 | Diversité des effets anti-tumoraux des anticorps monoclonaux

Les effets anti-tumoraux directs des AcM peuvent s'exercer au travers de différents mécanismes A). 1-Effet agoniste : la liaison de l'AcM à sa cible active des voies de signalisation menant à l'apoptose. 2-Effet antagoniste : la liaison de l'AcM à sa cible inhibe des voies de signalisation impliquées dans la prolifération et favorise l'entrée en apoptose de la cellule. B) Les AcM thérapeutiques peuvent également induire des effets anti-tumoraux via le recrutement d'effecteurs immunitaires. 1-Recrutement de macrophages et induction d'ADCP. 2-Activation du complément (CDC). 3-Recrutement de cellules NK (ADCC). C) Les AcM thérapeutiques peuvent également exercer des effets anti-tumoraux en agissant sur le microenvironnement tumoral. 1-2-Déplétion de cellules immunitaires immunosuppressives comme les LT régulateurs ou les MDSC. 3-Ciblage des récepteurs au VEGF des cellules endothéliales. 4-Capture du VEGF

Cette capacité des AcM à exercer des effets anti-tumoraux reste cependant négligeable dans le cas d'une utilisation pour l'imagerie. Plusieurs jours post-injection peuvent en effet être nécessaires pour obtenir un bon rapport signal/bruit de fond. L'activité biologique effectrice portée par les AcM peut alors se révéler, dans ce contexte, non souhaitable ou inutile sans toutefois représenter un frein à leur utilisation. Les quantités d'AcM injectées au patient dans le cadre d'une acquisition d'imagerie sont en effet souvent trop faibles pour induire un effet anti-tumoral majeur.

b-2- Anticorps conjugués pour l'imagerie

Les AcM peuvent également être utilisés comme vecteurs pour la délivrance d'agents thérapeutiques variés tels que des drogues cytotoxiques, des toxines ou des cytokines [99],[100]. Ces anticorps « armés » vont composer la classe des immunoconjugués (IC). Le concept est simple : conjuguer la sélectivité d'un AcM à la puissance d'un composé hautement cytotoxique afin de libérer ce dernier spécifiquement au sein de la tumeur, tout en limitant son impact sur les tissus sains. Cette approche, très répandue pour la thérapie des cancers, est également utilisée en imagerie nucléaire.

Dès le début des années 1970, plusieurs équipes ont étudié la faisabilité de l'utilisation d'anticorps radiomarqués pour localiser par imagerie des marqueurs tumoraux dans des modèles animaux [101], [102]. Avec les avancées réalisées dans le domaine des anticorps monoclonaux et le développement d'appareils d'imagerie gamma, des recherches équivalentes ont été conduites chez l'Homme [103]. Différents anticorps ont ainsi été développés pour l'immunoscintigraphie permettant de visualiser, de manière non invasive, des foyers tumoraux. On trouve actuellement sur le marché 5 représentants de cette classe d'immunoconjugués utilisés en oncologie (cf. **tableau 2**).

Tableau 2 | Anticorps utilisés en imagerie nucléaire pour l'oncologie approuvés par la FDA ou l'EMA

Désignation internationale	Format d'anticorps	Radionucléide associé	Antigène cible	Type de tumeurs ciblées
Capromab pendetide (ProstaScint)	IgG1 murine	¹¹¹ In	PSMA	Carcinome de la prostate
Votumumab (HumasPECT)	IgG3 humaine	¹¹¹ In	CTAA16.88	Cancers colorectaux, ovariens et du sein.
Ibritumomab tiuxetan (Zevalin)	IgG1 murine	¹¹¹ In	CD20	Lymphomes non hodgkiniens
Tositumomab (Bexxar)	IgG2a murine	¹¹¹ In	CD20	Lymphomes non hodgkiniens
Trastuzumab	IgG1 humain	¹¹¹ In	HER2	Cancer du sein

FDA : Federal Drug Administration ; EMA : European Medicines Agency ; PSMA : Prostate specific membrane antigen. D'après Duranti et al, 2019 [104].

Le développement plus récent des appareils de TEP a conduit de nombreux groupes à s'intéresser au marquage d'anticorps avec des radioéléments émetteurs β^+ . Ces dernières années, l'utilisation d'AcM radiomarqués pour l'imagerie TEP (appelée dans ce contexte immuno-TEP) a émergé comme une approche diagnostique pertinente malgré la concurrence de la TEP métabolique « classique » basée sur l'utilisation du ¹⁸F-FDG [105]. Plusieurs études cliniques ont permis de mettre en évidence la potentialité de cette technique notamment via l'utilisation d'anticorps radiomarqués à l'iode 124 (¹²⁴I) ou au zirconium 89 (⁸⁹Zr). L'utilisation d'un AcM chimérique cG250 anti-carbonic anhydrase-IX marqué à l'iode 124 a par exemple été

évaluée chez des patients présentant des carcinomes rénaux et a montré son efficacité en termes de sensibilité et de spécificité [106]. Ces résultats encourageants permettent d'envisager l'immunoTEP comme une alternative à la biopsie pour ce genre d'indication. Par ailleurs, une autre étude clinique a montré la faisabilité de l'immuno-TEP avec une IgG anti-CD44v6 radiomarquée au ^{89}Zr chez 20 patients atteints de tumeurs ORL [107]. Les résultats obtenus se sont révélés très encourageants puisqu'une spécificité de 100% mais surtout une sensibilité supérieure à la TEP au ^{18}F -FDG (85% versus 62%) ont été obtenus.

Le développement de l'immunoTEP représente donc une avancée majeure en termes de diagnostic pour la détection de tumeurs avant traitement ainsi que pour le suivi de patients tout au long d'un processus thérapeutique. La cartographie corps entier de l'expression des marqueurs tumoraux permise par cette technique peut également permettre la sélection de patients éligibles à un traitement d'immunothérapie [108].

Ces techniques d'imagerie basées sur l'utilisation de radionucléides vectorisés par des AcM présentent cependant des limites. Une des limitations majeures est liée aux anticorps eux-mêmes, qui du fait de leurs caractéristiques intrinsèques, vont présenter des propriétés pharmacocinétiques non optimales.

c-Les limitations des anticorps

Du fait de leur rôle clé dans le système immunitaire et en raison de leurs nombreuses applications biomédicales, les anticorps sont les protéines d'affinité les plus étudiées et les mieux caractérisées. Leur utilisation peut cependant présenter certaines limites [94].

Un inconvénient majeur relatif à l'usage des AcM en oncologie est leur faible capacité de pénétration des tumeurs solides. Ces tumeurs sont en effet caractérisées par une néovascularisation tortueuse et hétérogène, une pression interstitielle importante et une viscosité élevée du sang. Ces particularités des tissus cancéreux ainsi que le poids moléculaire important des AcM (environ 150 kDa) sont un frein à une occupation optimale des sites antigéniques tumoraux [109].

La pharmacocinétique des AcM peut également être défavorable pour certaines applications. Ces protéines ont une demi-vie sérique conséquente (21 jours pour les IgG) du fait de l'absence d'élimination rénale et du recyclage permis par les récepteurs FcRn (Neo-natal Fc receptor) [110]. La persistance des AcM dans la circulation peut être une limitation pour certaines modalités d'imagerie nécessitant une clairance sanguine rapide afin d'obtenir un contraste suffisant pour l'analyse. Le même problème peut se poser pour la RIT (Radio immuno-thérapie) pour laquelle cette rétention dans le compartiment sanguin peut aboutir à l'irradiation de tissus sains.

Une autre limitation est d'ordre économique. Les coûts de développement d'un AcM pour la clinique sont en effet conséquents. Les étapes de production peuvent également se révéler coûteuses. Les AcM sont des protéines complexes, multimériques, présentant de nombreux ponts disulfures ainsi que des modifications post-traductionnelles comme des glycosylations. La production en laboratoire d'AcM fonctionnels nécessite l'utilisation de systèmes d'expression eucaryotes coûteux et sophistiqués. Les quantités importantes d'AcM requises dans le cadre thérapeutique peuvent également constituer un frein économique à une utilisation généralisée de ces molécules. Dans le cas du daratumumab par exemple, la dose recommandée est de 16 mg par kg de masse corporelle soit plus d'un gramme d'anticorps pour un patient de 70 kg. Conjuguée à une fréquence d'injection hebdomadaire en début de traitement puis mensuelle, la quantité d'anticorps nécessaire pour ce genre de thérapie va donc être non négligeable [111].

Afin de surmonter ces limitations, de nombreux groupes de recherche se sont intéressés au développement d'alternatives à l'utilisation d'AcM entiers. L'une des premières alternatives proposées a été l'utilisation de fragments d'anticorps.

B-Les fragments d'anticorps

Les fragments d'anticorps, bien qu'étant généralement dépourvus de leur fonction d'effecteur, présentent une alternative intéressante aux anticorps entiers notamment du fait de leur plus petite taille favorisant une meilleure pénétration tissulaire et une clairance sanguine plus rapide [112]. Différents types de fragments ont été produits et ont fait l'objet de recherches (cf. **figure 15**) [113].

Les premiers fragments générés ont été obtenus par digestion protéolytique d'AcM entiers permettant l'obtention de Fab/Fab' (55 kDa) et de F(ab')₂ (110 kDa). Ces fragments conservent les propriétés de ciblage de l'anticorps dont ils sont issus tout en présentant une pharmacocinétique différente caractérisée par une clairance sanguine plus rapide notamment pour le fragment Fab/Fab', éliminé par filtration glomérulaire [114], [115]. Différents fragments d'anticorps ont ainsi été développés pour le diagnostic (cf. **tableau 3**). L'un des premiers représentants de cette famille est l'arcitumomab, un fragment Fab' qui a été couplé au ^{99m}Tc pour des applications d'imagerie chez des patients atteints de cancers colorectaux [116]. Néanmoins, un inconvénient de ce genre de format est sa monovalence (le Fab' possède un seul paratope) qui va réduire son avidité et donc sa fixation sur les antigènes tumoraux [117]. La production de ce genre de vecteur par voie enzymatique nécessite, de plus, des quantités importantes d'AcM, ce qui peut constituer un frein à leur utilisation.

L'essor de la biologie moléculaire combiné aux avancées dans le domaine de l'ingénierie des protéines ont ensuite permis le développement de nouveaux types de fragments de taille, de spécificité et de valence variable.

Tableau 3 | Fragments d'anticorps utilisés en imagerie nucléaire pour l'oncologie approuvés par la FDA ou l'EMA

Désignation internationale	Format d'anticorps	Radionucléide associé	Antigène cible	Type de tumeurs ciblées
Arcitumomab (CEA-Scan)*	Fab' (IgG1 murine)	^{99m} Tc	CEA	Carcinomes colorectaux et ovariens
Nofetumomab merpentan (Verluma)	Fab (IgG2ab murine)	^{99m} Tc	Glycoprotéine de 40 kDa	Carcinomes pulmonaires à petites cellules et non à petites cellules
Bectumomab (LymphoScan)	Fab' (IgG2a murine)	^{99m} Tc	CD22	Carcinomes pulmonaires à petites cellules et non à petites cellules
Igovomab (Indimacis-125)	F(ab') ₂ (IgG1 murine)	¹¹¹ In	CA125	Cancers ovariens

*FDA: Federal drug administration ; EMA: European medicines agency ; PSMA: Prostate specific membrane antigen. *AMM du CEA-Scan retirée sur demande de l'ayant droit pour raisons commerciales. Adapté d'après Duranti et al, 2019 [104].*

Poursuivant cette quête du vecteur idéal, différents groupes se sont intéressés au fragment Fv des anticorps [118], [119]. Le fragment Fv est la plus petite sous-unité issue d'un anticorps capable d'exercer la fonction de reconnaissance antigénique. Il est constitué des régions N-terminales des domaines V_H et V_L des anticorps. Des stratégies de bio-ingénierie ont permis d'isoler ces régions et de les relier entre elles via un linker polypeptidique assurant leur cohésion. Cette protéine de fusion, appelée scFv (single chain Fv), possède un poids moléculaire de 28 kDa situé en dessous du seuil de clairance rénale. L'utilisation de ce type de vecteur pour l'imagerie *in vivo* en oncologie n'a cependant jamais dépassé le stade de la recherche préclinique du fait de ses caractéristiques pharmacocinétiques non optimales (notamment une demi-vie plasmatique inférieure à 2 heures associée à une faible rétention tumorale) [113].

Différentes stratégies ont donc été explorées afin d'obtenir des fragments d'anticorps aux propriétés adaptées pour l'imagerie *in vivo*. Beaucoup d'entre elles se sont basées sur l'utilisation du format scFv multimérisé afin de former des homomultimères ou des hétéromultimères présentant une valence accrue ou une multispécificité (diabody, triabody, tetrabody) [120]. Ces multimères de scFv vont logiquement présenter un poids moléculaire supérieur à celui du monomère : 50 kDa pour le diabody, 75 kDa pour le triabody et 100 kDa pour le tetrabody. La vitesse de clairance intermédiaire ainsi que la plus grande avidité de ces composés leur confère un avantage pour les applications d'imagerie *in vivo* [121], [122].

D'autres protéines chimériques ont également été développées par fusion de scFv avec des domaines constants d'IgG. On compte notamment dans cette famille le scFv-CH3 également appelé minibody qui est formé par l'association de deux scFv avec un domaine CH3 d'IgG humaine via une région charnière. Ce type de vecteur présente une pharmacocinétique plus

favorable que celle d'un anticorps entier avec une clairance sanguine plus courte combinée à un adressage tumoral plus rapide rendant son utilisation pertinente pour l'imagerie in vivo [123], [124].

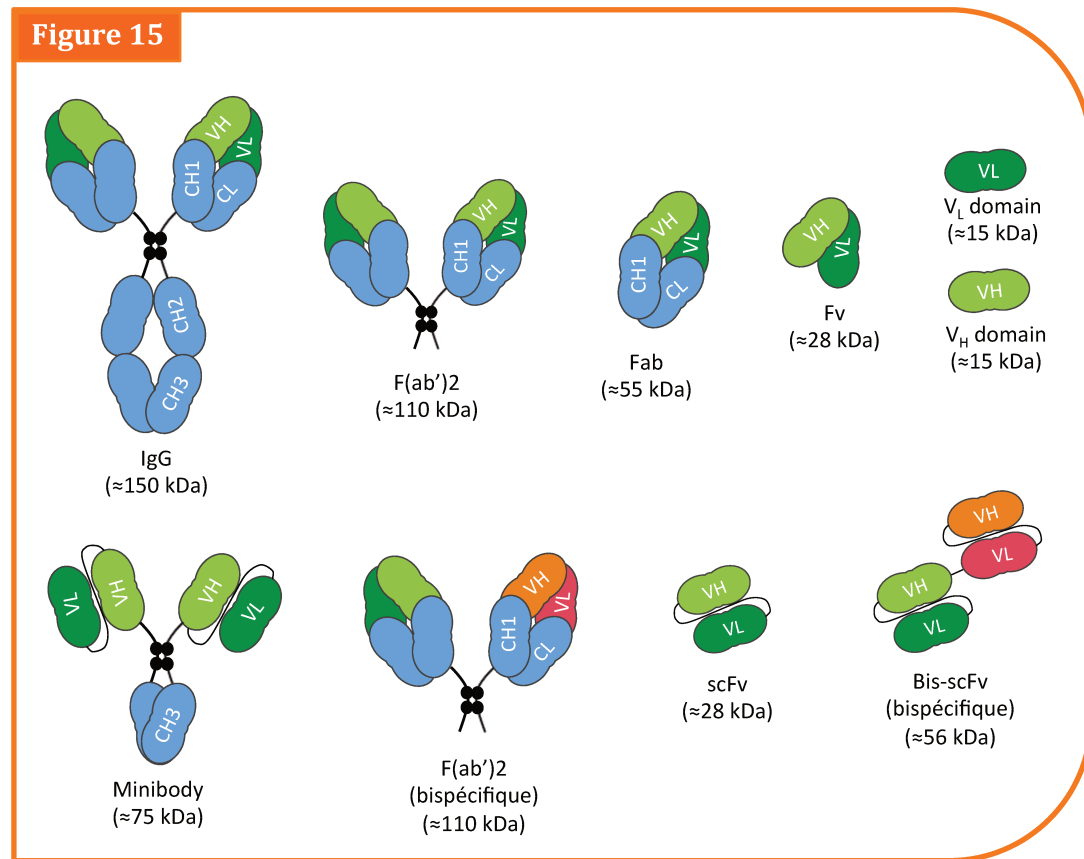


Figure 15 | Représentation de différents formats d'anticorps.

Sont représentés la structure d'une IgG entière ainsi que de nombreux fragments dérivés de cette structure tels que les F(ab')₂, les Fab, les Fv, les simples domaines V_H et V_L, les scFv ainsi que certains équivalents multimériques comme les Minibodies, les Bis-scFv et les F(ab')₂ bispécifiques. Les poids moléculaires donnés sont approximatifs. Modifié d'après Holliger et al, 2005 [113].

C-Les Nanobodies

Les Nanobodies sont une nouvelle classe de molécules d'affinité représentant une alternative à l'utilisation d'immunoglobulines humaines. Ces protéines sont issues de la découverte fortuite d'une nouvelle classe d'anticorps, coexistant avec les immunoglobulines conventionnelles, dans le sérum des camélidés. L'intérêt de cette découverte ne repose pas tant sur la taille de ces anticorps, plus petite que celle de leur équivalent « classique », mais dans le fait qu'ils présentent un paratope constitué uniquement d'un domaine variable (heavy chain only variable domain, V_HH) formé par une chaîne peptidique unique. La partie constante est quant à elle constituée de deux domaines (C_H2 C_H3) contre trois (C_H1 C_H2 C_H3) pour les IgG classiques (cf. **figure 16**). Malgré ces particularités, ces anticorps nommés HCABs (heavy-chain antibodies) conservent une

diversité de répertoire et des propriétés d'affinité semblables à celles des anticorps conventionnels [125].

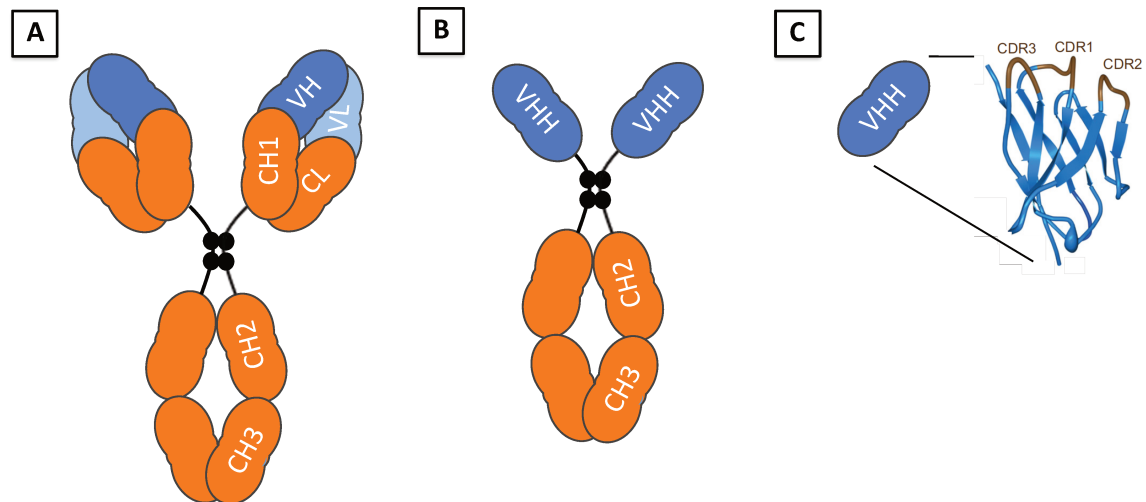


Figure 16 | Immunoglobuline G conventionnelle, IgG simple chaîne lourde de camélidé (HcAb) et Nanobody. A) IgG conventionnelle composée de deux chaînes lourdes avec 3 domaines constants (CH, orange) et un domaine variable (VH, bleu foncé) associées à 2 chaînes légères avec un domaine constant (CL, orange) et un domaine variable (VL, bleu clair). B) IgG simple chaîne lourde de camélidé composée de deux chaînes lourdes avec 2 domaines constants (CH, orange) et un domaine variable (VHH, bleu foncé). C) Fragment VHH ou Nanobody

L'obtention de domaines V_HH recombinants issus d'HCAbs a permis la création d'une nouvelle classe de protéines d'affinité : les Nanobodies (Nb) ou single domain antibody (sdAb). Des Nanobodies spécifiques de cibles particulières peuvent en effet être obtenus après immunisation d'un camélidé, récupération des cellules du sang périphérique et sélection par phage display. La structure d'un Nb comporte environ 110 acides aminés pour un poids moléculaire de 13 à 15 kDa. Ces acides aminés sont agencés en deux ensembles de quatre et cinq feuillets β antiparallèles reliés entre eux par des boucles et un pont disulfure. L'organisation structurale des Nb est très semblable à celle des V_H d'IgG classiques avec quatre régions framework conservées qui entourent les trois régions hypervariables, ou « complementarity-determining region » (CDR), conférant sa capacité de reconnaissance à l'anticorps. Ces trois CDR sont situées dans les boucles reliant les feuillets β et regroupées sur une face de la molécule du côté N terminale [126].

Les Nb présentent différents avantages faisant de cette classe de molécules d'affinité des outils pertinents pour le ciblage antigénique en thérapie ou en imagerie. La production est notamment relativement simple du fait de la possibilité d'utiliser des systèmes procaryotes tels *E.coli*. De plus, leur petite taille leur confère des capacités de pénétration tissulaire bien meilleures que celles des scFv ou des AcM classiques, ce qui leur permet d'accéder à des antigènes jusque-là hors d'atteinte. La structure de leur paratope favorise également la reconnaissance d'épitopes concaves, tels les sillons enzymatiques, plus difficilement accessibles

aux anticorps conventionnels. Leur relative simplicité structurale est aussi un atout puisqu'elle favorise leur déclinaison sous forme de multimères homo ou hétérospécifiques [126], [127]. Les Nb sont aussi très stables et capables de résister à des conditions physicochimiques extrêmes ce qui peut favoriser certaines applications de couplage du Nb avec un radionucléide ou d'autres composés [128]. Enfin, leur ressemblance avec les domaines V_H limite leur immunogénicité, ce qui facilite leur utilisation en santé humaine [126].

Ces différentes caractéristiques des Nb leur confèrent des propriétés pharmacocinétiques particulièrement intéressantes pour l'imagerie nucléaire [129]. Différentes études précliniques basées sur l'utilisation de modèles murins xénogreffés ont pu démontrer la pertinence de l'utilisation de Nb pour le ciblage des cellules tumorales [130]–[132]. De nombreux travaux ont notamment été menés autour de HER-2, une protéine surexprimée dans les cancers du sein, gastriques et ovariens [133], [134]. Un Nb anti-HER2 a notamment été évalué dans une étude d'imagerie de phase I chez des patients atteints de cancers du sein [135]. Le vecteur s'est avéré sûr, avec une clairance rapide résultant en une demi-vie courte d'environ une heure. Les données de biodistribution se sont avérées favorables. On constate en effet une accumulation maximale dans les organes d'élimination comme les reins ou le foie mais un très faible bruit de fond dans les autres organes susceptibles d'abriter un foyer tumoral primaire ou secondaire. L'accumulation du traceur dans les métastases HER-2 positives est importante et permet de les discriminer facilement du tissu environnant. Une étude de phase II devrait venir compléter ces informations.

Ces différents travaux et notamment les résultats de l'étude clinique de phase I suggèrent donc que les Nb sont des outils tout à fait pertinents dans le cadre de l'imagerie nucléaire en oncologie.

D-Les alternatives aux anticorps

Le système immunitaire n'est pas la seule source de molécules présentant des propriétés de reconnaissance protéique spécifique. Au cours des trente dernières années, le développement des banques combinatoires ainsi que des techniques de sélection *in vitro* ont donné aux chercheurs la possibilité d'isoler de nouvelles molécules d'affinité tout en s'affranchissant des protocoles d'immunisation et de création d'hybridomes indispensables à la production d'anticorps. Ces progrès majeurs ont permis l'émergence de nouvelles charpentes protéiques ou « scaffolds » possédant des capacités de liaison à une cible comparables à celles de la partie variable des anticorps [136]. Le but recherché est de combiner les propriétés d'affinité des anticorps avec une charpente protéique plus simple, stable et permettant l'utilisation de moyens de production plus aisés et moins coûteux. De manière générale, les charpentes protéiques candidates seront préférentiellement de petite taille et composées d'une simple chaîne polypeptidique. L'absence de résidus cystéines dans la séquence sera aussi un critère de choix

rendant la molécule utilisable pour des applications intracellulaires et autorisant des protocoles de marquage spécifique par ajout d'un résidu cystéine unique. De nombreuses protéines sont en théorie susceptibles de servir de plate-forme, c'est-à-dire qu'elles posséderaient un squelette polypeptidique pouvant être modifié sans que leur intégrité structurale globale ni leur comportement physicochimique ne soient altérés. Actuellement, on dénombre plus de 50 types différents de protéines d'affinité non issues des immunoglobulines qui ont été décrites comme alternatives aux anticorps [138], [139]. Trois de ces charpentes protéiques, les Affibodies, les DARPins et les α Reprs sont décrites à titre d'exemple dans les paragraphes suivants.

α -Diversité et sélection

En matière d'ingénierie des protéines, deux grands concepts vont s'opposer ou au contraire se compléter : la conception rationnelle et l'évolution dirigée [140], [141] (cf. **figure 17**). La conception rationnelle est basée sur une connaissance approfondie de la structure et de la fonction d'une protéine. Le but est de faire adopter par la protéine choisie une caractéristique désirée en modifiant spécifiquement certains résidus par mutagenèse dirigée. Cependant, les protéines sont des macromolécules complexes et de telles approches se révèlent souvent non satisfaisantes du fait de notre connaissance limitée des relations entre la séquence primaire et son repliement qui est support de sa fonction. Une alternative à la conception rationnelle est de mimer l'évolution naturelle en laboratoire de manière accélérée. Dans cette approche d'évolution dirigée, un gène codant pour une protéine donnée est soumis à de nombreux cycles de mutations aléatoires générant de nombreux variants. Des étapes de sélection et de criblage permettent ensuite d'isoler des variants d'intérêt pour l'application souhaitée. Une des limitations de cette technique est le nombre très élevé de variants générés pour un très faible nombre de variants présentant la caractéristique recherchée. La phase de criblage peut donc être longue et coûteuse.

Les limites inhérentes à ces deux grands concepts ont poussé les chercheurs à développer des approches combinées « semi-rationnelles » [142]. Dans ces approches, les étapes de mutagenèse portent non pas sur l'intégralité de la séquence mais sur certaines régions connues dont la modification est plus susceptible d'apporter un avantage, telle que la région de reconnaissance du ligand naturel. Différentes méthodes ont été développées autour de cette approche. Elles sont basées sur la création de banques par randomisation de positions peptidiques particulières intervenant généralement dans les interactions protéine-protéine. Des approches de sélection permettent ensuite l'enrichissement de la banque en séquences d'intérêt codant pour des protéines possédant la propriété souhaitée.

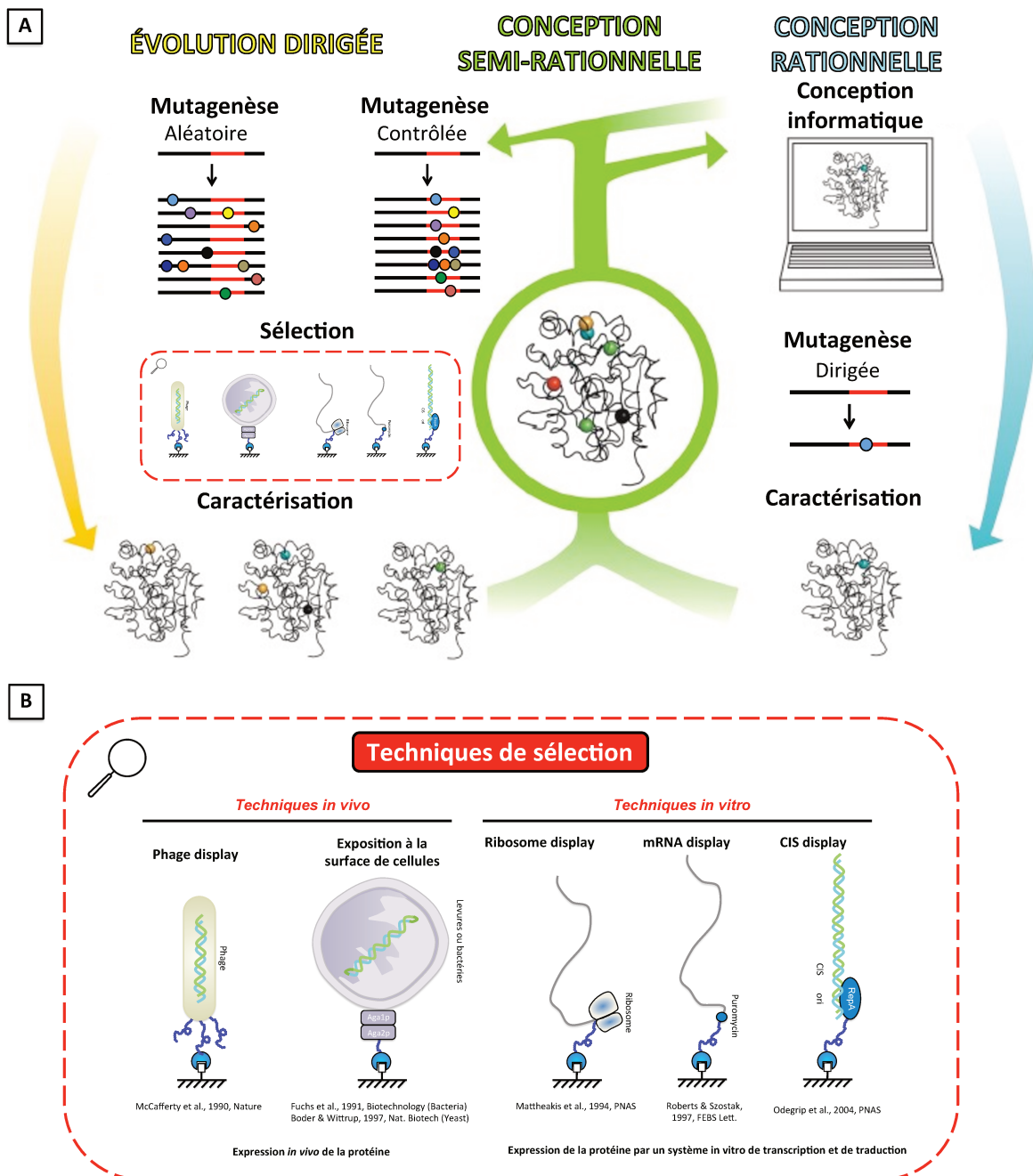


Figure 17 | Approches d'ingénierie des protéines et techniques de sélection

A) Représentation des trois grandes approches utilisées en ingénierie des protéines : l'évolution dirigée, la conception semi-rationnelle et la conception rationnelle. B) Représentation des principales techniques de sélection utilisées en ingénierie des protéines : le phage display [145], l'exposition à la surface des cellules [143], [144], le ribosome display [146], le mRNA display [240] et le CIS display [241].

De manière générale les approches d'évolution dirigée des protéines, qu'elles soient semi-rationnelles ou non, comportent différentes étapes :

- Une séquence ADN codant pour une protéine que l'on souhaite modifier est choisie. Cet ADN subit des processus de mutation aléatoire portant sur toute la séquence ou sur certaines positions d'intérêt. Diverses techniques de mutagenèse peuvent être utilisées. Les plus couramment employées sont des techniques de mutagenèse aléatoire basées sur l'utilisation

d'agents chimiques (mutagénèse chimique), sur les erreurs induites par la Taq polymérase (error prone PCR, error prone RCA - Rolling circle amplification -), ou sur l'introduction de codons dégénérés à l'aide d'oligonucléotides (mutagénèse par cassette combinatoire). Les séquences obtenues, codant pour de nombreux variants de la protéine originelle constituent une banque.

- La banque obtenue est clonée dans un vecteur d'expression. Selon la méthode de sélection employée, les protéines issues des séquences de la banque peuvent être exprimées à la surface de cellules [143], [144], de phages [145], ou en complexe avec des ribosomes [146]. Ces techniques de sélection permettent d'isoler les variants protéiques présentant la caractéristique recherchée tout en donnant accès à leur séquence nucléotidique, puisqu'elles permettent de maintenir un lien physique entre génotype et phénotype.

- La ou les séquences sélectionnées peuvent être amplifiées et subir de nouvelles étapes de mutagénèse ou de sélection si l'on juge nécessaire d'améliorer certaines caractéristiques de la protéine.

b-Exemples de charpentes alternatives aux anticorps

b-1-Les Affibodies

Les Affibodies sont des charpentes alternatives dérivées du domaine B de la protéine A de *Staphylococcus aureus* (cf. **figure 18**). Ce domaine B est en effet un candidat de choix pour l'élaboration de nouvelles charpentes puisqu'il possède une affinité naturelle pour le domaine Fc des IgG en plus d'une légère affinité pour les Fab.

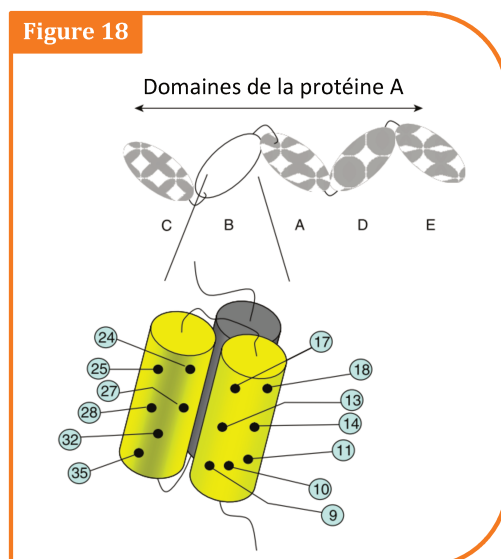


Figure 18 | Origine et structure des Affibodies. Le domaine B de la protéine A a été modifié afin d'augmenter sa stabilité. Treize positions situées sur les hélices alpha 1 et 2 sont ensuite randomisées afin de créer une bibliothèque de variants. Les Affibodies d'intérêt sont sélectionnés par phage display. D'après Tolmachev et al, 2007 [242].

Il s'agit d'un peptide de 58 acides aminés ne comportant pas de résidu cystéine, organisé en trois hélices α formant une structure compacte. Afin d'améliorer sa stabilité chimique et thermique, des mutations ont été réalisées à certaines positions clés de la séquence polypeptidique donnant naissance à un variant nommé domaine Z [147]. Ce domaine Z conserve son affinité pour la région Fc des anticorps mais perd la légère affinité du domaine B originel pour les fragments Fab. La construction des molécules d'Affibodies est basée sur l'utilisation du domaine Z pour lequel 13 positions peptidiques situées au niveau des hélices 1 et 2 et intervenant dans la liaison au Fc vont être mutées aléatoirement [148]. La grande diversité des séquences générées

nécessite ensuite l'emploi de techniques d'exposition afin de sélectionner des variants d'intérêts [149], [150]. Un des grands avantages de ces protéines est qu'il est possible de les produire efficacement par expression recombinante dans des bactéries, des cellules eucaryotes ou par synthèse chimique. Ces molécules montrent de plus une très grande stabilité dans des conditions extrêmes de température ou de pH malgré leur faible poids moléculaire (environ 6 kDa) [151].

De nombreux Affibodies ont été générés permettant le ciblage spécifique de différentes protéines (insuline, fibrinogène, transferrine, TNF- α ...) avec des affinités allant du μ M au pM [152]. La pertinence de l'utilisation des Affibodies a été démontrée dans de nombreuses applications comme la bioséparation par affinité, l'inhibition de liaisons protéine-protéine, la détermination de structures, la purification à l'aide d'étiquettes et le ciblage de tissus tumoraux [153].

De nombreuses études précliniques ont également souligné la pertinence de l'utilisation des Affibodies pour le diagnostic [154]–[156]. L' Affibody (Z_{HER2:342}) dirigé contre le récepteur HER-2 a ainsi été directement comparé à un AcM équivalent, le Trastuzumab (Herceptin®), pour l'imagerie de tumeurs HER2 positives dans un modèle murin de xénogreffe [157]. Dans ce modèle, les images TEP obtenues avec l'Affibody présentaient un meilleur contraste que celles obtenues avec l'AcM tout en nécessitant une durée d'attente moindre entre l'injection et l'acquisition. L'étude de biodistribution a permis d'expliquer ces résultats par un ratio tumeur/organe favorable à l'Affibody en relation avec la clairance plus rapide de cette charpente dans le compartiment sanguin et dans les organes sains.

En clinique, un Affibody anti-HER-2 radiomarcué au ⁶⁸Ga a été testé pour le phénotypage métastatique de patients présentant des cancers du sein [158]. Les résultats obtenus ont permis de valider l'utilisation de ce genre de charpente en imagerie TEP tout en soulignant son rôle théranostique.

b-2-Les protéines d'affinité artificielle à motif répété

La classe des protéines d'affinité artificielle à motifs répétés est composée de différents membres dont la structure repose sur l'agencement de séquences protéiques homologues agencées entre elles selon un nombre de répétitions variable. Afin de générer ces nouvelles ossatures peptidiques, les chercheurs se sont inspirés de motifs répétés retrouvés dans différents types de protéines et généralement impliquées dans des phénomènes d'interactions protéine-protéine. On peut citer parmi ces motifs les répétitions ankyrines, les tétratricopeptides, les leucine rich repeats, les armadillo repeats ou bien les HEAT repeats [159]. Les paragraphes suivants se proposent de revenir sur deux exemples de protéines d'affinité artificielles à motifs répétés : les DARpins et les α Reps.

b-2.1 Les DARPins

Les DARPins (Designed Ankyrin Repeat Proteins) représentent une classe de charpente protéique artificielle basée sur la structure des protéines à répétition ankyrine (cf. **figure 19**).

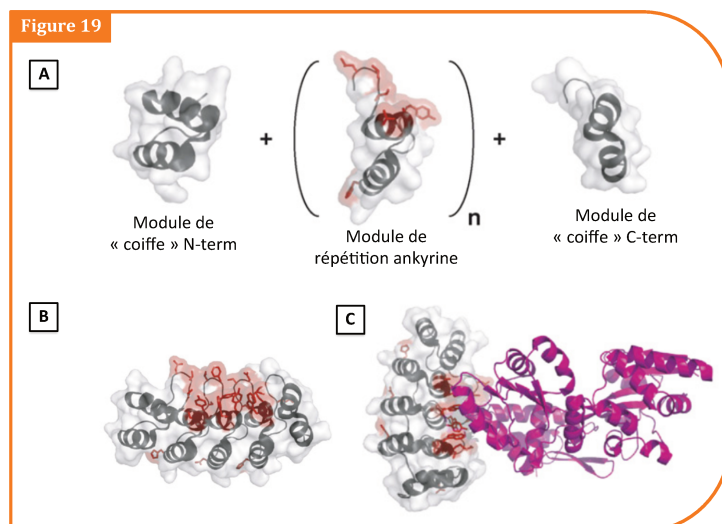


Figure 19 | Structure des DARPins

A) Les DARPins sont composées de deux modules de coiffe (N et C-terminal) entourant un nombre variable (n) de modules de répétition ankyrine. Les 7 positions d'acides aminés randomisées sont indiquées en rouge. Généralement, de deux à quatre modules de RA sont combinées conférant aux DARPins un poids moléculaire compris entre 14 et 21 kDa. B) Représentation tridimensionnelle d'un DARPin composés de 3 modules de RA. Les positions apparaissant en rouge représentent les zones randomisées potentiellement impliquées dans des interactions avec la cible. C) Représentation d'un DARPin en complexe avec sa cible. Adapté d'après Stumpp et al, [162].

Ces dernières sont une classe de macromolécules impliquées dans différentes interactions protéine-protéine à des niveaux très divers dans la cellule (initiation de la transcription, régulation du cycle cellulaire, transport d'ions, transduction de signaux...) [160]. Leur structure est constituée par l'assemblage de plusieurs copies consécutives (la plupart du temps 4 à 6) d'une petite unité structurale nommée répétition ankyrine (RA). Les DARPins sont inspirées de cet agencement et contiennent généralement 2 à 5 RA internes bornées par des modules « de

coiffe » aux extrémités N et C-terminales. Un module de RA consiste en 33 acides aminés s'organisant en un coude β suivi de deux hélices α antiparallèles puis d'une boucle permettant la connexion avec le domaine RA suivant [161]. Le poids moléculaire d'un module étant d'environ 3,5 kDa, la masse totale d'une protéine DARPins est comprise entre 14 et 21 kDa [162]. La génération de DARPins spécifiques d'une cible particulière a été obtenue par randomisation de 7 acides aminés parmi les 33 que compte chaque répétition. Plus récemment une nouvelle génération de DARPins a été développée par l'ajout d'une boucle peptidique et la randomisation de résidus supplémentaires afin de favoriser une meilleure flexibilité et de permettre une extension de la surface d'interaction [163]. Des binders spécifiques de cibles diverses et présentant des affinités allant jusqu'au picomolaire ont été sélectionnés à partir de banques de séquence DARPins par exposition sur ribosomes, phages, ou cellules de levure [164]. Ces protéines d'affinité ont démontré une grande stabilité thermique et chimique. On mesure en effet des températures de fusion comprises entre 66°C pour les DARPins de plus petite taille et 95°C pour les protéines possédant un nombre important de répétitions [162]. La même relation de proportionnalité entre le nombre de répétitions et la stabilité est constatée pour la dénaturation chimique avec des DARPins possédant plus de 3 motifs internes résistants à l'exposition aux

agents chaotropiques et au processus d'ébullition [165]. Un autre avantage de ces protéines d'affinité va résider dans la facilité de leur production en système d'expression procaryote avec des rendements de production pouvant atteindre 200mg de protéine par litre de culture [162]. Les DARPins ont également prouvé leur polyvalence en étant employés avec succès dans différentes applications de biologie. On peut notamment citer l'inhibition d'enzymes, l'immunohistochimie, les biocapteurs et le ciblage tumoral [164].

En oncologie, différents DARPins ont été développés contre des antigènes associés aux tumeurs tels qu'EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), l'EGFR (epidermal growth factor receptor), HER2, VEGF et HGF (hepatocyte growth factor) [164]. Des recherches précliniques autour de l'utilisation de cette charpente pour le diagnostic ont également été menées notamment en ciblant la protéine HER-2 [166], [167]. Comme pour des charpentes de poids moléculaire équivalent, la pharmacocinétique des DARPins est caractérisée par une clairance sanguine rapide liée à l'élimination rénale conjuguée à une bonne pénétration au sein de la masse tumorale. On retrouve donc dans les études de biodistribution des ratios tumeurs/organes ou tumeurs/sang élevés favorisant l'obtention d'images de TEMP (Tomographie par émission monophotonique) ou de TEP présentant un bon contraste [168]. Les DARPins n'ont pas encore fait l'objet d'études cliniques pour le diagnostic.

b-2.2 Les α Reps

Les α Reps (Artificial Alpha-helicoïdal Repeat Proteins) représentent une classe de charpente protéique artificielle basée sur la structure des protéines à répétition HEAT. Ces motifs, formés de 37 à 47 a.a, sont structurés en deux hélices α antiparallèles reliées par une boucle courte et sont retrouvés en agencement répété d'une longueur variable chez de nombreuses protéines aussi bien eucaryotes que procaryotes. Les fonctions biologiques de ces protéines sont diverses mais il apparaît que les répétitions HEAT sont impliquées majoritairement dans des processus d'interactions protéine-protéine [169]. Cette ossature particulière a servi d'inspiration à la création des α Reps. L'identification d'une séquence HEAT consensus ainsi que la détermination de séquences appropriées pour les modules de coiffe situés en N et C terminal des motifs répétés a permis l'émergence de cette nouvelle classe de protéines d'affinité artificielle (cf. **figure 20**). Les premiers travaux réalisés autour de cette ossature ont mis en évidence les caractéristiques favorables des α Reps qui peuvent être exprimées à un taux important en système d'expression procaryote tout en ne présentant pas d'anomalie structurelle consécutive à un mauvais repliement. Ces protéines sont également très stables puisque les températures de fusion mesurées vont de 70°C (structure à un motif répété) à plus de 90°C (structure à 6 motifs répétés) [170]. Des études ultérieures ont permis de démontrer la versatilité de ce vecteur en sélectionnant, par évolution dirigée, différentes

protéines d'intérêt présentant une spécificité pour des cibles de natures diverses telles que l'EGFP (Enhanced green fluorescent protein), la neocarzinostatin-3.24 (une variante mutée de protéine bactérienne), Ebs1 (une protéine retrouvée chez *S.cerevisae*) ou la protéine A3 (une α Rep précédemment générée) [171]. Les valeurs d'affinité mesurées, allant du micromolaire au

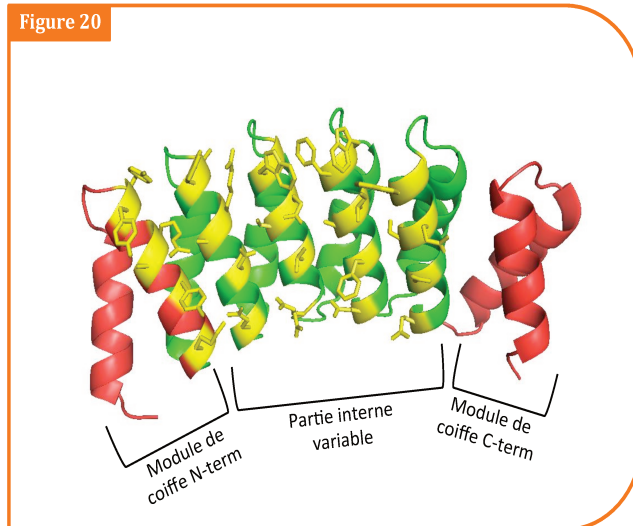


Figure 20 | Structure d'une molécule d' α Rep

Les α Rep sont constituées par la répétition d'un motif interne (en jaune et vert) encadré par deux modules de coiffe situés en N et C terminal (en rouge). Dans cet exemple particulier, la partie interne est composée de 4 motifs α Rep répétés. La position des résidus variables de la partie interne impliqués dans les processus d'interaction est indiquée en jaune.

sous-nanomolaire, ont également renforcé l'intérêt des α Reps comme protéines d'affinité artificielle pouvant être utilisées dans diverses applications de biologie. Plusieurs études sont venues confirmer le potentiel de ces protéines en démontrant la faisabilité de leur utilisation dans différents contextes expérimentaux. On peut notamment citer l'utilisation d' α Rep pour la synthèse d'enzymes artificielles [172], comme ligand spécifique de certaines protéines réfractaires au processus de cristallisation sans partenaire [173] ou pour la morphosynthèse des nanocristaux d'or [174]. Les α Rep ont également

prouvé leur utilité pour la génération de ligands spécifiques de la protéine de nucléocapside GAG constitutive du VIH-1. Les protéines d'affinité générées ont en effet montré un effet négatif significatif sur le cycle de réplication du VIH tout en ciblant des fonctions virales différentes [175]. Des α Rep anti-GFP ont également été générées et utilisées avec succès dans des expériences de pull-down ou de tracking cellulaire [176].

Du développement des AcM à la mise au point de nouvelles charpentes protéiques, le champ des possibles s'est considérablement élargi et de nombreuses approches sont maintenant envisageables pour le ciblage moléculaire en cancérologie (cf. **figure 21**). Les anticorps ne possèdent pas les caractéristiques les plus optimales pour l'imagerie mais restent une référence du fait de l'utilisation d'AcM équivalents en thérapie qui présentent une spécificité et une affinité identiques pour la cible. Les fragments d'anticorps comme les F(ab')₂ ou les Fab peuvent permettre d'améliorer la vitesse de clairance et la pénétration tumorale mais le temps nécessaire à l'obtention d'un bon contraste reste conséquent (24-48h). Le développement de nouvelles charpentes présentant des propriétés anticorps-mimétiques représente une grande avancée dans le domaine de la vectorisation. De nombreuses études doivent cependant encore être menées afin de valider leur usage en routine clinique.

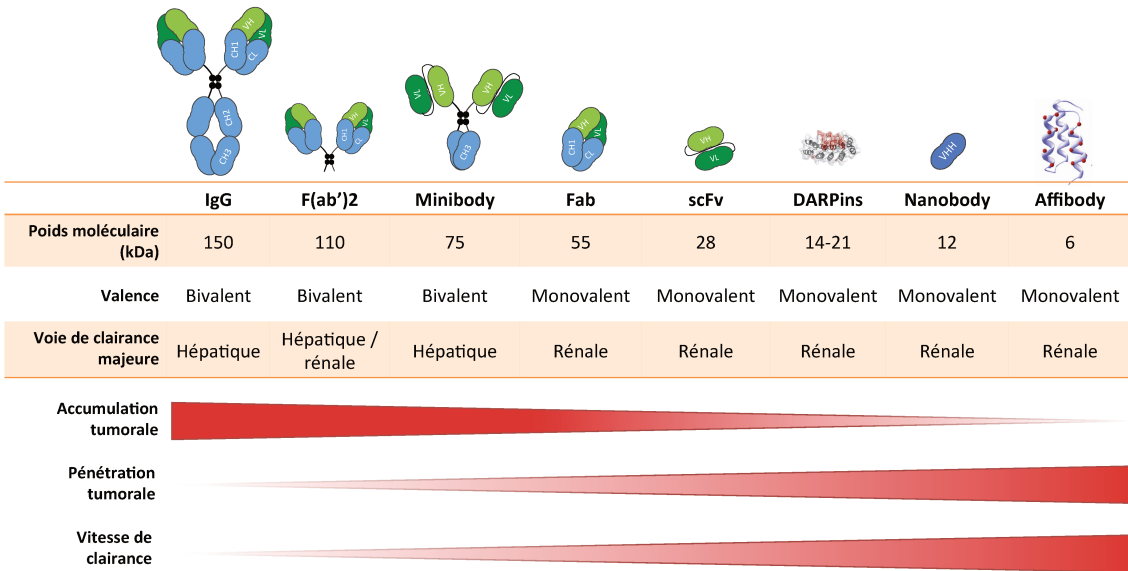


Figure 21 | Résumé des caractéristiques majeures de différents vecteurs (Adapté d'après Ruisi et al, 2018 [243])

La recherche de charpentes protéiques originales pour la vectorisation est toujours en mouvement et de nombreux groupes travaillent à découvrir ou à améliorer des squelettes protéiques existants. Notre équipe s'inscrit dans ce cadre avec l'exploration d'un nouveau type de protéine possédant des caractéristiques anticorps-mimétiques : les Affitines.

IV-Les Affitines, un nouveau vecteur pour le ciblage tumoral

Les trois dernières décennies ont vu l'émergence de nombreuses charpentes protéiques innovantes pour la vectorisation. Parmi ces différentes protéines, les Affitines occupent une place de choix du fait de leurs caractéristiques remarquables. Générées à partir de protéines d'archées hyperthermophiles et acidophiles vivant dans des biotopes extrêmes (sources hydrothermales océaniques, sources chaudes volcaniques, lacs salés...), ces protéines présentent des particularités structurales favorables à de nombreuses applications de biotechnologie.

A-Origines et structure

Les Affitines (exploitées commercialement sous le nom de Nanofitines®) sont des petites protéines d'affinité (7 kDa) dérivant structurellement de protéines de la famille Sul7d telle que Sac7d, un polypeptide que l'on retrouve exprimé par la famille d'archées *Sulfolobus acidocaldarius* [177] (cf **figure 22**). *In vivo*, il est admis que le rôle de cette protéine est de stabiliser la chromatine archéale protégeant ainsi l'ADN de la dénaturation thermique [177]. On retrouve en effet Sac7d en grande quantité au niveau de la chromatine de *Sulfolobus* où elle se fixe à l'ADN de manière aspécifique [178]. Cette protéine monomérique est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 66 acides aminés sans pont disulfure, sans cystéine, et présente une grande stabilité thermique (T_m de 90,4°C) ainsi qu'une grande résistance aux pH extrêmes. Des études de cristallographie ont permis de révéler une architecture de type « SH3-like » composée de cinq segments β . Les segments β_1 et β_2 vont former une épingle orientée perpendiculairement à un feuillet composé des segments β_3 à β_5 . Une hélice α amphiphilique positionnée à l'extrémité C-terminale « coiffe » cette structure qui prend la forme d'un tonneau [179], [180].

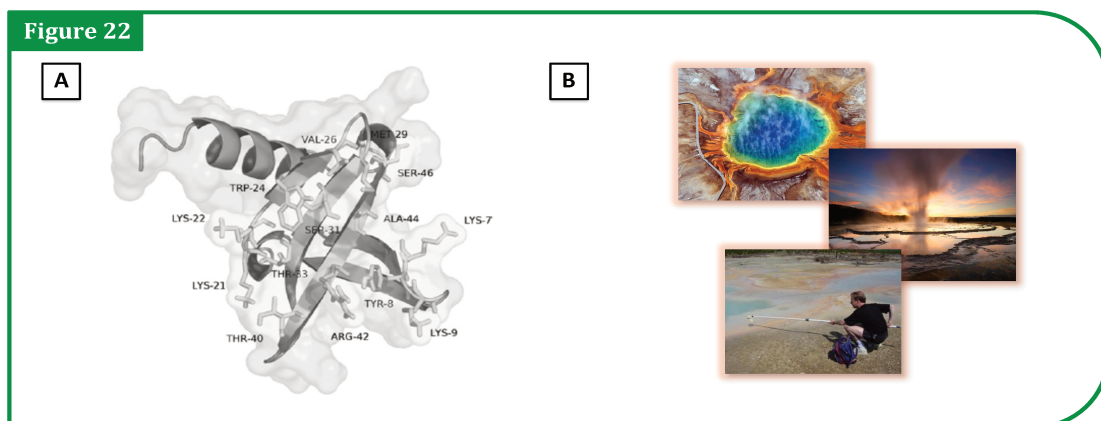


Figure 22 | Structure et origine des Affitines

A) Représentation schématique de la structure de la protéine Sac7d sauvage issue de l'archée *Sulfolobus acidocaldarius* (code pdb 1AZP). Les acides aminés légendés sur la structure correspondent aux 14 résidus impliqués dans la liaison à l'ADN, et qui sont randomisés pour la génération de banques d'Affitines. B) Images des sources hydrothermales du Parc Yellowstone, un des biotopes de la famille *Sulfolobus*. En bas, les précautions de rigueur pour un prélèvement en toute sécurité.

L'étude cristallographique des complexes Sac7d/ADN a permis de mieux comprendre l'architecture du site de liaison à l'ADN. Il a ainsi été établi que 14 résidus aminés localisés dans les segments β étaient impliqués dans l'interaction avec l'ADN [179], [181].

Des travaux menés par le groupe de Frédéric Pecorari ont permis de montrer que la sélectivité de Sac7d pour l'ADN pouvait être modifiée par mutagenèse aléatoire de ces 14 résidus [182]. Ces modifications rendent possible le développement de protéines possédant la charpente peptidique de Sac7d tout en présentant une sélectivité différente [183], [184]. Des stratégies de sélection permettent d'orienter la sélectivité de la protéine vers une cible d'intérêt pour l'expérimentateur. Il a également été montré que ces changements n'entraînaient pas d'altération des propriétés biophysiques de la protéine malgré le taux important de mutations que supporte la séquence (plus de 21% des résidus aminés de la séquence originelle de Sac7d sont modifiés). Ces résultats ont permis de valider l'utilisation de ces protéines archéales comme charpentes pouvant supporter la création de nouvelles protéines d'affinité logiquement nommées Affitines, pour « artificial affinity proteins ».

Plus récemment, des travaux portant sur la protéine Sso7d, un homologue de Sac7d, ont abouti à la génération d'Affitines présentant des propriétés de stabilité plus élevées [185], [186]. Une autre étude menée au sein du groupe de Frédéric Pecorari et visant à caractériser les protéines de la famille Sul7d [187] a également permis d'identifier la protéine Aho7c comme étant celle présentant la plus petite taille (60 acides aminés) tout en conservant une stabilité thermique ($T_m = 96.8^\circ\text{C}$) et chimique (pH 0 à 13) remarquablement élevée. Aho7c a permis d'obtenir des Affitines dirigées contre EpCAM avec une affinité de 110 pM [188].

Les travaux pionniers du groupe autour de Sac7d ont inspiré d'autres équipes pour générer des protéines d'affinité, notamment à partir de Sso7d. L'obtention d'Affitines spécifiques de cibles de nature différente (fluorescéine, β -caténine, lysozyme de blanc d'œuf, streptavidine, IgG murines, IgY de poulet, IgG humaines, virus de plante [189]–[192]) ainsi que la diversité des stratégies de sélection employées (exposition sur levure, exposition sur phages [191], [193]) démontrent la robustesse et la flexibilité de cette technologie comme le souligne également son adoption par différents groupes de recherche.

B-Génération de banques et sélection des Affitines d'intérêt

La première étape nécessaire à l'obtention d'Affitines dirigées contre une cible particulière est la génération de banques de séquences. Cette étape est réalisée *in vitro* par randomisation des 14 positions d'acides aminés intervenant dans la liaison de Sac7d à l'ADN. La très grande diversité ainsi obtenue (supérieure à 10^{12} séquences) doit permettre d'obtenir des variants présentant la spécificité de liaison recherchée. Une étape de sélection est ensuite menée afin d'isoler les Affitines monoclonales d'intérêt.

La sélection d’Affitines spécifiques d’une cible particulière est basée sur l’utilisation du système de ribosome display [146], [194], [195] (cf. **figure 23**). Les banques de séquences générées précédemment sont transcrites puis traduites selon un protocole précis (voir partie « Matériels et méthodes »). L’étape de traduction permet la formation de complexes ternaires formés par l’association de la séquence ARNm, du ribosome et de la protéine. Cette étape constitue le « cœur » de la stratégie de ribosome display puisqu’elle permet d’associer au sein d’une même structure le phénotype et le génotype de la protéine. Elle offre donc la possibilité de sélectionner des protéines candidates selon la propriété biologique recherchée par l’expérimentateur tout en donnant accès à la séquence nucléotidique associée. Les complexes ternaires sont ensuite mis en contact avec la molécule cible préalablement immobilisée sur une surface solide. Les trimères présentant une affinité faible ou nulle pour la cible sont éliminés par lavage. Les ARNm des complexes ternaires liés à la cible sont quant à eux récupérés par un processus d’élution, rétro-transcrit puis amplifiés par PCR. L’ADN ainsi obtenu constitue une nouvelle banque, différente de la banque d’origine dont il est issu du fait de son contact avec la cible d’intérêt. Cette banque d’ADN peut être réutilisée pour un nouveau cycle de sélection par ribosome display. Au fur et à mesure des cycles, la banque s’enrichit en séquences codant pour des Affitines présentant la particularité recherchée. Les différents travaux expérimentaux menés autour de cette approche ont montré que trois à cinq tours de sélection étaient nécessaires pour obtenir un enrichissement suffisant en séquences d’intérêt. A l’issue de l’étape de ribosome display, des étapes de criblage permettent d’identifier et d’isoler les meilleurs candidats.

Cette approche a permis d’isoler et de caractériser des Affitines présentant une spécificité pour des cibles variées telles que des protéines bactériennes (PulD, PulG [182], [196]), animales (lysozyme [184], [197]) et humaines (IgG, CD138, EpCAM [188], [198], [199]). La caractérisation de ces nouvelles protéines d’affinité a permis de démontrer une conservation des propriétés de stabilité thermique et chimique héritées de la protéine archéale d’origine Sac7d. Les valeurs d’affinité mesurées par résonance plasmonique de surface (SPR) se sont également révélées très satisfaisantes avec des constantes de dissociation à l’équilibre pouvant atteindre le sous-nanomolaire [182], [188]. Le taux de production élevé des Affitines chez *E.coli* (de 10 à 100 mg par litre de culture) permet aussi l’obtention de grandes quantités de protéines de manière relativement aisée et pour un coût restreint.

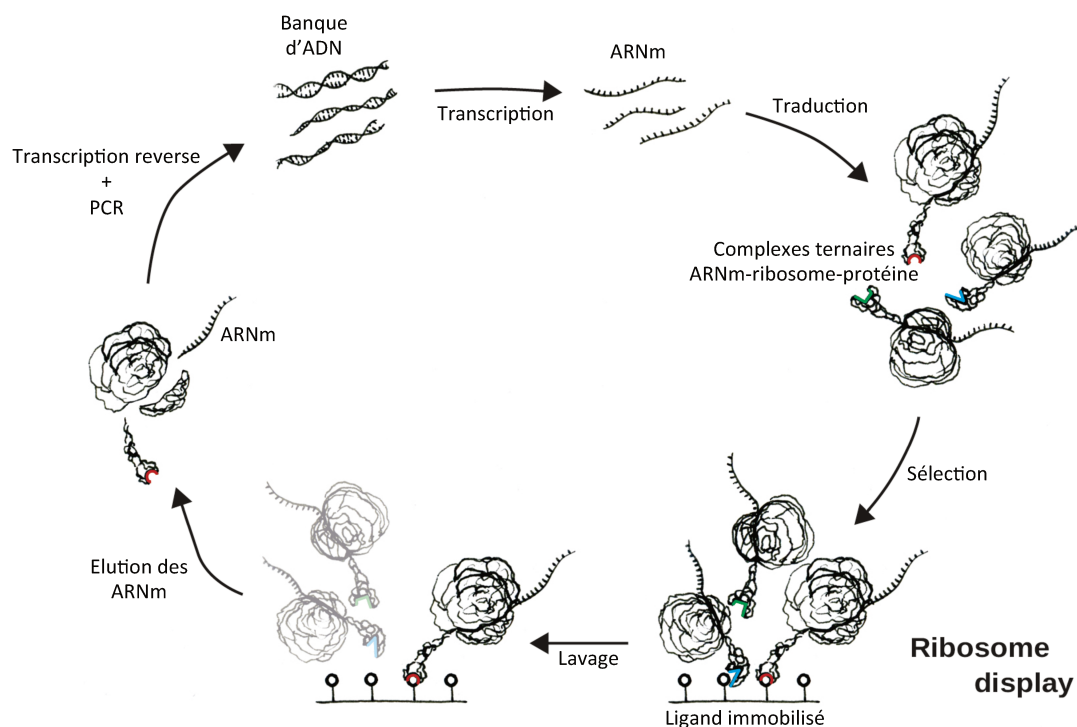


Figure 23 | Représentation schématique de la technique de Ribosome Display

Une banque d'ADN contenant des séquences codant pour différents variants d'Affitines est transcrite puis traduite. L'absence de codon stop à la fin des ARNm empêche la dissociation du ribosome et le relargage de la protéine native favorisant la formation de complexes ternaires. Ces complexes ARNm-ribosome-protéine sont ensuite incubés avec une protéine cible d'intérêt, préalablement immobilisée sur un support solide. Les complexes ternaires non fixés sont éliminés lors des étapes de lavage. Les ARNm des complexes liés à la protéine cible sont élués, rétro-transcrits et amplifiés par PCR. Cette nouvelle banque peut être utilisée directement pour un nouveau cycle de ribosome display ou bien être criblée afin d'identifier des variants d'Affitins d'intérêt (Dessin de Jérémy Segard, 2013, <http://jeremy-segard.com/>).

C-Exemples d'applications des Affitines

Les différentes caractéristiques évoquées précédemment font des Affitines une classe de protéines d'affinité artificielles en pleine expansion dont le principe de génération a été breveté [200]. Des variants dirigés contre différentes cibles font actuellement l'objet d'un développement à visée commerciale par Affilogic, une entreprise créée en 2010 afin d'exploiter la technologie Affitine. Les Affitines ont également été utilisées avec succès dans différentes applications de biotechnologie comme l'inhibition *in vivo* de protéines, l'immunolocalisation, les biocapteurs ou la chromatographie d'affinité. Plusieurs exemples sont évoqués dans les paragraphes ci-dessous.

a-Les inhibiteurs in cellulo

Une des premières études consacrées au développement d'Affitines a permis d'isoler des variants reconnaissant spécifiquement le domaine N-terminal de la protéine bactérienne PulD [182]. PulD est une secrétine impliquée dans le système de sécrétion de type II de *Klebsiella oxytoca*, une bactérie gram négative. Ce système est notamment composé d'un canal de translocation localisé dans la membrane externe et formé de 8 monomères de PulD. Ces monomères s'associent via leur partie C-terminale laissant ainsi libre la partie N-terminale (nommée PulD-N). Plusieurs variants d'Affitines spécifiques de cette partie N-terminale ont ainsi été sélectionnés par ribosome display. La caractérisation de ces variants a permis de mettre en évidence leur forte stabilité thermique, des affinités atteignant la centaine de picomolaires et une forte spécificité pour leur cible.

Il a également été montré que la fixation de certains variants d'Affitines spécifiques de PulD-N était capable de prévenir la multimérisation des monomères de PulD et ainsi d'empêcher la formation du canal de sécrétion *in cellulo*. Cette découverte permet d'envisager une utilisation des Affitines lors d'expériences de knock-down.

Lors de cette étude, certaines expériences ont également nécessité la création de protéines de fusion Affitines-GFP (green fluorescent protein) ou Affitines-PhoA (phosphatase alcaline). Ces fusions n'ont pas entraîné de perte de spécificité de l'Affitine et ont pu être utilisées à des fins d'immunolocalisation [201].

b-Les inhibiteurs in vitro

Des travaux s'intéressant à l'inhibition spécifique de glycosidases ont également été menés par le groupe de Frédéric Pecorari [184]. L'inhibition spécifique de ce type de protéine constitue en effet un challenge car des glycosidases avec des fonctions différentes peuvent partager des mécanismes enzymatiques similaires et des architectures de site catalytique proche. Dans cette étude, les Affitines sont proposées comme alternative aux petits composés chimiques, souvent peu spécifiques, habituellement utilisés pour l'inhibition des glycosidases. Des Affitines ont donc été sélectionnées contre CelD (une glycosidase présentant un mécanisme inverseur issue de *Clostridium thermocellum*) et contre le lysozyme de blanc d'œuf (une glycosidase possédant un mécanisme rétenteur). Deux types de banques combinatoires ont été utilisés dans ces travaux : une première banque créée par randomisation de la séquence de Sac7d sur les positions impliquées dans la reconnaissance et une deuxième banque identique à la première dans laquelle une boucle peptidique initialement présente a été allongée. L'extension de cette boucle doit permettre d'obtenir des variants d'Affitines plus susceptibles de se lier à des épitopes concaves. La caractérisation des Affitines obtenues suite aux sélections a permis de mettre en évidence une forte affinité pour la cible et une absence de reconnaissance croisée. Leur capacité

d'inhibition a également été démontrée que ce soit pour CelD (2 Affitines obtenues ; $K_i=95\text{nM}$ et 111nM) ou pour le lysozyme de blanc d'œuf (1 Affitine obtenue ; $K_i=45\text{nM}$). La cristallographie des complexes Affitines/glycosidase a permis de cartographier la zone d'interaction entre les deux protéines qui s'est avérée être localisée au niveau des sites catalytiques. Deux types de liaisons ont été caractérisés : soit par recouvrement du site si l'Affitine dérive de la première banque (sans boucle), soit par insertion dans le site catalytique de la boucle dans le cas où l'Affitine est issue de la deuxième banque (cf. **figure 24**).

Les résultats de cette étude ont permis de valider la pertinence de l'utilisation des Affitines comme inhibiteurs de haute spécificité.

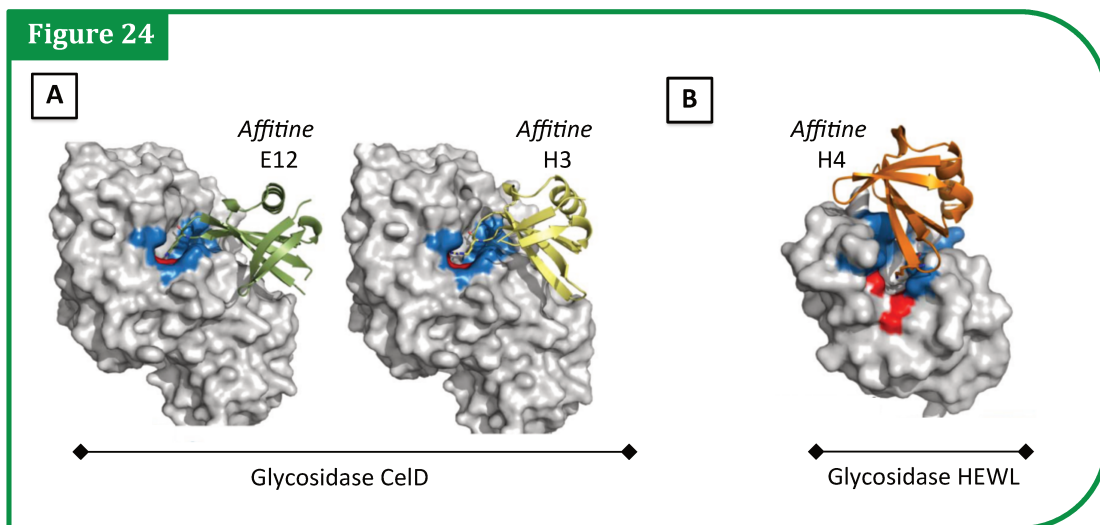


Figure 24 | Structure des complexes glycosidases/Affitines anti-glycosidase

Les glycosidases sont représentées en gris (CelD, glycosidase issue de *Clostridium thermocellum* et HEWL, Hen egg-white lysozyme, glycosidase de blanc d'œuf) avec la poche enzymatique en bleu et les résidus catalytiques en rouge. A) Les Affitines E12 et H3, qui sont issues de la banque possédant une boucle peptidique allongée, vont présenter une structure convexe saillante qui va s'insérer dans le site catalytique de la glycosidase renforçant les interactions établies entre les résidus randomisés des segments β des Affitins et la surface de CelD. B) L'Affitine H4 est issue de la banque sans boucle. Elle se lie à HEWL par recouvrement du site catalytique. D'après Correa et al, 2014 [184].

c-Les biocapteurs

Un biocapteur est un dispositif analytique de détection associant un élément capteur qui va réagir spécifiquement avec le bio-analyte d'intérêt et un élément transducteur qui va permettre de convertir l'évènement de reconnaissance moléculaire en un signal interprétable. Une des possibilités pour obtenir ce genre de dispositif est de coupler une protéine d'affinité reconnaissant une cible d'intérêt de manière spécifique avec un fluorophore qui va servir d'élément transducteur. La difficulté de ce genre d'approche réside dans le couplage fluorophore/protéine d'affinité. Le fluorophore doit en effet être situé à proximité du site de liaison afin de présenter une sensibilité à la fixation de la cible tout en ne perturbant pas l'affinité de la protéine. La technologie Affitine a donc été mise à profit afin de développer des biocapteurs

fluorescents spécifiques d'une cible particulière [202]. Afin d'établir la preuve de concept, une Affitine spécifique du lysozyme du blanc d'œuf et préalablement caractérisée a été utilisée. Sur cette Affitine, les résidus hypervariables ont été changés en cystéine de manière individuelle par mutagenèse dirigée. Les différents variants ainsi obtenus ont ensuite été couplés avec un fluorophore présentant une fonction thiol puis testés afin de déterminer leur sensibilité relative. Cette dernière va reposer à la fois sur leur affinité pour l'antigène et sur la variation du signal de fluorescence induit par la liaison à la cible. Cette méthode a permis d'obtenir des biocapteurs fluorescents fonctionnels présentant un fort potentiel, ouvrant la voie à leur utilisation dans différentes applications.

d-Les puces à protéines

Les puces à protéines sont des outils analytiques puissants permettant de détecter des interactions moléculaires entre de nombreux partenaires. Les avantages apportés par cette technologie sont cruciaux notamment pour l'analyse à haut débit de protéomes. Une étape clé dans la conception de ce genre de puce réside dans l'immobilisation des protéines de capture sur un support solide. Elle doit en effet permettre la fixation à haute densité des protéines au support tout en préservant leur activité biologique. Des travaux basés sur l'utilisation d'Affitines ont été menés afin d'explorer leur potentiel dans le développement de puces à protéines [203], [204]. Dans ce but, différentes stratégies ont été explorées afin d'immobiliser des Affitines sur un support solide tout en préservant leur capacité de reconnaissance. Ces développements doivent permettre à terme de s'affranchir de l'utilisation d'anticorps comme protéines de capture et ainsi de réduire les coûts d'utilisation de cette technologie.

La première stratégie de fixation est basée sur la particularité que possèdent les Affitines produites chez *E. coli* de posséder une étiquette hexahistidine. Celle-ci permet la purification des Affitines sur colonne d'affinité. L'étiquette peut également être utilisée afin d'immobiliser les Affitines sur une surface en verre recouverte par une couche de phosphonate de zirconium. L'ancrage orienté des protéines est obtenu en utilisant un adaptateur bifonctionnel. Ce dernier possède deux acides phosphoniques capables d'interagir avec la monocouche de zirconium ainsi qu'une ou deux unités NTA (acide nitrolotriacétique) permettant une liaison réversible avec l'étiquette histidine des Affitines. Cette stratégie a permis d'obtenir des puces présentant une forte densité de protéines fonctionnelles immobilisées.

Une autre stratégie de fixation développée ultérieurement a permis de s'affranchir de l'adaptateur bifonctionnel en immobilisant les Affitines directement sur le support. Dans cette approche, une étiquette phosphorylable (DSDSSSEDE) est ajoutée en C-terminale de la séquence de l'Affitine. La phosphorylation *in vitro* des quatre résidus sérine par la caséine kinase II va entraîner la création d'un nanocluster de phosphate qui va permettre l'immobilisation orientée

et irréversible de l'Affitine à la surface du zirconium. La preuve de concept de cette nouvelle approche a été réalisée par ajout de la séquence phosphorylable sur une Affitine anti-lysozyme de blanc d'œuf. La caractérisation des puces ainsi générées a permis de démontrer que ce système de fixation était valide et permettait l'immobilisation à haute densité de protéines fonctionnelles. L'utilisation de ces puces pour la capture de lysozyme en phase liquide a également montré une efficacité supérieure à celle des équivalents commerciaux.

Ces travaux, en plus du développement de moyens efficaces pour l'immobilisation de protéines, démontrent la robustesse des Affitines. L'utilisation répétée des puces a en effet montré une conservation de leur fonctionnalité malgré le passage par des étapes sèches, fatales à la fonction de la plupart des protéines, pour la préparation des lames de verre fonctionnalisées. Ces protéines d'affinité représentent donc une alternative totalement crédible aux anticorps pour la conception de ce genre d'outil.

e-La chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité est une méthode de purification des protéines basée sur l'utilisation des interactions biologiques se produisant entre un ligand et son substrat. L'ajout d'étiquettes aux séquences protéiques a grandement contribué à la popularité de cette technique. Cette approche peut cependant se révéler problématique lorsque les modifications de séquence à apporter pour étiqueter la protéine ne sont pas désirées (cas de molécules thérapeutiques par exemple) ou techniquement impossibles. Une stratégie permettant de surmonter cet obstacle peut alors consister en l'utilisation de ligands spécifiques de la protéine à purifier. La protéine A issue de *Staphylococcus aureus* est un exemple connu de ce genre de ligand. Sa spécificité naturelle pour les IgG humaines permet son utilisation en colonne de chromatographie d'affinité. Il n'est cependant pas toujours possible de disposer d'un ligand naturel spécifique de la protéine d'intérêt utilisable en purification. Une réponse possible à ce genre de limitation est le développement de protéines d'affinité artificielles. Ces dernières doivent répondre à différents critères afin de pouvoir être utilisées pour ce genre d'application. Idéalement, la protéine choisie devra être hautement spécifique de sa cible et facile à produire en grande quantité. Elle devra de plus présenter une forte stabilité chimique afin de résister aux effets des solutions de lavage et d'élution utilisées lors du processus de purification. Les Affitines possédant ces différentes caractéristiques, leur utilisation comme ligands pour les chromatographies d'affinité a été explorée [186]. A cette fin, plusieurs protéines (Affitines anti-IgG humaines, anti-PulD et anti-lysozymes) ont été immobilisées de manière covalente sur des colonnes d'agarose. Ces colonnes de spécificités différentes ont ensuite été testées expérimentalement pour la purification d'échantillons hétérogènes analogues à ceux obtenus lorsque la protéine cible est produite chez *E.coli*, par des cellules de mammifères ou issues de fluides d'ascite. Les résultats obtenus ont montré une conservation de la spécificité et de l'affinité

des Affitines après l'immobilisation sur colonnes. Le degré de pureté ainsi que le rendement des différentes colonnes testées se sont également avérés très satisfaisants. La robustesse de la colonne d'Affitine anti-IgG humaines a également été explorée. Les résultats ont montré que celle-ci conservait plus de 90% de sa capacité initiale de capture après 25 cycles de purification-régénération à la soude 0.25 M. De plus, le degré de pureté de l'échantillon d'IgG humaines obtenu après passage sur la colonne d'Affitine anti-IgG s'est avéré comparable à celui obtenu à l'issue d'une purification sur colonne de protéine A (cf. **figure 25**).

Ces différents résultats ont donc permis de démontrer l'intérêt de l'utilisation des Affitines pour des applications de chromatographie d'affinité à usage unique du fait de leur faible coût de production et/ou à usage multiple grâce à leur résistance chimique autorisant leur réutilisation.

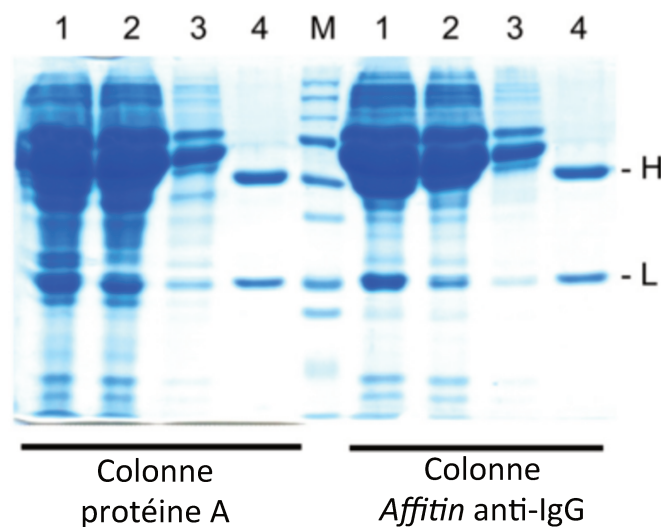


Figure 25 | Comparaison de la purification d'affinité d'IgG humaines réalisée sur colonne de protéine A ou sur colonne d'Affitine anti-IgG.

Les fractions collectées suite à la purification d'IgG humaines produites dans des ascites murins sont analysées sur gel SDS-Page. 1: Fraction injectée, 2: Fraction « flow-through », 3: Fraction de lavage, 4: Eluat, M : marqueur de taille. Les lettres « H » et « L » indiquent la migration des bandes correspondant aux chaînes lourdes et légères des IgG respectivement. D'après Béhar et al, 2016 [186].

f-La séparation magnétique

L'utilisation de particules magnétiques (PMN) pour la purification des protéines représente une alternative à la chromatographie. Du fait de leur structure, les PMN possèdent une surface d'interaction étendue et peuvent être facilement et sélectivement séparées de solutions biologiques. Différentes protéines d'affinité ont déjà été testées pour la fonctionnalisation des PMN à des fins de purification. L'intérêt des Affitines pour ce genre d'application a également été exploré dans un article publié en 2016 [205]. Dans cette étude, deux Affitines (Affitine anti-lysozymes et Affitine anti-IgG) ont été immobilisées sur des PMN. Ces particules ont ensuite été

testées pour leur capacité à se lier à leur protéine cible respective dans un extrait d'*E. coli* ou du plasma. Les analyses des échantillons obtenus suite à cette étape de capture magnétique ont permis de mesurer une pureté de 95% (extrait d'*E. coli*) et de 81% (plasma) en protéine cible. Cette étude confirme donc le potentiel des Affitines pour des applications nécessitant une immobilisation de la protéine d'affinité sur une matrice.

g-L'imagerie tumorale

Le développement de stratégies de ciblage tumoral innovantes pour le diagnostic fait partie des axes importants de recherche du groupe. Les Affitines présentent des propriétés favorables justifiant la réalisation d'études visant à évaluer leur potentiel pour ce genre d'applications. Des étapes de sélection par ribosome display puis de criblage ont permis d'isoler une première Affitine, nommée A6, spécifique de la forme humaine du CD138 (syndecan-1), un biomarqueur du MM. Un des premiers travaux réalisés par l'équipe a été d'évaluer la biodistribution de A6 préalablement radiomarquée à l'iode 125 dans un modèle murin non pathologique. L'objectif principal de cette étude visait à documenter le comportement pharmacocinétique des Affitines *in vivo* et de vérifier la compatibilité de celui-ci avec l'utilisation d'émetteurs β^+ à demi-vie courte pour l'imagerie TEP [199].

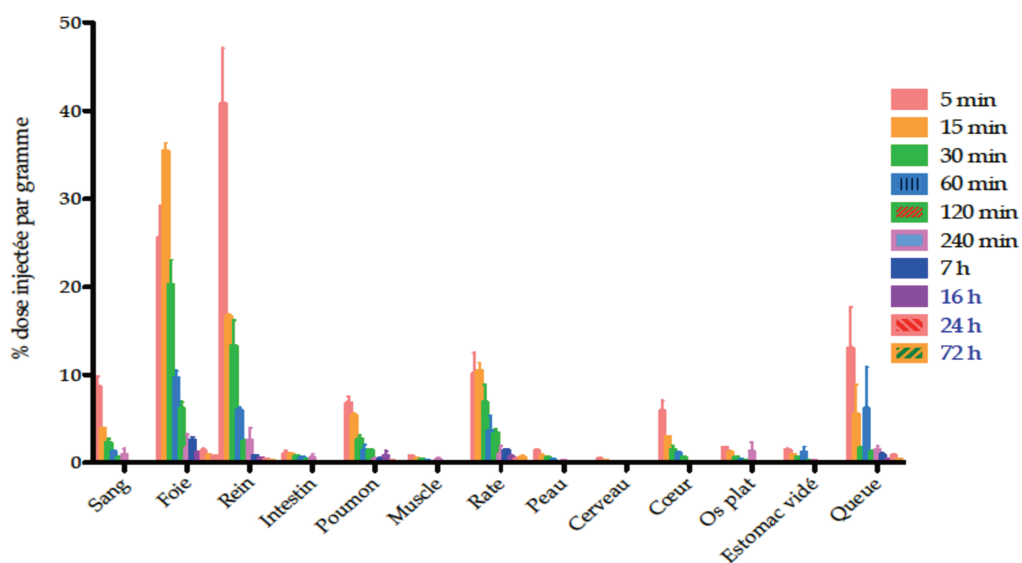


Figure 26 | Biodistribution de l’Affitine A6 radiomarquée à l’iode 125 dans des souris KaLwRij de 5 mn à 72 h après injection par voie intraveineuse. (D’après E. Matous [199])

Les résultats obtenus mettent en évidence la pharmacocinétique rapide de l’Affitine (cf. **figure 26**). Cinq minutes après l’injection, on retrouve 40% de la dose au niveau des reins, 25% va au foie et 13% à la rate. Deux heures plus tard, ces pourcentages atteignent respectivement 2,4%, 6% et 3% témoignant d’une élimination rapide dans ces organes. Cette cinétique rapide est également retrouvée dans d’autres organes comme les poumons, l’intestin, l’estomac et le

cœur. Les résultats de biodistribution obtenus consécutivement à cette étude démontrent le profil favorable des Affitines pour des applications d'imagerie tumorale.

Les recherches autour de cette nouvelle classe de vecteur se sont donc poursuivies avec une autre Affitine anti-CD138 nommée A872. Cette Affitine, isolée et caractérisée postérieurement à A6, présente des propriétés d'affinité supérieures justifiant l'intérêt d'une étude plus poussée. A872 a notamment été testée en cytométrie et a montré une capacité de fixation sur différentes lignées de cellules humaines CD138+ identique à celle de l'anticorps anti-CD138 commercial. La caractérisation de cette protéine d'affinité a également permis de mettre en évidence une grande stabilité chimique et thermique autorisant la réalisation de protocoles de marquage radioactif. De même, il a été montré que sa stabilité prévenait d'une dégradation précoce induite par les protéases sériques.

Une étude de biodistribution de cette Affitine a donc été réalisée dans un modèle murin pathologique greffé avec des tumeurs myélomateuses CD138+ (cf **figure 27**). Cette étude a permis de démontrer par immunohistochimie que A872 était capable de cibler les cellules cancéreuses *in vivo* en présentant un marquage important jusqu'à deux heures après l'injection par voie intraveineuse (IV). Les résultats montrent également une élimination rénale significative pendant la première heure post-injection. Comme pour la biodistribution de l'Affitine radiomarquée, on retrouve un profil pharmacocinétique favorable permettant d'envisager l'utilisation des Affitines couplées avec des émetteurs β^+ à demi-vie courte en imagerie.

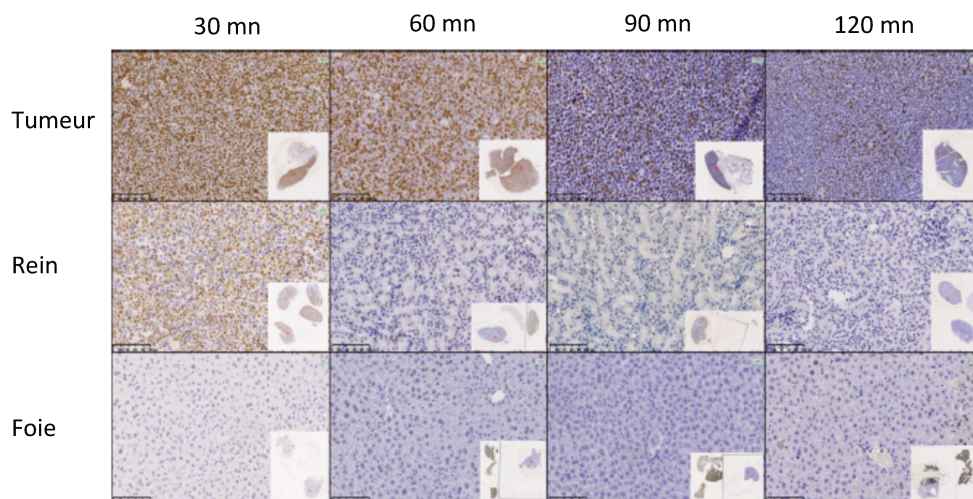


Figure 27 | Coupes histologiques de tissu tumoral, rénal et hépatique à différents temps après l'injection de l'Affitine A872

La détection d'A872 est réalisée à l'aide d'un anticorps anti-6-His couplé à la peroxydase. Les tissus contenant A872 apparaissent donc en brun. Grossissement : x80. D'après E.Matous [199].

Objectifs de la thèse

Le cancer est, dans les pays de l'OCDE, la seconde cause de décès après les pathologies cardiovasculaires. Le développement de nouvelles approches permettant d'améliorer la détection et le suivi des patients atteints de cancer constitue donc un enjeu de santé publique majeur. Les efforts de recherche entrepris en ce sens par la communauté scientifique ont été à l'origine de nombreuses avancées améliorant la compréhension du processus tumoral et permettant l'émergence de stratégies innovantes pour le diagnostic, la stadification et la thérapie des cancers.

Parmi ces innovations, le ciblage d'antigènes associés aux tumeurs s'est avéré être une stratégie prometteuse. L'utilisation d'anticorps monoclonaux ou de dérivés est un domaine en forte expansion notamment en thérapie malgré de nombreuses limitations liées aux caractéristiques intrinsèques de ces vecteurs et aux coûts financiers de leur développement. Ces limitations et notamment celles concernant la pharmacocinétique sont d'autant plus contraignantes en imagerie nucléaire où elles constituent un frein majeur à une utilisation étendue des AcM.

Le paysage actuel de l'imagerie médicale nucléaire en oncologie, dominé par la TEP métabolique au ^{18}F -FDG, joue également en défaveur d'une utilisation plus répandue de ces vecteurs.

L'exploration de charpentes alternatives combinant petite taille et propriétés anticorps-mimétiques semble être une réponse possible à ces limites. Différentes études ont en effet démontré le bon comportement *in vivo* de certains vecteurs comme les Affibodies et les DARPin, les rendant compatibles avec des émetteurs β^+ à demi-vie courte. Les charpentes artificielles sont donc de premier intérêt pour le développement d'outils de diagnostic et de suivi non invasifs.

Dans ce contexte d'élargissement de l'arsenal de charpentes alternatives, le groupe de Frédéric Pecorari a entrepris de développer une nouvelle classe de protéines d'affinité artificielles, les Affitines. Présentant un poids moléculaire très réduit (7-8 kDa), ces petites protéines thermiquement et chimiquement très stables disposent de propriétés d'affinité et de spécificité comparables à celles des anticorps. Un autre avantage remarquable de ce genre de charpente consiste en la possibilité de générer des Affitines par un système entièrement *in vitro* contre une cible préalablement choisie par l'expérimentateur. De nombreuses Affitines ont ainsi été générées contre des cibles variées et notamment contre CD138, un antigène surexprimé par les plasmocytes malins.

Dans le cadre de mon doctorat, nous avons choisi de prolonger ces travaux de recherche autour des Affitines en les inscrivant dans la thématique de développement de l'imagerie

phénotypique du MM portée par l'équipe du Prof. Michel Chérel. De nombreuses études réalisées au sein de cette équipe ont en effet souligné la pertinence de l'utilisation d'immunoconjugés pour l'imagerie TEP du MM. Nous souhaitons donc, avec ce projet, poursuivre sur cette thématique de l'imagerie phénotypique du MM en investiguant le potentiel des Affitines dans cette approche. Nous avons choisi comme biomarqueur d'intérêt le CD38, une glycoprotéine surexprimée par les plasmocytes malins et dont la pertinence pour le ciblage du MM a été démontrée dans de nombreux protocoles précliniques et cliniques.

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'utilisation des Affitines pouvait présenter un avantage qualitatif pour la vectorisation de radionucléides par rapport à l'utilisation d'anticorps ou de traceurs métaboliques conventionnels. Le travail à effectuer afin d'apporter des éléments de réponse à cette hypothèse a été décomposé en deux grandes parties jalonnées par plusieurs étapes :

Partie I-Développement d'Affitins anti-CD38. Etapes principales :

- 1 - Produire la protéine CD38 recombinante
- 2 – Générer des Affitines anti-CD38 par la technique du Ribosome Display
- 3 – Cribler la sélection d'Affitines anti-CD38 afin d'isoler des variants d'intérêt
- 4 – Caractériser les variants d'intérêt
- 5 – Radiomarquer la ou les molécules candidates et valider la conservation de leur affinité et spécificité après marquage
- 6 – Réaliser des études de biodistribution de l'Affitine radiomarquée dans un modèle murin de xénogreffe
- 7 – Réaliser des acquisitions TEP dans ce même modèle

Nous souhaitons disposer d'un référentiel auquel comparer les résultats des expériences *in vivo* effectuées avec les Affitines. Nous avons choisi pour cela d'utiliser un anticorps anti-CD38 commercial, de le radiomarquer avec un élément émetteur β^+ et de l'utiliser comme radiotraceur dans des expériences de biodistribution et d'imagerie analogues à celles planifiées pour la partie I du projet.

Partie II-Biodistribution et imagerie TEP du CD38. Etapes principales :

- 1- Radiomarquer l'anticorps anti-CD38 commercial
- 2- Caractériser l'anticorps radiomarqué
- 3- Réaliser des études de biodistribution de l'anticorps radiomarqué dans un modèle murin de xénogreffe
- 4- Réaliser des acquisitions TEP dans ce même modèle

Ces deux études se complètent et doivent autoriser un premier aperçu du potentiel de l'imagerie phénotypique pour la détection des foyers tumoraux myélomateux. La TEP anticorps anti-CD38, basée sur l'utilisation d'une molécule bien caractérisée dans la littérature, doit servir de référentiel afin d'évaluer la pertinence de l'utilisation des Affitines pour l'imagerie phénotypique du MM.

Partie I : Développement d'Affitines anti-CD38

MATERIELS ET METHODES	74
I-PRODUCTION ET CONTROLE QUALITE DES PROTEINES RECOMBINANTES CD38 MURIN ET CD38 HUMAIN	74
II-MISE EN PLACE DES SELECTIONS : PREPARATION DES BANQUES DE SEQUENCES ET BIOTINYLATION DES PROTEINES CIBLES	79
III-SELECTION PAR RIBOSOME DISPLAY	83
IV-ELISA DE CONTROLE DE L'ENRICHISSEMENT DES BANQUES	92
V-CLONAGE DES BANQUES D'AFFITINES	94
VI-CRIBLAGE DES BANQUES D'AFFITINES	96
VII-PRODUCTION D'AFFITINES A GRANDE ECHELLE	98
VIII-SEQUENÇAGE NGS	100
RESULTATS	102
I-PRODUCTION ET CONTROLE QUALITE DES PROTEINES RECOMBINANTES CD38 MURIN ET CD38 HUMAIN	102
II-PREPARATION DES BANQUES DE SEQUENCES ET BIOTINYLATION DE LA PROTEINE CIBLE UTILISEE POUR LES SELECTIONS	105
III-RIBOSOME DISPLAY : SELECTION I CONTRE RCD38M	108
IV-RIBOSOME DISPLAY : SELECTION II CONTRE RCD38M	110
V-RIBOSOME DISPLAY : SELECTION III CONTRE RCD38M	118
VI-RIBOSOME DISPLAY : SELECTION IV CONTRE CD38M	120
VII-ETUDE DES BANQUES DE SEQUENCES ISSUES DE LA SELECTION II CONTRE RCD38M	123
DISCUSSION	128

Matériels et méthodes

I-Production et contrôle qualité des protéines recombinantes CD38 murin et CD38 humain

La première partie de mon travail de thèse a consisté en la production des protéines recombinantes CD38 murin (rCD38m) et CD38 humain (rCD38h). L'étape de production est suivie d'étapes de contrôle afin de s'assurer de la qualité des protéines recombinantes produites. Ces étapes sont nécessaires afin de pouvoir utiliser ces protéines comme cibles lors des sélections par ribosome display.

A-Production des CD38 humain et murin recombinants

α -Clonage des CD38 humain et murin dans pKCR6

L'insert codant pour le domaine extramembranaire du CD38 humain (du résidu Met27 à Ile300) ou murin (du résidu Met31 à Thr304) a été commandé auprès de la société GeneCust. Une séquence KOZAK suivie par une séquence codant pour le signal peptide du CD33 est ajoutée en 5' de la séquence CD38 afin d'induire la sécrétion de la protéine dans le surnageant de culture. Une séquence AviTag, étiquette de 15 acides aminés biotinylable par l'enzyme BirA, est ajoutée en 3' pour permettre sa capture par la streptavidine ou équivalent lors des étapes de sélection par la technique de ribosome display. L'insert ainsi modifié est cloné entre les sites de restriction XhoI et XbaI du plasmide pKCR6 (gracieusement fourni par le professeur R. Breatnach, cf. **figure 28**) à l'aide de la T4 DNA ligase (ThermoFischer) utilisée selon les instructions du fournisseur.

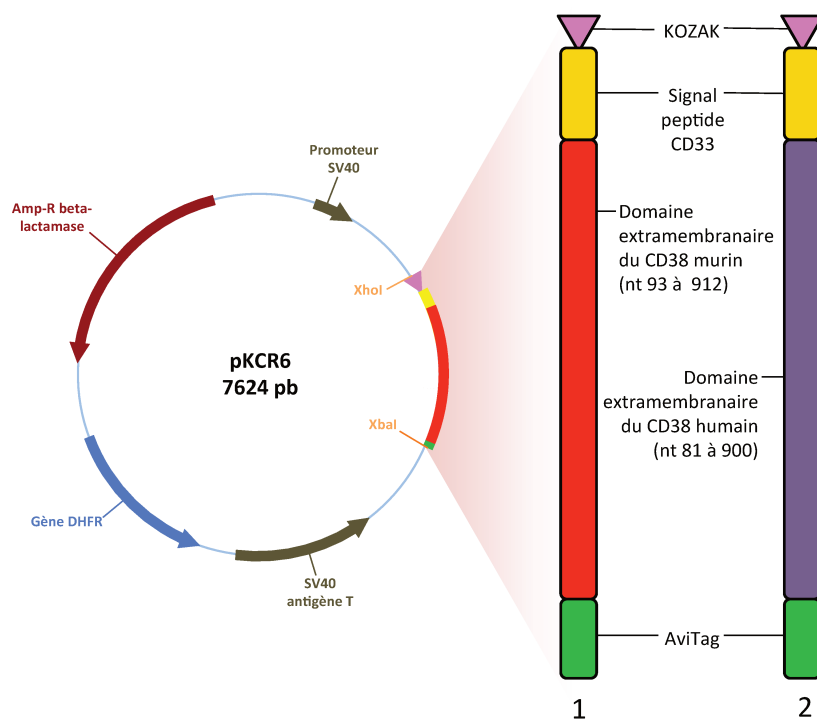


Figure 28 | Carte du plasmide pKCR6 et des inserts CD38

Représentation schématique du plasmide pKCR6 avec zoom sur les inserts codant pour la partie extramembranaire du CD38 murin (construction 1) ou humain (construction 2) flanquée en 5' par une séquence KOZAK suivie d'une séquence signal peptide CD33 et en 3' par une séquence AviTag.

b-Transfection des cellules CHO

La lignée cellulaire CHO (Chinese Hamster Ovary) est transfectée avec le plasmide pKCR6-CD38 humain ou murin à l'aide du kit « Lipofectamine 2000 Transfection Reagent » (ThermoFischer) utilisé selon les recommandations du fournisseur. Quatorze jours après la transfection, un clonage par dilution limitante est réalisé par ensemencement de plaques 96 puits à raison de 0,3 cellule par puits. 21 jours après le clonage, les surnageants des différentes colonies sont criblés par ELISA (« Enzyme Linked Immunosorbent Assay ») afin d'identifier les populations sécrétant les protéines recombinantes.

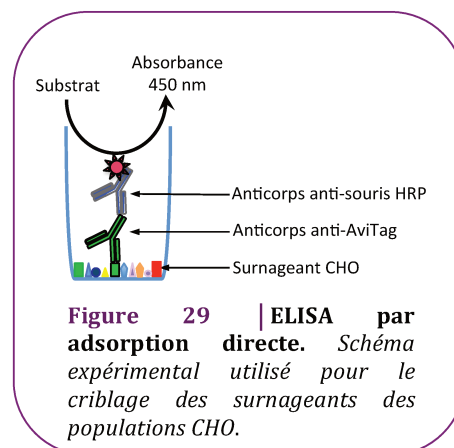
La lignée CHO est cultivée en milieu RPMI 1640 (Gibco) supplémenté avec 2mM de L-glutamine, 100U/mL de pénicilline (Invitrogen), 100µg/mL de streptomycine (Invitrogen) et 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF, laboratoire PAA) à 37°C, 5% de CO₂ et 95% d'humidité.

c-Criblage des clones CHO par ELISA

La sécrétion des protéines recombinantes dans le surnageant de culture nous permet de cribler les différentes populations clonales obtenues par ELISA selon le protocole suivant :

- Récupération des surnageants des populations clonales CHO.

- Dépôt en plaque 96 puits à fond conique et centrifugation 1 min à 2500 rpm (rotation par minute).
- Récupération des surnageants et dépôt en plaque 96 puits (Nunc Maxisorp), 50 μ L/puits, incubation sur la nuit à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
- Trois lavages PBS (tampon phosphate salin)-Tween 0,1%, 200 μ L/puits.
- Saturation des puits par une solution de PBS-BSA (Serum Albumine Bovine) 1%, 100 μ L/puits, 1h30 d'incubation à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
- Incubation avec l'anticorps primaire anti-AviTag (produit par la Plateforme P2R, Nantes) dilué à 2 μ g/mL en PBS-BSA 0,1%, 50 μ L/puits, 1h30 d'incubation à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
- Trois lavages PBS-Tween 0,1%, 200 μ L/puits.
- Incubation avec l'anticorps secondaire anti-souris HRP (« horseradish peroxidase » ou peroxydase du raifort) (Jackson) dilué à 0,4 μ g/mL en PBS-BSA 0,1%, 50 μ L/puits, 1h30 d'incubation à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
- Trois lavages PBS-Tween 0,1%, 200 μ L/puits.
- Révélation avec une solution d'OPD (o-Phenylenediamine, Sigma-Aldrich) diluée en PBS à une concentration de 1mg/mL, 50 μ L par puits, incubation 5min sous agitation douce (200rpm).
- Lecture de la DO (densité optique) à 450nm à l'aide du lecteur de plaque Infinite 200 Pro (Tecan).



d-Purification des surnageants

Les résultats d'ELISA nous ont permis de sélectionner deux populations clonales de CHO. Chacune de ces populations exprime fortement le CD38 humain recombinant (rCD38h) ou son équivalent murin (rCD38m). Ces deux populations sont donc amplifiées à raison de 1L de volume de milieu de culture par clone. Les surnageants sont ensuite récupérés, filtrés sur filtre 0,2 μ m et purifiés à l'aide d'une colonne N-hydroxysuccinimide (ThermoScientific) préalablement couplée avec un anticorps anti-AviTag. Les protéines sont ensuite éluées avec un tampon glycine (100mM glycine, 1M NaCl, pH 2,8), dialysées contre du PBS puis filtrées (0,2 μ m) avant d'être dosées au nanodrop et stockées à -80°C.

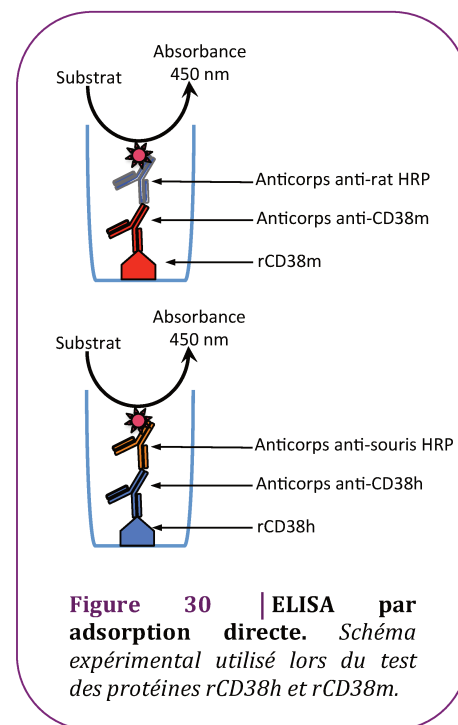
B-Contrôle qualité des protéines recombinantes produites

La qualité des protéines recombinantes rCD38h et rCD38m est contrôlée par ELISA et test de l'activité enzymatique.

α -Test ELISA

Une dilution en cascade des protéines rCD38h et rCD38m est réalisée dans du PBS afin d'obtenir une gamme allant de 10 μ g/mL à 0,625 μ g/mL. Le protocole suivant est appliqué :

- Dépôt des échantillons de protéines en plaque 96 puits (Nunc Maxisorp), 100 μ L/puits, incubation 1h30 à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
- Trois lavages PBS-Tween 0,1%, 200 μ L/puits.
- Saturation des puits par une solution de PBS-BSA 1%, 100 μ L/puits, 1h30 d'incubation à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
- Trois lavages PBS-Tween 0,1%, 200 μ L/puits.
- Incubation avec les anticorps primaires anti-CD38 dilués à 2 μ g/mL en PBS-BSA 0,1%, 100 μ L/puits, 1h d'incubation à température ambiante sous agitation (AcM anti-CD38 humain : clone HIT2, IgG1K de souris, eBioscience ; AcM anti-CD38 murin : clone 90, IgG2aK de rat, eBioscience).
- Six lavages PBS-Tween 0,1%, 200 μ L/puits.
- Incubation avec les AcM secondaires selon l'isotype de l'AcM primaire (1h d'incubation à température ambiante sous agitation). Pour l'AcM anti-CD38 humain : incubation avec un AcM anti-souris HRP dilué à 0,4 μ g/mL en PBS-BSA 0,1%, (Jackson). Pour l'AcM anti-CD38 murin : incubation avec un AcM anti-rat HRP dilué à 0,4 μ g/mL en PBS-BSA 0,1% (Sigma-Aldrich).
- Six lavages PBS-Tween 0,1%, 200 μ L/puits.
- Révélation avec une solution d'OPD (Sigma-Aldrich) diluée en PBS à une concentration de 1mg/mL, 50 μ L par puits, incubation 5min sous agitation douce (200rpm).
- Lecture de la DO à 450nm à l'aide du lecteur de plaque Infinite 200 Pro (Tecan).



b-Test enzymatique

La protéine CD38 possède une activité enzymatique catalysant notamment la transformation du NAD⁺ en cADPR puis l'hydrolyse du cADPR en ADPR. Cette caractéristique est partagée par les protéines humaines et murines [206]. L'utilisation d'un analogue du NAD⁺, le NGD⁺ (Nicotinamide guanine dinucléotide) permet de suivre cette réaction grâce aux propriétés de fluorescence du cGDPR (Guanosine diphosphate ribose cyclique) produit puis hydrolysé en GDPR (Guanosine diphosphate ribose) lors de cette cinétique (cf. **figure 31**) [207].

Le test enzymatique permet ici de s'assurer du bon repliement de la protéine recombinante lors des étapes de production.

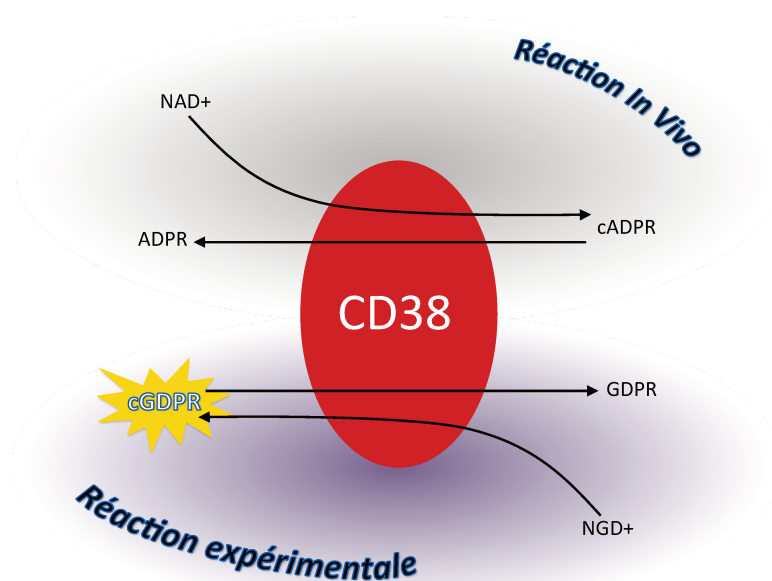


Figure 31 | Réactions enzymatiques catalysées par CD38 *in vivo* et *in vitro* à pH neutre

Représentation schématique des réactions enzymatiques principales catalysées par CD38 *in vivo* ou dans un contexte expérimental. L'analogue utilisé à la place du NAD⁺, le NGD⁺, est cyclisé en cGDPR par le CD38. Ce produit émettant de la fluorescence après excitation, il est possible de suivre sa cinétique d'apparition puis de disparition puisqu'il est ensuite linéarisé en GDPR qui ne présente pas de propriétés de fluorescence.

Le protocole appliqué pour suivre cette cinétique est le suivant :

- 280µL d'une solution de Tris 20mM NGD⁺ (Sigma-Aldrich) pH 7 sont distribués au fond d'une plaque noire 96 puits à fond plat préalablement positionnée sur de la glace.
- 1µg de protéines rCD38h ou rDC38m est pipeté dans les puits contenant la solution de substrat.
- La réaction enzymatique est suivie par un spectrofluorimètre (Inspire, Perkin Elmer). La longueur d'onde d'excitation est de 300nm, l'émission est mesurée à 410nm.

II-Mise en place des sélections : préparation des banques de séquences et biotinylation des protéines cibles

Le but de la seconde étape de mon travail de thèse était de générer des Affitines anti-CD38 par la technique de ribosome display. Cette stratégie nécessite la création préalable de banques de séquences qui seront utilisées lors du processus de sélection. La biotinylation des protéines cibles rCD38h et rCD38m est également nécessaire afin de pouvoir fixer ces protéines sur les différents supports solides utilisés pendant les sélections.

A-Préparation des banques de séquences d’Affitines

Les banques d’ADN L5 et L6 utilisées pour ce projet ont été générées en laboratoire par mutagenèse à saturation de 10 codons correspondant aux résidus aminés 9Y, 10K, 22K, 23K, 25W, 32S, 34T, 41T, 43R et 45A de la séquence peptidique de Aho7c impliqués dans l’interaction à l’ADN. Le protocole utilisé pour générer ces banques a déjà été décrit précédemment [195]. Brièvement, la banque L5 a été générée au format ribosome display par une réaction de PCR basée sur l’utilisation d’une combinaison de 4 oligonucléotides « classiques » et de 3 oligonucléotides dégénérés comprenant des triplets NNS et NHK (codant respectivement pour 20 et 16 acides aminés différents). Une seconde PCR va ensuite permettre l’ajout des séquences nécessaires au processus de sélection par assemblage de part et d’autre de la banque obtenue précédemment. L5 se retrouve ainsi encadrée en 5’ par un promoteur T7 suivi d’un site de liaison du ribosome (Ribosome binding site, RBS) et en 3’ par une séquence « espaceur » TolA (cf. **figure 32**). Cette dernière séquence, dépourvue de codon stop, permet au ribosome de rester solidaire de l’ARN traduit tout en jouant un rôle d’espaceur, éloignant la protéine nouvellement synthétisée du ribosome et favorisant ainsi une interaction Affitine/cible plus libre. La banque L6 est générée de manière analogue à la banque L5. La seule différence réside dans l’utilisation d’un variant d’oligonucléotide pendant la PCR d’assemblage de la banque (les séquences des oligonucléotides utilisés sont présentées dans le **tableau 4**). Ce variant permet l’extension d’une boucle peptidique située entre les feuillets $\beta 3$ et $\beta 4$ de la protéine par ajout de 4 résidus aminés randomisés pouvant potentiellement interagir avec les crevasses de sites catalytiques [184].

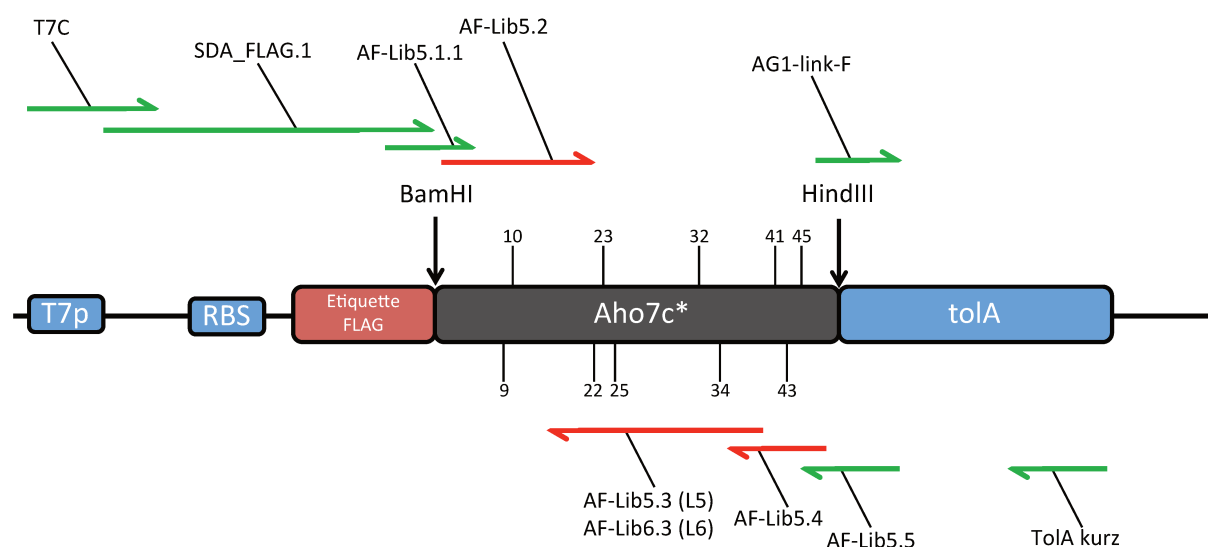


Figure 32 | Schéma de la construction des banques utilisées pour la sélection par ribosome display. T7p : promoteur de la polymérase T7. RBS : ribosome binding site (site de liaison du ribosome). Etiquette FLAG : étiquette DYKDDDDK [244]. Cette étiquette permet la détection des Affitines avec un anticorps anti-FLAG. Les résidus aminés de l'étiquette FLAG sont les premiers acides aminés de la séquence codante. Aho7c* : gène randomisé de Aho7c. TolA : séquence permettant de garder le ribosome lié avec la séquence. Les oligonucléotides standards et dégénérés utilisés pour générer la banque sont indiqués par des flèches vertes et rouges respectivement. Les positions d'acides aminés randomisés (9, 10, 22, 23, 25, 32, 34, 41, 43, 45) sont précisées sur la figure.

Tableau 4 | Séquences oligonucléotidiques

A- Amorces utilisées pour la génération de la région 5' de la construction utilisée en ribosome display ainsi que pour la randomisation de la séquence d'Aho7c

T7C	5'-ATACGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCTC-3'
SDA_FLAG.1	5'-AGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATATCTATGGACTACAAAGATGACGATGACAAA-3'
AF-Lib5.1.1	5'-CTACAAAGATGACGATGACAAAGGATCCGCGACCAAGTAAATTC-3'
AF-Lib5.2	5'-TCCGCGACCAAAAGTAAATTCAAA NHKNHK GGTGAGGAAAAAGAGGTGGATATTAGCAAGATC-3'
AF-Lib5.3 (L5)	5'-CTTGCCGTTGTCGTCGTAS NN AAAA SNN GATCATTTTGCCGACACGS SNN CAC SNN SNNGATCTTGCTAATATCCACCTC-3'
AF-Lib6.3 (L6)	5'-CTTGCCGTTGTCGTCGTAS NN AAAA SNN GAT SNN SNN SNN SNN SNN SNN SNN ACGS SNN CAC SNN TTTGATCTTGCTAATATCCACCTC-3'
AF-Lib5.4	5'-GCAGTTCTTTCGGGGCGTCTTTTTCGGAAAC SNN ACC SNN GCC SNN CTTGCCGTTGTCGTCGTA-3'
AF-Lib5.5	5'-GAATTCGGCCCCGAGGCCATATAAAGCTTCAGTTTCTCCAGCAGTTCTTTCGGGGCGTC-3'

B- Amorces utilisées pour l'amplification de la séquence TolA clonée dans le vecteur pFPRDV2.1

AG1-link-F	5'-AAGCTTTATATGGCCTCGGGGGCCGAATTC-3'
TolA kurz	5'-CCGCACACCAGTAAGGTGTGCGGTTTCAGTTGCCGCTTTCTTTCT-3'

C- Amorces utilisées pour l'assemblage de la région 5' avec la séquence TolA

T7B	5'-ATACGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGG-3'
TolA kurz	5'-CCGCACACCAGTAAGGTGTGCGGTTTCAGTTGCCGCTTTCTTTCT-3'

B-Biotinylation des protéines recombinantes rCD38h et rCD38m

Certaines étapes de la sélection par ribosome display nécessitent la biotinylation préalable des protéines cibles afin de pouvoir les fixer sur un support solide (plaque, billes magnétiques) par liaison avec des protéines de type avidine. rCD38h et rCD38m sont biotinylés par l'enzyme BirA qui permet d'attacher de manière covalente une biotine au niveau de la séquence AviTag des protéines recombinantes [208]. Cette réaction est réalisée par incubation des protéines rCD38h ou rCD38m à une concentration de 5µM avec une concentration équivalente d'enzyme BirA et d'ATP et une concentration 20 fois supérieure de biotine. Ces réactifs sont dilués en H₂O puis incubés 24h à température ambiante. Les protéines rCD38m biotinylée (rCD38m biot) et rCD38h biotinylée (rCD38h biot) sont ensuite dialysées contre du PBS.

Le nombre de biotines par protéine, théoriquement égal à 1 lorsque l'on procède à la biotinylation enzymatique d'une protéine avec une séquence AviTag unique, est déterminé par un test HABA (4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid) (Sigma-Aldrich). Pour ce faire, la protéine dont nous souhaitons connaître le niveau de biotinylation va être diluée dans une solution d'HABA et d'avidine en complexe. Du fait de sa plus grande affinité pour l'avidine, la biotine va rompre la liaison HABA-avidine entraînant une baisse de l'absorbance à 500nm de ce composé proportionnelle à la quantité de biotine présente en solution. Par cette méthode, la concentration en biotine d'un échantillon peut être évaluée par mesure de l'absorbance d'une solution d'HABA-avidine avant et après ajout de la protéine biotinylée dans la solution.

Brièvement, une solution d'HABA à 0,01M est préparée et la DO est mesurée à 500 nm (valeur A1). La solution de protéine biotinylée est ensuite diluée au 10^{ème} dans la solution d'HABA, puis la DO à 500nm de cette solution est mesurée (valeur A2). La valeur du delta d'absorbance A1-A2 permet de calculer la concentration molaire de biotine en solution par application de la loi de Beer-Lambert-Bouguer ($A = \epsilon \cdot l \cdot C$ où « A » est l'absorbance à la longueur d'onde considérée, « ϵ » le coefficient d'atténuation molaire relatif à l'entité chimique considérée, « l » la longueur du trajet parcouru par la lumière dans le milieu considéré et « C » la concentration de l'entité chimique étudiée).

$$\text{Concentration biotine} = \frac{(0,9 * A1) - A2}{34\,000 * 1}$$

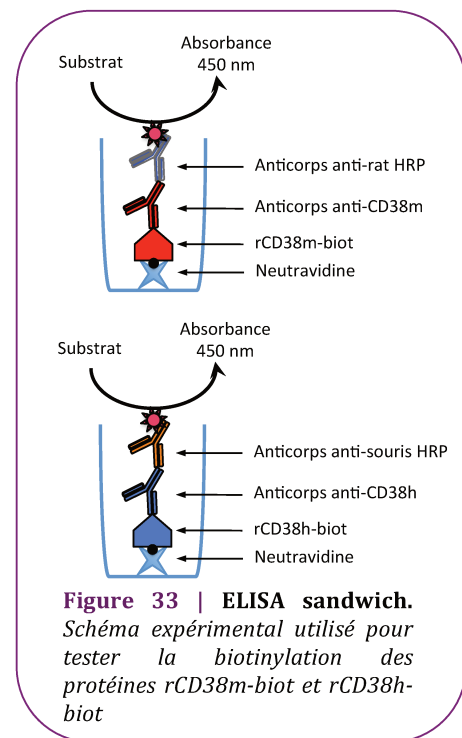
Où « 0,9 » est un facteur de correction permettant d'ajuster la dilution de la solution d'HABA-avidine par la solution de protéine biotinylée, « 34 000 » est le coefficient d'extinction molaire du complexe HABA-avidine à 500nm (en M⁻¹cm⁻¹), « 1 » est la longueur du trajet de la lumière dans la cuve (cm).

Le nombre de biotines par protéine est ensuite calculé à l'aide du rapport suivant. Le facteur 10 permet de tenir compte de la dilution de la solution de protéines.

$$\text{Nombre de biotines par protéine} = \frac{10 * [C]_{\text{biotine}}}{[C]_{\text{protéine biotinylée}}}$$

Les protéines biotinylées ainsi que le système de capture neutravidine-biotine qui sera utilisé pendant les sélections sont ensuite testés par ELISA sandwich selon le protocole ci-dessous :

- Dépôt d'une solution de neutravidine (Sigma-Aldrich) diluée à 4µg/mL en PBS en plaque 96 puits Nunc Maxisorp, 100µL/puits, incubation 1h30 à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
- Trois lavages PBS-Tween 0,1%, 200µL/puits.
- Saturation des puits par une solution de PBS-BSA 1%, 100µL/puits, 1h30 d'incubation à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
- Trois lavages PBS-Tween 0,1%, 200µL/puits.
- Dépôt des échantillons de protéines rCD38h-biot et rCD38m-biot diluées à 2µg/mL en PBS-BSA 0,1%, 100µL/puits, incubation 1h30 à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
- Trois lavages PBS-Tween 0,1%, 200µL/puits.
- Incubation avec les anticorps primaires anti-CD38 dilués à 2µg/mL en PBS-BSA 0,1%, 100µL/puits, 1h d'incubation à température ambiante sous agitation (AcM anti-CD38 humain : clone HIT2, IgG1K de souris, eBioscience ; AcM anti-CD38 murin : clone 90, IgG2aK de rat, eBioscience).
- Six lavages PBS-Tween 0,1%, 200µL/puits.
- Incubation avec les AcM secondaires selon l'isotype de l'AcM primaire (1h d'incubation à température ambiante sous agitation douce à 200rpm). Pour l'AcM anti-CD38 humain : incubation avec un AcM anti-souris HRP dilué à 0,4µg/mL en PBS-BSA 0,1%, (Jackson). Pour l'AcM anti-CD38 murin : incubation avec un AcM anti-rat HRP dilué à 0,4µg/mL en PBS-BSA 0,1% (Sigma-Aldrich).
- Six lavages PBS-Tween 0,1%, 200µL/puits.
- Révélation avec une solution d'OPD (Sigma-Aldrich) diluée en PBS à une concentration de 1mg/mL, 50µL par puits, incubation 5min sous agitation douce (200rpm).
- Lecture de la DO à 450nm à l'aide du lecteur de plaque Infinite 200 Pro (Tecan).



III-Sélection par ribosome display

La technique de ribosome display permet la sélection de séquences, issues des banques L5 et L6 générées précédemment, codant pour des Affitines présentant une affinité pour la cible choisie par l'expérimentateur. On estime qu'il faut généralement 5 tours de sélection pour enrichir de manière significative une banque en séquences d'intérêts. Nous avons choisi rCD38m comme cible de notre première sélection afin de disposer d'Affitines pouvant faire l'objet d'expériences dans le cadre du modèle murin syngénique de MM développé par l'équipe.

Un tour de sélection par ribosome display comporte plusieurs étapes :

- Transcription *in vitro* des banques d'ADN (a)
- Extraction et purification des ARNm (b)
- Traduction *in vitro* des ARNm (c)
- Sélection des complexes ternaires ARN/ribosome/Affitine (d)
- Elution des ARNm (e) et purification (f)
- Rétro-transcription *in vitro* des ARNm (g), RT-PCR (h), clonage dans le vecteur pFPRDV2.1 (i) et amplification par PCR des séquences (j)

Ces différentes étapes sont rappelées dans la **figure 34** ci-dessous et décrites dans les paragraphes suivants. Pour chacune de ces étapes, les banques L5 et L6 sont traitées de manière indépendante et ne sont pas mélangées.

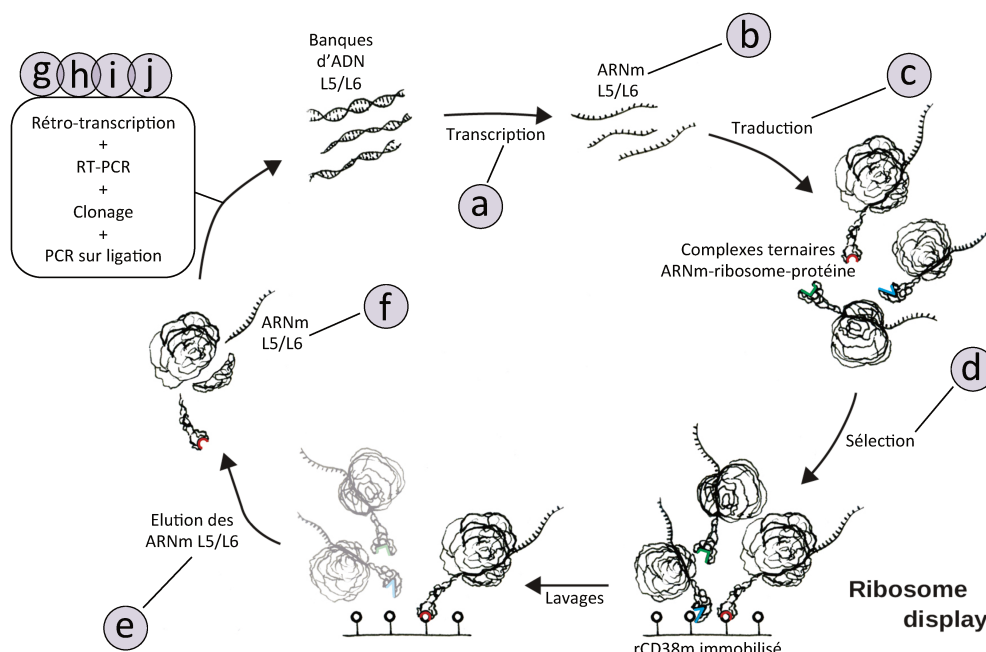


Figure 34 | Représentation schématique de la technique de Ribosome Display

Les banques d'ADN L5 et L6 sont transcrites (a), les ARNm L5/L6 purifiés (b) puis traduits (c). L'absence de codon stop à la fin des ARNm empêche la dissociation du ribosome (qui reste au niveau de la séquence TolA) et le relargage de la protéine native favorisant la formation de complexes ternaires. Ces complexes ARNm-ribosome-Affitine sont ensuite incubés avec rCD38m, préalablement immobilisé sur un support solide (d). Les complexes ternaires non fixés sont éliminés lors des étapes de lavage. Les ARNm des complexes liés à la protéine cible sont ensuite élués (e), purifiés (f), rétro-transcrits (g), amplifiés par PCR (h), clonés dans le vecteur pFPRDV2.1 (i) puis de nouveau amplifiés par PCR (j). Ces nouvelles banques L5/L6, enrichies en séquences d'intérêt, peuvent être utilisées pour un nouveau cycle de ribosome display ou bien être criblées. (Adapté à partir d'un dessin de Jérémie Segard, 2013, <http://jeremy-segard.com/>). Les étapes indiquées en lettres minuscules sur le schéma (a→j) sont décrites plus précisément dans les paragraphes suivants à la lettre correspondant (paragraphe A→J).

A-Transcription *in vitro* des banques ADN L5 et L6

Les banques ADN L5 et L6 sont transcrites avec le kit « TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit » (ThermoScientific) selon les instructions du fabricant. Brièvement, un mélange réactionnel contenant 1,25µg d'ADN (L5 ou L6), 4µL de tampon TranscriptAid 5X, 8µL d'une solution de NTP (nucléotides triphosphate) à 40mM, 2µL de mélange contenant l'ARN polymérase T7 et de l'H₂O en quantité suffisante (QSP) pour 20µL est réalisé. Ce mélange est incubé 2h à 37°C. 1µL de DNase I (50U/µL, ThermoScientific) est ensuite ajouté suivi par une incubation de 20min à 37°C. La réaction est stoppée par ajout de 2µL d'EDTA (Éthylènediaminetétraacétique) 0,5M (Fermentas) et incubation pendant 10min à 65°C.

B-Extraction et purification des ARNm L5 et L6

Les ARNm L5/L6 obtenus sont ensuite extraits et purifiés afin d'être utilisables pour la sélection. Cette purification nécessite plusieurs étapes et est réalisée selon le protocole par précipitation au chlorure de lithium suivant :

- Dilution des mélanges d'ARNm L5 et L6 avec 180µL d'H₂O.
- Ajout de 200µL de chlorure de lithium 6M. Conservation sur glace pendant 30min.
- Centrifugation à 20 000g pendant 30min dans une centrifugeuse préalablement refroidie à 4°C.
- Elimination du surnageant, mise en suspension du culot et lavage avec 500µL d'éthanol 70%.
- Centrifugation à 20 000g pendant 5min à 4°C.
- Elimination du surnageant et séchage du culot en Speedvac (5min, -900mbar).
- Reprise du culot avec 200µL d'H₂O.
- Centrifugation à 20 000g pendant 5min à 4°C.
- Transfert des solutions en tube Eppendorf neuf.
- Ajout de 20µL d'acétate de sodium 3M et de 500µL d'éthanol 100%.
- Incubation à -20°C pendant 30min.
- Centrifugation à 20 000g pendant 30min à 4°C.
- Elimination du surnageant, reprise et lavage du culot avec 500µL d'éthanol 70°C à 4°C.
- Centrifugation à 20 000g pendant 5min à 4°C.
- Elimination du surnageant et séchage du culot en Speedvac (5min, -900mbar).
- Solubilisation du culot dans 52µL d'H₂O.

Les ARNm L5 et L6 ainsi extraits sont dosés puis déposés sur gel d'agarose 1,5% afin de contrôler leur intégrité.

Les ARNm sont ensuite purifiés à l'aide du kit « NucleoSpin® RNA clean up XS (Macherey-Nagel). Brièvement, 60µg d'ARNm L5 ou L6 sont dilués dans un volume final de 250µL d'H₂O puis incubés avec 50µL d'une solution de DNase à 37°C pendant 30min. La purification est ensuite réalisée à l'aide de colonnes Nucleospin RNA XS selon les indications fournies par le fabricant. Les ARNm ainsi purifiés sont élués dans 20µL d'H₂O, dosés puis déposés sur gel d'agarose 1,5% afin de contrôler leur intégrité.

C-Traduction *in vitro* des ARNm L5 et L6

La traduction des ARNm constitue une étape clé de la sélection par ribosome display, puisqu'elle va permettre la formation des complexes ternaires ARNm/ribosome/Affitine qui

seront incubés en présence de la cible. La traduction est réalisée *in vitro* selon le protocole suivant :

- Réalisation d'un mélange réactionnel contenant les réactifs suivants :
 - 12,59µL de pré-mélange Z (50mM Tris-HOAc pH 7.3 ; 30mM NH₄OAc ; 12,3mM Mg(OAc)₂ ; 0,35mM de chaque acide aminé, 2mM d'ATP, 0,5mM de GTP, 1mM cAMP, 0,5mg/mL d'ARNt d'*E.coli*, 20µg/mL d'acide folique, 100mM KOAc, 30mM d'acétylphosphate)
 - 12,50µL de S30 (extrait d'*E.coli* [209])
 - 0,5µL de méthionine à 200mM
 - 2,5µg ARNm L5 ou L6 purifiés lors de l'étape précédente
 - H₂O QSP 27,5µL
- Incubation du mélange 8 min à 37°C.
- Arrêt de la traduction par ajout de 121µL de « solution stop glaciale ». Cette solution est composée de 125,5µL d'H₂O, 7,5µL BSA 10%, 1,88µL héparine, 0,15µL Tween 20 et 15µL de tampon de lavage 10x (50mM Tris-acetate pH 7.4, 150mM NaCl, 50mM acétate de magnésium). Ce réactif est stocké sur glace pendant 20min avant utilisation.
- Centrifugation de tubes contenant la traduction stoppée (20 000g, 5min, 4°C).
- Les tubes sont conservés sur glace jusqu'à utilisation.

D-Sélection des Affitines d'intérêt

Cette étape permet de sélectionner les Affitines présentant une affinité pour la protéine cible. Les complexes ternaires générés lors de l'étape précédente sont incubés avec rCD38m fixé sur un support solide lors d'une étape dites de « panning » après avoir été préalablement mis au contact des éléments du support solide seuls lors d'une étape de « pré-panning ». Cette étape de pré-panning doit permettre de s'affranchir des éventuelles protéines d'affinité présentant une spécificité pour des composants autres que la protéine cible (BSA, neutravidine, streptavidine...). Toutes les étapes de la sélection se déroulent en chambre froide (4°C) afin de minimiser le risque de dissociation des complexes ternaires. Il est à noter que certains paramètres du protocole de sélection vont varier selon le tour de sélection réalisé. Différents supports solides sont par exemple utilisés en alternance pour capter la protéine cible (plaque Nunc 96 puits sensibilisée par une solution de neutravidine, billes magnétiques, billes agarose-avidine...) afin de minimiser la rétention d'Affitines spécifiques de ces éléments de fixation. Le temps de lavage ainsi que le nombre de cycles de PCR effectués à l'issue de la sélection vont également varier selon le tour de sélection considéré. Dans un but de simplification, le protocole présenté ci-dessous est celui réalisé lors du premier tour de la sélection I. Lorsqu'un paramètre décrit est amené à être modifié lors des tours suivants, un renvoi est proposé vers le **tableau 5** (cf. p91) qui décrit en détail les protocoles utilisés lors des différentes sélections.

Le premier tour de la sélection I est réalisé en fixant rCD38m-biotinylé sur une plaque Nunc Maxisorp 96 puits préalablement sensibilisée par une solution de neutravidine. Le protocole utilisé est le suivant :

- Préparation des puits de pré-panning et de panning
 - Dépôt d'une solution de neutravidine (Sigma-Aldrich) diluée à 4µg/mL en PBS en plaque 96 puits Maxisorp (cf. **tableau 5**), 100µL/puits, incubation 1h30 à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
 - Trois lavages PBS, 200µL/puits.
 - Saturation des puits par une solution de PBS-BSA 1%, 100µL/puits, incubation sur la nuit à 4°C, sous agitation douce (200rpm).
 - Trois lavages PBS, 200µL/puits.
 - Les puits dédiés au pré-panning et au panning sont incubés avec 100µL de PBS-BSA 0,1%.
 - Juste avant la sélection : les puits sont lavés avec 3 fois 300µL de PBS et 1 fois 300µL de TBS (tampon tris salin). Après lavage, les puits sont incubés avec 300µL de TBS jusqu'au dépôt des échantillons (4°C, sous agitation modérée à 300rpm).
- Sélection :
 - Étape de pré-panning : Après élimination du TBS, les puits dédiés au panning négatif sont incubés avec 140µL de la solution de traduction stoppée L5 ou L6 (1h, 4°C, sous agitation douce à 200rpm).
 - Étape de panning : les surnageants sont collectés en tubes de 1.5mL. La protéine rCD38m-biot est ajoutée dans le surnageant de manière à obtenir une concentration finale de 150nM de protéine cible (cf. **tableau 5**). Incubation pendant 1h à 4°C sous agitation douce (200rpm). Cette étape doit permettre la fixation des Affitines (toujours associées au ribosome et à l'ARNm) présentant une affinité pour rCD38m.
 - Les surnageants sont récupérés et incubés dans les puits dédiés au panning (1h, 4°C, sous agitation douce à 200rpm). rCD38m-biot et les complexes ternaires associés vont être capturés par la neutravidine fixée en fonds de puits.
 - Après élimination du surnageant, les puits de panning sont lavés 6 fois pendant 10 secondes. L'étape de lavage va permettre d'éliminer les Affitines ne présentant pas une affinité intéressante pour la cible d'intérêt. Afin de conserver un maximum de diversité et de ne pas risquer de perdre des variants peu représentés dans la population, il est nécessaire d'adapter la stringence du lavage (le temps de lavage et le nombre) en fonction du tour de sélection considéré. En fin de sélection (tour 5 par exemple) le temps de lavage sera ainsi considérablement augmenté afin d'isoler des Affitines de forte affinité (cf. **tableau 5**).

E-Elution des ARNm L5 et L6

Suite aux étapes de lavage, les ARN L5 et L6 sont élués par dissociation des complexes ternaires toujours liés à la protéine cible. L'éluion est réalisée par l'ajout de 200µL par puits de tampon d'éluion (50mM Tris HOAc pH 7.5, 150mM NaCl, 20mM d'EDTA et 50µg/mL d'ARN de *S. cerevisiae*). Une incubation de 10min à 4°C sous agitation modérée (300rpm) est effectuée avant de récupérer le tampon d'éluion contenant les ARN sélectionnés.

F-Purification des ARNm L5 et L6

La purification des ARNm élués est réalisée à l'aide du kit « RNeasy MinElute Cleanup » (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Les ARNm sont élués dans 14µL d'H₂O.

G-Rétro-transcription

Avant la rétro-transcription (RT), 0,2µL d'oligonucléotide AG1-link-R à 100µM sont ajoutés à chaque échantillon. Une incubation de 5min à 70°C est ensuite effectuée afin de permettre l'hybridation de l'oligonucléotide.

La RT des ARNm est réalisée à l'aide du kit « RevertAid RT Reverse Transcription » (ThermoFischer) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, un mélange réactionnel contenant 4µL de tampon de RT, 2µL de dNTP (désoxyribonucléotides triphosphate) à 10mM, 0,5µL de Ribolock (40U/µL) et 1µL d'enzyme Revert Aid Minus H RT (200U/µL) est ajouté à chaque échantillon. La RT est effectuée à 42°C pendant 1h puis stoppée en chauffant les échantillons à 70°C pendant 10min.

H-RT-PCR

La RT-PCR est réalisée avec la « Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase » (ThermoFischer). Un mélange est préparé avec 10µL de tampon HF 5X, 1µL de dNTP à 10mM, 2µL de DMSO, 0,5µL de Phusion HM, 0,12µL d'amorce RDV2.1-F3 à 100µM, 0,12µL d'amorce AG1-link-R à 100µM et 5µL de produit de RT et de l'H₂O qsp 50µL. 40 cycles de PCR sont réalisés à l'issue du premier tour de sélection. Au fur et à mesure des tours de sélection, le nombre de cycles de PCR est abaissé du fait de l'enrichissement des banques en séquences d'intérêt (cf. **tableau 5**).

Programme PCR	
98°C	30s
98°C	10s
61°C	30s
72°C	20s
}	
x40	
72°C	5min
14°C	∞

Amorces utilisées pour la RT-PCR

RDV2.1-F3	5'-GATGACGATGACAAAGGATCC-3'
AG1-link-R	5'-GAATTCGGCCCCCGAGGCCATATAAAGC-3'

Les ADN amplifiés par PCR sont déposés sur gel d'agarose 1,5% afin de s'assurer de la réussite du tour de sélection. Si le résultat est positif, les ADN L5 et L6 sont purifiés selon les instructions du kit « Wizard® DNA Clean-Up System » (Promega). Les ADN sont élués dans 30µL d'H₂O.

I-Clonage dans pFPRDV2.1

Les ADN L5 L6 purifiés sont digérés par les enzymes de restriction BamHI et HindIII, purifiés avec le kit « Wizard® DNA Clean-Up System » (Promega) utilisé selon les instructions du fabricant puis clonés dans le vecteur pFPRDV2.1 à l'aide de la T4 DNA ligase (ThermoFischer) utilisée selon les instructions du fournisseur. Ce clonage permet de réinsérer les banques de séquence L5 et L6 sélectionnées entre les éléments nécessaires à un nouveau tour de sélection (promoteur T7, étiquette Flag, séquence TolA).

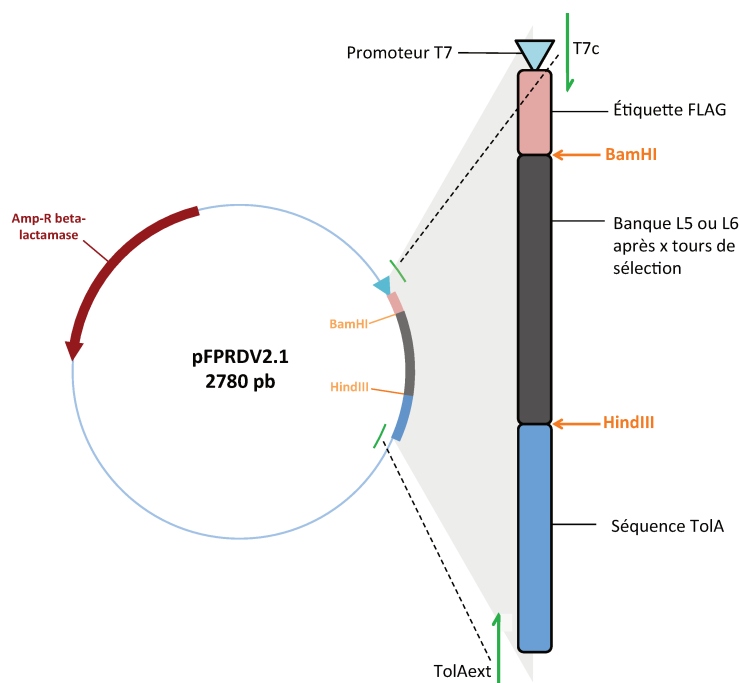


Figure 35 | Carte du plasmide pFPRDV2.1 après clonage des séquences issues de la sélection. Zoom sur la région du site de clonage multiple (SCM) au sein de laquelle sont clonées les banques d'ADN L5 et L6 préalablement digérées par BamHI et HindIII. Les séquences sont encadrées en 5' par un promoteur T7 et une étiquette FLAG et en 3' par la séquence TolA. La PCR sur ligation de l'étape suivante (voir ci-dessous) est réalisée en utilisant les amorces T7c et TolAext. Cette PCR permet de retrouver un fragment d'ADN linéaire possédant les éléments nécessaires à un nouveau cycle de sélection (promoteur T7, séquence TolA).

J-PCR sur ligation

Cette étape de PCR permet de générer une banque d'ADN linéaire contenant les banques de séquences L5 ou L6 obtenues à l'issue du tour de sélection précédent, encadrées des éléments nécessaires à un nouveau cycle de ribosome display (promoteur T7, séquence TolA). Un mélange de PCR est réalisé selon les paramètres décrits ci-dessus pour la RT PCR (amorces : T7C 0,2µM final et TolAext 0,2µM final).

Programme PCR

98°C	30s	
98°C	10s	} x30
72°C	15s	
72°C	30s	
72°C	5min	
14°C	∞	

Amorces utilisées pour la PCR sur ligation

T7c	5'-ATACGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTCCCTC-3'
TolAext	5'-CCGCACACCAGTAAGGTGTGCGGTTTCAGTTGCCGCTTCTTTCTTGCTTCAGCTGCAGCTGCTTC-3'

Les ADN sont déposés sur gel d'agarose 1,5% afin de s'assurer de la réussite de la PCR et vérifier les tailles des fragments obtenus. Les banques ADN L5 et L6 sont ensuite purifiées puis transcrites afin de réaliser un nouveau tour de sélection.

Au bout de cinq tours, un ELISA de contrôle de l'enrichissement des banques L5 et L6 en Affitines anti-CD38 murin est effectué.

Tableau 5 | Détails des paramètres appliqués pendant les tours de différentes sélections réalisées

I	Tours de sélection				
	1	2	3	4	5
Support	Plaques 96p maxisorp / neutravidine	Billes magnétiques / streptavidine	Billes agarose / avidine	Billes magnétiques / streptavidine	Billes magnétiques / neutravidine
[C] rCD38m	150nM	100nM	33nM	11nM	3,7nM
Nombre de lavages	4	6	8	10	10
Temps total de lavage	1min	5min	15min	1h	3h
Nombre de cycles de PCR	40	35	30	25	20

Sélection I contre rCD38m

Sélection réalisée en fixant rCD38m-biot au support solide (plaque, billes) par l'intermédiaire de protéines capables de se lier fortement à la biotine (neutravidine, streptavidine, avidine). La concentration de la protéine cible est abaissée au fur et à mesure des tours afin de favoriser la sélection d'Affinités de haute affinité.

II	Tours de sélection				
	1	2	3	4	5
Support	Plaques 96p maxisorp / neutravidine	Billes magnétiques rCD38m	Billes agarose / avidine	Billes magnétiques AcM anti-AviTag	Billes magnétiques rCD38m
Nombre de lavages	4	6	8	10	10
Temps total de lavage	1min	5min	15min	1h	3h
Nombre de cycles de PCR	40	35	30	25	20

Sélection II contre rCD38m

Sélection réalisée en fixant rCD38m-biot au support solide (plaque, billes) par l'intermédiaire d'avidine ou de neutravidine. Des billes magnétiques conjuguées directement avec rCD38m ou avec l'anticorps anti-AviTag sont utilisées en alternance. La concentration en protéine cible est maintenue constante tout au long des tours de sélection lorsqu'il est possible de la déterminer.

III	Tours de sélection				
	1	2	3	4	5
Support	Plaques 96p maxisorp / neutravidine	Billes magnétiques rCD38m	Billes agarose / avidine	Billes magnétiques AcM anti-AviTag	Billes magnétiques rCD38m
[C] Affinités anti-rCD38m			40µM C6 40µM D7	40µM C6 40µM D7	40µM C6 40µM D7
Nombre de lavages	4	6	8	10	10
Temps total de lavage	1min	5min	15min	1h	3h
Nombre de cycles de PCR	40	35	30	25	20

Sélection III contre rCD38m

Sélection réalisée dans les mêmes conditions que la sélection II. Deux Affinités anti-rCD38m (C6 et D7) générées lors des sélections précédentes sont incubées en excès (40µM) avec la cible afin de masquer les épitopes reconnus. Cette incubation est réalisée en amont des étapes de pré-panning et de panning. Ce procédé est appliqué à partir du tour n3 et vise à orienter la sélection vers des Affinités spécifiques d'épitopes peu représentés dans les sélections précédentes.

IV	Tours de sélection				
	1	2	3	4	5
Support	Plaques 96p maxisorp / neutravidine	Billes magnétiques rCD38m	Membranes cellulaires CD38+	Membranes cellulaires CD38+	Membranes cellulaires CD38+
Nombre de lavages	4	6	8	10	10
Temps total de lavage	1min	5min	15min	1h	3h
Nombre de cycles de PCR	40	35	30	25	20

Sélection IV contre (r)CD38m

Les deux premiers tours de sélection sont effectués de manière identique à la sélection II. Des extraits de membrane issus de la lignée 5T33-Luc(+)-CD38(+) pour le panning positif et de la lignée 5T33-Luc(+) pour le panning négatif sont utilisés pour les trois derniers tours afin de sélectionner des Affinités contre CD38 murin exprimé à la membrane des cellules.

Sélection I : la concentration de la protéine cible est abaissée au fur et à mesure des tours de sélection. Cette stratégie doit permettre la sélection d'Affinités de forte spécificité pour la cible en favorisant des mécanismes de compétition entre les protéines d'affinité. Détails de l'étape de panning : après l'étape de pré-panning, les mélanges de traduction sont récupérés puis incubés avec rCD38m-biot à la concentration indiquée. Après 1h à 4°C sous agitation, la solution est incubée avec le support solide permettant la capture de la protéine cible par sa biotine (puits sensibilisés par de la neutravidine ; billes magnétiques/streptavidine (Roche) ; billes magnétiques/neutravidine (Ademtech) ; billes agarose/avidine (Sigma-Aldrich)).

Sélection II : Utilisation de nouveaux support solides pour cette sélection : billes magnétiques (Ademtech) couplées de manière covalente avec rCD38m ou avec l'anticorps anti-AviTag. Lors des tours de sélection avec les billes magnétiques couplées avec rCD38m, pas d'étape intermédiaire d'incubation avec la cible après le pré-panning

Sélection III : les Affinités anti-rCD38m utilisées lors de cette sélection ont été produites et purifiées selon le protocole de production des Affinités à grande échelle détaillé p98-99. Ces protéines ont été testées par ELISA afin de valider leur capacité de reconnaissance du rCD38m.

Sélection IV : les lignées cellulaires 5T33-Luc(+)-CD38^{high} et 5T33-Luc(+) utilisées pour cette sélection sont décrites dans la 2^{ème} partie du matériels et méthodes.

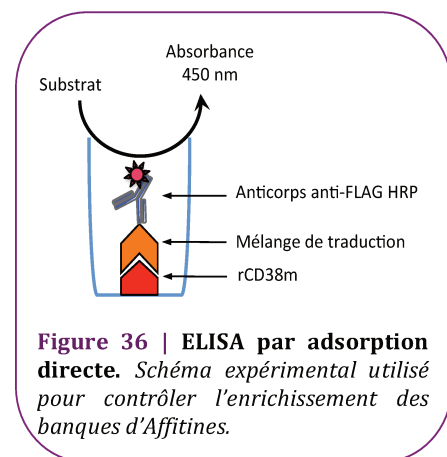
IV-ELISA de contrôle de l'enrichissement des banques

A l'issue de la sélection, l'enrichissement des banques d'ADN L5 et L6 en séquences codant pour des Affitines présentant une affinité pour rCD38m est contrôlé par ELISA. De manière analogue au protocole utilisé pour la sélection, les ADN vont être transcrits puis traduits. Les Affitines issues de la traduction vont ensuite être incubées avec la cible. La présence d'une étiquette FLAG en 5' des séquences Affitines autorise la détection de ces protéines via un AcM anti-FLAG couplé à la HRP. Deux modalités d'ELISA sont utilisées dans ce contexte : l'adsorption directe ou le sandwich. Pour ces deux procédés, une traduction de 2,5µg ARNm/puits est réalisée par incubation du mélange réactionnel (décrit au paragraphe « c : Traduction *in vitro* des ARNm L5 et L6 ») à 37°C pendant 1h. Ce temps de traduction, plus long que lors de la sélection (8min), va permettre au ribosome de se dissocier du brin d'ARNm, de libérer les protéines natives et ainsi répéter le processus de traduction sur plusieurs ARNm. La traduction est stoppée par ajout de 72,5µL de PBS-Tween 0,1% par réaction.

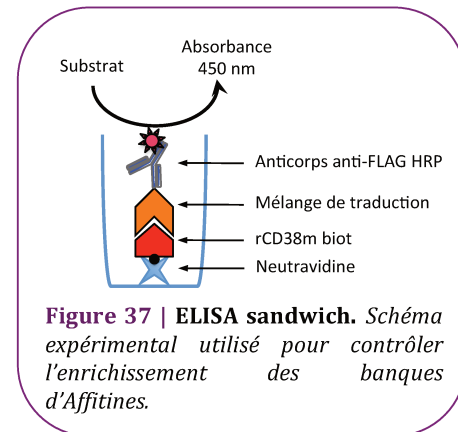
Les protocoles utilisés sont décrits ci-dessous.

○ ELISA par adsorption directe

- Dépôt de rCD38m dilué à 5µg/mL en PBS en plaque 96 puits Nunc Maxisorp, 100µL/puits, incubation 1h à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
- Trois lavages PBS-Tween 0,1%, 200µL/puits.
- Saturation des puits par une solution de PBS-BSA 1%, 100µL/puits, 1h30 d'incubation à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
- Trois lavages PBS-Tween 0,1%, 200µL/puits.
- Incubation avec la solution de traduction stoppée, 100µL/puits, 1h d'incubation à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
- Six lavages PBS-Tween 0,1%, 200µL/puits.
- Incubation avec l'AcM de révélation anti-Flag HRP (Sigma-Aldrich, clone M2) dilué à 0,1µg/mL en PBS-Tween 0,1%, 100µL/puits, 1h d'incubation à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
- Six lavages PBS-Tween 0,1%, 200µL/puits.
- Révélation avec une solution d'OPD (Sigma-Aldrich) diluée en PBS à une concentration de 1mg/mL, 50µL par puits, incubation 5min sous agitation douce (200rpm).



- Lecture de la DO à 450nm à l'aide du lecteur de plaque Infinite 200 Pro (Tecan).
- ELISA en sandwich
- Dépôt d'une solution de neutravidine (Sigma-Aldrich) diluée à 4µg/mL en PBS en plaque 96 puits Nunc Maxisorp, 100µL/puits, incubation 1h30 à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
 - Trois lavages PBS-Tween 0,1%, 200µL/puits.
 - Saturation des puits par une solution de PBS-BSA 1%, 100µL/puits, 1h30 d'incubation à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
 - Trois lavages PBS-Tween 0,1%, 200µL/puits.
 - Dépôt de rCD38m biotinylé dilué à 2µg/mL en PBS-BSA 0,1%, 100µL/puits, incubation 1h30 à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
 - Trois lavages PBS-Tween 0,1%, 200µL/puits.
 - Les étapes suivantes sont identiques à celles de l'ELISA par adsorption directe.



Si l'ELISA permet de démontrer un enrichissement des banques, un clonage des banques dans un vecteur d'expression est effectué afin de pouvoir procéder au criblage et isoler les Affitines présentant une affinité pour rCD38m.

V-Clonage des banques d’Affitines

À l’issue de la vérification de l’enrichissement des banques par ELISA, un clonage des séquences est réalisé dans le vecteur d’expression pFP1001. Ce vecteur est ensuite utilisé pour la transformation de bactéries compétentes qui, après étalement sur boîte de Pétri, permettront d’isoler et de produire les Affitines.

A-Ligation des banques L5 et L6 dans pFP1001

Les produits de RT-PCR obtenus à l’issue du dernier tour de sélection sont digérés par les enzymes de restriction BamHI et HindIII, purifiés selon les instructions du kit « Wizard® DNA Clean-Up System » (Promega) puis clonés dans le vecteur pFP1001 à l’aide de la T4 DNA ligase (ThermoFischer) utilisée selon les instructions du fournisseur. Ce plasmide possède les séquences nécessaires à l’expression des Affitines en système procaryote ainsi qu’à l’ajout d’une étiquette RGS-6polyhistidine en 5’ des séquences (cf **figure 38**). Cette étiquette polyhistidine va permettre la purification ultérieure des Affitines sur colonne d’affinité Ni-NTA (Nickel-acide nitrilotriacétique) et leur détection à l’aide d’anticorps anti-RGS-6His.

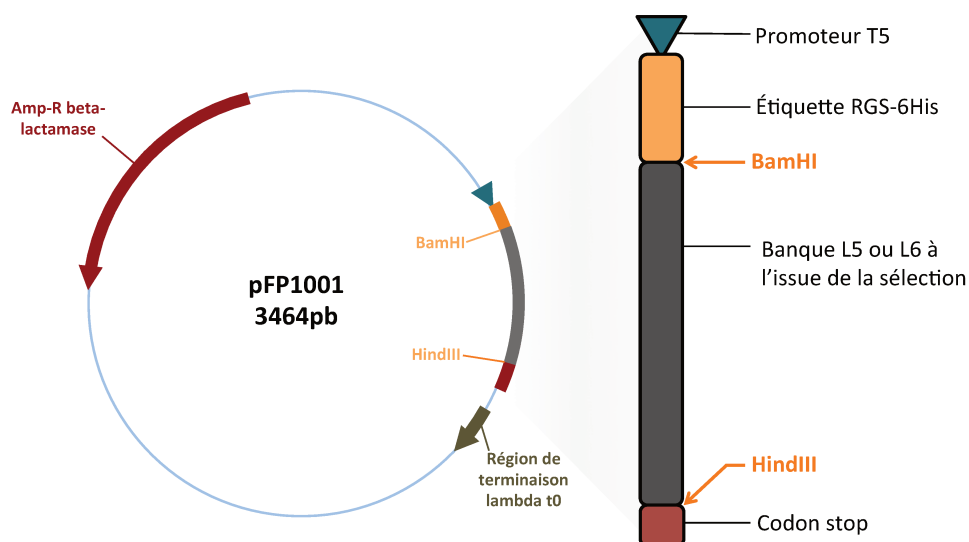


Figure 38 | Carte du plasmide pFP1001 après clonage des séquences issues de la sélection. Zoom sur la région du site de clonage multiple (SCM) au sein de laquelle sont clonées les banques d’ADN L5 et L6 préalablement digérées par BamHI et HindIII. L’étiquette RGS-6His ajoutée en amont va permettre la purification des Affitines sur colonne d’affinité Ni-NTA ainsi que leur détection à l’aide d’un anticorps anti-RGS-6His.

B-Transformation bactérienne

Les produits de ligation obtenus lors de l'étape précédente sont utilisés pour transformer des bactéries compétentes DH5alphaLAcI^q. Le protocole suivant est mis en œuvre :

- 15µL de produit de ligation (40ng d'ADN) sont ajoutés à une solution de 200µL de bactéries compétentes DH5alphaLAcI^q. Une homogénéisation douce est réalisée.
- Incubation du mélange 30min sur glace.
- Choc thermique : incubation de 50s à 40°C.
- Incubation 2min sur glace.
- Ajout de 800µL de milieu LB.
- Incubation 1h à 37°C sous agitation douce (200rpm).
- Centrifugation de 5min à 5000g.
- Élimination du surnageant et reprise du culot dans 100µL de LB.
- Étalement des bactéries dans des boîtes de Pétri contenant du milieu LB préalablement complété avec des antibiotiques (ampicilline et kanamycine) afin de sélectionner les bactéries transformées.
- Incubation sur la nuit à 37°C.

Les colonies individuelles obtenues sont ensuite repiquées en plaque deep-well 96 puits.

C-Constitution des plaques mères d'Affitines

A la suite de la transformation, les colonies isolées sont repiquées en plaque deep-well 96 puits selon le protocole suivant :

- Dépôt de 1,4mL de milieu de culture LB supplémenté en ampicilline (100µg/mL final), kanamycine (25µg/mL final) et en glucose (1% final) par puits dans la plaque 96 puits.
- Chaque puits est inoculé avec une colonie isolée sur boîte à l'aide d'un cône de pipette stérile.
- La plaque deep-well est incubée à 37°C sur la nuit sous agitation douce (200rpm).

Cette plaque constitue une plaque mère d'Affitines. Elle est conservée à -80°C après ajout de glycérol (16% final) afin de servir de sauvegarde. Lorsque l'on souhaite réaliser un criblage ou analyser une Affitine particulière, les puits correspondants sont repiqués dans du milieu LB à l'aide de cônes de pipettes stériles.

VI-Criblage des banques d’Affitines

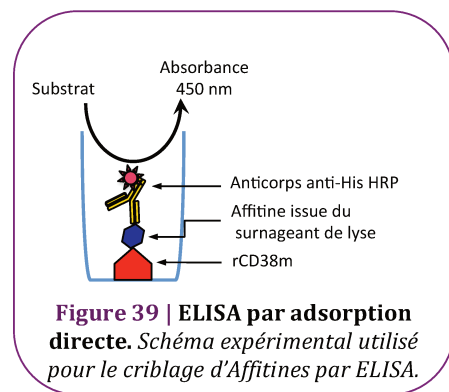
Après clonage des Affitines et constitution des plaques mères, un criblage est réalisé par ELISA dans un premier temps puis par cytométrie en flux dans un second temps. Chacune de ces approches va nécessiter la production préalable des Affitines à partir des plaques mères. Les différents protocoles de production utilisés sont présentés dans le **tableau 6** (cf. p99).

A-Criblage par ELISA

Le criblage par ELISA doit nous permettre de vérifier la spécificité des Affitines sélectionnées par ribosome display pour la protéine rCD38m. Il s’agit d’une première approche de criblage qui permet de confirmer et de préciser les résultats obtenus lors de l’ELISA de contrôle de l’enrichissement des banques. Le protocole détaillé de production d’Affitines pour un criblage par ELISA est présenté dans le **tableau 6**. Brièvement, les Affitines utilisées pour ce criblage sont produites par repiquage des clones provenant des plaques mères dans des plaques deepwell 96 puits contenant du milieu LB supplémenté en antibiotiques et glucose afin de réactiver la population bactérienne (étape de préculture). Une partie du volume de préculture est ensuite utilisée afin d’ensemencer une nouvelle plaque deepwell 96 puits (étape de culture). Après croissance de la population bactérienne, la production des protéines est induite par ajout d’IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) dans le milieu. Une étape d’extraction est ensuite réalisée par lyse des bactéries. Les surnageants obtenus contiennent les Affitines et vont être utilisés pour le criblage par ELISA.

Le criblage par ELISA est réalisé selon le protocole suivant :

- Dépôt de rCD38m non biot dilué à $2\mu\text{g/mL}$ en PBS en plaque 96 puits Nunc Maxisorp, $100\mu\text{L}$ /puits, incubation 1h à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
- Trois lavages PBS-Tween 0,1%, $200\mu\text{L}$ /puits.
- Saturation des puits par une solution de PBS-BSA 1%, $100\mu\text{L}$ /puits, 1h30 d’incubation à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
- Deux lavages PBS-Tween 0,1%, $200\mu\text{L}$ /puits.
- Un lavage TBS, $200\mu\text{L}$ par puits.
- Incubation avec les surnageants de lyse obtenus à l’issue de l’étape d’extraction. $100\mu\text{L}$ sont déposés par puits. Incubation 1h à température ambiante sous agitation douce (200rpm).



- Six lavages TBS-Tween 0,1%, 200µL/puits.
- Incubation avec l'anticorps anti-His HRP (Qiagen) dilué au 1/50 000^{ème} en TBS-Tween 0,1%, 100µL/puits, 1h d'incubation à température ambiante sous agitation douce (200rpm).
- Six lavages TBS-Tween 0,1%, 200µL/puits.
- Révélation avec une solution d'OPD (Sigma-Aldrich) diluée en TBS à une concentration de 1mg/mL, 50µL par puits, incubation 5min sous agitation douce (200rpm).
- Lecture de la DO à 450nm à l'aide du lecteur de plaque Infinite 200 Pro (Tecan).

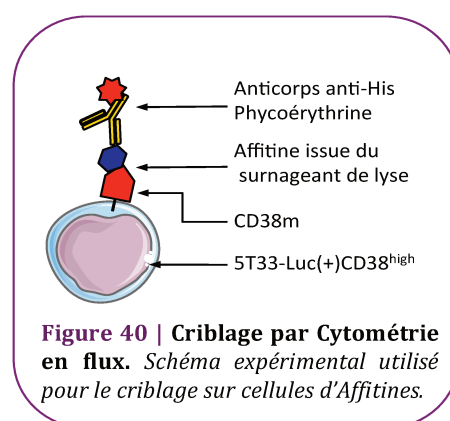
B-Criblage par cytométrie en flux

Le criblage par cytométrie en flux doit nous permettre de confirmer la spécificité des Affitines sélectionnées par ribosome display contre rDC38m pour la protéine CD38m « naturelle » exprimée à la membrane des cellules. Le protocole détaillé de production des Affitines pour un criblage par cytométrie est présenté dans le **tableau 6**. Brièvement, les Affitines utilisées pour ce criblage sont produites par repiquage des clones provenant des plaques mères dans des plaques deepwell 96 puits contenant du milieu LB supplémenté avec du glucose afin de réactiver la population bactérienne (étape de préculture). Une partie du volume de préculture est ensuite utilisée pour ensemercer une nouvelle plaque deepwell 24 puits (étape de culture). Après croissance de la population bactérienne, la production des protéines est induite par ajout d'IPTG dans le milieu. Une étape d'extraction est ensuite réalisée par lyse des bactéries. Les surnageants obtenus sont purifiés par chromatographie d'affinité à l'aide de résine agarose Nickel-NTA (GE healthcare). Cette étape de purification est essentielle car le dépôt direct des surnageants bactériens issus de l'étape de lyse sur les cellules entrainerait la mort de ces dernières.

Le criblage par cytométrie en flux des Affitines purifiées est réalisé sur la lignée de MM murin 5T33-Luc(+)CD38^{high} décrite dans la deuxième partie du manuscrit. Quatorze jours avant criblage, les cellules sont décongelées et cultivées en milieu RPMI 1640 supplémenté. Un passage est effectué tous les 3 jours avec ensemencement de milieu neuf avec 200 000 cellules par mL. Le criblage est ensuite réalisé selon le protocole suivant :

- Dépôt de 200 000 cellules par puits dans une plaque 96 puits à fond conique.
- Centrifugation à 2500g pendant 1min. Le surnageant est retiré par inversion (flicking) de la plaque.
- Deux lavages PBS-BSA 0,1%, 2 fois 150µL par puits.

- Incubation avec les Affitines purifiées préalablement diluées au $\frac{1}{4}$ en PBS-BSA 0,1%, 100 μ L par puits, incubation 1h à 4°C.
- Centrifugation à 2500g pendant 1min. Le surnageant est retiré par inversion de la plaque.
- Incubation avec l'anticorps anti-6His phycoérythrine (ebioscience, clone AD1.1.10) dilué au 1/100^{ème} en PBS-BSA 0,1%, 50 μ L par puits, incubation 1h à 4°C.
- Centrifugation à 2500g pendant 1min. Le surnageant est retiré par inversion de la plaque.
- Trois lavages PBS-BSA 0,1%, 3 fois 150 μ L par puits.
- Centrifugation à 2500g pendant 1min. Le surnageant est retiré par inversion de la plaque.
- Remise en suspension du culot cellulaire avec 200 μ L de PBS.
- Acquisition des résultats par cytométrie en flux (Calibur, BD).



VII-Production d'Affitines à grande échelle

Certains clones d'Affitines, isolés lors des étapes de criblage, sont produits à plus grande échelle afin de disposer des quantités de protéines purifiées nécessaires à la réalisation d'expériences complémentaires.

Le protocole détaillé de production d'Affitines à grande échelle est présenté dans le **tableau 6** ci-dessous. Brièvement, l'Affitine d'intérêt est produite par repiquage du clone correspondant provenant des plaques mères dans un erlenmeyer contenant 50mL de milieu LB afin de réactiver la population bactérienne (étape de préculture). Une partie du volume de préculture est ensuite utilisée afin d'ensemencer 1L de milieu 2YT (étape de culture). Après croissance de la population bactérienne, la production de la protéine est induite par ajout d'IPTG dans le milieu. Une étape d'extraction est réalisée par lyse des bactéries. Les surnageants obtenus sont ensuite purifiés par chromatographie d'affinité à l'aide de résine agarose Nickel-NTA (GE healthcare). Une étape de purification supplémentaire par gel filtration (Sephadex75 16/60, GE healthcare) est réalisée afin d'éliminer les derniers contaminants et de s'affranchir des éventuels multimères ou agrégats.

Tableau 6 | Détail des différents protocoles utilisés pour la production d’Affitines

	Criblage ELISA	Criblage cytométrie	Production à grande échelle
Préculture	Plaque deepwell 96 puits -Préparation plaque: 1,4ml de LB ¹ /puits + pénicilline (100µg/ml final) + kanamycine (25µg/ml final) + glucose (1% final). -Repiquage des clones conservés en plaque mère à -80°C. -Incubation sur la nuit à 37°C sous agitation forte (750 rpm).	Plaque deepwell 96 puits -Préparation plaque: 1,4ml de LB ¹ /puits + pénicilline (100µg/ml final) + kanamycine (25µg/ml final) + glucose (1% final). -Repiquage des clones conservés en plaque mère à -80°C. -Incubation sur la nuit à 37°C sous agitation forte (750 rpm).	Erlenmeyer -Préparation erlenmeyer: 50ml de LB ¹ + pénicilline (100µg/ml final) + kanamycine (25µg/ml final) + glucose (1% final). -Repiquage du/des clone(s) conservé(s) en plaque mère à -80°C. -Incubation sur la nuit à 37°C sous agitation forte (750 rpm).
Culture	Plaque deepwell 96 puits -Préparation plaque: 1,2ml de 2YT ² /puits + pénicilline (100µg/ml final) + kanamycine (25µg/ml final) + glucose (0,1% final). -Ensemencement avec 200µl de milieu de préculture. -Incubation pendant 3h30 à 37°C sous agitation. Induction : -Ajout d’une solution d’IPTG à 500µM/puits final. -Incubation sur la nuit à 30°C sous agitation forte (750 rpm).	Plaque deepwell 24 puits -Préparation plaque: 4,75ml de 2YT ² /puits + pénicilline (100µg/ml final) + kanamycine (25µg/ml final) + glucose (0,1% final). -Ensemencement avec 100µl de milieu de préculture. -Incubation pendant 3h30 à 37°C sous agitation. Induction : -Ajout d’une solution d’IPTG à 500µM/puits final. -Incubation sur la nuit à 30°C sous agitation forte (750 rpm).	Erlenmeyer -Préparation erlenmeyer: 1L de 2YT ² /puits + pénicilline (100µg/ml final) + kanamycine (25µg/ml final) + glucose (0,1% final). -Ensemencement avec 20ml de milieu de préculture. -Incubation pendant 3h30 à 37°C sous agitation. Induction : -Ajout d’une solution d’IPTG à 500µM final. -Incubation sur la nuit à 30°C sous agitation forte (750 rpm).
Extraction	-Centrifugation de la plaque de culture, 2000g/ 20mn. -Elimination des surnageants. -Ajout de 50µl/puits de solution de lyse ³ et remise en suspension des culots. -Incubation de la plaque pendant 30mn à température ambiante sous agitation forte (750 rpm). -Ajout de 250µl de TBS par puits. -Incubation de la plaque pendant 5mn à température ambiante sous agitation forte. -Centrifugation de la plaque à 2000g/ 20mn -Récupération des surnageants contenant les Affitines.	-Centrifugation de la plaque de culture, 2000g/ 20mn. -Elimination des surnageants. -Ajout de 200µl/puits de solution de lyse ³ et remise en suspension des culots. -Incubation de la plaque pendant 30mn à température ambiante sous agitation forte (750 rpm). -Ajout de 1000µl de TBS par puits. -Incubation de la plaque pendant 5mn à température ambiante sous agitation forte. -Centrifugation de la plaque à 2000g/ 20mn -Récupération des surnageants contenant les Affitines.	-Centrifugation du milieu de culture, 4500g/5mn. -Elimination du surnageant. -Reprise du culot dans 30ml de solution de lyse ³ . -Incubation pendant 30mn à température ambiante sous agitation forte (750 rpm). -Sonication pendant 10mn. -Centrifugation 8000g/10mn
Purification		Colonne Ni-NTA -250µl d’une suspension de résine Ni-NTA (GE healthcare) à 50% sont déposés dans chaque colonne. Equilibrage avec 2,4ml de TBS ₅₀₀ ⁴ -Imidazole 10mM -Chargement de 1000µl de surnageant d’extraction par colonne. -Incubation pendant 25mn à température ambiante sans agitation. -Trois lavages TBS ₅₀₀ ⁴ -Imidazole 10mM, 3 fois 1000µl par colonne. -Trois lavages TBS-Imidazole 20mM 2M NaCl, 3 fois 1000µl par colonne. -Equilibrage de la colonne en PBS : Trois lavages PBS-Imidazole 20mM, 3 fois 1000µl par colonne. L’élution des Affitines fixées sur les colonnes est réalisée en deux temps : -Incubation des colonnes avec 150µl d’une solution de PBS-Imidazole 500mM pendant 15mn à température ambiante sans agitation. Les protéines sont éluées par aspiration douce. -Répétition de l’étape précédente afin d’éluer les protéines restantes.	Colonne Ni-NTA -1ml d’une suspension de résine Ni-NTA (GE healthcare) à 50% est déposé dans une colonne. -Equilibrage avec 25ml de TBS ₅₀₀ ⁴ -Imidazole 25mM -Chargement du surnageant sur la colonne. -Incubation pendant 25mn à température ambiante sans agitation. -Lavage avec 30ml de TBS ₅₀₀ ⁴ -Imidazole 25mM. -Lavage avec 10ml de PBS-Imidazole 25mM, 2M NaCl. -Lavage avec 30ml de PBS-Imidazole 25mM. L’élution est réalisée par incubation de la colonne avec 4ml de PBS-Imidazole 500mM pendant 30mn à température ambiante sous agitation. Sephadex75 16/60 -La protéine est ensuite injectée dans une colonne gel filtration (GE healthcare) préalablement équilibrée avec du PBS afin d’éliminer l’imidazole et les derniers contaminants bactériens. Cette étape permet également d’éliminer les éventuels multimères/agrégats solubles.

1-Milieu LB : 10g de tryptone, 5g d’extrait de levure, 10g de NaCl, H2O qsp 1L ; 2-Milieu 2YT: 16g de tryptone, 10g d’extrait de levure, 5g de NaCl, H2O qsp 1L ; 3-Solution de lyse : BugBuster (Novagen 10X Protein extraction reagent) diluée à 1x en TBS supplémenté par du MgSO₄ à 20mM final et une solution de DNase à 5µg/mL final ; 4-TBS₅₀₀ : Tris-HCl 20mM à pH 7,4, NaCl 500mM.

VIII-Séquençage NGS

Les ADN provenant de la banque d'ADN L5 naïve (banque n'ayant jamais été sélectionnée contre CD38 et nommée T0) et issus des tours 1 à 5 (T1 à T5) de la sélection II sont soumis à un séquençage NGS (Next Generation Sequencing). Les ADN sont tout d'abord formatés par une PCR ajoutant des séquences en 5' et 3' constantes. La plateforme NGS (IRIC, Montréal, Canada) prend ensuite en charge les échantillons pour réaliser une amplification avec les adaptateurs Nextera qui permettent en un seul séquençage multiplex d'obtenir environ 500 000 séquences par échantillon. Les séquences obtenues ont été analysées avec des outils bioinformatiques utilisant la plateforme Galaxy (<https://usegalaxy.org/>).

A-PCR d'amplification

Les amorces sens et antisens (NGS_RDV2_H5_Fint et NGS_RDV2_H5_Rint) comprennent des séquences adaptées à l'indexation Nextera de la technique de séquençage NGS Illumina. Ainsi, une première PCR d'amplification des ADN correspondant à la banque L5 naïve (T0) et aux groupes de séquences sélectionnées aux tours 1 à 5 (T1 à T5) est réalisée au laboratoire à l'aide de ces deux amorces selon les conditions décrites ci-dessous :

Réactifs	Volume pour une réaction (µl)
H ₂ O	35.5
Tampon HF (5x)	10.00
dNTPs (10 mM)	1.00
NGS_RDV2_H5_Fint (100 µM)	0.25
NGS_RDV2_H5_Rint (100 µM)	0.25
ADN à amplifier (env. 2-5 ng)	0.5
DMSO (100%)	2
Phusion (2u/ µL)	0.5
Volume total	50.00

Programme PCR		
98°C	30s	
98°C	10s	} x25
60°C	30s	
72°C	10s	
72°C	5min	
14°C	∞	

Amorces utilisées

NGS_RDV2_H5_Fint	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATCCGCGACCAAGTAAATTC-3'
NGS_RDV2_H5_Rint	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGCTTCAGTTTCTCCAGCAG-3'

Après amplification, la qualité des produits obtenus est vérifiée par migration sur gel d'agarose 1.5% contenant du GelRed pour s'assurer qu'une seule bande d'amplification est obtenue pour la taille attendue (265 pb).

B-Séquençage NGS

Les six échantillons ainsi obtenus sont soumis à la plateforme de séquençage (centre de génomique de l'IRIC à Montréal, Canada) qui introduit par PCR les index Nextera aux amplicons pour leur séquençage NGS. La technologie MiSeq (Miseq Reagent Micro Kit v2 (500 cycles) – Paired end sequencing) d'Illumina (San Diego, USA) a été utilisée, avec une configuration de 2 × 150 bp. Ce séquençage dans les deux sens sur une longueur de 150 pb couvre la totalité des bases randomisées dans les banques d'Affitines.

C-Traitement informatique des séquences

Pour chaque puce générée, environ deux millions de lectures (ou « reads ») sont obtenues pour l'ensemble des six échantillons. Les fichiers de séquençage sont traités et assemblés à l'aide de la plateforme bioinformatique en ligne Galaxy (<https://usegalaxy.org/>). La qualité et la distribution de la longueur des lectures sont vérifiées à l'aide de l'outil FASTQ. Pour chaque échantillon, les paires de séquences sont ensuite traitées à l'aide de l'outil Galaxy personnalisé développé par Benjamin Navet appelé « Clustering » (non publié). Cet outil contrôle la qualité et le nombre de lectures, enlève les séquences adaptatrices, assemble les paires de séquences et les regroupe selon leur identité (« Clusters »).

Résultats

I-Production et contrôle qualité des protéines recombinantes CD38 murin et CD38 humain

A-Sélection des clones CHO producteurs

Les protéines recombinantes CD38 murin et CD38 humain sont produites par transfection de la lignée cellulaire CHO avec le plasmide pKCR6 dans lequel a préalablement été cloné un insert codant pour l'une ou l'autre des protéines. Le clonage par dilution limitante de la population de cellules CHO transfectées permet l'obtention de colonies issues d'une cellule unique. La séquence signal peptide CD33 induit la sécrétion des protéines recombinantes CD38 dans le milieu de culture. Un criblage par ELISA est donc réalisé afin d'identifier les colonies produisant rCD38h ou rCD38m. Les surnageants à tester sont récupérés puis adsorbés en fond de plaque Maxisorp. L'anticorps primaire utilisé pour détecter les protéines recombinantes est dirigé contre l'AviTag des protéines recombinantes (résultats non montrés).

Les résultats du criblage par ELISA effectué sur les colonies de cellules CHO nous ont permis de sélectionner 2 clones CHO qui produisent fortement rCD38h et rCD38m respectivement. Ces populations clonales sont amplifiées dans le but de produire à plus grande échelle les 2 protéines recombinantes nécessaires au projet. Après amplification, les surnageants sont récoltés puis purifiés sur une colonne N-hydroxysuccinimide préalablement couplée de manière covalente avec un anticorps anti-AviTag. Chaque lot de protéines rCD38h et rCD38 ainsi produit est testé sur gel SDS-PAGE, par ELISA et fait l'objet d'une expérience de cinétique enzymatique afin de s'assurer de leur intégrité, leur pureté et de valider leur bon repliement.

B-Contrôle de la qualité des protéines recombinantes produites

α -Gel SDS-PAGE

Les protéines CD38 humain et murin recombinantes sont déposées sur un gel SDS-PAGE 15% afin de vérifier leur pureté et leur intégrité. Pour chacune des protéines, nous obtenons une bande située au poids moléculaire attendu (rCD38h~45 kDa ; rCD38m~42kDa). Nous

n'observons pas de dégradations ni de bandes pouvant indiquer la présence de protéines contaminantes.

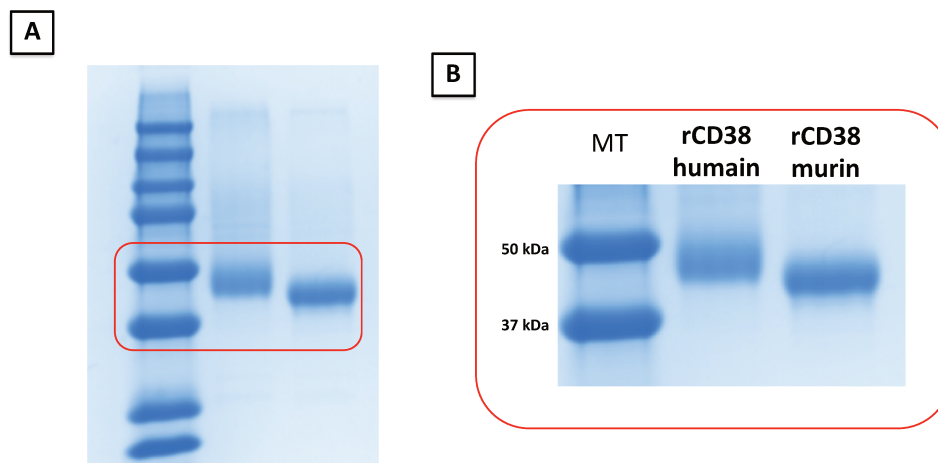


Figure 41 | Migration des protéines rCD38h et rCD38m sur gel SDS-PAGE

2,5 μ g de protéines rCD38m et rCD38h sont déposés sur un gel SDS-PAGE 15% afin de vérifier leur qualité. A) Vue d'ensemble du gel après migration des protéines pendant 1h à 100V. B) Zoom sur région du gel de polyacrylamide contenant les protéines d'intérêt (rCD38h~45 kDa ; rCD38m~42kDa). MT : marqueur de taille.

b-Test ELISA

Les protéines recombinantes CD38m et CD38h font également l'objet d'un test ELISA. Les anticorps primaires utilisés sont des AcM anti-CD38 murin et humain respectivement. La révélation est réalisée à l'aide d'anticorps secondaires couplés à la HRP et dirigés contre l'isotype de l'anticorps primaire. On constate une bonne reconnaissance des protéines par les anticorps commerciaux comme le montre la **figure 42**.

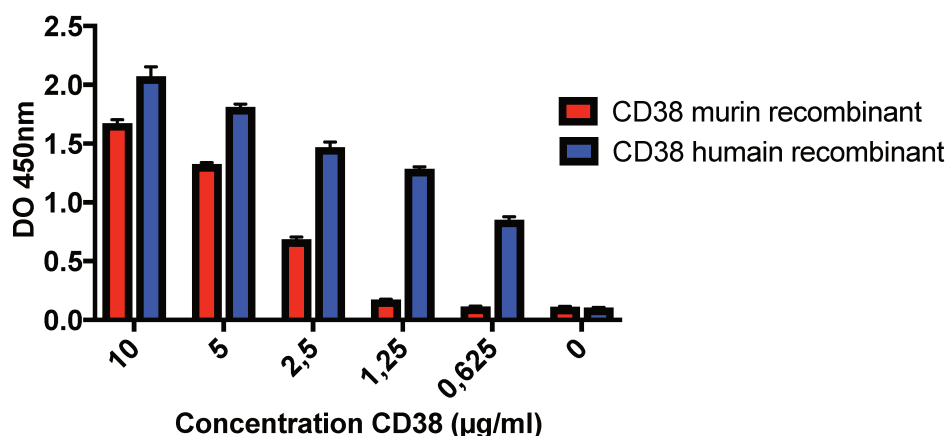


Figure 42 | Contrôle par ELISA des protéines CD38 murine et humaine recombinantes produites.

Une gamme de concentration est réalisée pour rCD38m et rCD38h (10 à 0,625 μ g/mL). Les échantillons sont adsorbés en plaque Maxisorp. Les protéines sont détectées à l'aide d'anticorps commerciaux anti-CD38 murin ou humain. Une incubation est ensuite réalisée avec des anticorps secondaires couplés à la HRP. La révélation est effectuée à l'aide du substrat de la HRP.

Une des fonctions les plus remarquables du CD38 est sa capacité à catalyser différentes réactions. Nous avons choisi de tirer parti de cette caractéristique en réalisant un test de cinétique enzymatique. La capacité d'une protéine recombinante à présenter l'activité enzymatique de la protéine naturelle va en effet témoigner d'un repliement correct du site catalytique lors des étapes de production permettant de présumer du bon repliement de l'intégralité des structures tertiaires de la protéine. Pour cette cinétique un analogue du NAD⁺, le substrat physiologique du CD38, est utilisé. Il s'agit du NGD⁺ qui va être cyclisé par l'enzyme en cGDPR puis linéarisé en GDPR [207]. Seul le cGDPR émet de la fluorescence à 410nm après excitation à 300nm, ce qui permet de suivre son apparition puis sa dégradation dans le milieu réactionnel. Il est à noter que la linéarisation du cGDPR en GDPR suit une cinétique beaucoup plus lente que celle se déroulant *in cellulo* et aboutissant à la linéarisation du cADPR en ADPR. Cette caractéristique, liée aux propriétés intrinsèques du cGDPR, facilite le suivi de la réaction.

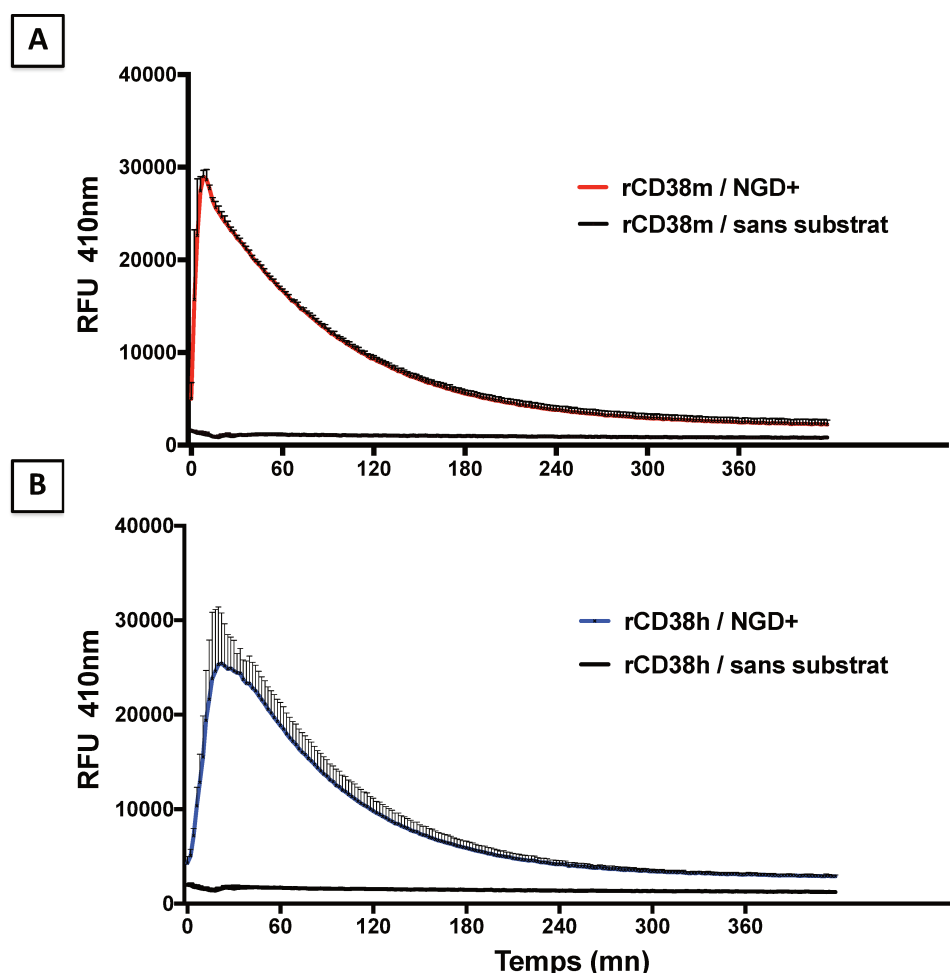


Figure 43 | Test de cinétique enzymatique des protéines rCD38m et rCD38h

1µg de protéine recombinante CD38 murin ou humain est incubé dans une solution de Tris contenant ou non du NGD⁺. La réaction est suivie par spectrofluorimétrie pendant 420min (7h) à raison d'une mesure toutes les deux minutes. (RFU : « relative fluorescence units », unités de fluorescence relative). A) Suivi de la cinétique enzymatique catalysée par rCD38m. B) Suivi de la cinétique enzymatique catalysée par rCD38h.

Les données présentées sur la **figure 43** montrent une activité enzymatique caractéristique de l'activité ADP-ribosyl-cyclase et ADP-ribose-hydrolase du CD38. On observe en effet dans les premières minutes de la cinétique une apparition rapide du cGDPR. Après avoir atteint un plateau, la concentration de cGDPR dans le milieu réactionnel diminue du fait de l'hydrolyse en GDPR non fluorescent. Les protéines rCD38m et rCD38h produites présentent donc une activité enzymatique dont les profils sont équivalents à ceux décrits dans la littérature pour ces protéines [41], [57]. Cette constatation nous conforte quant à la qualité des protéines produites et à leur homologie avec le CD38 exprimé à la membrane des cellules.

C-Bilan de la production de rCD38h et rCD38m

Cette étape de production nous a permis d'obtenir les protéines rCD38h et rCD38m en quantité importante à l'échelle du milligramme. Les tests réalisés sur les lots de production ont permis de démontrer la qualité de ces protéines et de valider leur utilisation pour la sélection d'Affitines par ribosome display. La mise au point du protocole de suivi de cinétique enzymatique effectuée à cette occasion nous offre également un avantage pour le criblage potentiel d'Affitines anti-CD38 présentant une activité inhibitrice.

II-Préparation des banques de séquences et biotinylation de la protéine cible utilisée pour les sélections

A-Préparation des banques de séquences L5 et L6

Des travaux menés par le groupe de Frédéric Pecorari ont permis de montrer que la sélectivité de la protéine archéale Sac7d pouvait être modifiée par mutagenèse aléatoire de résidus impliqués dans la liaison à l'ADN [182]. Différentes banques de séquences (L1 à L4) ont ainsi été générées par randomisation de ces positions peptidiques [183], [184]. Plus récemment, une étude s'est attachée à caractériser différents membres de la famille de protéines Sul7d qui regroupe les protéines archéales présentant des capacités de liaison à l'ADN [187]. Cette étude a permis l'identification de la protéine Aho7c qui présente une homologie de séquence de 91% avec Sac7d tout en possédant des propriétés physico-chimiques plus favorables (poids moléculaire plus faible, T_m plus élevée). La stratégie développée avec Sac7d pour l'obtention de banques de séquences randomisées utilisables en sélection a donc été reconduite avec Aho7c. Dix résidus aminés (9Y, 10K, 22K, 23K, 25W, 32S, 34T, 41T, 43R et 45A) identifiés comme participant à l'interaction entre Aho7c et l'ADN ont ainsi été mutés pour générer la banque L5.

Cette banque a été utilisée avec succès pour la sélection d’Affitines spécifiques de la protéine humaine recombinante EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) [188]. Nous avons donc choisi d’utiliser cette banque pour mon projet en combinaison avec la banque L6. Cette deuxième banque consiste en une variante de la banque L5 étendue entre les positions d’acides aminés 27 et 28. Cette extension, localisée entre les segments $\beta 3$ et $\beta 4$ de Aho7c, est constituée de 4 résidus randomisés permettant d’étendre une boucle peptidique préexistante. Cette variante doit favoriser l’obtention d’Affitines plus susceptibles de se lier à des épitopes concaves tels que les sillons enzymatiques [184].

La construction des banques par PCR d’assemblage est détaillée dans la section « Matériels et méthodes ». Le résultat final est présenté **figure 44**.

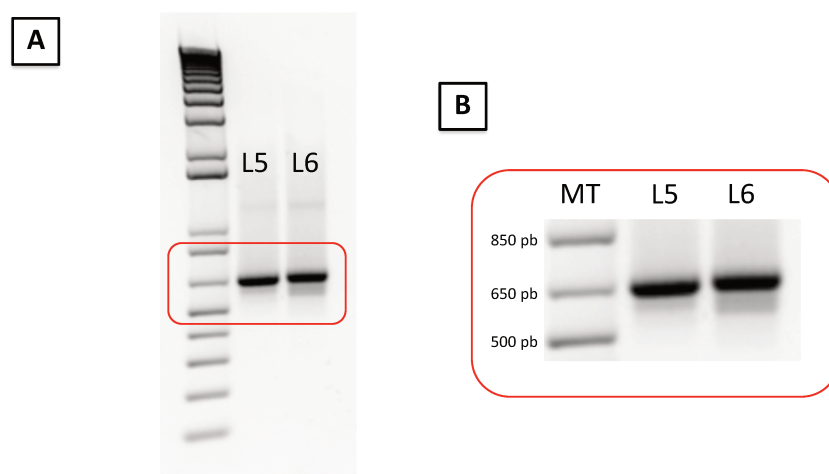


Figure 44 | Migration des banques L5/L6 finales sur gel d’agarose. Les produits de PCR purifiés obtenus après assemblage des banques L5/L6 avec la séquence TolA sont déposés sur gel d’agarose 1% afin de vérifier leur qualité. A) Vue d’ensemble du gel d’agarose après migration des banques L5/L6 pendant 1h à 100V. B) Zoom sur la région du gel d’agarose contenant les fragments d’intérêt (taille attendue: L5: 635 pb ; L6: 647 pb). MT : marqueur de taille.

Les banques L5 et L6 ainsi générées sont ensuite utilisées pour la sélection par ribosome display d’Affitines spécifiques du CD38. Quatre sélections différentes ont été réalisées pendant ce projet (cf. Matériel et Méthodes). Pour chacune de ces sélections, ce sont les banques décrites ci-dessus qui ont été utilisées.

B-Biotinylation de la protéine rCD38m

Pour les premières sélections, rCD38m est choisie comme cible afin de disposer d’Affitines pouvant faire l’objet d’expériences *in vivo* dans le cadre du modèle murin syngénique de MM développé par l’équipe. Le développement d’Affitines anti-CD38 humain, qui n’a pas encore été réalisé à l’heure actuelle, doit constituer la seconde étape de ce projet permettant d’investiguer l’intérêt d’une utilisation clinique de cet outil.

Préalablement aux sélections, rCD38m est biotinylé enzymatiquement afin de permettre sa fixation via des liaisons non-covalentes de type streptavidine-biotine aux différents supports solides utilisés. Contrairement à la biotinylation chimique qui permet une fixation de la biotine sur les groupes amines (biotine succinimidyl ester) ou sulfhydriles (biotine maléimide) accessibles, la biotinylation enzymatique autorise un ancrage spécifique au niveau de la séquence AviTag. La réussite de cette étape est vérifiée par un test HABA puis un ELISA sandwich. Un test de cinétique enzymatique est également réalisé afin de vérifier l'absence d'impact de la biotinylation sur l'activité biologique de la protéine (cf. **figure 45**). rCD38h est biotinylée et testée de manière identique en prévision des sélections futures (données non montrées).

Le test HABA effectué pour rCD38m nous donne une valeur moyenne de 0,95 molécule de biotine par molécule de CD38. Cette valeur témoigne de la réussite du processus de biotinylation enzymatique.

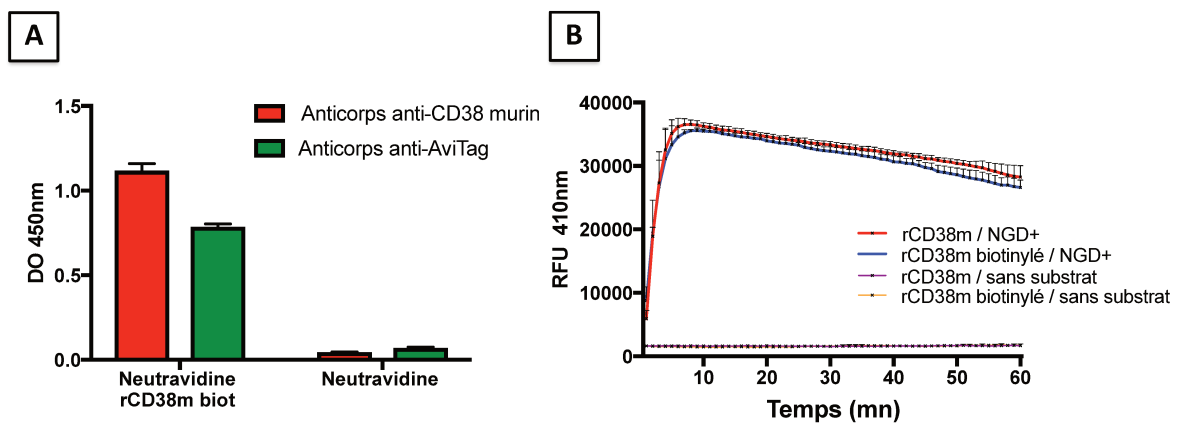


Figure 45 | Test de rCD38m biotinylé par ELISA et cinétique enzymatique

A) ELISA test de rCD38m biot. La plaque est sensibilisée avec une solution de neutravidine. 100ng/puits de rCD38m-biot sont ensuite immobilisés. La protéine est détectée avec un AcM anti-CD38 murin ou avec un AcM anti-AviTag. La neutravidine seule sert de contrôle négatif. B) Comparaison de la cinétique enzymatique de rCD38m et rCD38m biot. rCD38m et rCD38m biot sont incubées dans une solution de Tris contenant ou non du NGD+. La réaction est suivie par spectrofluorimétrie pendant 60min à raison d'une mesure par minute. (RFU: relative fluorescence units, unités de fluorescence relative).

L'ELISA nous permet de nous assurer de la réussite de la biotinylation de rCD38m et du bon fonctionnement du système de capture. Ce dernier s'avère fonctionnel comme l'atteste la détection de la protéine par l'AcM anti-CD38 murin. Moins attendu, l'anticorps anti-AviTag détecte toujours rCD38m malgré la présence de la biotine et l'ancrage à la neutravidine. L'expérience de cinétique des protéines rCD38m et rCD38m-biot nous permet de valider l'absence d'impact de la biotinylation sur la fonction enzymatique. Les cinétiques observées pour rCD38m et son équivalent biotinylé sont en effet identiques.

III-Ribosome display : Sélection I contre rCD38m

A-Principe de la sélection I

La sélection I est réalisée contre rCD38m biotinylé fixé sur différents supports solides qui sont décrits dans le **tableau 7** ci-dessous. Cette alternance doit permettre d'éviter la sélection d'Affitines spécifiques de ces éléments de support. Lors de cette sélection, la concentration en protéine cible est également abaissée au fur et à mesure des tours de 150nM pendant le tour 1 à 3,7nM pendant le tour 5. Cette diminution de la disponibilité de la cible doit favoriser la compétition entre les Affitines spécifiques d'épitope identique et ainsi permettre la sélection des candidats présentant la meilleure affinité.

Tableau 7 | Paramètres expérimentaux utilisés pour la sélection I contre rCD38m

I	Tours de sélection				
	1	2	3	4	5
Support	Plaques 96p maxisorp / neutravidine	Billes magnétiques / streptavidine	Billes agarose / avidine	Billes magnétiques / streptavidine	Billes magnétiques / neutravidine
[C] rCD38m	150nM	100nM	33nM	11nM	3,7nM
Nombre de lavages	4	6	8	10	10
Temps total de lavage	1min	5min	15min	1h	3h
Nombre de cycles de PCR	40	35	30	25	20

Rappel des paramètres expérimentaux utilisés pour la sélection I contre rCD38m. La protéine cible est fixée sur les différents supports solides via des liaisons non covalentes de type biotine-streptavidine.

A l'issue du cinquième tour de sélection, les produits de RT-PCR sont amplifiés par PCR après avoir été clonés dans le vecteur pFPRDV2.1. Après transcription, une traduction des séquences est réalisée afin de tester l'enrichissement des banques en Affitines anti-rCD38m par ELISA polyclonal.

B-Contrôle de l'enrichissement des banques L5 et L6 par ELISA

Les résultats des ELISA effectués à l'issue du tour 5 montrent une absence d'enrichissement des banques L5 et L6 en Affitines anti-rCD38m. Le signal obtenu lorsque la protéine cible est fixée par adsorption directe sur la plaque ELISA est en effet équivalent à celui obtenu contre la BSA, c'est-à-dire au niveau du bruit de fond. L'ELISA sandwich confirme l'absence d'Affitines

spécifiques de rCD38m comme en témoigne le faible signal mesuré pour les banques L5/L6 lorsqu'incubées avec la protéine cible fixée avec de la neutravidine. On observe en revanche un signal très fort des produits de traduction L5 et L6 contre la neutravidine seule (cf. **figure 46A**). Ce signal est aboli lorsqu'une incubation préalable de la neutravidine avec un excès de biotine est réalisée (cf. **figure 46B**). La qualité des traductions effectuées est contrôlée par traduction d'une banque codant pour une Affitine anti-IgG humaine (cf. **figure 46C**). La bonne fixation sur la plaque ELISA des protéines rCD38m et rCD38m-biot est contrôlée avec un anticorps anti-CD38 murin (cf. **figure 46D**).

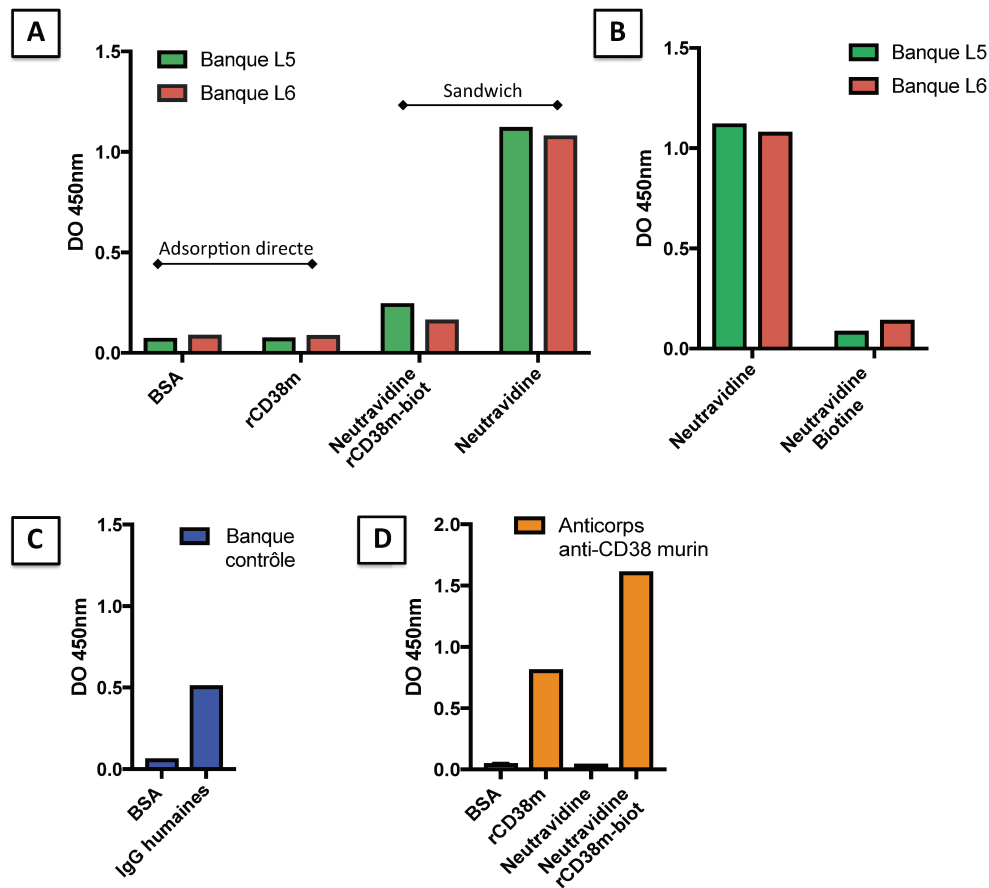


Figure 46 | Contrôle de l'enrichissement des banques en séquences d'Affitines anti-rCD38m par ELISA à l'issue de la sélection I. A) ELISA de contrôle de l'enrichissement des banques L5/L6 en Affitines anti-rCD38m. Les protéines testées sont adsorbées en plaque Maxisorp soit directement (adsorption directe : BSA et rCD38m) soit via la neutravidine (Sandwich: rCD38m-biot). La BSA et la neutravidine seules servent de témoins. B) ELISA test neutravidine. Puits neutravidine-biotine : après adsorption sur plaque maxisorp la neutravidine est incubée pendant 1h avec un excès de biotine. C) ELISA de contrôle de la traduction. Afin de vérifier l'efficacité du processus de traduction, une banque contrôle contenant une seule séquence codant pour une Affitine anti-IgG humaine est traduite. Le mélange traductionnel est incubé dans un puits préalablement sensibilisé avec des IgG humaines. D) ELISA contrôle de rCD38m ou rCD38m-biot. La protéine est détectée avec un AcM anti-CD38 murin.

Cette première sélection contre rCD38m a donc favorisé la sélection d'Affitines reconnaissant la neutravidine et qui sont probablement spécifiques des sites de fixation de la biotine. Les étapes de panning négatif pendant lesquelles les complexes ternaires sont incubés avec les protéines de fixation seules n'ont pas suffi à s'affranchir de ces Affitines. De même l'utilisation

alternée d'avidine, streptavidine ou neutravidine pour fixer rCD38m pendant les tours de sélection n'a pas permis d'éliminer les Affitines reconnaissant ces protéines. L'homologie structurelle de ces différents composés peut expliquer ce problème.

L'enrichissement des banques en séquences codant pour des protéines d'affinité spécifiques des sites de fixation de la biotine a déjà été observé lors de protocoles de sélection pour d'autres charpentes [210]. Les stratégies d'évitement décrites ci-dessus (panning négatif, alternance des protéines de fixation) suffisent habituellement à s'en affranchir. L'échec de ces stratégies pour la sélection contre rCD38m peuvent peut-être s'expliquer par une éventuelle moindre accessibilité des épitopes de CD38 en comparaison des sites de fixation de la biotine sur la neutravidine. La majorité des séquences sélectionnées vont ainsi coder pour des Affitines anti-neutravidine et envahir les banques de sélection. Les éventuelles séquences anti-rCD38m sélectionnées vont alors être trop peu nombreuses pour pouvoir être détectées lors de l'ELISA de contrôle de l'enrichissement des banques.

En tirant parti des enseignements de cette première sélection, nous décidons de remanier le protocole de sélection par ribosome display afin de minimiser le développement d'Affitines anti-neutravidine.

IV-Ribosome display : Sélection II contre rCD38m

A-Principe de la sélection II

Les résultats obtenus lors de la sélection I nous ont amenés à repenser le protocole de sélection afin de s'affranchir des Affitines spécifiques du site de liaison de la biotine. Nous avons donc choisi d'utiliser des billes magnétiques sur lesquelles rCD38m est préalablement couplé de manière covalente. Des billes magnétiques couplées avec un anticorps anti-AviTag sont également générées de manière analogue. Après couplage, la fixation covalente de la protéine rCD38m ou de l'AcM anti-AviTag à la surface des billes est vérifiée par cytométrie en flux (résultats non montrés). Les billes magnétiques rCD38m sont utilisées lors de l'étape de panning positif des tours n2 et n5. La solution de traduction est alors directement incubée avec les billes rCD38m après une étape de panning négatif réalisé sur des billes non couplées. Les billes magnétiques AcM anti-Avitag sont utilisées après une étape préalable d'incubation en solution de rCD38m avec les mélanges de traduction. La solution est ensuite incubée avec les billes qui vont capter la protéine cible via l'anticorps. Les lavages sont ensuite réalisés comme précisé dans le « Matériel et méthodes » et rappelé dans le **tableau 8** présenté page suivante.

Nous choisissons également de ne pas abaisser la densité de présentation de rCD38m au fur et à mesure des tours de sélection afin de conserver une plus grande diversité d’Affitines et d’éviter au maximum le développement de binders anti-neutravidine.

Tableau 8 | Paramètres expérimentaux utilisés pour la sélection II contre rCD38m

II	Tours de sélection				
	1	2	3	4	5
Support	Plaques 96p maxisorp / neutravidine	Billes magnétiques rCD38m	Billes agarose / avidine	Billes magnétiques AcM anti-AviTag	Billes magnétiques rCD38m
Nombre de lavages	4	6	8	10	10
Temps total de lavage	1min	5min	15min	1h	3h
Nombre de cycles de PCR	40	35	30	25	20

Rappel des paramètres expérimentaux utilisés pour la sélection II contre rCD38m. La protéine cible est fixée sur les différents supports solides selon trois procédés différents en fonction des tours : 1) rCD38m-biot est fixé au support via des liaisons non covalentes de type biotine-streptavidine (tours 1 et 3). 2) rCD38m est fixé par couplage covalent au support (tours 2 et 5). 3) rCD38m est capté par l'anticorps anti-AviTag préalablement couplé au support (tour 4).

B- Contrôle de l’enrichissement des banques L5 et L6 par ELISA

Les résultats des ELISA effectués à l’issue du tour 5 montrent un enrichissement des banques L5 et L6 en Affitines anti-rCD38m. Les signaux obtenus pour les mélanges de traduction L5 et L6 contre la protéine rCD38m directement fixée sur la plaque sont supérieurs à 1 de DO avec un bruit de fond contre la BSA faible. Les résultats d’ELISA sandwich sont plus contrastés puisque l’on observe la résurgence d’un fort signal de la banque L6 contre la neutravidine seule (cf. **figure 47A**). On observe cependant un signal qui semble spécifique de rCD38m avec la banque L5. Le résultat mesuré pour L6 avec la neutravidine seule s’explique peut-être par la conception de la banque qui possède une boucle peptidique étendue afin de lier des épitopes concaves. La fixation des Affitines sur le site de liaison à la biotine peut donc être favorisé, ce qui expliquerait la persistance de ces binders à l’issue du tour n5. Les résultats obtenus nous semblent cependant suffisamment prometteurs et nous décidons de cloner les banques L5/L6 afin de passer à l’étape de criblage.

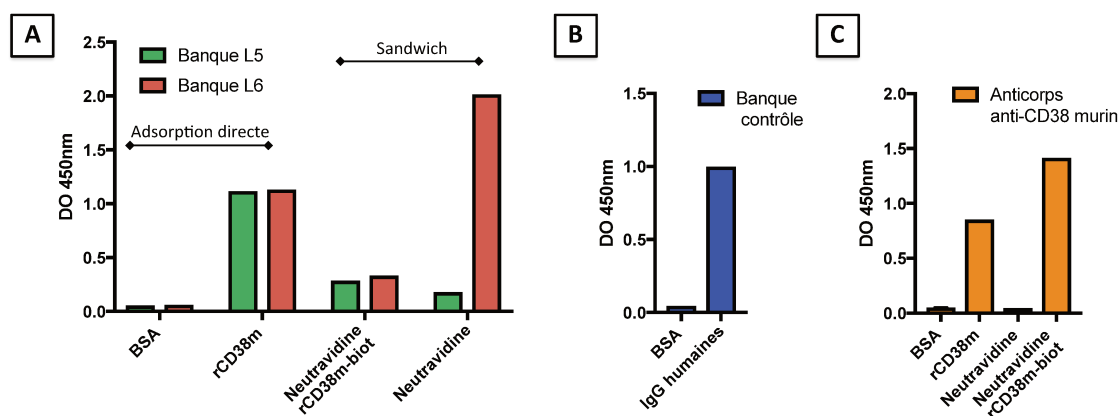


Figure 47 | Contrôle de l'enrichissement des banques en séquences d'Affitines anti-rCD38m par ELISA à l'issue de la sélection II. A) ELISA de contrôle de l'enrichissement des banques L5/L6 en Affitines anti-rCD38m. Les protéines testées sont immobilisées en plaque maxisorp soit directement (adsorption directe : BSA et rCD38m) soit via la neutravidine (Sandwich : rCD38m-biot). La BSA et la neutravidine seules servent de témoins. B) ELISA de contrôle de la traduction. Afin de vérifier l'efficacité du processus de traduction, une banque contrôle contenant une seule séquence codant pour une Affitine anti-IgG humaine est traduite. Le mélange de traduction est incubé dans un puits préalablement sensibilisé avec des IgG humaines. C) ELISA contrôle de rCD38m ou rCD38m-biot. La protéine est détectée avec un AcM anti-CD38 murin.

C-Criblage de la sélection II par ELISA

Les résultats d'ELISA précédents nous ont montré un enrichissement des banques en Affitines anti-rCD38m. Les séquences L5 et L6 sont donc clonées dans le vecteur d'expression pFP1001. Une transformation bactérienne est réalisée avec ce vecteur suivie d'un étalement sur boîte de Pétri. Les colonies isolées sont repiquées en milieu 2YT afin de produire les Affitines (cf. « Matériels et méthodes »). Les surnageants de lyse bactérienne obtenus à l'issue de l'extraction sont utilisés afin de réaliser un ELISA. Ce dernier doit permettre de confirmer les résultats obtenus précédemment.

Criblage banque L5

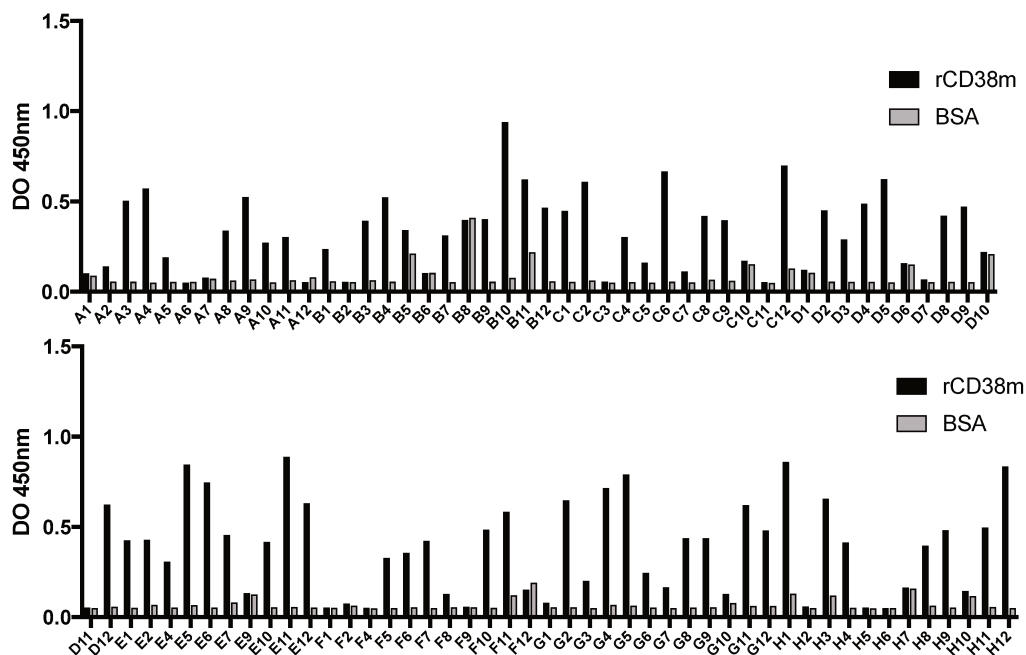


Figure 48 | Criblage de la banque L5 contre rCD38m par ELISA

93 Affitines issues de la banque L5 sont testées par ELISA afin d'identifier des clones spécifiques de rCD38m. Les Affitines sont détectées avec un anticorps anti-RGS-6His HRP.

Criblage banque L6

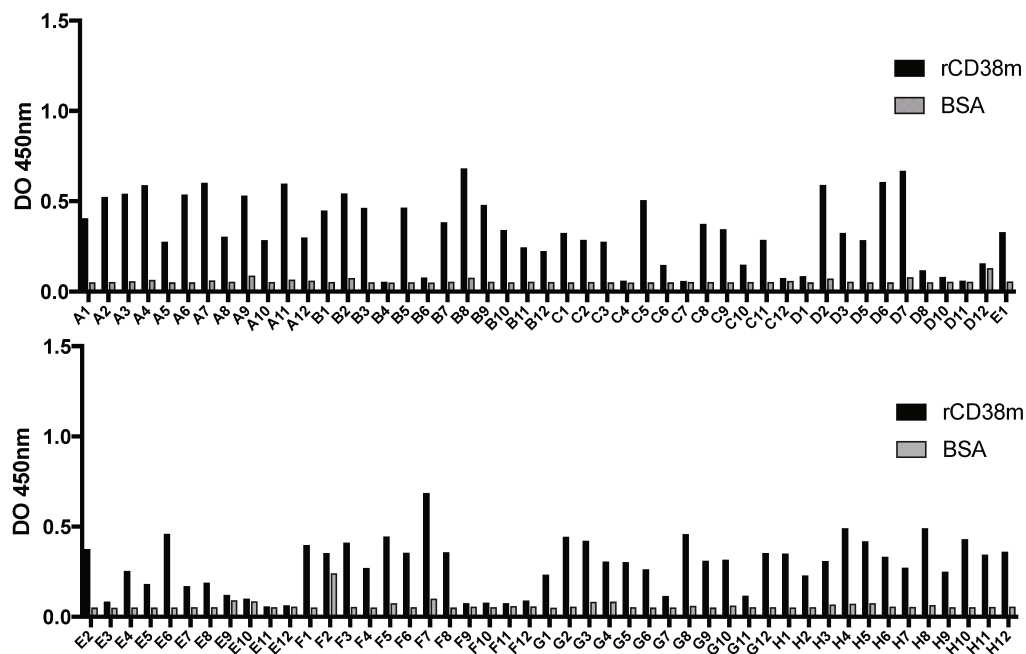


Figure 49 | Criblage de la banque L6 contre rCD38m par ELISA

94 Affitines issues de la banque L6 sont testées par ELISA afin d'identifier des clones spécifiques de rCD38m. Les Affitines sont détectées avec un anticorps anti-RGS-6His HRP.

Les résultats d'ELISA clonal des banques L5 et L6, présentés sur les **figures 48 et 49** page précédente, nous montrent qu'une forte proportion de clones d'Affitines reconnaissent rCD38m. 70% des clones issus de la banque L5 sont affins pour rCD38m, 80% pour la banque L6. Si la majorité des clones est spécifique de la protéine cible, on observe cependant pour certaines Affitines une réactivité contre la BSA. C'est notamment le cas des clones B8, D10 et F10 issus de la banque L5 ou des clones D12 et F2 issus de la banque L6. Ces Affitines, minoritaires, témoignent des difficultés rencontrées pour s'affranchir totalement de la sélection de protéines d'affinité spécifiques d'éléments de support (BSA, neutravidine).

La même expérience a été réalisée en remplaçant rCD38m par rCD38h en fond de plaque (résultats non montrés). Aucun des binders affins pour la protéine murine n'a montré de réaction croisée sur CD38 humain. Ce résultat nous permet de valider la spécificité des Affitines obtenues lors de la sélection II et que la reconnaissance n'implique pas une région ajoutée artificiellement commune aux rCD38m et rCD38h telle que l'AviTag.

Le criblage par ELISA nous a permis de valider la présence d'une forte proportion d'Affitines anti-rCD38m dans les banques L5 et L6 à l'issue du tour n5 de la sélection II. Nous souhaitons maintenant savoir si ces Affitines présentent également une affinité pour la protéine CD38 exprimée à la surface des cellules. Les banques criblées précédemment font donc l'objet d'un nouveau criblage par cytométrie en flux.

D-Criblage de la sélection II par cytométrie en flux

Le criblage par cytométrie en flux nécessite une nouvelle production des Affitines des banques L5 et L6 au format 24 puits. L'extraction est suivie par une étape de purification sur colonne d'affinité Ni-NTA afin d'éliminer le tampon de lyse ainsi que les principaux contaminants bactériens. Un gel SDS-PAGE est réalisé pour vérifier que les Affitines ont bien été produites et s'assurer de leur pureté relative. La **figure 50**, présentée en page suivante, est un exemple représentatif des résultats obtenus après migration sur gel de polyacrylamide des Affitines produites et purifiées sur colonne d'affinité. On visualise clairement les protéines d'intérêt qui ont migré au niveau de la bande 10 kDa du marqueur de taille, ce qui correspond au poids moléculaire attendu (~8 kDa). On constate un niveau de production très élevé pour chacun des clones à l'exception du clone B4. Des résultats similaires ont été observés à chaque nouvelle analyse par gel SDS-Page des Affitines produites et purifiées sur colonne d'affinité. La présence de protéines bactériennes contaminantes est minoritaire et ne présente pas un problème pour les expériences de cytométrie ultérieures.

La lignée utilisée pour le criblage est la 5T33-Luc(+)CD38^{high}, une lignée de MM murin qui a été générée pour ce projet (cf « Matériels et méthodes » partie II).

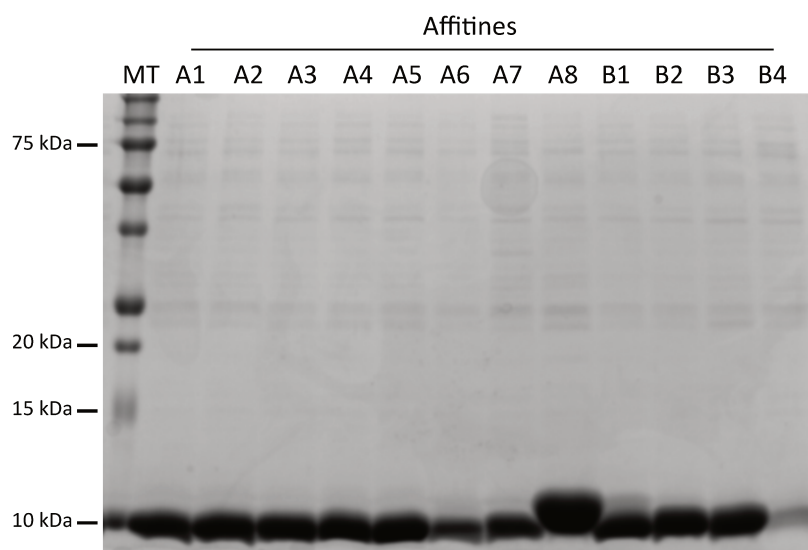


Figure 50 | Analyse par gel SDS-Page des Affitines produites.

Les Affitines sont déposées sur un gel de polyacrylamide 15% après une étape de purification sur colonne d'affinité Ni-NTA. Pour chaque clone produit, 12µl de l'éluat issu de la purification sont déposés sur gel. L'électrophorèse dure 1h à 100V. MT : marqueur de taille.

Un premier criblage est réalisé sur 200 clones issus de la banque L5 et 200 clones issus de la banque L6. L'analyse des données obtenues permet de mettre en évidence 4 Affitines (*C6*, *D7*, *F11* et *G5*) issues de la banque L5 qui présentent une affinité pour les cellules 5T33-Luc(+)CD38^{high}. Un contrôle sur une lignée n'exprimant pas CD38 (5T33-Luc(+)) est effectué pour ces clones. Malheureusement, ces derniers présentent également une affinité pour les cellules CD38 négative (cf. **figure 51**). Les histogrammes obtenus en cytométrie et reflétant la fixation des Affitines sont de plus très étalés et ne présentent pas de distribution gaussienne comme retrouvé avec un marquage anticorps conventionnel. Ces résultats nous laissent à penser que la fixation observée en cytométrie est aspécifique. Pour pousser plus loin notre réflexion, nous décidons de produire ces 4 Affitines à plus grande échelle afin de réaliser des expériences complémentaires. Ce protocole de production implique deux étapes de purification successives sur colonne d'affinité dans un premier temps puis sur colonne gel filtration dans un second temps ce qui permet de s'affranchir de la présence d'imidazole. Les Affitines obtenues sont pures à 100% et peuvent être quantifiées par spectrophotométrie à l'aide d'un Nanodrop.

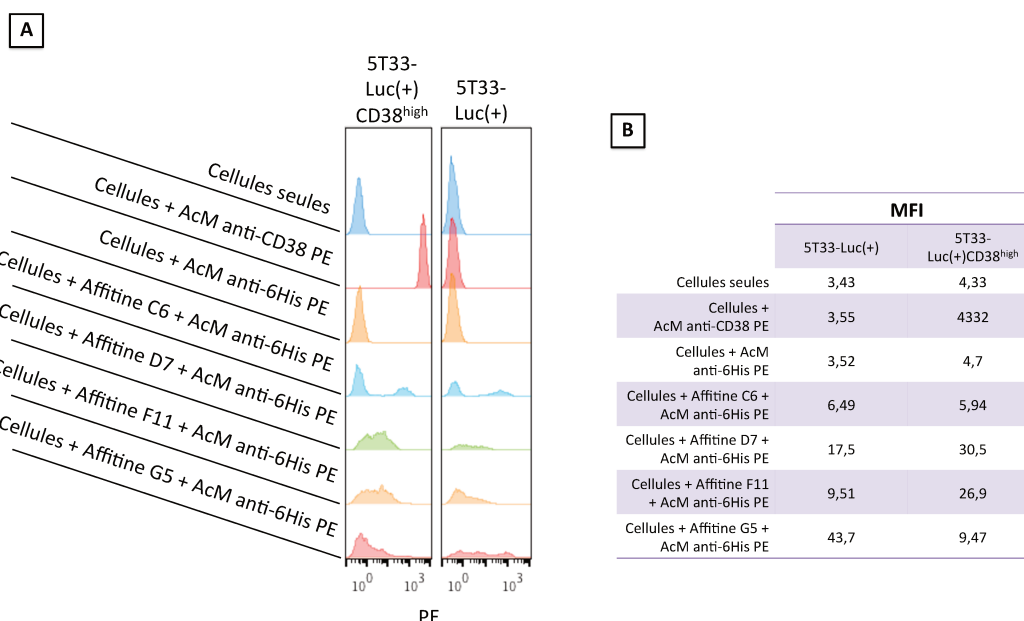


Figure 51 | Test de l'affinité des Affitines C6, D7, F11 et G5 par cytométrie en flux
A) Exemples de résultats de criblage obtenus pour 4 clones d'Affitines (C6, D7, F11 et G5) contre la lignée 5T33-Luc(+)-CD38^{high} qui exprime fortement CD38 et la lignée 5T33-Luc(+) qui n'exprime pas CD38. Le phénotype CD38 de chacune des lignées est contrôlé avec un anticorps commercial anti-CD38 PE en début d'expérience. Les Affitines sont détectées à l'aide d'un anticorps anti-6His PE. Les MFI obtenues pour ces clones sont détaillées dans le tableau (B).

L'affinité des protéines C6, D7, F11 et G5 purifiées pour rCD38m et CD38 cellulaire est testée en ELISA (cf. **figure 52**) et en cytométrie de flux respectivement. On retrouve bien une liaison à la forme recombinante de CD38 par ELISA. De façon remarquable, la dilution en série de ces protéines d'affinité permet l'observation d'un signal de fixation spécifique à rCD38m même pour les concentrations les plus faibles testées (12 ou 4 nM). Bien que ne permettant pas l'obtention de données chiffrées, ces résultats suggèrent des valeurs d'affinité dans le bas nanomolaire pour ces Affitines. Cette reconnaissance de rCD38m n'est cependant plus détectable lorsque ces protéines sont testées en cytométrie. Les Affitines C6, D7, F11 et G5 ont en effet été testées sur les lignées CD38 positives MOPC513.BM et 5T33-Luc(+)-CD38^{high} en réalisant une gamme de concentration équivalente à celle utilisée pour l'ELISA. Pour chacune des concentrations testées, le signal obtenu était équivalent au signal d'autofluorescence des cellules seules (résultats non montrés).

Cette absence d'affinité pour la forme cellulaire peut être liée à des différences dans l'accessibilité ou la conformation des épitopes entre la forme recombinante et cellulaire. Les motifs glycosylés peuvent également varier entre les deux formes. De plus, la protéine CD38 peut co-localiser à la surface de la membrane avec d'autres partenaires masquant ainsi des épitopes accessibles sur la forme recombinante [57]. Nous émettons l'hypothèse que notre sélection a généré des Affitines reconnaissant uniquement un nombre restreint d'épitopes. Ces épitopes ne

vont pas présenter la même conformation ou ne vont pas être accessibles sur la forme cellulaire de CD38.

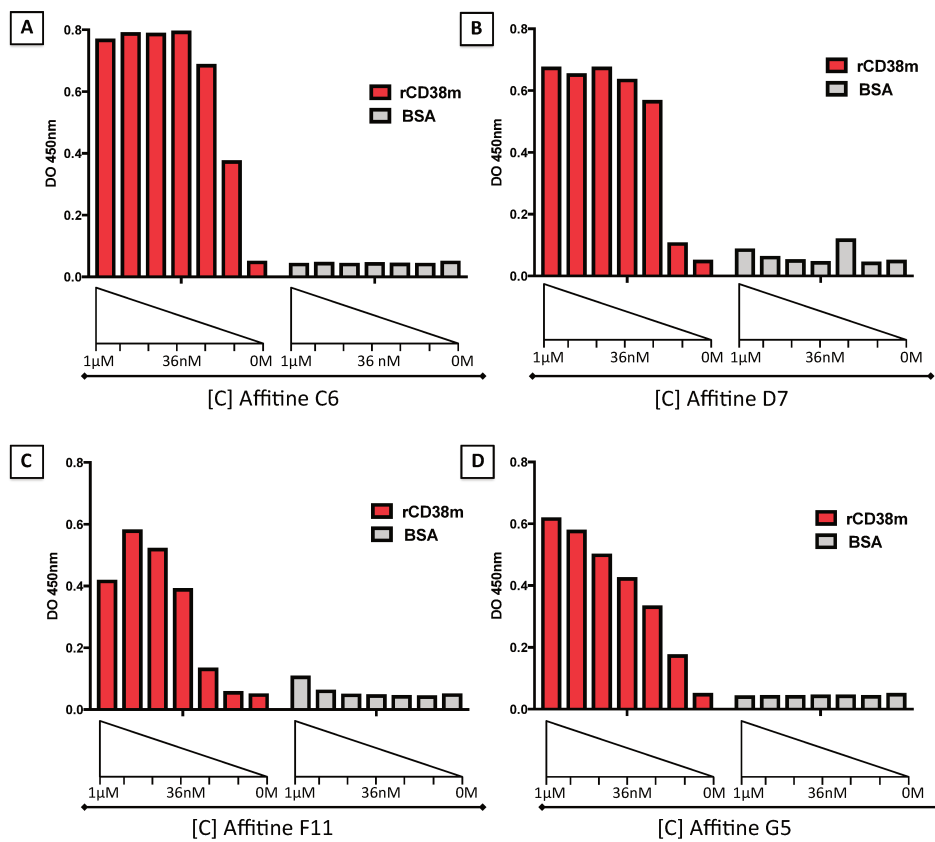


Figure 52 | Test de l'affinité des Affitines C6, D7, F11 et G5 pour rCD38m par ELISA
 Une gamme de concentrations des Affitines (C6, D7, G5 et F11) est réalisée (1 μM, 0,33 μM, 0,11 μM, 36 nM, 12 nM, 4 nM) et incubée avec rCD38m ou la BSA seule préalablement immobilisée sur plaque Maxisorp par adsorption directe. Les Affitines sont détectées à l'aide d'un AcM anti-RGS-6His HRP. A) ELISA Affitine C6, (B) ELISA Affitine D7, (C) ELISA Affitine F11, (D) ELISA Affitine G5.

Pour résoudre ce problème nous choisissons d'employer une stratégie dite de masquage d'épitope (ou « epitope masking »). Certaines Affitines, identifiées comme étant capables de se fixer sur rCD38m, sont produites à grande échelle et purifiées sur colonne d'affinité puis par gel filtration. Ces protéines sont ensuite incubées avec rCD38m juste avant les tours de sélection. Les épitopes reconnus par ces Affitines sont ainsi masqués et deviennent non-accessibles durant la sélection aux complexes ternaires Affitines-ARN-ribosome issus de l'étape de traduction. Cette stratégie doit permettre la sélection de variants d'Affitines anti-rCD38m spécifiques d'autres épitopes que ceux précédemment explorés.

V-Ribosome display : Sélection III contre rCD38m

La sélection III contre rCD38m est basée sur l'utilisation d'Affitines anti-rCD38m issues de la sélection II afin de masquer certains épitopes de la protéine cible. Ce masquage doit permettre de diriger la sélection vers d'autres épitopes, potentiellement communs à la forme recombinante et cellulaire de la protéine CD38. Cette stratégie nécessite au préalable une production à grande échelle des Affitines anti-rCD38m sélectionnées afin de disposer d'une quantité de protéine purifiée suffisante à la réalisation de la sélection. Des tests ELISA et de cytométrie en flux sont effectués sur les Affitines purifiées afin de valider leur capacité de fixation sur rCD38m juste avant leur utilisation pour les sélections.

A-Production des Affitines C6 et D7

En amont de cette sélection, 2 clones d'Affitines anti-rCD38m (nommés C6 et D7 selon leur position sur la plaque mère 96 puits) sont produits à grande échelle, extraits puis purifiés sur colonne d'affinité et colonne gel filtration. Les protéines produites sont testées par ELISA et cytométrie en flux afin de valider leur affinité pour rCD38m et confirmer l'absence d'affinité pour la protéine cellulaire (résultats non montrés).

B-Principe de la sélection III

Le protocole de sélection utilisé lors des deux premiers tours est identique à celui mis en œuvre lors de la sélection II. Les supports de fixation de rCD38m sont les mêmes, les paramètres de stringence des lavages restent identiques ainsi que le nombre de cycles de PCR. A partir du troisième tour, une incubation de rCD38m avec les Affitines C6 et D7 à fortes concentrations est effectuée avant l'étape de panning positif. C6 et D7, en se liant à leurs épitopes, vont masquer ces derniers qui ne seront alors plus accessibles aux complexes ternaires. Les mélanges de traduction sont ensuite incubés avec rCD38m. On devrait ainsi favoriser l'enrichissement des banques avec des séquences d'Affitines reconnaissant d'autres épitopes en espérant qu'ils soient communs à la protéine recombinante et cellulaire. Les paramètres utilisés pour la sélection III sont rappelés dans le **tableau 9** page suivante.

Tableau 9 | Paramètres expérimentaux utilisés pour la sélection III contre rCD38m

III	Tours de sélection				
	1	2	3	4	5
Support	Plaques 96p maxisorp / neutravidine	Billes magnétiques rCD38m	Billes agarose / avidine	Billes magnétiques AcM anti-AviTag	Billes magnétiques rCD38m
[C] Affinités anti-rCD38m			40µM C6 40µM D7	40µM C6 40µM D7	40µM C6 40µM D7
Nombre de lavages	4	6	8	10	10
Temps total de lavage	1min	5min	15min	1h	3h
Nombre de cycles de PCR	40	35	30	25	20

Rappel des paramètres expérimentaux utilisés pour la sélection III contre rCD38m. La protéine cible est fixée sur les différents supports solides selon trois procédés différents en fonction des tours : 1) rCD38m-biot est fixé au support via des liaisons non covalentes de type biotine-streptavidine (tours 1 et 3). 2) rCD38m est fixé par couplage covalent au support (tours 2 et 5). 3) rCD38m est capté par l'anticorps anti-AviTag préalablement couplé au support (tour 4). A partir du tour 3, rCD38m est incubé avec les Affinités C6 et D7 avant les étapes de sélection.

C-Contrôle de l'enrichissement des banques L5/L6 par ELISA

De façon inattendue, les résultats d'ELISA sur les groupes de sélection du tour 5 sont similaires à la sélection I (cf. **figure 53**). Ainsi, lorsque la protéine est fixée directement en fond de puits, les signaux obtenus suite à l'incubation des mélanges de traduction L5/L6 sont équivalents à ceux obtenus pour la BSA. Fixée par le biais de neutravidine, on retrouve des résultats semblables à ceux de la première sélection avec des signaux forts pour la neutravidine seule.

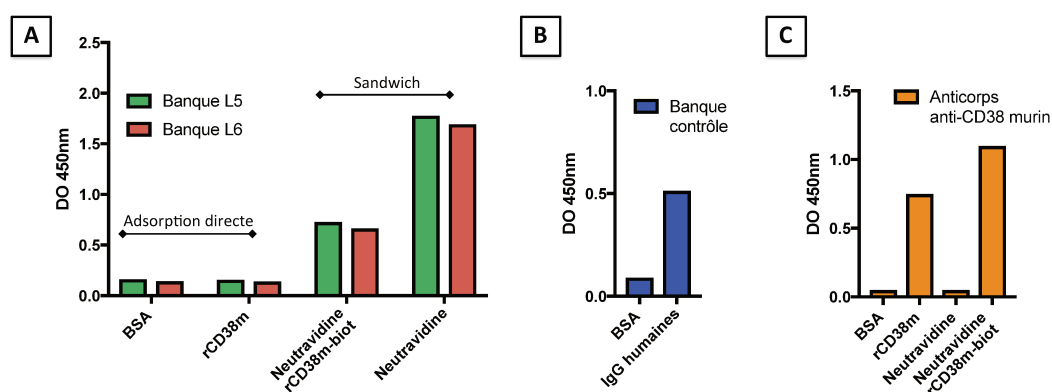


Figure 53 | Contrôle de l'enrichissement des banques en séquences d'Affinités anti-rCD38m par ELISA à l'issue de la sélection III. A) ELISA de contrôle de l'enrichissement des banques L5/L6 en Affinités anti-rCD38m. Les protéines testées sont immobilisées en plaque Maxisorp soit directement (adsorption directe : BSA et rCD38m) soit via la neutravidine (Sandwich : rCD38m-biot). La BSA et la neutravidine seules servent de témoins. B) ELISA de contrôle de la traduction. Afin de vérifier l'efficacité du processus de traduction, une banque contrôle contenant une seule séquence codant pour une Affinité anti-IgG humaine est traduite. Le mélange de traduction est incubé dans un puits préalablement sensibilisé avec des IgG humaines. C) ELISA contrôle de rCD38m ou rCD38m-biot. La protéine est détectée avec un AcM anti-CD38 murin

Ces résultats pourraient s'expliquer par une utilisation trop « tardive » au cours de la sélection des Affitines C6 et D7 de masquage des épitopes. Ainsi, il se pourrait qu'au tour 3, la sélection soit déjà trop avancée et la diversité des épitopes reconnus trop réduite. L'incubation de rCD38m avec C6 et D7 entraînerait donc une non-sélection des complexes ternaires reconnaissant ces épitopes sans gain de séquences plus rares puisque celles-ci ont déjà disparu au tour 3.

D-Criblage par cytométrie en flux

Malgré ces résultats d'ELISA, nous décidons de réaliser un criblage par cytométrie de façon identique à celui effectué pour la sélection II. Les banques L5 et L6 obtenues à l'issue du tour 5 sont clonées puis criblées. 200 clones de chaque banque sont ainsi testés sans que les résultats obtenus ne soient positifs.

Nous décidons de tenter une nouvelle approche de sélection par ribosome display en utilisant des extraits de membranes de la lignée 5T33-Luc(+)CD38^{high} fixés en fonds de puits de plaque Maxisorp. L'utilisation de tels extraits pourrait nous permettre de sélectionner des Affitines directement contre la protéine exprimée par les cellules et non pas contre sa forme recombinante.

VI-Ribosome display : Sélection IV contre CD38m

A-Principe de la sélection IV

La sélection par ribosome display sur membranes n'est pas triviale. S'il existe des protocoles de phage display décrivant la sélection sur cellules [211], aucun équivalent, à notre connaissance, n'a encore été développé pour le ribosome display. Il nous est apparu irréalisable de mettre au point, dans le temps imparti pour mon projet, une stratégie de sélection intégralement basée sur l'utilisation de cellules. Le fait de disposer de la lignée 5T33-Luc(+)-CD38^{high} et de sa contrepartie CD38 négative 5T33-Luc(+) nous a cependant incités à tenter une approche intermédiaire. L'idée derrière cette approche était d'utiliser le protocole habituel de ribosome display en remplaçant la protéine cible recombinante par des extraits membranaires permettant ainsi la sélection contre CD38 murin exprimé par la cellule dans un contexte proche du contexte physiologique. Cette stratégie est cependant risquée car nous ne savons rien de l'intégrité des membranes après l'extraction, de la présence de RNases ou de protéases, de

phénomènes de charge qui entraîneraient une éventuelle rétention aspécifique des complexes ternaires à la membrane, etc. Nous décidons cependant de mettre en œuvre cette approche. Une première étape est réalisée par l'extraction des membranes des lignées cellulaires de MM murin 5T33-Luc(+)-CD38^{high} et 5T33-Luc(+). Un ELISA est réalisé sur ces dernières afin de valider la bonne détection de la cible par l'anticorps anti-CD38 commercial après extraction et fixation des membranes en fond de puits. Un test de cinétique enzymatique est également réalisé en incubant les membranes avec une solution de NGD+. Cette cinétique nous apporte des indications sur l'intégrité de la protéine CD38 membranaire (données non montrées).

La sélection est ensuite réalisée de manière analogue à la sélection II pour les deux premiers tours de manière à réduire le nombre de séquences non spécifiques de CD38. Les membranes présentent en effet une très grande hétérogénéité d'épitopes qui n'ont rien à voir avec CD38 ce qui nous incite à la prudence quant à l'efficacité de l'étape de panning négatif sur membranes. Les 3 derniers tours sont ensuite réalisés sur membranes. Les mélanges de traduction sont incubés dans un premier temps avec les extraits de membranes issus de la lignée 5T33-Luc(+). Cette étape de panning négatif doit nous permettre de nous affranchir des Affitines non spécifiques. Les mélanges traductionnels sont ensuite transférés dans les puits contenant les extraits de membranes issus de la lignée 5T33-Luc(+)-CD38^{high} afin de favoriser la sélection des complexes ternaires spécifiques de la protéine cible. Les lavages sont effectués comme indiqué dans le **tableau 10** présenté ci-dessous.

Tableau 10 | Paramètres expérimentaux utilisés pour la sélection IV contre rCD38m

IV	Tours de sélection				
	1	2	3	4	5
Support	Plaques 96p maxisorp / neutravidine	Billes magnétiques rCD38m	Membranes cellulaires CD38+	Membranes cellulaires CD38+	Membranes cellulaires CD38+
Nombre de lavages	4	6	8	10	10
Temps total de lavage	1min	5min	15min	1h	3h
Nombre de cycles de PCR	40	35	30	25	20

Rappel des paramètres expérimentaux utilisés pour la sélection IV contre rCD38m. La protéine cible est fixée sur les différents supports solides selon trois procédés différents en fonction des tours : 1) rCD38m-biot est fixé au support via des liaisons non covalentes de type biotine-streptavidine (tour 1). 2) rCD38m est fixé par couplage covalent au support (tour 2). 3) Utilisation de membranes exprimant CD38 murin immobilisées en fonds de plaque Maxisorp.

B-Contrôle de l'enrichissement des banques L5/L6 par ELISA

Comme pour les sélections précédentes, l'enrichissement éventuel des banques L5 et L6 en séquences d'intérêt est testé par ELISA après 5 tours de sélection. Les Affitines issues de la traduction des banques sont incubées avec les membranes CD38 positives ou négatives afin de tester leur capacité de reconnaissance de la protéine membranaire. Le même test est réalisé en parallèle avec rCD38m.

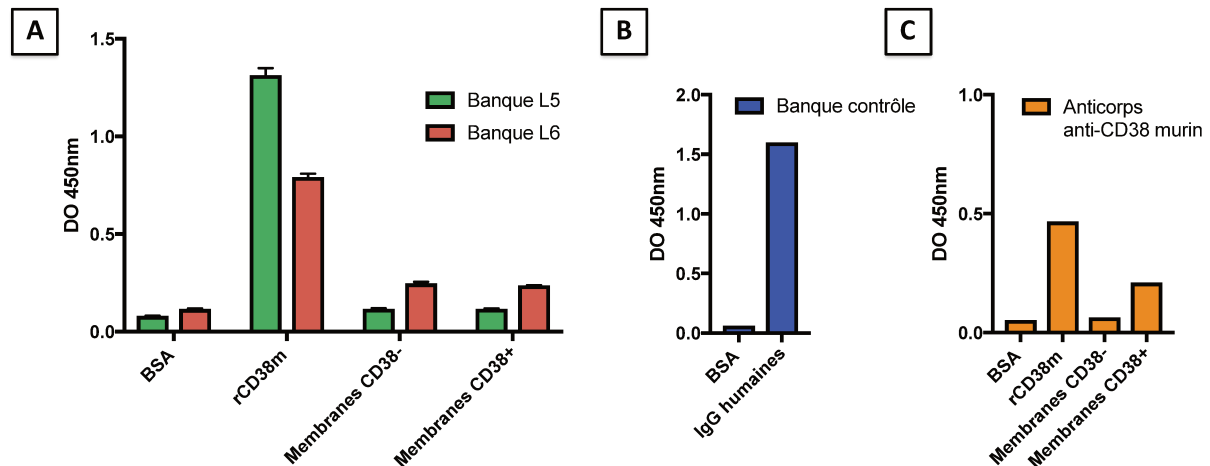


Figure 54 | Contrôle de l'enrichissement des banques en séquences d'Affitines anti-CD38m par ELISA à l'issue de la sélection IV. A) ELISA de contrôle de l'enrichissement des banques L5/L6 en Affitines anti-(r)CD38m. Les protéines testées sont immobilisées en plaque Maxisorp soit directement (Adsorption directe : BSA et rCD38m) soit en utilisant des extraits de membranes de cellules exprimant CD38 murin. La BSA et les membranes CD38- servent de témoins. B) ELISA de contrôle de la traduction. Afin de vérifier l'efficacité du processus de traduction, une banque contrôle contenant une seule séquence codant pour une Affitine anti-IgG humaine est traduite. Le mélange de traduction est incubé dans un puits préalablement coaté avec des IgG humaines. C) ELISA contrôle de rCD38m ou CD38 murin membranaire. La protéine est détectée avec un AcM anti-CD38 murin.

Les résultats d'ELISA montrent que les Affitines générées ne reconnaissent pas le CD38 murin membranaire. Nous n'observons pas de différences entre les signaux obtenus que les produits de traduction soient incubés avec les membranes CD38 positives ou avec les membranes CD38 négatives comme présenté sur la **figure 54A**. Les résultats des contrôles montrent que la traduction n'est pas en cause (**figure 54B**) et que la protéine CD38 présente à la surface de la membrane des cellules positives est bien reconnue par l'anticorps spécifique (**figure 54C**). Il semble que le signal résiduel observé soit lié à la présence d'Affitines s'accrochant à la membrane de manière aspécifique. On note cependant une forte affinité des Affitines L5 et L6 pour la protéine recombinante rCD38m. Comment expliquer ce résultat ? Les banques L5 et L6 n'ont en effet plus été sélectionnées contre cette protéine depuis le tour n2 et la sélection des tours 3 à 5 contre la protéine membranaire ne semble pas productive. Une hypothèse serait que les deux premiers tours de sélection ont suffi à enrichir significativement les banques en séquences codant pour des Affitines rCD38m. Ces séquences peuvent avoir

ensuite persisté tout au long des tours de sélection contre les membranes du fait de phénomènes de rétention aspécifiques des ARN [212].

Nous décidons de vérifier cette hypothèse en testant par ELISA de groupe les banques L5 et L6 issues de chacun des tours de la sélection II. Cette expérience doit nous permettre de mettre en évidence le tour de sélection à partir duquel l'enrichissement des banques en séquences d'intérêt est significatif.

VII-Etude des banques de séquences issues de la sélection II contre rCD38m

A-Test ELISA

Les résultats obtenus lors de la sélection IV sur membranes nous laissent à penser que l'enrichissement des banques en séquences codant pour des Affitines anti-rCD38m peut être significatif avant le tour n5. Pour tester cette hypothèse, nous décidons de reprendre toutes les séquences L5/L6 obtenues à l'issue de chacun des tours (de 0 à 5, 0 correspondant aux banques générées par PCR d'assemblage mais n'ayant pas encore été sélectionnées et 5 correspondant au dernier tour de la sélection). Ces séquences sont transcrites puis traduites. Les produits de traduction sont utilisés pour un ELISA polyclonal afin de mesurer l'enrichissement des banques en séquences anti-rCD38m à l'issue de chaque tour.

Les résultats obtenus, présentés **figure 55**, nous montrent que la sélection contre rCD38m induit un enrichissement significatif des banques dès la fin du second tour. On observe en effet pour les deux banques un signal ELISA qui devient significatif au tour 2 pour ensuite atteindre un plafond dès le tour 3. Ces observations témoignent d'un enrichissement précoce des banques en séquences codant pour des Affitines anti-CD38.

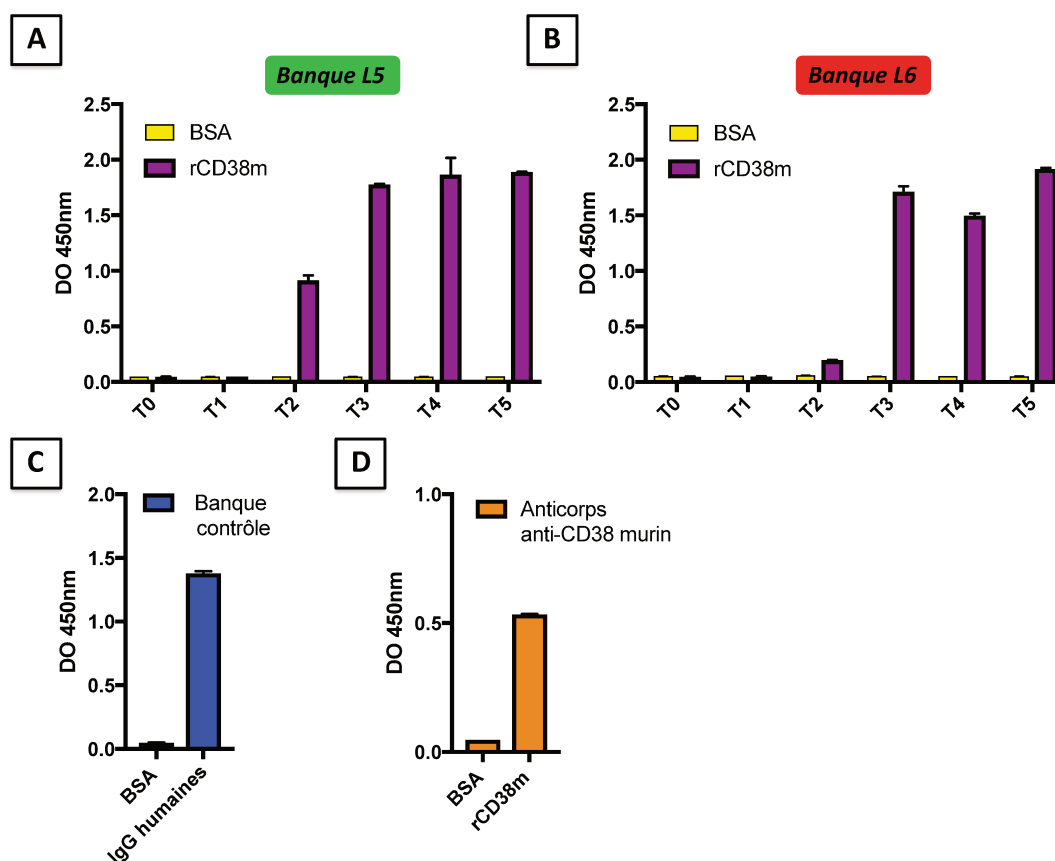


Figure 55 | Contrôle de l'enrichissement des banques en séquences d'Affitines anti-rCD38m pendant la sélection II. A) ELISA de contrôle de l'enrichissement de la banque L5 en Affitines anti-rCD38m avant la sélection (T0) et à l'issue de chaque tour (T1 à T5). La protéine cible (rCD38m, en violet sur l'histogramme) et une protéine contrôle (BSA, en jaune sur l'histogramme) sont immobilisées au fond d'une plaque Maxisorp. B) ELISA de contrôle de l'enrichissement de la banque L6 en Affitines anti-rCD38m avant la sélection (T0) et à l'issue de chaque tour (T1 à T5). La protéine cible (rCD38m, en violet sur l'histogramme) et une protéine contrôle (BSA, en jaune sur l'histogramme) sont immobilisées au fond d'une plaque Maxisorp. C) ELISA de contrôle de la traduction. Afin de vérifier l'efficacité du processus de traduction, une banque contrôle contenant une seule séquence codant pour une Affitine anti-IgG humaine est traduite. Le mélange de traduction est incubé dans un puits préalablement sensibilisé avec des IgG humaines. D) ELISA contrôle de rCD38m. La protéine est détectée avec un AcM anti-CD38 murin.

Nous décidons donc de cloner les séquences obtenues à l'issue des tours n2 et n3 et de les cribler par cytométrie en flux. 400 clones issus du tour de sélection n2 (200 L5 et 200 L6) et 400 clones issus du tour n3 (200 L5 et 200 L6) sont criblés par cytométrie en flux. Une fois encore, les résultats ne s'avèrent pas satisfaisants. A ce stade, on peut se demander si la conformation de rCD38m présentée lors des sélections oriente intrinsèquement et fatalement la sélection vers des épitopes inadaptés pour une fixation sur cellule. Il n'y aurait dans ce cas pas d'autre solution que de changer la forme de CD38 utilisée lors du processus de sélection. On peut également s'interroger sur la présence d'épitopes de rCD38m que nous pourrions qualifier « d'immunodominants » dans le sens où ils conduiraient à une sélection très rapide d'un nombre limité de familles d'Affitines. Nos résultats pourraient également être liés à une combinaison des deux phénomènes. Peut-être faut-il pousser plus loin le criblage en visant des échelles de

grandeur de l'ordre de 10 000 clones criblés ? Malheureusement, le temps nous manque pour vérifier cette hypothèse sur cellules.

Nous décidons de réaliser un séquençage NGS de la banque L5 afin d'analyser l'évolution des banques pendant la sélection et essayer de comprendre nos difficultés à sélectionner des Affitines reconnaissant la protéine CD38 exprimée à la membrane des cellules.

B-Séquençage NGS de la banque L5 issue de la sélection II

a-Résultats du séquençage

Les banques de séquence des tours T0 (banque L5 « naïve » n'ayant jamais été sélectionnée contre rCD38m) à T5 (banque L5 ayant subi 5 tours de sélection) sont séquencées par NGS. Les résultats obtenus suite à une première analyse bioinformatique des séquences sont présentés dans le **tableau 11**.

Tableau 11 | Données obtenues après séquençage NGS de la banque L5 de T0 à T5

Groupe de séquences	Banque L5 naïve (T0)	Tour 1	Tour 2	Tour 3	Tour 4	Tour 5
Lectures (« reads »)	816074	794929	830430	775073	524080	563783
Séquences exploitables	814642	793409	829219	773576	522938	562768
Séquences appairées	492535	471245	480814	428379	279154	309292

Résultats obtenus après séquençage NGS de la banque L5 de T0 à T5 et première analyse à l'aide des outils « FASTQ » et « Clustering ». Ces logiciels permettent de dénombrer le nombre de lectures (« reads » obtenues par échantillon), de vérifier la qualité des séquences et de les regrouper par paires de séquences.

Les données obtenues sont de grande qualité, puisque l'on obtient plusieurs centaines de milliers de séquences d'Affitines par échantillon. Ce nombre élevé de séquences ainsi que leur qualité est un prérequis important avant d'effectuer les analyses bioinformatiques portant sur l'évolution de la banque au cours des tours de sélection.

b-Analyse de l'évolution de la sélection L5

Les analyses bioinformatiques portant sur l'évolution de la banque L5 pendant le processus de sélection sont effectuées à l'aide de l'outil « Clustering » qui permet de regrouper les

séquences identiques par famille ou « cluster ». Les résultats obtenus suite à l'analyse sont présentés dans le **tableau 12**.

Tableau 12 | Résultats d'analyse de la banque L5 de T0 à T5 par le logiciel « Clustering »

Groupe de séquences	Banque L5 naïve (T0)	Tour 1	Tour 2	Tour 3	Tour 4	Tour 5
Nombre de clusters	433939	405826	383514	246565	170993	167501
Taille du plus grand cluster	6	8	320	3237	1959	3124
Clusters ayant au moins 100 séquences	0	0	44	143	111	136

Résultats d'analyse des séquences de la banque L5 avant la sélection et tout au long des tours de sélection (T0 à T5) par l'outil bioinformatique « Clustering ». Les séquences identifiées comme étant identiques sont regroupées par famille ou « cluster ».

L'analyse par « Clustering » des séquences de la banque L5 avant sélection nous permet d'identifier 433 939 clusters sur un total de 492 535 séquences appairées, soit en moyenne 1.1 séquence par cluster. Ce résultat confirme que le protocole de création des banques d'Affitines permet l'obtention d'une très large diversité avec très peu de biais, puisqu'aucun cluster de grande taille n'a pu être observé sur près d'un demi-million de séquences. C'est la première fois qu'une banque d'Affitines est séquencée à une aussi grande échelle.

L'analyse des échantillons T0 à T5 révèle une diminution du nombre de clusters et donc du nombre de séquences différentes pendant l'avancée de la sélection. On observe également l'évolution de la taille du plus grand cluster qui se peuple au fur et à mesure des tours jusqu'à atteindre un maximum à T3. La diminution de taille de ce cluster observée ensuite au tour n4 pourrait correspondre aux variations du schéma de sélection (augmentation de la stringence des lavages) qui permettent d'éliminer des séquences indésirables.

Ces données traduisent un enrichissement de la banque L5 en séquences codant pour des Affitines anti-CD38 et corroborent les résultats obtenus pour l'ELISA de suivi de l'évolution de la banque L5 (cf. **figure 55**).

La comparaison entre eux des clusters comportant au moins une centaine de séquences identiques permet d'analyser plus finement l'évolution des séquences durant la sélection. Bien que donnant l'impression d'une certaine diversité, cette analyse révèle une homologie de séquence forte entre ces différents clusters qui ne diffèrent souvent que de quelques bases. On constate ainsi que plus de 90% des séquences analysées sont identiques ou présentent une quasi-homologie dès la fin du second tour de ribosome display. La sélection s'est donc opérée très tôt probablement pour un épitope préférentiel à la surface de CD38. Si l'on compare les séquences qui avaient été purifiées et testées par FACS contre des cellules exprimant CD38, il

apparaît qu'aucune de celle que nous avons choisie au hasard n'est issue d'une famille de séquences minoritaires.

Parmi les séquences qui se maintiennent au fur et à mesure de la sélection, et qui reconnaissent potentiellement CD38, nous avons pu identifier trois autres familles de séquences différant significativement de la famille largement majoritaire. Il sera intéressant de faire synthétiser les gènes correspondant à ces Affitines pour les produire et les tester par FACS quant à leur capacité à reconnaître les cellules exprimant CD38 à leur surface.

Discussion

Cette première partie de mon projet de thèse s'est intéressée au développement de protéines présentant des propriétés anticorps-mimétique, les Affitines, pour le ciblage du CD38. Notre objectif était de sélectionner par ribosome display plusieurs Affitines anti-CD38 candidates afin de les évaluer pour l'imagerie TEP du myélome multiple. À cette fin, il était prévu que le projet se déroule en plusieurs étapes : production des protéines recombinantes CD38 cibles, préparation des banques de séquences, sélection, criblage, caractérisation physicochimique des Affitines anti-CD38 produites et expérience d'immuno-TEP dans un modèle murin syngénique de MM.

L'étape de production des protéines recombinantes nous a permis d'obtenir rCD38m et rCD38h à l'échelle du milligramme. Les différents tests pratiqués pour valider la qualité de nos lots de production ont mis en avant la conservation des propriétés enzymatiques caractéristiques de la protéine. Le test de cinétique développé à cette occasion a prouvé son efficacité pour le suivi des réactions GDP-ribosyl-cyclase et GDP-ribose-hydrolase (ADP-ribosyl-cyclase et ADP-ribose-hydrolase avec le substrat naturel NAD⁺) catalysées par le CD38. Des expériences complémentaires réalisées avec des lignées cellulaires exprimant CD38 incubées dans le milieu réactionnel ont également permis de visualiser ces activités. En plus de la production des protéines cibles, cette étape du projet a donc abouti à la mise au point d'un protocole de test pouvant s'avérer utile pour la recherche d'Affitines ou d'autres types de protéines d'affinité présentant une activité inhibitrice.

Le choix des banques de séquences utilisées a été réfléchi au sein de l'équipe et arrêté en considérant les derniers résultats obtenus pour les sélections les plus récentes. Auparavant basées sur la séquence de la protéine Sac7d (banques L1 à L4), les banques ont évolué du fait de la caractérisation d'une nouvelle protéine archéale, Aho7c, qui présente des propriétés physicochimiques plus favorables [187]. La banque L5, issue de la randomisation de 10 positions d'acides aminés de cette protéine, a notamment été utilisée avec succès pour la sélection d'Affitines spécifiques de la protéine humaine recombinante EpCAM avec une affinité de 110 pM [188]. Nous avons donc généré une banque analogue supplémentée par une deuxième banque nommée L6, dérivée de L5 par ajout d'une extension peptidique localisée entre les résidus aminés 27 et 28. Cette extension, étendant une boucle déjà présente, doit permettre de favoriser la sélection d'Affitines capables de se lier à des épitopes concaves couramment retrouvés au niveau des sillons enzymatiques des protéines. Cette approche a déjà été mise en pratique et validée par Correa et collaborateurs dans une étude visant à caractériser des Affitines anti-glycosidase [184].

Le protocole de sélection mené pendant ce projet a dû, à plusieurs reprises, être modifié pour tenir compte des obstacles expérimentaux rencontrés. La première modification a été apportée à la suite de la sélection d’Affitines spécifiques des protéines d’immobilisation de rCD38m aux supports. Des tests complémentaires ont permis de mettre en évidence une reconnaissance de la poche de liaison à la biotine, ou d’une région très proche, par ces Affitines (cf. **figure 46**). L’utilisation alternée, au cours des tours de sélection, de différentes protéines de capture de la biotine (avidine, neutravidine, streptavidine) minimise ce genre de problème et a été utilisée avec succès pour les sélections réalisées par le groupe ces dernières années ainsi que par d’autres équipes pour d’autres types de charpentes. Cependant, et malgré une homologie de séquence relativement faible, la streptavidine et l’avidine (et par extension la neutravidine) présentent des structures quaternaires très proches voire même quasi-identiques au niveau de la poche de fixation de la biotine [213] (cf. **figure 56**). Cette quasi-similitude structurelle peut expliquer la sélection et la conservation tout au long des tours d’Affitines capables de se lier à ces protéines au niveau de la poche. Cette problématique avait déjà été observée lors de sélections précédentes pour lesquelles ce type de précautions particulières n’avaient pas été prises. Cependant, « l’envahissement » des banques par des séquences codant ce type d’Affitines a toujours été marginal. Dans notre cas, seules ces séquences semblent être retrouvées à la fin du cinquième tour de ribosome display. Ce type de résultats peut s’expliquer par une éventuelle moindre accessibilité ou densité d’épitopes du CD38 comparativement au site de liaison à la biotine des protéines d’attache. Ainsi, au fur et à mesure des tours de sélection, la proportion de séquences codant pour des Affitines « anti-poche de la biotine » augmente pour finir par représenter la quasi-totalité des séquences de la banque. On peut envisager que quelques séquences codant pour des Affitines anti-CD38 aient été sélectionnées et aient subsisté mais qu’elles soient trop minoritaires pour être identifiées par l’ELISA effectué à l’issue du cinquième tour.

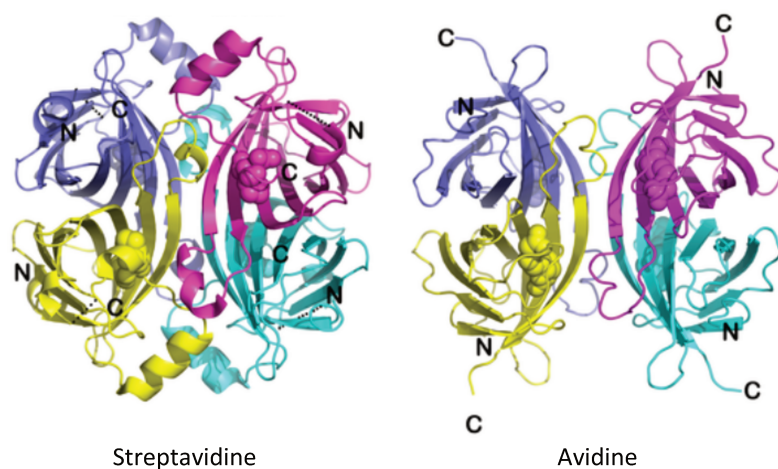


Figure 56 | Structure des protéines streptavidine et avidine

Représentation des homotétramères de streptavidine et d’avidine. Les sous-unités (I à IV) sont montrées avec des couleurs différentes : I (bleu), II (cyan), III (magenta) and IV (jaune). Les résidus de la poche de liaison de la biotine sont représentés sous forme de sphères.

L'approche adoptée afin de s'affranchir de ce problème a été de modifier le protocole de ribosome display en incluant l'utilisation de billes magnétiques directement couplées avec la protéine cible. Ce type de fixation permet d'éviter l'utilisation de protéines d'attache de type streptavidine. Cette stratégie s'est avérée pertinente puisque nous avons réussi à obtenir des Affitines spécifiques du CD38 murin recombinant. Il est cependant à noter qu'une fraction des clones sélectionnés à partir de la banque L6 présentait toujours un fort signal contre la neutravidine seule, témoignant de la persistance d'Affitines se fixant au niveau de la poche de la biotine (cf. **figure 47**). Ce fort signal mesuré en ELISA peut être lié à la structure même de la banque, qui du fait de la présence de la boucle peptidique étendue, va présenter une liaison facilitée aux épitopes concaves.

Les bons résultats obtenus à l'issue de la seconde sélection, avec 70 à 80% des Affitines criblées par ELISA qui sont spécifiques de rCD38m (cf. **figure 48 et 49**) nous laissaient optimistes quant à l'obtention d'Affitines capables de se fixer sur la protéine CD38 exprimée par les cellules. Malheureusement, le criblage de 400 clones issus des banques L5 et L6 sur la lignée 5T33-Luc(+)CD38^{high} ne nous a pas permis d'isoler d'Affitines intéressantes. Ce problème peut être lié à des différences dans l'accessibilité ou la conformation des épitopes entre les formes recombinante et cellulaire de CD38. La colocalisation de la protéine cible avec d'autres protéines partenaires comme le BCR, CD16 ou CD19 à la membrane peut notamment entraîner un masquage potentiel des épitopes reconnus par les Affitines anti-rCD38m [57]. D'autre part, les différences de glycosylation entre les formes recombinante et native peuvent également constituer un problème pour la reconnaissance de CD38, protéine pour laquelle les groupements osidiques comptent pour 25% du poids moléculaire [43]. Si les variations dans les processus de glycosylation entre les cellules de mammifères, d'insectes et les bactéries sont bien connues [214], les différences existant entre les différentes lignées de cellules de mammifères utilisées pour la production de protéines recombinantes sont moins documentées. Certaines études se sont cependant penchées sur ce problème et ont pu mettre en évidence la variabilité des motifs glycosylés retrouvés sur une même protéine produite avec différentes lignées [215], [216]. On peut donc supposer que ces différences de glycosylation vont entraîner l'apparition d'épitopes ne présentant pas une homologie de conformation totale entre la forme recombinante ou native d'une même protéine. Ces différences peuvent également expliquer le manque d'affinité des Affitines anti-rCD38m pour le CD38 exprimé à la membrane des cellules. Ce problème n'est pas limité aux Affitines, puisque des anticorps dirigés contre une même protéine peuvent reconnaître celle-ci à la surface de certaines lignées cellulaires l'exprimant et pas d'autres [217].

Une stratégie de masquage d'épitope a ensuite été choisie afin de résoudre ce problème de reconnaissance du CD38 murin cellulaire par les Affitines. Notre postulat de départ était le suivant : nous avons réussi à sélectionner des Affitines anti-rCD38m mais celles-ci ne fixent pas sur les lignées cellulaires CD38 positives. Des différences d'accessibilité et de conformation d'épitopes entre les formes recombinante et native de la protéine cible peuvent être à l'origine

de ce problème. Il faut donc essayer de sélectionner des binders spécifiques d'autres épitopes en espérant que ceux-ci soient communs aux deux formes de CD38.

Pour ce faire, la protéine cible a été incubée avec des Affitines-rCD38m préalablement produites et purifiées afin de bloquer l'accès des complexes ternaires (Affitines-ARN-ribosome) à ces épitopes pendant la sélection. La stratégie employée est illustrée par la **figure 57** ci-dessous.

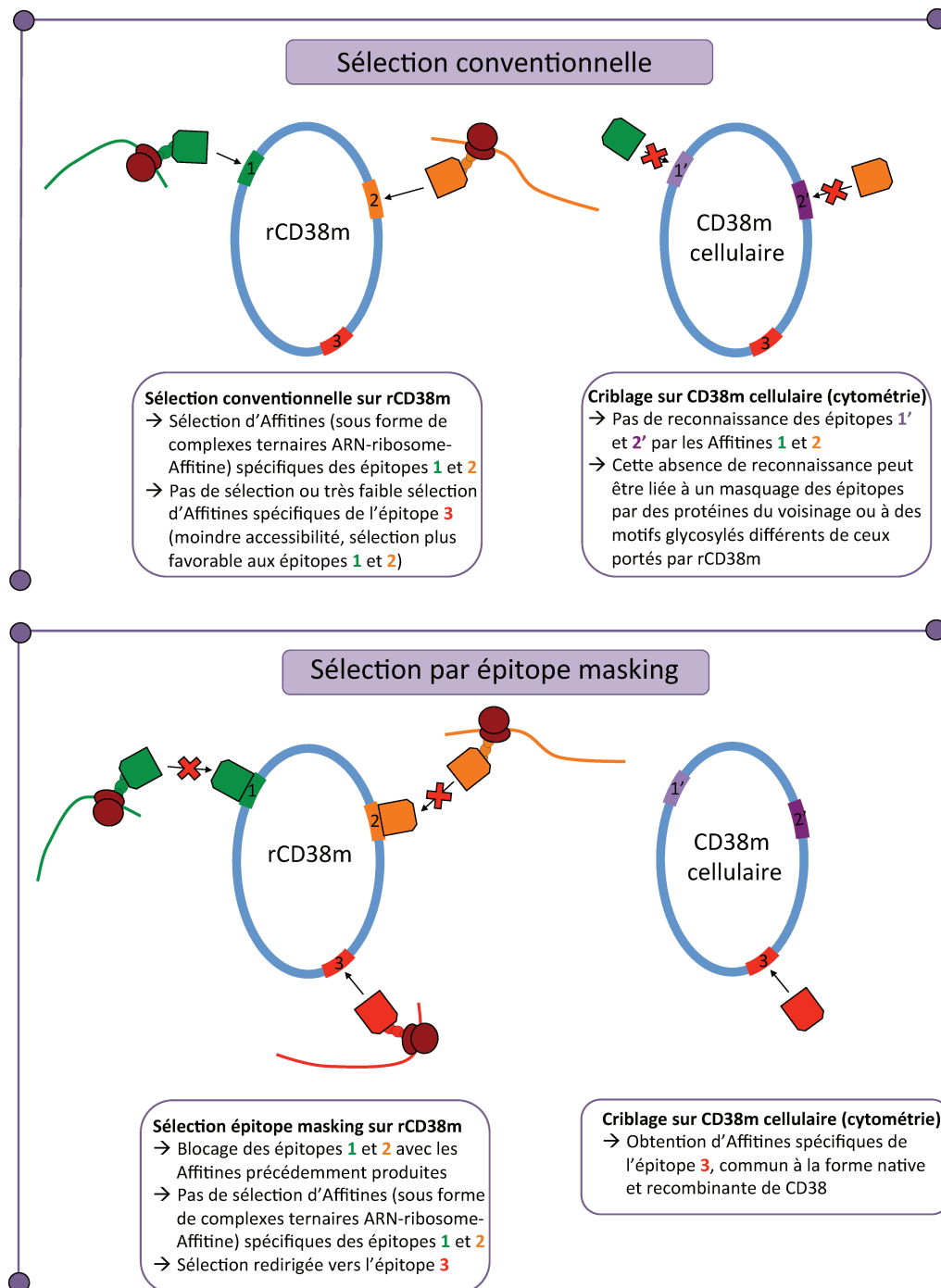


Figure 57 | Stratégie de sélection conventionnelle et par épitope masking

Malgré cette stratégie de masquage d'épitope, les résultats de la sélection n'ont pas permis d'identifier des Affitines se fixant sur cellules (cf. **figure 53**). Il est possible que ces résultats

négatifs soient liés à une utilisation trop tardive dans la sélection, à partir du tour 3, des Affitines de masquage. Les expériences d'ELISA effectuées ultérieurement sur l'ensemble des banques L5/L6 à l'issue de chaque tour (T0 à T5) ont en effet montré un enrichissement en séquences anti-rCD38m commençant de façon inhabituelle dès le tour 2 (cf. **figure 55**). Ces résultats ont par la suite été confirmés par l'analyse NGS. Pour espérer faire fonctionner cette stratégie d'épitope masking, nous aurions donc dû incuber les Affitines de blocage avec rCD38m dès le tour 1 de la sélection. Cette option n'avait pas été choisie d'emblée, du fait de la possibilité d'isoler des Affitines reconnaissant des complexes CD38-Affitine de masquage, hypothèse probable du fait de la très grande diversité de séquences présentes au tour 1. L'obtention à posteriori des résultats d'ELISA réalisés sur l'intégralité des banques L5/L6 (T0 à T5) nous a empêchés de disposer du temps nécessaire à la réalisation de cette nouvelle sélection.

La dernière sélection réalisée avec les extraits membranaires s'est également avérée non productive. Des phénomènes de rétention aspécifique des complexes ternaires ARN-ribosome-Affitines semblent en effet survenir pendant la sélection. Nous supposons qu'il s'agit majoritairement d'interaction entre les ARNm, négativement chargés et certaines protéines membranaires positivement chargées [212]. Cette rétention aspécifique empêche donc l'obtention d'Affitines reconnaissant des épitopes communs à la forme native et recombinante du CD38.

Le séquençage NGS effectué sur la banque L5 issue de la sélection II nous a permis de mieux comprendre les problèmes rencontrés pendant ce projet. Les résultats obtenus confirment les données de l'ELISA effectué sur la totalité de la banque L5 (de T0 à T5) utilisée pendant la sélection II. On observe en effet, dès le second tour, une réduction de la diversité des familles de séquences rencontrées. Nous pensons donc que notre sélection a entraîné très rapidement une baisse drastique de la variabilité des séquences d'Affitines. Les grandes familles de séquences restantes correspondent très probablement à des protéines reconnaissant des épitopes non partagés par CD38 murin recombinant et son homologue exprimé à la surface des cellules. Le NGS a également permis de mettre en évidence certaines séquences plus minoritaires et potentiellement non criblées en cytométrie.

Cette approche nous a donc permis de réaliser que la stratégie de criblage des clones par cytométrie en flux pouvait être limitée par l'existence de ces grands clusters de séquences dans le cas où ces derniers ne codent pas pour des Affitines reconnaissant la protéine CD38 exprimée à la membrane des cellules. Le nombre de clones d'Affitines analysé par cytométrie peut alors se révéler insuffisant pour couvrir l'intégralité des différentes familles de séquences existantes en fin de sélection. Le risque est alors grand de passer à côté de familles de séquences minoritaires présentant des propriétés de fixation différentes de celles du cluster majoritaire. Notre prochain objectif sera de produire les Affitines correspondant à ces séquences minoritaires afin de les tester sur cellules.

L'approche de séquençage NGS mise en œuvre pour caractériser la distribution des séquences en cours de sélection semble prometteuse et elle est maintenant mise en œuvre pour les nouvelles sélections d'Affitines. Un nombre significatif d'Affitines différentes pourra ainsi être testé avec l'avantage que la synthèse de gène correspondant à une Affitine (180 pb) représente un coût de seulement 80 € aujourd'hui.

Les difficultés expérimentales rencontrées pour la génération d'Affitines spécifiques du CD38 cellulaire nous ont empêchés de mener à bien les expériences précliniques programmées pendant le temps imparti pour ce projet. Ces difficultés ne sont pas liées aux capacités intrinsèques de reconnaissance des Affitines puisque nous avons réussi à générer des Affitines spécifiques capables de distinguer le CD38 murin du CD38 humain et présentant des affinités probablement nanomolaires. L'obstacle majeur rencontré ici tient plutôt dans les différences existant entre une protéine recombinante purifiée et son équivalent naturel. Ainsi, toutes les précautions prises, toutes les vérifications de l'activité catalytique qui est en général un bon reflet d'une conformation native, n'ont, à priori, pas suffi à reproduire l'état dans lequel se trouve CD38 à la surface des cellules.

Les analyses effectuées par ELISA et par NGS sur la banque L5 utilisée pendant la sélection II nous ont cependant permis de mieux comprendre les difficultés rencontrées. Les processus de sélection futurs pourront bénéficier de ces nouvelles connaissances et seront adaptés en fonction (alternance de protéines d'attache de type streptavidine avec la protéine cible directement couplée au support, contrôle de l'enrichissement des banques dès la fin du deuxième tour et non plus du cinquième, stratégie d'épitope masking enclenchée plus tôt dans la sélection si nécessaire, analyses NGS systématiques en cas de difficulté). Le projet Affitines anti-CD38 n'est pas encore fini puisque l'espoir demeure d'identifier des protéines candidates pour la forme cellulaire parmi les séquences minoritaires mises en évidence pendant l'analyse NGS. Nous espérons donc voir ce travail aboutir afin de disposer d'Affitines pouvant être testées *in vivo* dans notre modèle murin syngénique de MM. Notre conviction de l'intérêt de ce type de vecteur pour l'imagerie a de plus été récemment renforcée par la publication d'une étude préclinique conduite par la société Affilogic rapportant la première utilisation d'Affitines (nom commercial : Nanofitines) radiomarquées au fluor 18 pour l'imagerie TEP des tumeurs présentant une expression du récepteur de l'EGF [218]. Ce travail confirme le potentiel des Affitines pour l'imagerie phénotypique avec une session d'acquisition TEP réalisée 2h après l'injection du vecteur permettant de visualiser distinctement les tumeurs EGFR+. Malgré les limites inhérentes au modèle murin de xélogreffe utilisé, cette étude autorise un premier éclairage sur l'intérêt des Affitines pour imagerie. En janvier 2021, une autre étude préclinique portant sur l'utilisation d'une Affitine anti-HSP110 comme agent anti-tumoral a été publiée [219]. Ce travail a permis de

mettre en évidence la capacité des Affitines à jouer non plus seulement un rôle de vecteur mais aussi d'agent thérapeutique à part entière. La réalisation d'expériences de TEP-Scan afin de démontrer la spécificité de ciblage *in vivo* de l'Affitine anti-HSP110 étudiée vient également renforcer l'intérêt porté à ces vecteurs pour une utilisation en imagerie. Les résultats de TEP publiés montrent en effet une accumulation spécifique de l'Affitine anti-HSP110 radiomarquée au Gallium 68 au niveau du tissu tumoral du modèle murin syngénique utilisé. L'implantation sous-cutanée du tissu tumoral ciblé ne permet cependant pas de présager des résultats qui seraient obtenus dans un modèle de tumeurs disséminées, plus proche de la réalité clinique. Bien que l'imagerie TEP ne soit pas le but premier de cette étude, ces résultats apparaissent comme prometteurs et renforcent nos convictions quant au potentiel de ces vecteurs pour le diagnostic en oncologie.

De manière plus générale, le développement de nouveaux vecteurs présentant des propriétés anticorps-mimétiques constitue un axe de travail majeur pour de nombreux groupes de recherche. Les différentes charpentes protéiques évoquées dans l'introduction (Nanobodies, Affibodies, Darpins, Affitines...) sont autant de pistes sérieuses permettant d'envisager dans un futur proche l'émergence d'une imagerie phénotypique clinique caractérisée par une plus grande spécificité pour le tissu tumoral. Cette considération technique est renforcée par l'avantage offert par ces nouvelles technologies de ciblage d'une réduction du temps passé en milieu hospitalier pour le patient par rapport à une imagerie anticorps plus chronophage du fait des paramètres pharmacocinétiques propres à ces molécules. Le coût de production de ces vecteurs, théoriquement moins élevé que celui des AcM monoclonaux, représente également un avantage économique d'importance.

Le développement de ces nouvelles classes de vecteurs et la transition vers une utilisation clinique routinière apparaît donc comme une opportunité dans le cadre du développement de la médecine personnalisée. Mais « si la route est droite, la pente est forte » comme l'ont illustré les difficultés rencontrées au cours de ce projet. L'effort de recherche à produire reste donc conséquent avant de pouvoir envisager un déploiement clinique à large échelle de ces technologies.

Partie II : Biodistribution et imagerie TEP du CD38

MATERIELS ET METHODES	136
I-MODELE CELLULAIRE 5T33	136
II-MISE EN PLACE ET CARACTERISATION DU MODELE CELLULAIRE 5T33-LUC(+) CD38(+)	137
III-CD38 MURIN : BIODISTRIBUTION ET IMAGERIE TEP	142
IV-STATISTIQUES	149
RESULTATS	150
I-MISE EN PLACE ET CARACTERISATION DES LIGNEES CELLULAIRES 5T33-LUC(+) CD38(+)	150
II-RADIOMARQUAGE ET VALIDATION DE L'ANTICORPS ANTI-CD38 MURIN MAL-DOTA ⁶⁴Cu	155
III-ETUDES DE BIODISTRIBUTION DE L'ANTICORPS ANTI-CD38M MAL-DOTA ⁶⁴Cu	157
IV-ETUDES D'IMAGERIE TEP AVEC L'ACM ANTI-CD38M MAL-DOTA ⁶⁴Cu	161
DISCUSSION	169

Matériels et méthodes

I-Modèle cellulaire 5T33

La lignée cellulaire murine 5T33 [220] est le modèle cellulaire majoritairement utilisé au sein de notre équipe pour les travaux d'imagerie et de thérapie du MM réalisés dans un modèle murin syngénique. Cette lignée va exprimer les marqueurs conventionnels du MM retrouvés chez les plasmocytes malins humains (CD138, CD269, CD319) à l'exception du CD38. La lignée 5T33 et son équivalent exprimant la luciférase 5T33-Luc(+) ont cependant été utilisées pendant ce projet et sont décrites ci-dessous.

*5T33 :

La lignée cellulaire de MM murin 5T33 nous a été aimablement fournie par le Dr. Harvey Turner (Service de Médecine Nucléaire, Hôpital Fremantle, Australie) avec la permission du Dr. Jiri Radl (Institut TNO, Pays-Bas) [220]

*5T33-Luc(+):

La lignée cellulaire 5T33-Luc(+) a été générée avant mon arrivée au laboratoire par transduction de la lignée 5T33 avec un vecteur rétroviral contenant le gène codant la luciférase comme décrit précédemment [221].

Les différentes lignées cellulaires dérivées de 5T33 générées et/ou utilisées pendant ce projet sont cultivées en milieu RPMI 1640 (Gibco) supplémenté avec 2mM de L-glutamine, 100U/ml de pénicilline (Invitrogen), 100µg/ml de streptomycine (Invitrogen) et 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (SVF, laboratoire PAA) à 37°C, 5% de CO₂ et 95% d'humidité. Les cellules sontensemencées à raison de 0,1 M cellules/ml et sont maintenues en culture à une concentration inférieure à 1,5 M cellules/ml.

II-Mise en place et caractérisation du modèle cellulaire 5T33-Luc(+) CD38(+)

L'absence d'expression du CD38 par la lignée 5T33 nous a conduits à modifier cette population afin de disposer d'un modèle cellulaire exprimant la protéine d'intérêt. Les connaissances de notre groupe autour du modèle 5T33 et la faible expression du CD38 par l'autre lignée de MM murin (MOPC315.BM) utilisée par l'équipe nous ont poussés à faire ce choix. Nous souhaitons de plus disposer de la composante luciférase pour notre modèle cellulaire afin de pouvoir localiser les lésions myélomateuses par BLI (bioluminescence) en amont des expériences d'imagerie. De ce fait, la lignée 5T33-Luc(+) a été sélectionnée pour être modifiée. Une approche de transduction rétrovirale a été choisie pour induire l'expression de CD38 murin dans cette lignée du fait de son caractère réfractaire aux protocoles de transfection classiques.

A-Clonage du CD38 murin dans le vecteur pMX

La séquence codante du CD38 murin a été obtenue par extraction des ARN totaux de la lignée de MM murin MOPC315.BM, reverse transcription et PCR. La séquence est ensuite clonée dans le vecteur rétroviral pMX [222]. Le protocole suivant a été suivi :

a) Extraction des ARN totaux de la lignée MOPC315BM

- Culture de la lignée MOPC315BM en milieu RPMI 1640 supplémenté jusqu'à disposer de 5 millions de cellules.
- Extraction des ARN totaux à l'aide du kit « Nucleospin RNA II » (Macherey Nagel) utilisé selon les indications du fournisseur.

b) Reverse transcription

- La reverse transcription est effectuée à l'aide du kit « Superscript II Reverse Transcriptase » (ThermoFischer). Le mix suivant est réalisé : 2 µg d'ARN totaux, 2 µl de dNTP 10 mM, 1 µl d'oligo(dT) 50 µM, 4 µl de buffer 5 x, 1 µl de DTT, 1 µl de RNaseOUT, 1 µl Reverse Transcriptase superscript, H₂O qsp 20 µl.
- Incubation 1 h à 50°C.
- Incubation 15 min à 70 °C.
- Ajout de 80 µl d'H₂O. Les ADNc sont conservés à -20°C.

c) PCR d'amplification de CD38 sur les ADNc. Les sites de restriction des enzymes Sall et HindIII sont ajoutés aux amorces sens et anti-sens respectivement.

Amorces utilisées

CD38murin-sens-Sall	5'-ATGCGTAAGCTTATGGCTAACTATGA-3'
CD38murin-antisens-HindIII	5'-ATGCGTGAATTCTCACGTATTAAGTCTACA-3'

Programme PCR

98°C	30s	
98°C	10s	} x30
59°C	30s	
72°C	1min	
72°C	10min	
14°C	∞	

- Le mix suivant est réalisé : 10 µl de phusion buffer 5 x, 1 µl de dNTP 10 mM, 2,5 µl amorce CD38murin-sens Sall 10 µM, 2,5 µl amorce CD38murin-anti-sens HindIII 10 µM, 1,5 µl DMSO, 0,5 µl Phusion high fidelity polymerase (ThermoFischer), 2 µl d'ADNc, H2O qsp 50 µl.
- Le produit de PCR est déposé sur gel d'agarose 1 % afin de s'assurer de la réussite de la PCR et vérifier la taille du fragment obtenu. Une purification est ensuite réalisée selon les instructions du kit « Wizard DNA Clean-Up System » (Promega).

d) Digestion et clonage de l'insert CD38 murin dans pMX

- L'ADNc CD38 murin purifié est digéré par Sall et HindIII (New England Biolab) en utilisant le mix suivant : 2,5µl Sall HF (10U/µl) ; 2,5µl HindIII HF (10U/µl) ; 30µl ADNc CD38 murin (2,5µg) ; 6µl tampon cutsmart 10x ; 6µl BSA 10x ; H2O qsp 60µl. Une incubation de 1 heure à 37°C est réalisée.
- L'ADN CD38 murin digéré est purifié selon les instructions du kit « Wizard DNA Clean-Up System » (Promega) puis cloné dans le vecteur rétroviral pMX (préalablement linéarisé par Sall et HindIII) à l'aide de la T4 DNA ligase (ThermoFischer) utilisée selon les instructions du fournisseur. Le mix suivant est réalisé : 2,87µl de vecteur pMX linéarisé (50ng) ; 6,12µl d'ADN CD38 murin digéré (37ng) ; 10µl de tampon quick ligase 2X ; 1µl d'enzyme Quick Ligase. Le mélange est incubé 15 min à 25°C puis conservé sur glace jusqu'à la transformation.
- La souche *E.coli* XL1 (Agilent) est transformée avec pMX-CD38m selon les instructions du fournisseur. Les bactéries transformées sont étalées sur boîte de Pétri. Un criblage par PCR sur colonie est réalisé afin d'isoler un clone positif. Le clone choisi est amplifié dans 100 ml de milieu LB. pMX-CD38m est purifiée à l'aide du kit Nucleospin plasmid (Macherey nagel) selon les indications du fournisseur.

B-Transduction de la lignée 5T33-Luc(+)

Le vecteur pMX-CD38 murin généré lors de l'étape précédente est utilisé afin de transfecter la lignée cellulaire Phoenix-Ampho packaging cells (ATCC® CRL-3213). Cette lignée va permettre, après transfection, la génération des particules rétrovirales contenant la séquence CD38m. Le protocole suivant est réalisé :

- La veille de la transfection, ensemencement d'une plaque 6 puits avec 150 000 cellules Phoenix par puits dans 4 ml de milieu DMEM 4,5 g/L glucose supplémenté.
- La transfection est réalisée à l'aide du kit « Lipofectamine 2000 Transfection Reagent » (ThermoFischer) utilisé selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, pour chaque puits contenant les cellules à transfecter, le milieu DMEM de culture est remplacé par 2 ml de milieu Opti-MEM (Gibco) sans sérum. Un mix contenant 325 µl de milieu Opti-MEM (Gibco), 10 µl de lipofectamine, 3,5 µl de PLUS-reagent et 5 µl (3,5 µg) de vecteur pMX-CD38 murin est ensuite ajouté. Une incubation sur 4 heures en incubateur est effectuée (37°C, 5 % de CO₂ et 95% d'humidité).
- Après l'incubation, le milieu de transfection est remplacé par du milieu DMEM 4,5 g/L glucose supplémenté.
- La population transfectée est ensuite amplifiée. Lorsque les cellules sont à confluence, le surnageant contenant les particules rétrovirales est collecté, filtré à 0,46 µm, puis utilisé pour la transduction de la lignée 5T33-Luc(+).

Les particules rétrovirales générées sont utilisées afin de transduire la lignée 5T33-Luc(+). Le protocole suivant est suivi :

- Le jour de la transfection, ensemencement d'une plaque 6 puits avec 1,5 million de cellules 5T33-Luc(+) par puits dans 1,5 ml de milieu RPMI supplémenté.
- Dépôt de 1,5 ml de surnageant rétroviral sur les cellules. Ajout de 3 µl de polybrème (Sigma-aldrich), 8 µg/ml final par puits.
- Centrifugation de la plaque à 2400 g pendant 90 minutes.
- Incubation de la plaque 90 min en incubateur (37°C, 5 % de CO₂ et 95% d'humidité).
- Remplacement du milieu de transduction par du milieu RPMI supplémenté neuf.
- Incubation de la plaque 24 h en incubateur (37°C, 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité).
- Le puits contenant les 5T33-Luc(+) est de nouveau transduit avec 1,5 ml de surnageant rétroviral. Le même protocole est suivi. Cette étape de transduction est répétée 3 fois en tout.
- Après transduction, la population 5T33-Luc(+) est amplifiée puis analysée par cytométrie en flux afin de s'assurer de la réussite du protocole.

C-Clonage et sélection des clones 5T33-Luc(+)CD38(+)

Une semaine après la transduction, les cellules sont clonées en plaque 96 puits fonds plats à raison de 0,3 cellules par puits. Quinze jours après l'ensemencement, les colonies obtenues sont transférées en flasque individuelle et maintenues en culture à des fins d'amplification de la population cellulaire. Un criblage par cytométrie en flux de ces différentes populations est ensuite réalisé afin d'isoler des clones exprimant le CD38.

Le protocole suivant est utilisé :

- Pour chaque population, dépôt de 200 000 cellules par puits dans une plaque 96 puits à fond conique.
- Deux lavages PBS-BSA 0,1 %, 2 fois 150 µl par puits. Entre chaque lavage, la plaque est centrifugée 1 min à 2500 g afin de culotter les cellules. Le surnageant est retiré par flicking de la plaque.
- Incubation avec un anticorps anti-CD38 murin couplé à la phycoérythrine (eBioscience, clone 90) dilué à 2 µg/ml en PBS-BSA 0,1 %. Incubation 1 h, 4°C.
- Trois lavages PBS-BSA 0,1 %, 2 fois 150 µl par puits. Entre chaque lavage, la plaque est centrifugée 1 min à 2500 g afin de culotter les cellules. Le surnageant est retiré par flicking de la plaque.
- Après le dernier lavage, le culot cellulaire est resuspendu dans 200 µl de PBS.
- Acquisition des résultats par cytométrie en flux (calibur, BD).

Suite au criblage, 10 clones présentant des niveaux d'expression de CD38 différents sont sélectionnés et amplifiés. Un phénotypage des marqueurs CD38 et CD138 est réalisé en suivant un protocole identique à celui observé pour le criblage des populations 5T33 issues du clonage (voir ci-dessus). Seule l'étape d'incubation avec l'anticorps va différer. Les populations cellulaires sont en effet incubées 1 h à 4°C soit avec un mix d'anticorps de détection (mix 1), soit avec un mix contenant les isotypes contrôles respectifs de ces anticorps (mix 2). La composition des mix est détaillée ci-dessous :

*Mix 1 : AcM anti-CD38 murin PE (Biolegend, clone 90) dilué à 2 µg/ml en PBS-BSA 0,1 %.

AcM anti-CD138 murin APC (PharMingen, clone 281-2) dilué à 2 µg/ml en PBS-BSA 0,1 %.

*Mix 2 : IgG2a, κ de rat PE (Biolegend, clone MOPC-173) dilué à 2 µg/ml en PBS-BSA 0,1 %.

IgG2a, κ de rat APC (Biolegend, clone RTK2758) dilué à 2 µg/ml en PBS-BSA 0,1 %.

Après analyse des résultats, deux clones sont sélectionnés et utilisés pour l'étude *in vivo*. L'un des clones exprime très fortement CD38, l'autre plus faiblement. Dans la suite du document, ces populations seront nommées respectivement 5T33-Luc(+)CD38^{high} et 5T33-Luc(+)CD38^{low}.

Les différentes populations 5T33-Luc(+)CD38(+) générées sont conservées à -196°C dans une solution de SVF contenant 10 % de DMSO (Diméthylsulfoxyde).

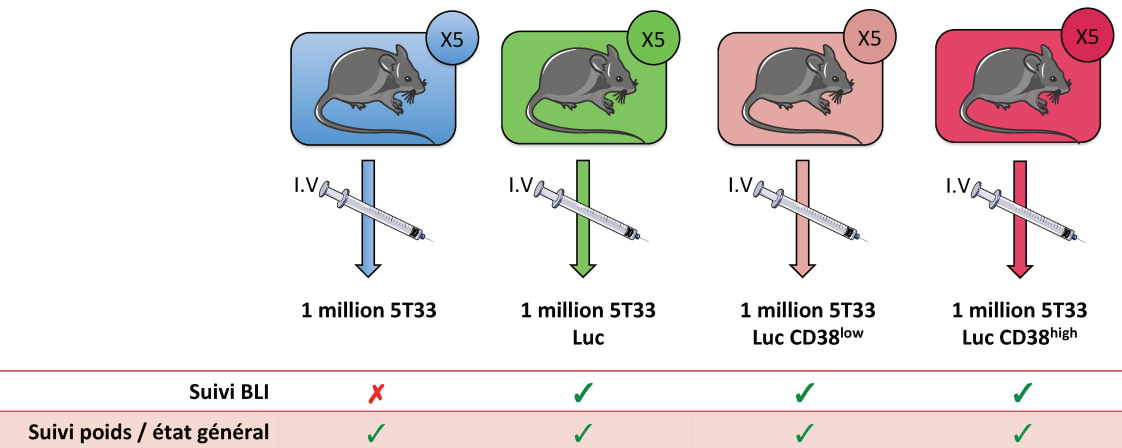
D-Etude *in vivo* des clones 5T33-Luc(+)CD38(+)

Les 2 clones 5T33-Luc(+)CD38^{low} et 5T33-Luc(+)CD38^{high} générés précédemment font l'objet d'une étude *in vivo* afin de vérifier l'absence d'impact de la transduction CD38 sur leur capacité de prolifération et de dissémination dans le modèle murin C57BL/KaLwRij majoritairement utilisé par l'équipe. Les populations 5T33 et 5T33-Luc(+) sont intégrées à l'étude afin de disposer de points de comparaison avec des lignées de référence présentant un comportement *in vivo* connu et documenté. Avant injection, les quatre populations 5T33, 5T33-Luc(+), 5T33-Luc(+)CD38^{low} et 5T33-Luc(+)CD38^{high} sont caractérisées pour leur expression des marqueurs CD38 et CD138. Le protocole suivi est identique à celui décrit précédemment.

a-Greffe des souris C57BL/KaLwRij

Les souris C57BL/ KaLwRij utilisées pour les expériences d'étude *in vivo* des clones 5T33, de biodistribution et d'imagerie ont été achetées chez Envigo et hébergées au sein de l'Unité de Thérapeutique Expérimentale de l'Institut de Recherche en Santé de Nantes (UTE-IRS-UN, numéro de licence : B-44-278). Les expériences réalisées lors de mon projet de thèse ont été approuvées par le comité d'éthique en expérimentation animale (référence 00143.02) et menées dans le respect des normes et réglementations en vigueur.

Quatre groupes constitués de cinq souris C57BL/ KaLwRij âgées de 19 semaines sont greffés en systémique respectivement avec 1 million de cellules 5T33 ; 5T33-Luc(+) ; 5T33-Luc(+)-CD38^{low} ou 5T33-Luc(+)-CD38^{high} préalablement diluées dans 100µl de PBS. La greffe est réalisée par injection intraveineuse caudale du volume contenant les cellules. Les groupes expérimentaux ainsi que les modalités de suivi sont présentés sur la **figure 58** ci-dessous.



Suivi survie des animaux des 4 groupes

Figure 58 | Schéma expérimental de l'étude *in vivo* des populations cellulaires 5T33 ; 5T33-Luc(+) ; 5T33-Luc(+)-CD38^{low} ; 5T33-Luc(+)-CD38^{high}
Le suivi par bioluminescence (BLI) n'est pas réalisé pour les souris injectées avec la lignée 5T33 conventionnelle du fait de l'absence d'expression de la luciférase par cette lignée.

b-Suivi des souris C57BL/ KaLwRij greffées

Les animaux greffés font l'objet d'un suivi trihebdomadaire avec pesée, palpation et vérification visuelle de leur état de santé global. Un suivi hebdomadaire du développement des lésions myélomateuses est également effectué par bioluminescence (voir détails ci-dessous). Les animaux présentant une perte ou un gain de poids supérieur à 10 % de leur poids initial et/ou une paralysie des membres et/ou qui présentent un comportement anormal prolongé (prostration, stéréotypie) sont sacrifiés par dislocation cervicale après avoir été préalablement anesthésiés à l'aide d'une solution d'isoflurane 5 %.

En parallèle du suivi conventionnel, un suivi hebdomadaire du développement des lésions myélomateuses est effectué par bioluminescence. Brièvement, les souris sont anesthésiées par injection intra-péritonéale de 200 µl d'une solution anesthésique (composée de 1 ml de kétamine à 100 mg/ml (Panpharma) ; 0,5 ml de xylazine à 20 mg/ml (Bayer) ; et 8,5 ml de PBS). Après anesthésie, les animaux sont injectés en intra-péritonéale avec 100 µl d'une solution de luciférine à 12 mg/ml (Interchim) 5 minutes avant d'être imagés. Les acquisitions sont réalisées en position ventrale et dorsale avec l'appareil Photon IMAGER™ (Biospace Lab) sur une durée de 30 secondes. Les images sont analysées avec le logiciel M3Vision™ (Biospace Lab). Ce suivi n'est pas réalisé pour les souris injectées avec la lignée 5T33 conventionnelle du fait de l'absence d'expression de la luciférase.

III-CD38 murin : Biodistribution et imagerie TEP

Les souris C57BL/KaLwRij utilisées pour les expériences de biodistribution et d'imagerie ont été achetées chez Envigo et hébergées selon les conditions décrites précédemment.

A-Modèles murins de MM : modèle tumoral sous-cutané ou disséminé

Deux types de modèles tumoraux de MM ont été utilisés pour ce projet : un modèle de tumeur sous-cutanée (SC) et un modèle de tumeur disséminée (IV). La lignée 5T33-Luc(+)CD38^{high} établie au laboratoire est employée comme lignée de MM CD38 positive, la lignée 5T33-Luc(+) comme contrepartie négative.

Les souris du modèle SC sont greffées en sous-cutané au niveau des membres postérieurs gauche et droit avec respectivement 2.10^6 5T33-Luc(+)CD38^{high} et 2.10^6 5T33-Luc(+) en

suspension dans 100 µl de PBS. La greffe est réalisée 13 jours avant le début des sessions d'acquisition TEP et les expériences de biodistribution.

Les souris du modèle IV sont greffées par injection intraveineuse caudale de 1.10^6 5T33-Luc(+)-CD38^{high} suspendues dans 100 µl de PBS. La greffe est réalisée 34 jours avant les sessions d'acquisition TEP.

Les animaux greffés SC et IV font l'objet d'un suivi trihebdomadaire avec pesée et vérification visuelle de leur état de santé global comme décrit précédemment. Les points limites conduisant au sacrifice de l'animal sont identiques à ceux décrits précédemment (cf. Etude *in vivo* des clones 5T33-Luc(+)-CD38(+)). Le développement des tumeurs SC et des lésions myélomateuses fait l'objet d'un suivi hebdomadaire par bioluminescence dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

B-Couplage et radiomarquage de l'anticorps

a-Anticorps anti-CD38 murin

L'anticorps monoclonal anti-CD38 murin utilisé pour cette étude a été obtenu auprès de la société BioLegend. Il s'agit d'une IgG2a,κ de rat, dénommée clone 90.

b-Couplage de l'anticorps anti-CD38 murin

Le couplage du chélateur maléimide-DOTA (CheMatech) avec l'IgG anti-CD38 murin (Biolegend, clone 90) est effectué par les radio-chimistes du Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers (CRCINA, INSERM U1232, Nantes, France) selon le protocole suivant :

- Dilution de l'AcM à 1 mg/ml en PBS-EDTA 0,02 % afin de chélater les métaux contaminants.
- Ajout de 210 équivalents d'Iminoéthylane (Sigma-Aldrich). Incubation pendant 2 h à température ambiante sous agitation. Ce réactif va réagir sur les amines primaires pour former un groupe sulfhydryle.
- L'excès d'iminoéthylane est éliminé avec une colonne gel filtration PD10 (GE healthcare). L'anticorps est récupéré en sortie de colonne, dosé puis concentré à 4 mg/ml en PBS EDTA 0,02 % à l'aide d'un Amicon Ultra-4 centrifugal unit (Millipore).
- Le couplage est réalisé en ajoutant 20 équivalents maléimide-DOTA (CheMatech) à la solution d'AcM. Le maléimide vient réagir sur les groupes sulfhydryles permettant ainsi le couplage du DOTA à l'anticorps. Incubation sur la nuit à température ambiante sous agitation.

- L'excès de maléimide-DOTA est éliminé avec une colonne gel filtration PD10 (Sephadex G25, GE healthcare). L'anticorps est récupéré en PBS en sortie de colonne.
- L'absence de maléimide-DOTA dans la solution d'anticorps est vérifiée par chromatographie en phase liquide (UPLC, Ultra performance liquid chromatography).

Une fois couplé, une mesure du nombre moyen de ligands mal-DOTA couplés par anticorps est réalisée par chromatographie sur couche mince.

c-Radiomarquage de l'anticorps anti-CD38 murin

Le cuivre 64 (^{64}Cu) est un isotope radioactif du cuivre présentant une période de 12,7h. Cet émetteur de positons est produit par le cyclotron ARRONAX (GIP ARRONAX, Saint-Herblain, France). Il est obtenu par bombardement d'une cible de nickel 64 avec un faisceau de deutons de 16MeV. Il est délivré en solution sous la forme de $^{64}\text{CuCl}_2$ HCl 0,1 N.

Le radiomarquage de l'anticorps anti-CD38-mal-DOTA est effectué par les radio-chimistes du CRCINA selon le protocole suivant :

- L'AcM est incubé en tampon acétate d'ammonium 0,1M (pH 7) avec une solution de 61 μl de $^{64}\text{CuCl}_2$ (408 MBq, dissolved in HCl 0.1 N) et 6 μl d'acétate de sodium 2,5 M (pH 7). Incubation pendant 20 min à 40°C.
- Ajout de 8 μl d'EDTA 10mM (pH 7) afin de chélater le cuivre non capté par le DOTA. Incubation pendant 5 min à température ambiante.
- L'anticorps radiomarqué est purifié à l'aide d'une colonne gel filtration PD10 (Sephadex G25, GE healthcare).
- La pureté radiochimique de l'anticorps est vérifiée par chromatographie sur couche mince (CCM). Brièvement, l'AcM radiomarqué est déposé à la base d'un support en silice qui est ensuite placé dans une phase mobile composée de tampon citrate (0.1 M ; pH 5). Après migration, la CCM est mise 5 min à exposer sur une plaque au phosphore photostimulable, qui est révélée par un imageur radiométrique type Cyclone Plus (Perkin Elmer). Le logiciel d'analyse Optiquant permet d'obtenir des radiochromatogrammes. L'AcM radiomarqué, va du fait de son PM, rester au niveau du point de dépôt tandis que le cuivre libre éventuel migrera dans la partie supérieure du support.

L'immunoréactivité d'un anticorps désigne sa capacité à se fixer de manière spécifique sur sa cible. Cette propriété peut être altérée notamment lorsque le couplage entraîne la présence de ligands au niveau du paratope. L'immunoréactivité de l'AcM anti-CD38 murin mal-DOTA-⁶⁴Cu est déterminée à l'aide de billes magnétiques (Ademtech) préalablement couplées avec la protéine rCD38m. Le principe de ce test va être de créer un déséquilibre entre le nombre de sites antigéniques disponibles et le nombre d'anticorps en défaveur de ces derniers (cf. **figure 59**). Ce déséquilibre est généré en incubant une quantité de billes rCD38m croissante avec une quantité fixe d'AcM anti-CD38 murin mal-DOTA ⁶⁴Cu. Lorsque le nombre de sites antigéniques est supérieur au nombre d'AcM, seuls les AcM ayant perdu leur immunoréactivité vont rester dans le surnageant. La mesure de la radioactivité de la fraction contenant les billes rCD38m et celle de la fraction de surnageant va nous permettre d'estimer l'immunoréactivité de l'AcM anti-CD38 murin mal-DOTA-⁶⁴Cu. Le protocole suivant est réalisé :

- Réalisation d'une gamme de billes magnétiques rCD38m. 10 µg, 20 µg, 40 µg, 80 µg et 160 µg de billes sont mis en suspension dans un volume final de 100 µl de PBS.
- Le surnageant est éliminé à l'aide d'un portoir magnétique permettant de maintenir les billes le long de la paroi du tube.
- Chaque tube contenant les billes est incubé avec 50 µl d'une solution contenant l'AcM anti-CD38 murin mal-DOTA ⁶⁴Cu dilué à 0,4 µg/ml en PBS-BSA 1 %.
- Incubation 15 min à température ambiante sur agitateur rotatif.
- Récupération des surnageants à l'aide du portoir magnétique. Les surnageants sont conservés en tubes individuels.
- Lavage par resuspension des billes dans 100 µl de PBS-BSA 0,1 %.
- Récupération des surnageants à l'aide du portoir magnétique. Les surnageants sont ajoutés dans les tubes correspondant précédemment utilisés. Volume final par tube : 150 µl. La radioactivité mesurée dans ces tubes va donc refléter la quantité d'AcM présents qui ne se sont pas accrochés aux billes rCD38m.
- Resuspension des billes dans 150 µl de PBS-BSA 0,1 % et transfert dans des nouveaux tubes individuels. La radioactivité mesurée dans ces tubes va refléter la quantité d'AcM présents fixés aux billes rCD38m.
- La radioactivité des différents échantillons recueillis est mesurée à l'aide d'un compteur gamma (Beckman-Coulter) paramétré pour le ⁶⁴Cu. L'immunoréactivité de l'AcM est estimée en calculant le rapport de la radioactivité mesurée pour la fraction contenant les billes sur la radioactivité totale (radioactivité de la fraction « billes » + radioactivité fraction « surnageants »).

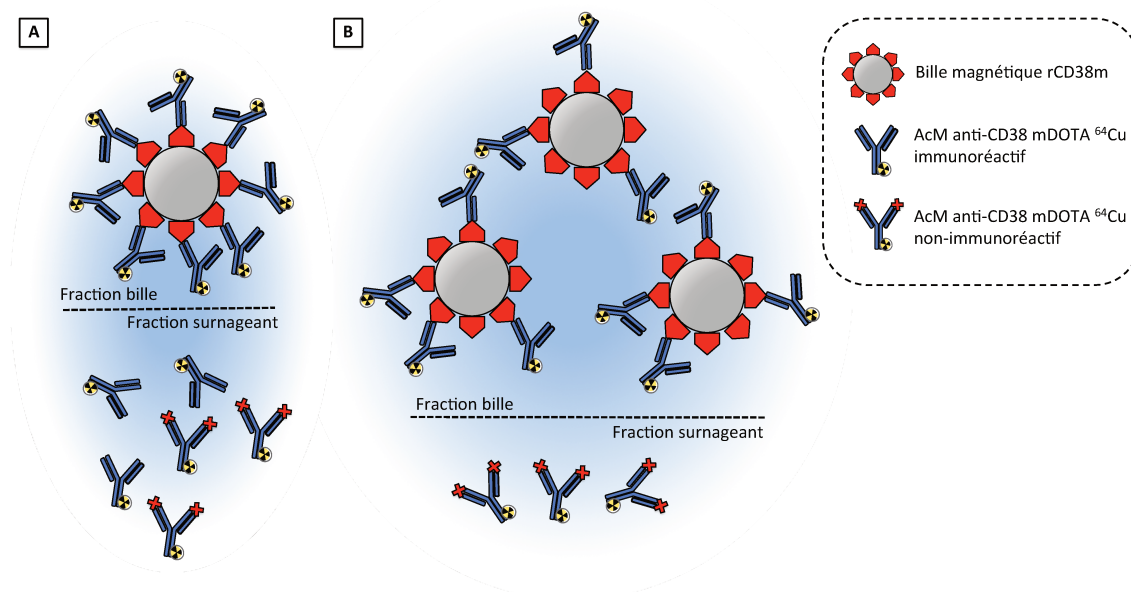


Figure 59 | Test d'immunoréactivité de l'AcM anti-CD38m mal-DOTA ^{64}Cu .

A) Cas de figure expérimental dans lequel la quantité de sites antigéniques est inférieure à la quantité d'anticorps disponibles. La fraction de surnageant issue des lavages va donc contenir un mélange d'anticorps immunoréactifs et non immunoréactifs. La détermination de la valeur d'immunoréactivité n'est pas possible dans cette situation. B) Cas de figure expérimental dans lequel la quantité de sites antigéniques est supérieure à la quantité d'anticorps disponibles. Dans ce cas, tous les AcMs immunoréactifs vont se lier à un site antigénique. Seuls les AcMs non immunoréactifs vont rester dans le surnageant. La mesure de la radioactivité de la fraction bille et de la fraction surnageant permet de calculer l'immunoréactivité de l'anticorps selon la formule suivante: $\text{Immunoréactivité AcM} = (\text{Radioactivité fraction bille} / (\text{Radioactivité fraction bille} + \text{radioactivité fraction surnageant})) \times 100$

e- Affinité de l'anticorps anti-CD38 murin mal-DOTA- ^{64}Cu

Les paramètres cinétiques (k_a , k_d et K_D) de l'anticorps anti-CD38 murin mal-DOTA- ^{64}Cu et de son équivalent non couplé ont été calculés par résonance plasmonique de surface à l'aide d'un Biacore T200 (GE healthcare). Les expériences de SPR ont été effectuées par les ingénieurs de la plateforme Interactions Moléculaires Puces Activités (Impact, Nantes). Brièvement la protéine rCD38m, diluée à $5\mu\text{g/ml}$ en tampon acétate de sodium (pH 4), est immobilisée à hauteur de 2000 unités de résonance par couplage amine sur une puce CM5 (GE healthcare) préalablement activée par un mix NHS/EDC (*N*-hydroxysuccinimide / 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide). Les anticorps anti-CD38 murin et anti-CD38 murin mal-DOTA- ^{64}Cu sont dilués en tampon HBSEP pH 7,4 (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, et 0,005 % surfactant P20) à des concentrations allant de 6 à 100nM . Après injection des protéines, les périodes d'association et de dissociation sont suivies pendant 3 et 1 min respectivement. La régénération entre chaque cycle est réalisée par injection d'une solution de glycine pH 2 pendant 30 s. Les paramètres cinétiques K_a , K_d , et K_D sont obtenus par intégration numérique des données selon un modèle d'interaction 1:1 à l'aide du logiciel BIAevaluation.

C-Etudes de biodistribution

Les études de biodistribution de l'anticorps anti-CD38 murin mal-DOTA-⁶⁴Cu ont été menées dans le modèle murin C57BL/KaLwRij tumoral SC. L'anticorps dilué dans 100 µl de PBS est injecté par intraveineuse caudale. Deux études sont menées avec deux quantités d'anticorps anti-CD38 murin mal-DOTA ⁶⁴Cu différentes (50 µg ou 160 µg) (cf. **figure 60**). La dose par animal injectée lors de la première étude est constituée de 50 µg d'AcM chaud anti-CD38 murin mal-DOTA ⁶⁴Cu (10 MBq). La dose par animal injectée lors de la deuxième étude est constituée d'un mélange de 50 µg d'AcM chaud anti-CD38 murin mal-DOTA ⁶⁴Cu avec 110 µg d'anticorps froid anti-CD38 murin (10 MBq). Pour chacune de ces deux études, les paramètres utilisés restent les mêmes en dehors de la variable « quantité d'anticorps ». L'activité totale injectée reste constante (10 MBq).

A chaque temps post-injection préalablement défini par l'expérimentateur, des animaux sont sacrifiés et les tumeurs, le sang et certains organes/tissus (foie, reins, intestins, poumons, muscle, rate, peau, cerveau, cœur, os plat, fémur et estomac) sont disséqués et pesés à l'aide d'une balance de précision. La radioactivité de chaque organe est mesurée à l'aide d'un compteur γ calibré et normalisé (Beckman-Coulter). Afin de pouvoir analyser les résultats en fonction de l'activité injectée, une activité standard de référence (correspondant à l'activité injectée aux souris ou dose totale injectée) est passée simultanément au compteur gamma. Pour chaque organe, le pourcentage de dose injectée par gramme (% ID/g) est calculé en rapportant l'activité de l'organe à son poids puis en le divisant par la dose totale injectée.

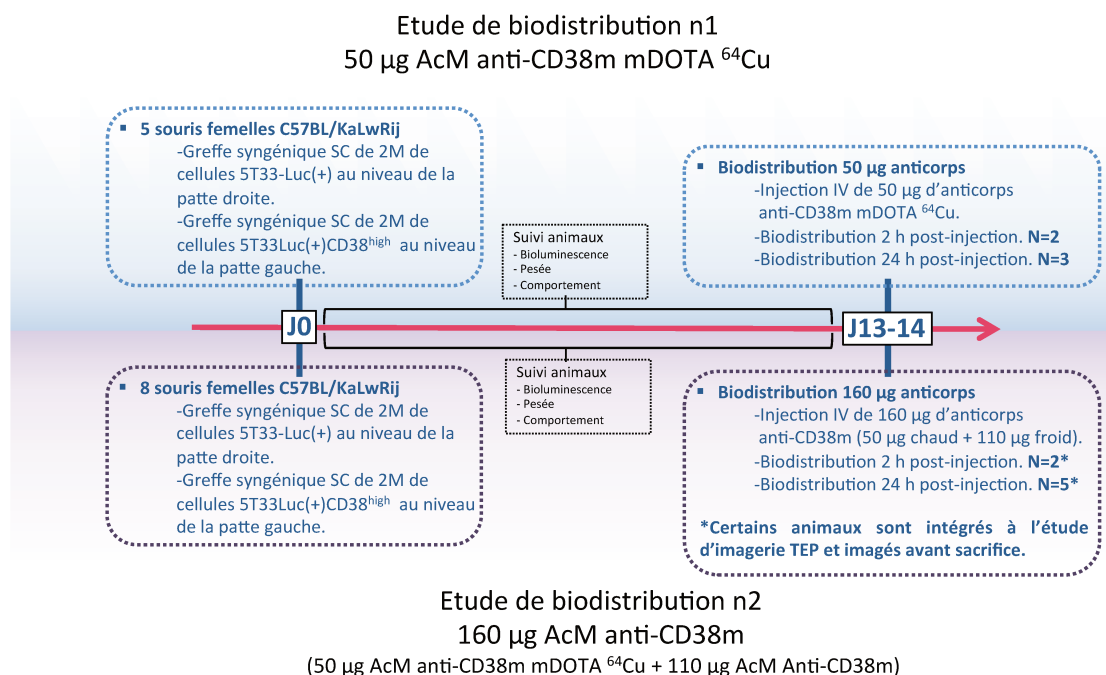


Figure 60 | Protocoles expérimentaux des études de biodistribution de l'AcM anti-CD38 murin mal-DOTA ⁶⁴Cu. Les deux études effectuées font intervenir une variation dans la quantité d'AcM injecté qui est de 50µg d'anticorps chaud pour la première étude et de 160µg pour la deuxième étude (50µg AcM chaud + 110 AcM froid). Les biodistributions sont réalisées dans un modèle murin C57BL/KaLwRij tumoral SC.

D-Etudes d'imagerie TEP-TDM

Les sessions d'acquisition TEP-TDM ont été réalisées au Centre d'Imagerie Multimodale Appliquée de Nantes (CIMA) avec l'aide des médecins nucléaires et physiciens du CHU de Nantes. Les images corps-entier ont été réalisées sur une TEP-TDM petit animal Inveon (Siemens Medical Solution) équipée de détecteurs de type LSO (OxyorthoSilicate de Lutécium). Les images TDM ont été acquises en premier et utilisées pour la correction d'atténuation (paramètres du tube à rayon X : 80 kV ; 500 μ A). Les images TEP ont été acquises pendant 20 minutes. Les sinogrammes 3D ont été reconstruits selon l'algorithme de reconstruction itérative 3D-OSEM puis l'algorithme MAP. La résolution spatiale de la micro-TEP était de 1,5 mm. Le post-traitement des images a été réalisé à l'aide du logiciel « Inveon Research Workplace ».

L'imagerie TEP des souris des modèles SC et IV a été réalisée avec du ^{18}F -FDG et avec l'AcM anti-CD38-murin-mal-DOTA- ^{64}Cu . Une souris saine a également été imagée avec l'AcM anti-CD38-murin-mal-DOTA ^{64}Cu comme contrôle d'imagerie pour ce radionucléide. Le protocole expérimental utilisé est détaillé sur la **figure 61** présentée en page suivante.

Pour l'imagerie TEP au ^{18}F -FDG, les souris suivent un protocole de diète (6 à 12 h) avec un accès libre à l'eau. Le jour de l'acquisition, les animaux sont placés sous lampe chauffante, anesthésiés par inhalation d'isoflurane 5 % puis injectés avec 100 μ l (10 MBq) de ^{18}F -FDG par la veine caudale. Les souris sont maintenues sous anesthésie pendant 1 heure puis imagées.

Pour l'imagerie TEP avec l'AcM anti-CD38-murin-mal-DOTA- ^{64}Cu des procédures identiques ont été suivies à l'exception du protocole de diète et des temps d'imagerie (2 h et 24 h PI). L'anticorps radiomarqué est injecté dans un volume de 100 μ l (10 MBq) par intraveineuse caudale.

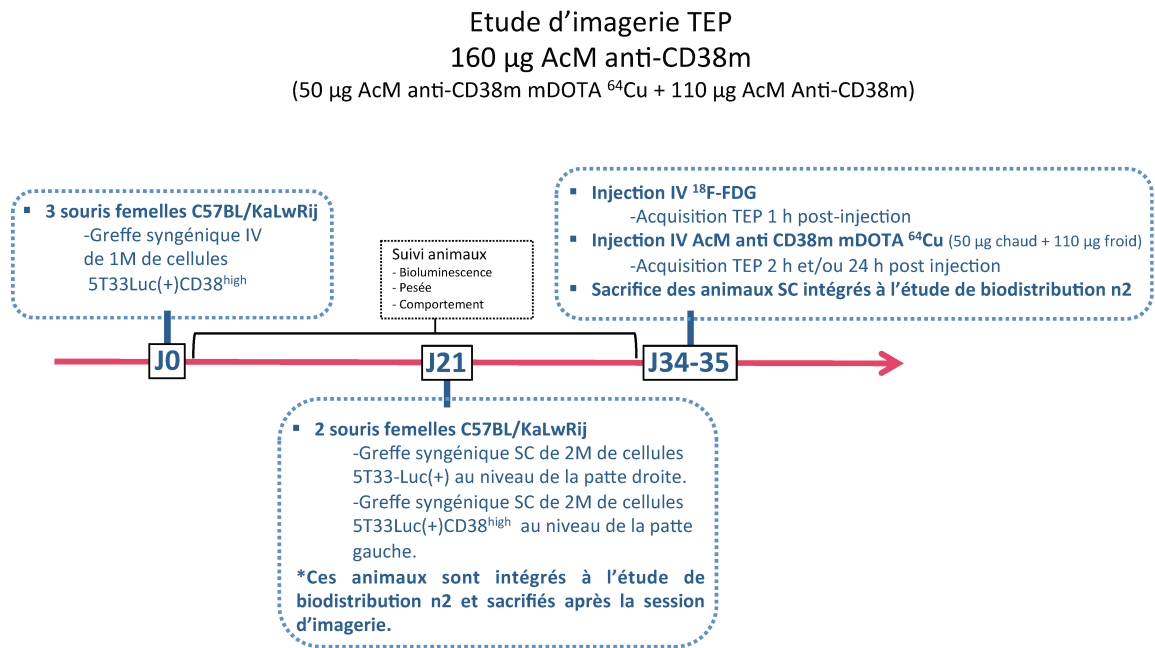


Figure 61 | Protocole expérimental de l'étude d'imagerie TEP de l'AcM anti-CD38 murin mal-DOTA ⁶⁴Cu. Les modèles murins C57BL/KaLwRij tumoral SC et IV sont utilisés pour cette étude d'imagerie TEP. Les animaux greffés SC sont intégrés à l'étude de biodistribution n2 et sacrifiés après l'acquisition TEP.

IV-Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism version 7.0c. Les différences entre les courbes de survie de l'étude in vivo des clones 5T33 sont vérifiées à l'aide du test non paramétrique du logrank. Les différences de fixation de l'AcM anti CD38m mal-DOTA ⁶⁴Cu entre les tumeurs CD38- et CD38+ sont vérifiées à l'aide d'un test non paramétrique de Mann-Whitney.

Résultats

I-Mise en place et caractérisation des lignées cellulaires 5T33-Luc(+) CD38(+)

Les lignées cellulaires de myélome multiple murin 5T33 et MOPC315.BM ainsi que leurs équivalents exprimant la luciférase, 5T33-Luc(+) et MOPC315.BM-Luc(+) utilisées par l'équipe, n'expriment pas le CD38 (5T33, 5T33-Luc(+)) ou très faiblement (MOPC315.BM, MOPC315.BM-Luc(+)). Nous avons donc choisi de générer une lignée exprimant CD38 en modifiant la lignée 5T33-Luc(+) par transduction rétrovirale. L'obtention de cette lignée répondait à une double nécessité. Nous souhaitions en effet disposer d'une lignée de MM murin exprimant CD38 afin de cribler par cytométrie les *Affitins* anti-rCD38m issues des sélections mais aussi pour mener à bien des expériences *in vivo* de biodistribution et d'imagerie. Le suivi par bioluminescence permettant la localisation chez l'animal des cellules après la greffe, nous avons choisi de développer cette lignée à partir de la lignée 5T33-Luc(+).

A l'issue du travail de transduction rétrovirale et de clonage, les populations obtenues sont caractérisées *in vitro* pour leur expression du CD38. Une étude *in vivo* de prise de greffe des lignées générées est réalisée afin de mieux caractériser ce nouveau modèle cellulaire.

A-Clonage et caractérisation des clones générés

Cinq jours après la transduction rétrovirale, la lignée 5T33 Luciférase est analysée par cytométrie en flux. Les résultats obtenus mettent en évidence une expression de CD38 par plus de 60% des cellules (résultats non montrés). La population est clonée puis criblée afin d'isoler des clones 5T33-Luc(+) présentant différents profils d'expression pour CD38 (résultats non montrés). 10 clones 5T33-Luc(+)
CD38(+) sont retenus. Ces différentes populations sont sélectionnées afin de disposer d'un panel de 5T33-Luc(+) exprimant CD38 à différents niveaux. Ces clones sont phénotypés par cytométrie en flux pour leur expression de CD38 et CD138 (cf. **figure 62**)

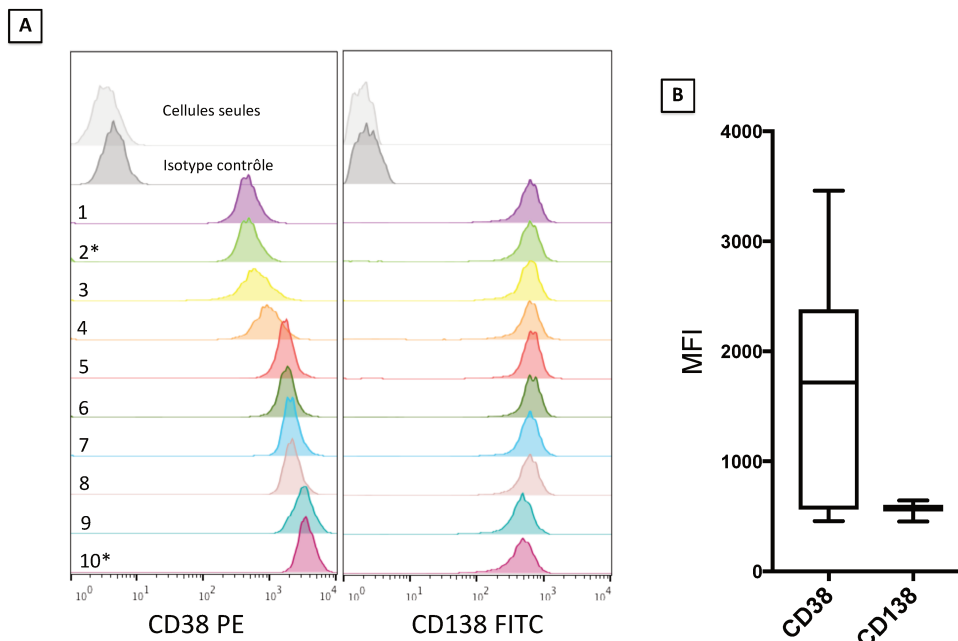


Figure 62 | Caractérisation phénotypique des clones 5T33-Luc(+)CD38(+)

A) Phénotypage par cytométrie en flux des clones 1 à 10 pour l'expression des marqueurs CD38 et CD138. Les MFI relevées pour les cellules seules et l'isotype contrôle étant identiques pour les différentes populations, un histogramme est choisi de manière arbitraire pour chaque paramètre afin de servir de référence pour cette figure (histogrammes en gris clair et gris foncé, haut de figure). Les clones dont le numéro présente un astérisque sont ceux sélectionnés pour l'étude *in vivo*. B) Les valeurs de médiane de fluorescence obtenues pour CD38 et CD138 sont représentées dans un format « boîte à moustache » afin de mieux apprécier leur répartition.

Les populations obtenues vont présenter une expression variée de la protéine CD38 à la membrane avec un facteur 7 de différence entre le plus faible expresseur et le plus fort. Cette variabilité dans l'intensité d'expression du CD38 n'impacte pas celle du CD138 qui reste homogène pour toutes les populations phénotypées. Les populations clonales 5T33-Luc(+)CD38(+) n2 et n10 sont sélectionnées pour l'étude *in vivo* afin de comparer deux lignées exprimant faiblement et fortement CD38 comparativement l'une à l'autre. Elles seront nommées respectivement 5T33-Luc(+)CD38^{low} et 5T33-Luc(+)CD38^{high} dans la suite du document.

B-Etude *in vivo* des populations 5T33-Luc(+)CD38(+)

La caractérisation du comportement *in vivo* des lignées 5T33-Luc(+)CD38^{low} et CD38^{high} a été réalisée par injection en systémique des cellules dans un modèle murin syngénique C57BL/KaLwRij. Nous souhaitons en effet nous assurer de l'absence d'effets potentiels induits par le processus de transduction sur l'agressivité et la localisation des foyers tumoraux. Les lignées 5T33 et 5T33-Luc(+) sont ajoutées à l'étude afin de disposer de points de comparaison avec des populations de référence utilisées au sein de l'équipe.

Le but de cette étude va donc être de comparer la survie des différents groupes de souris greffées en systémique avec les lignées ainsi que de récolter des informations sur la localisation des cellules myélomateuses après la greffe grâce à l'imagerie par bioluminescence. Les résultats

obtenus doivent permettre de juger de la pertinence de l'utilisation des nouvelles lignées 5T33-Luc(+) $CD38^{low}$ et $CD38^{high}$ comme modèle tumoral disséminé de MM.

a-Analyse phénotypique des lignées 5T33

Avant injection, les lignées 5T33, 5T33-Luc(+), 5T33-Luc(+) $CD38^{low}$ et 5T33-Luc(+) $CD38^{high}$ utilisées sont phénotypées pour l'expression des marqueurs CD38 et CD138 (cf. **figure 63**). Ces différentes lignées sont greffées par injection IV caudale dans des souris C57BL/KaLwRij. Le suivi des animaux greffés est effectué comme indiqué dans le « Matériels et méthodes ».

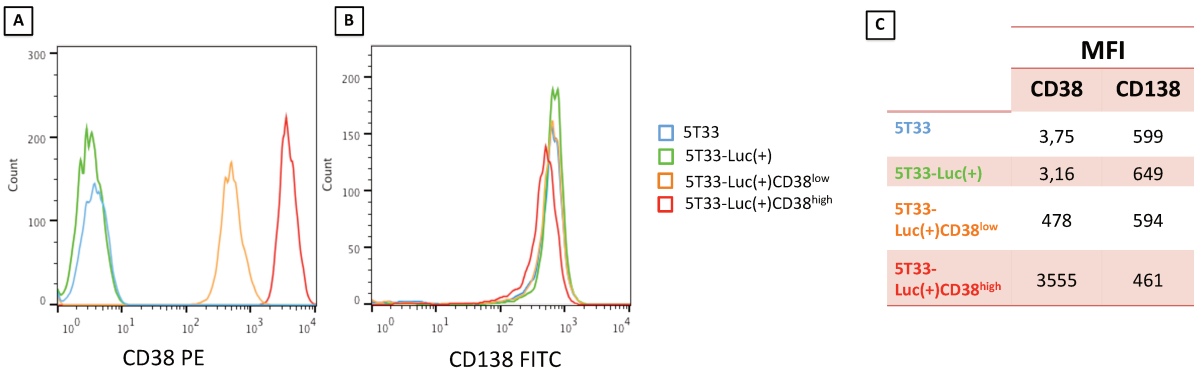


Figure 63 | Analyse phénotypique des populations 5T33, 5T33-Luc(+), 5T33-Luc(+) $CD38^{low}$ et 5T33-Luc(+) $CD38^{high}$ par cytométrie en flux

Phénotypage des populations 5T33, 5T33-Luc(+), 5T33-Luc(+) $CD38^{low}$, 5T33-Luc(+) $CD38^{high}$ pour leur expression des marqueurs CD38 (A) et CD138 (B). Les valeurs de médiane de fluorescence mesurées sont précisées dans le tableau (C). Pour les 4 lignées, les valeurs de médiane de fluorescence mesurées dans les canaux PE et FITC pour les cellules seules ou pour les cellules marquées avec un isotype contrôle, sont comprises entre 3 et 4 (histogrammes non montrés).

b-Localisation des foyers tumoraux

Le suivi des animaux greffés par bioluminescence nous offre la possibilité de localiser les territoires de dissémination des cellules. Si les 5T33 et 5T33-Luc(+) présentent un tropisme préférentiel pour l'environnement médullaire, il a également été montré que ces cellules pouvaient envahir d'autres tissus comme le foie, la rate ou les ganglions lymphatiques [223]. Nous souhaitons, avec ce suivi par BLI, nous assurer que les deux populations 5T33-Luc(+) $CD38^{low}$ et $CD38^{high}$ conservaient ces caractéristiques.

Le suivi par BLI conjugué à l'observation de symptômes de paralysie induits par le développement du MM nous permet de valider la conservation par les lignées $CD38^{+}$ des caractéristiques de dissémination propres aux 5T33 (cf. **tableau 13**). On observe en effet la présence de lésions osseuses caractéristiques du modèle cellulaire chez 100 % des animaux des groupes $CD38^{+}$. Ces différentes lésions sont retrouvées en crânien, dans les membres postérieurs

et en vertébral. On retrouve également des symptômes de paralysie des membres postérieurs consécutifs au développement de foyers tumoraux comprimant la moelle épinière.

Tableau 13 | Symptômes et lésions observés chez les groupes de souris C57BL/KalwRij greffées

	Paralysie membres postérieurs	Lésions osseuses (BLI)	Localisation des lésions osseuses (BLI)			
			Crâne	Membres antérieurs	Membres postérieurs	Vertèbres
Groupe 5T33	3/5	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Groupe 5T33-Luc(+)	3/5	5/5	3/5	0/5	2/5	1/5
Groupe 5T33-Luc(+) <i>CD38</i> ^{low}	5/5	5/5	4/5	0/5	4/5	2/5
Groupe 5T33-Luc(+) <i>CD38</i> ^{high}	4/5	5/5	4/5	0/5	1/5	1/5

Le groupe 5T33 n'est pas suivi par BLI du fait de l'absence d'expression de la luciférase. N.D : non déterminé.

L'exploration de la localisation des foyers extramédullaires a également été réalisée par dissection de l'animal après injection de luciférine 5 min avant sacrifice. On retrouve les localisations évoquées dans l'étude de Vanderkerken et collaborateurs [223] avec des cellules envahissant le foie et la rate.

c-Survie des souris C57BL/KalWrij greffées

Les données obtenues montrent un décalage dans la mortalité des groupes greffés avec les lignées Luc(+) (cf. **figure 64**). Il semble que ce résultat soit lié à l'expression de la luciférase et non pas à celle du CD38. Une étude similaire menée sur la lignée de MM murin MOPC315.BM et son équivalent Luc(+) avait déjà mis en évidence cette différence dans la cinétique du développement tumoral [224]. Les auteurs de cette étude émettent l'hypothèse, jusqu'à présent non investiguée plus en détail, d'un effet immunogénique à bas bruit de la luciférase qui contraindrait le développement des cellules *in vivo* sans les éliminer totalement. Nous observons cependant, dans le cas de notre étude, que cet effet ne semble pas concerner la totalité des animaux des groupes Luc(+). Le temps de survie de 60 à 80 % des souris de ces groupes est en effet analogue à celui observé pour le groupe 5T33. Les individus restants vont finir par présenter des lésions myélomateuses mais le temps nécessaire au développement de ces dernières va être fortement allongé.

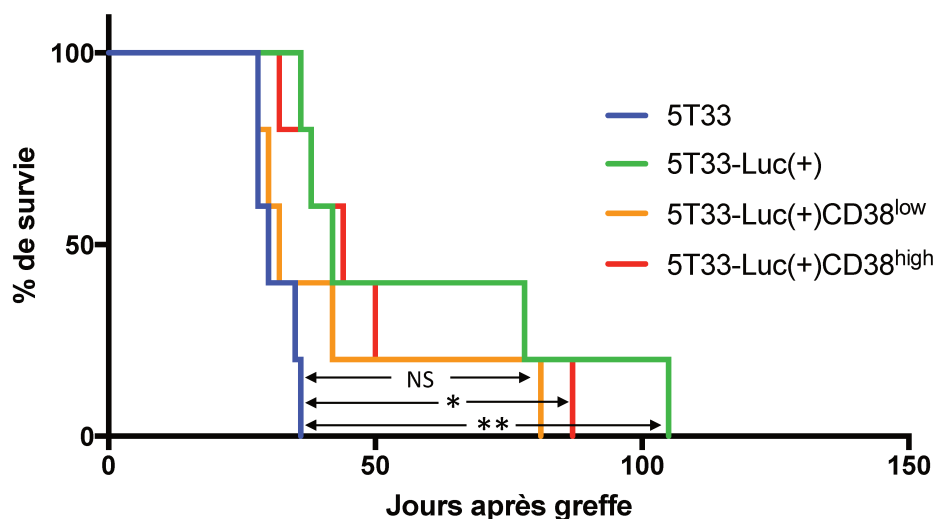


Figure 64 | Courbes de survie des souris C57BL/KalwRij greffées

A $j = 0$, les souris sont greffées par IV avec 1.10^6 cellules (5T33, 5T33-Luc(+), 5T33-Luc(+)CD38^{low}, 5T33-Luc(+)CD38^{high}). $N = 5$ /groupe. Les courbes de survie des groupes 5T33-Luc(+) et 5T33-Luc(+)CD38^{high} sont significativement différentes de celle du groupe 5T33 (Test du Logrank, valeur $p = 0,004$ et $0,013$ respectivement).

d-Conclusion de l'étude in vivo des populations 5T33-Luc(+)CD38^{low} et CD38^{high}

Ce travail nous a permis de générer deux lignées 5T33-Luc(+) exprimant CD38. Les études de bioluminescence et de survie menées chez ces souris nous ont permis de valider la conservation des propriétés de dissémination et de tumorigénèse du modèle 5T33 originel par nos lignées modifiées. On retrouve en effet des localisations tumorales typiques des 5T33 chez les animaux greffés avec ces cellules. La survie des différents groupes est également homogène bien que nous notions une différence entre les trois lignées exprimant la luciférase et la lignée cellulaire de base. Ce phénomène s'explique peut-être par un effet immunogénique à bas bruit de la luciférase.

Les différentes données recueillies au cours de cette étude suggèrent que la modification des cellules 5T33-Luc(+) par transduction et l'expression du CD38 à la membrane n'ont pas altéré les propriétés fondamentales de ce modèle. Les lignées 5T33-Luc(+)CD38^{low} et CD38^{high} générées pourront donc être greffées en systémique dans des souris C57BL/KaLwRij afin de disposer d'un modèle murin MM exprimant CD38.

Le travail de mise en place d'une lignée 5T33-CD38(+) dépourvue de luciférase a également été effectué suite à cette étude. La lignée 5T33 a été modifiée et clonée de la même manière que décrite précédemment afin d'obtenir des clones 5T33-CD38+ (résultats non montrés). Les expériences de greffe *in vivo* de ces nouvelles lignées restent encore à mener.

II-Radiomarquage et validation de l'anticorps anti-CD38 murin mal-DOTA ⁶⁴Cu

L'AcM anti-CD38 murin (IgG2a, κ de rat, clone 90) utilisé pour les études de biodistribution et d'imagerie TEP est couplé avec le chélateur maléimide-DOTA puis radiomarké au ⁶⁴Cu. Suite au radiomarquage, une chromatographie sur couche mince est réalisée afin de vérifier la pureté radiochimique de l'AcM. L'immunoréactivité est également déterminée. Après décroissance du cuivre radioactif, l'anticorps est testé par résonnance plasmonique de surface afin de comparer son affinité à celle de l'AcM non radiomarké.

A-Radiomarquage de l'anticorps anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴Cu

Après couplage et radiomarquage au cuivre 64, la pureté radiochimique de l'AcM est contrôlée par chromatographie sur couche mince (cf. **figure 65**). Les résultats nous indiquent une pureté de 97% témoignant de la réussite du processus de radiomarquage de l'AcM.

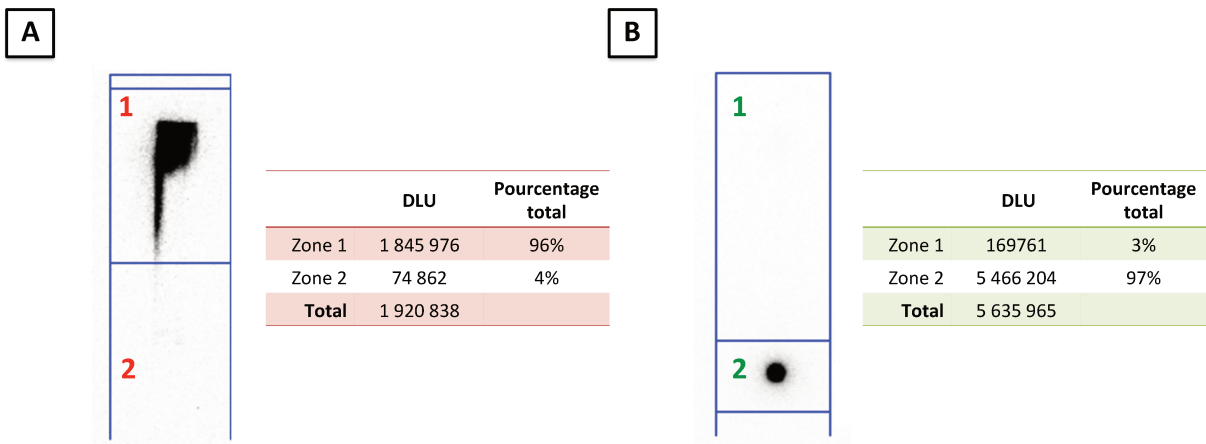


Figure 65 | Contrôle de la pureté radiochimique de l'anticorps anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴Cu. La radioactivité émise par le ⁶⁴Cu est exprimée en DLU (Digital light unit) après analyse des plaques de phosphore photostimulable exposées aux CCM par le logiciel d'analyse Optiquant. A) Contrôle avec dépôt de ⁶⁴CuCl₂ libre. B) IgG anti-CD38 mal-DOTA radiomarké au ⁶⁴Cu.

B-Immunoréactivité et affinité de l'anticorps anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴Cu

L'immunoréactivité est estimée par incubation de l'anticorps radiomarké avec une concentration croissante de billes magnétiques rCD38m. La mesure de la radioactivité des fractions d'AcM liées aux billes ou présentes dans le surnageant va permettre de déterminer sa

valeur (cf. **figure 66 (A)**). La constante d'affinité à l'équilibre (K_D) de l'anticorps radiomarqué est calculée par résonnance plasmonique de surface et comparée à celle mesurée pour l'anti-CD38 murin non couplé (cf. **figure 66 (B-C)**).

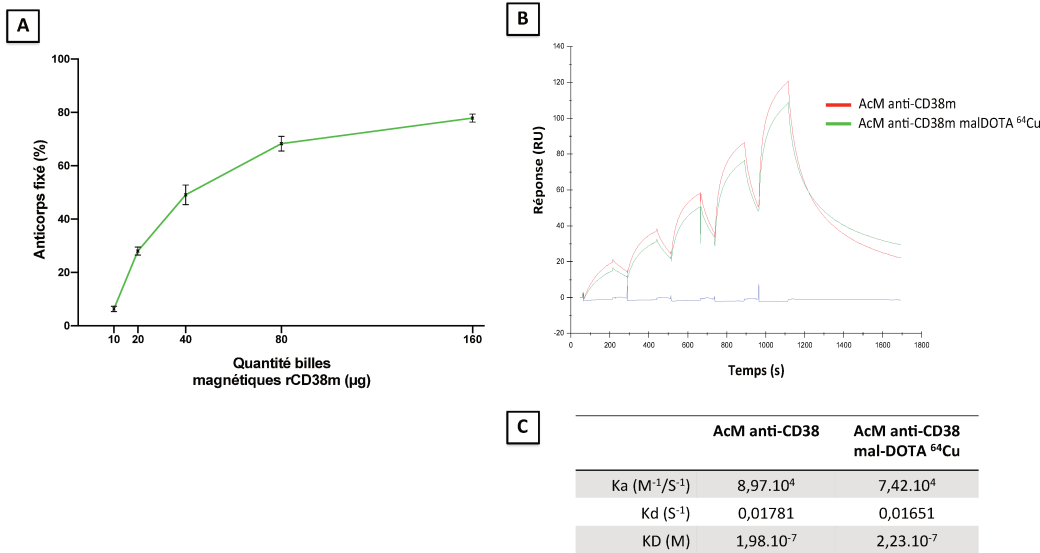


Figure 66 | Immunoréactivité et affinité de l'anticorps anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴Cu
A) Détermination de l'immunoréactivité par incubation de l'anticorps anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴Cu avec une quantité croissante de billes magnétiques rCD38m. Pour chaque point, une mesure de la radioactivité des fractions « billes rCD38m – AcM anti-CD38 mal-DOTA ⁶⁴Cu fixé » et « surnageant de lavage - AcM anti-CD38 mal-DOTA ⁶⁴Cu non fixé » est réalisée. Le rapport de la valeur de radioactivité de la fraction « bille » sur la valeur de radioactivité totale permet d'obtenir le pourcentage d'anticorps fixés pour chaque point. B) Détermination des paramètres cinétiques (K_a , K_d et K_D) par résonnance plasmonique de surface (SPR) de l'anticorps anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴Cu et de son équivalent non couplé. RU : resonance units. C) Tableau des paramètres cinétiques déterminés par SPR.

On mesure une immunoréactivité de $78 \pm 1,5$ % (cf. **figure 66 (A)**). 1/5^{ème} de notre lot d'anticorps a donc perdu sa fonctionnalité pendant l'étape de couplage et ne peut plus interagir avec la protéine cible. Cette valeur d'immunoréactivité reste cependant dans les standards mesurés pour ce genre de marquage. La proportion d'anticorps mal-DOTA fonctionnelle est largement suffisante pour la réalisation des études de biodistribution et d'imagerie que nous envisageons. Les paramètres cinétiques mesurés par SPR pour l'anticorps anti-CD38 froid et sa contrepartie radiomarquée sont du même ordre de grandeur (cf. **figure 66 (B-C)**). Le processus de radiomarquage ne modifie donc pas de manière drastique les caractéristiques d'affinité de l'anticorps.

Ces résultats nous permettent de valider la qualité du radioconjugué obtenu. La fraction d'anticorps immunoréactive est satisfaisante et les expériences de SPR confirment la préservation des caractéristiques d'affinité du vecteur.

III-Etudes de biodistribution de l'anticorps anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴Cu

Les études de biodistribution de l'anticorps anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴Cu ont été réalisées dans un modèle murin *C57BL/KaLwRij* tumoral SC. Treize jours avant l'injection de l'AcM, les souris sont greffées en sous-cutanée au niveau des pattes droite et gauche avec 2 millions de cellules 5T33-Luc(+) et 5T33-Luc(+)CD38^{high} respectivement. Une quantité de 50 µg d'AcM anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴Cu ou 160 µg d'un mélange d'AcM (50 µg d'AcM anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴Cu + 110 µg d'AcM anti-CD38m non couplé) est injecté par animal. A t = 2 h ou 24 h après l'injection, les animaux sont sacrifiés et les organes prélevés. La radioactivité des tissus est mesurée à l'aide d'un compteur gamma.

A-Injection de 50 µg d'anticorps

Les animaux sont injectés avec 50 µg d'anticorps anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴Cu. Les résultats de la biodistribution sont présentés dans la **figure 67**.

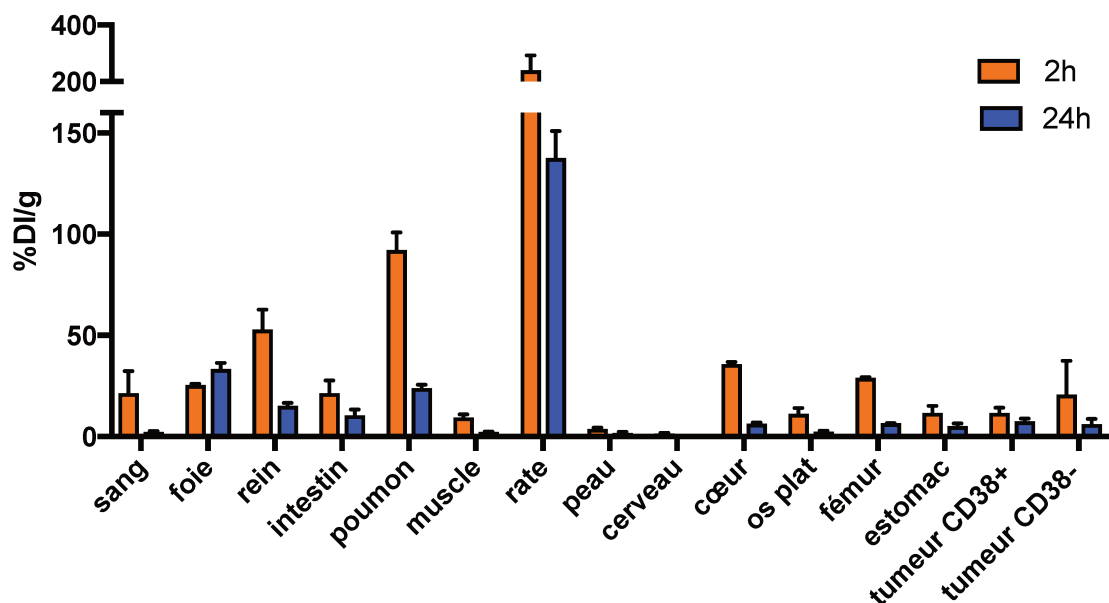


Figure 67 | Biodistribution de 50µg d'AcM anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴Cu dans un modèle murin syngénique de tumeurs sous-cutanées de MM

Les données obtenues à t = 2 h (n = 2) et t = 24 h (n = 3) sont exprimées en pourcentages de dose injectée par gramme de tissu [% DI/g] ± SD après injection en intraveineuse caudale de l'anticorps radiomarqué.

Les données obtenues montrent une fixation très importante à la rate, que ce soit à 2 h ou 24 h PI (post injection) avec des valeurs atteignant respectivement 240 ± 52 % et 138 ± 13 % de

la DI/g. La rate est un organe richement vascularisé et s'il n'est pas surprenant d'y retrouver une forte accumulation d'activité, les valeurs mesurées ici interpellent. La décroissance mesurée entre 2 h et 24 h est de plus relativement faible, contrairement à d'autres organes très perfusés comme les poumons ou le cœur, ce qui invalide l'hypothèse d'un effet purement vasculaire. Il est probable que les populations spléniques B, qui expriment CD38, soient responsables de la rétention prolongée de l'AcM dans ce territoire [225]. Cette fixation spécifique combinée à la présence d'anticorps libres présents en vasculaire dans l'organe pourrait expliquer les fortes valeurs d'activité mesurées. En hépatique, les activités mesurées sont également importantes. On observe de plus une légère augmentation de la DI/g entre 2 h et 24 h PI ($25 \pm 0,6$ % DI/g à 2 h, 33 ± 3 % DI/g à 24 h). Cette augmentation peut être liée au catabolisme physiologique normal des IgG médié par l'interaction avec les récepteurs Fc γ [226]. Le territoire pulmonaire présente également un % de DI/g à 2 h très important (92 ± 9 %) et supérieur aux valeurs retrouvées plus conventionnellement dans cet organe. La forte clairance observée à 24 h (% de DI/g = 24 ± 2) laisse à penser que les activités mesurées à 2 h sont majoritairement liées à la présence de l'AcM circulant en vasculaire. On retrouve une dynamique équivalente pour les reins, l'intestin et le cœur et de manière plus marginale pour le fémur, les muscles, l'os plat et la peau. La pharmacocinétique de l'AcM dans ces différents organes reflète celle du compartiment sanguin pour lequel une forte clairance est observée entre 2 h et 24 h PI le % de DI/g passant de 22 ± 11 % à $2,5 \pm 0,5$.

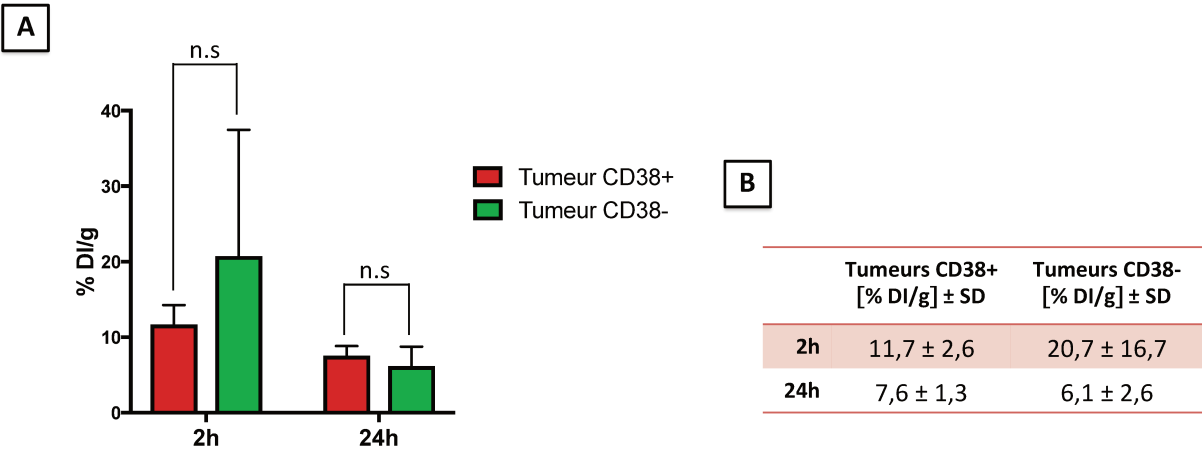


Figure 68 | Biodistribution de l'AcM anti-CD38m mal-DOTA ^{64}Cu dans les tumeurs CD38- et CD38+. A) Les données obtenues à $t = 2\text{ h}$ ($n = 2$) et $t = 24\text{ h}$ ($n = 3$) sont exprimées en pourcentages de dose injectée par gramme de tissu [% DI/g] $\pm$ SD après injection en intraveineuse caudale de l'anticorps radiomarqué. Un test non paramétrique de Mann-Whitney est utilisé pour les calculs statistiques. Le détail des valeurs obtenues est précisé dans le tableau (B).

Au niveau tumoral, on observe également une baisse de l'activité mesurée entre 2 h et 24 h. On ne retrouve pas de différences significatives entre les tumeurs CD38+ et CD38- que ce soit à 2 h ou à 24 h PI (cf. **figure 68**). Il semble donc que la radioactivité mesurée à 24 h PI soit liée à la présence d'anticorps en vasculaire dans les tumeurs et non à une fixation spécifique sur l'antigène cible.

Ces résultats, pour le moins inattendus, peuvent s'expliquer par un effet « éponge » de la rate qui, en captant une grande partie de la dose injectée, va entraîner une diminution nette de la quantité d'AcM circulant restant. Cette hypothèse permet d'expliquer la clairance importante du compartiment sanguin presque entièrement nettoyé à 24 h PI. La quantité d'AcM restante après fixation splénique pourrait donc être trop faible et ne pas suffire à induire un marquage spécifique des tumeurs. La dose mesurée en tumorale correspondrait majoritairement à de l'AcM libre en vasculaire, le pourcentage de spécifique devant être très réduit dans les tumeurs CD38+. Il devient alors impossible de discriminer les 2 types de tumeurs.

Nous choisissons donc de reconduire cette étude dans le même modèle en augmentant la quantité d'anticorps tout en conservant une activité totale injectée identique.

B-Injection de 160 µg d'anticorps

Les animaux sont injectés avec 160 µg d'anticorps anti-CD38m (50 µg d'AcM anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴Cu + 110 µg d'AcM anti-CD38m non couplé). Les résultats de la biodistribution sont présentés dans la **figure 69**.

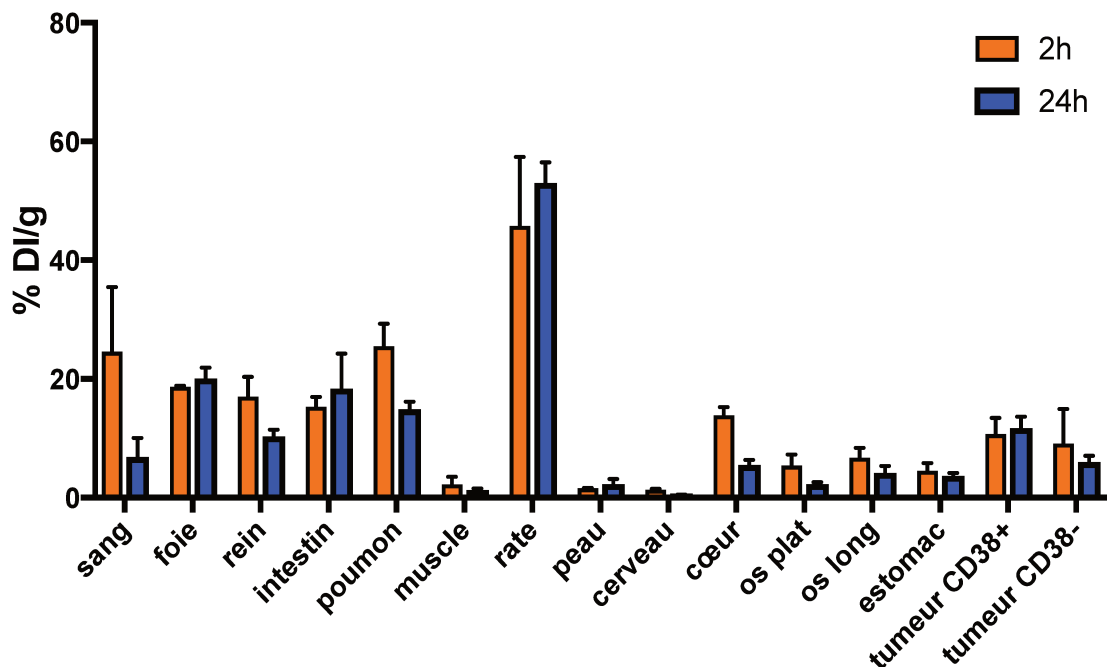


Figure 69 | Biodistribution de 160µg d'AcM anti-CD38m (50µg AcM anti-CD38m mal-DOTA ⁶⁴Cu + 110 µg AcM anti-CD38m) dans un modèle murin syngénique de tumeurs sous-cutanées de MM. Les données obtenues à $t = 2$ h ($n = 2$) et $t = 24$ h ($n = 5$) sont exprimées en pourcentages de dose injectée par gramme de tissu [% DI/g] $\pm$ SD après injection en intraveineuse caudale de l'anticorps radiomarqué.

Les résultats obtenus confirment l'importance de la fixation splénique observée lors de la première biodistribution. On mesure en effet une forte accumulation d'activité dans ce compartiment avec des valeurs de % de DI/g qui progressent entre 2 h et 24 h PI ($46 \pm 12,5$ % à $t = 2$ h ; $53 \pm 3,5$ % à $t = 24$ h). Le pourcentage de dose à la rate est cependant moins conséquent que celui mesuré précédemment. On peut penser que l'augmentation de la quantité d'AcM administré a permis une saturation de cet organe, la dose restante pouvant alors se répartir dans les autres compartiments. Cette hypothèse est confortée par la clairance du sang, moins forte que celle enregistrée lors de la première expérience. On mesure en effet un % de DI/g de $6,9 \pm 3,2$ 24 h après l'injection, ce qui témoigne d'une quantité d'AcM circulant en vasculaire toujours conséquente après 24 h. La dynamique observée en hépatique reste analogue à celle décrite précédemment. Les organes richement vascularisés comme les poumons, le cœur et les reins vont également présenter une clairance similaire à celle observée lors de la première biodistribution. Le même constat vaut également pour le fémur, les muscles, l'os plat et la peau. En intestinal, on note en revanche une augmentation de l'activité accumulée entre 2 h et 24 h PI ($15,3 \pm 1,7$ % à $t = 2$ h, $18,4 \pm 5,9$ % à $t = 24$ h). Cette augmentation a pu être provoquée par un mauvais lavage des intestins desquels sont extraits les fèces avant comptage de la radioactivité au compteur gamma.

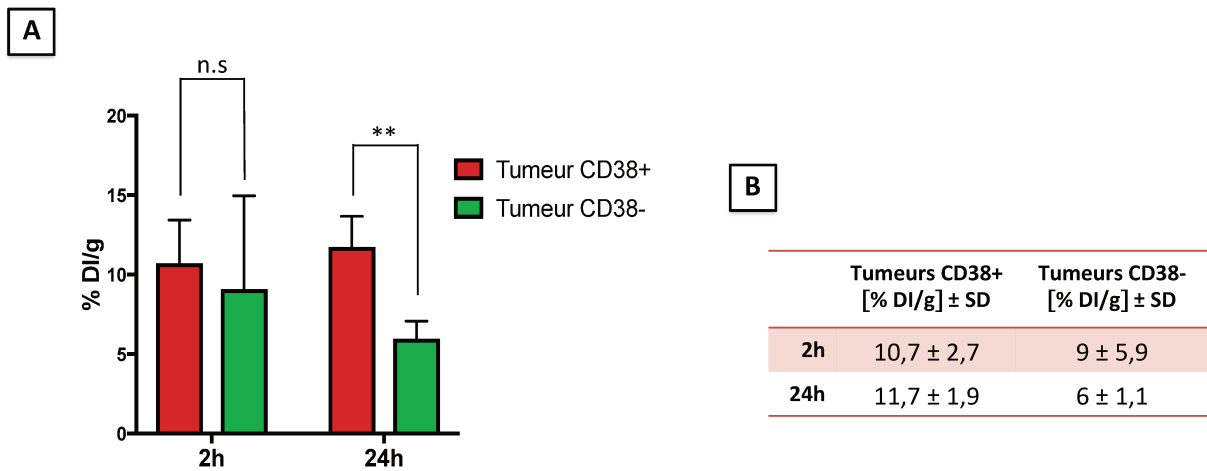


Figure 70 | Biodistribution de l'AcM anti-CD38m mal-DOTA ^{64}Cu dans les tumeurs CD38- et CD38+. A) Les données obtenues à $t = 2$ h ($n = 2$) et $t = 24$ h ($n = 5$) sont exprimées en pourcentages de dose injectée par gramme de tissu [% DI/g] $\pm$ SD après injection en intraveineuse caudale de l'anticorps radiomarqué. Un test non paramétrique de Mann-Whitney est utilisé pour les calculs statistiques ($p = 0,0079$). Le détail des valeurs obtenues est précisé dans le tableau (B).

Au niveau tumoral, on observe une activité équivalente dans les tumeurs CD38+ et CD38- 2 h après l'injection (cf. **figure 70**). Cette activité va ensuite décroître dans les tumeurs n'exprimant pas CD38 suivant la dynamique de l'AcM dans le compartiment sanguin. Pour les tumeurs CD38+, au contraire, les valeurs mesurées vont rester constantes à 24 h PI du fait de la fixation spécifique de l'AcM sur la protéine cible. Contrairement à la première biodistribution, la quantité

d'AcM disponible en vasculaire permet une forte fixation spécifique et une accumulation dans la tumeur.

C-Conclusion de l'étude de biodistribution

L'étude de la pharmacocinétique de l'AcM anti-CD38m mal-DOTA ^{64}Cu dans un modèle de MM syngénique a permis de souligner l'importance de la dose injectée. Avec 50 μg d'AcM, on observe une accumulation dans la rate au détriment des tissus malins. Cet effet « éponge » de la rate va entraîner une clairance rapide du compartiment sanguin défavorable à une fixation optimale de l'AcM au niveau des sites antigéniques tumoraux. On retrouve au niveau des tumeurs une activité analogue quel que soit le statut CD38 du tissu, liée majoritairement à la présence d'AcM libres dans les vaisseaux. Avec 160 μg injectés, le pourcentage de la dose captée par le tissu splénique est moindre et la quantité d'AcM disponibles en vasculaire plus importante. Ces AcM circulants se fixent sur les sites antigéniques tumoraux permettant ainsi de discriminer les tumeurs CD38+ des tumeurs CD38-.

IV-Etudes d'imagerie TEP avec l'AcM anti-CD38m mal-DOTA ^{64}Cu

Les études d'imagerie TEP de l'anticorps anti-CD38m mal-DOTA ^{64}Cu ont été réalisées dans un modèle murin de MM syngénique. Deux modèles tumoraux sont utilisés ici :

- un modèle de MM sous-cutané dans lequel les souris sont greffées au niveau des pattes droite et gauche avec 2 millions de cellules 5T33-Luc(+) et 5T33-Luc(+)CD38^{high} respectivement.
- un modèle de MM disséminé dans lequel les animaux sont greffés par IV caudale avec 1 million de cellules 5T33-Luc(+)CD38^{high}.

Une souris saine est également imagée avec l'anticorps radiomarqué afin de préciser les zones de fixation physiologique du radiotraceur. Les images de TEP conventionnelle sont réalisées par injection IV de 10 MBq de ^{18}F -FDG. Les images d'immuno-TEP sont réalisées par injection IV de 160 μg d'un mélange d'AcM anti-CD38m (50 μg d'AcM anti-CD38m mal-DOTA ^{64}Cu + 110 μg d'AcM anti-CD38m non couplé) représentant une activité de 10 MBq. Aux temps préalablement définis par l'expérimentateur, les animaux sont imagés.

Les sessions d'acquisition TEP-TDM ont été réalisées au Centre d'Imagerie Multimodale Appliquée de Nantes (CIMA) avec l'aide des médecins nucléaires et physiciens du CHU de Nantes.

A-Etude d'imagerie dans une souris saine

Une souris saine est imagée avec l'anticorps anti-CD38 murin mal-DOTA ^{64}Cu afin de visualiser les zones de fixation physiologique et ainsi pouvoir analyser plus facilement les images obtenues avec des animaux présentant des lésions tumorales.

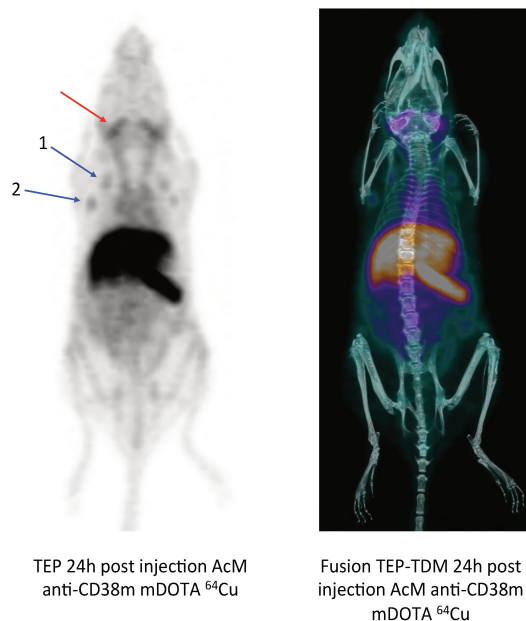


Figure 71 | Imagerie immuno-TEP d'une souris C57BL/KaLwRij saine. Imagerie d'immunoTEP avec un anticorps anti-CD38 murin mal-DOTA ^{64}Cu 24h après l'injection. Les images TEP sont présentées au format MIP (Maximum intensity projection – à gauche) ou fusionnées avec l'imagerie anatomique TDM (à droite). Les glandes salivaires sont indiquées par une flèche violette, les ganglions axillaires et brachiaux par les flèches bleues 1 et 2 respectivement.

fixation à 24 h PI témoignant de la présence de populations cellulaires immunes CD38+ dans ces territoires [225].

Les résultats d'immuno-TEP obtenus avec l'AcM anti-CD38 murin mal-DOTA ^{64}Cu confortent les principales observations de l'étude de biodistribution précédente.

L'immuno-TEP avec l'AcM anti-CD38 murin mal-DOTA ^{64}Cu confirme les enseignements apportés par l'étude de biodistribution. On observe un bruit de fond vasculaire qui perdure 24 heures après l'injection notamment au niveau cardiaque, de l'aorte et des troncs supra-aortiques (cf. **figure 71**). On mesure également une forte activité au niveau splénique liée à la fixation de l'AcM. Le territoire hépatique ainsi que le tractus digestif présentent également une fixation bien qu'étant plus modérée en digestif. Les fixations localisées de part et d'autre de la base du crâne (flèche rouge) sont plus inattendues puisque non explorées pendant l'étude de biodistribution. Nous supposons qu'il s'agit des glandes salivaires qui vont retenir l'anticorps radiomarqué. Les ganglions axillaires et brachiaux (flèches bleues 1 et 2 respectivement) présentent également une

B-Etude d'imagerie dans un modèle tumoral de MM sous-cutané

L'intérêt majeur du modèle tumoral sous-cutané va être d'apporter la preuve de la spécificité de l'AcM anti-CD38 murin pour le tissu tumoral exprimant la protéine cible. La preuve de ces caractéristiques est en partie apportée par la deuxième étude de biodistribution qui montre une accumulation de l'AcM dans les tumeurs CD38+ (cf. **figure 70**). Cependant, la validation de ces données par l'imagerie nous semblait être un prérequis indispensable à la réalisation

d'expériences analogues dans un modèle tumoral disséminé. En amont de l'imagerie phénotypique « anticorps anti-CD38 mal-DOTA ^{64}Cu », les animaux sont imagés par TEP au ^{18}F -FDG afin de disposer d'un référentiel autorisant la localisation des territoires tumoraux indépendamment de leur statut d'expression du CD38.

Les images obtenues 1 h après l'injection du ^{18}F -FDG montrent une fixation physiologique au niveau du parenchyme cérébral, du cœur, des muscles et dans les intestins (cf. **figure 72**). On peut également noter une fixation intense dans la région oculaire du fait de l'incorporation du FDG par la glande de Harder, une glande lacrymale impliquée dans la lubrification des yeux [227]. Le système urinaire est également visible avec une très forte accumulation du radiotraceur dans la vessie. Les 2 tumeurs apparaissent distinctement, indépendamment de leur statut d'expression du CD38. La différence dans l'étendue de la zone de fixation s'explique par une hétérogénéité de taille entre les deux tumeurs.

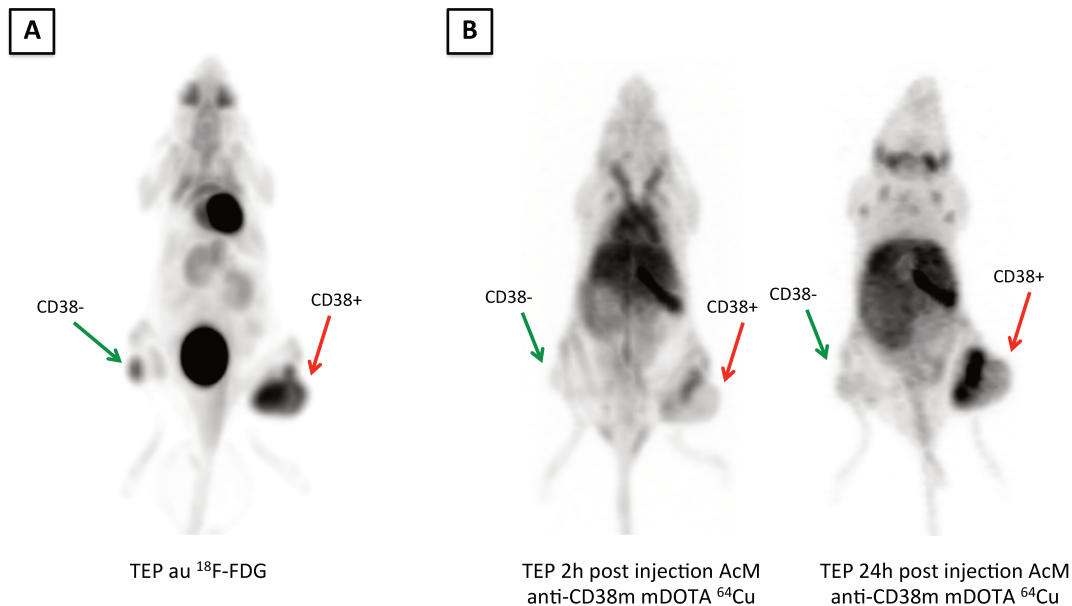


Figure 72 | Imagerie TEP d'une souris C57BL/KaLwRij greffée en sous-cutanée

Imagerie TEP au ^{18}F -FDG (A) ou avec l'anticorps anti-CD38 murin mal-DOTA ^{64}Cu (B) à 2 h et 24 h après l'injection. Les tumeurs CD38 négative et CD38 positive sont indiquées par des flèches vertes et rouges respectivement.

L'immuno-TEP avec l'AcM anti-CD38 murin mal-DOTA ^{64}Cu conforte les enseignements apportés par l'étude de biodistribution et l'imagerie de la souris saine effectuées précédemment (cf. **figure 71**). Au niveau tumoral, on observe une hyperfixation dans la tumeur CD38+ contrebalancée par une moindre fixation dans la tumeur CD38-. Ces observations sont confirmées par les images TEP obtenues avec un deuxième animal présentant des tumeurs de taille plus homogène (cf. **figure 73**) mais non imagé en FDG.

Les données obtenues nous permettent donc de valider la spécificité *in vivo* de l'AcM anti-CD38 murin mal-DOTA ^{64}Cu , les images d'immunoTEP acquises avec l'AcM permettant en effet de discriminer aisément les tumeurs CD38+ de celles CD38-, ce qui est moins le cas avec l'imagerie TEP au ^{18}F -FDG. Dans le cas de cette dernière modalité d'imagerie, le contraste entre les deux tumeurs est moins marqué et semble d'avantage lié à l'hétérogénéité de taille observée entre les tissus tumoraux CD38+ et CD38-. Les acquisitions d'immunoTEP offrent pour leur part un bon contraste permettant de visualiser clairement la greffe SC exprimant CD38. Les performances de ce type d'imagerie restent cependant à investiguer dans un modèle de MM disséminé, plus proche des exigences propres à l'imagerie clinique.

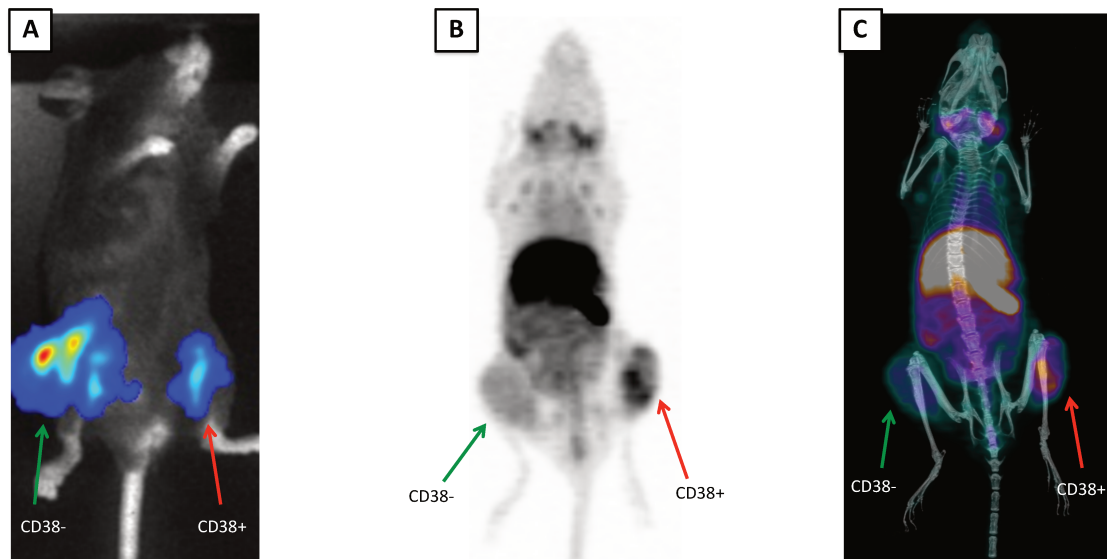


Figure 73 | Différentes explorations d'imagerie d'une souris C57BL/KaLwRij greffée en sous-cutanée (A) Bioluminescence (B) Immuno-TEP avec AcM anti-CD38m mal-DOTA ^{64}Cu 24 h PI. Format MIP (maximum projection intensity). (C) TEP-TDM avec AcM anti-CD38m mal-DOTA ^{64}Cu 24 h PI Les tumeurs CD38 négative et CD38 positive sont indiquées par des flèches vertes et rouges respectivement.

C-Etude d'imagerie dans un modèle tumoral de MM disséminé

Le modèle tumoral disséminé permet de simuler un myélome du fait du tropisme de la lignée 5T33-Luc(+)CD38^{high} injectée pour l'environnement médullaire. L'invasion de la moelle va induire des lésions caractéristiques du MM que l'on retrouve majoritairement au niveau des os mais parfois aussi en extramédullaire. Nous souhaitons avec cette étude éprouver la capacité de l'immunoTEP anti-CD38 à détecter ces différents types de lésions myélomateuses en le comparant dans un premier temps avec une imagerie TEP conventionnelle au ^{18}F -FDG.

Les résultats obtenus avec le ^{18}F -FDG 1 h après l'injection montrent une fixation physiologique au niveau du parenchyme cérébral, du cœur, des muscles et dans les intestins comme décrit précédemment. L'image acquise chez le même animal à 24 h PI avec l'anticorps

anti-CD38 radiomarqué présente également des zones de fixation résultant de la distribution normale de l'anticorps (rate, foie...) qui ont également été précisées dans le paragraphe concernant la **figure 71**.

Plusieurs zones d'hyperfixation (numérotées de 1 à 8 sur la **figure 74**) apparaissent en première lecture comme étant liées à la présence de foyers tumoraux. Certaines sont retrouvées à la fois en TEP FDG et anticorps, d'autres sont exclusives à l'une ou l'autre des approches d'imagerie. Une description des différentes lésions est proposée ci-dessous :

La lésion n1 est une lésion hépatique confirmée comme étant maligne par anatomopathologie. On retrouve cette lésion sur l'imagerie anticorps malgré le bruit de fond engendré par le métabolisme hépatique et l'accumulation splénique. Cette localisation extramédullaire des cellules 5T33 n'est pas surprenante et a été déjà observée pour ce modèle [223].

La lésion n2 a tout d'abord été identifiée comme étant pathologique du fait de son positionnement au niveau d'une vertèbre thoracique. Une simple analyse sur le logiciel « Inveon Research Workplace » nous a permis de voir que ce point chaud était lié à un repli intestinal qui, à l'image, se superpose à la colonne.

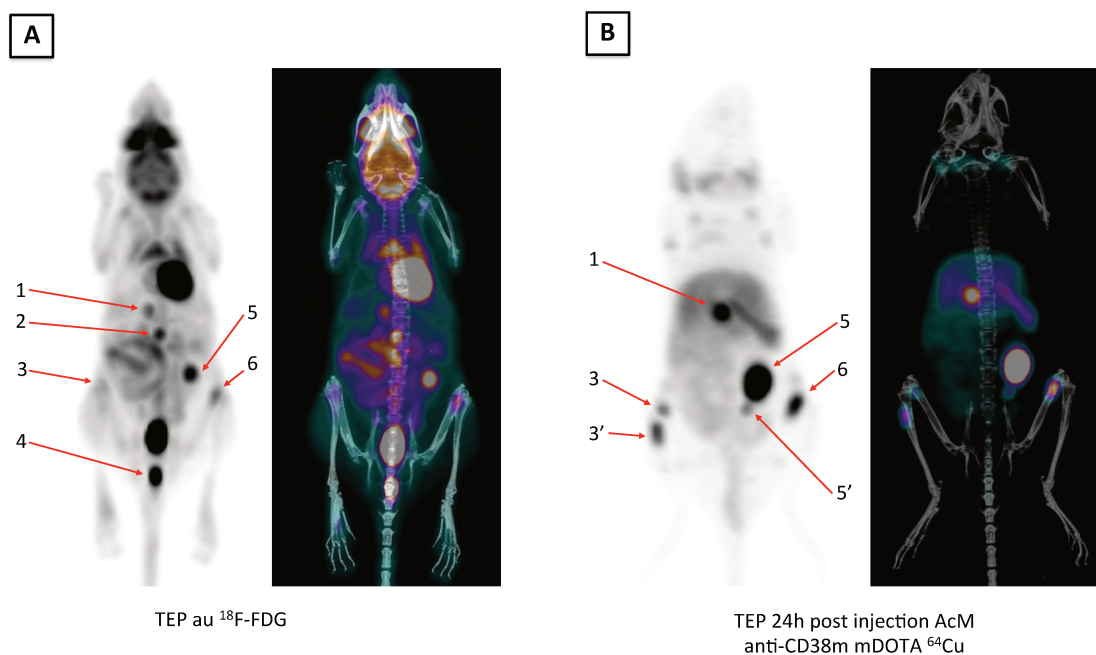


Figure 74 | Imagerie TEP-TDM d'une souris C57BL/KaLwRij greffée en IV

Imagerie TEP au ^{18}F -FDG (A) ou avec l'anticorps anti-CD38 murin mal-DOTA ^{64}Cu 24h après l'injection (B). Les zones d'hyperfixation identifiées comme étant des lésions myélomateuses en imagerie sont indiquées par des flèches rouges et numérotées afin de simplifier la discussion (cf. paragraphe correspondant).

La lésion n3 apparaît en TEP FDG comme étant localisée au niveau de l'épiphyse distale du fémur droit. L'imagerie anticorps nous permet de préciser cette localisation puisqu'il apparaît que cette zone d'hyperfixation est en fait constituée de deux lésions distinctes, l'une se situant au niveau de l'épiphyse distale du fémur droit, l'autre au niveau de l'épiphyse proximale du tibia droit (lésion 3' sur la partie B de la **figure 74**). La précision apportée tient plus à la position de l'animal sur le lit d'examen qu'à un éventuel gain de sensibilité apporté par l'immunoTEP. Lors de l'acquisition FDG, les extrémités fémorales distale et tibiale proximale sont en effet superposées, ce qui empêche de dissocier les deux foyers tumoraux à l'image. On observe cependant une fixation plus forte avec l'anticorps qui permet de faire ressortir plus distinctement les zones tumorales.

La lésion n4 est liée à une rétention du ^{18}F -FDG au niveau caudal suite à un problème dans l'injection IV. On ne retrouve donc pas cette zone de fixation artefactuelle avec l'imagerie anticorps.

La lésion n5 correspond à une fixation au niveau du ganglion inguinal. En immuno-TEP, ce foyer tumoral fixe d'avantage que le FDG. On distingue également avec l'AcM ce qui apparaît comme étant une extension de la lésion ou un territoire ganglionnaire voisin également envahi (lésion 5' sur la partie B de la **figure 74**). Ce deuxième foyer n'apparaît pas sur l'imagerie TEP au ^{18}F -FDG.

La lésion n6 résulte de la présence d'un foyer tumoral localisé au niveau de l'épiphyse distale du fémur gauche. Cette lésion est visualisée pour les 2 modalités d'imagerie mais l'immunoTEP fait apparaître la lésion plus distinctement.

L'imagerie anticorps permet de visualiser les lésions préalablement mises en évidence au ^{18}F -FDG. Les lésions osseuses notamment apparaissent de manière plus distincte en immuno-TEP. La lésion hépatique est intéressante puisqu'elle est facilement identifiée avec l'anticorps malgré sa localisation dans un territoire d'accumulation physiologique du radiotraceur. Les atteintes ganglionnaires semblent également mieux définies en immuno-TEP.

Malgré ces observations, il apparaît ici très prématuré de conclure quant aux éventuels avantages de l'immuno-TEP sur l'imagerie TEP conventionnelle au ^{18}F -FDG. Ces résultats valident cependant l'approche d'imagerie phénotypique développée dans ce modèle et soulignent la pertinence du choix de la protéine CD38 comme cible pour visualiser les foyers tumoraux.

Afin de poursuivre l'exploration autour de l'imagerie immuno-TEP du CD38, d'autres animaux greffés en IV ont également été imagés. Ces souris ont fait l'objet d'une session d'acquisition TEP 24 h après injection de l'AcM anti-CD38 mal-DOTA ^{64}Cu .

On retrouve chez la première souris (cf. **figure 75**, (a,b,c)) des lésions osseuses caractéristiques du MM localisées au niveau de l'épiphyse distale de l'humérus gauche et sur une vertèbre lombaire. Des foyers tumoraux osseux sont également visualisés chez la deuxième souris (cf. **figure 75**, (d,e,f)) en vertébral (lésion lombaire et lésion sacro-coccygienne) et sur le tibia droit.

On note également la présence d'un ganglion inguinal vraisemblablement envahi puisqu'il présente une fixation forte de l'AcM.

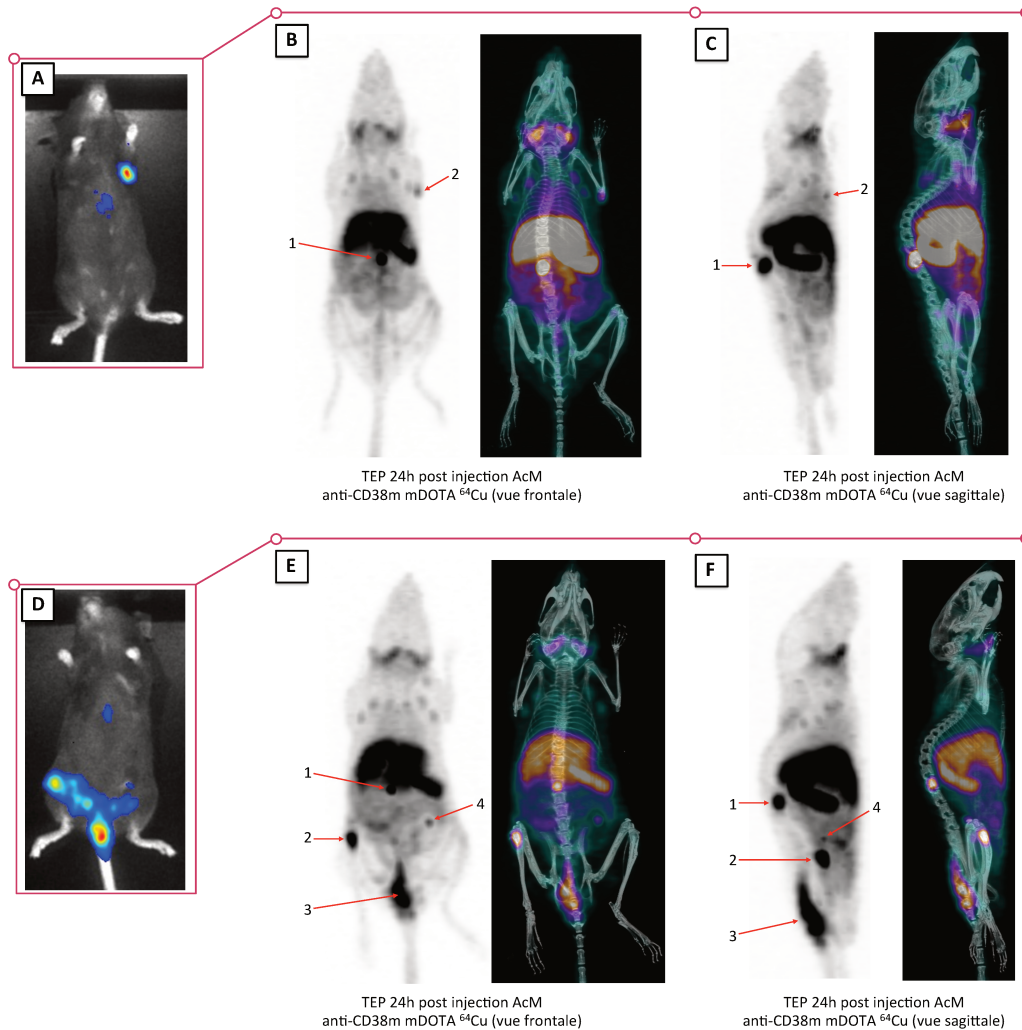


Figure 75 | Imagerie BLI et immuno-TEP-TDM de deux souris C57BL/KaLwRij greffées en IV
A) Bioluminescence. (B-C) Immuno-TEP avec l'AcM anti-CD38m mal-DOTA ^{64}Cu 24 h PI en vue frontale (B) ou sagittale (C) révélant une lésion vertébrale lombaire (1) ainsi qu'une lésion localisée sur l'épiphyse distale de l'humérus gauche (2). (D) Bioluminescence. (E-F) Immuno-TEP avec l'AcM anti-CD38m mal-DOTA ^{64}Cu 24 h PI en vue frontale (E) ou sagittale (F) révélant une lésion vertébrale lombaire (1), une lésion sur l'épiphyse proximale du tibia droit (2), une lésion s'étendant des vertèbres sacrées aux premières vertèbres coccygiennes (3) ainsi qu'une lésion localisée au niveau du ganglion inguinal (4).

Ces résultats démontrent la pertinence de l'approche d'imagerie phénotypique CD38 développée dans ce modèle. Les foyers tumoraux sont visualisés distinctement et se dégagent nettement du bruit de fond engendré par la distribution physiologique de l'AcM. Les lésions préalablement identifiées par BLI sont retrouvées avec l'immunoTEP qui permet de préciser leur localisation.

D-Conclusion de l'étude d'imagerie

L'imagerie immuno-TEP de la souris saine (cf. **figure 71**) nous a permis d'identifier les zones d'accumulation physiologique de l'AcM. On retrouve ici certaines observations apportées par l'étude de biodistribution, notamment l'intense fixation splénique et l'accumulation en hépatique. D'autres territoires ignorés lors de la biodistribution (ganglions, glandes salivaires) apparaissent à l'imagerie.

L'étude du modèle tumoral sous-cutané nous a permis de confirmer la spécificité de l'AcM anti-C38m mal-DOTA ^{64}Cu *in vivo* (cf. **figure 72 et 73**). On observe en effet une hyperfixation spécifique du tissu tumoral CD38+ avec l'AcM. Cette spécificité est absente de l'imagerie TEP au ^{18}F -FDG puisque le radiotracer s'accumule dans les lésions tumorales indépendamment de leur statut CD38.

Enfin, le modèle tumoral disséminé nous a permis de valider l'approche d'imagerie phénotypique ciblant le CD38. Les lésions observées en TEP au ^{18}F -FDG sont en effet retrouvées en immuno-TEP (cf. **figure 74**). L'étude de deux autres animaux présentant des lésions préalablement identifiées par BLI et retrouvées avec l'imagerie anticorps conforte également cette approche (cf. **figure 75**).

Cette étude ne prétend pas conclure quant à l'éventuelle supériorité de l'immuno-TEP du CD38 par rapport à la TEP conventionnel au ^{18}F -FDG. Au vu des résultats obtenus, il apparaît cependant que l'approche d'imagerie phénotypique ciblant le CD38 murin dans un modèle syngénique est totalement adaptée à la localisation des foyers tumoraux myélomateux, que ceux-ci soient localisés au niveau osseux ou en extramédullaire. Les zones d'accumulation physiologique de l'AcM identifiées lors de l'étude de biodistribution ou par l'imagerie TEP de la souris saine ne semblent pas constituer un problème majeur pour l'identification de lésions situées dans le voisinage immédiat.

Discussion

Cette seconde partie de mon projet de thèse s'est intéressée à la biodistribution et à l'imagerie TEP du CD38 murin dans un modèle murin syngénique de MM. Ce travail devait constituer la suite logique de la première partie relative au développement d'*Affitins* anti-CD38 en étant consacrée à la caractérisation des paramètres pharmacocinétiques de ces protéines et à leur intérêt potentiel pour l'imagerie TEP. Du fait des différentes problématiques rencontrées évoquées dans la première partie du manuscrit, nous n'avons pas encore entrepris ce travail. Nous avons cependant choisi d'amorcer cette étude autour de la biodistribution et l'imagerie en utilisant un anticorps anti-CD38 murin radiomarké au cuivre 64. Ainsi, bien que ne disposant pas du vecteur initialement prévu, les données recueillies autorisent une première vue d'ensemble permettant de mieux apprécier l'intérêt de l'imagerie phénotypique et plus particulièrement du ciblage du CD38 pour la localisation des foyers tumoraux myélomateux.

Cette étude a tout d'abord nécessité la mise en place d'un nouveau modèle cellulaire exprimant le CD38 murin. Les lignées 5T33 et MOPC315.BM habituellement utilisées par l'équipe pour les greffes syngéniques vont en effet présenter une expression nulle ou faible de la protéine cible respectivement. L'étude *in vivo* des populations 5T33-Luc(+)CD38(+) (5T33-Luc(+)CD38^{high} 5T33-Luc(+)CD38^{low}) générées nous a permis de valider la conservation par ces lignées des propriétés de tumorigenèse et de dissémination caractéristiques de la population 5T33 originelle [223], [228]. La greffe de lignée 5T33-Luc(+)CD38(+) chez des souris C57BL/KaLwRij nous permet donc de disposer d'un modèle tumoral syngénique présentant des caractéristiques physiopathologiques proches du MM humain [229]. L'expression physiologique de la protéine cible par certains tissus sains renforce également cette approche en préservant les potentielles interactions spécifiques vecteur/organes, abolies chez les animaux xéno greffés avec des cellules tumorales humaines, seules présentatrices du marqueur d'intérêt. De même, l'utilisation de souris immunocompétentes permet de conserver les relations système immunitaire / cellules myélomateuses, importantes dans cette pathologie [230]. L'étude de biodistribution et d'imagerie TEP réalisée pendant ce projet repose donc sur l'utilisation d'un modèle murin tumoral sensiblement plus proche de la réalité clinique que d'autres modèles couramment utilisés en préclinique et basés sur la greffe de cellules humaines chez des animaux immunodéficients. L'extrapolation des données obtenues par l'étude de modèles syngéniques à la clinique humaine reste cependant une gageure, aucun modèle animal ne pouvant recréer fidèlement la complexité et l'hétérogénéité des pathologies humaines. Si les observations consécutives à cette étude ne sont pas transposables *de facto* en clinique, elles permettent cependant d'esquisser un panorama et d'entreapercevoir les difficultés mais surtout les

opportunités permises par l'immunoTEP pour le diagnostic et le suivi des patients MM.

L'étude de biodistribution de l'anticorps anti-CD38 murin radiomarké au cuivre 64 dans un modèle murin syngénique sous-cutané de MM a permis de souligner l'importance de la quantité de vecteur injecté nécessaire afin d'obtenir une fixation spécifique significative au niveau du tissu tumoral. Avec 50µg d'anticorps anti-CD38 murin malDOTA ⁶⁴Cu, seule une faible accumulation est observée en tumoral et celle-ci est indépendante du statut CD38 du tissu. Cette absence de fixation spécifique significative va être liée à la captation par différents organes de la dose aboutissant à un appauvrissement de la quantité d'anticorps disponible dans le compartiment sanguin.

La rate est l'organe qui va présenter l'accumulation la plus importante de radiotraceur (en % de DI/g). Cette accumulation peut s'expliquer par l'addition de phénomènes de fixation spécifiques (présence de populations lymphocytaires B CD38+ [225]) et aspécifiques (liaison aux récepteurs Fcγ [231]) favorisés par l'importante vascularisation de cet organe. L'hypothèse de la présence de cellules myélomateuses 5T33-Luc(+)CD38^{high} n'est pas à écarter et pourrait contribuer à ce phénomène d'accumulation. Une colonisation de la rate par la lignée 5T33 a en effet déjà été décrite dans la littérature [223], [228] et observée par BLI lors de l'étude de greffe IV des lignées 5T33-Luc(+)CD38(+) présentée dans ce document. Pour le modèle tumoral sous-cutané utilisé lors de l'étude de biodistribution, de telles observations n'ont pas été reproduites et semblent moins probables même si nous ne pouvons pas écarter la possibilité de développement de foyers tumoraux spléniques à partir de cellules issues de la tumeur primaire. Ce processus métastatique renforcerait la fixation de l'anticorps anti-CD38 à la rate en accroissant le nombre de sites antigéniques présents dans ce territoire. La réalité biologique de la forte accumulation splénique mesurée doit probablement résulter de l'addition de ces différents phénomènes même s'il nous est difficile de les hiérarchiser par ordre d'importance. La rétention des AcM par ce site « non cible » va cependant affecter négativement la fixation au niveau tumoral en diminuant la quantité de radiotraceur disponible en vasculaire.

Une fixation importante perdurant jusqu'à 24 h PI est également retrouvée en hépatique. Cette dernière est probablement liée au catabolisme physiologique des AcM par le foie, principal organe de clairance pour ces molécules [226]. Le relargage de cuivre libre ne peut pas être tenu comme seul responsable de l'accumulation observée pour le foie bien que ce paramètre puisse intervenir de manière marginale. Une étude similaire menée par notre équipe avec un anticorps anti-CD138 murin radiomarké au zirconium 89 a en effet abouti à des observations identiques quant à la fixation de l'AcM au foie, dédouanant ainsi un potentiel effet lié à la présence du radioélément seul après décomplexation [38]. Il est à noter que l'isotype de l'anticorps utilisé lors de cette étude était identique à celui de l'anticorps anti-CD38 murin présenté dans ce document (IgG2a, κ de rat). Les remarques formulées précédemment pour la rate quant à la présence potentielle de cellules 5T33-Luc(+)CD38(+) peuvent être reconduites pour le foie. La littérature et nos propres expériences autour du modèle tumoral IV ont permis la mise en

évidence de foyers métastatiques en hépatique mais ce processus reste à démontrer dans le modèle tumoral SC utilisé dans cette étude.

Plus généralement, la cinétique d'absorption des AcM par les tissus sains va être favorisée par rapport à un tissu tumoral présentant une vascularisation plus désorganisée avec des valeurs de pressions interstitielles élevées. Au premier temps de biodistribution (2 h PI), on retrouve ainsi des valeurs de % de DI/g importantes dans les organes les plus perfusés comme le cœur, les poumons et les reins. La présence de l'anticorps radiomarké dans ces compartiments décroît ensuite de manière importante entre 2 h et 24 h PI, suivant la cinétique observée au niveau sanguin.

Ces différents paramètres pharmacocinétiques et particulièrement l'intense fixation splénique et hépatique ont également été mis en évidence dans une étude s'intéressant à la RIT α du CD38 [232]. Ces mécanismes vont participer à l'épuisement de la quantité d'anticorps présent en vasculaire. Avec une dose initiale injectée de 50 μ g, la quantité de radiotraceur circulant restante est donc trop faible pour permettre une occupation optimale des sites antigéniques au niveau des lésions myélomateuses CD38 positives.

Avec une quantité d'anticorps injectée de 160 μ g (50 μ g d'anticorps anti-CD38 malDOTA ^{64}Cu + 110 μ g d'anticorps anti CD38 non radiomarké), la problématique d'absorption par la rate est moins marquée du fait de la saturation du territoire splénique. La quantité d'AcM disponible est vasculaire et plus importante et permet une fixation spécifique au niveau du tissu tumoral exprimant le marqueur d'intérêt.

Ces observations soulignent l'importance cruciale de la quantité de vecteur injecté nécessaire à l'obtention d'une fixation spécifique significative au niveau du tissu tumoral. Les informations apportées par cette étude de biodistribution ont été complétées par un travail d'imagerie mené avec l'anticorps anti-CD38 murin radiomarké.

L'immuno-TEP de la souris saine avec l'AcM anti-CD38 murin mal-DOTA ^{64}Cu confirme les enseignements apportés par l'étude de biodistribution. A 24h PI, on retrouve en effet à l'image un léger bruit de fond vasculaire particulièrement visible autour de la région cardiaque (cœur, aorte, tronc supra-aortique). Le tractus gastro-intestinal apparaît également, bien que de manière modérée, du fait de l'élimination physiologique d'une partie des AcM par cette voie. L'accumulation splénique mesurée précédemment apparaît de manière très nette sur les images d'immunoTEP effectuées à 24H PI. On observe une fixation homogène qui épouse les contours de l'organe. La même constatation est faite avec le foie, très visible à l'image. On note également une accumulation du radiotraceur dans certains territoires inexplorés pendant l'étude de biodistribution. Les ganglions axillaires et brachiaux vont notamment présenter une fixation importante de l'anticorps liée à la présence de populations immunitaires CD38+ [233], [234]. Les glandes salivaires apparaissent également comme fixant le radiotraceur. Les raisons précises pouvant expliquer cette fixation restent à investiguer dans notre modèle bien que la littérature rapporte la présence de cellules immunitaires CD38+ dans cette région chez l'Homme [235] et

une expression du CD38 par les cellules acineuses de la glande salivaire sublinguale chez le rat [236].

L'immuno-TEP réalisée chez le modèle murin tumoral SC nous a permis de valider la spécificité *in vivo* de l'AcM anti-CD38 murin mal-DOTA ⁶⁴Cu. Les images d'immunoTEP permettent en effet de discriminer les tumeurs CD38+ de celles CD38-, ce qui n'est pas le cas avec les acquisitions de TEP conventionnelles réalisées au ¹⁸F-FDG (cf. **figure 72** et **73**). Cette étude nous a permis un premier aperçu des performances de l'immunoTEP en confirmant la pertinence de ce type d'imagerie pour la visualisation de lésions myélomateuses SC. Nous avons ensuite souhaité poursuivre ce travail dans un modèle tumoral syngénique disséminé (IV), plus proche de la réalité d'un MM que le modèle tumoral SC, afin d'investiguer plus en profondeur le potentiel de l'immunoTEP anti-CD38.

L'immunoTEP avec l'AcM anti-CD38 murin mal-DOTA ⁶⁴Cu réalisée dans un modèle disséminé de MM a été comparée dans un premier temps avec l'imagerie TEP conventionnelle au ¹⁸F-FDG. Les images obtenues à 24h PI avec l'anticorps montrent un très bon contraste facilitant la détection des différents foyers tumoraux (cf. **figure 74**). On observe une très bonne fixation au niveau des lésions osseuses. L'accumulation de radiotraceur au niveau des tissus sains n'empêche pas la localisation de lésions situées au voisinage immédiat ou même directement dans l'organe comme l'a montré la détection d'un foyer tumoral situé en hépatique. Ces différentes lésions sont retrouvées avec la TEP au ¹⁸F-FDG bien qu'apparaissant pour certaines comme moins fixantes (lésions osseuses) ou moins bien délimitées (lésion hépatique et atteinte ganglionnaire).

Les images d'immunoTEP réalisées chez 2 autres animaux présentant des lésions disséminées préalablement localisées par BLI (cf. **figure 75**) permettent de renforcer les observations précédentes. Les lésions sont en effet visualisées distinctement et se dégagent clairement du bruit de fond lié à la fixation physiologique de l'AcM.

Cette étude de biodistribution et d'imagerie effectuée dans un modèle syngénique de MM a permis de démontrer l'intérêt de l'imagerie phénotypique anti-CD38 pour la détection des foyers tumoraux myélomateux. La sensibilité et la spécificité offertes par cette approche restent à investiguer plus en profondeur dans ce modèle mais les premiers résultats obtenus sont prometteurs et confortent les données d'immunoTEP obtenues avec un anticorps anti-CD138 radiomarqué au cuivre 64 [38], [39]. L'utilisation d'un modèle murin syngénique renforce considérablement nos résultats puisqu'il permet la conservation d'une cartographie épitopique physiologique caractérisée par l'expression du marqueur d'intérêt par les tissus sains mais aussi la préservation des interactions immunitaires, prépondérantes dans le MM.

Le transfert de cette approche d'immunoTEP anti-CD38 pour la pratique clinique semble donc présenter un intérêt à des fins diagnostiques mais également thérapeutiques. Les résultats

prometteurs du daratumumab employé à des fins thérapeutiques en monothérapie ou en combinaison avec d'autres drogues ont considérablement renforcé l'intérêt porté à cette molécule [237], [238]. Les premiers résultats de l'essai de phase I du daratumumab radiomarqué au cuivre 64 pour l'imagerie TEP de patients MM se sont de plus révélés très encourageants et laissent entrevoir de magnifiques opportunités pour le futur de l'immunoTEP [83].

Conclusion du travail de thèse

Le cancer représente la seconde cause de mortalité dans les pays de l'OCDE après les pathologies cardiovasculaires. Cette thématique de santé publique majeure nécessite la poursuite des efforts de recherche déjà entrepris afin d'affiner la compréhension de cette pathologie complexe et ainsi permettre l'émergence de nouvelles stratégies de diagnostic et de thérapie.

Parmi les différentes voies de recherche investiguées en cancérologie, l'utilisation de protéines d'affinité artificielles pour le ciblage tumoral représente une opportunité unique permettant d'envisager de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques. Largement focalisés sur les anticorps dans un premier temps, de nombreux travaux portent actuellement sur l'utilisation de charpentes protéiques alternatives présentant des propriétés pharmacocinétiques plus favorables pour l'imagerie.

C'est dans ce contexte que l'équipe du Dr. Frédéric Pecorari a entrepris de développer une nouvelle classe de protéines d'affinité artificielles nommée Affitine. Nous avons choisi, dans le cadre de mon doctorat, de poursuivre ces travaux de recherche en les inscrivant dans la thématique de développement de l'imagerie phénotypique du MM portée par l'équipe du Prof. Michel Chérel. Le CD38 a été sélectionné comme protéine cible du fait des nombreuses études précliniques et cliniques ayant démontré la pertinence de l'utilisation de ce biomarqueur pour le ciblage des cellules myélomateuses.

Ainsi le but de mon doctorat était de générer des Affitines anti-CD38, de les caractériser puis d'investiguer la faisabilité et l'intérêt de leur utilisation pour le ciblage tumoral et l'imagerie TEP dans un modèle murin de MM. Un travail d'imagerie basé sur l'utilisation d'un anticorps anti-CD38 radiomarqué au cuivre 64 a également été mené en parallèle afin de disposer d'un référentiel auquel comparer les expériences d'imagerie Affitine.

La première partie du projet consacrée au développement *in vitro* d'Affitines anti-CD38 a nécessité de nombreux ajustements et modifications du protocole de ribosome display afin de surmonter les différents obstacles auxquels nous avons été confrontés. En proposant des solutions créatives (billes magnétiques directement couplées avec la protéine CD38 recombinante, analyse des banques de séquence par NGS...), nous avons réussi à résoudre une majeure partie des difficultés. La dernière étape avant l'obtention d'Affitines anti-CD38 utilisables *in vivo* pour l'imagerie est cependant toujours en cours. L'analyse NGS effectuée sur la sélection II nous a en effet permis de constater que certaines familles de séquences minoritaires avaient potentiellement échappé au processus de criblage par cytométrie en flux. Nous

concentrons actuellement nos efforts sur ces familles de séquences afin d'obtenir des Affitines capables de reconnaître la forme cellulaire de CD38.

La deuxième partie du projet consacrée à l'imagerie phénotypique « anticorps » nous a permis d'obtenir des résultats prometteurs qui confirment la pertinence du ciblage du CD38 pour la détection des foyers tumoraux myélomateux. Le choix d'utiliser un modèle murin syngénique renforce nos résultats du fait de l'expression physiologique du CD38 par certains tissus sains. Cette étude vient de plus conforter les travaux précédemment réalisés par l'équipe autour du ciblage du CD138 dans le MM en soulignant l'intérêt de l'imagerie phénotypique pour le diagnostic.

Ce projet et notamment la partie concernant le développement d'Affitines anti-CD38 est toujours en cours à l'issue de mon doctorat. Bien que n'ayant pas encore pu conclure définitivement sur l'intérêt de l'imagerie Affitine, les différentes études réalisées nous ont permis d'effectuer des avancées, des différentes adaptations apportées au protocole de ribosome display jusqu'aux résultats des études de biodistribution et d'imagerie. Ces travaux ont non seulement mis en relief l'importance de la stratégie de sélection lorsqu'on utilise une cible recombinante dans la perspective d'applications cellulaires, mais aussi celle tout aussi décisive de la stratégie de criblage. Ainsi ce travail de thèse constitue, à défaut d'une réponse définitive à la problématique posée, une étape intermédiaire ayant permis l'acquisition de nouveaux éléments de compréhension.

Bibliographie

- [1] INCa, *Comprendre le myélome multiple*. 2015.
- [2] S. Lonial, B. Durie, A. Palumbo, and J. San-Miguel, "Monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma: Current status and future perspectives," *Leukemia*, vol. 30, no. 3, pp. 526–535, 2015.
- [3] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, 2018.
- [4] M. S. Raab, K. Podar, I. Breitkreutz, P. G. Richardson, and K. C. Anderson, "Multiple myeloma.," *Lancet*, vol. 374, no. 9686, pp. 324–39, Jul. 2009.
- [5] A. J. Cowan *et al.*, "Global burden of multiple myeloma: A systematic analysis for the global burden of disease study 2016," *JAMA Oncol.*, vol. 4, no. 9, pp. 1221–1227, 2018.
- [6] HAS and INCa, "Tumeur maligne, affection du tissu lymphatique ou hématopoïétique - Myélome multiple.," in *Guide - Affection de longue durée*, 2010.
- [7] Y. Furukawa and J. Kikuchi, "Molecular pathogenesis of multiple myeloma.," *Int. J. Clin. Oncol.*, May 2015.
- [8] S. Robiou du Pont *et al.*, "Genomics of multiple myeloma," *J. Clin. Oncol.*, vol. 35, no. 9, pp. 963–967, 2017.
- [9] M. D. Antonio Palumbo, M.D., and Kenneth Anderson, "Multiple Myeloma," *N. Engl. J. Med.*, p. 1046–60., 2011.
- [10] J. Corre, N. Munshi, and H. Avet-Loiseau, "Genetics of multiple myeloma: Another heterogeneity level?," *Blood*, vol. 125, no. 12, pp. 1870–1876, 2015.
- [11] E. Terpos, I. Ntanasis-stathopoulos, M. Gavriatopoulou, and M. A. Dimopoulos, "Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma : from bench to bedside," *Blood Cancer J.*, 2018.
- [12] S. K. Kumar *et al.*, "Multiple myeloma," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 3, pp. 1–20, 2017.
- [13] S. V. Rajkumar, "Multiple myeloma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management," *Am. J. Hematol.*, vol. 93, no. 8, pp. 1091–1110, 2018.
- [14] J. Hillengass *et al.*, "International myeloma working group consensus recommendations on imaging in monoclonal plasma cell disorders," *Lancet Oncol.*, vol. 20, no. 6, pp. e302–e312, 2019.
- [15] E. Zamagni, P. Tacchetti, and M. Cavo, "Imaging in multiple myeloma: How? When?," *Blood*, vol. 133, no. 7, pp. 644–651, 2018.
- [16] E. Terpos, M. A. Dimopoulos, and L. A. Moulopoulos, "The Role of Imaging in the Treatment of Patients With Multiple Myeloma in 2016," *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.*, vol. 36, pp. e407–e417, 2016.
- [17] T. G. Gleeson *et al.*, "Accuracy of whole-body low-dose multidetector CT (WBLDCT) versus skeletal survey in the detection of myelomatous lesions, and correlation of disease distribution with whole-body MRI (WBMRI)," *Skeletal Radiol.*, vol. 38, no. 3, pp. 225–236, 2009.
- [18] R. Chrzan, A. Jurczyszyn, and A. Urbanik, "Whole-body low-dose computed tomography (WBLDCT) in assessment of patients with multiple myeloma – Pilot study and standard imaging protocol suggestion," *Polish J. Radiol.*, vol. 82, pp. 356–363, 2017.
- [19] M. A. Dimopoulos *et al.*, "Role of magnetic resonance imaging in the management of patients with multiple myeloma: A consensus statement," *J. Clin. Oncol.*, vol. 33, no. 6, pp. 657–664, 2015.
- [20] L. A. Moulopoulos *et al.*, "Diffuse pattern of bone marrow involvement on magnetic resonance imaging is associated with high risk cytogenetics and poor outcome in newly diagnosed, symptomatic patients with multiple myeloma: A single center experience on 228 patients," *Am. J. Hematol.*, vol. 87, no. 9, pp. 861–864, 2012.
- [21] E. K. Mai *et al.*, "Association between magnetic resonance imaging patterns and baseline disease features in multiple myeloma: analyzing surrogates of tumour mass and biology," *Eur. Radiol.*, vol. 26, no. 11, pp. 3939–3948, 2016.
- [22] K. Leung, "[18F]Fluoro-2-deoxy-2-D-glucose," *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*, 2005. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK23335/>.
- [23] A. Gallamini, C. Zwarthoed, and A. Borra, "Positron emission tomography (PET) in oncology,"

- Cancers (Basel)*, vol. 6, no. 4, pp. 1821–1889, 2014.
- [24] B. Jamet *et al.*, “Interest of pet imaging in multiple myeloma,” *Front. Med.*, vol. 6, no. APR, pp. 1–9, 2019.
 - [25] C. Sachpekidis, H. Goldschmidt, and A. Dimitrakopoulou-Strauss, “Positron Emission Tomography (PET) Radiopharmaceuticals in Multiple Myeloma,” *Molecules*, pp. 1–29, 2019.
 - [26] M. Cavo *et al.*, “Role of 18F-FDG PET/CT in the diagnosis and management of multiple myeloma and other plasma cell disorders: a consensus statement by the International Myeloma Working Group,” *Lancet Oncol.*, vol. 18, no. 4, pp. e206–e217, 2017.
 - [27] T. Cassou-Mounat *et al.*, “18F-fluorocholine versus 18F-fluorodeoxyglucose for PET/CT imaging in patients with suspected relapsing or progressive multiple myeloma: a pilot study,” *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 43, no. 11, pp. 1995–2004, 2016.
 - [28] C. Nanni *et al.*, “11C-choline vs. 18F-FDG PET/CT in assessing bone involvement in patients with multiple myeloma,” *World J. Surg. Oncol.*, vol. 5, pp. 1–7, 2007.
 - [29] A. Dankerl *et al.*, “Multiple myeloma: Molecular imaging with 11C-methionine PET/CT - Initial experience,” *Radiology*, vol. 242, no. 2, pp. 498–508, 2007.
 - [30] K. Lückerrath *et al.*, “11C-Methionine-PET: A novel and sensitive tool for monitoring of early response to treatment in multiple myeloma,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 10, pp. 8418–8429, 2015.
 - [31] C. Lapa *et al.*, “11C-methionine-PET in multiple myeloma: Correlation with clinical parameters and bone marrow involvement,” *Theranostics*, vol. 6, no. 2, pp. 254–261, 2016.
 - [32] A. Agool, B. W. Schot, P. L. Jager, and E. Vellenga, “18F-FLT PET in hematologic disorders: A novel technique to analyze the bone marrow compartment,” *J. Nucl. Med.*, vol. 47, no. 10, pp. 1592–1598, 2006.
 - [33] İ. Ak, H. Onner, and O. M. Akay, “Is there any complimentary role of F-18 NaF PET/CT in detecting of osseous involvement of multiple myeloma? A comparative study for F-18 FDG PET/CT and F-18 FDG NaF PET/CT,” *Ann. Hematol.*, Jun. 2015.
 - [34] C. L. Ho *et al.*, “11C-Acetate PET/CT for metabolic characterization of multiple myeloma: A comparative study with 18F-FDG PET/CT,” *J. Nucl. Med.*, vol. 55, no. 5, pp. 749–752, 2014.
 - [35] C. Lin *et al.*, “11C-Acetate as a new biomarker for PET/CT in patients with multiple myeloma: Initial staging and postinduction response assessment,” *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 41, no. 1, pp. 41–49, 2014.
 - [36] M. Okasaki *et al.*, “Comparison of 11C-4'-thiothymidine, 11C-methionine, and 18F-FDG PET/CT for the detection of active lesions of multiple myeloma,” *Ann. Nucl. Med.*, vol. 29, no. 3, pp. 224–232, 2015.
 - [37] K. Herrmann *et al.*, “First-in-human experience of CXCR4-directed endoradiotherapy with 177Lu-and 90Y-labeled pentixather in advanced-stage multiple myeloma with extensive intra-and extramedullary disease,” *J. Nucl. Med.*, vol. 57, no. 2, pp. 248–251, 2016.
 - [38] C. Bailly *et al.*, “What is the best radionuclide for immuno-PET of multiple myeloma? A comparison study between 89Zr- and 64Cu-labeled anti-CD138 in a preclinical syngeneic model,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 10, 2019.
 - [39] C. Bailly *et al.*, “Comparison of immuno-PET of CD138 and PET imaging with 64CuCl2 and 18F-FDG in a preclinical syngeneic model of multiple myeloma,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 10, pp. 9061–9072, 2018.
 - [40] Q. Liu, I. A. Kriksunov, R. Graeff, C. Munshi, C. L. Hon, and Q. Hao, “Crystal structure of human CD38 extracellular domain,” *Structure*, vol. 13, no. 9, pp. 1331–1339, 2005.
 - [41] H. C. Lee, “Structure and enzymatic functions of human CD38,” *Mol. Med.*, vol. 12, no. 11–12, pp. 317–23, Jan. 2006.
 - [42] L. Guida, L. Franco, E. Zocchi, and A. De Flora, “Structural role of disulfide bridges in the cyclic ADP-ribose related bifunctional ectoenzyme CD38,” *FEBS Lett.*, vol. 368, no. 3, pp. 481–4, Jul. 1995.
 - [43] Q. Liu, I. A. Kriksunov, R. Graeff, C. Munshi, H. C. Lee, and Q. Hao, “Crystal structure of human CD38 extracellular domain,” *Structure*, vol. 13, no. 9, pp. 1331–9, Sep. 2005.
 - [44] N. Chidambaram and C. F. Chang, “Functional role of glycosylation on the recombinant CD38/ADP-ribosyl cyclase in CHO cells,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 30, no. 9, pp. 1011–1018, 1998.
 - [45] C. Munshi, R. Aarhus, R. Graeff, T. F. Walseth, D. Levitt, and H. C. Lee, “Identification of the enzymatic active site of CD38 by site-directed mutagenesis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 28, pp. 21566–71, Jul. 2000.
 - [46] A. D. A. Funaro *et al.*, “Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation,” *Immunity*, vol. 7, no. 3, pp. 315–324, 1990.

- [47] S. Deaglio *et al.*, "Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member," *J. Immunol.*, vol. 160, no. 1, pp. 395–402, Jan. 1998.
- [48] C. M. Ausiello, F. Urbani, A. la Sala, A. Funaro, and F. Malavasi, "CD38 ligation induces discrete cytokine mRNA expression in human cultured lymphocytes," *Eur. J. Immunol.*, vol. 25, no. 5, pp. 1477–1480, 1995.
- [49] C. M. Ausiello, A. La Sala, C. Ramoni, F. Urbani, A. Funaro, and F. Malavasi, "Secretion of IFN- γ , IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-10 cytokines after activation of human purified T lymphocytes upon CD38 ligation," *Cell. Immunol.*, vol. 173, no. 2, pp. 192–197, 1996.
- [50] A. Funaro, L. B. De Monte, U. Dianzani, M. Forni, and F. Malavasi, "Human CD38 is associated to distinct molecules which mediate transmembrane signaling in different lineages," *Eur. J. Immunol.*, vol. 23, no. 10, pp. 2407–2411, 1993.
- [51] M. Morra, M. Zubiaur, C. Terhorst, J. Sancho, and F. Malavasi, "CD38 is functionally dependent on the TCR/CD3 complex in human T cells," *FASEB J.*, vol. 12, no. 7, pp. 581–592, 1998.
- [52] P. Muñoz *et al.*, "CD38 Signaling in T Cells Is Initiated within a Subset of Membrane Rafts Containing Lck and the CD3- ζ Subunit of the T Cell Antigen Receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 50, pp. 50791–50802, 2003.
- [53] A. Kitanaka, C. Ito, H. Nishigaki, and D. Campana, "CD38-mediated growth suppression of B-cell progenitors requires activation of phosphatidylinositol 3-kinase and involves its association with the protein product of the c-cbl proto-oncogene," *Blood*, vol. 88, no. 2, pp. 590–598, 1996.
- [54] J. C. Rodríguez-Alba, M. E. Moreno-García, C. Sandoval-Montes, V. H. Rosales-Garcia, and L. Santos-Argumedo, "CD38 induces differentiation of immature transitional 2 B lymphocytes in the spleen," *Blood*, vol. 111, no. 7, pp. 3644–3652, 2008.
- [55] F. E. Lund, "Signaling properties of CD38 in the mouse immune system: enzyme-dependent and -independent roles in immunity," *Mol. Med.*, vol. 12, no. 11–12, pp. 328–33, Jan. 2006.
- [56] R. Mallone *et al.*, "Signaling through CD38 induces NK cell activation," *Int. Immunol.*, vol. 13, no. 4, pp. 397–409, 2001.
- [57] F. Malavasi *et al.*, "Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology," *Physiol. Rev.*, vol. 88, no. 3, pp. 841–86, Jul. 2008.
- [58] S. Partida-Sánchez *et al.*, "Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo," *Nat. Med.*, vol. 7, no. 11, pp. 1209–1216, 2001.
- [59] R. Fliegert, A. Gasser, and A. H. Guse, "Cell and Molecular Biology of TRP Channels Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers," *Biochem. Soc. Trans.*, no. Figure 2, pp. 109–114, 2007.
- [60] M. Howard *et al.*, "Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38," *Science (80-.)*, vol. 262, no. 5136, pp. 1056–1059, 1993.
- [61] S. Partida-Sánchez, S. Goodrich, K. Kusser, N. Oppenheimer, T. D. Randall, and F. E. Lund, "Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: Impact on the development of humoral immunity," *Immunity*, vol. 20, no. 3, pp. 279–291, 2004.
- [62] S. Y. Rah, K. H. Park, M. K. Han, M. J. Im, and U. H. Kim, "Activation of CD38 by interleukin-8 signaling regulates intracellular Ca²⁺ level and motility of lymphokine-activated killer cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 4, pp. 2888–2895, 2005.
- [63] H. C. Lee, "Cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) as messengers for calcium mobilization," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 38, pp. 31633–40, Sep. 2012.
- [64] L. Guida, S. Bruzzone, L. Sturla, L. Franco, E. Zocchi, and A. De Flora, "Equilibrative and concentrative nucleoside transporters mediate influx of extracellular cyclic ADP-ribose into 3T3 murine fibroblasts," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 49, pp. 47097–47105, 2002.
- [65] A. de Flora, E. Zocchi, L. Guida, L. Franco, and S. Bruzzone, "Autocrine and paracrine calcium signaling by the CD38/NAD⁺/cyclic ADP-ribose system," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1057, pp. 260–278, 2005.
- [66] S. Bruzzone *et al.*, "A Self-restricted CD38-connexin 43 Cross-talk Affects NAD⁺ and Cyclic ADP-ribose Metabolism and Regulates Intracellular Calcium in 3T3 Fibroblasts," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 51, pp. 48300–48308, 2001.
- [67] Y. J. Zhao, C. M. C. Lam, and H. C. Lee, "The membrane-bound enzyme CD38 exists in two opposing orientations," *Sci. Signal.*, vol. 5, no. 241, pp. 1–11, 2012.
- [68] S. Deaglio *et al.*, "CD38/CD31, a Receptor/Ligand System Ruling Adhesion and Signaling in Human Leukocytes," in *Human CD38 and Related Molecules*, Basel, vol. 75, F. Malavasi and K.

- Mehta, Eds. 2000, pp. 99–120.
- [69] S. Deaglio *et al.*, “Human CD38 and its ligand CD31 define a unique lamina propria T lymphocyte signaling pathway,” *FASEB J.*, vol. 15, no. 3, pp. 580–2, Mar. 2001.
 - [70] S. Deaglio *et al.*, “CD38/CD31 interactions activate genetic pathways leading to proliferation and migration in chronic lymphocytic leukemia cells,” *Mol. Med.*, vol. 16, no. 3–4, pp. 87–91, Mar. 2010.
 - [71] R. Leo *et al.*, “Multiparameter analyses of normal and malignant human plasma cells: CD38++ CD56+, CD54+ cIg+ is the common phenotype of myeloma cells,” *Ann. Hematol.*, pp. 132–139, 1992.
 - [72] A. Seckinger *et al.*, “CD38 as immunotherapeutic target in light chain amyloidosis and multiple myeloma-Association with molecular entities, risk, survival, and mechanisms of upfront resistance,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. JUL, 2018.
 - [73] J. Moreaux, “Anticorps anti-CD38 dans le myélome multiple,” *Med. Sci. (Paris)*, vol. 35, no. 12, pp. 1001–1004, 2019.
 - [74] M. T. Petrucci and F. Vozella, “The Anti-CD38 Antibody Therapy in Multiple Myeloma,” *Cells*, pp. 1–9, 2019.
 - [75] M. de Weers *et al.*, “Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors,” *J. Immunol.*, vol. 186, no. 3, pp. 1840–8, Feb. 2011.
 - [76] M. B. Overdijk *et al.*, “Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of the therapeutic antibody daratumumab in lymphoma and multiple myeloma,” *MAbs*, vol. 7, no. 2, pp. 311–320, 2015.
 - [77] N. W. C. J. van de Donk *et al.*, “Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond,” *Immunol. Rev.*, vol. 270, no. 1, pp. 95–112, Mar. 2016.
 - [78] J. Krejci *et al.*, “Daratumumab depletes CD38+ immune-regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma,” *Blood*, May 2016.
 - [79] T. Facon *et al.*, “Daratumumab plus lenalidomide and dexamethasone for untreated Myeloma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 380, no. 22, pp. 2104–2115, 2019.
 - [80] P. Moreau *et al.*, “Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study,” *Lancet*, vol. 394, no. 10192, pp. 29–38, 2019.
 - [81] E. Caserta *et al.*, “Copper 64-labeled daratumumab as a PET/CT imaging tracer for multiple myeloma,” *Blood*, vol. 131, no. 7, pp. 741–745, 2018.
 - [82] A. Ghai *et al.*, “Preclinical development of CD38-Targeted [89 Zr]Zr-DFO-Daratumumab for Imaging Multiple Myeloma,” *J. Nucl. Med.*, vol. 59, no. 2, pp. 216–222, 2018.
 - [83] A. Krishnan *et al.*, “Identifying CD38+ cells in patients with multiple myeloma: First-in-human imaging using copper-64-labeled daratumumab,” *Blood Adv.*, vol. 4, no. 20, pp. 5194–5202, 2020.
 - [84] P. Gold and S. Freedman, “Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques,” *J. Exp. Med.*, 1964.
 - [85] A. M. Scott, J. P. Allison, and J. D. Wolchok, “Monoclonal antibodies in cancer therapy,” *Cancer Immun.*, vol. 12, no. May, pp. 1–8, 2012.
 - [86] N. H. Martin, “The immunoglobulins: a review,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 22, no. 2, pp. 117–131, 1969.
 - [87] M. Broutin and H. Watier, “Les biomédicaments 2eme partie : les anticorps thérapeutiques,” *Biol. Géologie*, vol. 2, no. 1, pp. 97–108, 2016.
 - [88] H. W. J. Schroeder and L. Cavacini, “Structure and Function of Immunoglobulins,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, pp. S41–S52, 2010.
 - [89] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, and al, “The generation of antibody diversity,” in *Molecular biology of the cell: 4th edition*, 2002.
 - [90] G. Cartron and M. C. Béné, “Compréhension et modulation des mécanismes d’action des anticorps monoclonaux thérapeutiques –,” *Corresp. en Onco-hématologie*, vol. 2, 2010.
 - [91] C. Magdelaine-beuzelin, M. Ohresser, and H. Watier, “FcRn, un récepteur d’IgG aux multiples facettes,” *Medecine/Sciences*, pp. 1053–6, 2009.
 - [92] G. Köhler and C. Milstein, “Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity,” *Nature*, pp. 495–497, 1975.
 - [93] D. Bellet and V. Dangles-Marie, “Anticorps humanisés en thérapeutique,” *Medecine/Sciences*, vol. 21, 2005.

- [94] P. Chames, M. Van Regenmortel, E. Weiss, and D. Baty, "Therapeutic antibodies: Successes, limitations and hopes for the future," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 157, no. 2, pp. 220–233, 2009.
- [95] A. M. Scott, J. D. Wolchok, and L. J. Old, "Antibody therapy of cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, no. 4, pp. 278–287, 2012.
- [96] G. J. Weiner, "Rituximab : mechanism of action," *Semin. Hematol.*, vol. 47, no. 2, pp. 115–123, 2011.
- [97] C. A. Hudis, "Trastuzumab - Mechanism of action and use in clinical practice," *N. Engl. J. Med.*, vol. 357, no. 1, pp. 39–51, 2007.
- [98] N. Ferrara, K. J. Hillan, H. P. Gerber, and W. Novotny, "Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 3, no. 5, pp. 391–400, 2004.
- [99] D. Schrama, R. A. Reisfeld, and J. C. Becker, "Antibody targeted drugs as cancer therapeutics," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, no. 2, pp. 147–159, 2006.
- [100] J. F. Haeuw, V. Caussanel, and A. Beck, "Les immunoconjugués, anticorps «armés» pour combattre le cancer," *Medecine/Sciences*, vol. 25, no. 12, pp. 1046–1052, 2009.
- [101] J.-P. Mach, S. Carrel, C. Merenda, and J.-C. Cerottini, "In vivo localisation of radiolabelled antibodies to carcinoembryonic antigen in human colon carcinoma grafted into nude mice," *Nature*, vol. 248, pp. 704–706, 1974.
- [102] F. J. Primus, R. MacDonald, and H. J. Hansen, "Localization of GW-39 Human Tumors in Hamsters by Affinity-purified Antibody to Carcinoembryonic Antigen," *Cancer Res.*, vol. 37, no. 5, pp. 1544–1547, 1977.
- [103] J. P. Mach *et al.*, "Tumor Localization in Patients by Radiolabeled Monoclonal Antibodies Against Colon Carcinoma," *Cancer Res.*, vol. 43, no. 11, pp. 5593–5600, 1983.
- [104] C. Duranti and A. Arcangeli, "Ion Channel Targeting with Antibodies and Antibody Fragments for Cancer Diagnosis," *Antibodies*, vol. 8, no. 2, p. 33, 2019.
- [105] K. S. Carmon and A. Azhdarinia, "Application of Immuno-PET in Antibody–Drug Conjugate Development," *Mol. Imaging*, vol. 17, pp. 1–10, 2018.
- [106] C. R. Divgi *et al.*, "Preoperative characterisation of clear-cell renal carcinoma using iodine-124-labelled antibody chimeric G250 (124I-cG250) and PET in patients with renal masses: a phase I trial," *Lancet Oncol.*, vol. 8, no. 4, pp. 304–310, 2007.
- [107] P. K. E. Börjesson *et al.*, "Performance of immuno - positron emission tomography with zirconium-89-labeled chimeric monoclonal antibody U36 in the detection of lymph node metastases in head and neck cancer patients," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 7 I, pp. 2133–2140, 2006.
- [108] F. Kraeber-Bodéré *et al.*, "L'immuno-TEP, une nouvelle approche d'imagerie moléculaire," *Med. Nucl.*, vol. 34, no. 5, pp. 295–298, 2010.
- [109] R. A. Beckman, L. M. Weiner, and H. M. Davis, "Antibody constructs in cancer therapy: Protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors," *Cancer*, vol. 109, no. 2, pp. 170–179, 2007.
- [110] T. Takai, "Roles of Fc receptors in autoimmunity," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 8, pp. 580–592, 2002.
- [111] "VIDAL," *DARZALEX (daratumumab), premier anticorps monoclonal anti-CD38*. [Online]. Available: <https://www.vidal.fr/actualites/23429-myelome-multiple-darzalex-daratumumab-premier-anticorps-monoclonal-anti-cd38.html>.
- [112] V. Kenanova and A. M. Wu, "Tailoring antibodies for radionuclide delivery," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 3, no. 1, pp. 53–70, 2006.
- [113] P. Holliger and P. J. Hudson, "Engineered antibody fragments and the rise of single domains," *Nat. Biotechnol.*, vol. 23, no. 9, pp. 1126–1136, 2005.
- [114] D. G. Covell, J. Barbet, O. D. Holton, C. D. V. Black, J. N. Weinstein, and R. J. Parker, "Pharmacokinetics of monoclonal immunoglobulin G1, F(ab')₂, and fab' in mice," *Cancer Res.*, vol. 46, no. 8, pp. 3969–3978, 1986.
- [115] T. Behr, W. Becker, E. Hannappel, D. M. Goldenberg, and F. Wolf, "Targeting of liver metastases of colorectal cancer with IgG, F(ab')₂, and Fab' anti-carcinoembryonic antigen antibodies labeled with ^{99m}Tc: The role of metabolism and kinetics," *Cancer Res.*, vol. 55, no. 23 SUPPL., 1995.
- [116] K. T. Cheng, "^{99m}Tc-Arcitumomab," *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*, 2008..
- [117] K. Alt *et al.*, "High-resolution animal PET imaging of prostate cancer xenografts with three different ⁶⁴Cu-labeled antibodies against native cell-adherent PSMA," *Prostate*, vol. 70, no. 13,

- pp. 1413–1421, 2010.
- [118] J. Hochman, D. Inbar, and D. Givol, “An Active Antibody Fragment (Fv) Composed of the Variable Portions of Heavy and Light Chains,” *Biochemistry*, vol. 12, no. 6, pp. 1130–1135, 1973.
 - [119] A. Plückthun and A. Skerra, “Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*,” *Methods Enzymol.*, vol. 178, no. C, pp. 497–515, 1989.
 - [120] P. J. Hudson and A. A. Kortt, “High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies,” *J. Immunol. Methods*, vol. 231, no. 1–2, pp. 177–189, 1999.
 - [121] M. K. Robinson *et al.*, “Quantitative immuno-positron emission tomography imaging of HER2-positive tumor xenografts with an iodine-124 labeled anti-HER2 diabody,” *Cancer Res.*, vol. 65, no. 4, pp. 1471–1478, 2005.
 - [122] G. Sundaresan *et al.*, “I-Labeled Engineered Anti-CEA Minibodies and Diabodies Imaging of Xenografts in Athymic Mice,” *J. Nucl. Med.*, vol. 44, no. 12, pp. 1962–1969, 2004.
 - [123] J. V. Leyton *et al.*, “A Humanized Radioiodinated Minibody as an Imaging Agent for the Detection of Prostate Stem Cell Antigen (PSCA)-Expressing Tumors by microPET,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 22, pp. 7488–7496, 2008.
 - [124] N. Pandit-Taskar *et al.*, “First-in-human imaging with 89Zr-Df-IAB2M Anti-PSMA minibody in patients with metastatic prostate cancer: Pharmacokinetics, biodistribution, dosimetry, and lesion uptake,” *J. Nucl. Med.*, vol. 57, no. 12, pp. 1858–1864, 2016.
 - [125] S. Muyldermans *et al.*, “Camelid immunoglobulins and nanobody technology,” *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 128, no. 1–3, pp. 178–183, 2009.
 - [126] S. Muyldermans, “Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 82, no. 1, pp. 775–797, 2013.
 - [127] H. A. Huet *et al.*, “Multivalent nanobodies targeting death receptor 5 elicit superior tumor cell killing through efficient caspase induction,” *MAbs*, vol. 6, no. 6, pp. 1560–1570, 2014.
 - [128] M. Dumoulin *et al.*, “Single-domain antibody fragments with high conformational stability,” *Protein Sci.*, vol. 11, no. 3, pp. 500–515, 2009.
 - [129] P. Debie, N. Devoogdt, and S. Hernot, “Targeted Nanobody-Based Molecular Tracers for Nuclear Imaging and Image-Guided Surgery,” *Antibodies*, vol. 8, no. 1, p. 12, 2019.
 - [130] I. Vaneycken *et al.*, “In vitro analysis and in vivo tumor targeting of a humanized, grafted Nanobody in mice using pinhole SPECT/micro-CT,” *J. Nucl. Med.*, vol. 51, no. 7, pp. 1099–1106, 2010.
 - [131] U. Iqbal *et al.*, “Molecular imaging of glioblastoma multiforme using anti-insulin-like growth factor-binding protein-7 single-domain antibodies,” *Br. J. Cancer*, vol. 103, no. 10, pp. 1606–1616, 2010.
 - [132] C. Wang *et al.*, “ImmunoPET imaging of multiple myeloma with [⁶⁸Ga] Ga-NOTA-Nb1053,” *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, no. February, 2021.
 - [133] C. Xavier *et al.*, “Synthesis, preclinical validation, dosimetry, and toxicity of ⁶⁸Ga-NOTA-anti-HER2 nanobodies for iPET imaging of HER2 receptor expression in cancer,” *J. Nucl. Med.*, vol. 54, no. 5, pp. 776–784, 2013.
 - [134] G. Vaidyanathan *et al.*, “Preclinical evaluation of ¹⁸F-labeled anti-HER2 nanobody conjugates for imaging HER2 receptor expression by immuno-PET,” *J. Nucl. Med.*, vol. 57, no. 6, pp. 967–973, 2016.
 - [135] M. Keyaerts *et al.*, “Phase I study of ⁶⁸Ga-HER2-Nanobody for PET/CT assessment of HER2 expression in breast carcinoma,” *J. Nucl. Med.*, vol. 57, no. 1, pp. 27–33, 2016.
 - [136] B. Owens, “Faster, deeper, smaller—the rise of antibody-like scaffolds,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 35, no. 7, pp. 602–603, 2017.
 - [137] M. Gebauer and A. Skerra, “Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 13, no. 3, pp. 245–255, 2009.
 - [138] A. Skerra, “Engineered protein scaffolds for molecular recognition,” *J. Mol. Recognit.*, vol. 13, no. 4, pp. 167–187, 2000.
 - [139] H. K. Binz, P. Amstutz, and A. Plückthun, “Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 23, no. 10, pp. 1257–1268, 2005.
 - [140] P. Minard, “L’évolution dirigée des protéines,” *Medecine/Sciences*, vol. 35, pp. 169–175, 2019.
 - [141] C. Li, R. Zhang, J. Wang, L. M. Wilson, and Y. Yan, “Protein Engineering for Improving and Diversifying Natural Product Biosynthesis,” *Trends Biotechnol.*, pp. 1–16, 2020.
 - [142] S. Lutz, “Beyond directed evolution - semi-rational protein engineering and design,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 21, no. 6, pp. 734–743, 2010.
 - [143] P. Fuchs, F. Breitling, S. Dübel, T. Seehaus, and M. Little, “Targeting recombinant antibodies to

- the surface of *Escherichia coli*: fusion to a peptidoglycan associated lipoprotein," *Biotechnology*, vol. 9, pp. 1369–1372, 1991.
- [144] E. T. Boder and K. D. Wittrup, "Yeast surface display for screening combinatorial polypeptides libraries," *Nat. Biotechnol.*, vol. 15, pp. 553–557, 1997.
 - [145] J. McCafferty, A. Griffiths, G. Winter, and D. Chiswell, "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains," *Nature*, vol. 348, pp. 552–554, 1990.
 - [146] L. C. Mattheakis, R. R. Bhatt, and W. J. Dower, "An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 19, pp. 9022–9026, 1994.
 - [147] B. Nilsson *et al.*, "A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein a," *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 1, no. 2, pp. 107–113, 1987.
 - [148] K. Nord, J. Nilsson, B. Nilsson, M. Uhlén, and P. Å. Nygren, "A combinatorial library of an α -helical bacterial receptor domain," *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 8, no. 6, pp. 601–608, 1995.
 - [149] N. Kronqvist, J. Löfblom, A. Jonsson, H. Wernérus, and S. Ståhl, "A novel affinity protein selection system based on staphylococcal cell surface display and flow cytometry," *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 21, no. 4, pp. 247–255, 2008.
 - [150] S. Grimm, F. Yu, and P. Å. Nygren, "Ribosome display selection of a murine IgG1 fab binding affibody molecule allowing species selective recovery of monoclonal antibodies," *Mol. Biotechnol.*, vol. 48, no. 3, pp. 263–276, 2011.
 - [151] V. Tolmachev and A. Orlova, "Affibody molecules as targeting vectors for PET imaging," *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 3, 2020.
 - [152] P. Å. Nygren, "Alternative binding proteins: Affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold," *FEBS J.*, vol. 275, no. 11, pp. 2668–2676, 2008.
 - [153] J. Löfblom, J. Feldwisch, V. Tolmachev, J. Carlsson, S. Ståhl, and F. Y. Frejd, "Affibody molecules: Engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications," *FEBS Lett.*, vol. 584, no. 12, pp. 2670–2680, 2010.
 - [154] Z. Cheng and E. Al, "64 Cu-Labeled Affibody Molecules for Imaging of HER2 Expressing Tumors," *Mol. imaging Biol.*, vol. 12, no. 1, p. 316-, 2010.
 - [155] S. Ahlgren *et al.*, "Targeting of HER2-expressing tumors using 111In-ABY-025, a second-generation Affibody molecule with a fundamentally reengineered scaffold," *J. Nucl. Med.*, vol. 51, no. 7, pp. 1131–1138, 2010.
 - [156] T. A. Burley *et al.*, "Affibody-based PET imaging to guide EGFR-targeted cancer therapy in head and neck squamous cell cancer models," *J. Nucl. Med.*, vol. 60, no. 3, pp. 353–361, 2019.
 - [157] A. Orlova, H. Wållberg, S. Stone-Elander, and V. Tolmachev, "On the selection of a tracer for PET imaging of HER2-expressing tumors: Direct comparison of a99mTc-labeled affibody molecule and trastuzumab in a murine xenograft model," *J. Nucl. Med.*, vol. 50, no. 3, pp. 417–425, 2009.
 - [158] J. Sörensen *et al.*, "Measuring HER2-receptor expression in metastatic breast cancer using [68Ga]ABY-025 Affibody PET/CT," *Theranostics*, vol. 6, no. 2, pp. 262–271, 2016.
 - [159] M. A. Andrade, C. Perez-Iratxeta, and C. P. Ponting, "Protein repeats: Structures, functions, and evolution," *J. Struct. Biol.*, vol. 134, no. 2–3, pp. 117–131, 2001.
 - [160] J. Li, A. Mahajan, and M. D. Tsai, "Ankyrin repeat: A unique motif mediating protein-protein interactions," *Biochemistry*, vol. 45, no. 51, pp. 15168–15178, 2006.
 - [161] R. Tamaskovic, M. Simon, N. Stefan, M. Schwill, and A. Plückthun, "Designed ankyrin repeat proteins (DARPin): From research to therapy," in *Methods in Enzymology*, vol. 503, 2012, pp. 101–134.
 - [162] M. T. Stumpp, H. K. Binz, and P. Amstutz, "DARPin: A new generation of protein therapeutics," *Drug Discov. Today*, vol. 13, no. 15–16, pp. 695–701, 2008.
 - [163] J. Schilling, J. Schöppe, and A. Plückthun, "From DARPin to LoopDARPin: Novel LoopDARPin design allows the selection of low picomolar binders in a single round of ribosome display," *J. Mol. Biol.*, vol. 426, no. 3, pp. 691–721, 2014.
 - [164] A. Plückthun, "Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPin): Binding Proteins for Research, Diagnostics, and Therapy," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 55, pp. 489–511, 2015.
 - [165] S. K. Wetzel, G. Settanni, M. Kenig, H. K. Binz, and A. Plückthun, "Folding and Unfolding Mechanism of Highly Stable Full-Consensus Ankyrin Repeat Proteins," *J. Mol. Biol.*, vol. 376, no. 1, pp. 241–257, 2008.
 - [166] R. Goldstein *et al.*, "Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2 molecular imaging," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 42, no. 2, pp. 288–301, 2015.
 - [167] A. Vorobyeva *et al.*, "Comparison of tumor-targeting properties of directly and indirectly

- radioiodinated designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 variants for molecular imaging of HER2," *Int. J. Oncol.*, vol. 54, no. 4, pp. 1209–1220, 2019.
- [168] C. Zahnd *et al.*, "Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: Effects of affinity and molecular size," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 4, pp. 1595–1605, 2010.
- [169] S. H. Yoshimura and T. Hirano, "HEAT repeats - versatile arrays of amphiphilic helices working in crowded environments?," *J. Cell Sci.*, vol. 129, no. 21, pp. 3963–3970, 2016.
- [170] A. Urvoas *et al.*, "Design, Production and Molecular Structure of a New Family of Artificial Alpha-helical Repeat Proteins (α Rep) Based on Thermostable HEAT-like Repeats," *J. Mol. Biol.*, vol. 404, no. 2, pp. 307–327, 2010.
- [171] A. Guellouz *et al.*, "Selection of Specific Protein Binders for Pre-Defined Targets from an Optimized Library of Artificial Helical Repeat Proteins (α Rep)," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, 2013.
- [172] T. Di Meo *et al.*, "Functionalized artificial bidomain proteins based on an α -solenoid protein repeat scaffold: A new class of artificial diels-alderases," *ACS Omega*, vol. 4, no. 2, pp. 4437–4447, 2019.
- [173] A. Chevrel *et al.*, "Alpha repeat proteins (α Rep) as expression and crystallization helpers," *J. Struct. Biol.*, vol. 201, no. 2, pp. 88–99, 2018.
- [174] J. Prasad *et al.*, "Directed evolution of artificial repeat proteins as habit modifiers for the morphosynthesis of (111)-terminated gold nanocrystals," *Nanoscale*, vol. 11, no. 37, pp. 17485–17497, 2019.
- [175] S. Hadpech *et al.*, "Alpha-helical HEAT-like Repeat Proteins (α Rep) Selected as Interactors of HIV-1 Nucleocapsid Negatively Interfere with Viral Genome Packaging and Virus Maturation," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–19, 2017.
- [176] A. Chevrel *et al.*, "Specific GFP-binding artificial proteins (α Rep): A new tool for in vitro to live cell applications," *Biosci. Rep.*, vol. 35, no. 4, 2015.
- [177] J. G. McAfee, S. P. Edmondson, P. K. Datta, J. W. Shriver, and R. Gupta, "Gene Cloning, Expression, and Characterization of the Sac7 Proteins from the Hyperthermophile *Sulfolobus acidocaldarius*," *Biochemistry*, vol. 34, no. 31, pp. 10063–10077, 1995.
- [178] W. B. Peters, S. P. Edmondson, and J. W. Shriver, "Thermodynamics of DNA binding and distortion by the hyperthermophile chromatin protein Sac7d," *J. Mol. Biol.*, vol. 343, no. 2, pp. 339–360, 2004.
- [179] H. Robinson, Y.-G. Gao, B. McCrary, S. Edmondson, J. Shriver, and A. H. J. Wang, "The hyperthermophile chromosomal protein Sac7d sharply kinks DNA," *Nature*, vol. 392, pp. 202–205, 1998.
- [180] S. P. Edmondson and J. W. Shriver, "Binding Proteins Sac7d and Sso7d from *Sulfolobus*," in *Methods in Enzymology*, vol. 334, 2001.
- [181] S. Su *et al.*, "Crystal structures of the chromosomal proteins Sso7d/Sac7d bound to DNA containing T-G mismatched base-pairs," *J. Mol. Biol.*, vol. 303, no. 3, pp. 395–403, 2000.
- [182] B. Mouratou *et al.*, "Remodeling a DNA-binding protein as a specific in vivo inhibitor of bacterial secretin PulD," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 46, pp. 17983–8, Nov. 2007.
- [183] G. Béhar *et al.*, "Tolerance of the archaeal Sac7d scaffold protein to alternative library designs: Characterization of anti-immunoglobulin G Affitins," *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 26, no. 4, pp. 267–275, 2013.
- [184] A. Correa *et al.*, "Potent and Specific Inhibition of Glycosidases by Small Artificial Binding Proteins (Affitins)," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e97438, 2014.
- [185] G. Béhar, S. Pacheo, M. Maillason, B. Mouratou, and F. Pecorari, "Switching an anti-IgG binding site between archaeal extremophilic proteins results in Affitins with enhanced pH stability," *J. Biotechnol.*, 2014.
- [186] G. Béhar, A. Renodon-Cornière, B. Mouratou, and F. Pecorari, "Affitins as robust tailored reagents for affinity chromatography purification of antibodies and non-immunoglobulin proteins," *J. Chromatogr. A*, Feb. 2016.
- [187] V. Kalichuk *et al.*, "The archaeal '7 kDa DNA-binding' proteins: extended characterization of an old gifted family," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 37274, Nov. 2016.
- [188] V. Kalichuk *et al.*, "A novel, smaller scaffold for Affitins: Showcase with binders specific for EpCAM," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 115, no. 2, pp. 290–299, 2018.
- [189] N. Gera, M. Hussain, R. C. Wright, and B. M. Rao, "Highly Stable Binding Proteins Derived from the Hyperthermophilic Sso7d Scaffold," *J. Mol. Biol.*, vol. 409, no. 4, pp. 601–616, 2011.
- [190] N. Gera, A. B. Hill, D. P. White, R. G. Carbonell, and B. M. Rao, "Design of pH Sensitive Binding Proteins from the Hyperthermophilic Sso7d Scaffold," *PLoS One*, vol. 7, no. 11, 2012.

- [191] M. Hussain, N. Gera, and B. M. Rao, "Avidity-Mediated Virus Separation Using a Hyperthermophilic Affinity Ligand," *Biotechnol. Prog.*, pp. 237–246, 2012.
- [192] M. Hussain, N. Gera, A. B. Hill, and B. M. Rao, "Scaffold Diversification Enhances Effectiveness of a Superlibrary of Hyperthermophilic Proteins," *ACS Synth. Biol.*, 2012.
- [193] N. Zhao, M. A. Schmitt, and J. D. Fisk, "Phage display selection of tight specific binding variants from a hyperthermostable Sso7d scaffold protein library," *FEBS J.*, vol. 283, pp. 1351–1367, 2016.
- [194] C. Zahnd, P. Amstutz, and A. Plückthun, "Ribosome display: Selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target," *Nat. Methods*, vol. 4, no. 3, pp. 269–279, 2007.
- [195] B. Mouratou, B. Ghislaine, L. Paillard-Laurance, S. Colinet, and F. Pecorari, "Ribosome Display for the selection of Sca7d Scaffolds," in *Ribosome Display and Related Technologies: Methods and Protocols*, 2012, pp. 315–331.
- [196] M. Krehenbrink, M. Chami, I. Guilvout, P. M. Alzari, F. Pécari, and A. P. Pugsley, "Artificial Binding Proteins (Affitins) as Probes for Conformational Changes in Secretin PulD," *J. Mol. Biol.*, vol. 383, no. 5, pp. 1058–1068, 2008.
- [197] A. Loussouarn, G. Béhar, F. Pecorari, M. Croyal, and A. Renodon-Cornière, "Characterization of Affitin proteolytic digestion in biorelevant media and improvement of their stabilities via protein engineering," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–13, 2020.
- [198] B. Mouratou, G. Béhar, and F. Pecorari, "Artificial affinity proteins as ligands of immunoglobulins," *Biomolecules*, vol. 5, no. 1, pp. 60–75, 2015.
- [199] E. Matous, "Développement d'une Affitin anti-CD138 comme nouvel outil pour l'imagerie phénotypique," 2014.
- [200] F. Pecorari and P. Alzari, "Wo 2008/068637 a3," 2008.
- [201] N. Buddelmeijer, M. Krehenbrink, F. Pecorari, and A. P. Pugsley, "Type II secretion system secretin PulD localizes in clusters in the Escherichia coli outer membrane," *J. Bacteriol.*, vol. 91, no. 1, pp. 161–168, 2009.
- [202] F. F. Miranda, E. Brient-Litzler, N. Zidane, F. Pecorari, and H. Bedouelle, "Reagentless fluorescent biosensors from artificial families of antigen binding proteins," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 10, pp. 4184–90, Jun. 2011.
- [203] M. Cinier *et al.*, "Bisphosphonate adaptors for specific protein binding on zirconium phosphonate-based microarrays," *Bioconjug. Chem.*, vol. 20, no. 12, pp. 2270–7, Dec. 2009.
- [204] M. Cinier, M. Petit, F. Pecorari, D. R. Talham, B. Bujoli, and C. Tellier, "Engineering of a phosphorylatable tag for specific protein binding on zirconium phosphonate based microarrays," *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 17, no. 3, pp. 399–407, 2012.
- [205] C. S. M. Fernandes *et al.*, "Affitins for protein purification by affinity magnetic fishing," *J. Chromatogr. A*, vol. 1457, pp. 50–58, 2016.
- [206] P. Aksoy, T. A. White, M. Thompson, and E. N. Chini, "Regulation of intracellular levels of NAD: A novel role for CD38," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 345, no. 4, pp. 1386–1392, 2006.
- [207] R. M. Graeff, T. F. Walseth, K. Fryxell, W. D. Branton, and H. C. Lee, "Enzymatic synthesis and characterizations of cyclic GDP-ribose. A procedure for distinguishing enzymes with ADP-ribosyl cyclase activity," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 48, pp. 30260–7, Dec. 1994.
- [208] M. Fairhead and M. Howarth, "Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols," *Methods Mol. Biol.*, no. 1266, pp. 171–184, 2015.
- [209] J. F. Zawada, "Preparation and Testing of E. coli S30 In Vitro Transcription Translation Extracts," in *Ribosome Display and Related Technologies: methods and protocols*, 2012, pp. 31–41.
- [210] P. Milovnik, D. Ferrari, C. A. Sarkar, and A. Plückthun, "Selection and characterization of DARPins specific for the neurotensin receptor 1," *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 22, no. 6, pp. 357–366, 2009.
- [211] K. Even-Desrumeaux and P. Chames, "Phage Display and Selections on Cells," in *Antibody Engineering: Methods and Protocols, Second Edition*, no. 1, 2012, pp. 225–235.
- [212] J. A. Lamboy, P. Y. Tam, L. S. Lee, and P. J. Jackson, "Chemical and genetic wrappers for improved phage and rna display," *ChemBiochem*, vol. 9, no. 17, pp. 2846–2852, 2008.
- [213] J. Leppiniemi *et al.*, "Structure of Bradavidin - C-terminal residues act as intrinsic ligands," *PLoS One*, vol. 7, no. 5, 2012.
- [214] H. Clausen, H. H. Wandall, C. Steentoft, P. Stanley, and R. L. Schnaar, "Chapter 56 Glycosylation Engineering," in *Essentials of Glycobiology*, 2017.
- [215] A. Croset *et al.*, "Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells," *J. Biotechnol.*, vol. 161, no. 3, pp. 336–348, 2012.

- [216] J. B. Goh, S. K. Ng, J. B. Goh, and S. K. Ng, "Impact of host cell line choice on glycan profile Impact of host cell line choice on glycan profile," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 38, no. 6, pp. 851–867, 2018.
- [217] K. Sterzyńska, B. Kempisty, P. Zawierucha, and M. Zabel, "Analysis of the specificity and selectivity of anti-EpCAM antibodies in breast cancer cell lines," *Folia Histochem. Cytobiol.*, vol. 50, no. 4, pp. 534–541, 2012.
- [218] M. Goux *et al.*, "Nanofitin as a New Molecular-Imaging Agent for the Diagnosis of Epidermal Growth Factor Receptor Over-Expressing Tumors," *Bioconjug. Chem.*, vol. 28, no. 9, pp. 2361–2371, 2017.
- [219] G. Marcion *et al.*, "Nanofitins targeting heat shock protein 110: an innovative immunotherapeutic modality in cancer.," *Int. J. Cancer*, no. January, 2021.
- [220] I. R. Garrett, S. Dallas, J. Radl, and G. R. Mundy, "A murine model of human myeloma bone disease," *Bone*, vol. 20, no. 6, pp. 515–520, 1997.
- [221] S. Gouard *et al.*, "Comparative analysis of multiple myeloma treatment by CD138 antigen targeting with bismuth-213 and Melphalan chemotherapy," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 41, no. S, pp. e30–e35, 2014.
- [222] M. Onishi *et al.*, "Applications of retrovirus-mediated expression cloning .," *Exp. Hematol.*, vol. 24(2), pp. 324–329, 1996.
- [223] K. Vanderkerken *et al.*, "Organ involvement and phenotypic adhesion profile of 5T2 and 5T33 myeloma cells in the C57BL/KaLwRij mouse," *Br. J. Cancer*, vol. 76, no. 4, pp. 451–460, 1997.
- [224] P. O. Hofgaard *et al.*, "A Novel Mouse Model for Multiple Myeloma (MOPC315.BM) That Allows Noninvasive Spatiotemporal Detection of Osteolytic Disease," *PLoS One*, vol. 7, no. 12, p. e51892, Dec. 2012.
- [225] F. R. Donís-Hernández, R. M. Parkhouse, and L. Santos-Argumedo, "Ontogeny, distribution and function of CD38-expressing B lymphocytes in mice.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 31, no. 4, pp. 1261–7, Apr. 2001.
- [226] M. J. Eigenmann, L. Fronton, H. P. Grimm, M. B. Otteneder, and B. F. Krippendorff, "Quantification of IgG monoclonal antibody clearance in tissues," *MAbs*, vol. 9, no. 6, pp. 1007–1015, 2017.
- [227] D. W. Brammer, J. M. Riley, S. C. Kreuser, K. R. Zasadny, M. J. Callahan, and M. D. Davis, "Harderian gland adenectomy: A method to eliminate confounding radio-opacity in the assessment of rat brain metabolism by 18F-fluoro-2-deoxy-D- glucose positron emission tomography," *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, vol. 46, no. 5, pp. 42–45, 2007.
- [228] L. S. Manning, J. D. Berger, H. L. O'Donoghue, J. Harvey Turner, G. N. Sheridan, and P. G. Claringbold, "A model of multiple myeloma: Culture of 5t33 murine myeloma cells and evaluation of tumorigenicity in the c57bl/kalwrij mouse," *Br. J. Cancer*, vol. 66, no. 6, pp. 1088–1093, 1992.
- [229] J. Paton-Hough, A. D. Chantry, and M. A. Lawson, "A review of current murine models of multiple myeloma used to assess the efficacy of therapeutic agents on tumour growth and bone disease," *Bone*, vol. 77, pp. 57–68, 2015.
- [230] G. Shay, L. Hazlehurst, and C. Lynch, "Dissecting the Multiple Myeloma-bone microenvironment reveals new therapeutic opportunities," *J. Mol. Med.*, vol. 94, no. 10, pp. 21–35, 2016.
- [231] M. Cataldi, C. Vigliotti, T. Mosca, M. R. Cammarota, and D. Capone, "Emerging role of the spleen in the pharmacokinetics of monoclonal antibodies, nanoparticles and exosomes," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 6, 2017.
- [232] I. Quelven *et al.*, "212Pb Alpha-Radioimmunotherapy targeting CD38 in Multiple Myeloma: a preclinical study.," *J. Nucl. Med.*, 2019.
- [233] C. Sandoval-Montes and L. Santos-Argumedo, "CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 77, no. 4, pp. 513–521, 2005.
- [234] F. Vences-Catalán and L. Santos-Argumedo, "CD38 through the life of a murine B lymphocyte," *IUBMB Life*, vol. 63, no. 10, pp. 840–846, 2011.
- [235] A. Larsson, A. Bredberg, G. Henriksson, R. Manthorpe, and A. Sallmyr, "Immunohistochemistry of the B-cell component in lower lip salivary glands of Sjögren's syndrome and healthy subjects," *Scand. J. Immunol.*, vol. 61, no. 1, pp. 98–107, 2005.
- [236] W. Masuda and E. Jimi, "CD38/ADP-ribosyl cyclase in the rat sublingual gland: Subcellular localization under resting and saliva-secreting conditions," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 513, no. 2, pp. 131–139, 2011.

- [237] H. M. Lokhorst *et al.*, "Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma," *N. Engl. J. Med.*, Aug. 2015.
- [238] P. Moreau *et al.*, "Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study," *Lancet*, vol. 394, no. 10192, pp. 29–38, 2019.
- [239] N. Parker, M. Schneegurt, A.-H. T. Tu, P. Lister, and B. M. Forster, "Adaptative specific host defense," in *Microbiology*, 2016, pp. 771–812.
- [240] R. W. Roberts and J. W. Szostak, "RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 23, pp. 12297–12302, 1997.
- [241] R. Odegrip *et al.*, "CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 9, pp. 2806–2810, 2004.
- [242] V. Tolmachev, A. Orlova, F. Y. Nilsson, J. Feldwisch, A. Wennborg, and L. Abrahmsén, "Affibody molecules: Potential for in vivo imaging of molecular targets for cancer therapy," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 7, no. 4, pp. 555–568, 2007.
- [243] R. Fu, L. Carroll, G. Yahiloglu, E. O. Aboagye, and P. W. Miller, "Antibody Fragment and Affibody ImmunoPET Imaging Agents: Radiolabelling Strategies and Applications," *ChemMedChem*, vol. 13, no. 23, pp. 2466–2478, 2018.
- [244] T. Hopp *et al.*, "A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification," *Nat. Biotechnol.*, vol. 6, pp. 1204–1210, 1988.

Titre : Développement et caractérisation préclinique d’Affitines anti-CD38 pour l’imagerie par tomographie par émission de positons du myélome multiple

Mots clés : Myélome multiple, CD38, Affitines, alternative aux anticorps, ciblage tumoral, tomographie émission de positons.

Résumé : Le myélome multiple représente 10% des hémopathies malignes et demeure encore aujourd'hui incurable malgré les progrès réalisés au cours des deux dernières décennies. Dans ce contexte, le développement de nouvelles stratégies de vectorisation constitue un axe de recherche majeur. Les anticorps sont les molécules les plus utilisées pour le ciblage moléculaire mais leurs caractéristiques pharmacocinétiques et structurales rendent leur usage non optimal pour des applications d'imagerie. Les Affitines sont des protéines d'affinité artificielle de faible poids moléculaire montrant une affinité et une spécificité comparables à celles des anticorps tout en présentant une stabilité accrue. Ces différentes caractéristiques font de ces protéines d'excellentes candidates à une utilisation en imagerie en alternative aux anticorps.

Le but de ce travail de thèse était donc d'investiguer l'intérêt de cette nouvelle classe de vecteur pour l'imagerie phénotypique du myélome multiple. La première partie de cette étude a été consacrée au développement et à la caractérisation d’Affitines spécifiques de CD38, une glycoprotéine surexprimée par les plasmocytes malins. Ce travail est toujours en cours et sera poursuivi par l'évaluation préclinique des Affitines anti-CD38 identifiées. La seconde partie du doctorat a été consacrée à une étude d'imagerie basée sur l'utilisation d'un anticorps anti-CD38 radiomarqué au cuivre 64. L'objectif principal de cette étude était d'apporter un premier éclairage sur le ciblage du CD38 pour l'imagerie et de servir de point de comparaison avec les études similaires qui seront menées avec les Affitines anti-CD38 générées.

Title : Development and preclinical characterization of anti-CD38 Affitins for positron emission tomography imaging of multiple myeloma

Keywords : Multiple myeloma, CD38, Affitins, antibodies alternatives, tumor targeting, positron emission tomography.

Abstract : Multiple myeloma accounts for 10% of hematological malignancies and still remains incurable despite medical progress. In this context, new targeting strategies represent a major step forward which can improve patient's diagnosis and therapeutic monitoring. Antibodies are the most widely used targeting molecules but their pharmacokinetic and structural characteristics make their use suboptimal for imaging applications. Affitins are artificial affinity proteins with low molecular weight that exhibit comparable affinity and specificity to those of antibodies while being highly stable. These different characteristics make Affitins excellent candidates for a use in imaging as an alternative to antibodies. The aim of this thesis was therefore to investigate

the interest of this new class of vector for phenotypic imaging of multiple myeloma. The first part of this work was devoted to the development and characterization of Affitins specific for CD38, a glycoprotein overexpressed by multiple myeloma cells. This study is still ongoing and will be followed by the preclinical evaluation of anti-CD38 Affitins. The second part of the thesis work was devoted to an imaging study based on the use of an anti-CD38 antibody radiolabelled with copper 64. The main objective of this study was to shed a first light on CD38 targeting for imaging and to serve as a point of comparison with similar studies that will be conducted with the anti-CD38 Affitins previously generated.