



HAL
open science

Développement et caractérisation de VHH anti-transferrine

Laure Deyme

► **To cite this version:**

Laure Deyme. Développement et caractérisation de VHH anti-transferrine. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01677755

HAL Id: dumas-01677755

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01677755>

Submitted on 8 Jan 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

PRESENTEE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA
FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

LE 20 DECEMBRE 2017

PAR

Laure DEYME

Née le 21 décembre 1992 à Marseille

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

TITRE :

**DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION DE
VHH ANTI-TRANSFERRINE**

JURY :

Président : Dr Joseph CICCOLINI, Aix-Marseille Université

Membres : Dr Florence GATTACCECA, Aix-Marseille Université

Dr Ghérici HASSAINE, Theranyx



27 Boulevard Jean Moulin – CS 30064 - 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. Philippe CHARPIOT, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	M. David BERGE-LEFRANC, M. François DEVRED, Mme Caroline DUCROS, Mme Pascale BARBIER
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Jean-Pierre REYNIER
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Jacques BARBE, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Sandrine NOURIAN
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Myriam TORRE

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
NUTRITION ET DIETETIQUE	M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE	M. Jérémy MAGALON
--------------------------------	-------------------

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Caroline MONTET
---------	---------------------

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Philippe CHARPIOT
BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN Mme Florence SABATIER-MALATERRE
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Nathalie BARDIN Mme Dominique ARNOUX Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Sylvie COINTE
----------------------------	-------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Henri PORTUGAL Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

PROFESSEURS ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (P.A.S.T.)

GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE M. Jean-Pierre CALISSI

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE Mme Anne FAVEL
Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION Mme Elisabeth SCHREIBER-DETURMENY
Mme Catherine DEFOORT
M. Alain NICOLAY
Mme Estelle WOLFF
Mme Elise LOMBARD

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES M. David BERGE-LEFRANC
M. Pierre REBOUILLON

CHIMIE THERAPEUTIQUE Mme Catherine DIANA
Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT
Mme Caroline DUCROS
M. Marc MONTANA

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE
HYDROLOGIE M. Armand GELLIS
M. Christophe CURTI
Mme Julie BROGGI
M. Nicolas PRIMAS
M. Cédric SPITZ
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE M. Riad ELIAS
Mme Valérie MAHIOU-LEDDET
Mme Sok Siya BUN
Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES M. Thierry ATHUYT

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE M. Marc LAMBERT

DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE
ET GESTION DE LA PHARMAFAC M. Philippe BESSON

AHU

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE Mme Manon ROCHE

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE Mme Camille DESGROUAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Athanassios ILIADIS
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	Mme Suzanne MOUTERDE-MONJANEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Hot BUN M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD M. Stéphane HONORÉ Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACODYNAMIE	M. Philippe GARRIGUE
-----------------	----------------------

ATER

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlel BOUHLEL
-----------------	---

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE
--

Mme Nathalie AUSIAS, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Gérard CARLES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Christine PENOT-RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Alain RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

Mise à jour le 1^{er} décembre 2015

'L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.'

Remerciements

À mon jury de thèse :

À mon président de jury de thèse, **Dr Joseph Ciccolini**,

Je tiens, tout d'abord, à vous remercier d'avoir su me donner goût à la pharmacocinétique par votre dynamisme, de m'avoir accompagnée depuis ma quatrième année dans le choix de mes stages, de mon master, de ma thèse de pharmacie et de continuer à me supporter pour les trois prochaines années grâce à l'obtention du financement pour ma thèse de sciences. Je vous remercie, également, pour toute la confiance que vous m'avez accordée.

À mon directeur de thèse, **Dr Florence Gattacceca**,

Je tiens à vous remercier pour les enseignements en modélisation que vous nous avez transmis lors du master 2, de m'avoir permis de comprendre l'intérêt de cette discipline et m'avoir donné envie de continuer avec une thèse de sciences dans ce domaine. Je vous remercie, également, d'avoir accepté de m'encadrer pour ces trois prochaines années dans mon projet de thèse. Je suis reconnaissante d'avoir l'occasion de poursuivre cette aventure avec vous.

Au **Dr Ghérici Hassaine**,

Je tiens, tout d'abord, à vous remercier d'avoir accepté d'être présent aujourd'hui dans mon jury de thèse. Je vous remercie, également, de m'avoir accepté au sein de Theranyx, confié cet intéressant projet scientifique et accordé une réelle confiance, mais aussi pour vos conseils, votre aide et votre disponibilité tout au long de mon stage.

J'adresse, également, tous mes remerciements **à tous les membres du laboratoire SMARTc** pour m'avoir permis de réaliser et d'avoir participé aux études *in vivo* de ce projet, notamment Raphaëlle Fanciullino, Sarah et Anne. Mais je remercie également toutes les personnes de ce labo de m'accueillir avec tant de bonne humeur et j'espère passer de très bons moments avec vous pendant ces trois prochaines années.

Je remercie **l'ensemble de Theranyx**, et notamment Asma, Jaime, Gérald, Lamia et Thierry, pour votre accompagnement, votre aide, vos enseignements scientifiques et vos encouragements tout au long de mon stage au sein de votre start-up.

Je remercie, **Romain et Lucile**, d'avoir relu avec attention cette thèse, grâce à vous mon jury s'étouffera un peu moins avec les fautes d'orthographe et la longueur des phrases.

Je dédie cette thèse :

À **mes parents**, ma doudou, mon papou, tant de raisons de vous remercier... Vous êtes à mes yeux exceptionnels, je vous remercie infiniment de me soutenir, de m'accompagner, et de me rassurer au quotidien. Si j'en suis là aujourd'hui c'est grâce à vous, alors merci d'avoir su me donner les moyens de réussir. Je vous aime.

À **mon frère**, Raph, merci d'être un grand frère, de me conseiller et de me pousser à avancer.

À **ma grand-mère**, Mamie Fafa, pendant toutes ces années tu as été là pour moi alors merci, merci pour tout, merci d'être une grand-mère aussi parfaite, je t'embrasse fort.

À **Hanitra et Lucile**, merci de m'accompagner de partout, de me rassurer tout le temps et merci pour cette belle amitié.

À **Lamia, ma binôme**, sans toi ces années pharma n'auraient pas été les mêmes, merci pour tous ces TP, ces rires et les stress pré-exam partagés.

Table des matières

Liste des figures et tableaux.....	15
Liste des abréviations	17
Introduction	19
REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	19
<i>Des anticorps aux VHH.....</i>	<i>19</i>
1. Les immunoglobulines	19
1.1. Historique des anticorps	19
1.2. Les immunoglobulines	19
1.3. Les immunoglobulines G	20
2. Les anticorps monoclonaux en thérapeutique	21
3. Les fragments d'anticorps	23
3.1. Les fragments Fab, (Fab') ₂ , scFv et le simple domaine V	23
3.2. Multimérisation des fragments	24
4. Les anticorps à chaînes lourdes des poissons cartilagineux et leur	
domaine variable	25
5. Les anticorps à chaînes lourdes de camélidé.....	25
6. Le domaine variable des anticorps à chaînes lourdes, VHH.....	26
6.1. Structure	26
6.2. Propriétés	28
6.3. Applications	29
<i>La transferrine et ses récepteurs</i>	<i>32</i>
1. La transferrine	32
1.1. Le fer.....	32
1.2. Structure et propriétés de la transferrine	32
1.3. Le transport transmembranaire du fer	32
1.4. Le passage de la barrière hémato-encéphalique du fer	33
2. Les récepteurs de la transferrine	34
3. La transferrine et ses récepteurs, cible thérapeutique.....	35
3.1. En oncologie.....	35

3.2. Sphère neuro-cérébrale	37
TRAVAUX PERSONNELS	39
Objectifs	39
Matériels et méthodes	39
1.Immunisation des lamas et construction de la banque de VHH.....	39
2. Sélection par « phage display » et phages ELISA	41
3. Test ELISA protéine-protéine	42
4. Sous-clonage des VHH anti-transferrine	43
4.1. Sous clonage dans le plasmide, pET23 NN sfGFP	43
5. Production et purification des VHH anti-transferrine	45
6. Marquage des VHH avec des fluorophores	45
7. Culture cellulaire	46
7.1. Conditions de culture et lignées cellulaires	46
7.2. Lignée stable PANC1 – mCherry	46
8. Détermination de la constante d’affinité à l’équilibre par	
thermophorèse à micro-échelle	47
9. Cytométrie en flux.....	50
9.1. Principe général.....	50
9.2. Détermination de l’expression du récepteur de la transferrine sur les différentes	
lignées cellulaires.....	51
9.3. Analyse de l’interaction VHH – transferrine sur cellules par cytométrie en flux.....	51
10. Microscopie confocale.....	51
11. Etude in vivo du VHH D10-sfGFP et du VHH C3-sfGFP.....	52
12. Etude de la demi-vie du VHH D10	52
12.1. Administration	52
12.2. Suivi <i>in vivo</i> du VHH D10 et de la GFP par imagerie à fluorescence	53
13. Etude de la biodistribution du VHH C3.....	54
13.1. Xénogreffe de cellules PANC1	54
13.2. Administration	54
13.3. Suivi <i>in vivo</i> du VHH D10 et de la GFP par imagerie à fluorescence	54

Résultats	56
1.Immunisation, construction de la banque et sélection	56
1.1. Sélection A, 2 tours sur transferrine humaine (hTf).....	57
1.2. Sélection B, 3 tours : tours 1 et 2 sur transferrine de souris (mTf) et tour 3 sur transferrine humaine (hTf)	58
2.Test ELISA protéine-protéine.....	59
2.1. VHH issus de la sélection A	59
2.2. VHH issus de la sélection B.....	60
3.Détermination de l'expression du récepteur de la transferrine sur les différentes lignées cellulaires	62
4.Etude in vitro des VHH liés à la superfolder Green Fluorescent Protein	63
4.1 Détermination des constantes de dissociation par thermophorèse à micro-échelle	63
4.2 Etude de l'interaction transferrine-VHH GFP sur la lignée PANC1	64
5. Etude in vitro des VHH Cystéine C-terminal	68
5.1 Marquage des VHH.....	68
5.2 Caractérisation des VHH par cytométrie en flux.....	68
6. Etude in vivo du VHH D10 lié à la superfolder Green Fluorescent Protein	69
6.1 Etude de la cinétique du VHH D10 GFP après administration intrapéritonéale.....	69
7. Etude in vivo de la biodistribution VHH C3 lié à la superfolder Green Fluorescent Protein.....	72
7.1 Au niveau tumoral.....	72
7.2 Au niveau cérébral.....	73
7.3 Région rate/foie/estomac.....	74
Conclusion et perspectives.....	76
Références.....	79
Liste des annexes	89
Annexes	90
Serment de Galien	102

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Structure d'une immunoglobuline G.

Figure 2 : Structure des 4 types d'anticorps monoclonaux sur le marché pharmaceutique

Figure 3 : Représentation d'un immunoconjugué ou ADC.

Figure 4 : Représentation schématique des différents formats d'anticorps.

Figure 5 : (A) Structures des différents types d'anticorps de camélidé. (B) Les séquences des VH et des VHH et leur structure repliée simplifiée.

Figure 6 : Répartition des VHH en fonction de leur domaine d'utilisation.

Figure 7 : Schéma présentant le passage transmembranaire du fer et le recyclage de la transferrine.

Figure 8 : Schéma présentant les deux hypothèses des modèles de transport du fer à travers la BHE.

Figure 9 : Schéma présentant les différentes stratégies ciblant le RTf en recherche dans les traitements anti-cancéreux.

Figure 10 : Plasmide contenant la séquence de VHH (bleu) et la superfolder Green Fluorescent Protein.

Figure 11 : Schéma explicatif d'un clonage indépendant de la ligase.

Figure 12 : Principe de la thermophorèse à micro-échelle.

Figure 13 : Principe de la cytométrie en flux.

Figure 14 : Les 14 images obtenues lors d'une acquisition après séparation spectrale en mode automatique avec l'IVIS® spectrum et le logiciel Living Image 4.2.

Figure 15 : Sélection des 4 ROI : tumeur, cerveau, rate/foie et corps dans sa totalité avec le logiciel Living Image 4.2 (Perkin Elmer).

Figure 16 : Schéma des résultats de l'immunisation, construction de la banque, production, sélection sur transferrine humaine et phage ELISA.

Figure 17 : Séquences des 19 VHH différents issus de la sélection A.

Figure 18 : SDS Page des extraits périplasmiques contenant VHH issus de la sélection A.

Figure 19 : SDS Page des extraits périplasmiques contenant VHH issus de la sélection B.

Figure 20 : Détermination de l'expression des récepteurs de la transferrine par les lignées cellulaires.

Figure 21 : Détermination des constantes de dissociation (Kd) par thermophorèse à micro-échelle des VHH fusionnés à la GFP pour la transferrine humaine.

Figure 22 : Caractérisation des VHH anti-transferrine fusion GFP en présence de transferrine sur la lignée PANC1 par cytométrie en flux.

Figure 23 : Etude de compétition pour caractériser les VHH anti-transferrine E2, F11 et D10 en présence de transferrine sur la lignée PANC1 par cytométrie en flux.

Figure 24 : Etude pour caractériser le VHH anti-transferrine D10 en présence de transferrine de souris sur les lignées B16F10 (à gauche) et K562 (à droite) par cytométrie en flux.

Figure 25 : Image de microscopie confocale du VHH C3 lié à la GFP sur les cellules PANC1.

Figure 26 : Caractérisation des VHH anti-transferrine E9 et D10 marqué par de l'Alexa fluor® 647 maleimide en présence de transferrine sur la lignée PANC1 par cytométrie en flux.

Figure 27 : Détermination graphique de la demi-vie du VHH D10 GFP après administration IP.

Figure 28 : Détermination graphique de la demi-vie du VHH D10 GFP après administration IV.

Figure 29 : Absorption relative (%) au niveau tumoral du VHH C3 en présence de hTf (en rouge) et sans hTf (en bleu).

Figure 30 : Absorption relative (%) au niveau cérébral du VHH C3 en présence de hTf (en rouge) et sans hTf (en bleu).

Figure 31 : Absorption relative (%) au niveau de la région rate/foie/estomac du VHH C3 en présence de hTf (en rouge) et sans hTf (en bleu).

Figure 32 : **A gauche**, schéma d'un système d'imagerie *in vivo* par fluorescence. **A droite**, images comparant la pénétration tissulaire avec un laser de 640 nm et un laser de 525 nm, longueur d'onde d'émission de la GFP.

Figure 33 : **A gauche**, spectres d'excitations et d'émissions de différents fluorophores et spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine. **A droite**, images comparant l'autofluorescence observée à une longueur d'onde de 550 nm (proche de la GFP) et à une longueur d'onde dans le proche infra-rouge, 840 nm.

Tableau 1 : Les applications médicales des VHH.

Tableau 2 : Phage ELISA à partir des phages de la sélection A (2 tours sur transferrine hTf).

Tableau 3 : Phage ELISA à partir des phages de la sélection B. (3 tours, 1^{er} et 2^{ème} sur mTf et 3^{ème} sur hTf)

Tableau 4 : ELISA avec extraits périsplasmiques de la sélection A.

Tableau 5 : ELISA avec les extraits périsplasmiques de la sélection B. (3 tours, 1^{er} et 2^{ème} sur mTf et 3^{ème} sur hTf)

Tableau 6 : Résumé de l'étude de biodistribution du VHH C3 en présence ou non d'hTf

Liste des abréviations

2YT : 2x yeast extract tryptone
Ac : Anticorps
ADC : *antibody-drug-conjugate*
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
Alexa C 647 : Alexa 647 maleimide
Amp : ampicilline
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
BHE : barrière hémato-encéphalique
BSA : sérum d'albumine bovine
CDR : *complementary determining region*
CH : *constant heavy*
CL : *constant light*
Chloram : chloramphenicol
dCTP : desoxycytosine triphosphate
dGTP : dexoguanosine triphosphate
DMEM/F12 : *Dulbecco's modified Eagle's medium : nutrient mixture F-12*
DMT1 : *Divalent Metal Transporter 1*
DO : densité optique
DPBS : *Dulbecco's phosphate-buffered saline*
ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*
EMEA : *European Medicine Agency*
Fab : fragment de liaison à l'antigène
Fc : fragment constant
FR : *framework region*
GFP : *green fluorescent protein*
Glu : glucose
H : *heavy*, lourd
HCAb : *heavy chain antibody*
HCl : acide chlorydrique
HRP : *horseradish peroxidase*
hTf : transferrine humaine
Ig : immunoglobuline
IgNAR : nouveau récepteur d'antigène
IP : intrapéritonéal
IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IR : infrarouge
IV : intraveineuse
Kana : kanamycine

Kd : constante de dissociation à l'équilibre
L : légère
LBAgar : Luria-Bertani Agar
LIC : *ligase independant cloning*
MEM : *minimum essential media*
MST : thermophorèse à micro-échelle
mTf : transferrine de souris
NaCl : chlorure de sodium
NaHCO₃ : bicarbonate de sodium
NHS ester : ester succinimidylique
Ni-NTA : nickel nitrilotriacétique
o.n. : *over night*, sur la nuit
PBS : *phosphate-buffered saline*
PCR : *polymerase chain reaction*
PEG : polyethylene glycol
PM : poids moléculaire
RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*
RT : température ambiante, *room temperature*
RT-PCR : *reverse transcription- polymerase chain reaction*
RTf1 : récepteur 1 de la transferrine
RTf2 : récepteur 2 de la transferrine
scFv : *single chain Fv*
SDS Page : gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium
sfGFP : *superfolder green fluorescent protein*
SVF : sérum de veau fœtal
Tf : transferrine
TNF- α : *tumor necrosis factor α*
UKCCR : comité de coordination britannique de recherche contre le cancer
VH : *variable heavy*
VHH : *variable fragments of heavy chain antibodies*
VL : *variable light*
VNAR : domaine variable des IgNAR

Introduction

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Des anticorps aux VHH

1. Les immunoglobulines

1.1. Historique des anticorps

En 1890, Emil von Behring et Shibasabro Kitasato ont découvert des substances sériques neutralisant les toxines diphtériques (Behring 1890). Quelques années plus tard, en 1900, Paul Ehrlich a émis l'hypothèse de la formation d'anticorps constitués de multiples sites interagissant avec des composés étrangers, aujourd'hui appelés antigènes. En 1948, Astrid Fagraeus a découvert que les lymphocytes B produisent les anticorps (Fagraeus 1948). En 1972, Gerald Edelman et Rodney Porter ont obtenu le prix Nobel de physiologie et médecine pour leurs travaux sur la structure chimique des anticorps (Porter 1959; Edelman et al. 1961). En 1973, la première structure atomique d'un anticorps a été publiée (Inbar, Hochman, and Givol 1972). En 1975, Milstein et Köhler ont développé des cellules hybrides, hybridomes, afin de produire des anticorps monoclonaux. En 1998, le premier anticorps monoclonal, Rituximab (MabThera®, Roche), est rentré sur le marché pharmaceutique européen.

1.2. Les immunoglobulines

Les immunoglobulines (Ig), également appelées anticorps, sont des glycoprotéines solubles sécrétées par les plasmocytes, dernier stade de différenciation des lymphocytes B. Les Ig ont la capacité de reconnaître un antigène et de déclencher une réponse immunitaire. La famille des Ig est divisée en 5 classes (IgA, IgD, IgE, IgG et IgM). Chaque classe présente ses propres caractéristiques : localisation, fonction, demi-vie... (Schroeder and Cavacini 2010)

1.3. Les immunoglobulines G

Les IgG sont les Ig les plus abondantes dans l'organisme. Elles sont constituées de deux chaînes lourdes (H, *heavy*) identiques de 55 kDa et de deux chaînes légères (L, *light*) identiques de 24 kDa. Les chaînes lourdes possèdent 3 parties constantes (CH1, CH2, CH3) et 1 partie variable (VH). Les chaînes légères possèdent 1 partie constante (CL) et 1 partie variable (VL). Chaque partie variable, VH et VL, se situe en position N-terminale et possède 3 séquences de 5 à 10 résidus où la variabilité est maximum, CDR (*complementary determining region*), responsable de la complémentarité avec l'épitope de l'antigène. La molécule d'IgG est hydrolysable en deux fractions par la papaïne : le fragment de liaison à l'antigène (Fab) constitué des domaines CH1, CL1, VH et VL et le fragment constant (Fc) constitué des domaines CH3 et CH4, cette dernière est impliquée dans les fonctions effectrices des Ig ou dans le recrutement de cellules immunitaires. (Stanfield and Wilson 2015; Joosten et al. 2003; Padlan 1994) (Figure 1)

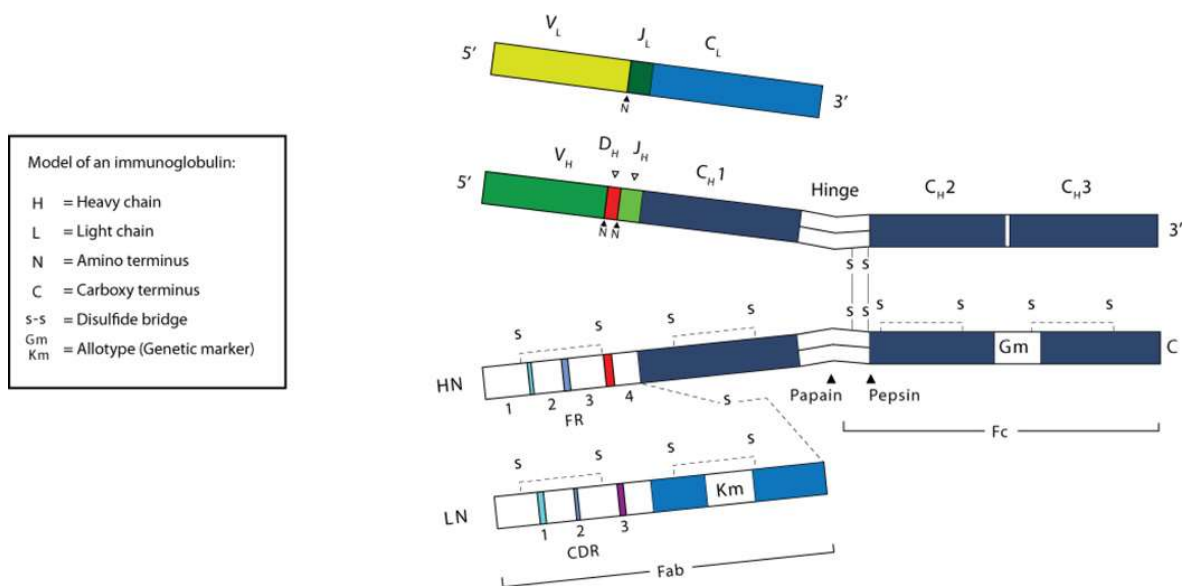


Figure 1 : Structure d'une immunoglobuline G. (Schroeder and Cavacini 2010)

2. Les anticorps monoclonaux en thérapeutique

À partir des travaux menés par Milstein et Köhler en 1975 sur les techniques de production d'anticorps monoclonaux (hybridome), beaucoup d'espairs ont été portés sur les anticorps pour une utilisation en thérapeutique et en imagerie. En effet, les anticorps monoclonaux sont stables, se fixent avec une grande spécificité et une bonne affinité à un certain nombre de molécules, d'autre part leur production est massive et constante. De plus, les avancées en biologie moléculaire dans les années 2000, ont permis d'obtenir des anticorps recombinants à partir de diverses lignées cellulaires de manière reproductible et stable (Hoogenboom and Chames 2000).

Les premiers anticorps développés étaient des anticorps murins mais afin de réduire l'immunogénicité des anticorps et de pouvoir les utiliser plus facilement en thérapeutique, des anticorps chimériques, des anticorps humanisés puis des anticorps humains ont été développés (Figure 2). À l'heure actuelle, les anticorps murins ne sont plus commercialisés du fait d'une forte immunogénicité et d'une faible demi-vie.

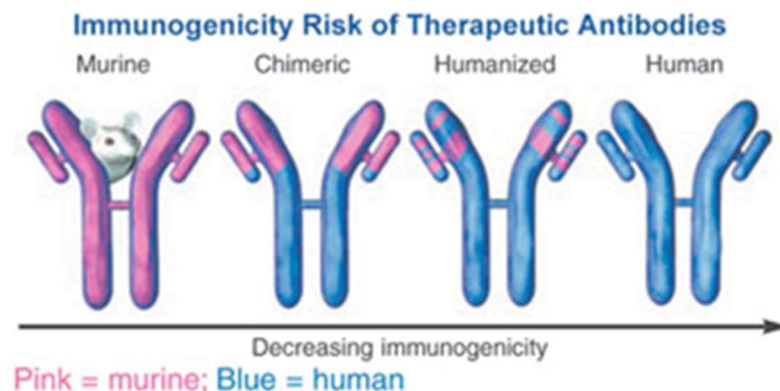


Figure 2 : Structure des 4 types d'anticorps monoclonaux sur le marché pharmaceutique. De gauche à droite, par ordre décroissant d'immunogénicité : l'anticorps murin, l'anticorps chimérique, l'anticorps humanisé, l'anticorps humain. ("Human Abs" n.d.)

Les anticorps chimériques sont des anticorps à 70% humains. Les parties variables murines des chaînes légères et des chaînes lourdes (VL et VH) sont greffées aux domaines constants humains. Plusieurs anticorps chimériques ont été approuvés par l'*European Medicine Agency* (EMA) : Rituximab et Cetuximab en oncologie ; Basiliximab contre les rejets de greffe ; Infliximab dans les maladies auto-immunes (maladie de Crohn et polyarthrite rhumatoïde). Ces anticorps sont moins immunogènes et permettent de mieux

interagir avec les fonctions effectrices et le complément du système immunitaire humain que les anticorps murins.

Les anticorps humanisés sont des anticorps à 85-90% humains, les CDR murins des parties variables sont greffées sur une immunoglobuline humaine. Ces anticorps sont mieux tolérés par l'organisme humain, l'immunogénicité est plus faible que celle des anticorps précédemment décrits, par conséquent leur demi-vie est plus longue. Le Trastuzumab, prescrit dans le cancer du sein, est un anticorps humanisé.

Le développement d'une technique de souris génétiquement modifiée a permis de produire des anticorps humains (Lonberg 2008). Plusieurs anticorps humains sont sur le marché tel que Adalimumab, un anti-inflammatoire prescrit dans certaines maladies auto-immunes.

Actuellement, 22 anticorps monoclonaux sont commercialisés en thérapeutique, principalement avec une indication en oncologie ou dans les maladies auto-immunes. Cependant, des difficultés subsistent : le coût de production très élevé dû à la complexité de la molécule, un poids moléculaire très élevé et une faible pénétration tissulaire, ce qui a conduit à s'intéresser aux fragments d'anticorps.

De plus, le mécanisme d'action cytotoxique complexe, mené par la fraction Fc de l'anticorps, activation du complément ou recrutement de cellules effectrices, peut être présent *in vitro* mais non retrouvé *in vivo*. La fraction Fc présente donc un rôle majeur mais est une difficulté à la production d'anticorps monoclonaux en thérapeutique.

Par conséquent, les chercheurs se sont intéressés à cette fraction Fc afin d'améliorer la demi-vie (Magdelaine-Beuzelin, Ohresser, and Watier, n.d.) et l'efficacité des anticorps (Desjarlais et al. 2007; Nechansky et al. 2007). En effet, plusieurs travaux de mutagenèse ont été menés pour augmenter ou diminuer l'affinité de cette fraction à différents récepteurs Fc. Notamment l'affinité à pH acide de Fc au FcRn (*neonatal Fc receptor*) a été augmentée afin d'améliorer la demi-vie des anticorps.

D'autre part, les immunoconjugués ou *Antibody Drug Conjugates* (ADC) sont une classe thérapeutique innovante qui connaît un grand essor, ces dernières années dans le domaine de la thérapie ciblée en oncologie. Un ADC est constitué d'un anticorps monoclonal

lié (par un linker) à un composé toxique. Cette nouvelle classe combine la sélectivité des thérapies ciblées avec l'anticorps monoclonal et la cytotoxicité des chimiothérapies et permet ainsi d'augmenter l'efficacité, tout en diminuant la toxicité. À l'heure actuelle, deux ADC sont sur le marché : Kadcylla® (T-DM1, Roche, Genentech) et Adcetris® (Brentuximab vedotin, Seattle Genetics). La première spécialité est la combinaison de trastuzumab et emtansine indiqué dans le cancer du sein HER2 positif. La seconde est la conjugaison de brentuximab à la védotine, cet ADC est indiqué dans le lymphome hodgkinien CD30 positif et le lymphome anaplasique à grandes cellules systémique. Un grand nombre d'ADC sont, actuellement, en phase clinique et les premiers résultats semblent très prometteurs. (Bakhtiar 2016)

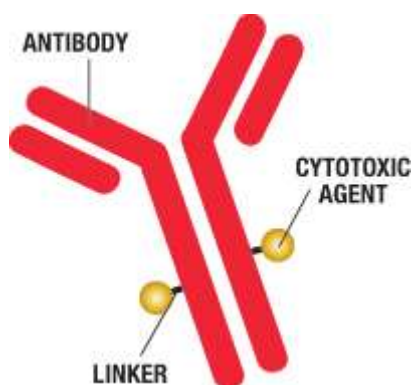


Figure 3 : Représentation d'un immunoconjugé ou ADC. (*"Antibody-Drug Conjugates | Baxter BioPharma Solutions" n.d.*)

3. Les fragments d'anticorps

3.1. Les fragments Fab, (Fab')₂, scFv et le simple domaine V

Les fragments Fab et (Fab')₂ sont obtenus par la protéolyse enzymatique de la pepsine ou la papaïne. Les scFv (*single chain Fv*) sont obtenus par ingénierie moléculaire, ils sont constitués d'un domaine VL et d'un domaine VH reliés par une chaîne polypeptidique flexible comprenant un grand nombre de composés sérines et glycines (Huston et al. 1988). Les fragments Fab (55kDa), (Fab')₂ (110kDa) et scFv (25-30kDa) contiennent les domaines VH et VL et ainsi conservent leur spécificité, monovalence et une affinité de fixation à l'antigène comparable à celle de l'anticorps parent (Figure 3). De plus,

de par leur PM, ces fragments ont une meilleure pénétration tissulaire que les anticorps monoclonaux.

Le simple domaine variable (VH ou VL) des immunoglobulines conventionnelles perd son affinité, est très peu soluble et a tendance à s'agréger lorsqu'il est tout seul.

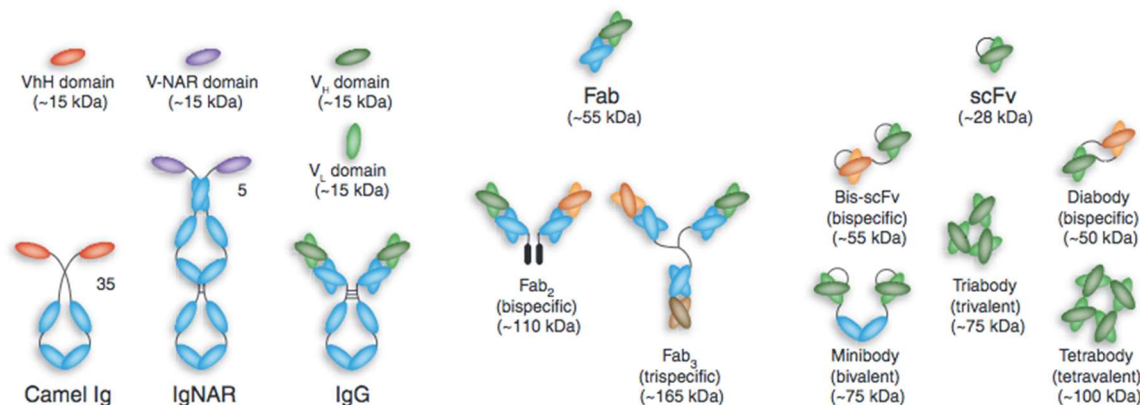


Figure 4 : Représentation schématique des différents formats d'anticorps. (Holliger and Hudson 2005) De gauche à droite, domaine VHH : partie variable d'une Ig à chaînes lourdes de camélidé (HCAb) en haut, HCAb en bas ; domaine VNAR : partie variable d'un nouveau récepteur d'antigène (IgNAR) en haut, IgVNAR en bas ; simples domaines variables VH et VL d'une IgG en haut, IgG en bas ; fragment Fab ; fragments multimères : fragment avec deux fragments Fab différents, (Fab')₂ bispécifique ; Fab₃, trispécifique ; fragment scFv et ses multimères : bis-scFv, diabody, minibody, triabody, tetrabody.

Les domaines variables de deux types d'anticorps dépourvus de chaînes légères ont montré conserver leur affinité, et restent solubles. Il s'agit des domaines variables des anticorps à chaînes lourdes des camélidés (VHH) et des poissons cartilagineux (VNAR) (Figure 3). (Holliger and Hudson 2005; Ma and O'Kennedy 2015)

3.2. Multimérisation des fragments

Dans les systèmes biologiques, les fragments d'anticorps se dissocient très rapidement de leur cible et ont une demi-vie très courte malgré une haute affinité à l'antigène. La multimérisation des fragments Fab, scFv et domaine VH permet d'augmenter significativement l'affinité fonctionnelle en termes d'avidité, tout en diminuant considérablement le temps de dissociation. Différents types de multimérisation ont été développés, deux VH et VL identiques : diabody bivalent, deux VH et VL différents : diabody bispécifique, trois ou quatre entités VH et VL identiques : triabody, tetrabody (Figure 3)... (Holliger and Hudson 2005)

4. Les anticorps à chaînes lourdes des poissons cartilagineux et leur domaine variable

En 1995, Flajnik et son équipe ont décrit pour la première fois un nouveau récepteur d'antigène (*New Antigen Receptor*, IgNAR) provenant des poissons cartilagineux (Greenberg et al. 1995). Ces IgNAR ont été retrouvés chez certains poissons cartilagineux : requins nourrices (*Ginglymostoma cirratum*), requins tapis (*Orectolobus maculatus*), et aiguillats communs (*Squalus acanthias* et *Mustelus canis*). Ils ont une structure homodimerique constituée d'un domaine variable (VNAR) d'environ 13 kDa, de 5 domaines constants et ne sont pas associés à des chaînes légères. Il existe différents types de VNAR en fonction du nombre et des motifs des ponts disulfures, ce qui confère des nouvelles structures aux boucles de liaison à l'antigène et par conséquent des possibilités supplémentaires par rapport aux anticorps conventionnels. (Simon Krahl, Christian Schröter, Stefan Zielonka, Martin Empting, Bernhard and Valldorf & Harald Kolmar, n.d.)

5. Les anticorps à chaînes lourdes de camélidé

En 1993, Hamers-Casterman a découvert, dans le sérum des camélidés, la présence d'anticorps différents des anticorps conventionnels retrouvés chez les mammifères. La particularité de ces anticorps est qu'ils sont dépourvus de chaînes légères, ils ont donc été nommés anticorps à chaînes lourdes (HCAb, *Heavy Chain Antibody*). Les HCAb ont un poids moléculaire d'environ 95 kDa alors que celui des IgG est d'environ 160 kDa. Ils sont constitués de deux chaînes à 3 domaines : 2 constants CH2 et CH3, 1 variable VHH en position N-terminal (Figure 4). Le domaine VHH est l'équivalent structurellement et fonctionnellement du fragment de liaison à l'antigène des anticorps conventionnels. Le domaine CH1, présent dans les anticorps conventionnels, est fortement impliqué dans la liaison chaîne lourde-chaîne légère par un pont disulfure. Une mutation au niveau du gène de celui-ci peut expliquer l'absence de CH1 et l'absence de chaînes légères. (Hamers-Casterman et al. 1993; Joosten et al. 2003)

La famille biologique des camélidés comprend les chameaux (*Camelus bactrianus*), les dromadaires (*Camelus dromedarius*), les lamas (*Lama glama* et *Lama guanicoe*), les vicognes (*Vicugna vicugna* et *Vicugna pacos*). Les camélidés sont la seule famille possédant des anticorps à chaînes lourdes fonctionnels (Serge Muyldermans 2013) mais la proportion d'anticorps à chaînes lourdes, parmi l'ensemble des anticorps, varie selon l'espèce : le sérum

des lamas en contient moins de 45%, celui des dromadaires environ 50% (Hamers-Casterman et al. 1993) et celui des chameaux 75% (van der Linden et al. 2000). Chez l'Homme des anticorps sans chaîne légère ont déjà été observés suite à une délétion génétique du CH1 et d'une partie du VH mais ces anticorps ne reconnaissent pas d'antigène (Cogné, Preud'homme, and Guglielmi 1989).

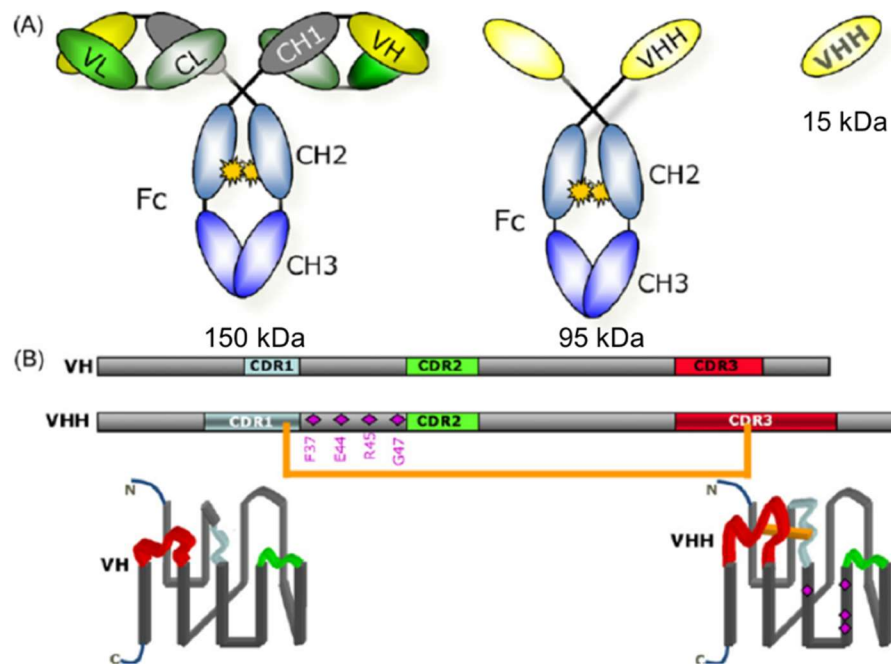


Figure 5 : (A) Structures des différents types d'anticorps de caméléidé. À gauche, la structure d'un Ac conventionnel ; au centre : un Ac « chaînes lourdes » ; à droite, un VHH. (B) Les séquences des VH et des VHH et leur structure repliée simplifiée. Représentation des 3 CDR en bleu, vert et rouge. Représentation des FR en gris. Les losanges violets du FR-2 : 4 principales mutations différenciant VH des VHH. En orange, le pont disulfure liant le CDR1 au CDR3 dû aux mutations cystéines. (S. Muyldermans et al. 2009)

6. Le domaine variable des anticorps à chaînes lourdes, VHH

6.1. Structure

Le domaine variable des anticorps à chaînes lourdes (VHH ou nanobody®) est constitué de 118 à 136 acides aminés soit environ 15 kDa, ce qui représente 1/10 d'un anticorps conventionnel. Il comporte 3 séquences hypervariables (CDR) comme le domaine variable des anticorps conventionnels. (S. Muyldermans et al. 2009)

Le domaine variable comprend 2 feuillets β de 4 et 5 brins β connectés par des boucles et un pont disulfure. Dans cette structure, les CDR sont localisés dans les boucles et les 4 *framework regions* (FR) dans les brins β . (Serge Muyldermans 2013)

Les gènes de camélidé des fragments VH et VHH présentent une grande similitude mais aussi quelques différences, ce qui permet aux VHH de fixer un épitope sous forme d'un seul domaine (Conrath et al. 2003).

Notamment, 4 substitutions caractéristiques au sein du FR 2 des VHH : phénylalanine en position 37, acide glutamique en 44, arginine en 45 et glycine en 47. Les 4 substitutions caractéristiques du FR 2 rendent les VHH plus hydrosolubles que les VH et empêchent leur liaison avec le domaine VL (Desmyter et al. 1996; Kastelic et al. 2009). De plus, ces acides aminés permettent de diminuer l'agrégation des domaines variables des HCAb en absence de VL.

La deuxième différence majeure entre VH et VHH réside dans les boucles CDR1 et CRD3. Ces deux boucles sont plus étendues dans les VHH, ce qui fournit un espace d'interaction suffisant avec l'antigène : 600 à 800 Å, équivalent à l'espace d'interaction des 6 boucles des domaines VH et VL des anticorps conventionnels (De Meyer, Muyldermans, and Depicker 2014).

Par ailleurs, les VHH présentent des cystéines supplémentaires, principalement au niveau des boucles des CDR 1 et CDR 3 ou entre CDR 2 et CDR 3, qui forment un pont disulfure inter-boucle, ou encore entre CDR3 et le FR2. Ce pont disulfure supplémentaire permet d'optimiser la conformation tridimensionnelle du VHH pour une forte interaction avec l'antigène (Wang et al. 2016) (Figure I.2.)

La diversité des VHH réside principalement dans la longue boucle du CDR 3 (Vu et al. 1997), cette boucle est souvent plus courte chez les lamas que chez les dromadaires.

D'autre part, le VHH présente quelques différences par rapport au VNAR. Tout d'abord, le VNAR contient une délétion au niveau de FR2-CDR2, ce qui réduit son nombre de brins β à 8 et ainsi réduit son PM. Du fait de cette délétion, le VNAR contient seulement deux CDR : CDR 1 et 3.

6.2. Propriétés (Serge Muyldermans 2013)

Un VHH a la capacité de reconnaître un épitope unique et est codé par un seul exon. Lors de son clonage celui-ci n'est, par conséquent, pas modifié et conserve son affinité contrairement aux scFv qui nécessitent l'assemblage de plusieurs exons provenant des domaines VH et VL. L'affinité des VHH est par conséquent très bonne, leur coefficient de dissociation est de l'ordre du nanomolaire ou même picomolaire. De plus, cette affinité peut être améliorée en dimérisant ou multimérisant les VHH. Par ailleurs, de par la structure de leur paratope, les VHH ont tendance à se lier avec des épitopes de forme concave (tel que les sites catalytiques des enzymes) qui ne sont pas toujours accessibles aux anticorps conventionnels (Lauwereys et al. 1998; De Genst et al. 2006).

L'expression des VHH a un bon rendement et peut se faire avec un système procaryote (Arbabi-Ghahroudi, Tanha, and MacKenzie 2005), un système eucaryote (Frenken et al. 1998), les levures (Frenken et al. 2000) ou des plantes (Ismaili et al. 2007). Dans le cas du système procaryote, un peptide signal ajouté par ingénierie moléculaire permet de sécréter le VHH dans le périplasma qui contient les conditions oxydantes nécessaire à la formation des ponts disulfures des VHH.

Les VHH sont des protéines très stables, ils conservent leur capacité à reconnaître un antigène pendant plusieurs mois à 4°C et bien plus longtemps à -20°C, ils semblent même supporter plusieurs semaines à 37°C. La dénaturation des VHH est observée, en général, aux alentours de 60-80°C.

De plus, les VHH peuvent être fortement stabilisés par ajout de deux cystéines à deux positions précises permettant la stabilisation de la structure du VHH et empêchant sa dénaturation par la pepsine et la chymotrypsine. L'ajout de ce pont disulfure pourrait par conséquent permettre aux VHH d'être administrés par voie orale.

Par ailleurs, les VHH sont également très résistants dans certaines conditions chimiques notamment en présence de détergent et de dénaturant, mais également à des taux élevés d'urée.

Les VHH semblent être très faiblement immunogène, ceci s'explique notamment de par leur petite taille, à la ressemblance des VHH aux VH, leur faible demi-vie et leur grande

stabilité. Néanmoins, une équipe a cherché à humaniser les VHH en modifiant les 12 acides aminés qui diffèrent entre les deux espèces (Vincke et al. 2009).

De par leur taille, les VHH sont éliminés rapidement par voie rénale, leur demi-vie est de l'ordre de 15min à 1h.

6.3. Applications (De Meyer, Muyldermans, and Depicker 2014).

De par leurs propriétés, les VHH sont des molécules recherchées et utilisées dans divers domaines (Figure 5).

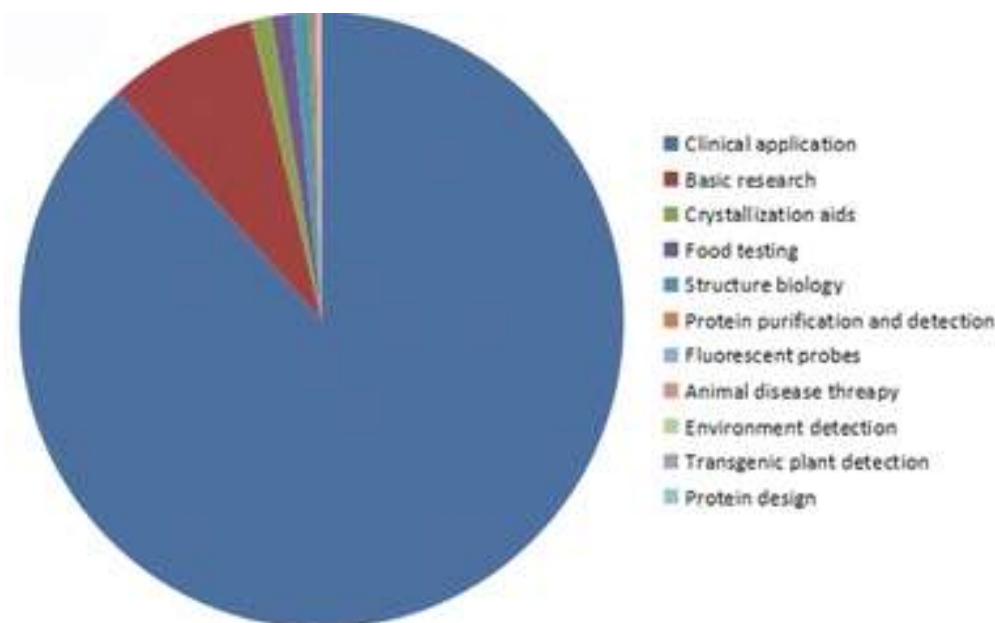


Figure 6 : Répartition des VHH en fonction de leur domaine d'utilisation. Dans l'ordre décroissant, en bleu : utilisation clinique, en rouge : recherche, en vert : outils d'aide à la cristallisation... (Zuo et al. 2017)

Les VHH sont utilisés comme outils de recherche, par exemple les chromocorps (*chromobodies*) qui résultent de la fusion d'un VHH avec une protéine fluorescente.

En biochimie, les VHH sont utilisés dans la purification et l'immunoprécipitation.

En biologie structurale, les VHH sont utilisés comme protéines chaperonnes. En effet, les VHH peuvent permettre d'augmenter la solubilité, la stabilité, l'affinité d'une colonne de purification, la polarité d'une protéine membranaire ou permettre, également, par remplacement moléculaire de résoudre la structure d'une protéine membranaire ("Nanobody-Aided Crystallography | Structural Biology Brussels" n.d.). Les VHH ont ainsi

permis de trouver plusieurs structures de protéines tel que : le récepteur β_2 adénergique humain stabilisé sous forme active par un VHH (Rasmussen et al. 2011), un fragment de TSSm du système de sécrétion de type VI (T6SS) complexé avec un VHH (Nguyen et al. 2015)...

Les VHH ayant la capacité d'interagir avec des sites catalytiques, sont également utilisés comme inhibiteur fonctionnel de certaines protéines, notamment dans le domaine de l'agriculture et les souris transgéniques.

Dans le domaine agroalimentaire, des VHH ont été développés pour analyser la composition de produits alimentaires. De par leur résistance thermique, les VHH sont une bonne alternative aux anticorps conventionnels.

Dans le domaine médical, les VHH peuvent être utilisés en thérapeutique comme en diagnostique.

Plusieurs VHH semblent intéressants par rapport aux anticorps conventionnels en immuno-diagnostique, du fait de leur petite taille permettant d'atteindre certains épitopes et de leur plus grande spécificité.

Dans le domaine de l'infectiologie, les protozoaires du genre *Trypanosoma*, responsable de la maladie de Chagas et de la maladie du sommeil, présentent une grande variabilité antigénique, par conséquent, aucun anticorps conventionnel ne reconnaît avec spécificité ce genre mais l'équipe de Muyltermans et al. a sélectionné des VHH anti-trypanosomes. Concernant, le genre *Taenia* responsable du cysticercosis, actuellement un test diagnostique ELISA sandwich avec un anticorps monoclonal existe mais dispose d'une faible spécificité pour l'espèce la plus menaçante pour la santé publique, *Taenia solium*. Des VHH ont été sélectionnés contre *Taenia solium* afin de développer un test immuno-diagnostique plus spécifique pour la cysticercosis humaine (Deckers et al. 2009).

Par ailleurs, les VHH ont été récemment utilisés pour détecter de nombreuses toxines, notamment, la neurotoxine botulique A (agent du bioterrorisme) (Goldman et al. 2008) ainsi que des virus et des bactéries.

De plus, en oncologie certains marqueurs tumoraux sont inaccessibles aux anticorps conventionnels, les VHH peuvent donc être utilisés de par leur petite taille, par exemple pour détecter le récepteur EGF (Huang et al. 2008). (Leow et al. 2017)

En thérapeutique, plusieurs études sont en cours pour utiliser ces VHH comme élément thérapeutique en soi ou comme vecteur associé à une drogue, notamment en cancérologie (Conrath et al. 2003; Majidi et al. 2009) (Tableau 1). La société Ablynx spécialisée dans les *nanobodies*® dispose du Caplacizumab qui est le premier VHH à avoir été approuvé par l'European Medicines Agency pour le traitement du purpura thrombotique thrombocytopenique (Peyvandi et al. 2017) et de plusieurs projets au stade clinique.

Target Antigens	Diseases	Applications	Reference
HER2	Breast cancer	Diagnostic	[284,285,286]
TNT	Explosive	Diagnostic	[274,287]
Ts14 glycoprotein	<i>T. solium</i> cysticercosis	Diagnostic	[249]
LMM, ES, CSE, TSB, LLGPs, VF of <i>T. solium</i>	Neurocysticercosis	Immunodiagnosis	[249]
VEGF-A ₁₆₅	Neoangiogenesis	Diagnostic and therapeutic	[288]
HPV-16 L1 protein	Cervical cancer	Diagnostic and therapeutic	[289,290]
DARC	Malaria (by <i>P. vivax</i>)	Diagnostic or therapeutic	[291]
Poliovirus type 1 Sabin strain particles	Poliomyelitis	Diagnostic and therapeutic	[292,293]
CD105	Angiogenesis related tumors	Diagnostic and therapeutic	[294,295]
HSP-60	Brucellosis (Livestock)	Diagnostic and vaccine	[222,296]
Caffeine carboxylate KLH	Beverages	Detection and separation	[251,252]
SEB	Toxin	Sensor and diagnostic	[275]
Ricin	Toxin	Sensor and diagnostic	[275]
BoNT/A	Toxin	Sensor and diagnostic	[235,297,298]
CEA	Colon cancer	In vivo imaging	[299,300,301]
VCAM1	Atherosclerotic plaques	Molecular imaging	[302,303,304]
EGFR	Tumours	Detection and imaging	[305,306]
Scorpion AahII	Toxin	Neutralizing and therapeutic	[276,307]
Heat-killed <i>B. melitensis</i> Riv1	Brucellosis	Diagnostic, therapeutic and vaccination	[282,308,309,310]
RSV protein F	Acute lower respiratory tract	Therapeutic	[311]
vWF	Thrombosis	Therapeutic	www.ablynx.com
TNF α , IL-6R, IgE	Rheumatoid arthritis	Therapeutic	www.ablynx.com
RANKL	Bone metastasis	Therapeutic	www.ablynx.com
RSV	bronchiolitis and pneumonia	Therapeutic	www.ablynx.com
DR5	Solid tumors	Therapeutic	www.ablynx.com
Not stated	Alzheimer's disease	Therapeutic	www.ablynx.com

Tableau 1 : Les applications médicales des VHH. (Leow et al. 2017)

La transferrine et ses récepteurs

1. La transferrine

1.1. Le fer

Le fer est un oligo-élément impliqué dans de nombreux processus biologiques. En effet, ce cofacteur est indispensable, notamment, à la biosynthèse des macromolécules, la division et la prolifération cellulaire, la production d'énergie, le transport de l'oxygène ainsi qu'à la synthèse de l'ADN (Hentze et al. 2010). Le taux de fer chez l'Homme est de 4 à 5 grammes répartis en fer actif (80% : hémoglobines, myoglobines, enzymes et cytochromes), complexé à la transferrine pour le transport plasmatique et sous forme de stockage avec la ferritine et hémosidérine.

1.2. Structure et propriétés de la transferrine

La transferrine humaine sérique est une glycoprotéine de type beta-globuline de 80 kDa sécrétée par le foie dans la circulation sanguine. Elle a pour rôle de transporter le fer sous forme ferrique (Fe^{3+}) et possède une demi-vie de 8 à 10 jours. Cette protéine comprend deux sites (N et C) de liaison pour le fer. Dans la circulation sanguine, 4 formes co-existent : la diferrique, la monoferrique N, la monoferrique C et l'apotransferrine. La forme diferrique possède l'affinité la plus forte pour le récepteur 1 de la transferrine (RTf1), avec une constante de dissociation à l'équilibre (Kd) de 4 nM. A pH neutre (extracellulaire), les deux formes monomériques forment également un complexe stable avec le récepteur alors que l'apotransferrine fixe très faiblement le récepteur (Mason et al. 2009).

1.3. Le transport transmembranaire du fer

Le complexe récepteur – transferrine est internalisé dans la cellule par endocytose clathrine-dépendante, puis le fer se dissocie de la transferrine dans l'endosome et est pris en charge par un transporteur de cation divalent (*Divalent Metal Transporter 1*, DMT1) afin d'être utilisé par la cellule. A pH endosomal (acide, pH~5,2), l'apotransferrine a une haute affinité pour son récepteur, ce qui lui permet d'être recyclée à la membrane cellulaire avec

celui-ci, puis relarguée dans la circulation sanguine (Dautry-Varsat, Ciechanover, and Lodish 1983) et de réaliser à nouveau ce cycle. (Figure 6)

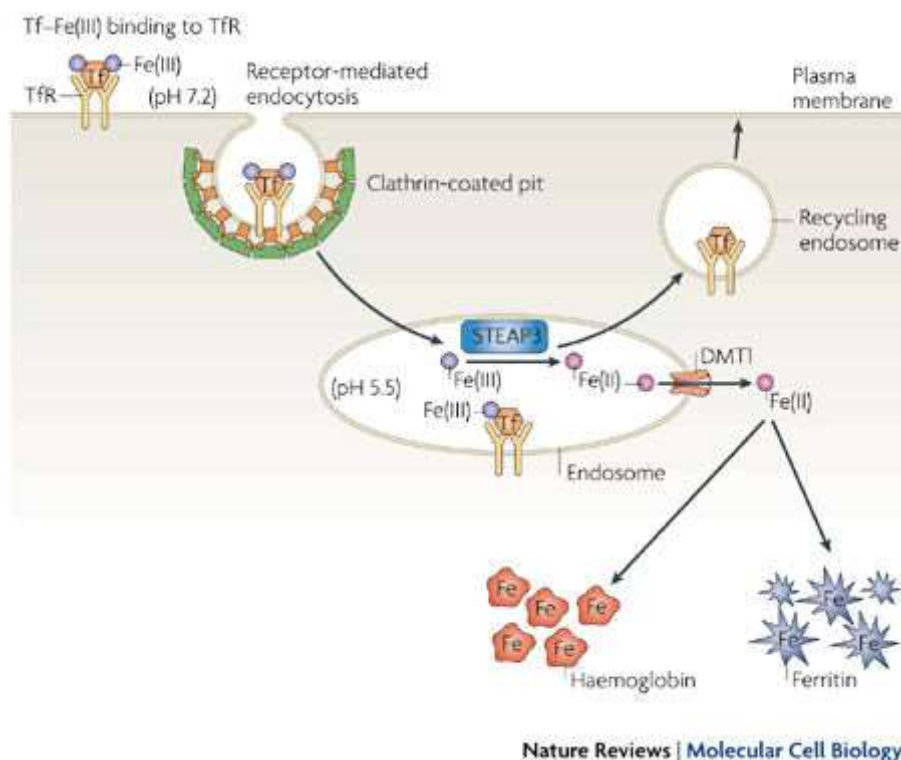


Figure 7 : Schéma présentant le passage transmembranaire du fer et le recyclage de la transferrine. (Domenico, Ward, and Kaplan 2008)

1.4. Le passage de la barrière hémato-encéphalique du fer

Etant indispensable à divers processus biologiques, le fer doit traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) afin d'alimenter le cerveau.

La nature hydrophile de la transferrine chargée de fer ne lui permet pas de passer cette membrane par simple diffusion, mais des RTf1 sont exprimés au pôle luminal des cellules endothéliales de la BHE (Angelova-Gateva 1980; Jefferies et al. 1984). Deux mécanismes expliquant le transport du fer à travers la BHE sont envisagés. La première hypothèse étant le passage du fer lié à la transferrine par transcytose du pôle apical (sanguin) au pôle basal (cérébral) (Moos and Morgan 2000), et la deuxième hypothèse étant la pénétration du fer liée à la transferrine au pôle apical des cellules endothéliales, libération du fer à l'intérieur de la cellule, recyclage transferrine-RTf au pôle apical et prise en charge du fer par d'autres molécules pour sa libération au pôle basal (Rouault and Cooperman 2006).

Selon de récents travaux, les deux hypothèses restent possibles, les neurones expriment des RTf1 à leur surface, donc la transferrine semble les alimenter en fer alors que les cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes et microglie) ne présentent pas de RTf1 à leur surface. Une identification nouvelle des protéines Steap, DMT1 et ferroportine dans les cellules endothéliales de la BHE sont en faveur de la deuxième hypothèse (Skjørringe et al. 2015). (Figure 7)

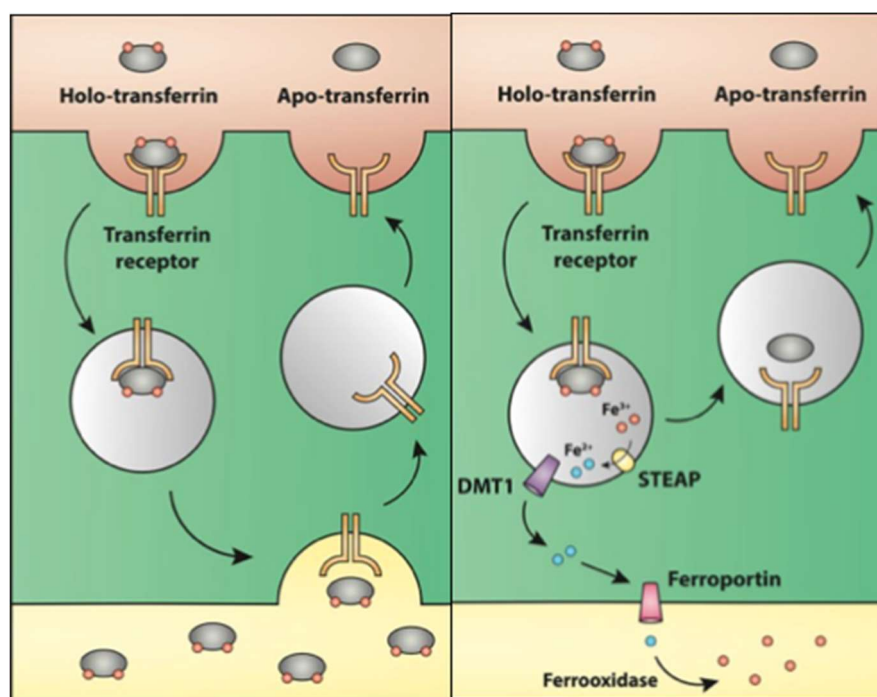


Figure 8 : Schéma présentant les deux hypothèses des modèles de transport du fer à travers la BHE. Avec transcytose de la transferrine (à gauche), sans transcytose de la transferrine (à droite). (Skjørringe et al. 2015)

2. Les récepteurs de la transferrine

Les récepteurs de la transferrine sont des récepteurs transmembranaires homodimériques comportant 2 monomères qui peuvent chacun lier une molécule de transferrine. Il existe 2 récepteurs : RTf1 et récepteur 2 de la transferrine (RTf2). La principale différence entre ces deux récepteurs réside dans leur localisation. Le RTf1 est ubiquitaire, son expression est retrouvée dans la plupart des types cellulaires et reflète les besoins cellulaires en fer alors que le RTf2 est principalement présent dans le foie, l'intestin grêle et les érythroblastes (Kawabata et al. 1999, 2001). De plus, l'affinité de la transferrine pour le RTf2 est 25 fois plus faible que celle pour le RTf1.

3. La transferrine et ses récepteurs, cible thérapeutique

3.1. En oncologie

Les RTf sont des cibles intéressantes pour les traitements en cancérologie. Le RTf peut être utilisé en oncologie en tant que thérapeutique de deux manières (Figure 8). La première comme vecteur permettant de cibler le cancer et d'internaliser un médicament dans les cellules tumorales. La deuxième stratégie, similaire à celle des antifolates (methotrexate, pemetrexed) qui bloque la synthèse de l'ADN, est de bloquer le RTf ou de chelater le fer et par conséquent bloquer l'apport de fer, essentiel à de nombreuses fonctions cellulaires, conduisant ainsi à la mort de la cellule tumorale (Daniels et al. 2012). Depuis les années 80, des études ont montré *in vitro* que bloquer RTf par des anticorps anti-RTf permet d'inhiber la croissance tumorale (Trowbridge and Lopez 1982).

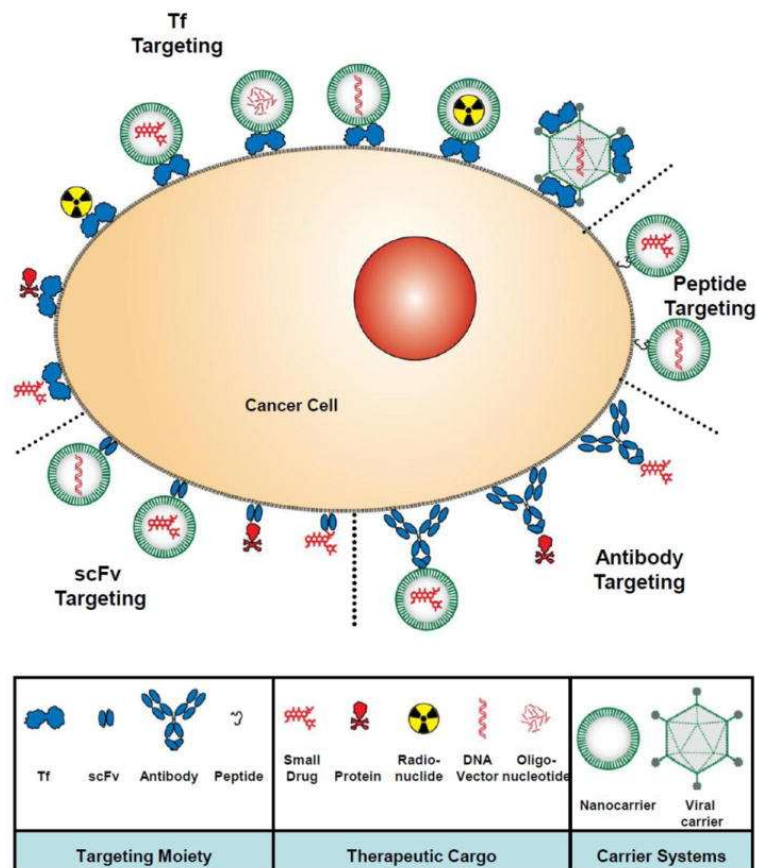


Figure 9 : Schéma présentant les différentes stratégies ciblant le RTf en recherche dans les traitements anti-cancéreux. (Daniels et al. 2012)

Ainsi plusieurs études *in vitro* et *in vivo*, concernant des traitements ciblant le RTf par différentes stratégies ont été conduites (Calzolari et al. 2007; Daniels et al. 2012; Luck and Mason 2013).

De nombreuses études présentent une surexpression des RTf au niveau de certains types de cancer, en comparaison aux tissus sains, notamment : cancer pancréatique, cancer du côlon, cancer pulmonaire, cancer de la vessie, cancer du sein, leucémie lymphoïde chronique, glioblastomes, lymphome non Hodgkinien, myélome. De plus, plusieurs articles montrent que le degré de sévérité de la maladie est corrélé avec l'expression des RTf. (Ryschich et al. 2004; Calzolari et al. 2010; Prutki et al. 2006; Kondo et al. 1990; Seymour et al. 1987; Singh et al. 2011; Habeshaw et al. 1983; Prior, Reifenberger, and Wechsler 1990; Das Gupta and Shah 1990; Jeong et al. 2014) La surexpression des RTf est en lien avec la prolifération cellulaire (Luck and Mason 2013).

L'accessibilité du RTf et sa surexpression dans les cellules tumorales fait du RTf une cible intéressante pour des anticorps dans le traitement du cancer (Daniels et al. 2006). Plusieurs travaux ont été menés sur des anticorps anti-RTf (Daniels et al. 2006, 2012), une protéine de fusion avidine-antiRTf (anti-TfR IgG3-Av) a été développée et a montré avoir une capacité pro-apoptotique et être capable de délivrer différentes molécules dans les cellules tumorales (Ng et al. 2002).

Plusieurs équipes ont développé et évalué *in vitro*, différents médicaments conjugués à la transferrine pour cibler les cellules tumorales, notamment à la doxorubicine, daunorubicine, cisplatine, tirapazamine, photosensibilisateur et TNF- α (*Tumour necrosis factor α*). La doxorubicine est un antibiotique de la famille des anthracyclines utilisé dans le traitement de différents cancers dont la dose est limitée par sa cardiotoxicité. La conjugaison à la transferrine permettrait à la doxorubicine de mieux cibler les cellules tumorales, d'améliorer son efficacité cytotoxique sur ces cellules et de diminuer sa toxicité. Des chercheurs se sont également intéressés au développement d'immunotoxines, toxine végétale (principalement ricine et saporine) ou toxine bactérienne (exotoxine A et toxine diphtérique) couplée à la transferrine ou à un anticorps anti-RTf. Une phase 1 clinique a été menée avec une immunotoxine composée de ricine couplée à un anticorps anti-RTf et 4 patients sur 8 atteints d'une tumeur cérébrale ont répondu au traitement. L'immunotoxine dont le développement a le plus avancé, est une forme mutante de la toxine diphtérique (CRM107) liée à la transferrine. Cette dernière a montré des résultats prometteurs mais des

difficultés ont été relevées, notamment au niveau de la stabilité de la transferrine et de l'impossibilité de coupler la dose thérapeutique de toxine sur la transferrine. (Tortorella and Karagiannis 2014)

Des nanovecteurs (composés où le principe actif est encapsulé dans des particules de l'ordre du nanomètre : nanoliposomes, nanosphères, nanocapsules) couplés à la hTf ont été produits afin de fournir un ciblage actif/direct. Un dendrimère composé de polypropylènimine a été développé avec et sans couplage à la transferrine, une étude *in vivo* a mis en évidence que le dendrimère couplé à la hTf présentait une meilleure spécificité anti-tumorale que le dendrimère non couplé (Koppu et al. 2010). De la même manière, plusieurs études ont montré que les liposomes couplés à de la hTf avaient une demi-vie plus élevée, étaient moins sensibles à la capture par le réticulum endoplasmique et étaient plus internalisés dans les cellules tumorales (Ishida et al. 2001). L'ensemble des travaux portant sur le couplage de Tf ou dérivé aux nanoparticules est présenté dans les tableaux en annexes (Annexes A : Tableau). (Daniels et al. 2012)

3.2. Sphère neuro-cérébrale

La présence de RTf à la surface des cellules endothéliales de la BHE laisse supposer que la transferrine passe du côté cérébral afin d'alimenter les cellules du système nerveux central en fer, si cette hypothèse est vraie, le couplage de médicament à la hTf permettrait le transit du médicament via le RTf.

En 1993, l'équipe de Frieden montre que le couplage de NGF à un anticorps anti-RTf passe la barrière hémato-encéphalique alors que le NGF seul ne passe pas la barrière (Friden et al. 1993).

Une étude récente avec des nanoparticules d'or exposant à la surface de la transferrine a été publiée. Il a été montré que le taux de nanoparticules passant la BHE est dépendant du nombre de transferrine présente à la surface soit que l'avidité de la nanoparticule influe sur la capacité de transcytose. En effet, il semblerait que les nanoparticules présentant un grand nombre de transferrine, présentent une forte avidité et restent ainsi au pôle luminal des cellules endothéliales de la BHE. Alors que les nanoparticules exposant moins de transferrine semblent se retrouver au niveau du parenchyme cérébrale. (Wiley et al. 2013)

Des nanoparticules couplées à la Tf par de l'avidine ont été développées dans la recherche de traitements dans les gliomes (Ren et al. 2010).

Afin d'améliorer le traitement du gliome, des nanomédicaments encapsulant de la daunorubicine ont été développés avec un double ciblage en intégrant à la surface des nanoparticules de la transferrine et MAN (p-aminophenyl- α -D-manno-pyranoside, substrat du transport de glucose GLUT 1 au niveau de la BHE), cela a permis d'augmenter de 24.5% le passage de la BHE. (Ying et al. 2010)

Des équipes de recherche ont mis en évidence que la transferrine endogène est un inhibiteur compétitif de l'internalisation des nanoparticules conjuguées à la transferrine (Chang et al. 2009). Par la suite des anticorps anti-RTf ou anti-transferrine ont été utilisés et plusieurs études ont notamment été réalisées avec des nanomédicaments conjugués à OX26, un anticorps anti-RTf de rat (Liu and He 2017; Johnsen et al. 2017).

Une étude *in vivo* chez la souris de nanosphère encapsulant un inhibiteur de la caspase 3, fonctionnalisé par la conjugaison d'un anticorps monoclonal anti-Tf de souris à sa surface, est parue en 2009. Cette étude a montré par microscopie intravitale à fluorescence que la nanosphère conjuguée était internalisée via les RTf1 présents à la surface des cellules endothéliales de la BHE. Elle permettait ainsi de passer la BHE car l'effet inhibiteur de la caspase 3 a été démontré. (Karatas et al. 2009)

TRAVAUX PERSONNELS

Objectifs

Comme cela a été décrit précédemment dans l'introduction, les VHH présentent, du fait de leur petite taille, certains avantages pour une utilisation en thérapeutique par rapport aux anticorps monoclonaux et la transferrine est une cible intéressante pour les traitements en oncologie et dans la sphère neuro-cérébrale.

Dans le cadre de ma thèse d'exercice, nous avons décidé, avec la start-up Theranyx, spécialisée en biotechnologie et en récepteurs couplés aux protéines G, de développer des VHH anti-transferrine par immunisation de transferrine humaine chez un lama. Puis de les sélectionner par *phage display*, et ensuite de les caractériser *in vitro* et *in vivo*, chez la souris.

Le développement de ces VHH a été effectué en vue d'une utilisation thérapeutique en les utilisant, en tant que vecteur de nanoparticule, médicament ou encore d'une toxine, en oncologie mais également dans la sphère neuro-cérébrale. De plus, ces VHH pourraient être utilisés pour augmenter la demi-vie d'autre VHH fonctionnel en créant des VHH bivalents.

Matériels et méthodes

1. Immunisation des lamas et construction de la banque de VHH

Un lama a été immunisé à 5 reprises avec une dose de 0.2 mg d'holo-transferrine humaine plasmatique (Athens Research and Technology) après reconstitution volume à volume avec l'adjuvant Gerbu, par injection intramusculaire.

Un prélèvement sanguin a été effectué 7 jours après la dernière immunisation. À partir de cet échantillon, les cellules mononuclées sanguines périphériques ont été isolées par gradient de Ficoll et l'ARN total a été extrait. Ce dernier a été utilisé pour la synthèse de

l'ADNc par RT-PCR. L'ADNc total a été, par la suite, amplifié par PCR1 permettant d'obtenir les gènes codants pour VH + CH1 + CH2 (bande à 900 paires de bases, pb), et les gènes codants pour les VHH + CH2 (bande à 600 pb) (Figure III.1.). La bande à 600 pb a été purifiée à partir d'un gel d'agarose 1.5%, puis utilisée comme matrice pour la PCR2. Cette amplification nous a permis d'obtenir une bande à 450 pb correspondant au gène codant pour les VHH comportant les sites de restriction, NcoI et NotI. Cet ADN a été par la suite digéré avec les deux enzymes de restriction, puis inséré par ligation (T4 DNA ligase) dans le phagemide pHEN1 préalablement digéré. Le phagemide pHEN est un vecteur permettant d'exprimer les VHH sur la capsid des phages : technique phage display. En effet, les VHH sont exprimés en fusion avec la protéine p3 du phage (Annexes : Figure B).

Le produit de la ligation a été, par la suite, transformé par électroporation dans des bactéries TG1 (*supE thi-1Δ(lac-proAB) Δ (mcrB-hsdSM)5(rKmK) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]*) puis la transformation a été étalée sur une boîte de milieu LB Agar+Amp+Glu et incubée o.n. à 37°C. Les bactéries ayant poussé sur la boîte ont été, par la suite, récupérées, utilisées pour la production de la banque en phages et conservées à -80°C.

La production de phages a été réalisée en cultivant les bactéries de la banque (100 fois la diversité) dans du 2YT+Amp+Glu à une DO₆₀₀ initiale de 0.1. Lorsque la culture a atteint une DO₆₀₀ = 0.6, les bactéries ont été infectées avec le *phage helper* et incubées 30 min à 37°C sans agitation puis 30 min à 37°C avec agitation. Les bactéries ainsi infectées ont été récupérées par centrifugation 15 min à 6 000xg puis remises en culture o.n. à 30°C dans du milieu 2YT+Amp+Kana. Le lendemain, le surnageant de la culture a été récupéré par centrifugation 10 min à 10 000 x g et les particules de phages ont été précipitées par ajout de PEG-NaCl puis reprises dans une solution de PBS-glycérol puis quantifiées par mesure de DO à 269 nm.

2. Sélection par « phage display » et phages ELISA

Une sélection par *phage display* est réalisée en 4 étapes :

- Immobilisation de la cible
- Mise en contact de la cible avec des phages exprimant sur leur capsidale les VHH
- Élimination des phages non spécifiques par lavage
- Éluion acide des phages exprimant des VHH qui reconnaissent la cible

En effet, la transferrine a été immobilisée dans un puits d'une plaque Maxisorb (Nunc), à 20 µg/mL o.n. à 4°C. Le puits a été, par la suite, lavé 3 fois avec 200 µL de PBS puis bloqué avec 200 µL d'une solution de PBS-BSA 3%. Après 3 lavages avec PBS, la cible a été incubée avec 100 µL de la banque de phages pendant 2 h à 4°C sous agitation. Les phages non spécifiques ont été éliminés avec de nombreux lavages (25 lavages avec 200 µL PBS-tween 0.1%). Les phages fixés à la transferrine ont été élués avec 100 µL d'une solution de glycine à pH 2. Le pH de cette solution a été par la suite neutralisé par ajout de 100 µL de Tris pH8. Des bactéries TG1 en phase exponentielle ($DO_{600} = 0,6$) ont été, par la suite, infectées avec cette solution de phages. Après 30 min sans agitation à 37°C, étape d'infection des bactéries TG1, des dilutions de celle-ci ont été étalées sur des boîtes LB-Agar+Amp+Glu afin de déterminer le nombre de clones indépendants issus de ce 1^{er} tour de sélection. La culture a été, par la suite, incubée 30 min à 37°C avec agitation. Les bactéries ainsi infectées ont été récupérées par centrifugation 15 min à 6 000 x g puis remises en culture o.n. à 30°C dans du milieu 2YT+Amp+Kana. Le lendemain, le surnageant de la culture a été récupéré par centrifugation 10 min à 10 000 x g et les particules de phages ont été précipitées par ajout de PEG-NaCl. Les phages précipités ont été utilisés pour réaliser un deuxième tour de sélection.

À partir de ces deux tours de sélection, 24 ou 48 clones bactériens indépendants par tour ont été cultivés et infectés par *phage helper* afin de réaliser des phages ELISA. La transferrine humaine à 20 µg/mL a été immobilisée sur une plaque de 96 puits Maxisorb (Nunc) o.n. à 4°C. La plaque a été, par la suite, lavée 3 fois puis bloquée avec une solution de PBS-BSA 3%, le surnageant des cultures contenant les phages a été incubé sur la plaque pendant 1 h à 4°C sous agitation. Après 3 lavages, la plaque a été incubée avec un anticorps spécifique des phages couplé à la HorseRadish Peroxydase (anti-M13-HRP). Après 5 lavages, la présence de phages exprimant à leur surface des VHH fixés à la transferrine a été

révéler par ajout du substrat de la peroxydase, BM Blue POD Substrate. La réaction a été, par la suite, arrêtée par ajout de HCl et le signal a été mesuré à 450 nm. Deux plaques contrôles ont été réalisées en parallèle, dans les mêmes conditions mis à part la première étape d'immobilisation, la solution de transferrine a été remplacée par une solution de PBS-BSA 1%.

Dans ce projet, deux *phages display* ont été réalisés : le 1^{er} appelé sélection A, comprend 2 tours de sélection sur la transferrine humaine et le 2^{ème} appelé sélection B, comprend 3 tours de sélection, les deux premiers sur transferrine de souris et le troisième sur transferrine humaine.

3. Test ELISA protéine-protéine

Les extraits périsplasmiques ont été produits à partir des bactéries TG1. Dans une plaque de 24 puits profonds, 4 µL de TG1 ont été cultivés dans 4 mL de milieu de culture (2YT+Amp+Glu 2%) o.n. à 37°C avec agitation. Le lendemain, 40 µL de ces précultures ont été cultivés dans 4 mL de milieu de culture (2YT+Amp+Glu 2%) dans une nouvelle plaque de 24 puits profonds à 37°C avec agitation jusqu'à atteindre la phase exponentielle ($DO_{600nm}=0,6$). Les cultures ont été, par la suite, incubées à RT 30 min sans agitation puis 1 mM d'IPTG a été ajouté aux cultures afin d'induire l'expression des VHH o.n. à 20°C avec agitation. Le lendemain, les cultures ont été centrifugées 15 min à 2 000 rpm à 4°C puis le surnageant a été éliminé et les culots ont été congelés à -20°C pendant au moins 1h afin de fragiliser la membrane externe des bactéries et ainsi libérer les VHH qui se trouvaient dans le périplasme. Après congélation, les culots ont été repris dans 300 µL de PBS et incubés sous agitation 45 min pour casser la membrane, puis centrifugés 15 min à 2 000 rpm. Les surnageants contenant les VHH produits ont été récupérés et 5 µL ont été déposés sur gel de polyacrylamide afin de vérifier les niveaux d'expression des VHH (env. 15kDa).

Dans le cadre du test ELISA avec extraits périsplasmiques, le protocole est similaire au phage ELISA avec quelques modifications. Après immobilisation de la transferrine et blocage des sites libres par la BSA, les puits ont été incubés avec 100 µL d'extrait périsplasmique contenant un VHH fusionné à la protéine p3 et un myc-tag pendant 2 h à RT puis lavés au PBS-Tween 0,1%. Les puits ont été, par la suite, incubés pendant 45 min avec l'anticorps anti-c Myc-HRP à RT. Après lavage, le substrat de la peroxydase a été ajouté,

BM Blue POD Substrate et la réaction a été arrêtée par ajout de HCl puis le signal a été quantifié.

4. Sous-clonage des VHH anti-transferrine

4.1. Sous clonage dans le plasmide, pET23 NN sfGFP

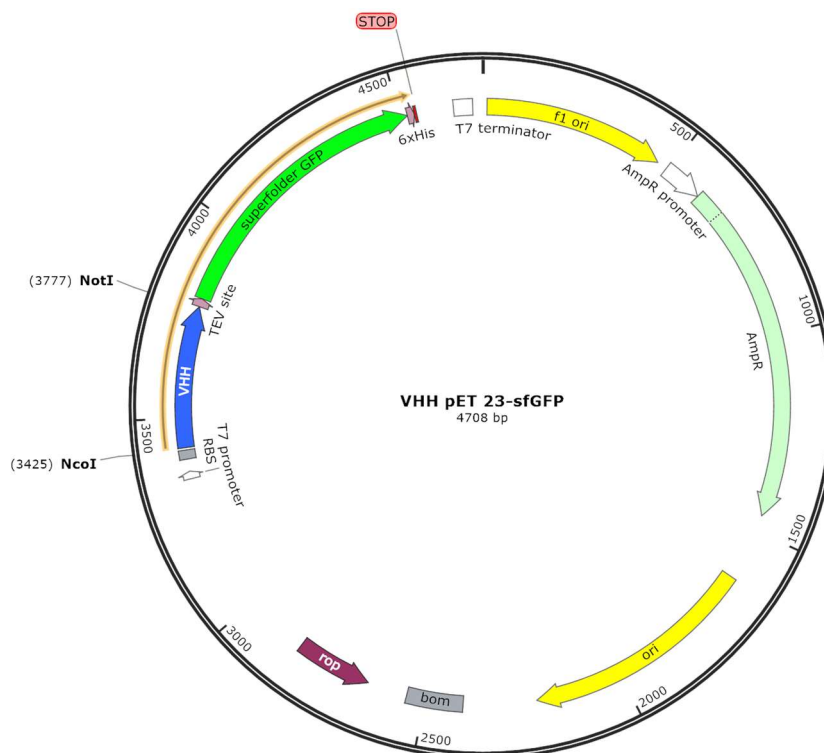


Figure 10 : Plasmide contenant la séquence de VHH (bleu) et la superfolder Green Fluorescent Protein (vert)

Le plasmide et le VHH ont été digérés par les enzymes de restriction NcoI et NotI. Le plasmide digéré a été purifié à partir d'un gel d'agarose 1% et la ligation plasmide – insert a été réalisée o.n. à 16°C. Le plasmide recombinant (Figure 9) a été, par la suite, transformé dans des bactéries TAM E2 et étalé sur une boîte LBAgar+Amp. Les colonies qui ont poussé, ont été mises en culture o.n. et le lendemain, des minipreparations de clones ayant intégré le plasmide recombinant ont été effectuées pour être envoyées au séquençage. Les clones dont le clonage a été confirmé, ont été, par la suite produits et purifiés.

4.2. Sous clonage dans le plic28 Cystéine C-terminal SUMO

Le plic28 permet de réaliser un clonage sans utiliser de T4 DNA ligase (LIC : *Ligase Independant Cloning*). Ce plasmide comprend le gène *SacB* qui code pour l'enzyme levansucrase. La levansucrase convertit le sucrose en levan, composé toxique pour la bactérie.

Le plasmide LIC est dans un premier temps digéré par les enzymes de restriction, ce qui conduit à l'élimination du *sacB*, puis incubé avec la T4 ADN polymérase et de la desoxyguanosine triphosphate (dGTP). En manquant de desoxycytosine triphosphate (dCTP), la T4 ADN polymérase va éliminer des acides nucléiques par son activité exonucléasique (3'→5'), ce qui aboutit à de longues extrémités 5' sortantes.

En parallèle, l'insert est amplifié avec les oligonucléotides complémentaires aux bouts tronqués puis par l'activité exonucléasique de la T4 ADN polymérase et en absence de dGTP, les extrémités 3' sont éliminées. L'insert et le plasmide s'hybride naturellement pas simple complémentarité. (Figure 10)

La transformation a été, par la suite, réalisée et étalée sur une boîte LB Agar+Kana+Sucrose.

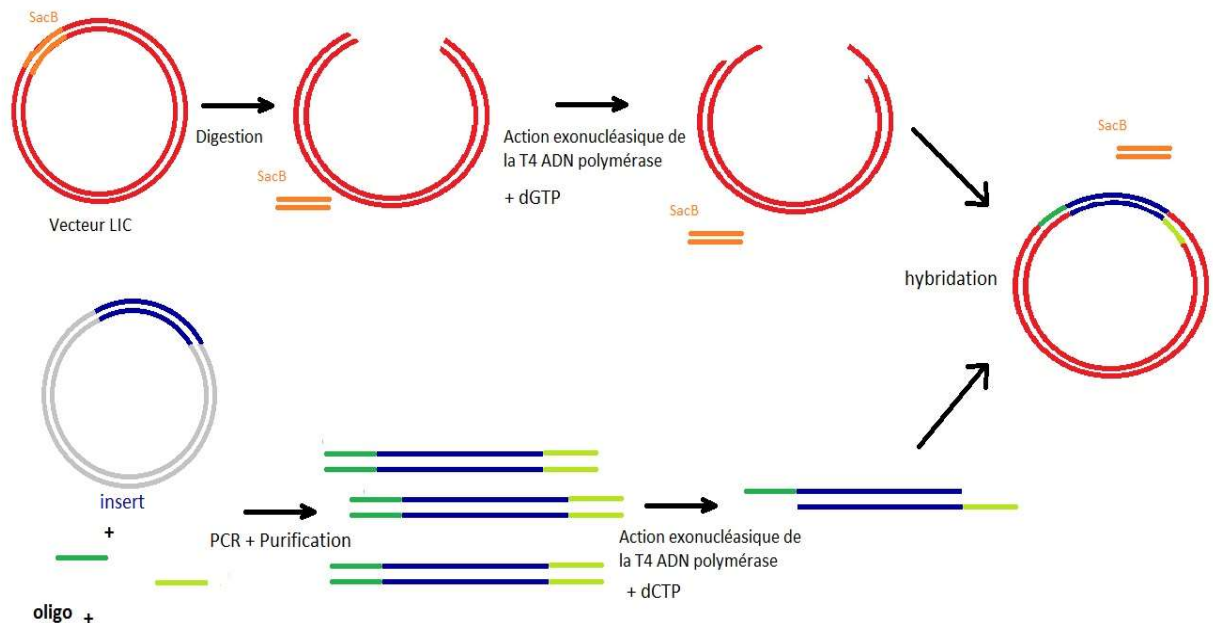


Figure 11 : Schéma explicatif d'un clonage indépendant de la ligase

5. Production et purification des VHH anti-transferrine

Les plasmides recombinants ont été transformés dans des bactéries BI21 cultivées dans du milieu riche 2YT + antibiotique de sélection (Kana ou Amp) + Chloram + Glucose. À DO=0,6 l'expression des VHH a été induite par ajout d'1mM IPTG o.n. à 20°C. La purification des VHH a été effectuée par affinité sur colonne nickel nitrilotriacétique (Ni-NTA) grâce aux tags histidines présents sur les VHH, suivi d'une étape de gel filtration.

6. Marquage des VHH avec des fluorophores

Deux types de fluorophores ont été utilisés, de l'Alexa fluor® 647 ester succinimidylique (NHS ester) et de l'Alexa fluor® 647 maleimide. Le dérivé NHS ester permet de marquer les groupements amines primaires, par conséquent le fluorophore se fixe aux lysines du VHH. Le dérivé maleimide permet de marquer les groupements thiols des cystéines accessibles du VHH. Plusieurs conditions de marquage ont été testées pour améliorer celui-ci, plus précisément le ratio (molaire) fluorophore/VHH a varié de 3 à 20, le choix du tampon (carbonate ou HEPES) et la température de la réaction de couplage (4°C et RT). Pour exemple de protocole, une solution de 190 µL à 20 µM de VHH a été incubée avec une solution de 10 µL à 2,7 mM de fluorophore dans un tampon de marquage carbonate à pH 8,3 (NaHCO₃ 0,2 M et NaCl 0,3 M) pendant 1h à 4°C. Le complexe protéine-fluorophore a été purifié sur une colonne de dessalage (NAP-5 GE-Healthcare) préalablement équilibrée dans du tampon de marquage, afin d'éliminer l'excès de fluorophore non couplé. L'éluât a été, par la suite, dosé au nanodrop, la lecture de la densité optique à 280nm permet de déterminer la quantité de VHH et la lecture de la densité optique à 647nm (maximum d'excitation de l'Alexa fluor® 647) permet de déterminer la quantité de fluorophore en appliquant la loi de Beer Lambert. Le ratio de marquage a été calculé par la formule : nombre de moles de fluorophore/nombre de moles de VHH.

7. Culture cellulaire

7.1. Conditions de culture et lignées cellulaires

La culture cellulaire et tous les traitements effectués sur les cellules ont été réalisés dans un laboratoire de niveau P2. Les cellules ont été cultivées dans le milieu de culture adéquat à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂. Pour ce projet de recherche, 3 lignées cellulaires adhérentes ont été utilisées. Les cellules PANC 1 sont des cellules humaines dérivées de cancers pancréatiques. Les cellules HepG2 sont des cellules humaines issues d'hépatoblastome humain et les cellules B16F10 sont des cellules dérivées de mélanomes murins. Ces trois lignées cellulaires adhérentes ont été entretenues et maintenues dans un milieu DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium : nutrient mixture F-12) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 5 µg/mL de normocin. De plus, 2 lignées cellulaires qui poussent en suspension ont été utilisées. Les cellules K562 sont des cellules issues de lymphoblastes dans le cas d'une leucémie myéloïde chronique humaine. Les cellules HMC1 sont des mastocytes humains. Ces deux lignées cellulaires en suspension ont été entretenues et maintenues dans un milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 5 µg/mL de normocin.

7.2. Lignée stable PANC1 – mCherry

Afin d'obtenir une quantité importante d'ADN du gène mCherry, 1 µL de plasmide contenant le gène codant pour la protéine mCherry, pmCherry-N1 (Clontech®) a été transformé dans des bactéries TAM E2. Cette solution bactérienne a été, par la suite étalée sur une boîte LBAgar+Kana et mise en culture o.n. à 37°C sous agitation. Le lendemain, une colonie a été repiquée dans 4 mL de milieu 2YT+Kana, cette préculture a été incubée 9h à 37°C. Au terme des 9h, la culture pour la maxipréparation, soit 200 mL de 2YT+Kana et les 4 mL de la préculture, a été remise en culture o.n. à 37°C sous agitation. La maxipréparation a été réalisée avec le Plasmid Maxi Purification Kit (Qiagen) et en suivant les instructions du kit. Brièvement, les cellules ont été lysées, le matériel génétique, l'ADN, a été purifié sur colonne échangeuse d'anions et le produit élué a été précipité à l'isopropanol et enfin récupéré dans de l'eau de qualité biologique (DNA/RNA free). L'ADN a été dosé par spectrophotométrie à 260nm. Le ratio DO à 260nm/DO à 280 nm renseigne sur la qualité de la préparation.

Pour la transfection, 5×10^5 cellules PANC 1/puits ont étéensemencées dans 4 puits de $9,61 \text{ cm}^2$, la veille de la transfection. Le jour de la transfection, les cellules étaient à 80% de confluence. Dans un premier tube A, $11,25 \mu\text{L}$ de lipofectamine 3000 R ont été dilués dans $375 \mu\text{L}$ de milieu Opti-MEM (Minimum Essential Media, Gibco®) dont la teneur en sérum est réduite. Le tube A comprend donc des liposomes cationiques. Dans un deuxième tube B, $7,5 \mu\text{L}$ d'ADN (mCherry) à $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ont été dilués dans $364 \mu\text{L}$ de milieu Opti-MEM et $15 \mu\text{L}$ de réactif P3000R ont été ajoutés. Après 5 min à température ambiante, les deux tubes A et B ont été mélangés, l'ADN chargé négativement pénètre dans les liposomes cationiques. Après 15min d'incubation à température ambiante, $250 \mu\text{L}$ du mélange ont été ajoutés dans 3 puits. La plaque a été, par la suite, incubée à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2 . Deux jours plus tard, les cellules ont été observées au microscope à fluorescence et le taux de transfection a été estimé. Les cellules des 4 puits de $9,61 \text{ cm}^2$ ont été récupérées et diluées dans 4 boîtes de 55 cm^2 contenant du DMEM F12+10%SVF. Dans les trois boîtes contenant les cellules transfectées, l'antibiotique G418, antibiotique de sélection du plasmide mCherry pour cellules de mammifères (plasmide qui présente le gène de résistance à la néomycine), a été ajouté à 3 concentrations différentes $0,5 \text{ mg/mL}$, 1 mg/mL et $1,5 \text{ mg/mL}$. Par la suite, le milieu a été renouvelé tous les 2 jours avec les mêmes concentrations de G418. Au bout de 2-3 semaines des plages de cellules PANC 1-mCherry résistantes au G418 et fluorescentes étaient présentes sur les boites. Ces plages de cellules ont été récupérées etensemencées en dilution en série dans des plaques de culture cellulaire de 96 puits. Dix jours après, les puits comportant qu'une plage de cellules ont été repiqués dans une boîte de 24 puits. La fluorescence de chaque puits a été analysée par cytométrie en flux et les cellules présentant la plus forte intensité de fluorescence ont été amplifiées et congelées.

8. Détermination de la constante d'affinité à l'équilibre par thermophorèse à micro-échelle

La thermophorèse à micro-échelle (MST) est une méthode biophysique, développée récemment, qui permet de mesurer quantitativement l'interaction entre protéines libres en solution. Le principe de la MST repose sur un gradient de température qui provoque un mouvement des molécules en solution, ceci est appelé l'effet Ludwig Soret, thermophorèse ou thermodiffusion. Ce phénomène est lié à la charge, la taille et la solvatation des molécules. L'interaction entre deux molécules conduit à des modifications de ces propriétés,

ainsi cette interaction peut être quantifiée par mesure des changements thermophorétiques (Duhr and Braun 2006).

Cette technique nécessite de marquer avec un fluorophore une des protéines impliquées dans l'interaction (ou qu'elle soit auto-fluorescente), car la thermophorèse est suivie par fluorescence. En effet, cette technique utilise 16 échantillons, où la protéine non marquée est diluée en série du premier échantillon jusqu'au seizième, tandis que la quantité de protéine marquée est constante dans chaque échantillon. Le suivi de la fluorescence permet donc de voir si ce signal est modifié proportionnellement à la quantité de protéine non marquée et donc de définir s'il y a interaction entre les deux molécules et si oui, la quantifier. Le gradient de température est créé par l'application d'un laser infrarouge (IR), qui permet également l'excitation du fluorophore couplé à l'une des protéines, à cet endroit les biomolécules s'éloignent de la source de chaleur, la concentration en protéine diminue et par conséquent, l'intensité de fluorescence diminue. Cette technique est applicable à des échantillons en solution dans des tampons classiques ou à des échantillons biologiques comme le sang ou les lysats cellulaires. Les avantages de la thermophorèse à micro-échelle sont la faible consommation d'échantillon et la possibilité d'étudier une gamme étendue de constantes thermodynamiques de dissociation entre le sub-nanomolaire et le millimolaire. (Figure 11)

Dans ce projet, la thermophorèse a été utilisée pour mesurer les interactions entre la transferrine humaine ou celle de souris et les différents VHH étudiés. Les deux types de transferrine ont été marqués avec de l'Alexa fluor® 647 NHS ester selon le protocole précédemment décrit. Les études d'interaction avec les VHH liés à la *green fluorescent protein* (GFP) et les VHH non marqués, ont été réalisées avec ces transferrines marquées. Les études d'interactions avec les VHH marqués par les différents marquages décrits précédemment (Alexa fluor® 647 dérivé maleimide et dérivé NHS ester) ont été réalisées avec les transferrines non marquées.

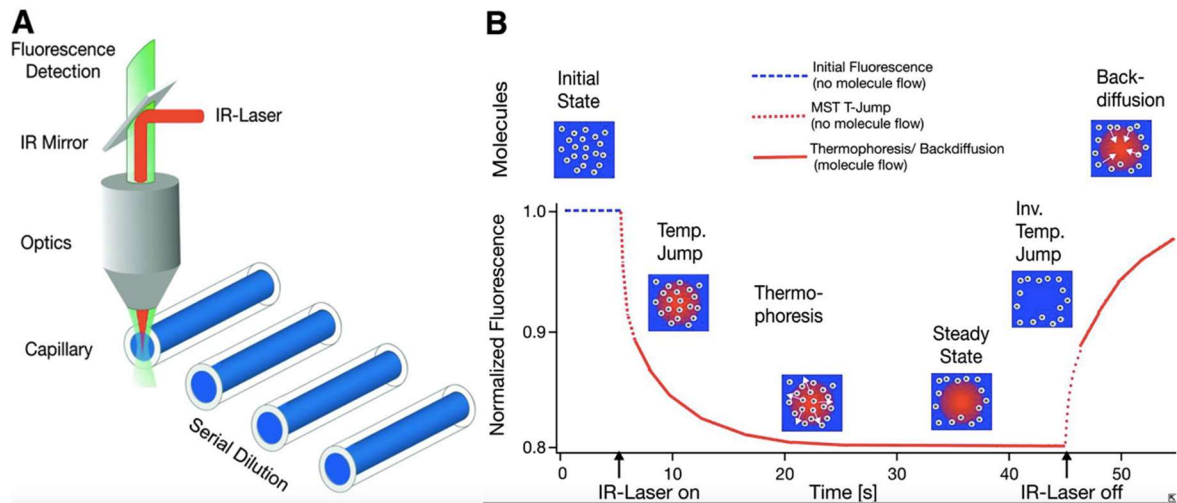


Figure 12 : Principe de la thermophorèse à micro-échelle. (A) Représentation schématique d'un système de thermophorèse. La fluorescence dans le capillaire est excitée et mesurée à travers le même élément optique. Un laser infrarouge est utilisé pour chauffer localement le volume d'échantillon observé par fluorescence. La thermophorèse est directement observée comme un changement de fluorescence. (B) Une courbe de thermophorèse typique pour un capillaire. Initialement, les molécules sont réparties de façon homogène et une "fluorescence initiale" constante est mesurée. Dès que le laser IR est allumé, une variation de la température (T-jump) rapide est observée, suivi du mouvement thermophorétique des molécules. La diminution de la fluorescence est mesurée pendant 30 s. Lorsque le laser est éteint, un T-Jump inverse est observé, suivi d'un retour à l'état initial (Backdiffusion), qui est purement dû à la diffusion de masse. (Jerabek-Willemsen et al. 2011).

Pour les mesures d'affinité, dans un volume total de 20 μ l, 20 nM de protéine marquée ont été, préalablement, centrifugés à 13 000 x g/min pendant 5 min à 4°C afin d'éliminer les agrégats. Puis, elles ont été incubés avec une concentration décroissante de protéine non marquée de 10 μ M à 0,3 nM (dilution en cascade au 1/2). Après incubation à l'abri de la lumière, environ 10 μ l de chaque échantillon ont été chargés dans un capillaire standard par capillarité. La mesure a été effectuée par l'appareil Monolith device NT.115 MST. Les mesures ont été réalisées avec les réglages suivants, puissance de LED : 90%, puissance de la thermophorèse : 20%, 40% ou 80% selon les VHH, temps de puissance de la thermophorèse : 30 secondes et temps d'arrêt de la thermophorèse : 5 secondes.

Les mesures des constantes de dissociation à l'équilibre (K_d) ont été obtenues en utilisant l'équation quadratique dérivée de la loi d'action de masse :

$$F_{\text{norm}} = \frac{[A] + [B] + K_d - \sqrt{([A] + [B] + K_d)^2 - 4[AB]}}{2[B]}$$

A correspond au composé titré, B au composé dont la concentration reste constante et dont la fluorescence est mesurée.

9. Cytométrie en flux

9.1. Principe général

La cytométrie en flux est une technique qui combine trois systèmes : un système fluide, un système optique et un système électronique. Le système fluide permet de séparer les cellules en suspension et de les aligner une à une devant le système optique. Le système optique comprend un laser (source d'excitation) ainsi que des miroirs et des filtres qui permettent de récupérer les signaux optiques, ensuite convertis en signaux électriques par les photomultiplicateurs. Cette technique permet de différencier les cellules selon trois paramètres : la taille (diamètre, *FSC-forward scatter*) par la diffusion de la lumière dans l'axe, la granularité (*SSC-side scatter*) par la réfraction de la lumière à angle droit et enfin le ou les marquages par l'intensité de fluorescence. (Figure 12)

Dans notre projet, la taille et la granularité permettent de sélectionner les cellules individuelles vivantes et le paramètre d'intérêt est la fluorescence émise.

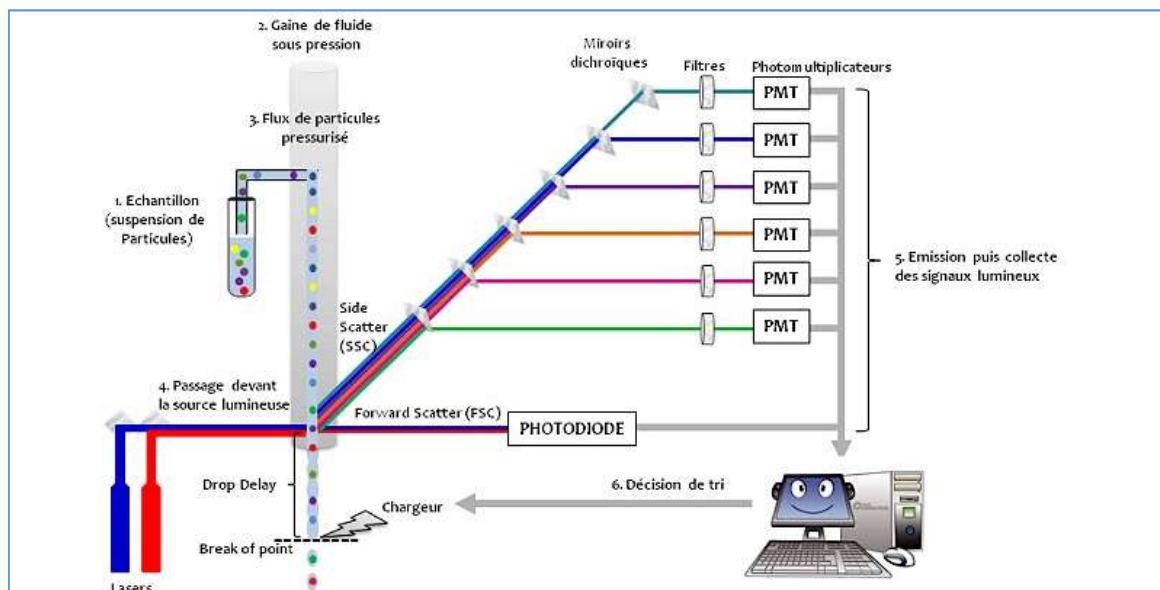


Figure 13 : Principe de la cytométrie en flux

9.2. Détermination de l'expression du récepteur de la transferrine sur les différentes lignées cellulaires

Les cellules des 5 lignées (PANC1, HepG2, K562, HMC1 et B16F10) ont été incubées à la concentration de 2×10^6 cellules/mL dans un milieu RPMI sans sérum pendant 30 min à 37°C afin d'éliminer la transferrine résiduelle. 4×10^5 cellules/puits de chaque solution cellulaire ont étéensemencées dans 4 puits d'une plaque de 96 puits. La transferrine humaine Alexa fluor® 488 (Life Technologies) a été ajoutée dans 2 puits de chaque type cellulaire à la concentration de 312.5 nM/puits (soit 1 µL d'une solution de transferrine à 5 mg/mL, PM = 80 kDa) et incubée à 37°C pendant 20 min. Puis les cellules ont été lavées à 3 reprises (après centrifugation à 400xg pendant 4 min) avec un tampon froid composé de Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), 20 mM de glucose et 1% de BSA. Si besoin, les cellules ont été fixées avec de la PFA 4%. Les cellules ont, ensuite, été analysées par cytométrie en flux avec l'appareil Cytoflex® (Beckman), en utilisant le laser à 488nm et le filtre de bande passante 525/40.

9.3. Analyse de l'interaction VHH – transferrine sur cellules par cytométrie en flux

Les cellules ont été préparées comme précédemment (cf. 9.2). En parallèle, la transferrine humaine (Life Technologies) a été incubée avec un VHH lié à la protéine GFP ou marqué avec de l'Alexa fluor® 647 (Life Technologies) pendant 20min à température ambiante à l'abri de la lumière. Puis le mélange (VHH-Tf) a été incubé sur les cellules pendant 20 min à 37°C. La même quantité de VHH a été incubée sur cellules sans transferrine pour servir de témoin. Puis les cellules ont été lavées et fixées si besoin comme précédemment (cf. 9.2). Les cellules ont, ensuite, été analysées par cytométrie en flux avec l'appareil Cytoflex® (Beckman), en utilisant le laser à 488nm et le filtre de bande passante 525/40 pour les VHH liés à la GFP et le laser à 638nm et le filtre de bande passante 660/20 pour les VHH marqués par le fluorophore Alexa fluor® 647.

10. Microscopie confocale

La veille de l'observation au microscope confocale, 4×10^5 cellules PANC1 sontensemencées dans une chambre de culture cellulaire Lab-Tek™ (Nunc) à 8 compartiments.

Le lendemain un mélange transferrine-VHH a été incubé 20min à RT. Le milieu des cellules a été remplacé par du DPBS, pour diminuer l'auto-fluorescence du milieu. Les cellules ont, ensuite, été incubées avec le mélange VHH-Tf. L'observation a été réalisée à 37°C, avec le grossissement, les lasers et les filtres adaptés.

11. Etude in vivo du VHH D10-sfGFP et du VHH C3-sfGFP

Les protocoles de recherche des études in vivo ont été préalablement approuvés par le comité d'éthique en expérimentation animale rattaché à Aix Marseille Université, CE 14, sous l'enregistrement #2017030609535653 et cette étude est en accord avec les recommandations du comité de coordination britannique de recherche contre le cancer (UKCCR) pour le bien-être des animaux en oncologie expérimentale. Les études ont été réalisés sur des souris femelles immunodéprimées de 6 semaines de type *swiss nude* (Charles River Laboratoires, France). Afin de les familiariser les souris à leur nouvel environnement, à leur réception les souris ont été placées pendant quatorze jours dans des cages filtrées, stérilisées au sein d'une armoire d'animalerie thermostatique à 32°C sous pression positive et avec un cycle jour-nuit. Tout au long des études, les souris ont été surveillés quotidiennement. Les souris ont été alimentés avec un aliment complet autoclavable (D04, Scientific Animal Food and Engineering). Concernant l'étude du VHH C3, l'eau de boisson a été supplémentée en paracétamol (80 mg/kg) à partir du moment où les souris ont été xénogreffées afin de prévenir leurs douleurs.

Deux études différentes ont été réalisées in vivo : étude de la demi-vie du VHH D10 et étude de la biodistribution du VHH C3.

12. Etude de la demi-vie du VHH D10

Cette étude comprend deux lots (lot A et lot B) de 5 souris.

12.1. Administration

Après acclimatation, les souris du lot A, groupe contrôle, ont reçu 0.42 mg (250 µL à 1.67 mg/mL soit 21 mg/kg) de GFP, trois souris par voie intra-veineuse (IV, intra caudale)

et deux par voie intra-péritonéale (IP). Les souris du lot B ont reçu 0.627 mg (110 μ L à 5.7 mg/mL soit 14 mg/kg) de VHH D10 marqué GFP.

12.2. Suivi *in vivo* du VHH D10 et de la GFP par imagerie à fluorescence

Une cinétique à quatorze temps (0.65h à 336h) a été réalisée sur les 10 souris afin d'évaluer semi-quantitativement la demi-vie du VHH D10 marqué GFP en IV et en IP. Pour suivre la fluorescence, à chaque temps, quatorze images ont été acquises à des longueurs d'onde différentes (520 nm à 780 nm) et une séparation spectrale a été effectuée afin de discriminer les signaux et d'éliminer l'auto-fluorescence des tissus et de l'alimentation des longueurs d'onde d'intérêt. L'acquisition et l'analyse des données ont été effectuées avec un imageur IVIS[®] spectrum et de son logiciel Living Image 4.2 (Perkin Elmer). (Figure 13)

La demi-vie semi-quantitative du VHH D10 marqué GFP a été ensuite déterminée graphiquement pour chaque type d'administration.

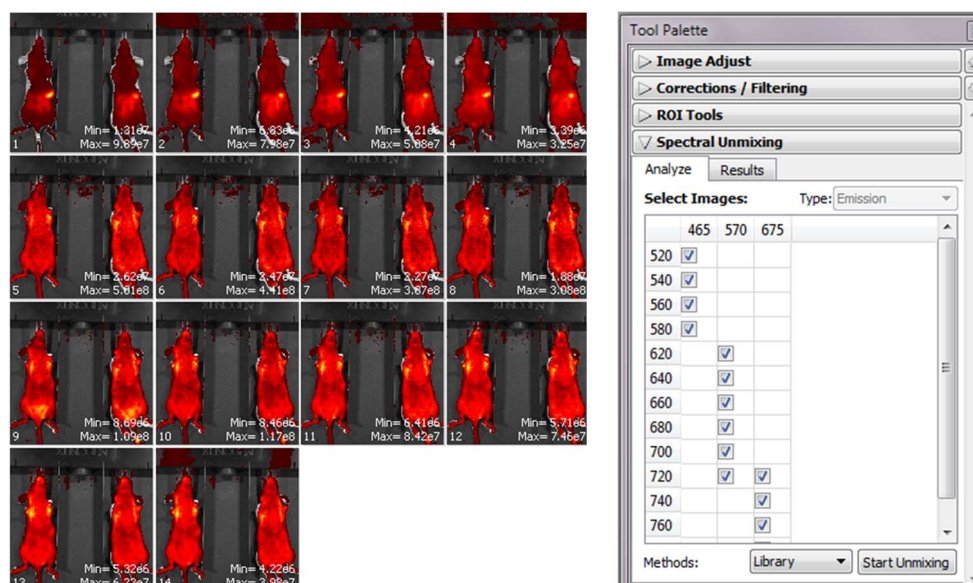


Figure 14 : Les 14 images obtenues lors d'une acquisition après séparation spectrale en mode automatique avec l'IVIS[®] spectrum et le logiciel Living Image 4.2 (Perkin Elmer).

13. Etude de la biodistribution du VHH C3

Cette étude comprend deux lots (lot C et lot D) de 10 souris.

13.1. Xénogreffe de cellules PANC1

Les cellules PANC1-mCherry ont été suspendues dans 40% de milieu RPMI et 60% de matrice Matrigel® (Corning) puis maintenues dans la glace jusqu'à la greffe. Quatorze jours après leur arrivée au laboratoire, les souris ont été greffées en sous-cutané sur le flanc gauche avec 50 μ L de cette suspension soit 200 000 cellules/souris.

13.2. Administration

Dix jours après la xénogreffe, une solution de 1.14 mg de VHH C3 marqué GFP (150 μ L à 7.6 mg/mL) a été administrée en IV aux 10 souris du lot C. Une solution de 1.14 mg de VHH C3 marqué GFP (150 μ L à 7.6 mg/mL) a été préalablement reconstituée avec 3.75 mg d'hTf (150 μ L à 25 mg/mL), incubée 30 min à 1 h à RT, à l'abri de la lumière, puis administrée (300 μ L par souris) aux 10 souris du lot D en IV.

13.3. Suivi in vivo du VHH D10 et de la GFP par imagerie à fluorescence

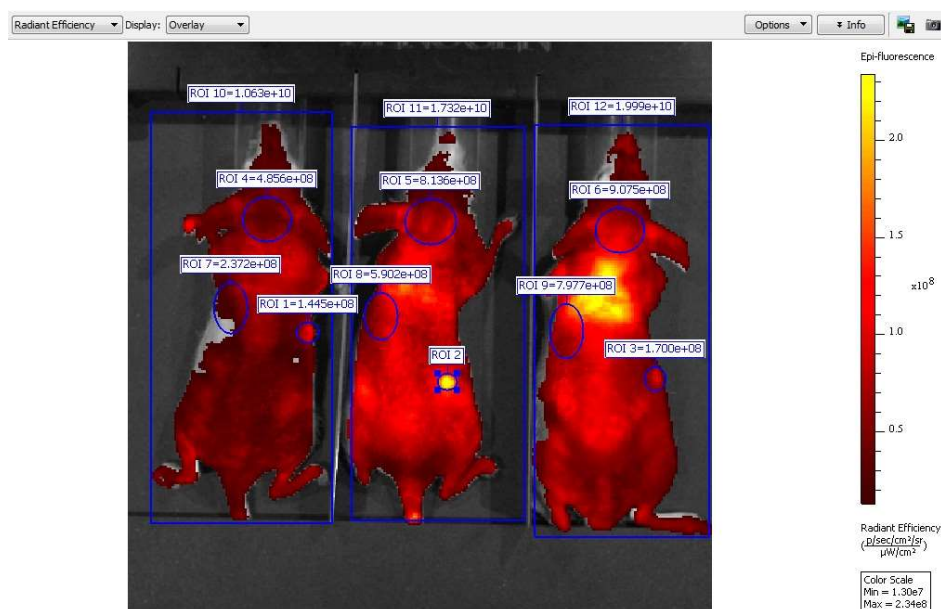


Figure 15 : Sélection des 4 ROI : tumeur, cerveau, rate/foie et corps dans sa totalité avec le logiciel Living Image 4.2 (Perkin Elmer).

Le suivi de la fluorescence a été réalisé sur 23 temps de 0.08 h à 336 h sur les 10 souris xénogreffées afin d'évaluer la biodistribution du VHH C3 marqué GFP en présence ou non d'hTf. Pour suivre la fluorescence, à chaque temps, quatorze images ont été acquises à des longueurs d'onde différentes (520 nm à 780 nm) et une séparation spectrale a été effectuée en mode automatique afin de discriminer les signaux et d'éliminer l'auto-fluorescence des tissus et de l'alimentation des longueurs d'onde des fluochromes d'intérêt : mCherry, pour localiser la tumeur et GFP, pour suivre la localisation du VHH. L'acquisition et l'analyse des données ont été effectuées avec un imageur IVIS® spectrum et son logiciel Living Image 4.2 (Perkin Elmer) (Figure 13). Les régions d'intérêt (ROI) ont été sélectionnées sur l'image du signal GFP après la séparation spectrale. Les quatre ROI qui ont systématiquement été mesurés sont : la fluorescence totale, le cerveau, la tumeur et la région rate/foie (Figure 14). Finalement, les résultats ont été exprimés en % d'absorption par rapport à la fluorescence corporelle totale. Les différences de distribution ont été testées sur Sigma Stat 2.0. (Jandel Scientific) en utilisant l'analyse de variance à un facteur ou test t, en fonction de la distribution des données. Une valeur $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

Résultats

1. Immunisation, construction de la banque et sélection

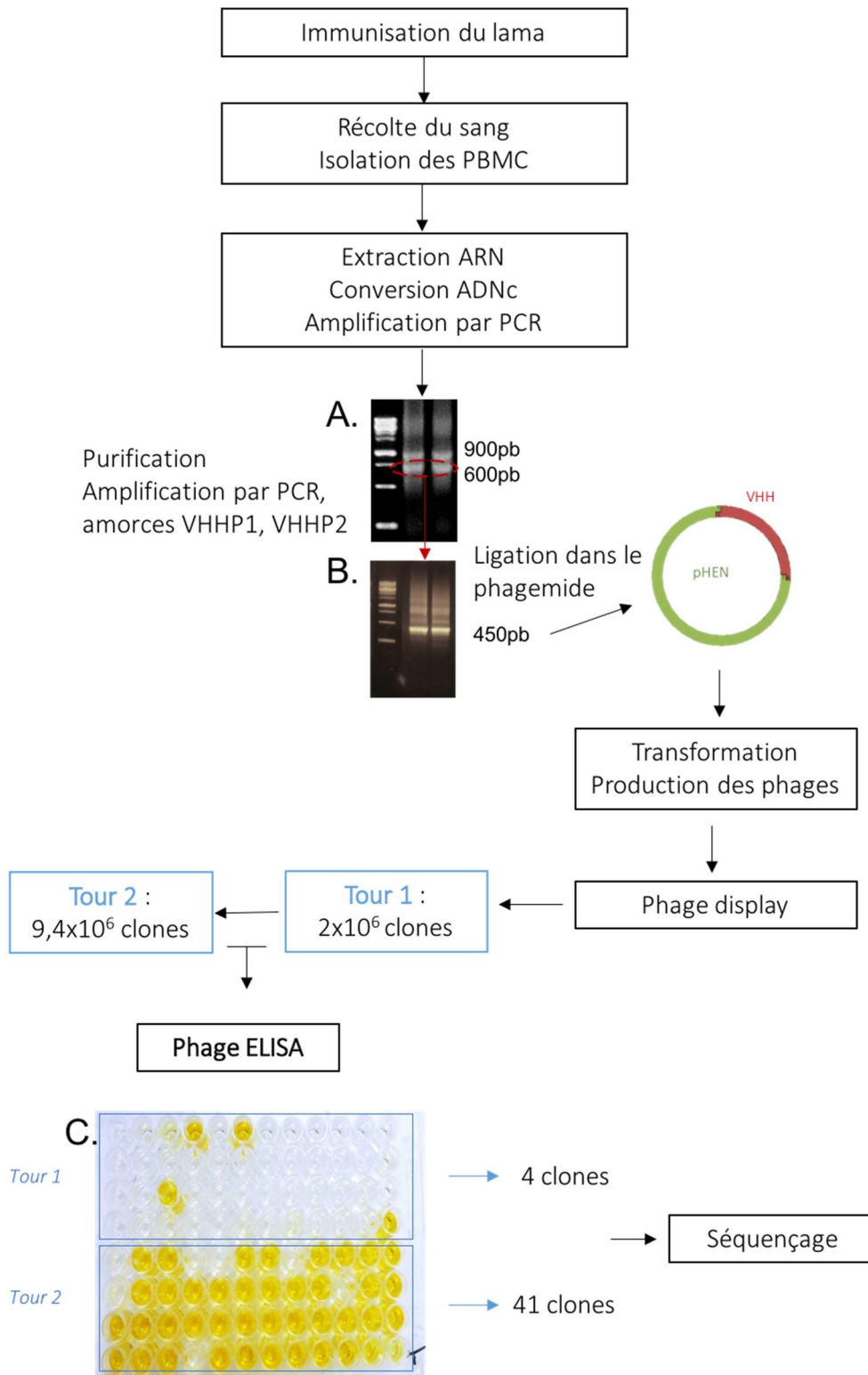


Figure 16 : Schéma des résultats de l'immunisation, construction de la banque, production, sélection sur transferrine humaine et phage ELISA

Les ARNm des VHH sont présents dans les lymphocytes de camélidé immunisé avec la holo-transferrine humaine. Afin de récupérer les séquences d'ADN des VHH du répertoire immunitaire du lama, son sang a été prélevé et les cellules mononuclées sanguines (PBMC) ont été isolées. L'ARN total des PBMC a été extrait puis converti en ADNc par RT-PCR. Une première PCR a été réalisée afin de séparer les VHH des VH. À partir du gel d'agarose 1,5% (Figure 15, A), la bande à 600 pb, contenant l'ADN des VHH et des fragments de CH2, a été purifiée. La bande d'ADN purifiée a été amplifiée avec des amorces contenant les sites de restriction NcoI et NotI et s'hybridant avec les framework des VHH. L'ADNc des VHH autour des 450pb (Figure 15, B) a été purifié et digéré par les enzymes de restriction adéquates puis ligué dans le phagemide pHEN 1 préalablement digéré. Des bactéries TG1 ont, ensuite, été transformées par électroporation avec le produit de la ligation et les phages exprimant des VHH fusionnés à la protéine p3 de leur capsid ont été produits.

1.1. Sélection A, 2 tours sur transferrine humaine (hTf)

Le premier tour de la sélection A a été réalisé sur de la transferrine humaine et 2×10^6 clones indépendants ont été obtenus. Le deuxième tour de la sélection A a été également réalisé sur de la transferrine humaine et $9,4 \times 10^6$ clones indépendants ont été obtenus. À l'issue de ces deux tours, 48 clones de chaque tour ont été repiqués et les phages ont été produits afin d'effectuer un phage ELISA (Figure 15, C et Tableau 2) sur de la transferrine humaine. Ce phage ELISA a révélé la présence de 4 clones du tour 1 et 41 clones du tour 2 positifs, soit 45 phages-VHH qui interagissent à la transferrine humaine. Ces 45 clones ont, ensuite, été envoyés au séquençage.

	Abs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tour 1	A	-0,1	-0,1	-0,4	2,9	-0,1	2,9	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1
	B	-0,1	-0,1	-0,2	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,2	-0,1	-0,1
	C	-0,1	-0,1	3	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1
	D	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,4	-0,1	-0,1	-0,1
Tour 2	E	-0,1	3,2	3,1	-0,1	-0,1	2,8	3	-0,1	2,7	3	2,7	2,8
	F	-0,2	3	3	3,2	3	3	2,8	2,9	3,1	-0,1	2,5	2,6
	G	2,3	2,6	3,2	3,1	3,2	1,4	3,3	3,1	2,9	3,4	2,3	1,8
	H	2,5	3,2	3	-0,1	2,6	2,7	3	2,7	2,6	0,7	-0,9	0

Tableau 2 : Phage ELISA à partir des phages de la sélection A (2 tours sur transferrine hTf).

Parmi les 45 clones envoyés au séquençage, 19 séquences différentes ont été identifiées (Figure 16). Les séquences diffèrent notamment au niveau du CDR3 qui est le

principal domaine impliqué dans l'interaction avec l'épitope (De Genst et al. 2006). Les quatre substitutions dans le FR 2 confirment que ce sont des séquences de VHH et rendent les VHH plus hydrosolubles que les VH de par leur nature hydrophile : en position 37, une phénylalanine (F) ou une tyrosine (Y) à la place d'une valine ; en position 44, un acide glutamique (E) ou une glutamine (Q) à la place d'une glycine ; en position 45, une arginine (R) à la place d'une leucine et en position 47, une lysine (L) ou une phénylalanine (F) à la place d'un tryptophane (W).

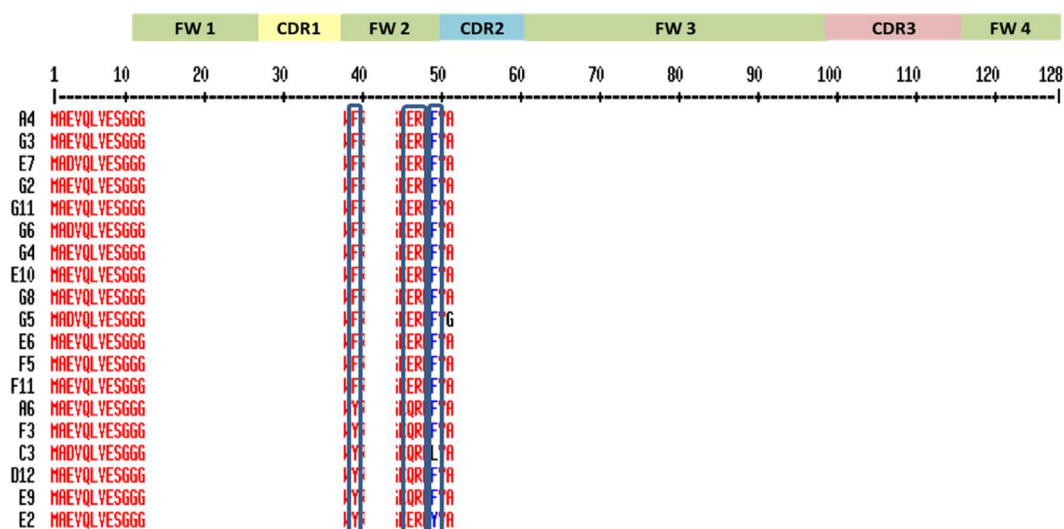


Figure 17 : Séquences des 19 VHH différents issus de la sélection A. Les acides aminés encadrés en bleu sont les 4 mutations qui différencient les VHH des VH. Les séquences ont été cachées par mesures de confidentialités.

1.2. Sélection B, 3 tours : tours 1 et 2 sur transferrine de souris (mTf) et tour 3 sur transferrine humaine (hTf)

Au terme du premier tour de sélection sur la transferrine de souris, la sous bibliothèque était composée de $5,1 \times 10^5$ clones indépendants et au deuxième tour de $5,4 \times 10^6$ clones indépendants. Les phages obtenus à partir du deuxième tour de sélection ont été incubés sur la transferrine humaine afin d'obtenir des VHH qui interagissent à la transferrine humaine et à la transferrine de souris.

		mTf												
		Abs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tour 1	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,3
	B	-0,2	0	-0,6	-0,6	0	0	-0,6	0	0	-0,9	-0,3	0	0
Tour 2	C	0	0,3	-0,8	-0,3	-0,1	-2	-1,7	-1	1,4	-2	-1,7	-0,7	0
	D	3,1	2,1	-0,8	-0,4	-1,3	-1,8	2	-0,2	-1,1	3,6	-0,3	3,4	0
Tour 3	E	3,7	2,2	3,6	-1,8	3,6	3,7	3,7	-2	-1,2	-2,1	3,6	-2,1	0
	F	-1,5	1,6	-1,1	2,4	0,1	-1,9	2,7	-0,2	3,6	-1,3	-1,1	-0,4	0
	G	3,6	-2	2	-2	2,1	-2	2,2	-0,8	1,2	3,6	3,7	-1,4	0
	H	-2	-1,2	1,5	-0,8	3	2,9	-2,5	0,7	3,6	-1,7	0	0	0

		hTf												
		Abs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tour 1	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,1	-0,3
	B	-0,2	0	-0,6	-0,5	0	0,1	-0,6	0	0	-1,3	-0,3	0	0
Tour 2	C	0	0	-1	-0,3	-0,1	-2,3	-1,7	-1,2	3,4	-2,5	-2	-0,7	0
	D	0,1	0,3	-0,5	-0,4	0,2	-2,3	3,5	0	-1,4	3,6	-0,3	3,3	0
Tour 3	E	3,8	3,3	3,4	-1,8	3,6	3,6	3,7	-2,3	-1,7	-2,1	3,6	-2	0
	F	-0,8	3,4	-0,8	3,3	2,4	-1,2	3,3	0,4	3,6	-1	-1,1	-0,1	0
	G	3,5	-1,1	3,3	-0,8	3,6	-0,6	2,2	-0,3	1,8	3,6	3,6	-1,4	0
	H	-1,8	-0,3	1,5	-0,3	3,6	3,8	-2,4	2,5	3,7	-1,1	0,4	0	0

Tableau 3 : Phage ELISA à partir des phages de la sélection B. (3 tours, 1^{er} et 2^{ème} sur mTf et 3^{ème} sur hTf) (A) Transferrine de souris immobilisée. (B) Transferrine humaine immobilisée.

Le phage ELISA a été réalisé sur la transferrine humaine et sur la transferrine de souris, en parallèle, avec 24 clones provenant du tour 1, 24 clones du tour 2 et 48 clones du tour 3.

À partir de la sélection B, 27 clones ont été positifs en phage ELISA sur la transferrine humaine et sur la transferrine de souris et 2 clones ont été uniquement positifs sur la transferrine de souris (Tableau 3).

2. Test ELISA protéine-protéine

Avant de réaliser le sous clonage et les purifications des VHH, les extraits périplasmiques des clones de VHH sélectionnés ont été évalués en ELISA.

2.1. VHH issus de la sélection A

Les extraits périplasmiques des 19 VHH ont été produits et déposés sur gel (Figure 17) afin de vérifier l'expression des VHH, PM d'environ 15kDa.

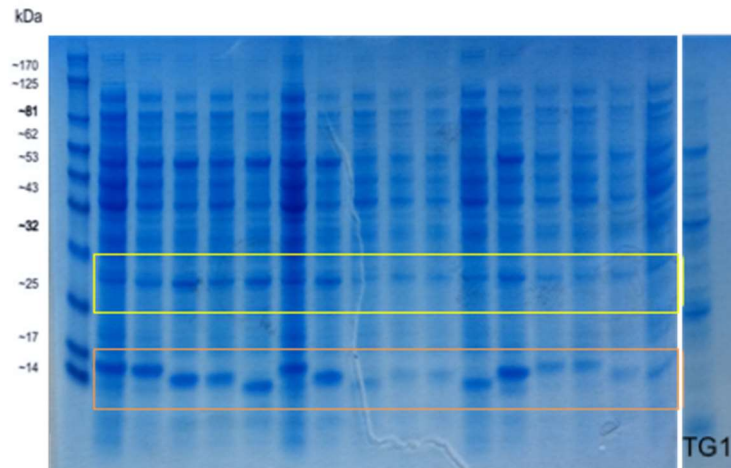


Figure 18 : SDS Page des extraits périplasmiques contenant VHH issus de la sélection A. Encadré orange, les VHH autour de 15kD. Encadré jaune, fusion protéine p3-VHH. À droite, contrôle négatif : TG1 non transformées.

		A4	A6	C3	D12	E2	E6	E7	E9	E10	F3	F5	F11
		G2	G3	G4	G5	G6	G8	G11					
	Abs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
hTrans	A	1,98	0,6	0,71	1,46	0,71	0,5	1,27	1,52	0,93	0,38	0,57	0,56
	B	1,91	1,47	1,65	1,24	1,4	0,28	1,5					
mTrans	C	0	-0,01	0	-0,01	0,1	-0,02	0	-0,02	-0,05	-0,19	-0,01	-0,01
	D	0,01	0,01	-0,03	0,07	-0,04	-0,01	-0,01					
hAlb	E	-0,01	-0,11	0,01	0	-0,01	-0,02	-0,01	-0,02	-0,08	-0,3	-0,01	-0,02
	F	0	-0,02	-0,03	0,01	-0,05	-0,01	-0,02			0,03	0,09	0,1

Tableau 4 : ELISA avec extraits périplasmiques de la sélection A.

Sur les 19 VHH de la sélection A, 17 semblent spécifiques à la transferrine humaine en extrait périplasmique selon le test ELISA (Tableau 4). Afin de diminuer le nombre de VHH à sous cloner et à purifier, les séquences des 17 VHH positifs ont été analysées et regroupées par classe en fonction de leur homologie de séquence. Pour la suite du projet, 6 VHH ont été sélectionnés : A4, C3, D12, E2, E9, F11 et G5.

2.2. VHH issus de la sélection B

Les 27 clones positifs en phage ELISA ont été produits et les extraits périplasmiques ont été chargés sur gel pour vérifier la présence des VHH, PM autour de 15 kDa (Figure 18). La transferrine humaine et la transferrine de souris ont été immobilisées et un test ELISA a été réalisé avec les extraits périplasmiques des clones issus de la sélection B.

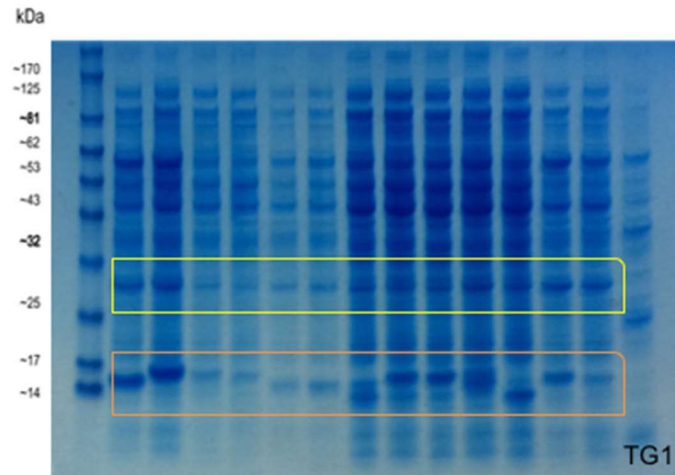


Figure 19 : SDS Page des extraits périplasmiques contenant VHH issus de la sélection B. Encadré orange, les VHH autour de 15kD. Encadré jaune, fusion protéine p3-VHH. À droite, contrôle négatif : TG1 non transformées

		C9	D7	D10	D12	E1	E2	E3	E5	E6	E7	E11	F2	
		F4	F7	F9	G1	G3	G5	G7	G9	G10	G11	H3	H5	
Prot immobilisée		H6	H8	H9	D12	D2	TG1							
		Abs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
mTf	A	0,04	0,03	0,15	0,17	0,14	0,03	0,16	0,16	0,12	0,11	0,18	-0,03	
	B	0,03	0,07	0,12	0,16	0,05	0,02	-0,16	-0,02	0,13	0,14	-0,08	0,03	
	C	0,02	-0,12	0,18	0,02	0,02	0							
hTf	F	0,34	0,37	0,57	0,57	0,47	0,41	0,54	0,55	0,57	0,53	0,54	0,2	
	G	0,36	0,44	0,57	0,5	0,23	0,39	0	0,26	0,55	0,52	0,01	0,31	
	H	0,3	0,11	0,57	-0,01	0,01	0							

Tableau 5 : ELISA avec les extraits périplasmiques de la sélection B. (3 tours, 1^{er} et 2^{ème} sur mTf et 3^{ème} sur hTf)

Ce test ELISA a révélé 13 clones positifs pour les deux transferrines, mTf et hTf (Tableau5). L'ADN de ces 13 clones a été envoyé au séquençage. À partir du séquençage, une seule nouvelle séquence, D10, a été identifiée.

Les 6 VHH issus de sélection A et le VHH issu de la sélection B : A4, C3, D12, E2, E9, F11, G5 et D10 ont été sous clonés dans le plasmide pET 23 NN sfGFP (NN : site des enzymes de restriction, Nco et NotI ; sfGFP : fusionné au gène de la *superfolder Green Fluorescent Protein*) puis purifiés par affinité sur colonne nickel suivie d'une étape de gel filtration. Les VHH ont été produits, dans un premier temps, fusionnés avec la GFP afin de pouvoir les suivre plus facilement par cytométrie en flux et par microscopie confocale.

3. Détermination de l'expression du récepteur de la transferrine sur les différentes lignées cellulaires

Préalablement à l'étude des VHH, l'expression du RTf1 par les 5 lignées : PANC1, HepG2, HMC2, K562 et B16F10, a été vérifiée par cytométrie en flux en quantifiant la transferrine Alexa fluor® 488 (Life Technologies®). Pour se faire, les cellules ont été incubées avec de la transferrine humaine Alexa fluor® 488 (Life Technologies®) à la concentration de 125 nM pendant 20min à 37°C puis analysées par cytométrie en flux. Les 5 lignées capturent la transferrine humaine, y compris la lignée de mélanome murin B16F10. Les lignées cellulaires classées par ordre croissant de capture de transferrine sont HMC1, B16F10, HepG2, K562 et PANC1 (Figure 19).

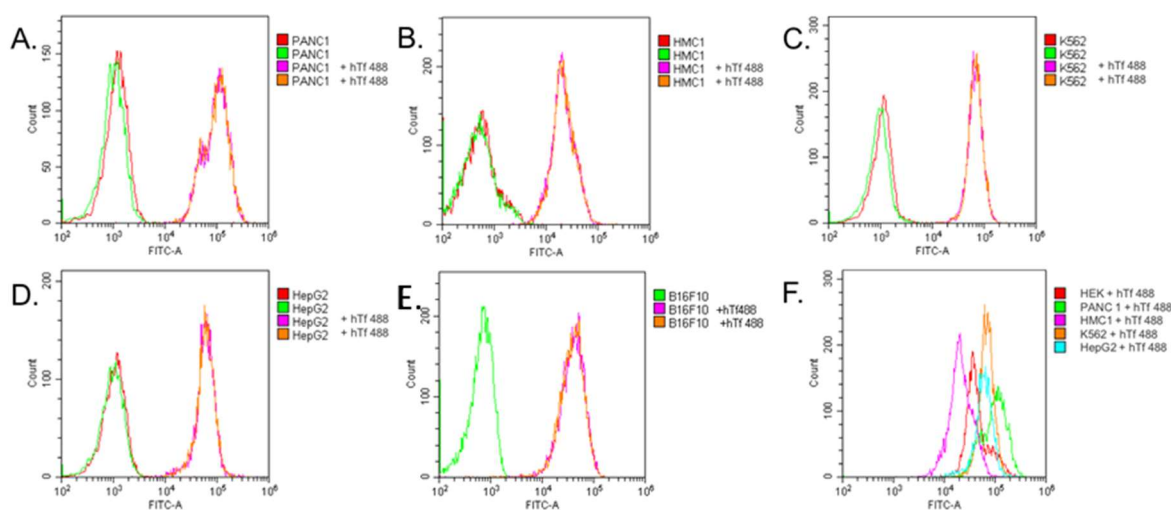


Figure 20 : Détermination de l'expression des récepteurs de la transferrine par les lignées cellulaires. Analyse par cytométrie en flux des cellules incubées avec de la transferrine humaine Alexa® fluor 488 (Life Technologies) à la concentration de 125 nM. (A) Lignée cellulaire PANC 1. (B) Lignée cellulaire HMC1. (C) Lignée cellulaire K562. (D) Lignée cellulaire HepG2. (E) Lignée cellulaire B16F10. (F) Récapitulatif de la capture de la transferrine humaine en fonction des lignées cellulaires.

4. Etude in vitro des VHH liés à la superfolder Green Fluorescent Protein

4.1 Détermination des constantes de dissociation par thermophorèse à micro-échelle

La transferrine humaine a été marquée avec de l'Alexa fluor® 647 NHS ester afin de réaliser les études d'interaction par MST. Les constantes de dissociation (Kd) des VHH C3, D12, E9 et D10 fusionnés à la GFP pour la transferrine humaine ont pu être estimées par cette méthode, respectivement, à 37 ± 3 nM, $102 \pm 9,5$ nM, $81,5 \pm 6,9$ nM et $440 \pm 65,2$ nM. Selon cette technique, les VHH A4, E2, F11 et G5 ne semblent pas interagir avec la transferrine humaine. (Figure 20)

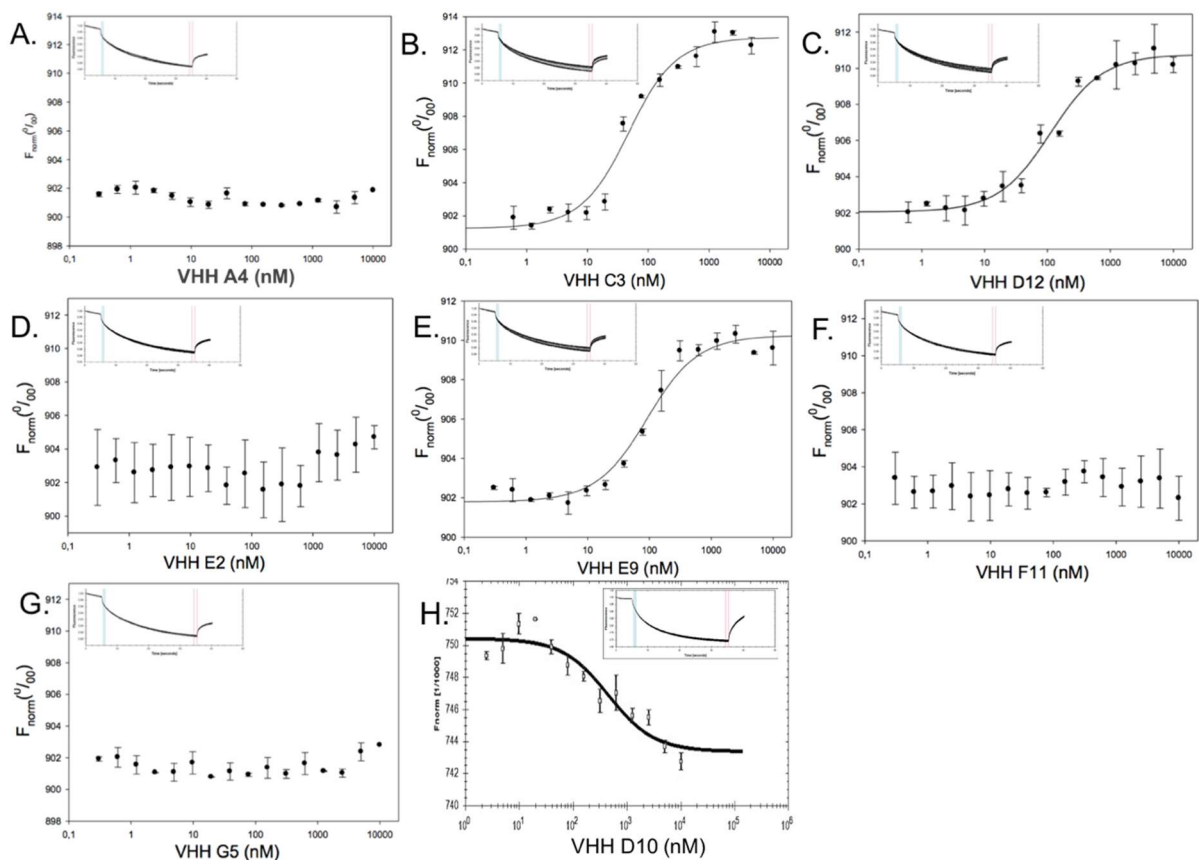


Figure 21 : Détermination des constantes de dissociation (Kd) par thermophorèse à micro-échelle des VHH fusionnés à la GFP pour la transferrine humaine. (A) VHH A4. (B) VHH C3. (C) VHH D12. (D) VHH E2. (E) VHH E9. (F) VHH F11. (G) VHH G5. (H) VHH D10.

4.2 Etude de l'interaction transferrine-VHH GFP sur la lignée PANC1

Pour caractériser fonctionnellement les VHH par cytométrie en flux, des cellules PANC1 ont été incubées 20min à 37°C avec un mélange composé de transferrine humaine (hTf) ou murine (mTf) non marquée à 312,5 nM et de VHH fusion GFP à 1,05 µM. En parallèle, une expérimentation contrôle contenant une quantité identique de VHH mais sans transferrine a été réalisée afin de détecter les VHH aspécifiques. En effet, si un VHH interagit avec un ou des composés cellulaires en absence de transferrine, la fluorescence émise sera supérieure au contrôle négatif (Figure III.7.G, PANC1-hTf NM, orange), autour de 10^3 UA. Le VHH pourra être considéré comme aspécifique. (Figure 21, Courbes rouges)

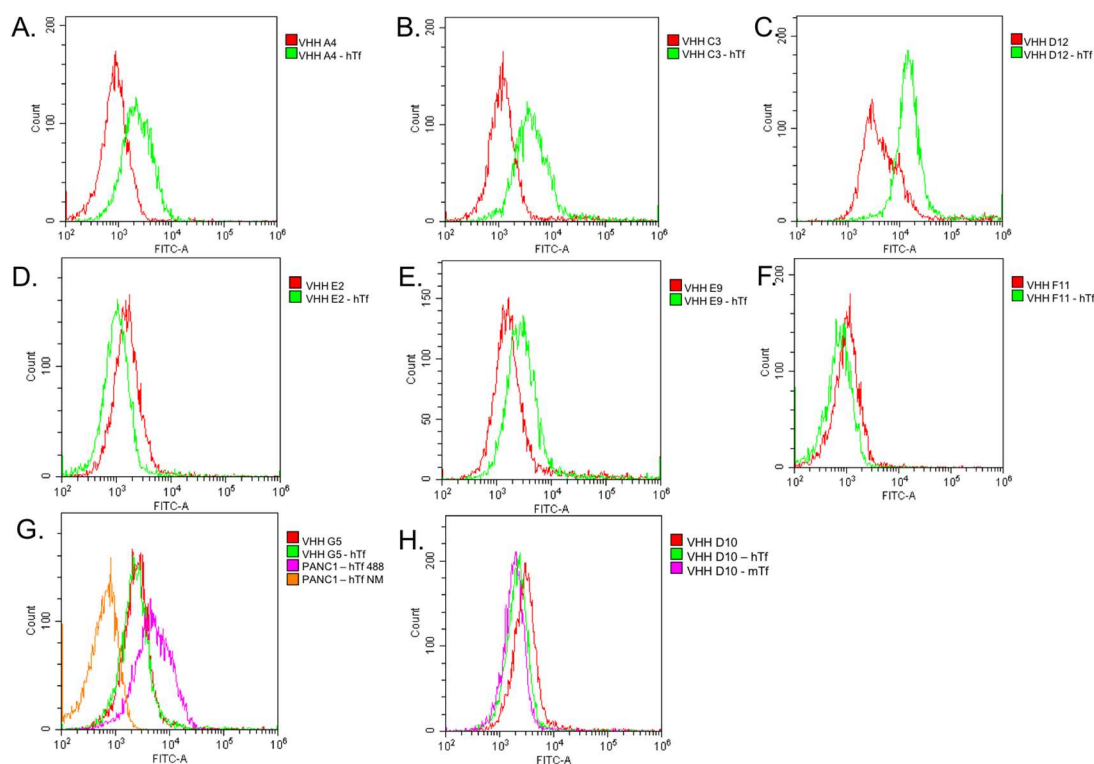


Figure 22 : Caractérisation des VHH anti-transferrine fusion GFP en présence de transferrine sur la lignée PANC1 par cytométrie en flux. Analyse par cytométrie en flux des cellules incubées avec : un VHH fusionné à la GFP à 1,05µM, *en rouge* et un mélange de transferrine (non marquée, humaine : hTf ou de souris : mTf) de 312,5nM et de VHH fusionné à la GFP de 1,05µM (soit VHH 3,3x - hTf 1x), *en vert*. **(A)** VHH A4. **(B)** VHH C3. **(C)** VHH D12. **(D)** VHH E2. **(E)** VHH E9. **(F)** VHH F11. **(G)** VHH G5. **(H)** VHH D10 issu de la sélection B, ELISA avec extrait périplasmique positif avec hTf et mTf.

En présence de transferrine, si le VHH n'est pas considéré comme aspécifique lors de l'expérimentation de contrôle, il existe trois possibilités :

- (1) le VHH se fixe à la transferrine et n'empêche pas l'interaction transferrine-RTf
- (2) le VHH se fixe et empêche l'interaction transferrine-RTf
- (3) le VHH ne se fixe pas à la transferrine.

Si la fluorescence émise par les cellules est positive (supérieure à 10^3 UA), le complexe VHH-transferrine se fixe au RTf. La fluorescence de la GFP du VHH est donc observable, que le VHH soit à la surface de la cellule ou internalisé (1). À l'inverse, si la fluorescence émise par les cellules est négative (autour de 10^3 UA), les interprétations (2) et (3) restent possibles : le VHH se fixe et empêche l'interaction transferrine-RTf ou le VHH ne se fixe pas à la transferrine.

Selon cette expérimentation,

- Le VHH G5 est aspécifique
- Les VHH A4, C3, D12 et E9 semblent spécifiques à la transferrine et interagissent avec celle-ci sans empêcher sa fixation au RTf
- Les VHH E2, F11 et D10 ne sont pas caractérisables avec ce test, soit ils ne se fixent pas à la transferrine soit ils se fixent et bloquent l'interaction Tf-RTf. (Figure 21).

Afin de caractériser les VHH E2, F11 et D10, un test de compétition a été réalisé. Le VHH C3, étant positif par cytométrie en flux et ayant obtenu la plus haute affinité par thermophorèse à micro-échelle ($K_d = 37 \pm 3$ nM, cf II.4.1), a été choisi pour réaliser un test de compétition avec les VHH en question. Pour cette expérimentation, les VHH E2, F11 et D10 ont été incubés à différentes concentrations de 625 nM à 10 μ M avec une quantité fixe de VHH C3 à 625 nM et de transferrine à 312,5 nM avant d'être incubés sur cellules.

S'il n'y a pas de compétition entre le VHH à tester et le VHH C3, le VHH ne se fixe pas à la transferrine. À l'inverse, si le VHH se fixe à la transferrine et bloque l'interaction transferrine-RTf, le signal de fluorescence décroît lorsque la concentration en VHH « à tester » augmente.

Les résultats obtenus montrent que le seul VHH qui est capable de modifier la fluorescence émise par le VHH C3, est le VHH D10, ce qui suggère qu'il bloque l'interaction entre la transferrine et son récepteur (Figure 22.C). Par ailleurs, la fluorescence du VHH C3-

GFP est constante quel que soit la concentration en VHH E2 et F11, par conséquent, ces deux derniers ne semblent pas interagir avec la transferrine (Figure 22.A et B).

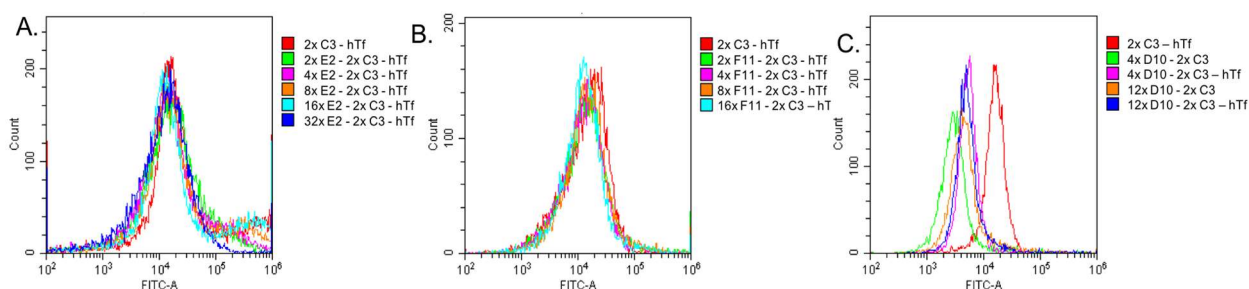


Figure 23 : Etude de compétition pour caractériser les VHH anti-transferrine E2, F11 et D10 en présence de transferrine sur la lignée PANC1 par cytométrie en flux. Analyse par cytométrie en flux des cellules incubées avec un mélange de transferrine (non marquée, humaine : hTf) de 312,5 nM, du VHH C3 fusionné à la GFP de 625 nM et des 3 VHH étudiés E2, F11 et D10 à différentes concentrations de 625 nM à 10 μ M. **(A)** VHH E2. **(B)** VHH F11. **(C)** VHH D10.

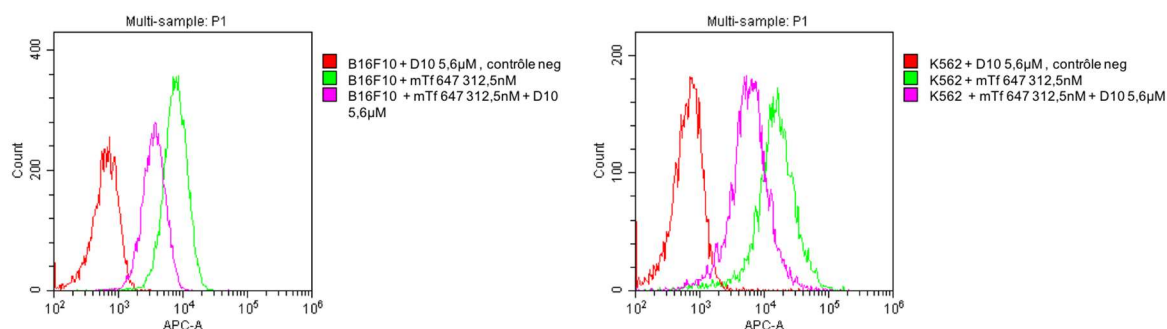


Figure 24 : Etude pour caractériser le VHH anti-transferrine D10 en présence de transferrine de souris sur les lignées B16F10 (à gauche) et K562 (à droite) par cytométrie en flux. Analyse par cytométrie en flux des cellules incubées avec un mélange de transferrine de souris marquée avec Alexa fluor® 647 NHS ester de 312,5 nM et le VHH D10.

Dans le but, de vérifier que le VHH D10 bloque également l'interaction entre la transferrine de souris (mTf) et le RTf, la mTf a été marquée par de l'Alexa fluor® 647 NHS ester. Ce test a été réalisé sur une lignée cellulaire humaine (K562) et une lignée cellulaire de souris (B16F10).

Sur les deux types cellulaires, la présence du VHH D10 impacte sur la fluorescence de l'Alexa fluor® 647 de la mTf. Par conséquent, le VHH D10 bloque, également, l'interaction mTf-RTf. (Figure 23)

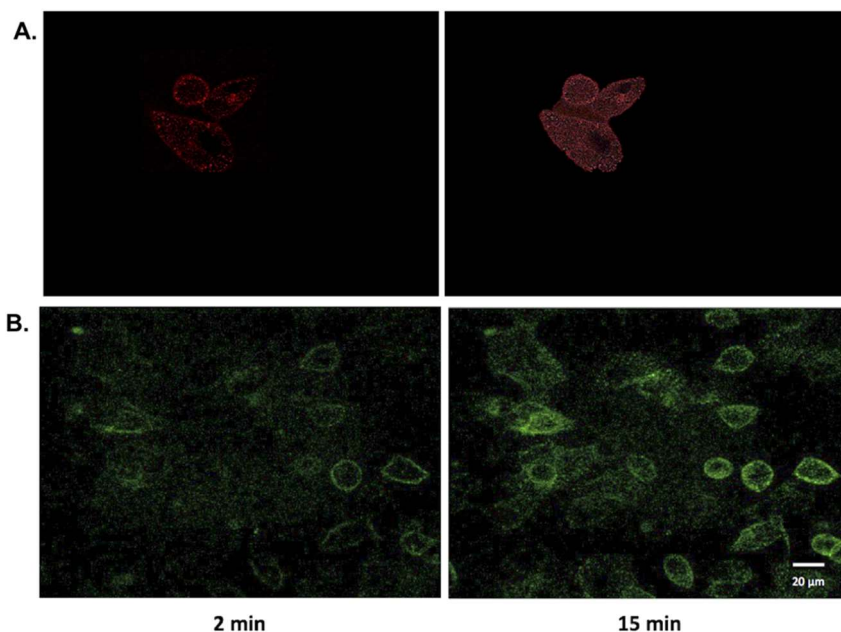


Figure 25 : Image de microscopie confocale du VHH C3 lié à la GFP sur les cellules PANC1. (A) Tf humaine marquée Alexa fluor® 488 (NHS ester). (B) Mélange Tf-VHH C3 GFP. À gauche, image 2 min après incubation. À droite, image 15 min après incubation.

Le VHH C3 fusionné à la GFP accompagné de la transferrine (non marquée) en concentration équimolaire (170 nM) a été observé en microscopie confocale, il se fixe à la membrane cellulaire, et est internalisé. (Figure 24.B) Un contrôle avec 49 nM de transferrine humaine, marquée par de l'Alexa fluor® 647 NHS ester, a été réalisé (Figure 24.A).

Pour la suite du projet, les VHH sélectionnés à partir de ces résultats sont les VHH C3, E9, D10 et D12. Dans le but de les tester *in vivo*, chez la souris, les VHH ont été produits avec une cystéine en C-terminal afin d'éliminer la fusion GFP et de pouvoir les marquer avec des fluorophores maleimides.

5. *Etude in vitro des VHH Cystéine C-terminal*

Les constantes d'affinité des VHH E9 et D10 non marqués pour la transferrine humaine et la transferrine de souris ont été étudiées par thermophorèse à micro-échelle. Le VHH E9 présente un K_d de 8,4 nM pour la transferrine humaine. Le VHH D10 présente un K_d de 0,418 nM pour la transferrine humaine et de 360 nM pour la transferrine de souris (Annexes, Figure C). Par conséquent, les affinités obtenues pour les VHH en fusion avec la GFP (cf rubrique Matériels et méthodes, 4.1.) sont de 10 à 1 000 fois inférieures à celles obtenues pour les VHH seuls. Cette perte d'affinité est probablement dû à un encombrement stérique engendré par la GFP.

5.1 Marquage des VHH

Les VHH D10 et E9 ont été marqués avec de l'Alexa fluor® 647 maleimide dans un tampon HEPES 20 mM à pH7 et NaCl 300 mM. Le ratio fluorophore/VHH en phase d'incubation est de 3,26. Après passage sur la colonne de dessalage (NAP-5 GE Healthcare), la solution de VHH D10 récupérée est de 3,5 μ M, le ratio de marquage fluorophore/VHH est de 1,4 et concernant le VHH E9, sa concentration est de 4,2 μ M et le ratio de marquage de 0,6.

5.2 Caractérisation des VHH par cytométrie en flux

Afin de vérifier que les VHH conservent leur interaction avec la transferrine, les VHH marqués par fluorophore Alexa 647 maleimide (Alexa C 647) ont été, préalablement, incubés avec de la transferrine, puis sur cellules, et analysés par cytométrie en flux.

Le VHH E9 C647 a été incubé à différentes concentrations : 35 nM, 87,5 nM et 175 nM avec de la transferrine humaine non marquée à 312,5 nM et analysé avec la bande passante 660/20 nm afin d'observer le VHH.

Le VHH D10 C647 a été incubé à différentes concentrations 319 nM, 797,5 nM, 1,6 μ M, 2,39 μ M et 3,1 μ M avec de la transferrine humaine Alexa fluor® 488 à 312,5 nM et analysé avec la bande passante 525/40 nm afin d'observer la transferrine.

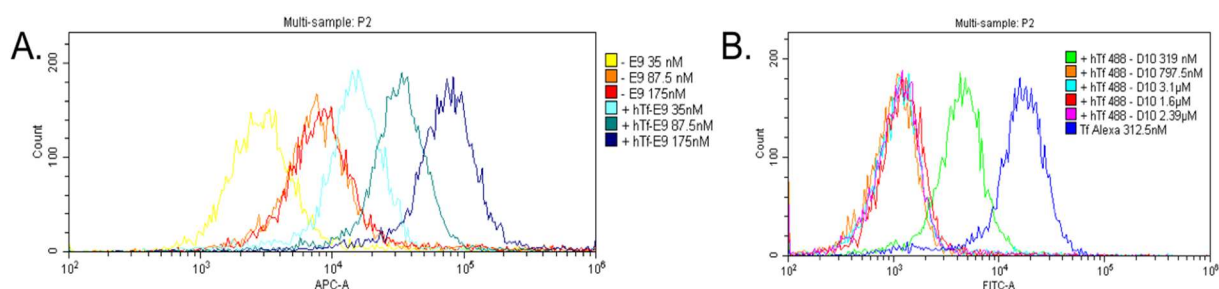


Figure 26 : Caractérisation des VHH anti-transferrine E9 et D10 marqué par de l'Alexa fluor® 647 maleimide en présence de transferrine sur la lignée PANC1 par cytométrie en flux. Analyse par cytométrie en flux des cellules incubées avec un mélange de transferrine humaine (non marquée : hTf ou marquée par Alexa fluor® 488 : hTf 488) de 312,5nM et de VHH (A) VHH E9, en jaune, orange et rouge : contrôle négatif, VHH sans transferrine ; en dégradé de bleu, mélange hTf avec différentes concentrations de VHH E9 C647. (B) VHH D10, en bleu foncé : contrôle, hTf 488 seule.

Selon cette expérimentation, les VHH E9 et D10 conservent leur interaction à la transferrine humaine avec le marquage C647 ainsi que leur fonction. Le VHH E9 fixe la transferrine sans bloquer son interaction avec le récepteur à la transferrine. Le VHH D10 fixe la transferrine et bloque son interaction avec son récepteur, ce blocage est à son maximum à partir de 797,5nM (Figure 25).

Néanmoins, le marquage ne semble pas suffisant pour observer ces VHH par microscopie confocale. Afin d'augmenter la capacité de marquage, trois gènes synthétiques des VHH C3, E9 et D10, comportant trois acides aminés mutés en cystéine et une cystéine en C-terminal, ont été commandés. Le choix des acides aminés mutés a été réalisé en s'appuyant sur une publication (Pleiner et al. 2015). Ces VHH ont, par la suite, été sous clonés dans le plic28 et sont en cours de purification.

6 Etude *in vivo* du VHH D10 lié à la superfolder Green Fluorescent Protein

6.1 Etude de la cinétique du VHH D10 GFP après administration intrapéritonéale

En se basant sur les mesures des vingt-quatre premières heures et par détermination graphique la demi-vie d'une dose de 0.627 mg de VHH D10 en fusion à la GFP en administration IP est de 4,4 heures, selon cette étude (Figure 26).

L'aire sous la courbe de 0 à 24h, reflétant l'exposition, par la méthode des trapèzes est de $6,48 \times 10^{11}$ p/sec.h⁻¹ suite à une administration IP d'une dose de 0.627 mg de VHH D10 en fusion à la GFP.

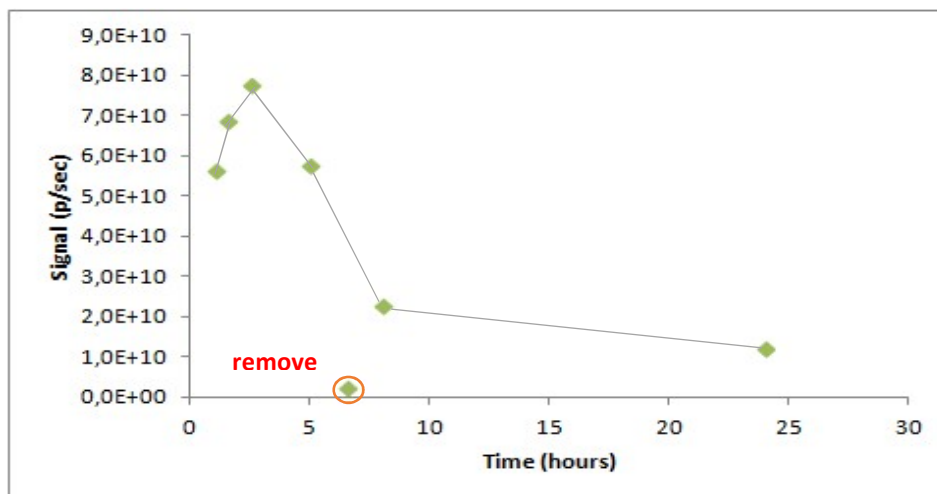


Figure 27 : Détermination graphique de la demi-vie du VHH D10 GFP après administration IP.

6.2 Etude de la cinétique du VHH D10 GFP après administration intraveineuse

En se basant sur les mesures des vingt-quatre premières heures et par détermination graphique la demi-vie d'une dose de 0.627 mg de VHH D10 en fusion à la GFP en administration IV semble être de 2.3 heures (Figure 27).

L'aire sous la courbe de 0 à 24h, par la méthode des trapèzes est de 2.86×10^{11} p/sec.h⁻¹ suite à une administration IV d'une dose de 0.627 mg de VHH D10 en fusion à la GFP.

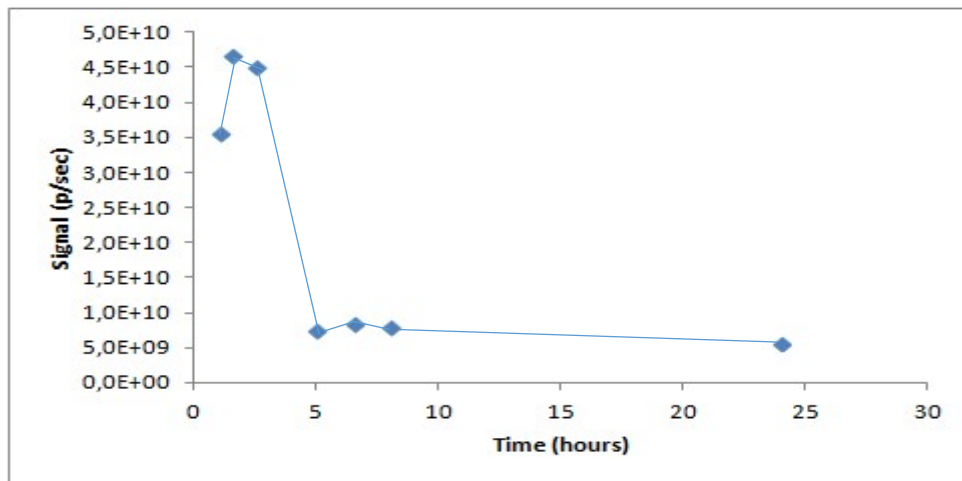


Figure 28 : Détermination graphique de la demi-vie du VHH D10 GFP après administration IV.

L'étude de la cinétique du VHH D10 a montré une différence en fonction de la voie d'administration. En effet, l'exposition du VHH D10 est augmentée de +126% et la demi-vie est augmentée de 91% lors d'une administration intrapéritonéale par rapport à l'intraveineuse. Ces différences s'expliquent, principalement, par une résorption probablement plus lente dans le péritoine, ce qui conduit également à un ralentissement de l'élimination par rapport à une injection intraveineuse directe.

7 Etude in vivo de la biodistribution VHH C3 lié à la superfolder Green Fluorescent Protein

Cette étude a été réalisée dans son intégralité par le laboratoire SMARTc,, Aix-Marseille Université.

7.1 Au niveau tumoral

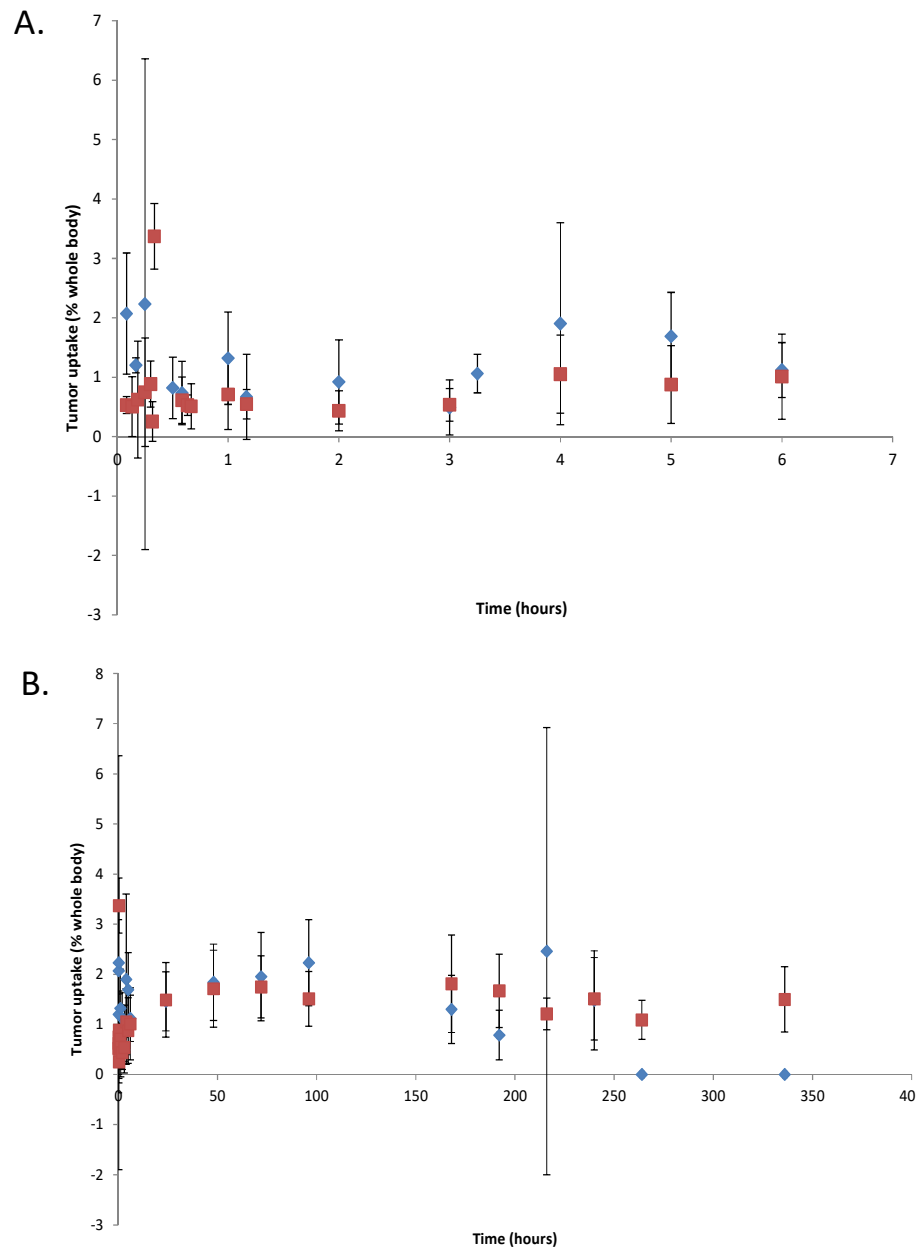


Figure 29 : Absorption relative (%) au niveau tumoral du VHH C3 en présence de hTf (en rouge) et sans hTf (en bleu). (A) au cours des six premières heures. (B) jusqu'à trois cent trente-six heures après l'administration IV.

Le VHH C3 ne semble pas se concentrer significativement au niveau tumoral en présence de hTf puisqu'il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes selon l'analyse de variance à un facteur avec $p > 0.05$. (Figure 28)

L'ensemble des résultats sont présentés en annexe (Annexes : E, tableau 1).

7.2 Au niveau cérébral

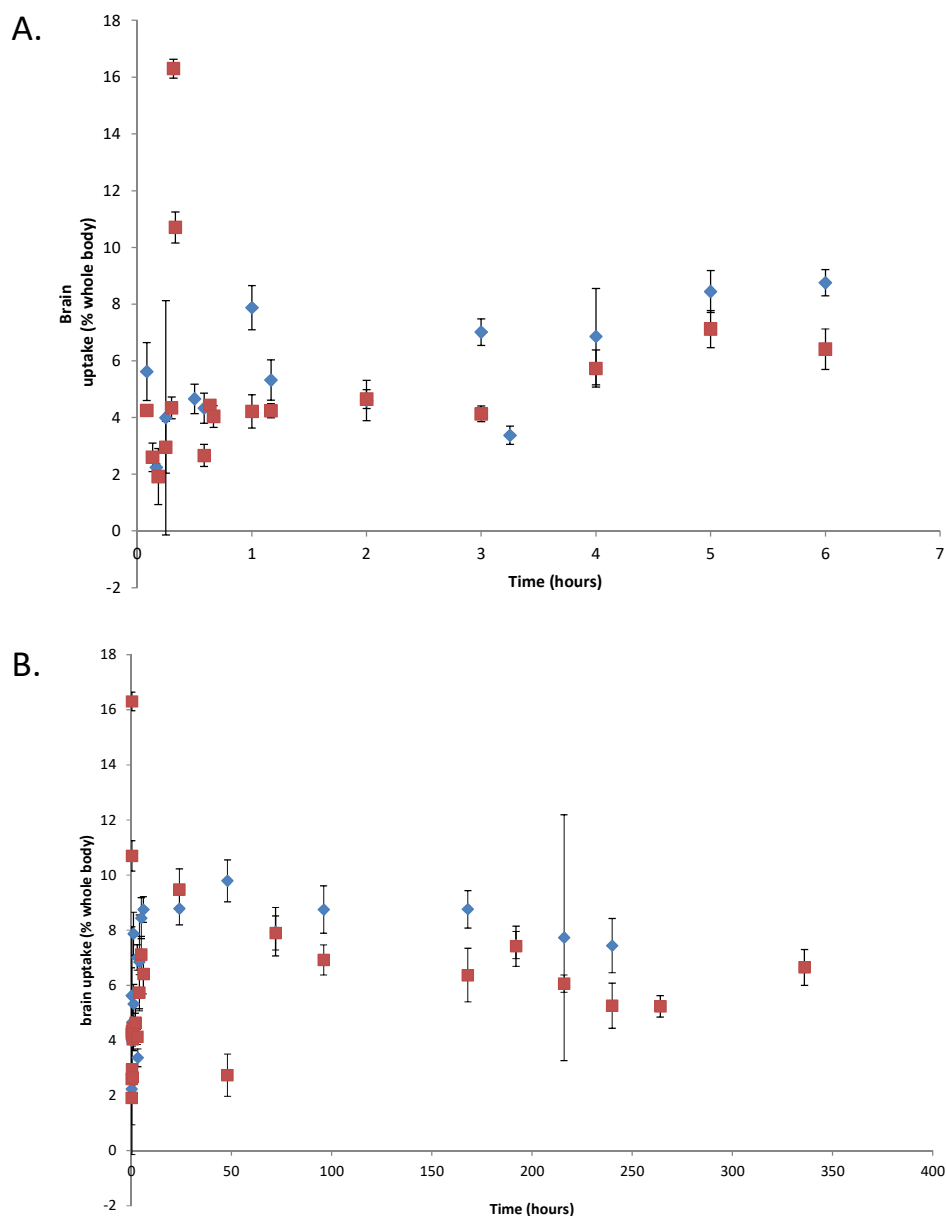


Figure 30 : Absorption relative (%) au niveau cérébral du VHH C3 en présence de hTf (en rouge) et sans hTf (en bleu). (A) au cours des six premières heures. (B) jusqu'à trois cent trente-six heures après l'administration IV.

Le VHH C3 ne semble pas se concentrer significativement au niveau cérébral en présence de hTf puisqu'il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes selon l'analyse de variance à un facteur avec $p > 0.05$. (Figure 29)

L'ensemble des résultats sont présentés en annexe (Annexes : E, tableau 2).

7.3 Région rate/foie/estomac

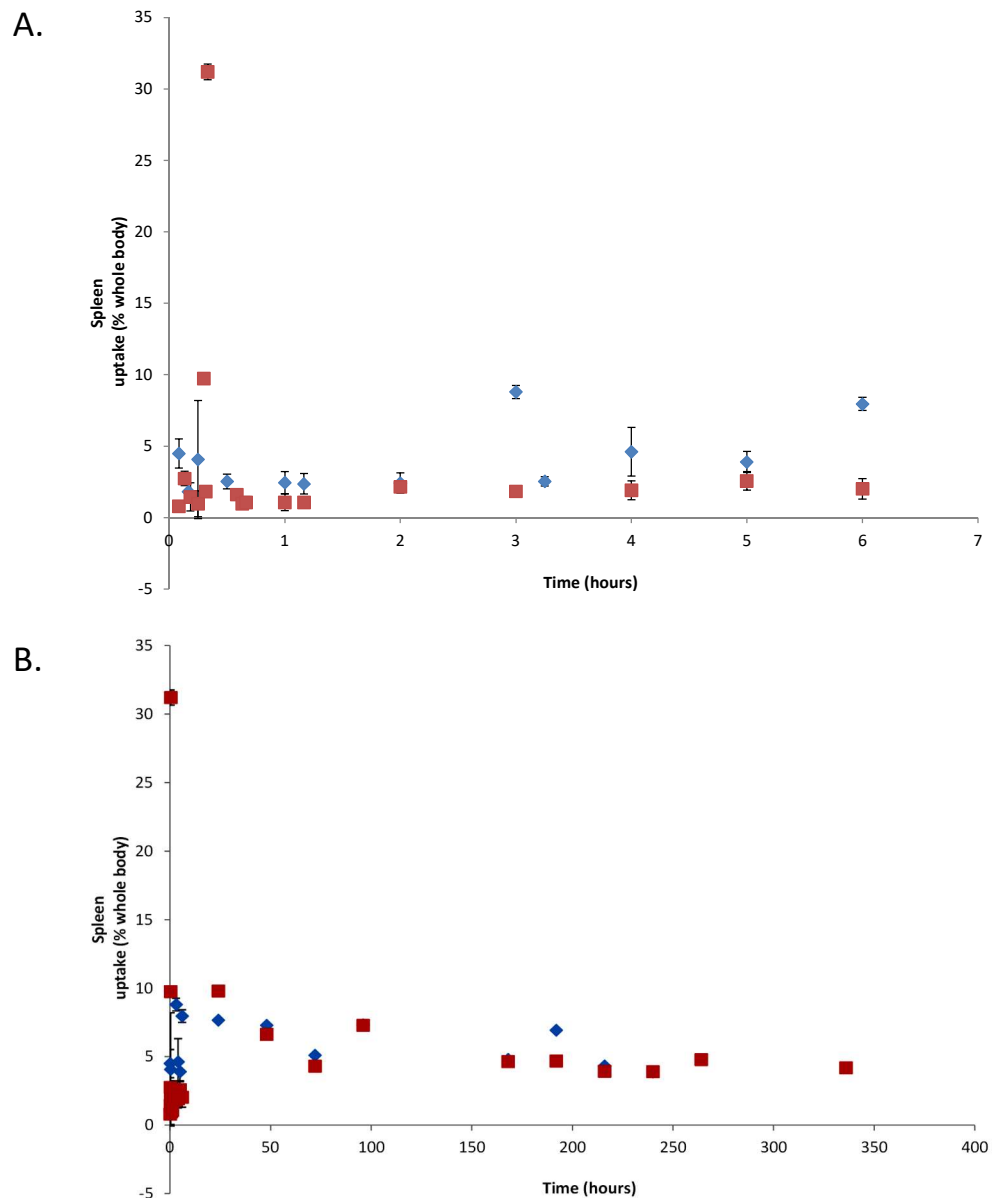


Figure 31 : Absorption relative (%) au niveau de la région rate/foie/estomac du VHH C3 en présence de hTf (en rouge) et sans hTf (en bleu). (A) au cours des six premières heures. (B) jusqu'à trois cent trente-six heures après l'administration IV.

Les experts de Perkin Elmer ont été contactés afin de déterminer la zone anatomique qui émet de la fluorescence dans les longueurs d'onde de la GFP, mais ils n'ont pu répondre avec certitude et proposent la rate, le foie ou encore l'estomac.

Au cours des six premières heures, le VHH C3 en présence de hTf s'accumule significativement dans cette région selon l'analyse de variance à un facteur avec $p < 0.05$. Par contre, il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes sur les 336 heures d'étude selon l'analyse de variance à un facteur avec $p > 0.05$. (Figure 30)

L'ensemble des résultats sont présentés en annexe (Annexes : E, tableau 3)

L'ensemble des résultats de cette étude de biodistribution montre des différences non significatives entre les deux groupes selon l'analyse de variance à un facteur avec $p > 0.05$.

%	VHHC3	VHC3-hTf	
Tumor	1,41 ± 0,58	1,07 ± 0,66	n.s.
Brain	6,66 ± 2,12	5,7 ± 2,99	n.s.
Spleen*	4,76 ± 2,17	4,41 ± 5,92	n.s.

Tableau 6 : Résumé de l'étude de biodistribution du VHH C3 en présence ou non d'hTf

Conclusion et perspectives

Ce projet réalisé pour ma thèse d'exercice en pharmacie a permis d'obtenir des résultats préliminaires sur le développement de *nanobodies*® anti-transferrine. En effet, 3 VHH anti-transferrine (C3, E9 et D10) ont été développés et caractérisés.

Pour les VHH C3 et E9, une affinité nanomolaire pour la transferrine humaine a été déterminée par thermophorèse à micro-échelle (MST) (Figure III.6). Par cytométrie en flux, ces deux VHH ont montré qu'ils se fixent à la transferrine et n'empêchent pas l'interaction transferrine-RTf (Figure III.7 et III.11). De plus, le VHH C3 semble être internalisé à l'intérieur des cellules selon les images obtenues par microscopie confocale (Figure III.10).

Le VHH D10 reconnaît les deux transferrines humaine et souris (Figure III.6 et Annexes, Figure V.2). Les expérimentations par cytométrie en flux ont permis d'identifier que le VHH D10 ne présente pas le même effet que les VHH précédents. Le VHH D10 semble empêcher l'interaction transferrine-RTf (Figure III.7, III.8, III.9 et III.11), probablement parce que le VHH a son épitope sur le site de fixation de la Tf à son récepteur ou le VHH crée un encombrement stérique et/ou modifie le site de fixation de la Tf à son RTf. Ceci pourrait expliquer que ce VHH n'est pas internalisé.

Les études *in vivo*, chez la souris, de la cinétique du VHH D10 et de la biodistribution du VHH C3 ont été réalisées avec des VHH couplés à la sfGFP. Les résultats obtenus n'ont pas été ceux attendus.

En effet, l'étude *in vivo* de la cinétique du VHH D10 (non internalisé) par suivi de la fluorescence émise par le VHH n'a pas montré une demi-vie du VHH proche de celle de la transferrine, 8 à 10 jours, mais a révélé une demi-vie de quelques heures seulement.

Concernant l'étude *in vivo* de la biodistribution du VHH C3 (VHH anti-transferrine internalisé) chez des souris xénotreffées par une lignée PANC1-mCherry, n'a montré aucune différence significative entre les deux groupes, VHH C3 couplé à la transferrine humaine (groupe à évaluer) et VHH C3 seul (groupe contrôle négatif).

Néanmoins, il est important de souligner que la *Green Fluorescent Protein* n'est pas le fluorophore le plus adapté pour réaliser des études *in vivo* par suivi de fluorescence. De ce fait, les résultats de ces études doivent être interprétés avec précaution. En effet, à la longueur d'onde d'émission de la GFP se superpose le spectre d'absorption de

l'oxyhémoglobine. Par conséquent, une analyse à 450 nm (pic d'émission GFP) conduit à une image avec une auto-fluorescence très importante. En outre, au plus un laser est proche des longueurs d'ondes infrarouges, au plus il pénètre dans les tissus. Le laser à 525 nm ne pénètre pratiquement pas dans les tissus.

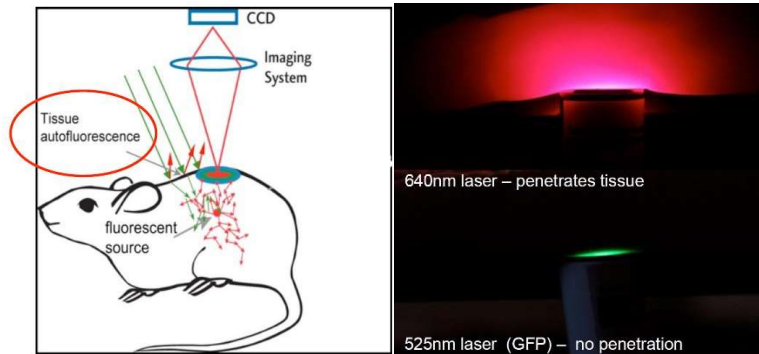


Figure 32 : A gauche, schéma d'un système d'imagerie *in vivo* par fluorescence. A droite, images comparant la pénétration tissulaire avec un laser de 640 nm et un laser de 525 nm, longueur d'onde d'émission de la GFP.
 ("Laurent_Cronier_IMageurInVivo_formation_nov2013.pdf" n.d.)

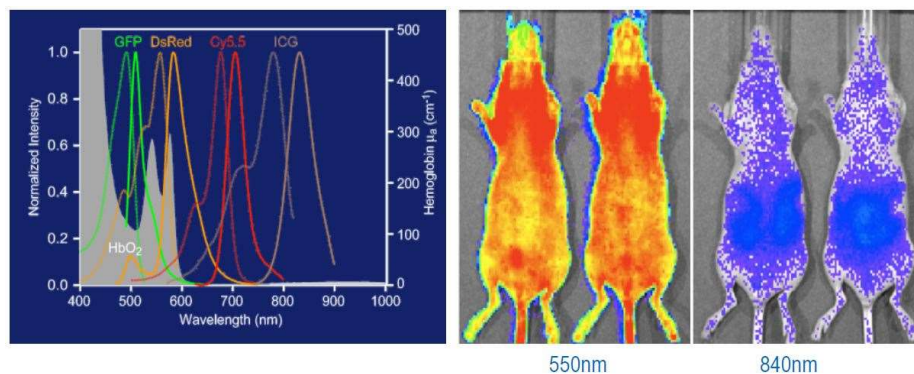


Figure 33 : A gauche, spectres d'excitations et d'émissions de différents fluorophores et spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine. A droite, images comparant l'auto fluorescence observée à une longueur d'onde de 550 nm (proche de la GFP) et à une longueur d'onde dans le proche infra-rouge, 840 nm.
 ("Laurent_Cronier_IMageurInVivo_formation_nov2013.pdf" n.d.)

Dans le futur, de nouvelles études *in vivo* pourraient être réalisées en couplant des VHH à des fluorophores plus adéquats (longueur d'onde supérieur à 600 nm et différente de 680 nm) tel que l'Alexa fluor® 750. De plus, il serait pertinent de réaliser des études *in vivo* étudiant l'effet antitumoral avec le VHHC3 utilisé comme vecteur (d'un médicament ou d'une toxine), chez des souris xénotransplantées avec une lignée de cellules tumorales surexprimant le récepteur à la transferrine. Ces études pourraient apporter des réponses supplémentaires en les comparant à l'effet antitumoral du médicament ou de la toxine seule.

Références

- Angelova-Gateva, P. 1980. "Iron Transferrin Receptors in Rat and Human Cerebrum." *Agressologie: Revue Internationale De Physio-Biologie Et De Pharmacologie Appliquees Aux Effets De L'agression* 21 (1):27–30.
- "Antibody-Drug Conjugates | Baxter BioPharma Solutions." n.d. Accessed December 11, 2017. <http://www.baxterbiopharmasolutions.com/sterile-manufacturing-solutions/complex-manufacturing/antibody-drug-conjugates.html>.
- Arbabi-Ghahroudi, Mehdi, Jamshid Tanha, and Roger MacKenzie. 2005. "Prokaryotic Expression of Antibodies." *Cancer Metastasis Reviews* 24 (4):501–19. <https://doi.org/10.1007/s10555-005-6193-1>.
- Bakhtiar, Ray. 2016. "Antibody Drug Conjugates." *Biotechnology Letters* 38 (10):1655–64. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2160-x>.
- Behring, Emil von. 1890. "Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren."
- Calzolari, Alessia, Luigi Maria Larocca, Silvia Deaglio, Veronica Finisguerra, Alessandra Boe, Carla Raggi, Lucia Ricci-Vitani, et al. 2010. "Transferrin Receptor 2 Is Frequently and Highly Expressed in Glioblastomas." *Translational Oncology* 3 (2):123–34.
- Calzolari, Alessia, Isabella Oliviero, Silvia Deaglio, Gualtiero Mariani, Mauro Biffoni, Nadia Maria Sposi, Fabio Malavasi, Cesare Peschle, and Ugo Testa. 2007. "Transferrin Receptor 2 Is Frequently Expressed in Human Cancer Cell Lines." *Blood Cells, Molecules & Diseases* 39 (1):82–91. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2007.02.003>.
- Chang, Jiang, Youssef Jallouli, Maya Kroubi, Xu-bo Yuan, Wei Feng, Chun-sheng Kang, Pei-yu Pu, and Didier Betbeder. 2009. "Characterization of Endocytosis of Transferrin-Coated PLGA Nanoparticles by the Blood-Brain Barrier." *International Journal of Pharmaceutics* 379 (2):285–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.035>.
- Cogné, M., J. L. Preud'homme, and P. Guglielmi. 1989. "Immunoglobulin Gene Alterations in Human Heavy Chain Diseases." *Research in Immunology* 140 (5–6):487–502.
- Conrath, K. E., U. Wernery, S. Muyltermans, and V. K. Nguyen. 2003. "Emergence and Evolution of Functional Heavy-Chain Antibodies in Camelidae." *Developmental and Comparative Immunology* 27 (2):87–103.
- Daniels, Tracy R., Ezequiel Bernabeu, José A. Rodríguez, Shabnum Patel, Maggie Kozman, Diego A. Chiappetta, Eggehard Holler, Julia Y. Ljubimova, Gustavo Helguera, and Manuel L. Penichet. 2012. "The Transferrin Receptor and the

Targeted Delivery of Therapeutic Agents against Cancer.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1820 (3):291–317. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.016>.

- Daniels, Tracy R., Tracie Delgado, Jose A. Rodriguez, Gustavo Helguera, and Manuel L. Penichet. 2006. “The Transferrin Receptor Part I: Biology and Targeting with Cytotoxic Antibodies for the Treatment of Cancer.” *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 121 (2):144–58. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.06.010>.
- Das Gupta, A., and V. I. Shah. 1990. “Correlation of Transferrin Receptor Expression with Histologic Grade and Immunophenotype in Chronic Lymphocytic Leukemia and Non-Hodgkin’s Lymphoma.” *Hematologic Pathology* 4 (1):37–41.
- Dautry-Varsat, A, A Ciechanover, and H F Lodish. 1983. “PH and the Recycling of Transferrin during Receptor-Mediated Endocytosis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (8):2258–62.
- De Genst, Erwin, Karen Silence, Klaas Decanniere, Katja Conrath, Remy Loris, Jörg Kinne, Serge Muyldermans, and Lode Wyns. 2006. “Molecular Basis for the Preferential Cleft Recognition by Dromedary Heavy-Chain Antibodies.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (12):4586–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505379103>.
- De Meyer, Thomas, Serge Muyldermans, and Ann Depicker. 2014. “Nanobody-Based Products as Research and Diagnostic Tools.” *Trends in Biotechnology* 32 (5):263–70. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.03.001>.
- Deckers, N., D. Saerens, K. Kanobana, K. Conrath, B. Victor, U. Wernery, J. Vercruysse, S. Muyldermans, and P. Dorny. 2009. “Nanobodies, a Promising Tool for Species-Specific Diagnosis of *Taenia Solium* Cysticercosis.” *International Journal for Parasitology* 39 (5):625–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.10.012>.
- Desjarlais, John R., Greg A. Lazar, Eugene A. Zhukovsky, and Seung Y. Chu. 2007. “Optimizing Engagement of the Immune System by Anti-Tumor Antibodies: An Engineer’s Perspective.” *Drug Discovery Today* 12 (21–22):898–910. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.08.009>.
- Desmyter, A., T. R. Transue, M. A. Ghahroudi, M. H. Thi, F. Poortmans, R. Hamers, S. Muyldermans, and L. Wyns. 1996. “Crystal Structure of a Camel Single-Domain VH Antibody Fragment in Complex with Lysozyme.” *Nature Structural Biology* 3 (9):803–11.
- Domenico, Ivana De, Diane McVey Ward, and Jerry Kaplan. 2008. “Regulation of Iron Acquisition and Storage: Consequences for Iron-Linked Disorders.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (1):nrm2295. <https://doi.org/10.1038/nrm2295>.
- Duhr, Stefan, and Dieter Braun. 2006. “Why Molecules Move along a Temperature Gradient.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (52):19678–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603873103>.

- Edelman, G. M., B. Benacerraf, Z. Ovary, and M. D. Poulik. 1961. "STRUCTURAL DIFFERENCES AMONG ANTIBODIES OF DIFFERENT SPECIFICITIES*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 47 (11):1751–58.
- Fagraeus, A. 1948. "The Plasma Cellular Reaction and Its Relation to the Formation of Antibodies in Vitro." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 58 (1):1–13.
- Frenken, L. G., J. G. Hessing, C. A. Van den Hondel, and C. T. Verrips. 1998. "Recent Advances in the Large-Scale Production of Antibody Fragments Using Lower Eukaryotic Microorganisms." *Research in Immunology* 149 (6):589–99.
- Frenken, L. G., R. H. van der Linden, P. W. Hermans, J. W. Bos, R. C. Ruuls, B. de Geus, and C. T. Verrips. 2000. "Isolation of Antigen Specific Llama VHH Antibody Fragments and Their High Level Secretion by *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Biotechnology* 78 (1):11–21.
- Friden, P. M., L. R. Walus, P. Watson, S. R. Doctrow, J. W. Kozarich, C. Bäckman, H. Bergman, B. Hoffer, F. Bloom, and A. C. Granholm. 1993. "Blood-Brain Barrier Penetration and in Vivo Activity of an NGF Conjugate." *Science (New York, N.Y.)* 259 (5093):373–77.
- Goldman, Ellen R., George P. Anderson, Jerry Conway, Laura J. Sherwood, Melissa Fech, BaoHan Vo, Jinny L. Liu, and Andrew Hayhurst. 2008. "Thermostable Llama Single Domain Antibodies for Detection of Botulinum A Neurotoxin Complex." *Analytical Chemistry* 80 (22):8583–91. <https://doi.org/10.1021/ac8014774>.
- Greenberg, Andrew S., David Avila, Marianne Hughes, Austin Hughes, E. Churchill McKinney, and Martin F. Flajnik. 1995. "A New Antigen Receptor Gene Family That Undergoes Rearrangement and Extensive Somatic Diversification in Sharks." *Nature* 374 (6518):168–73. <https://doi.org/10.1038/374168a0>.
- Habeshaw, J. A., T. A. Lister, A. G. Stansfeld, and M. F. Greaves. 1983. "CORRELATION OF TRANSFERRIN RECEPTOR EXPRESSION WITH HISTOLOGICAL CLASS AND OUTCOME IN NON-HODGKIN LYMPHOMA." *The Lancet* 321 (8323):498–501. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)92191-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)92191-8).
- Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. B. Songa, N. Bendahman, and R. Hamers. 1993. "Naturally Occurring Antibodies Devoid of Light Chains." *Nature* 363 (6428):446–48. <https://doi.org/10.1038/363446a0>.
- Holliger, Philipp, and Peter J. Hudson. 2005. "Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains." *Nature Biotechnology* 23 (9):1126–36. <https://doi.org/10.1038/nbt1142>.
- Hoogenboom, H. R., and P. Chames. 2000. "Natural and Designer Binding Sites Made by Phage Display Technology." *Immunology Today* 21 (8):371–78.

- Huang, Lieven, Lea Olive Tchouate Gainkam, Vicky Caveliers, Chris Vanhove, Marleen Keyaerts, Patrick De Baetselier, Axel Bossuyt, Hilde Revets, and Tony Lahoutte. 2008. "SPECT Imaging with 99mTc-Labeled EGFR-Specific Nanobody for in Vivo Monitoring of EGFR Expression." *Molecular Imaging and Biology: MIB: The Official Publication of the Academy of Molecular Imaging* 10 (3):167–75. <https://doi.org/10.1007/s11307-008-0133-8>.
- "Human Abs." n.d. *Antibody Solutions Inc.* (blog). Accessed October 19, 2017. <https://antibody.com/solutions/by-application/human-abs/>.
- Huston, J. S., D. Levinson, M. Mudgett-Hunter, M. S. Tai, J. Novotný, M. N. Margolies, R. J. Ridge, R. E. Brucoleri, E. Haber, and R. Crea. 1988. "Protein Engineering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced in Escherichia Coli." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (16):5879–83.
- Inbar, Dan, Jacob Hochman, and David Givol. 1972. "Localization of Antibody-Combining Sites within the Variable Portions of Heavy and Light Chains." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (9):2659–62.
- Ishida, O., K. Maruyama, H. Tanahashi, M. Iwatsuru, K. Sasaki, M. Eriguchi, and H. Yanagie. 2001. "Liposomes Bearing Polyethyleneglycol-Coupled Transferrin with Intracellular Targeting Property to the Solid Tumors in Vivo." *Pharmaceutical Research* 18 (7):1042–48.
- Ismaili, Ahmad, Mokhtar Jalali-Javaran, Mohammad J. Rasaei, Fatemeh Rahbarizadeh, Mehdi Forouzandeh-Moghadam, and Hamid Rajabi Memari. 2007. "Production and Characterization of Anti-(Mucin MUC1) Single-Domain Antibody in Tobacco (*Nicotiana Tabacum* Cultivar Xanthi)." *Biotechnology and Applied Biochemistry* 47 (Pt 1):11–19. <https://doi.org/10.1042/BA20060071>.
- Jefferies, W. A., M. R. Brandon, S. V. Hunt, A. F. Williams, K. C. Gatter, and D. Y. Mason. 1984. "Transferrin Receptor on Endothelium of Brain Capillaries." *Nature* 312 (5990):162–63.
- Jeong, S. M., J. Lee, L. W. S. Finley, P. J. Schmidt, M. D. Fleming, and M. C. Haigis. 2014. "SIRT3 Regulates Cellular Iron Metabolism and Cancer Growth by Repressing Iron Regulatory Protein 1." *Oncogene* 34 (16):onc2014124. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.124>.
- Jerabek-Willemsen, Moran, Christoph J. Wienken, Dieter Braun, Philipp Baaske, and Stefan Duhr. 2011. "Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis." *Assay and Drug Development Technologies* 9 (4):342–53. <https://doi.org/10.1089/adt.2011.0380>.
- Johnsen, Kasper Bendix, Annette Burkhart, Fredrik Melander, Paul Joseph Kempen, Jonas Bruun Vejlebo, Piotr Siupka, Morten Schallburg Nielsen, Thomas Lars Andresen, and Torben Moos. 2017. "Targeting Transferrin Receptors at the Blood-Brain Barrier Improves the Uptake of Immunoliposomes and Subsequent Cargo

- Transport into the Brain Parenchyma.” *Scientific Reports* 7 (1):10396.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-11220-1>.
- Joosten, Vivi, Christien Lokman, Cees AMJJ van den Hondel, and Peter J Punt. 2003. “The Production of Antibody Fragments and Antibody Fusion Proteins by Yeasts and Filamentous Fungi.” *Microbial Cell Factories* 2 (January):1.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-2-1>.
- Karatas, Hulya, Yesim Aktas, Yasemin Gursoy-Ozdemir, Ebru Bodur, Muge Yemisci, Secil Caban, Atay Vural, et al. 2009. “A Nanomedicine Transports a Peptide Caspase-3 Inhibitor across the Blood–Brain Barrier and Provides Neuroprotection.” *Journal of Neuroscience* 29 (44):13761–69.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4246-09.2009>.
- Kastelic, Damjana, Snjezana Frković-Grazio, Daniel Baty, Gilles Truan, Radovan Komel, and Denis Pompon. 2009. “A Single-Step Procedure of Recombinant Library Construction for the Selection of Efficiently Produced Llama VH Binders Directed against Cancer Markers.” *Journal of Immunological Methods* 350 (1–2):54–62.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.08.016>.
- Kawabata, Hiroshi, Tsuyoshi Nakamaki, Pranvera Ikononi, Reginald D. Smith, Rasha S. Germain, and H. Phillip Koeffler. 2001. “Expression of Transferrin Receptor 2 in Normal and Neoplastic Hematopoietic Cells.” *Blood* 98 (9):2714–19.
<https://doi.org/10.1182/blood.V98.9.2714>.
- Kawabata, Hiroshi, Rong Yang, Toshiyasu Hirama, Peter T. Vuong, Seiji Kawano, Adrian F. Gombart, and H. Phillip Koeffler. 1999. “Molecular Cloning of Transferrin Receptor 2 A NEW MEMBER OF THE TRANSFERRIN RECEPTOR-LIKE FAMILY.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (30):20826–32.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.20826>.
- Köhler, G., and C. Milstein. 1975. “Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity.” *Nature* 256 (5517):495–97.
<https://doi.org/10.1038/256495a0>.
- Kondo, K., M. Noguchi, K. Mukai, Y. Matsuno, Y. Sato, Y. Shimosato, and Y. Monden. 1990. “Transferrin Receptor Expression in Adenocarcinoma of the Lung as a Histopathologic Indicator of Prognosis.” *Chest* 97 (6):1367–71.
- Koppu, Swati, Yew Jinn Oh, RuAngelie Edrada-Ebel, David R. Blatchford, Laurence Tetley, Rothwelle J. Tate, and Christine Dufès. 2010. “Tumor Regression after Systemic Administration of a Novel Tumor-Targeted Gene Delivery System Carrying a Therapeutic Plasmid DNA.” *Journal of Controlled Release* 143 (2):215–21. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.11.015>.
- “Laurent_Cronier_ImageurInVivo_formation_nov2013.Pdf.” n.d. Accessed December 4, 2017. http://sfa.univ-poitiers.fr/imageup/wp-content/uploads/sites/24/2014/06/LCronier_ImageurInVivo_nov2013.pdf.

- Lauwereys, M, M Arbabi Ghahroudi, A Desmyter, J Kinne, W Hölzer, E De Genst, L Wyns, and S Muyldermans. 1998. "Potent Enzyme Inhibitors Derived from Dromedary Heavy-Chain Antibodies." *The EMBO Journal* 17 (13):3512–20. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.13.3512>.
- Leow, Chiuan Herng, Katja Fischer, Chiuan Yee Leow, Qin Cheng, Candy Chuah, and James McCarthy. 2017. "Single Domain Antibodies as New Biomarker Detectors." *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 7 (4). <https://doi.org/10.3390/diagnostics7040052>.
- Linden, R. van der, B. de Geus, W. Stok, W. Bos, D. van Wassenaar, T. Verrips, and L. Frenken. 2000. "Induction of Immune Responses and Molecular Cloning of the Heavy Chain Antibody Repertoire of Lama Glama." *Journal of Immunological Methods* 240 (1–2):185–95.
- Liu, Y., and Q. He. 2017. "Chapter 2 - The Route of Nanomaterials Entering Brain." In *Neurotoxicity of Nanomaterials and Nanomedicine*, edited by Xinguo Jiang and Huile Gao, 33–57. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804598-5.00002-7>.
- Lonberg, N. 2008. "Human Monoclonal Antibodies from Transgenic Mice." *Handbook of Experimental Pharmacology*, no. 181:69–97. https://doi.org/10.1007/978-3-540-73259-4_4.
- Luck, Ashley N., and Anne B. Mason. 2013. "Structure and Dynamics of Drug Carriers and Their Interaction with Cellular Receptors: Focus on Serum Transferrin." *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 (8):1012–19. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.11.001>.
- Ma, Hui, and Richard O’Kennedy. 2015. "The Structure of Natural and Recombinant Antibodies." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1348:7–11. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2999-3_2.
- Magdelaine-Beuzelin, Charlotte, Marc Ohresser, and Hervé Watier. n.d. "FcRn, un récepteur d’IgG aux multiples facettes." *médecine/sciences* 25 (12):1053–56. <https://doi.org/10.1051/medsci/200925121053>.
- Majidi, Jafar, Jaleh Barar, Behzad Baradaran, Jalal Abdolalizadeh, and Yadollah Omid. 2009. "Target Therapy of Cancer: Implementation of Monoclonal Antibodies and Nanobodies." *Human Antibodies* 18 (3):81–100. <https://doi.org/10.3233/HAB-2009-0204>.
- Mason, Anne B., Shaina L. Byrne, Stephen J. Everse, Samantha E. Roberts, N. Dennis Chasteen, Valerie C. Smith, Ross T. A. MacGillivray, Banu Kandemir, and Fadi Bou-Abdallah. 2009. "A Loop in the N-Lobe of Human Serum Transferrin Is Critical for Binding to the Transferrin Receptor as Revealed by Mutagenesis, Isothermal Titration Calorimetry, and Epitope Mapping." *Journal of Molecular Recognition : JMR* 22 (6):521–29. <https://doi.org/10.1002/jmr.979>.
- Moos, T., and E. H. Morgan. 2000. "Transferrin and Transferrin Receptor Function in Brain Barrier Systems." *Cellular and Molecular Neurobiology* 20 (1):77–95.

- Muyldermans, S., T. N. Baral, V. Cortez Retamozzo, P. De Baetselier, E. De Genst, J. Kinne, H. Leonhardt, et al. 2009. "Camelid Immunoglobulins and Nanobody Technology." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128 (1–3):178–83. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.299>.
- Muyldermans, Serge. 2013. "Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies." *Annual Review of Biochemistry* 82:775–97. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>.
- "Nanobody-Aided Crystallography | Structural Biology Brussels." n.d. Accessed October 31, 2017. <http://www.structuralbiology.be/chaperones>.
- Nechansky, Andreas, Manfred Schuster, Wolfgang Jost, Petra Siegl, Susanne Wiederikum, Gilbert Gorr, and Ralf Kircheis. 2007. "Compensation of Endogenous IgG Mediated Inhibition of Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity by Glyco-Engineering of Therapeutic Antibodies." *Molecular Immunology* 44 (7):1815–17. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.08.013>.
- Ng, Patrick P., Jay S. Dela Cruz, David N. Sorour, James M. Stinebaugh, Seung-Uon Shin, Daniel S. Shin, Sherie L. Morrison, and Manuel L. Penichet. 2002. "An Anti-Transferrin Receptor-Avidin Fusion Protein Exhibits Both Strong Proapoptotic Activity and the Ability to Deliver Various Molecules into Cancer Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (16):10706–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.162362999>.
- Nguyen, Van Son, Silvia Spinelli, Aline Desmyter, Thi Thu Hang Le, Christine Kellenberger, Eric Cascales, Christian Cambillau, and Alain Roussel. 2015. "Production, Crystallization and X-Ray Diffraction Analysis of a Complex between a Fragment of the TssM T6SS Protein and a Camelid Nanobody." *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications* 71 (Pt 3):266–71. <https://doi.org/10.1107/S2053230X15000709>.
- Padlan, E. A. 1994. "Anatomy of the Antibody Molecule." *Molecular Immunology* 31 (3):169–217.
- Peyvandi, F., M. Scully, J. A. Kremer Hovinga, P. Knöbl, S. Cataland, K. De Beuf, F. Callewaert, H. De Winter, and R. K. Zeldin. 2017. "Caplacizumab Reduces the Frequency of Major Thromboembolic Events, Exacerbations, and Death in Patients with Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura." *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, April. <https://doi.org/10.1111/jth.13716>.
- Pleiner, Tino, Mark Bates, Sergei Trakhanov, Chung-Tien Lee, Jan Erik Schliep, Hema Chug, Marc Böhning, Holger Stark, Henning Urlaub, and Dirk Görlich. 2015. "Nanobodies: Site-Specific Labeling for Super-Resolution Imaging, Rapid Epitope-Mapping and Native Protein Complex Isolation." *ELife* 4 (December):e11349. <https://doi.org/10.7554/eLife.11349>.
- Porter, R. R. 1959. "The Hydrolysis of Rabbit γ -Globulin and Antibodies with Crystalline Papain." *Biochemical Journal* 73 (1):119–27.

- Prior, R., G. Reifenberger, and W. Wechsler. 1990. "Transferrin Receptor Expression in Tumours of the Human Nervous System: Relation to Tumour Type, Grading and Tumour Growth Fraction." *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology* 416 (6):491–96.
- Prutki, Maja, Marija Poljak-Blazi, Marko Jakopovic, Davor Tomas, Igor Stipancic, and Neven Zarkovic. 2006. "Altered Iron Metabolism, Transferrin Receptor 1 and Ferritin in Patients with Colon Cancer." *Cancer Letters* 238 (2):188–96. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.07.001>.
- Rasmussen, Søren G. F., Hee-Jung Choi, Juan Jose Fung, Els Pardon, Paola Casarosa, Pil Seok Chae, Brian T. DeVree, et al. 2011. "Structure of a Nanobody-Stabilized Active State of the B2 Adrenoceptor." *Nature* 469 (7329):175–80. <https://doi.org/10.1038/nature09648>.
- Ren, Wei-hua, Jiang Chang, Cheng-hu Yan, Xiao-min Qian, Li-xia Long, Bin He, Xu-bo Yuan, et al. 2010. "Development of Transferrin Functionalized Poly(Ethylene Glycol)/Poly(Lactic Acid) Amphiphilic Block Copolymeric Micelles as a Potential Delivery System Targeting Brain Glioma." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21 (9):2673–81. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4106-5>.
- Rouault, Tracey A., and Sharon Cooperman. 2006. "Brain Iron Metabolism." *Seminars in Pediatric Neurology* 13 (3):142–48. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2006.08.002>.
- Ryschich, E., G. Huszty, H. P. Knaebel, M. Hartel, M. W. Büchler, and J. Schmidt. 2004. "Transferrin Receptor Is a Marker of Malignant Phenotype in Human Pancreatic Cancer and in Neuroendocrine Carcinoma of the Pancreas." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 40 (9):1418–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.01.036>.
- Schroeder, Harry W., and Lisa Cavacini. 2010. "Structure and Function of Immunoglobulins." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2 0 2):S41–52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>.
- Seymour, G. J., M. D. Walsh, M. F. Lavin, G. Strutton, and R. A. Gardiner. 1987. "Transferrin Receptor Expression by Human Bladder Transitional Cell Carcinomas." *Urological Research* 15 (6):341–44.
- Simon Krahl, Christian Schröter, Stefan Zielonka, Martin Empting, Bernhard, and Valldorf & Harald Kolmar. n.d. "Single-Domain Antibodies for Biomedical Applications."
- Singh, Meenakshi, Kimberly Mugler, Dulan W. Hailoo, Stephanie Burke, Barbara Nemesure, Kathleen Torkko, and Kenneth R. Shroyer. 2011. "Differential Expression of Transferrin Receptor (TfR) in a Spectrum of Normal to Malignant Breast Tissues: Implications for in Situ and Invasive Carcinoma." *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM* 19 (5):417–23. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e318209716e>.
- Skjørringe, Tina, Annette Burkhart, Kasper Bendix Johnsen, and Torben Moos. 2015. "Divalent Metal Transporter 1 (DMT1) in the Brain: Implications for a Role in Iron

- Transport at the Blood-Brain Barrier, and Neuronal and Glial Pathology.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 8 (June). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00019>.
- Stanfield, Robyn L., and Ian A. Wilson. 2015. “Antibody Structure,” January, 49–62. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0012-2013>.
- Tortorella, Stephanie, and Tom C. Karagiannis. 2014. “Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis: A Useful Target for Cancer Therapy.” *The Journal of Membrane Biology* 247 (4):291–307. <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9637-0>.
- Trowbridge, I S, and F Lopez. 1982. “Monoclonal Antibody to Transferrin Receptor Blocks Transferrin Binding and Inhibits Human Tumor Cell Growth in Vitro.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (4):1175–79.
- Vincke, Cécile, Remy Loris, Dirk Saerens, Sergio Martinez-Rodriguez, Serge Muyldermans, and Katja Conrath. 2009. “General Strategy to Humanize a Camelid Single-Domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold.” *The Journal of Biological Chemistry* 284 (5):3273–84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806889200>.
- Vu, K. B., M. A. Ghahroudi, L. Wyns, and S. Muyldermans. 1997. “Comparison of Llama VH Sequences from Conventional and Heavy Chain Antibodies.” *Molecular Immunology* 34 (16–17):1121–31.
- Wang, Yongzhong, Zhen Fan, Lei Shao, Xiaowei Kong, Xianjuan Hou, Dongrui Tian, Ying Sun, Yazhong Xiao, and Li Yu. 2016. “Nanobody-Derived Nanobiotechnology Tool Kits for Diverse Biomedical and Biotechnology Applications.” *International Journal of Nanomedicine* 11 (July):3287–3303. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107194>.
- Wiley, Devin T., Paul Webster, Aaron Gale, and Mark E. Davis. 2013. “Transcytosis and Brain Uptake of Transferrin-Containing Nanoparticles by Tuning Avidity to Transferrin Receptor.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (21):8662–67. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307152110>.
- Ying, Xue, He Wen, Wan-Liang Lu, Ju Du, Jia Guo, Wei Tian, Ying Men, et al. 2010. “Dual-Targeting Daunorubicin Liposomes Improve the Therapeutic Efficacy of Brain Glioma in Animals.” *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 141 (2):183–92. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.09.020>.
- Zuo, Jing, Jian Li, Rongxin Zhang, Longsheng Xu, Hanhan Chen, Xiaohuan Jia, Zhipeng Su, Linhong Zhao, Xing Huang, and Wei Xie. 2017. “Institute Collection and Analysis of Nanobodies (ICAN): A Comprehensive Database and Analysis Platform for Nanobodies.” *BMC Genomics* 18 (1):797. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4204-6>.

Liste des annexes

- A. Tableau de l'ensemble des études portant sur le couplage de transferrine ou dérivé à des nanoparticules (Daniels et al. 2012)**

- B. Figure : Carte du phagemide pHEN1**

- C. Figure : Détermination des constantes de dissociation (K_d) par thermophorèse à micro-échelle.**

- D. Tableau 1 : Cinétique du VHH D10 et de la GFP administrés par voie intrapéritonéale**
Tableau 2 : Cinétique du VHH D10 et de la GFP administrés par voie intraveineuse

- E. Tableau 1 : Etude de la biodistribution du VHH C3 en présence ou non de transferrine, au niveau tumoral**
Tableau 2 : Etude de la biodistribution du VHH C3 en présence ou non de transferrine, au niveau cérébral
Tableau 3 : Etude de la biodistribution du VHH C3 en présence ou non de transferrine, au niveau de la rate/foie

Annexes

A. Tableau de l'ensemble des études portant sur le couplage de transferrine ou dérivé à des nanoparticules (Daniels et al. 2012)

System	Composition	Ligand	Size (nm)	Cargo	Cell/Tumor model	Comments	Ref
Liposomes	Chol/DSPC/DSPE-PEG2000-COOH	holo-Tf	70	ADR	Human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) Male ICR mice bearing s.c. HepG2 cells	The IC ₅₀ of Tf-SL-ADR was 5.22 μM. SL-ADR was 20.4 μM and free ADR was 166.2 μM. The average weight of tumors in the group of mice treated with Tf-SL-ADR was 0.33g, with SL-ADR 1.17 g, and with free ADR 1.38 g. The dose equivalent of 3 mg/kg of ADR was used in all treatments.	185
	SPC/Chol/mPEG-PE	holo-Tf	129	Cisplatin (cDDP)	human ovarian carcinoma cell lines A2780 and A2780/cis (cDDP resistant)	IC ₅₀ at 48h = 8.28 μM compared to the free cDDP (IC ₅₀ at 48h = 14.47 μM) in drug resistant cell only.	193
	DPC/cho/MBPE	Murine IgG1 anti-human TfR (OKT9)	ND	ADR	K562 human erythroleukemia cell line ADR-resistant subline K562/ADM	Free ADR and OKT9-liposome loaded with ADR showed similar IC ₅₀ 0.45 and 0.55 μg/ml respectively. 3.5 times lower IC ₅₀ (8 μg/ml) than free ADR (28 μg/ml).	195
	DC-Chol/egg PC/PEG-DSPE	holo-Tf	126-156	Oligonucleotide (G3139 a Bcl-2 antisense)	K562 human erythroleukemia cells	Exhibited significantly greater Bcl-2 downregulation (up to 70%) compared to free G3139 and 40% by non-targeted LP-G3139. Decreased the IC ₅₀ of daunorubicin from 1.77 μM to 0.18 μM (a 9.8-fold decrease).	190-191
	DOTAP/DDAB/DOPE	Murine IgG1 anti-human TfR scFv (5E9)	92.9	luciferase gene	Athymic nude mice bearing s.c. K562 tumors Human prostate cell line DU145 human breast cancer cell line MDA-MB-435	Greater accumulation in the tumor and was found to be more effective in tumor growth inhibition and extending survival than free G3139. 4-10 fold more efficient transfection activity compared to the untargeted liposomes.	201-202
				p53 expression plasmid (pCMV-p53)	Nude mice bearing s.c. DU145 human prostate cancer cells	Displayed a high level of the expression of exogenous wild type p53 preferentially in the tumors.	

System	Composition	Ligand	Size (nm)	Cargo	Cell/Tumor model	Comments	Ref
					Nude mice bearing s.c. JSQ-3 human head and neck cancer cells	Tumor specific expression observed after systemic gene delivery.	
					LAMA-84 leukemia cell line	Cell internalization of fluorescently labeled siRNA (Cy3-siRNA) was only detected with Tf-liposomes. For non-targeted liposome no Cys3-siRNA inside the cell was observed.	
	Chol/DSPC/DODAP/	Holo-Tf	175.5	siRNA and ODN (anti-BCR-ABL)	K562 human erythroleukemia cell line	Treatment with Tf-liposomes loaded with 2 μ M siRNA or ODN resulted in higher levels of toxicity. Non-targeted liposomes or empty targeted liposomes at the same lipid concentration did not induce toxicity.	204
	PC/cho/DOPE-DPPTPA/mPEG-DSPE	Holo-Tf	118.3	ADR	KB human carcinoma cell line identified as a subline derived from HeLa cervical cancer cells	Tf-liposomes loaded with ADR and free ADR showed similar IC ₅₀ 13.91 and 14.38 μ M respectively, but both were lower than non-targeted liposomes (43.74 μ M)	187
	DSPC/Chol/DSPE-PEG	Holo-Tf	180-200	cDDP	Nude mice bearing i.p. MKN45P human gastric cancer cell line	Tf-PEG-liposome loaded with cDDP injected at day 1 and 4 at a dose of 5 mg/kg significantly extended survival of mice compared to non-targeted PEG-liposomes, free cDDP or bare liposomes.	186
	DOTAP/DOPE	Holo-Tf	63.8	p53 expression plasmid (pCMV.p53)	Nude mice bearing DU145 human head and neck cancer cells in a s.c. xenograft model	Targeted liposomes loaded the plasmid plus radiation-showed significant improvement in survival with complete tumor regression and no sign of recurrence even 6 months after treatment, compared to targeted and loaded liposomes, radiation alone, or non-targeted liposomes.	189
Dendrimers	Polypropyl/iminine-G3	Tf	287	Plasmid DNA coding for TNF α .	A431 human epidermoid carcinoma cell line and T98G glioblastoma <i>in vitro</i> . A431 <i>in vivo</i> in nude mice s.c. xenograft model.	<i>In vitro</i> IC ₅₀ of 7.09 \pm 0.88 μ g/mL compared to nontargeted DAB polyplexes (IC ₅₀ of 9.47 \pm 1.15 μ g/mL) in A431 cells. <i>In vitro</i> IC ₅₀ of 21.72 \pm 2.68 μ g/mL compared to nontargeted DAB polyplexes (IC ₅₀ of 21.72 \pm 2.68 μ g/mL) in T98G cells. In the A431 s.c. model 50 μ g Tf-DAB polyplexes injected i.v.	147

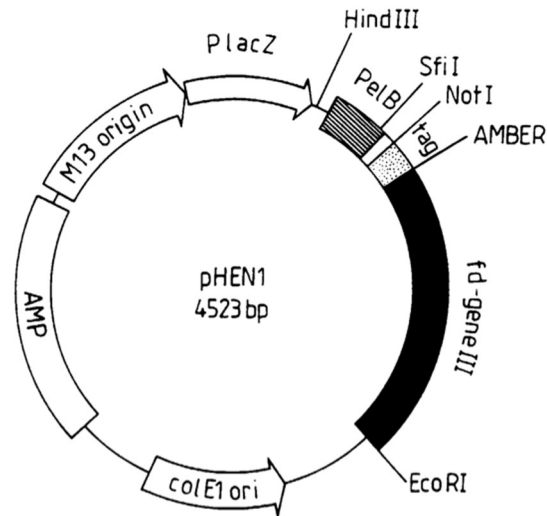
System	Composition	Ligand	Size (nm)	Cargo	Cell/Tumor model	Comments	Ref
	PEG-Poly(amidoamine)-G4 (PAMAM)	TF and wheat germ agglutinin (WGA)	199	ADR	Murine C6 glioma cells	elicited tumor regression and long term survival with 90% complete response and 10% partial response after one month. <i>In vitro</i> cytotoxicity showed an IC_{50} = 0.271 μ M compared to free ADR (IC_{50} = 0.315 μ M).	150
					Human Bel-7402 hepatocellular carcinoma cell line	<i>In vitro</i> cytotoxicity in the presence of soluble TF (IC_{50} 231.5 nM) than in the absence of TF (IC_{50} 676.7 nM). This was close to that of free ADR (IC_{50} 191.5 nM).	
	PEG-Poly(amidoamine)-G5 (PAMAM)	Peptide HA1YPRH (T7)	10	ADR	BALB/c nude mice bearing s.c. Bel-7402 xenograft tumors	Significantly enhanced ADR accumulation in the tumor by approximately 1.7-fold compared to that of unmodified ones and by approximately 5.3-fold compared to that of free ADR. For <i>in vivo</i> antitumor studies, tumor growth of mice treated i.v. with 2 mg ADR/kg was significantly inhibited compared to that of mice treated with non-targeted dendrimer or saline, but not to 5 mg free ADR/kg.	148
	PEG-Poly(amidoamine)-G5 (PAMAM)	Peptide HA1YPRH (T7)	200	Therapeutic gene encoding human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (pORF-hTRAIL) and ADR.	BALB/c nude mice bearing Bel-7402 s.c. tumors	Higher efficiency in cellular uptake and gene expression than unmodified co-delivery system in Bel-7402 cells. The co-delivery system induced apoptosis of tumor cells <i>in vitro</i> and inhibited tumor growth <i>in vivo</i> more efficiently in comparison with single ADR or pORF-hTRAIL delivery system. In mice bearing Bel-7402 xenografts, lower doses (0.16 mg/kg ADR) effectively inhibited tumor growth comparable to high doses (5 mg/kg) of free ADR (77% versus 69%).	149
Nanoparticles	PLGA: D- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS)	Holo-Tf	187.0	7 α -(4'-amino) phenylthio-1,4-androstadiene-3,17-dione (7 α -APTADD)	Human breast cancer cell line SKBR-3	IC_{50} of the targeted 7 α -APTADD loaded Tf-nanoparticles was in the range of 0.77–1.21 nM and the IC_{50} of the 7 α -APTADD loaded non-targeted nanoparticles was in the range of 1.90–3.41 nM.	160

System	Composition	Ligand	Size (nm)	Cargo	Cell/Tumor model	Comments	Ref
	PLA-PEG-biotin (BP); PLA-PEG (LP)	Biotinylated Tf	106.8	Paclitaxel (PTX) (Taxol®)	BT4C rat glioma cell line	Significantly increased the anti-tumoral activity compared to free PTX and non-targeted nanoparticles <i>in vitro</i> .	164
	Poly(aminopoly (ethylene glycol)-cyanoacrylate-co-hexadecyl cyanoacrylate) (H2N-PEG-PHDCA), MePEG-PHDCA and poly(hexadecyl cyanoacrylate) (PHDCA)	Holo-Tf	109.8	Poly(ethylene glycol)-hydroxycamptothecin conjugate (PEG-HCPT)	Mice bearing murine sarcoma S180 cell line s.c. tumors	For mice treated i.v. with 1 mg/kg × 7 Tf-PEG-NP (PEG-HCPT), the mean tumor weight was 0.03 g which was significantly lower compared to 0.12 g of PEG-NP (PEG-HCPT), 0.18 g of non-NP (PEG-HCPT), 0.23 g of PEG-HCPT solution, 0.31 g of HCPT alone, and 0.47 g for saline.	166
	PLGA	Holo-Tf	222	PTX	Human breast cancer cells MCF-7/Adr resistant to ADR	At a concentration of 1 g/ml the targeted particle showed a 70% antiproliferative effect, while non-targeted particles showed 55% and free PTX showed 20%.	162
	Poly(aminopoly (ethylene glycol) cyanoacrylate-co-hexadecyl cyanoacrylate) (poly(H ₂ NPEGCA-co-HDCA))	Holo-Tf	101.4	PTX	Mice bearing s.c. murine sarcoma S-180 cells	For mice treated i.v. with 20 mg/kg × 5 Tf-NP (PTX), the tumor burden was much smaller compared with free PTX or non-targeted NPs. In addition, the life span of tumor-bearing mice was significantly increased when they were treated with Tf-NPs.	165
	Poly(lactide)-d-α-Tocopheryl polyethylene glycol succinate (PLA-TPGS)	Holo-Tf	137.6	Docetaxel	C6 rat glioma cell line	<i>In vitro</i> cytotoxicity: the IC ₅₀ of docetaxel loaded PLA-TPGS/Tf was 5.10±0.44 μg/mL, for PLA-TPGS 5.96±1.15 μg/mL, for PLGA = 6.53±1.26 μg/mL, and for Taxotere® = 16.77±3.93 μg/mL.	167
	PLGA	Holo-Tf	220	PTX	Human prostate cancer cell line PC3 Athymic nude mice bearing s.c. PC3 tumors C6 rat glioma cell line	The IC ₅₀ for PTX loaded Tf-conjugated NPs (PTX-NPs-Tf) was 0.6×10 ⁻³ μM, for non-targeted Tx-NPs was 3.1×10 ⁻³ μM, and for PTX in solution was 3.5×10 ⁻³ μM. Animals that received a single-dose 24 mg/kg intratumoral injection of PTX-NPs-Tf demonstrated complete tumor regression and significantly extended survival rate compared to those that received	161

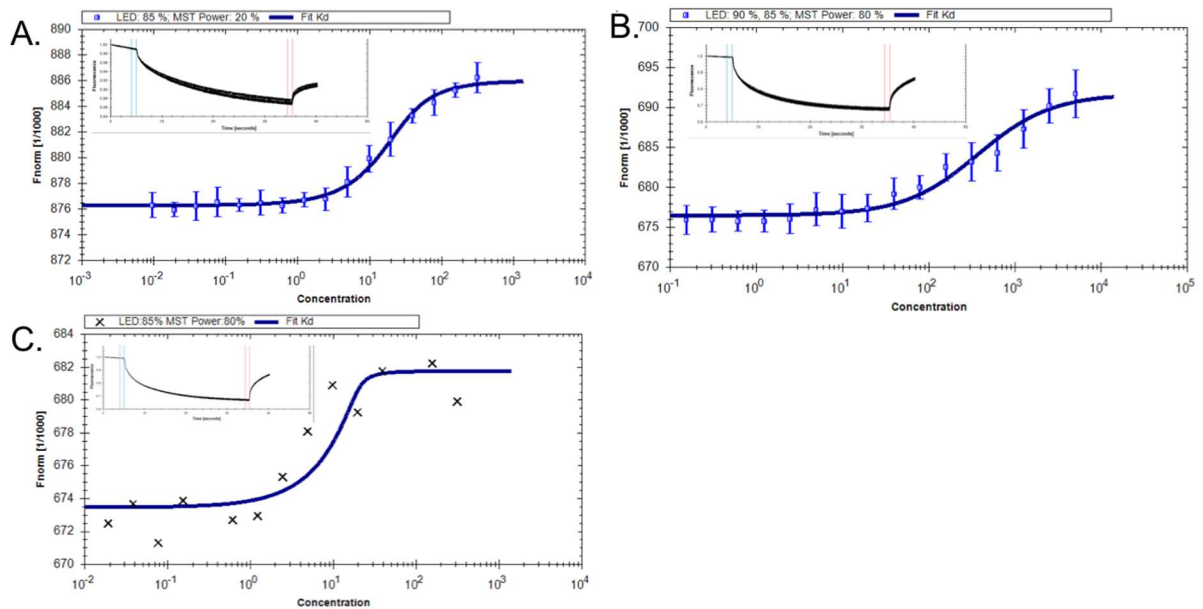
System	Composition	Ligand	Size (nm)	Cargo	Cell/Tumor model	Comments	Ref
					C6 rat glioma cell line	either Tx-NPs or Tx-Cremophor® EL. Cytotoxicity was significantly higher and the observed in the order of TE-PTX-PLGA-NPs > P85-PTX-PLGA-NPs > PTX-PLGA-NPs in comparison to PTX.	
	PLGA	Holo-TF	182.8	PTX	Rats bearing s.c. C6 glioma tumors	<i>In vivo</i> biodistribution in male Sprague-Dawley rats bearing C6 glioma showed higher tumor PTX concentrations in animals administered with PTX-NPs compared to PTX.	163

N/D = not determined

B. Figure : Carte du phagemide pHEN1



C. Figure : Détermination des constantes de dissociation (Kd) par thermophorèse à micro-échelle.



Détermination des constantes de dissociation (Kd) par thermophorèse à micro-échelle.
(A) VHH E9 Cystéine C-terminal avec la transferrine humaine marquée par de l'Alexa fluor® 647, $K_d = 8,4 \text{ nM}$. **(B)** VHH D10 Cystéine C-terminal avec la transferrine de souris marquée par de l'Alexa fluor® 647, $K_d = 360 \text{ nM}$. **(C)** VHH D10 Cystéine C-terminal avec la transferrine humaine marquée par de l'Alexa fluor® 647, $K_d = 0,418 \text{ nM}$.

D. Tableau 1: Cinétique du VHH D10 et de la GFP administrés par voie intrapéritonéale

Time (h)	IP VHH D10	SD	IP GFP	SD
0,65			2,67E+10	n/a
1	5,66E+10	4,15E+10	1,44E+10	n/a
1,35			2,25E+10	n/a
1,5	6,87E+10	7,12E+10		
1,7			2,94E+10	n/a
2,5	7,75E+10	3,87E+10	2,18E+10	n/a
2,85			3,14E+10	n/a
5	5,76E+10	6,18E+09	7,11E+09	n/a
5,35			6,98E+09	n/a
6,5	2,57E+09	4,38E+08	2,83E+09	n/a
6,85			6,47E+09	n/a
8	2,30E+10	1,06E+09		
24	1,23E+10	1,18E+09	2,38E+10	2,65E+10
30	1,46E+10	2,79E+09	8,25E+09	9,55E+09
96	1,54E+10	4,88E+09	1,65E+09	3,89E+07
120	5,34E+09	1,62E+09	8,64E+09	7,26E+08
144	1,56E+09	2,40E+07	3,06E+09	5,59E+08
168	2,40E+10	3,17E+10	1,91E+09	2,12E+07
288	9,70E+09	7,58E+08	9,70E+09	7,58E+08
336	1,89E+10	5,87E+09	2,37E+10	2,49E+10

D. Tableau 2 : Cinétique du VHH D10 et de la GFP administrés par voie intraveineuse

Time (h)	IV VHH D10	SD	IV GFP	SD
1	3,58E+10	3,69E+10		
1,2			7,90E+09	3249861741
1,5	4,67E+10	5,84E+10	5,34E+09	1111695252
2,5	4,51E+10	5,97E+10	8,77E+09	161967075
5	7,65E+09	1,05E+09	6,11E+09	192666378
6,5	8,63E+09	9,52E+08	5,55E+09	1585452301
7,5			6,68E+09	1,33E+09
8	8,12E+09	1,05E+09		
24	5,76E+09	7,05E+08	5,15E+09	6,47E+08
30	4,62E+09	6,13E+08	5,00E+09	3,24E+11
96	1,83E+09	3,75E+08	2,02E+09	9,33E+08
120	9,94E+08	2,25E+08	2,41E+09	327519974
144	5,59E+09	5,14E+08	2,21E+09	172143351
168	4,55E+09	8,49E+08	2,14E+09	319877060
288	7,04E+09	3,36E+08	2,27E+09	2,95E+10
336	9,10E+09	5,32E+09	6,95E+09	8,52E+08

E. Tableau 1 : Etude de la biodistribution du VHH C3 en présence ou non de transferrine, au niveau tumoral

Tumor uptake (%)						
	GROUPE C : VHH C3			GROUPE D : hTf-VHH C3		
Time (h)	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM
0,08	2,07	1,02	0,458	0,53	0,143	0,064
0,13				0,504	0,504	0,356
0,17	1,2	0,127	0,0859			
0,18				0,623	0,986	0,57
0,25	2,23	4,13	1,3	0,749	0,913	0,527
0,30				0,884	0,388	0,274
0,32				0,255	0,334	0,193
0,33				3,37	0,551	0,389
0,50	0,821	0,516	0,182			
0,58	0,733	0,533	0,25	0,611	0,392	0,226
0,63				0,527	0,173	0,0999
0,67				0,51	0,382	0,27
1,00	1,32	0,779	0,348	0,706	0,589	0,263
1,17	0,669	0,716	0,413	0,545	0,248	0,111
2,00	0,92	0,71	0,36	0,434	0,335	0,126
3,00	0,492	0,463	0,267	0,536	0,275	0,0972
3,25	1,06	0,325	0,188			
4,00	1,9	1,7	0,539	1,05	0,656	0,208
5,00	1,69	0,74	0,234	0,875	0,656	0,208
6	1,12	0,462	0,146	1,01	0,716	0,226
24	1,46	0,589	0,186	1,49	0,747	0,236
48	1,84	0,763	0,254	1,71	0,768	0,243
72	1,95	0,881	0,278	1,75	0,619	0,196
96	2,23	0,859	0,271	1,51	0,544	0,172
168	1,3	0,68	0,215	1,81	0,973	0,308
192	0,785	0,494	0,156	1,67	0,73	0,258
216	2,46	4,46	1,41	1,21	0,314	0,0992
240	1,48	0,986	0,312	1,51	0,824	0,26
264	0	0	0	1,09	0,391	0,148
336	0	0	0	1,5	0,65	0,23

E. Tableau 2 : Etude de la biodistribution du VHH C3 en présence ou non de transferrine, au niveau cérébral

brain uptake (%)						
Time (h)	GROUPE C : VHH C3			GROUPE D : hTf-VHH C3		
	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM
0,08	5,62	2,33	1,04	4,25	1,8	0,806
0,13				2,6	1,56	1,1
0,17	2,24	0,0596	0,0422			
0,18				1,92	3,05	1,76
0,25	3,99	1,97	0,624	2,95	3,07	1,77
0,30				4,34	0,645	0,456
0,32				16,3	22	12,7
0,33				10,7	1,32	0,932
0,50	4,66	1,97	0,698			
0,58	4,33	0,407	0,288	2,66	2,81	1,62
0,63				4,43	0,654	0,378
0,67				4,04	3,18	2,25
1,00	7,87	6,96	3,11	4,22	3,54	1,58
1,17	5,32	3,71	21,4	4,24	1,75	0,783
2,00	4,6	4,69	17,7	4,65	2,16	0,817
3,00	7,01	2,24	1,29	4,13	1,66	0,586
3,25	3,37	0,676	0,391			
4,00	6,85	3,27	1,04	5,73	2,66	0,841
5,00	8,44	7,27	2,3	7,12	3,6	1,14
6,00	8,75	3,79	1,2	6,41	3,15	0,996
24,00	8,78	2,71	0,856	9,48	1,65	0,52
48,00	9,79	2,16	0,683	2,74	33,4	10,6
72,00	7,941	2,69	0,852	7,9	0,982	0,31
96,00	8,75	1,39	0,439	6,92	1,16	0,367
168,00	8,76	2,12	0,67	6,37	1,45	0,459
192,00	7,46	1,49	0,473	7,42	2,54	0,803
216,00	7,73	0,758	0,268	6,06	1,26	0,399
240,00	7,44	2,39	0,755	5,26	2,05	0,649
264,00				5,24	1,52	0,482
336,00				6,65	8,24	2,61

E. Tableau 3 : Etude de la biodistribution du VHH C3 en présence ou non de transferrine, au niveau de la rate/foie

Spleen uptake (%)						
Time (h)	GROUPE C : VHH C3			GROUPE D : hTf-VHH C3		
	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM
0,08	4,49	3,77	1,69	0,8	0,328	0,147
0,13				2,74	3,16	2,23
0,17	1,82	1,82	1			
0,18				1,45	2,03	1,17
0,25	4,07	2,76	0,872	0,967	0,842	0,486
0,30				9,74	0,121	8,58
0,32				1,83	0,865	0,499
0,33				31,2	35	24,8
0,50	2,54	1,32	0,466			
0,58				1,62	1,12	0,649
0,63				0,98	0,313	0,181
0,67				1,08	1,24	0,875
1,00	2,45	1,22	0,546	1,08	1,11	0,495
1,17	2,37	2,52	1,2	1,08	0,643	0,287
2,00	2,43	1,2	0,6	2,16	1,28	0,482
3,00	8,8	4,96	2,86	1,84	1,08	0,381
3,25	2,54	0,121	0,0697			
4,00	4,61	3,33	1,05	1,92	1,63	0,514
5,00	3,9	2,89	0,915	2,58	1,49	0,472
6,00	7,96	3,94	1,25	2,02	1,52	0,48
24,00	7,66	4,73	1,5	9,78	6,09	1,93
48,00	7,28	3,51	1,11	6,62	3,5	1,11
72,00	5,09	2,23	0,705	4,31	2,16	0,684
96,00	7,32	1,55	0,491	7,28	9,02	2,85
168,00	4,79			4,63	2,34	0,738
192,00	6,92			4,67	1,81	0,571
216,00	4,32			3,93	1,17	0,371
240,00	3,89			3,9	0,95	0,3
264,00				4,78	1,65	0,625
336,00				4,19	1,2	0,38

Serment de Galien

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- **D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**
- **D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**
- **De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.**
- **En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.