

Centre Énergie Matériaux Télécommunication

**CRIBLAGE DE STRUCTURES D'ANTICORPS TRI-SPECIFIQUES
ENGAGEANT LES CELLULES T, UTILISANT LA
NANOTECHNOLOGIE DE L'ADN**

Par

Ahlem Ben Mansour

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences de l'énergie et des matériaux

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Charles Gauthier
INRS-AFSB

Examineur externe

Simon Matoori
Université de Montréal

Directeur de recherche

Marc Andre Gauthier
INRS-EMT

Co-directrice de recherche

Maya Saleh
INRS-AFSB

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de recherche Prof. Marc Andre Gauthier de m'avoir intégré au sein de son groupe et du support apporté lors de la réalisation de mes travaux. Il m'a permis d'évoluer dans un milieu de recherche stimulant auprès de collaborateurs. Ainsi, j'ai pu atteindre mes objectifs.

À ces remerciements, je dois ajouter aussi le Prof. Maya Saleh pour son accompagnement attentif, ses conseils éclairés et son soutien constant tout au long de ce projet de maîtrise. Sa disponibilité, son sens pédagogique et la qualité de ses orientations scientifiques ont largement contribué à la progression et à la qualité de mon travail.

Un immense merci à Andrea A. Greschner, Ph.D, notre associée de recherche, pour son aide exceptionnelle tout au long de mes deux années de maîtrise. Elle a contribué de manière significative à ce projet, toujours présente pour m'accompagner, répondre à mes questions et m'offrir un soutien constant. Sa disponibilité, sa patience et sa générosité ont été essentielles à la réussite de ce travail.

Je souhaite également remercier chaleureusement Dr. Yves Durocher, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et offert l'opportunité d'effectuer la production des protéines au sein de son équipe. Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire Durocher, pour leur aide, leur bienveillance et leur disponibilité. Leur esprit collaboratif a grandement facilité mon intégration et l'accomplissement de mes expériences.

Je tiens également à remercier mes collègues, en particulier Kevin Coutu, candidat au Ph.D, pour son soutien constant, sa générosité et son esprit collaboratif. Je souhaite également exprimer ma profonde gratitude à Behnaz, Amatus et Ching, ainsi qu'à l'ensemble de l'équipe, pour leur aide précieuse, leurs conseils avisés et leur disponibilité tout au long de mon parcours.

Je souhaite également adresser mes remerciements les plus sincères à ma famille pour leur soutien indéfectible, leur patience et leurs encouragements tout au long de mon parcours de maîtrise. Leur confiance en moi et leurs conseils m'ont donné la motivation nécessaire pour surmonter les défis et mener ce projet à bien.

Je remercie aussi mes amis, pour leur présence, leur compréhension et leur soutien moral. Leur écoute et leurs encouragements ont été précieux durant les moments de stress et m'ont permis de garder un équilibre tout au long de ces années.

RÉSUMÉ

Ce projet vise le développement d'une nouvelle génération d'immunothérapies anticancéreuses reposant sur des anticorps tri-spécifiques capables de cibler simultanément un antigène exprimé par les lymphocytes T et deux antigènes tumoraux. La nanotechnologie de l'ADN a été exploitée pour concevoir des nanostructures aux propriétés contrôlées de géométrie, de valence et de flexibilité, servant de plateformes pour l'assemblage de fragments d'anticorps à chaîne variable simple (scFv).

Quatre scFv dirigés contre CD3, CD19, PD-1 et PD-L1 ont été produits et purifiés, en parallèle de l'anticorps bispécifique blinatumomab utilisé comme contrôle. Les rendements obtenus étaient de 35 mg pour le scFv_{CD19}, 6,6 mg pour le scFv_{CD3}, 16 mg pour le blinatumomab, 44 mg pour le scFv_{PD-L1} et 0,14 mg pour le scFv_{PD-1}. Les scFv monomériques ont été réduits à l'aide de le tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) immobilisé, tandis que la déprotection des oligonucléotides d'ADN porteurs d'un groupe maléimide protégé a été réalisée par une réaction rétro-Diels–Alder. La conjugaison scFv–ADN a ensuite été effectuée par une réaction de Michael thiol–maléimide.

La formation des hybrides scFv–ADN a été confirmée par chromatographie d'échange de cations et électrophorèse sur gel natif. Cette étude prépare le développement d'anticorps modulables et multi-spécifiques pour l'immunothérapie.

Mots-clés : Anticorps tri-spécifiques ; immunothérapie ; nanotechnologie de l'ADN ; scFv ; conjugaison thiol-maléimide ; CD3 ; CD19 ; PD-1 ; PD-L1 ; hybrides ADN-protéine.

ABSTRACT

This project aims to develop a new generation of anticancer immunotherapies based on trispecific antibodies capable of simultaneously targeting three antigens: one expressed on T lymphocytes and two on cancer cells. DNA nanotechnology was used to design nanostructures with precise control over geometry, valence, and flexibility, serving as a platform for grafting single-chain variable antibody fragments (scFv).

Four scFv targeting CD3, CD19, PD-1, and PD-L1, as well as the bispecific antibody blinatumomab as a control, were successfully produced and purified. Monomeric scFv reduction was performed using immobilized TCEP, and deprotection of protected maleimide DNA oligonucleotides was achieved via the retro Diels-Alder reaction. The conjugation of scFv to DNA was achieved by the thiol–maleimide Michael-addition reaction, and the scFv–DNA hybrids was confirmed by cation-exchange chromatography and native gel electrophoresis.

Yields were variable: 35 mg for scFv_{CD19}, 6,6 mg for scFv_{CD3}, 16 mg for le blinatumamab, 44 mg for scFv_{PD-L1}, and 0.14 mg for scFv_{PD-1}. The reaction conditions were optimized producing the scFv–DNA hybrids. This work is that star demonstrates the therapeutic potential of DNA-based modular antibodies, providing a promising platform for the future design of optimized multi-specific antibodies for immunotherapy.

Keywords: Trispecific antibodies; immunotherapy; DNA nanotechnology; scFv; thiol–maleimide conjugation; CD3; CD19; PD-1; PD-L1; DNA–protein hybrids.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	v
ABSTRACT	vii
TABLE DES MATIÈRES	ix
LISTES DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX	xiii
LISTES DES ABRÉVIATIONS	xv
1 INTRODUCTION	1
1.1 Immunothérapie anti-cancéreuse	1
1.2 Généralité sur les anticorps monoclonaux	4
1.3 Les anticorps bispécifiques.....	7
1.3.1 Généralité	7
1.3.2 Mode d'action	8
1.3.3 Applications	9
1.3.4 Avantages.....	11
1.3.5 Limites et défis.....	11
1.4 Les anticorps tri-spécifiques	12
1.5 Le double ciblage	13
1.5.1 Cellules tumorales	13
1.5.2 Cellules immunitaires.....	14
1.6 Production des BsAb.....	15
1.6.1 Approche Quadroma	15
1.6.2 Approches génétiques	15
1.7 Production des anticorps TsAbs	20
1.7.1 Conjugaison chimique	20
1.7.2 Approches génétiques	21
1.8 Objectif.....	21

2	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	27
2.1	Production des fragments ScFv (CD3, CD19, PD-I1 et PD1) et blinatumomab.....	27
2.1.1	Matériel	27
2.1.2	Transformation, amplification bactérienne et purification de l'ADN transfecté...	28
2.1.3	Transfection des cellules	28
2.1.4	Récolte du surnageant et analyse par Western blot	29
2.1.5	Purification des scFv produits.....	30
2.1.6	SDS-PAGE et deuxième purification.....	31
2.2	Production des différents hybrides S22-scFv _{PD-L1} ; S23-scFv _{CD19} et S24-scFv _{CD3}	32
2.2.1	Réduction des scFv (scFv _{CD19} , scFv _{CD3} et scFv _{PD-L1})	32
2.2.2	Déprotection des brins d'ADN-maléimide (s22, s23 et s24) et leur conjugaison avec les scFv.....	34
2.3	Purification des bio-conjugués produits	36
3	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	37
3.1	Production des fragments scfv (CD3, CD19, PD-L1 et PD1).....	37
3.1.1	La viabilité et la densité cellulaire des cellules transfectées par les différents vecteurs de clonage.	37
3.1.2	Western blot.....	42
3.1.3	SDS-PAGE.....	43
3.2	Production et purification des hybrides ADN-scFv, en vue de préparer des Tsab....	47
3.2.1	Formation des hybrides ADN-scFv.....	47
3.2.2	Purification des hybrides formés	59
4	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	65
5	BIBLIOGRAPHIE.....	69

LISTES DES FIGURES

Figure 1.1	Mécanisme d'action du blinatumomab au BsAb anti CD19/CD3 de type BiTE.....	2
Figure 1.2	Mécanisme de reconnaissance de la cellule cible CD19+ par la cellule CAR-T.....	4
Figure 1.3	Structure générale d'un anticorps monoclonal avec ses différents fragments.	5
Figure 1.4	Mécanismes d'action d'anticorps monoclonaux. : Fonction cytolytique (ADCC ; CDC ; ADCP) et la fonction neutralisante.	7
Figure 1.5	Exemples d'anticorps bispécifiques avec fragment F _c (à gauche) et sans fragment F _c (à droite).....	8
Figure 1.6	Mécanismes d'action des BsAbs	9
Figure 1.7	Les deux catégories principales de TsAb: avec fragment F _c (à gauche) et sans fragment F _c (à droite).	13
Figure 1. 8	Structure de l'anticorps aTriFlex	14
Figure 1. 9	Effet cytotoxique induit par le TsAb CD38/CD28×CD3.....	14
Figure 1. 10	Principes de la technologie CrossMab	16
Figure 1. 11	DuoBody-CD3×CD20, est une IgG1 et porte les mutations L234F, L235E et D265A, dans le fragment FC (Engelberts et al., 2020).	18
Figure 1. 12	L'anticorps DART CD19/CD3	20
Figure 1. 13	(A) Structure du Blinatumomab typique. (B) Exemples de BiTE hybrides utilisés pour contrôler la distance inter-scFv, la flexibilité conformationnelle et le nombre de scFv ajoutés. (C) Diagrammes en boîte de la viabilité moyenne obtenues avec chaque anticorps bispécifique testé.	23
Figure 1. 14	Les étapes clés pour la conception des anticorps tri-spécifiques.....	25
Figure 3.1	La viabilité des cellules CHO3E7 transfectées avec les différents vecteurs durant les 12 jours suivant la transfection.	40
Figure 3.2	La densité cellulaire des cellules CHO3E7 transfectées avec les différents vecteurs durant les 12 jours suivant la transfection.	40
Figure 3.3	Résultats du Western Blot.	43
Figure 3.4	Résultats de SDS PAGE.....	45
Figure 3.5	Résultats de l'électrophorèse sur gel dénaturant de la réduction des scFv avec le DTT.....	48

Figure 3.6	Résultats de l'électrophorèse sur gel dénaturant de la réduction des scFv avec TCEP en solution.....	49
Figure 3.7	Résultat de l'électrophorèse SDS-PAGE de scFv réduit par TCEP immobilisé...50	
Figure 3.8	Le mécanisme d'addition de type Michael.....	52
Figure 3.9	Réaction de Retro Diels-Alder responsable à la déprotection de l'ADN.....	53
Figure 3.10	Résultat de l'électrophorèse sur gel natif ; Puit 1 : Marqueur de taille (pb), Puit 2 : ADN libre (contrôle négatif), Puit 5 : Échantillon du milieu réactionnel.....	54
Figure 3.11	Résultats de l'électrophorèse sur gel natif.....	55
Figure 3.12	Résultats d'électrophorèse sur gel natif et pourcentage de bande détectée.....	56
Figure 3.13	Résultats de l'électrophorèse. (a) Analyse électrophorèse sur gel natif des hybrides produits. (b) Analyse électrophorèse sur gel dénaturant des hybrides produits.....	57
Figure 3.14	Résultats de la purification des contrôles	61
Figure 3.15	Résultat du gel d'électrophorèse natif de la purification des produits de contrôle.....	61
Figure 3.16	Résultats de la purification. (a) chromatogramme de la purification de S23-scFv _{CD19} . (b) chromatogramme de la purification de S22-scFv _{PD-L1}	62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Exemples des maladies traitées par des anticorps monoclonaux.....	6
Tableau 1.2	Quelques anticorps bispécifiques approuvés et en cours de développement.....	10
Tableau 3.1	Séquences protéiques des ScFv produites et du blinatumomab.	38
Tableau 3.2	Quantités finales obtenues de chaque produit.	47
Tableau 3.3	Séquences des ADN utilisées pour la formation des hybrides.	52

LISTES DES ABRÉVIATIONS

ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps)
ADCP	Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis (Phagocytose cellulaire dépendante des anticorps)
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
Amp	Ampicilline
APC	Antigen-Presenting Cell (Cellule présentatrice d'antigène)
BCMA	B-Cell Maturation Antigen (Antigène de maturation des cellules B)
BiTE	Bispecific T-cell Engager (engageur de lymphocytes T bispécifique)
BsAb	Anticorps bispécifique
CAM	Complement Attack Membrane (Complexe d'attaque membranaire)
CAR-T	Cellules T à récepteur antigénique chimérique
CDC	Complement-Dependent Cytotoxicity (Cytotoxicité dépendante du complément)
CD	Cluster of Differentiation
cFAE	controlled Fab-arm exchange (échange contrôlé de bras Fab)
CH	Constant Heavy chain domain (Domaine constant de la chaîne lourde)
CHO	Chinese Hamster Ovary
CHU	Centre hospitalier universitaire
CL	Constant Light chain domain (Domaine constant de la chaîne légère)
CMV	Cytomégalovirus

CRS	Cytokine Release Syndrome (Syndrome de relargage cytokinique)
CV	Column Volume (volume de colonne)
DEAE	Diéthylaminoéthyle
DTT	Dithiothréitol (agent réducteur)
DTNB	5,5'-Dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque)
DMA	<i>N,N</i> -diméthylacétamide
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (Récepteur du facteur de croissance épidermique)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (test immuno-enzymatique)
F	Fraction collectée lors de purification chromatographique
Fab	Fragment Antigen-Binding (Fragment de reconnaissance de l'antigène)
F _c	Fragment crystallizable (Fragment constant d'un anticorps)
FDA	Food and Drug Administration
Fv	Variable Fragment (Fragment variable V _H + V _L)
FLPC	Fast Liquid Protein Chromatography
GFP	Green Fluorescent Protein (protéine fluorescente verte)
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
g/L	grammes par litre
HC	Heavy Chain (Chaîne lourde)
HLA	Human Leukocyte Antigen

IgG	Immunoglobulin G (Immunoglobuline G)
IL	Interleukine
kDa	Kilodalton (unité de masse moléculaire)
LLA-B	Leucémie Lymphoblastique Aiguë à cellules B
LC	Light Chain (Chaîne légère)
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LNH	Lymphome Non Hodgkinien
LT	Lymphocytes T
LPS	Lipopolysaccharide
LDL	Cholestérol des Lipoprotéines de Basse Densité
MET	Proto-oncogène MET, récepteur à activité tyrosine kinase
M\$	Millions de dollars
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
MeOH	Méthanol
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complexe majeur d'histocompatibilité)
mAb	Monoclonal Antibody (Anticorps monoclonal)
ng/μL	Nanogramme par microlitre
nmoles	Nanomoles
NaCl	Chlorure de sodium
NIH	National Institutes of Health
NK	Natural Killer (Cellules tueuses naturelles)
rpm	rotation par minute

OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
PBS	Phosphate-Buffered Saline (tampon phosphate)
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne
PCSK9	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9
PD-1	Programmed Cell Death protein 1
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PEG	Polyethylene Glycol (Polyéthylène glycol)
PEI	Polyéthylèneimine
pl	Point isoélectrique
RE	Réticulum Endoplasmique
ARN	Acide ribonucléique
scFv	Single-chain Variable Fragment (Fragment variable à chaîne unique V _H -linker-V _L)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate / Dodécyl sulfate de sodium
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Se	Sélénium
SP	Signal Peptide
S21, S22, S23, S24	Séquences d'oligonucléotides spécifiques utilisées pour conjugaison
TAE	Tris-Acétate-EDTA (tampon pour électrophorèse ADN)
TAMg	Tampon Tris-Acétate avec MgCl ₂
TBE	Tris-Borate-EDTA (tampon pour électrophorèse ADN)
TCA	Tricarboxylic Acid cycle (cycle de Krebs)

TCEP	Tris(2-carboxyethyl) phosphine (agent réducteur de ponts disulfures)
TME	Tumor Microenvironment (Microenvironnement tumoral)
TCR	T-Cell Receptor (Récepteur des lymphocytes T)
TsAb	Tri-Specific Antibody (Anticorps tri-spécifique)
TriTE	Tri-specific T-cell Engager (engageur de lymphocytes T tri-spécifique)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)
VH	Variable Heavy chain domain (Domaine variable de la chaîne lourde)
VL	Variable Light chain domain (Domaine variable de la chaîne légère)
VRS	Virus Respiratoire Syncytial
UV	Ultraviolet
UV-Vis	Ultraviolet-Visible (spectrophotométrie)

1 INTRODUCTION

1.1 Immunothérapie anti-cancéreuse

En 2023, le cancer se classait au deuxième rang des principales causes de décès dans les pays de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), représentant environ 21 % de l'ensemble des décès. Néanmoins, au Japon et en Espagne, cette maladie est devenue la cause principale de mortalité, devant les maladies cardiovasculaires (OCDE, 2025). Parmi les différents types de cancers, on trouve les tumeurs malignes à cellules B caractérisées par leur hétérogénéité. Ces cancers sont traités par diverses voies thérapeutiques, souvent en combinant des traitements standards comme la chimiothérapie ou la radiothérapie et des traitements immuno-thérapeutiques. Comparée aux traitements standards, l'immunothérapie s'avère être une approche prometteuse amenant des améliorations significatives en termes de survies et de qualité de vie. En effet, cette nouvelle thérapie exploite les mécanismes immunitaires de l'organisme pour générer une réponse immunitaire spécifique contre les tumeurs malignes des cellules B tout en ciblant des protéines spécifiques à la surface des cellules B, ce qui aide le système immunitaire à les trouver et à les détruire (Ling et al., 2022).

Parmi les différentes stratégies innovantes de l'immuno-oncologie, les anticorps monoclonaux jouent un rôle crucial dans le traitement des maladies cancéreuses grâce à leur reconnaissance spécifique des antigènes tumoraux en bloquant les signaux de croissance et en activant les mécanismes cytotoxiques des lymphocytes T (LT). Près de 46 % des anticorps thérapeutiques approuvés sont destinés au traitement du cancer (GLOBOCAN, 2021) ce qui confirme leur grand intérêt. La capacité de ces anticorps monoclonaux à se lier spécifiquement aux cellules tumorales a présenté une voie au développement de nouvelles générations d'anticorps bispécifiques (BsAbs) et tri-spécifiques (TsAbs) caractérisées par une large possibilité de cibler divers antigènes sur les LT et sur les cellules cancéreuses. Ceci, présente un avantage majeur pour maximiser l'affinité entre l'anticorps et sa(ses) cible(s) thérapeutiques et l'efficacité du traitement. L'un de ces médicaments est le blinatumomab, un BsAb approuvé en 2014 pour le traitement de deuxième ligne de la leucémie lymphoblastique aiguë à cellules B (LLA-B). Cet anticorps est le premier engageur de LT bi-spécifique (BiTE) à être approuvé pour une utilisation clinique (Amgen, 2014). Il sert comme un pont moléculaire qui permet de rapprocher physiquement les LT CD3+ des lymphocytes B CD19+ induisant l'activation de l'effet cytotoxique des LT et par conséquent la destruction ciblée des cellules B.

Le mécanisme d'action par lequel le BsAb de type BiTE (Figure 1.1) induit l'activation des LT est expliqué par sa capacité à former une synapse immunitaire. La zone de contact étroite d'environ 15 nm entre les membranes cellulaires est rendue possible grâce à sa faible taille

(environ 11 nm). Ceci favorise la modification structurale de la protéine CD45 et son exclusion de la zone de contact formée entre les cellules tumorales cibles et les LT (Alhallak, 2021). Cette exclusion de la protéine réceptrice tyrosine phosphatase CD45 réside dans sa taille importante par rapport à la zone de contact formée ce qui engendre, à la suite du rapprochement étroit des cellules tumorales envers les LT, le changement de son emplacement et sa localisation adjacente aux LT en inhibant sa fonction de déphosphorylation. Cela favorise la libération des molécules tyrosine kinase Lck responsables de la phosphorylation du complexe TCR/CD3 dans le cadre de contacts restreints et le déclenchement par la suite de l'activation du système de signalisation des LT (Alhallak, 2021). À la suite de la phosphorylation du récepteur TCR/CD3, une série de réactions de signalisation de LT commence à s'activer en vue d'induire la destruction des cellules cibles reconnues par l'anticorps BiTE. Le processus de signalisation agit directement sur l'ADN chromosomique des LT afin d'induire de nombreuses fonctions effectrices, notamment la prolifération des LT via l'activation des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN. Il assure également l'activation des gènes codant pour la synthèse de protéines cytolytiques, enveloppées dans des vésicules sécrétoires, incluant principalement la perforine et des cocktails de granzymes (Nagorsen, 2012). Le processus de la destruction cellulaire implique en premier lieu la libération, par exocytose, de la perforine dans la synapse cytolytique formée, induisant en présence d'ions Ca^{2+} , des dommages au niveau de la membrane cellulaire des cellules cibles *via* des pores membranaires (Tian 2021). Ces pores permettent la diffusion intracytoplasmique facile des granules cytotoxiques, notamment les granzymes B, qui activent plusieurs voies de signalisation de l'apoptose responsables à la lyse des cellules cibles (Tian 2021). Le rôle principal de la granzyme B implique l'activation des caspases par clivage protéolytique des pro-caspases 3, 6, 7, 8 et 10 impliquées dans le phénomène d'apoptose qui est un des principaux types de mort cellulaire régulée (Cigalotto, 2024).

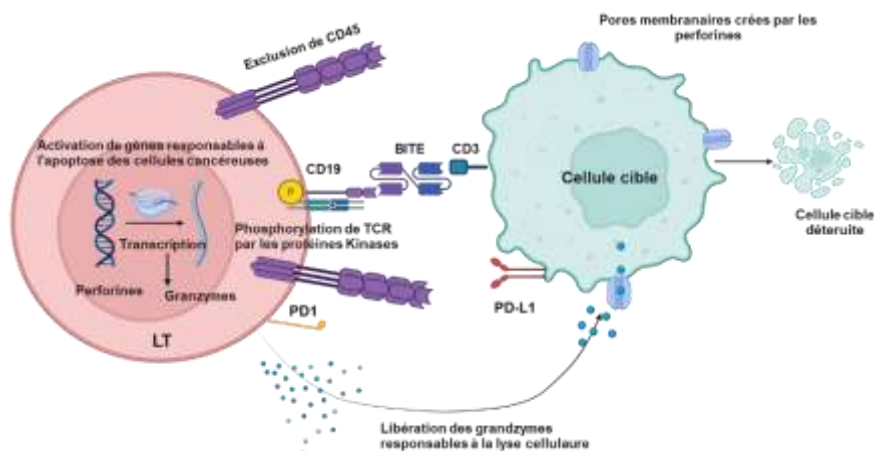


Figure 1.1 Mécanisme d'action du blinatumomab au BsAb anti CD19/CD3 de type BiTE

Toutefois, les cellules cancéreuses exploitent également des nombreux mécanismes de défense qui leur permet de développer une résistance vis à vis le système immunitaire en utilisant la voie PD1/PD-L1 comme un processus majeur de l'immunosuppression tumoral. Cette voie favorise le blocage de la signalisation des LT et rend le système immunitaire inefficace dans l'élimination des cellules tumorales (Jiang et al., 2019). Ceci a mené à des recherches plus approfondies des thérapies ciblant la voie PD1/PD-L1, comme une approche prometteuse pour empêcher l'échappement immunitaire des cellules tumorales. Dans ce contexte, diverses tumeurs solides, telles que le mélanome, le cancer du poumon et le cancer du rein, ont été traitées à l'aide d'anticorps anti-PD-1/PD-L1, agissant comme des inhibiteurs des points de contrôle immunitaires (NIH, 2022). Cependant, le blocage complet de PD-1, bien qu'efficace à court terme, peut entraîner la différenciation ou la perte des LT de type souche, limitant la durabilité de la réponse antitumorale. Ces observations soulignent l'importance de préserver ces précurseurs pour maximiser l'efficacité à long terme des immunothérapies anticancéreuses (Jyh Liang et al., 2025).

Dans la suite du progrès des stratégies d'immunothérapie, les thérapies à médiation cellulaire utilisant la thérapie par LT à récepteur antigénique chimérique (CAR-T) représentent aussi une approche thérapeutique innovante dans le traitement ciblé de certains cancers du sang notamment les leucémies (Chu, 2025). Cette thérapie est une thérapie génique qui exploite les LT autologues du patient, prélevés par la technique d'aphérèse, qui sépare et collecte spécifiquement les LT, puis génétiquement modifiées par l'insertion d'un nouveau gène codant pour la protéine extracellulaire CD19 pour exprimer un récepteur chimérique à l'antigène ciblant la protéine CD19 présente sur les cellules cibles (Figure 1.2). Ces cellules CAR-T anti-CD19 se multiplient en laboratoire et sont réinjectées au patient par voie intraveineuse (Chu, 2025). Le tisagenlecleucel constitue la première thérapie CAR-T autorisée par la FDA américaine en 2017 en tant que traitement pour les patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique avec une rémission globale confirmée de 82,5 % (FDA, 2017). Jusqu'à 2022, six produits CAR-T ont été approuvés par la FDA américaine dans le monde, avec des taux de rémission complète allant de 40 % à 90 % selon le type du cancer (Hannemann, 2025).

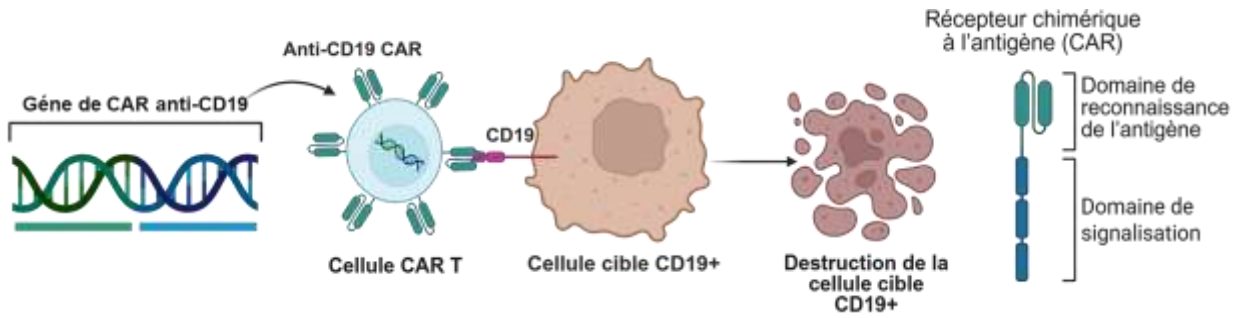


Figure 1.2 Mécanisme de reconnaissance de la cellule cible CD19+ par la cellule CAR-T

Comparés aux anticorps bispécifiques de type BiTE, les CAR-T se distinguent par une réponse durable et prolongée après une seule injection, selon (Caffrey, 2025). Cependant, cette approche nécessite un temps de fabrication long en raison de son mode de production autologue complexe, ce qui limite la rapidité d'accès aux patients. À l'inverse, les BiTE, comme le blinatumomab, offrent une accessibilité immédiate puisqu'ils ne requièrent aucune modification génétique, permettant ainsi une disponibilité rapide du traitement (Yardumian, 2025).

Les CAR-T sont généralement associés à des taux de rémission complète et à des réponses globales supérieures à celles observées avec les BiTE dans divers contextes cliniques. Ils contribuent à une survie prolongée, mais s'accompagnent aussi d'un risque accru d'événements indésirables sévères, tels que le syndrome de relargage cytokinique (CRS) et la neurotoxicité (Techaapornkun et al., 2025). En revanche, les BiTE présentent un profil de sécurité plus favorable, avec une incidence moindre d'événements graves. Leur taille moléculaire réduite facilite une production standardisée ainsi qu'une meilleure pénétration tissulaire (Yardumian, 2025).. Enfin, les BiTE requièrent une administration répétée par perfusion continue en raison de leur demi-vie courte, tandis que les CAR-T, une fois infusés, peuvent persister et se multiplier *in vivo*, offrant ainsi une durée d'action plus soutenue.

1.2 Généralité sur les anticorps monoclonaux

Lorsqu'un agent pathogène étranger (bactéries, virus...) attaque notre organisme, une réaction physiologique se met en action en déclenchant deux réponses immunitaires distinctes : la réponse immunitaire cellulaire et la réponse immunitaire humorale. La réponse immunitaire à médiation humorale implique la libération de différents anticorps monoclonaux, produits par une seule lignée de lymphocytes B (LB) spécifiques chacun à un unique épitope de l'antigène afin de le cibler, le neutraliser et l'éliminer (Atanasov et al., 2025). Cette grande spécificité des anticorps monoclonaux est à l'origine de leur utilisation fréquente comme une approche clinique innovante au cours de ces dernières décennies. En effet, cette découverte scientifique implique l'utilisation d'anticorps dirigés contre un antigène spécifique afin de stimuler le

système immunitaire et assurer la destruction des cellules cibles. L'immunothérapie pourrait être appliquée dans diverses maladies à risques telles que le cancer (Routier et al., 2014), les maladies auto-immunes (Greillier & Grigoriu, 2021) et les maladies infectieuses (Promsote et al., 2023). L'application de cette nouvelle stratégie thérapeutique a débuté dans les années 1970, la période de la découverte des premiers anticorps monoclonaux (Milstein, 1975).

La structure des anticorps monoclonaux de type immunoglobuline G est composée de deux chaînes polypeptidiques lourdes et deux chaînes polypeptidiques légères attachées par des ponts disulfures (Goshen, 2025). Cette structure en Y de l'anticorps est composée par deux fragments variables (Fab) et un fragment constant (F_c) (Figure 1.3). Le fragment Fab est formé par l'association des domaines variables de la chaîne lourde (VH) et de la chaîne légère (VL) et est responsable de la reconnaissance spécifique de l'épitope porté par l'antigène (Theodora & Joachim, 2019). En revanche, le fragment F_c, constitué des régions constantes des deux chaînes lourdes (CH), médie l'interaction de l'anticorps avec les cellules effectrices du système immunitaire, telles que les cellules Natural Killer et les macrophages, via leurs récepteurs F_c, conduisant à leur activation et à l'élimination de l'agent pathogène (Murphy, 2012).

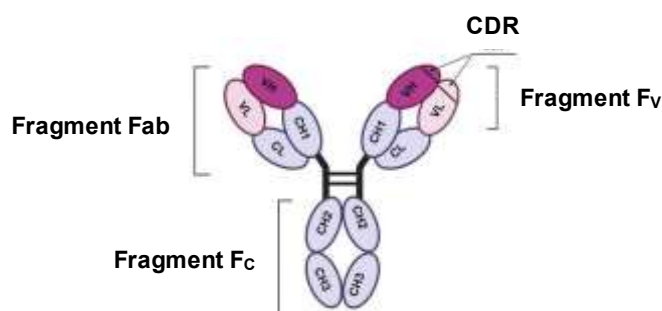


Figure 1.3 Structure générale d'un anticorps monoclonal avec ses différents fragments.

Avec : Fab : Partie de l'anticorps qui reconnaît et se lie à l'antigène ; F_c : Partie constante de l'anticorps impliquée dans les fonctions effectrices ; CDR : Boucles hypervariables du Fab responsables de la spécificité de liaison à l'antigène ; F_v : fragment variable qui reconnaît l'antigène.

Grâce aux avancées de l'ingénierie des protéines au cours du temps, les anticorps monoclonaux ont été optimisés pour devenir humanisés par le remplacement des régions hypervariables (CDR) de l'anticorps humain par des régions CDR murines (Bellet & Dangles-Marie, 2005) ou entièrement humains en utilisant des souris transgéniques ou des modèles d'expression comme les levures ou les phages (Bellet & Dangles-Marie, 2005). Ces options offrent aujourd'hui un large éventail d'options thérapeutiques pour le traitement de nombreuses maladies. Depuis 2010, l'application des anticorps monoclonaux connaît une évolution spectaculaire dans le domaine de l'oncologie. En effet, à la fin de l'année 2017 un total de 73 anticorps avaient reçu une autorisation de mise sur le marché, dont 34 étaient destinés au traitement du cancer (Deligne & Gros, 2019).

Le tableau 1.1 illustre quelques maladies traitées par les anticorps monoclonaux sélectionnées afin d'illustrer la diversité des indications thérapeutiques des anticorps monoclonaux, leur validation clinique et réglementaire, ainsi que la variété de leurs mécanismes d'action.

Tableau 1.1 Exemples des maladies traitées par des anticorps monoclonaux.

Applications thérapeutiques	Nom de l'anticorps	Caractéristiques
Maladies immunes inflammatoires (sclérose en plaque)	Natalizumab (Babaesfahani 2022)	-Approuvé en 2006 par la FDA américaine. -Il se lie aux récepteurs de l'intégrine alpha-4 présents sur les cellules endothéliales et bloque l'infiltration des leucocytes dans le système nerveux central.
Maladies infectieuses (Virus respiratoire syncytial chez les enfants)	Palivizumab (Garegnani et al., 2021)	-Approuvé en 1998 par la FDA américaine. -Anticorps monoclonal humanisé dirigé contre un épitope de la glycoprotéine de fusion du VRS. -Il empêche l'attachement de la particule virale à la cellule hôte.
Maladies cardiovasculaires (cholestérol)	Evolocumab (Sabatine et al., 2017)	-Approuvé en 2015 par la FDA américaine. -Anticorps monoclonal humain dirigé contre la pro-protéine convertase PCSK9.

En outre, l'efficacité des immunothérapies repose sur la diversité des mécanismes d'action des anticorps monoclonaux pour inhiber les tumeurs. En effet, un anticorps monoclonal peut avoir à la fois une fonction cytolytique qui implique le ciblage de l'épitope e.g d'un antigène associé à la tumeur et sa fixation, *via* son fragment F_c, aux cellules immunitaires effectrices (cellules Natural Killers, macrophages) provoquant respectivement l'activation de la voie de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et la voie de la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP) (David, 2020). Également, ils peuvent avoir une fonction neutralisante en ciblant des médiateurs chimiques (cytokines, chimiokines), des facteurs de croissance (e.g., VEGF) et des inhibiteurs du contrôle du système immunitaire (anti CTLA-4, anti PD-1, anti PD-L1...). De plus, ils peuvent activer le complément et la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM) à la surface des cellules ciblées, provoquant leur mort (David, 2020). Ces différents mécanismes d'action des anticorps monoclonaux cliniquement pertinents (Figure 1.4) contribuent au contrôle anti-tumoral par le système immunitaire (Lebranchu, 2018)

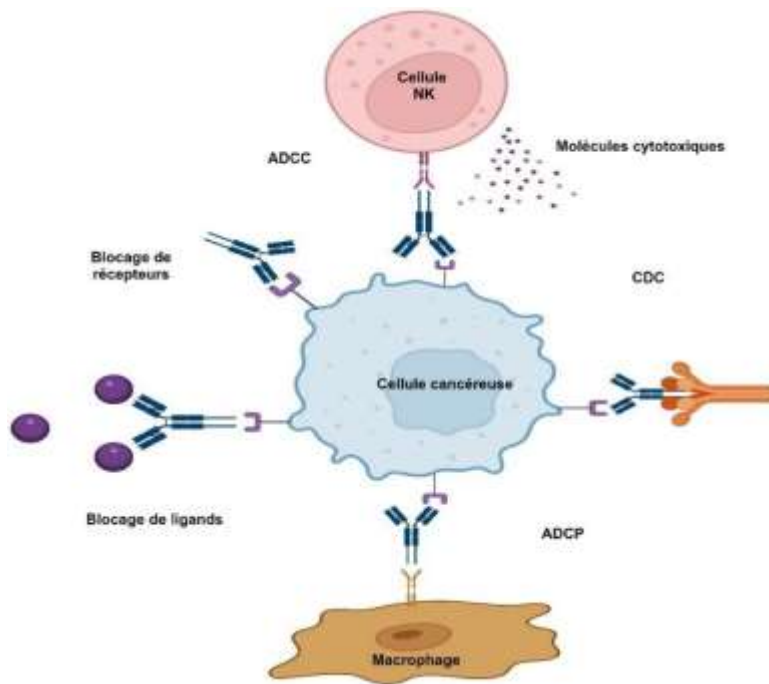


Figure 1.4 Mécanismes d'action d'anticorps monoclonaux. : Fonction cytolytique (ADCC ; CDC ; ADCP) et la fonction neutralisante.

Il est évident que, l'application des anticorps monoclonaux dans le traitement des diverses maladies, en particulier les maladies tumorales, a connu de nombreuses réussites. Cependant, plusieurs études cliniques ont mis en lumière le problème de la résistance des cellules tumorales, ce qui constitue l'une des limites majeures dans l'efficacité des traitements par les anticorps monoclonaux. Cette résistance peut se produire à travers des mutations produites au niveau de l'antigène associé à la tumeur, la perte de l'antigène par trogocytose ou par l'épuisement fonctionnel des cellules immunitaires à la suite de leur exposition permanente aux anticorps (Capuano et al., 2015).

1.3 Les anticorps bispécifiques

1.3.1 Généralité

L'avancée technologique dans le domaine de l'ingénierie génétique a conduit au développement de nouvelles formes d'anticorps thérapeutiques nommés « des anticorps multi-spécifiques » offrant la possibilité de viser plusieurs antigènes pathologiques simultanément ce qui confère aux anticorps des activités cliniques diversifiées et accompagnées de plusieurs avantages thérapeutiques. Les anticorps bispécifiques (BsAb) sont les nouvelles générations d'anticorps, conçus pour s'attacher simultanément à deux cibles distinctes. Cette nouvelle approche a été proposée en 1960 parallèlement avec le développement du premier BsAb par génie chimique (Meric-Bernstam et al., 2017).

En s'appuyant sur leurs constituants structurels, les BsAb pourraient être classés en deux catégories (Figure 1.4) : des anticorps bispécifiques avec le fragment F_C et des BsAb sans fragment F_C (Guo et al., 2023). En effet, la structure des BsAb avec la région F_C offre à l'anticorps la propriété de s'attacher simultanément sur les deux cibles ainsi qu'aux cellules immunitaires effectrices (cellules NK, les macrophages, LT). Dans ce contexte, en 2021 la FDA américaine a approuvé l'application de « l'amivantamab », un anticorps bispécifique avec fragment F_C qui cible EGFR et MET pour le traitement du cancer du poumon non à petites cellules (Yun et al., 2020).

En revanche, les anticorps bispécifiques dépourvus du fragment F_C sont basés, par exemple, sur la structure de deux fragments variables à chaîne unique (scFv ; composés de fragments V_L et V_H) reliés par un court peptide (li eur) de 15 à 20 acides aminés (Kang et al., 2022). Le blinatumomab est le premier BsAb dépourvu de fragment F_C approuvé par la FDA américaine en 2014. Il assure la redirection des LT *via* un scFv anti-CD3 vers des cellules cibles exprimant l'antigène CD19, i.e., les lymphocytes B, y compris les LB des lymphomes et des leucémies. La figure 1.5 ci-dessous illustre les deux types de BsAb.

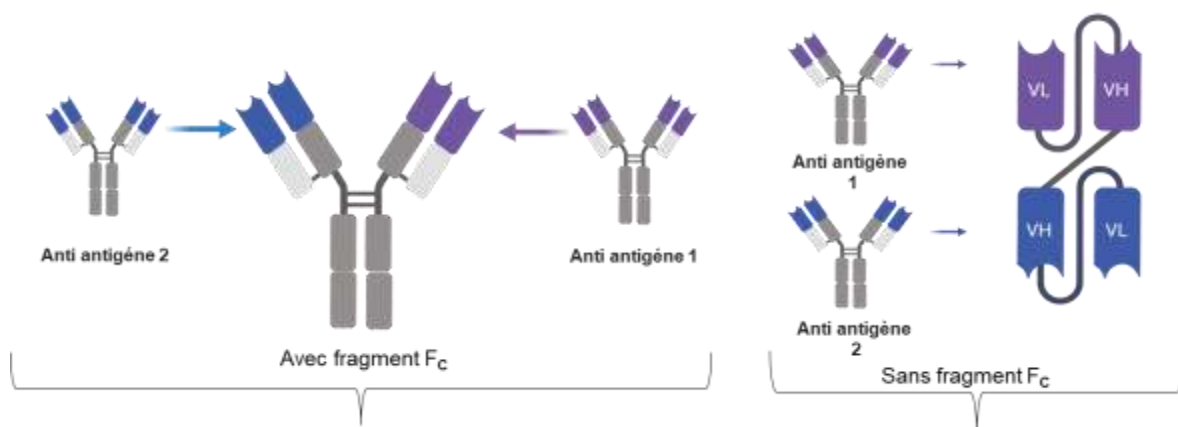


Figure 1.5 Exemples d'anticorps bispécifiques avec fragment F_C (à gauche) et sans fragment F_C (à droite).

1.3.2 Mode d'action

La double affinité des BsAb représente un atout majeur en comparaison avec les anticorps monoclonaux en offrant plusieurs mécanismes d'action possibles (Kontermann, 2012b) (figure 1.6).

-Interaction entre deux cellules distinctes : Les BsAb ont la capacité de s'attacher simultanément à deux types de cellules différentes. Ils agissent comme des connecteurs donnant l'occasion, par exemple, aux LT de cibler les cellules cancéreuses (Kontermann, 2012b), (Yang, 2017).

-Interaction avec les cytokines libérées : Les BsAb ont également la capacité de viser les cytokines libérées dans le microenvironnement tumoral en empêchant leur liaison à leurs récepteurs spécifiques. En inhibant cette liaison, les BsAb sont susceptibles de moduler les réponses immunitaires et l'évolution de la maladie (Kontermann, 2012b), (Godar et al., 2018).

-Interaction entre deux épitopes distincts du même antigène : Cette interaction permet une reconnaissance plus précise et une efficacité accrue optimale dans le ciblage des antigènes recherchés. Cela offre aux BsAb l'avantage de limiter les risques de réactions croisées avec des cellules non ciblées (Yang, 2017), (Kontermann, 2012b).

-Interaction entre deux antigènes distincts de la même cellule : Cette propriété permet le ciblage de divers récepteurs cellulaires simultanément et le blocage, par conséquent, de plusieurs voies de signalisation en parallèle. Cela offre l'opportunité d'amplifier l'effet thérapeutique d'avantage en réduisant les chances que les cellules tumorales contournent le traitement en utilisant des voies de signalisation alternatives (Kontermann, 2012b).

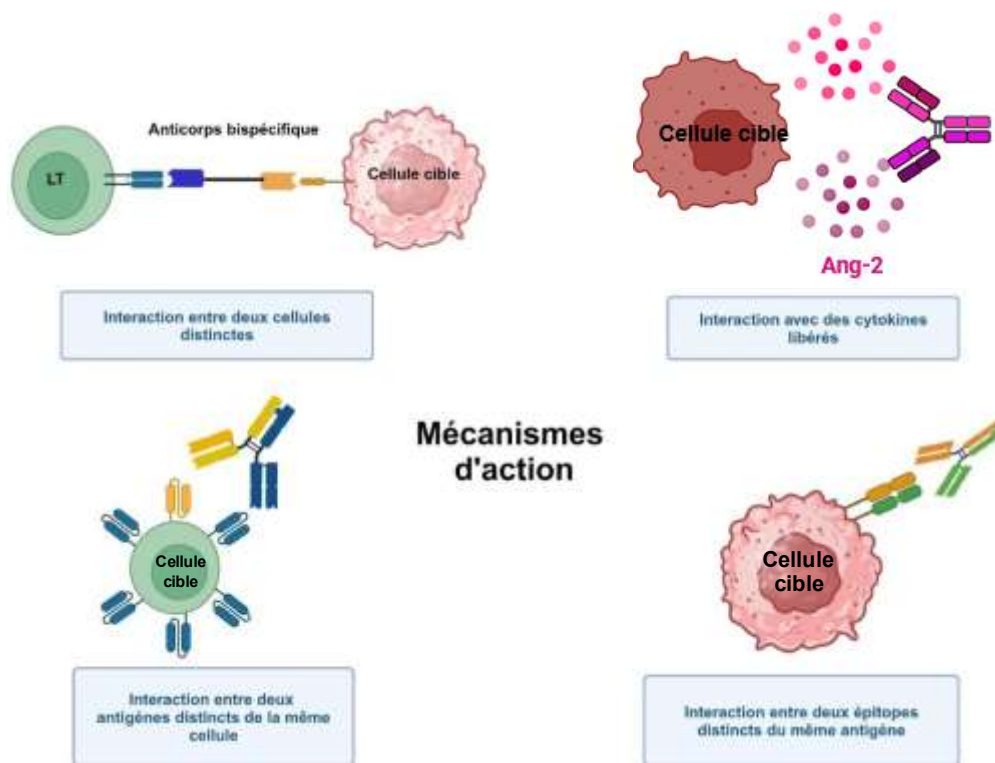


Figure 1.6 Mécanismes d'action des BsAbs.

1.3.3 Applications

L'application des anticorps bispécifiques en clinique constitue aujourd'hui un grand marché mondial (de 600 M\$ en 2022) (Hou et al., 2020). Actuellement, il existe plus de 200 BsAb en développement clinique (plus de 85% pour l'oncologie) et 11 anticorps bispécifiques sont

approuvés par la FDA américaine à la fin de 2023 dont 78% sont destinés pour les cancers (Klein et al., 2024). Le tableau 1.2 ci-dessous présente certains BsAb approuvés et en cours de développement.

Tableau 1.2 Quelques anticorps bispécifiques approuvés et en cours de développement.

Les anticorps bispécifiques	Antigène ciblé	Phase clinique	Mode d'action et pathologies à traiter
Blinatumomab	CD3 / CD19	Approuvé par FDA en 2014	-Il recrute les LT pour tuer les cellules B exprimant CD19. -Il traite la leucémie lymphoblastique aiguë.
Amivantamab	EGFR / MET	Approuvé par FDA en 2021	-Inhibe simultanément les voies EGFR et MET et induit cytotoxicité immune. -Il traite le cancer du poumon.
Faricimab	VEGF-A / Ang-2	Approuvé par FDA en 2022	-Il bloque l'angiogenèse et stabilise les vaisseaux sanguins. -Il traite la dégénérescence musculaire.
Emicizumab (Hemlibra)	IXa × facteur X	Approuvé par FDA en 2017	-Cible facteur IXa × facteur X. -Il traite la prophylaxie de l'hémophilie A avec inhibiteurs du facteur VIII.
Tebentafusp-tebn (Kimmtrak)	GP100 × CD3	Approuvé par FDA en 2022	-Engage les LT contre les cellules exprimant le peptide gp100, favorisant leur destruction. -Il traite la mélanome uvéal non résecable ou métastatique.
Teclistamab-cqyv (Tecvayli)	BCMA × CD3	Approuvé par FDA en 2022	- Engage T vs cellules myélomateuses BCMA+ → destruction immunitaire. -Traite la myélome multiple réfractaire ou en rechute.
Mosunetuzumab-axgb (Lunsumio)	CD20 × CD3	Approuvé par FDA en 2022	- Engage T vs cellules B tumorales CD20+ → destruction immunitaire. -Il traite la lymphome folliculaire réfractaire ou en rechute.

Zanidatamab (Ziihera)	Deux domaines HER2	Approuvé par FDA en 2024	- Liaison aux deux domaines HER2 → inhibition signalisation tumorale. -Il traite le cancer des voies biliaires HER2-positif.
REGN4336	CD3 / PD-L1	Phase I/II	-Recrute les LT pour tuer les cellules exprimant PD-L1. -Il traite le cancer de la prostate.

(Kang et al., 2022)

1.3.4 Avantages

Les avantages des BsAb sont nombreux. En effet, ces nouveaux agents thérapeutiques peuvent rediriger des cellules immunitaires spécifiques vers les cellules cancéreuses ce qui favorise l'amélioration de l'activité antitumorale. La haute spécificité de liaison résultant de l'interaction simultanée avec deux antigènes de surface cellulaire différents au lieu d'un seul présente une caractéristique intéressante dans l'efficacité thérapeutique particulièrement dans le traitement du cancer, où les traitements chimiques comme la chimiothérapie peuvent avoir des effets secondaires sur les tissus sains. Cette double interaction peut non seulement élaborer un intermédiaire entre cellules effectrices de l'immunité et les cellules cibles mais peut également permettre le blocage simultané de deux voies différentes qui exercent des fonctions uniques ou qui se chevauchent dans la pathogenèse (Fan et al., 2015).

Outre leurs avantages thérapeutiques, les anticorps bispécifiques se distinguent également par leurs caractéristiques techniques remarquables. En effet, la simplification de leur structure facilite considérablement les processus de production à grande échelle et leur purification.

1.3.5 Limites et défis

Malgré le progrès de l'ingénierie des anticorps, le développement des BsAb a été toujours entravé par de nombreux défis et seuls quelques formats ont réussi à passer aux essais cliniques. Les obstacles détectés incluent l'instabilité des BsAb lors du stockage ou de leur administration ce qui engendre la dénaturation ou la perte d'activité. Aussi, leur immunogénicité pourrait provoquer une réponse immunitaire contre le BsAb et par la suite des réactions indésirables pourraient être détectées chez les patients (Spiess et al., 2015). Également, la toxicité des BsAb, causée par l'activation puissante des LT, présente des risques majeurs de complications tels que le syndrome de relargage cytokinique induit par une libération excessive de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, entraînant plusieurs symptômes comme la fièvre, la fatigue et les céphalées (Barrière et al., 2021).

L'administration des BsAb peut aussi entraîner des effets néfastes neurologiques comme le syndrome de neurotoxicité associé aux cellules effectrices immunitaires se manifestant par des maux de tête, des troubles du sommeil et des crises d'épilepsie (Barrière et al., 2021).

De plus, la résistance aux BsAb peut se développer au cours du temps, affectant leur efficacité à long terme. Les cellules tumorales peuvent acquérir des mécanismes de résistance pour contourner le mécanisme d'action des anticorps bispécifiques, limitant ainsi leur intérêt clinique. En effet, les cellules tumorales sont capables d'altérer les antigènes qu'elles expriment en surface, ce qui peut entraîner leur évasion aux anticorps. Par exemple, chez près d'un tiers des patients traités avec le blinatumomab, les cellules cancéreuses ont montré une perte d'expression ou mutation/modification de l'antigène cible (CD19). De plus, les cellules tumorales peuvent également exercer un effet inhibiteur en bloquant l'axe PD-1/PD-L1 lors de leur interaction avec les LT *via* les BsAb (Barrière et al., 2021).

Le progrès des connaissances scientifiques en immunothérapie a donné lieu au développement de nouveaux formats d'anticorps multi-spécifiques nommés « anticorps tri-spécifiques », qui ont la capacité de s'attacher simultanément à trois cibles différentes. L'apport d'une troisième spécificité aux anticorps bispécifiques a commencé en 1991 dans le but d'améliorer les propriétés des anticorps bi-spécifiques et d'éviter la résistance des cellules cancéreuses, tout en offrant une perspective thérapeutique intéressante (Jung et al., 1991).

1.4 Les anticorps tri-spécifiques

Le développement des anticorps tri-spécifiques (TsAb) se concentre spécifiquement sur le traitement des cancers, avec 20 molécules thérapeutiques en phase d'étude pré-clinique en 2022, en réponse à la forte résistance observée chez les cellules tumorales traitées soit par les anticorps monoclonaux ou bispécifiques (Tapia-Galisteo et al., 2023). Cette résistance s'explique par la capacité des cellules tumorales à modifier leurs antigènes membranaires ou à activer les voies de signalisation des points de contrôle immunitaires en liant l'antigène PD-L1 présent à leur surface au récepteur PD-1 des cellules immunitaires (Yanyan Han 2020).

Comme pour les BsAb, il existe deux structures typiques pour les TsAb : une structure avec fragment F_C et une structure sans le fragment F_C (figure 1.7).

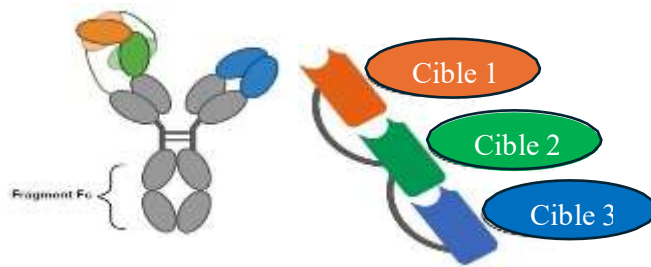


Figure 1.7 Les deux catégories principales de TsAb : avec fragment F_c (à gauche) et sans fragment F_c (à droite).

En revanche, aucun anticorps tri-spécifique, jusqu'à présent, n'a été approuvé par la FDA pour une application clinique. Cependant, un nombre important de ces anticorps sont en phase de développement préclinique et ou clinique.

1.5 Le double ciblage

1.5.1 Cellules tumorales

L'immunothérapie dirigée contre deux cibles antigéniques de la surface des cellules cancéreuses a représenté la dernière avancée thérapeutique en matière de traitement contre le cancer. En effet, elle a permis une augmentation de la sélectivité tumorale des cellules immunitaires effectrices engendrée par les anticorps multi-spécifiques tout en élargissant l'espace cible disponible pour les anticorps engageant les cellules effectrices. De plus, le double ciblage représente une solution clé pour contrer les mécanismes de résistance de la tumeur et la perte des antigènes cibles causée par l'hétérogénéité d'expression de l'antigène des cancers solides. Dans ce contexte, un nouveau TsAb, appelé aTriFlex, a été développé (Figure 1.8). Ce dernier est dirigé contre le récepteur des cellules NK (CD16A), l'antigène de maturation des cellules B (BCMA) et le récepteur inhibiteur CD200. À cette fin, les domaines F_v spécifiques d'anticorps dirigés contre BCMA et CD200 sont isolés de bibliothèques d'anticorps humains naïfs par phage display et fusionnés aux extrémités N- et C- de la chaîne peptidique contenant la V_L anti-CD16A. Ceci produit une structure asymétrique, composée de deux chaînes de tailles différentes (Thorsten Gantke, 2017). Cet anticorps est capable de rediriger les cellules NK vers les deux protéines tumorales BCMA et CD200 exprimés en surface. À l'aide d'étude in vitro, l'efficacité des anticorps aTriFlex pour induire le double ciblage et la sélectivité de la lyse des cellules cancéreuses par les cellules NK ont été étudiées. Il a été constaté que la liaison bivalente bispécifique aux cellules cibles entraînait des gains d'avidité significatifs. Ces résultats obtenus suggèrent que les TsAb aTriFlex pourraient prendre en charge des stratégies de double ciblage pour contrer l'hétérogénéité tumorale des cancers solides et le problème de perte de l'antigène cible des cellules tumorales (Thorsten Gantke, 2017).

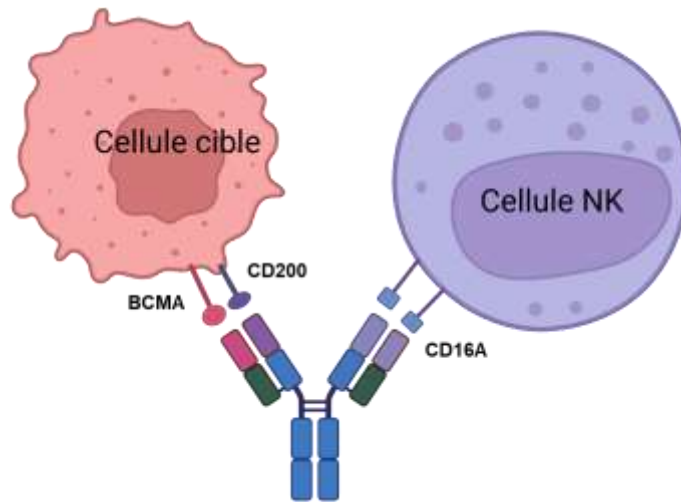


Figure 1.8 Structure de l'anticorps aTriFlex.

1.5.2 Cellules immunitaires

Dans le but d'améliorer l'affinité du système immunitaire vis-à-vis les cellules tumorales et d'éviter l'épuisement des LT due à l'exposition à un microenvironnement tumoral suppressif, le double ciblage des cellules LT via des anticorps multi-spécifiques présente une stratégie prometteuse. La plateforme des anticorps multi-spécifiques a récemment permis d'obtenir un TsAb CD3/CD28/CD38 qui s'engage à deux protéines différentes à la surface des LT (CD3 et CD28) et à l'antigène CD38 exprimé sur certains LB y compris les LB du myélome multiple (Lan et al., 2020). En effet, l'incubation des cellules tumorales CD38+ (cellules de myélome multiple CD38+ et des modèles de lymphomes/leucémies CD38+) avec ce TsAb a induit un regroupement important de LT autour des cellules tumorales, conduisant à leur lyse presque complète (figure 1.9).

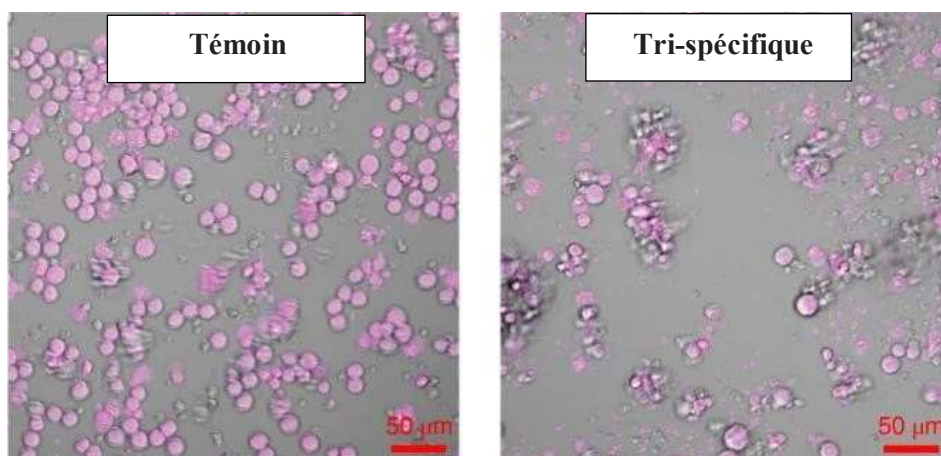


Figure 1.9 Effet cytotoxique induit par le TsAb CD38/CD28×CD3

(Lan et al., 2020).

1.6 Production des BsAb

1.6.1 Approche Quadroma

L'approche Quadroma est la technique la plus ancienne utilisée pour la génération des BsAb de type IgG depuis les années 1983 (Milstein et al., 1983). L'origine de cette méthode est fondée sur la technologie d'hybridome appliquée dans la production des anticorps monoclonaux, fonctionnant selon le principe de l'hybridation somatique des lymphocytes B, prélevées de la rate de la souris immunisée contre un antigène donné, avec des cellules de myélome immortelles en présence d'un polymère de fusion (polyéthylène glycol (PEG) par exemple) (Milstein, 1975). La production des anticorps hybrides dotés d'une double affinité par la technique Quadroma commence tout d'abord par la génération de deux hybridomes exprimant chacune les gènes codants pour les différents fragments de l'anticorps monoclonal spécifique à des antigènes différents donné. Avant de procéder à la fusion de deux hybridomes, l'application du protocole de marquage de ces cellules est considérée comme une étape essentielle pour faciliter la sélection des cellules fusionnées. Le marquage des hybridomes hybrides pourrait être réalisé en utilisant des marqueurs de sélection fluorescents (Tang et al., 2004), détectés par la cytométrie en flux, ou par l'acquisition d'une résistance aux cellules hybrides à un marqueur spécifique de résistance aux médicaments. Dans ce contexte, le BsAb Catumaxomab a été développé en 2009 pour le traitement de l'ascite maligne chez les patients souffrant de tumeurs EpCAM-positives (Linke et al., 2010). C'est le premier BsAb produit par l'approche Quadroma capable de cibler l'antigène cancéreux EpCAM et l'antigène lymphocytaire CD3.

1.6.2 Approches génétiques

La production des BsAb *via* les approches génétiques repose sur le principe de la construction de vecteur de clonage contenant les gènes codants de l'anticorps et de l'exprimer dans des cellules hôtes (bactéries, levures, cellules mammifères...) dans le but d'exploiter leur machinerie cellulaire pour la production (Misorin et al., 2023). Cette méthode génétique de production donne naissance aux multiples formats de BsAb. Environ 45 formats ont été créés (Kontermann, 2012a), répartis en deux catégories : les anticorps bispécifiques avec fragment F_C de type IgG et les anticorps bispécifiques sans fragments F_C tel que décrit dans la section 1.3.1.

-La technologie de CrossMab

Cette approche fait partie des technologies génétiques qui impliquent la manipulation d'anticorps monoclonaux préexistants afin de générer une molécule bispécifique capable de s'attacher à deux cibles simultanément. La description de cette méthode, apparue en 2011

(Schaefer et al., 2011), est fondée sur le principe du réarrangement de domaines de la partie Fab des chaînes légères et lourdes d'un seul bras de BsAb, associée à la technologie "des boutons dans les trous" afin de renforcer l'association correcte entre les fragments F_C des chaînes lourdes de deux bras de l'anticorps (Klein et al., 2016). Commencant par le réarrangement de la chaîne légère, cette technologie CrossMab consiste à créer une nouvelle chaîne légère en remplaçant sa partie Fab par les domaines V_H-C_{H1} de la chaîne lourde originale. De même pour la partie Fab de chaîne lourdes, cette méthode vise à créer une nouvelle chaîne lourde modifiée en substituant les domaines V_H-C_{H1} de la chaîne lourde par la partie Fab de la chaîne légère (Schaefer et al., 2011). Ces changements qui touchent la partie Fab de deux chaînes de l'anticorps donne naissance à un format de CrossMab connu par la technologie CrossMab Fab. Selon les domaines des chaînes lourdes et légères à modifier, d'autres formats de CrossMab pourraient avoir lieu (Figure 1.10). En effet, l'échange de domaine V_H par V_L contribue à un format de CrossMab nommé « CrossMab V_H-V_L », tandis que, le remplacement de C_{H1} et C_L donne lieu à un « CrossMab $C_{H1}-C_L$ » (Schaefer et al., 2011).

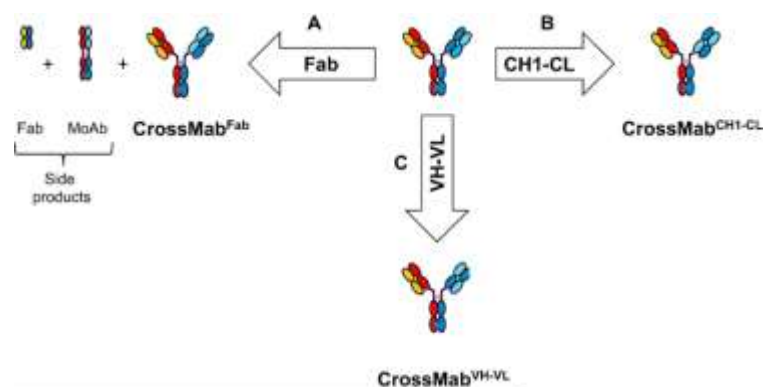


Figure 1. 10 Principes de la technologie CrossMab

Les différentes possibilités de génération d'hétérodimères bispécifiques : (A) échange de l'ensemble Fab (CrossMab^{Fab}), (B) des domaines $C_{H1}-C_L$ (CrossMab^{CH1-CL}) ou (C) des domaines V_H-V_L (CrossMab^{VH-VL}) (Klein et al., 2019)

Associée avec la technique CrossMab, la technique « des boutons dans les trous » consiste à appliquer des mutations dirigées dans les domaines C_{H3} des parties F_C des chaînes lourdes ce qui favorise l'association asymétrique des domaines F_C différents, pour produire le BsAb. Ces mutations engendrent une modification d'un seul acide aminé dans les domaines C_{H3} opposés en créant des trous et des boutons. Dans l'une des chaînes lourdes, cette modification est caractérisée par la substitution d'un acide aminé (T366) de masse molaire faible par le tryptophane de masse molaire importante ce qui donne la forme du bouton, alors que dans l'autre chaîne lourde opposée, trois mutations sont induites impliquant la substitution

de trois résidus (T366S, L368A et Y407V) afin d'aboutir à la formation du trou. L'attachement entre le bouton et le trou formés assure l'appariement asymétrique de deux chaînes lourdes différentes et renforce leur hétérodimérisation. (Spasevska, 2013).

En appliquant cette technique pour la production des BsAbs, huit anticorps sont en cours de développement clinique visant à traiter plusieurs maladies (C. Klein et al., 2019). Dans ce contexte, un le BsAb Vanucizumab de format « CrossMab $C_{H1}-C_L$ » a été généré pour cibler les antigènes VEGF-A et l'Ang-2 appliqué dans le domaine de l'oncologie (C. Klein et al., 2019).

-Technologie DVD-Ig

L'approche de l'immunoglobuline à double domaine variable (DVD-Ig) est une innovation dans le domaine de l'ingénierie des anticorps qui a été développée par Abbott en 2007 (Adilet et al., 2023) et qui vise à créer des molécules d'anticorps de type IgG à double spécificité (Dong & Tariq, 2019). Le principe de cette technologie consiste à ajouter à chacune des parties Fab des deux chaînes lourdes et légères de l'anticorps un domaine variable supplémentaire aboutissant à l'obtention d'une seule molécule d'anticorps de type IgG qui intègre la spécificité de deux anticorps monoclonaux.

Comme pour les anticorps classiques de type IgG, la structure de l'anticorps à double domaine variable est composée par un fragment F_C et une partie Fab qui est responsable à la reconnaissance de l'antigène. Cependant, sa partie F_C est marquée par la présence d'une double spécificité dont chaque bras combine une région constante ($C_{H1}-C_L$) et deux fragments variables (F_V) comprenant un domaine variable externe (V_{D1}) formé de V_{H1} et V_{L1} et un deuxième domaine variable interne (V_{D2}) constitué de $V_{H2}-V_{L2}$ (Dong & Tariq, 2019). Les deux domaines variables déterminant la double affinité sont liés en tandem via des séquences protéiques entre cinq à 13 acides aminés responsable au maintien de la structure de la protéine d'anticorps DVD-Ig.

Dans ce contexte, un BsAb DVD-Ig a été généré dans le but de cibler simultanément les deux cytokines IL-18 et IL-12 impliquées dans diverses maladies. La construction de deux domaines variables de l'anticorps DVD-Ig a été faite à l'aide de la technique PCR en fusionnant en tandem les deux domaines variables (V_H-V_L) de l'anticorps monoclonal spécifique à l'IL-12, à l'extrémité N de la chaîne lourde et de la chaîne légère de l'anticorps monoclonal ayant l'affinité pour l'IL-18 (Wu et al., 2007). L'un des avantages de cette approche utilisée dans la production des de BsAb est sa capacité à empêcher la formation des mésappariements entre chaînes légères et lourdes. De plus, les anticorps produits se caractérisent par de bonnes propriétés physicochimiques incluant une bonne stabilité *in vivo*, une haute pureté ainsi qu'une bonne capacité à conserver leur intégrité structurale et fonctionnelle dans divers environnements

physiologiques. Cependant, la spécificité des domaines variables internes (V_{D2}) pourrait être affectée en vue de sa position un peu masquée vis à vis de sa cible.

-Technologie de *Duobody*

Le principe de cette technologie de fabrication de BsAb de type IgG a été développé depuis 2007 (Genmab A/S, 2007) et repose sur la plate-forme d'échange contrôlé Fab-bras (cFAE) permettant l'induction des mutations au niveau des domaines C_{H3} de deux anticorps monoclonaux parentaux avec l'expression séparée de chacun d'entre eux dans de cellules de mammifère (Labrijn et al., 2013). Les mutations dirigées induites permettent l'élimination de la liaison covalente reliant les deux bras d'anticorps parentaux favorisant par la suite leur séparation en deux bras monomères et leur réarrangement pour se transformer en anticorps monoclonaux homodimères vers des anticorps hétérodimères (Labrijn et al., 2013).

En appliquant cette technologie *Duobody*, un BsAb IgG1 reconnaissant l'antigène CD3 et l'antigène CD20 a été développé dans le but d'améliorer la réponse immunitaire anti-cancéreuse (Guo et al., 2023). Afin d'obtenir l'anticorps bispécifique (CD3/CD20) entier, des anticorps monoclonaux anti-CD3 et anti-CD20 ont été produits par la technique d'hybridation somatique et ont subi deux mutations dans leur domaine C_{H3} (Figure 1.11). De plus, trois autres mutations supplémentaires ont été induites dans tous les domaines C_{H2} de deux anticorps monoclonaux (Engelberts et al., 2020).

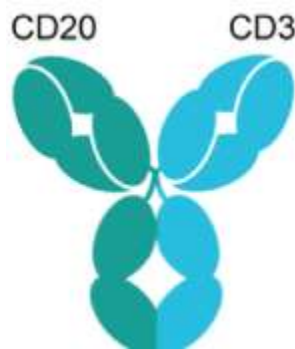


Figure 1. 11 DuoBody-CD3xCD20, est une IgG1 et porte les mutations L234F, L235E et D265A, dans le fragment F_c .

(Engelberts et al., 2020)

Les résultats obtenus ont montré une bonne affinité de l'anticorps Duobody vis-à-vis des antigènes CD3 et CD20 aussi que sa capacité à déclencher la cytotoxicité des LT responsable de l'inhibition de la croissance tumorale (Engelberts et al., 2020).

En utilisant la technique *Duobody* dans la production des BsAb, le désappariement des chaînes légères pourrait être évité tout en maintenant une interaction correcte des chaînes lourdes et légères lors de l'échange de deux bras d'anticorps (Goulet et al., 2018). De plus,

cette méthode possède des avantages techniques qui se présentent par un nombre limité de mutations induites simplifiant son application (Goulet et al., 2018) et favorisant sa fiabilité à produire des BsAb caractérisés par une bonne durée de vie *in vivo*, et son bon rendement en quantité et en qualité des anticorps produits (Guo et al., 2023).

Cependant, cette technologie pourrait produire d'autres produits secondaires incluant des BsAb symétriques non oxydés, symétriques oxydés et des anticorps bispécifiques asymétriques oxydés caractérisés chacun par des propriétés distinctes, ce qui limitent parfois leur utilisation (Evans et al., 2019). De plus, l'élimination de la liaison disulfure covalente, par les mutations induites, pourrait provoquer une dissociation des fragments FC des anticorps formés ce qui influe négativement l'intégrité et le maintien des anticorps produits (Labrijn et al., 2013).

1.6.2.1 Production des BsAb sans fragment F_c

Les anticorps dépourvus de fragment F_c sont des petits fragments d'anticorps de dimensions réduites, obtenus par l'assemblage de domaines variables des chaînes lourdes (V_H) et légères (V_L) ou uniquement des chaînes lourdes de deux anticorps de spécificité différentes. Dans cette conception, les domaines variables sont liés entre eux par courtes séquences peptidiques ce qui forme une molécule bispécifique de petite taille capable de s'attacher simultanément à deux antigènes distincts (Guo et al., 2023).

-BiTE

Ce format de BsAb dépourvu de la partie F_c est considéré parmi les formats d'anticorps les plus courants, son idée de conception a été développée depuis 1995 (Mack et al., 1995) et repose sur la production d'une molécule biologique dotée d'une double affinité *via* ses deux domaines variables qui ciblent l'antigène CD3 exprimé à la surface des LT et un antigène tumoral. La génération de cet anticorps a été réalisée par la technique de l'ADN recombinante en utilisant les cellules ovariennes de Hamster chinois (CHO), intégrant le vecteur d'expression d'ADNc, pour exprimer les constructions génétiques codantes pour les domaines variables et les lieurs peptidiques de l'anticorps (Przeziorka et al., 2015). En effet, les séquences des domaines variables des deux chaînes lourdes et légères ont été obtenues en utilisant la PCR sur les anticorps monoclonaux spécifiques au CD3 et CD19 lesquels ont été générés à partir d'hybridomes murins (Burt et al., 2019). La greffe d'une séquence protéique de six histidines à l'extrémité C-terminale des constructions génétiques facilite l'étape de la purification par affinité des anticorps obtenus en utilisant la technique de chromatographie d'affinité métallique (Nagorsen et al., 2012).

-DART

Cette technologie a été développée par MacroGenics en 2010 (Johnson et al., 2010b) et conçue pour la production des de BsAb de petite taille capable de rediriger les cellules immunitaires vers les tissus tumoraux (Johnson et al., 2010a). La structure des anticorps obtenus par la technologie DART est formée par l'association de deux chaînes polypeptidiques indépendantes ayant chacune une spécificité à un antigène donné (Johnson et al., 2010a). La construction génétique de chaque chaîne est formée par le domaine variable de la chaîne lourde V_H de l'anticorps parental 1 lié en tandem avec le domaine variable de la chaîne légère V_L de l'anticorps parental 2 (Zhang et al., 2017). Par opposition à la technologie BITE, la structure des anticorps de format DART se caractérise par la présence d'une liaison disulfure entre les deux polypeptides assurant une bonne stabilité de l'anticorps produit. Dans ce contexte, plusieurs anticorps ont été développés par la technologie DART dans le but de traiter plusieurs maladies cancéreuses. L'anticorps DART CD19/CD3 (Figure 1.12) a été développé pour cibler les LT et les lignées cellulaires de lymphome B (Moore et al., 2011).

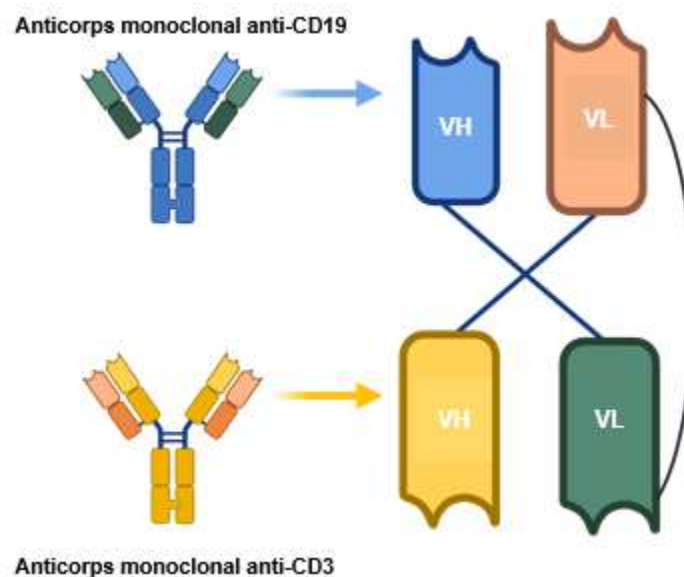


Figure 1.12 L'anticorps DART CD19/CD3.

1.7 Production des anticorps TsAbs

1.7.1 Conjugaison chimique

La génération des TsAb a commencé en 1991 avec la construction de fragments d'anticorps tri-spécifiques dépourvus du fragment F_C (Jung et al., 1991), impliquant la conjugaison chimique de trois fragments $F(ab')_2$ par le biais d'agents de réticulation chimiques. Dans ce contexte un TsAb anti-NG2 / CD3 / CD28 a été développé dans le but d'induire le potentiel

cytolytique des LT lors de leur liaison aux cellules cibles cancéreuses (Jung et al., 1991).

1.7.2 Approches génétiques

Les avancées actuelles dans les domaines du génie génétique et de l'ingénierie des protéines permettent de développer des nouvelles plateformes capables de générer de nombreux formats de TsAbs. Ces formats sont classés en deux catégories majeures incluant les TsAbs avec fragment F_C et ceux dépourvus du fragment F_C (Tapia-Galisteo et al., 2023). Comme expliqué précédemment pour la production des BsAb de type IgG en appliquant la technique de l'ADN recombinant, les constructions génétiques codant pour les différentes parties du TsAb sont clonées dans des vecteurs de clonage et exprimées dans des cellules hôtes de mammifères. En effet, la combinaison génétique de trois fragments Fab d'anticorps monoclonaux a donné lieu à la formation d'une molécule biologique ayant un format connu sous le nom Ortho-Tri-spécifiques capable de se fixer simultanément à un triple antigène (A. Tapia-Galisteo et al., 2023). Dans ce contexte, un TsAb de type IgG a été développé ciblant les antigènes HER-2 / EGFR / cMet afin d'éviter le processus d'échappement des cellules cancéreuses au contrôle immunitaire et rediriger les cellules immunitaires vers les tissus cancéreux. En utilisant la résonance plasmonique de surface, une forte liaison tri-spécifique a été observée permettant le triple ciblage des cellules cancéreuses (Wu et al., 2018).

Pour les TsAb sans fragment F_C , en fonction de la combinaison de domaines variables de liaison, il est possible de cloner soit les fragments variables à chaîne unique (scFv) ou les fragments à domaine unique (VHH) ce qui donne naissance à la génération de plusieurs formats d'anticorps (A. Tapia-Galisteo et al., 2023). Toutes les constructions des séquences codantes aux différents fragments variables de l'anticorps sont clonées dans un vecteur d'expression suivi d'une étape d'expression dans des cellules de mammifères puis de purification à travers la technique de la chromatographie (Molloy et al., 2021).

1.8 Objectif

La production de BsAb et TsAb demeure un défi technique. Néanmoins, les travaux récents menés dans notre laboratoire ont démontré que l'ADN pouvait servir de plateforme modulaire, offrant une préparation rapide et contrôlée des BsAb tout en explorant plusieurs concepts originaux exploitant la nanotechnologie de l'ADN dans le domaine des biotechnologies.

Dans ce contexte, le blinatumomab illustre parfaitement le principe des anticorps bispécifiques : ce BiTE, formé de deux fragments scFv ciblant CD3 sur les LT et CD19 sur les cellules B leucémiques, facilite le rapprochement des cellules T et tumorales pour activer la cytotoxicité. L'étude de Messaoudi et al. (2024) montre comment ce concept peut être étendu et optimisé

grâce aux nanostructures d'ADN, utilisées comme plateformes modulaires pour l'assemblage précis de fragments scFv. Ces travaux constituent un exemple clé du potentiel des nanostructures d'ADN pour l'ingénierie rationnelle d'anticorps bispécifiques, offrant un contrôle fin sur les paramètres structuraux et fonctionnels (Messaoudi et al., 2024). Cette étude a conçu une bibliothèque de 19 constructions hybrides combinant des fragments scFv ciblant CD3 sur les LT et CD19 sur les cellules leucémiques, assemblés sur des nanostructures d'ADN programmables. Chaque construction variait en distance inter-scFv, orientation spatiale, flexibilité et valence, permettant d'évaluer systématiquement comment la géométrie moléculaire influence l'engagement des cellules-T et l'activité cytotoxique contre les cellules tumorales. Les résultats obtenus (Figure 1.13) sont particulièrement intéressants, certaines architectures montrant une activation des LT plus efficace que celle induite par le blinatumomab, avec une cytotoxicité in vitro significativement augmentée contre les cellules CD19⁺. L'étude a révélé que la disposition spatiale des fragments scFv est un facteur déterminant pour l'efficacité fonctionnelle des bsAb, et que certaines structures géométriques sont particulièrement puissantes. Les structures triangulaires ont démontré une cytotoxicité maximale grâce à une orientation optimale des sites de liaison favorisant la formation du complexe T-cellule-bsAb-cellule cible. Les formats linéaires à valence double ont montré une activation rapide et sélective des cellules-T tout en limitant l'engagement non spécifique. Les constructions triangulaires multi-sites ont amélioré la stabilité et la flexibilité, contribuant à un recrutement des LT plus efficaces et une meilleure performance cytotoxique globale. Ces observations confirment que la géométrie et la topologie des fragments scFv modulent directement l'efficacité des bsAb et fournissent un outil méthodologique puissant pour cartographier les relations structure-activité et guider la conception rationnelle de nouvelles molécules thérapeutiques.

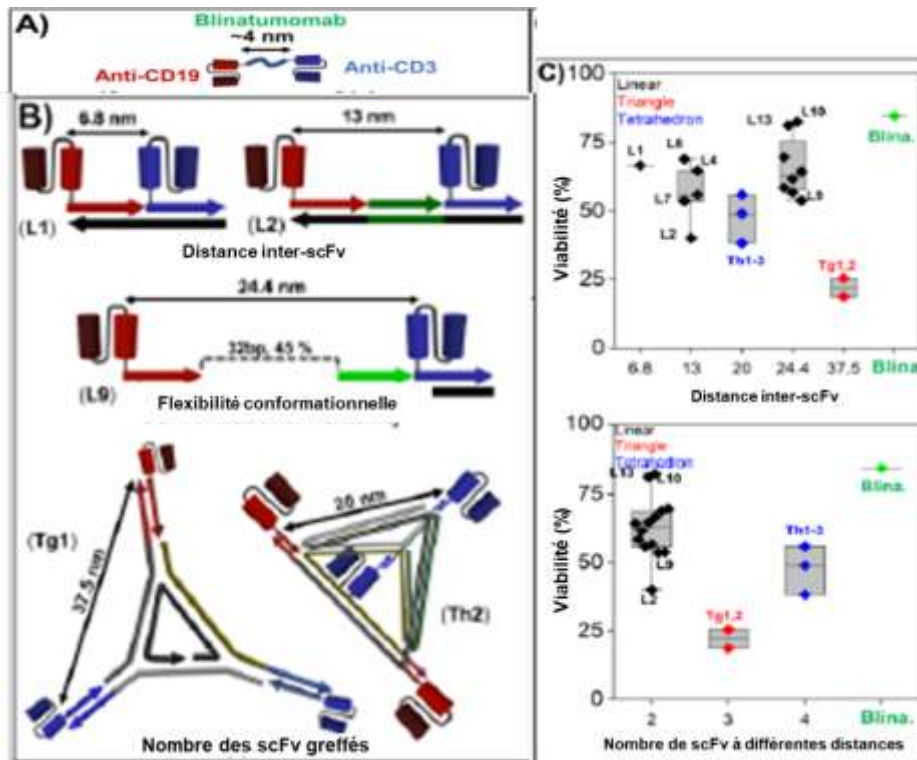


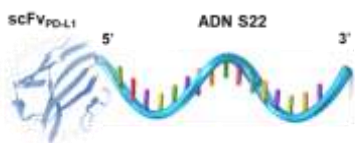
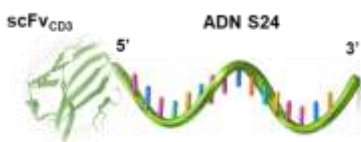
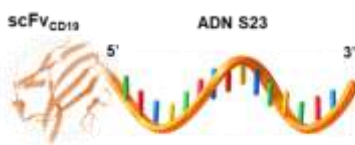
Figure 1. 13 (A) Structure du Blinatumomab typique. (B) Exemples de BiTE hybrides utilisés pour contrôler la distance inter-scFv, la flexibilité conformationnelle et le nombre de scFv ajoutés. (C) Diagrammes en boîte de la viabilité moyenne obtenus avec chaque anticorps bispécifique testé.

S'appuyant directement sur cette approche conceptuelle et technologique développée au laboratoire, notre projet vise à franchir une étape supplémentaire en concevant un anticorps tri-spécifique composé d'ADN et des scFv. Les objectifs principaux sont présentés ci-dessous :

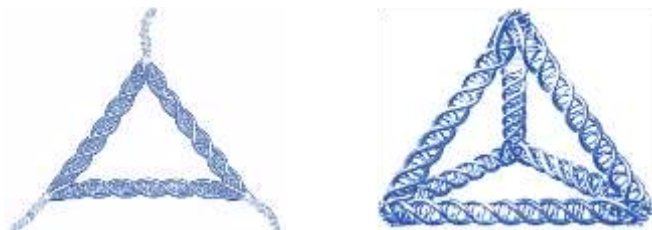
- Concevoir un anticorps tri-spécifique basé sur une architecture nanométrique programmable combinant de l'ADN et des fragments scFv.
- Intégrer, au sein d'une même structure, trois fonctions de reconnaissance complémentaires permettant de cibler simultanément CD19, CD3 et l'axe PD-1/PD-L1.
- Favoriser l'engagement des LT, le ciblage des cellules tumorales et la modulation des points de contrôle immunitaire.
- Explorer l'intérêt de l'axe PD-1/PD-L1 pour une modulation plus fine et plus sélective de la réponse immunitaire, en comparaison avec les inhibiteurs anti-PD-1 classiques.
- Développer et optimiser les protocoles de production des bio-conjugués essentiels à la construction de ces anticorps tri-spécifiques, notamment les fragments scFv et les stratégies de conjugaison thiol-maléimide.
- Établir une plateforme expérimentale permettant la génération d'anticorps tri-spécifiques modulables et fonctionnels en vue d'applications futures en immunothérapie.

À partir de ces objectifs et des principes connus des anticorps multi-spécifiques, plusieurs hypothèses sont formulées. Les anticorps tri-spécifiques devraient permettre un ciblage simultané efficace des antigènes CD19, CD3 et PD-1/PD-L1, tout en favorisant une activation cytotoxique spécifique des LT contre les cellules tumorales. La modulation sélective de l'axe PD-1/PD-L1 devrait réduire les effets secondaires immunitaires observés avec les inhibiteurs anti-PD-1 classiques, tout en maintenant une réponse antitumorale efficace. L'optimisation des bioconjugués influencera la stabilité, la fonctionnalité et la modularité des anticorps, et la mise en place d'une plateforme expérimentale permettra la production de TsAbs modulables et fonctionnels pour des études précliniques ultérieures.

Sur le plan pratique, la conception d'anticorps tri-spécifiques (Figure 1.14) repose sur l'intégration de fragments d'anticorps (scFv) avec des brins d'ADN, générant des hybrides ADN-scFv. Ces hybrides sont ensuite organisés en structures tridimensionnelles, telles que des triangles ou des tétraèdres, grâce à la nanotechnologie ADN. La formation de ces architectures est guidée par la complémentarité des séquences d'ADN, permettant un positionnement précis et stable des différents hybrides sur la structure. Cette approche assure que chaque bras de la nanostructure présente un scFv distinct, conférant à l'anticorps tri-spécifique la capacité de reconnaître simultanément trois antigènes différents.



Les hybrides ADN-scFv



Les nanostructures d'ADN

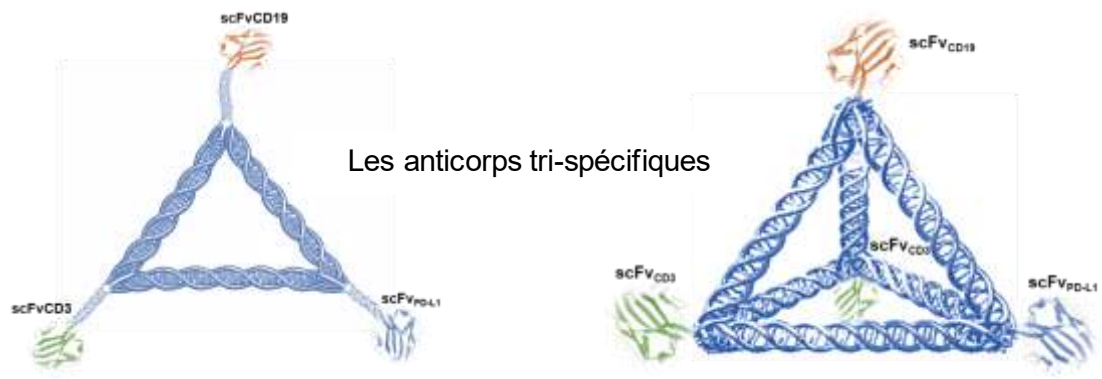


Figure 1.14 Les étapes clés pour la conception des anticorps tri-spécifiques

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Production des fragments scfv (CD3, CD19, PD-1 et PD1) et blinatumomab

2.1.1 Matériel

Accumax (Innovative Cell Technologies), acétate de potassium, acétonitrile anhydre et toluène anhydre (ThermoFisher), aiguille (18G), agitateur orbital (25 mm, Infors HT) et agitateur magnétique, ampicilline (100 mg/mL, Sigma-Aldrich), anticlumping (100 %, Irvine Scientific) et antifoam (Sigma- Aldrich), bain d'huile, barreaux magnétiques, BalanCD Transfectory CHO (Irvine Scientific), Bio-Rad (gels polyacrylamide précoulés 4–15 %, kit de transfert rapide, marqueurs de taille protéique et d'ADN, système d'imagerie ChemiDoc MP), centrifugeuses (ThermoFisher et Thermo Scientific Nalgene) et filtres centrifuges Amicon 15 mL (5 et 10 kDa), cellules CHO 3E7/TGE WCB (NRC), Circlegrow® (MP Biomédicales), compteur de cellules fluorescentes (Cellometer K2), colonnes de purification (HiTrap et Capto SP ImpRes), gel réducteur de disulfure TCEP immobilisé (ThermoFisher), Dodécyl sulfate de sodium, DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, HyClone), E. coli DH5 α (NEB C2987R), Erlenmeyers 2 L (Corning), EDTA (TEKnova), filtres à tubes centrifuges (0,45 μ m, 2 mL) et filtres 0,22 μ m (Millipore Sigma), GelRed, gel polyacrylamide pour protéines (Novex 4–15 %, Bio- Rad), lecteur de microplaques Cytation 5 (Biotek), lyophilisateur (LABCONCO), méthanol (ThermoFisher), microplaques Corning à 96 puits à demi-surface, *N,N*-diméthylacétamide (DMA, Thermo Scientific), oligonucléotides 5'-maléimide (Genelink, séquences dans Tableau 4), PEI Max (Polyéthylèneimine linéaire, 25 kDa ; Polysciences), Phosphate-Buffered Saline (PBS, HyClone), plasmides ADN (NRC), pompes Masterflex (Millipore Sigma), Precision Plus Protein™ Standard « Dual Color » (Bio-Rad), réacteur à micro-ondes (système CEM Discover, USA) et tubes en verre pour micro-ondes, rotavaporateur (Rotavapor R-210, BUCHI), ScFv (CNRC), seringues en verre, SpeedVac, spectrophotomètre UV-Vis (DeNovix), système de chromatographie ÄKTA start™, tampons Tris-TAE (40 mM Tris, 20 mM acide acétique, 1 mM EDTA), TAMg (40 mM Tris, 20 mM acide acétique glacial, 1 M MgCl₂·6H₂O, pH 7,4), TA sans MgCl₂ 1 \times (40 mM Tris, 20 mM acide acétique glacial, pH 7,4), TBE 1 \times (89 mM Tris, 89 mM acide borique, 2 mM EDTA, pH 8), tampon XT non réducteur, tampon de lavage stérile (50 mM NaPO₄, 300 mM NaCl, pH 7), TE (Tris-EDTA, HyClone), Thimerosal 10 %, Tween 20 0,1 %, Tris (Tris(hydroxyméthyl)aminométhane), tubes en verre ambré avec bouchon à vis pour HPLC (2 mL) et tout autre produit chimique obtenu auprès de Sigma-Aldrich et utilisé tel que reçu.

2.1.2 Transformation, amplification bactérienne et purification de l'ADN transfecté.

Les séquences protéiques correspondant aux protéines scFV_{CD3}, scFV_{CD19}, scFV_{PD-L1}, scFV_{PD1} toutes modifiées pour avoir une cystéine ainsi que le blinatumomab ont été clonées dans les vecteurs d'expression pTT5 et pTwist, respectivement. Les détails des séquences des protéines produites sont fournis dans le Tableau 3.1.

Les plasmides ont été amplifiés par transformation bactérienne des cellules *E. coli*. Les plasmides acquis commercialement (GenScript, NJ, USA) ont été re-suspendus dans 20 µL de tampon TE (Tris-EDTA) stérile et chauffés à 37° C pendant quelques minutes. Deux-µL de ces préparations ont été ajoutés à 50 µL de cellules *E. coli DH5α* compétentes pour transformation. Après un choc thermique (30 secondes à 47.5 °C puis 2 minutes à la glace), les bactéries ont été cultivées pendant 19 heures à 37 °C avec une agitation orbitale à 230 rpm. La suspension bactérienne a été centrifugée, le surnageant a été éliminé et les bactéries re-suspendues séparément dans 10 mL des tampons P1 (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA et RNase A), P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) et P3 (3 M acétate de potassium, pH 5,2), spécifiquement préparés par l'équipe de CNRC, conçus pour assurer la lyse des bactéries et la précipitation des débris. La purification des plasmides amplifiés a ensuite été réalisée sur une colonne contenant de la résine échangeuse d'anions Fractogel diéthylaminoéthyl (DEAE, groupe de CNRC). Cette résine possède des groupes fonctionnels DEAE chargés positivement qui permettent de lier sélectivement l'ADN plasmidique, lui-même chargé négativement, grâce à des interactions spécifiques modulées par la force ionique du tampon. Puis les plasmides purifiés ont été précipités à l'isopropanol et lavés avec l'éthanol afin de rendre l'ADN plasmidique isolé stérile, les plasmides ont été re-suspendus dans du tampon TE et entreposés à -20 °C. La concentration de l'ADN plasmidique purifié a été déterminée à l'aide du spectrophotomètre UV-Visible qui repose sur l'absorption spécifique de la lumière ultraviolette par les bases azotées de l'ADN à 260 nm, permettant une quantification précise de l'ADN plasmidique.

2.1.3 Transfection des cellules

Les cellules CHO3E7 ont été cultivées dans le milieu BalanCD Transfectory CHO, un milieu optimisé pour la croissance et la transfection des cellules CHO. Afin d'atteindre la concentration requise pour la transfection, soit 8×10^6 cellules/mL, les cellules ont été passées régulièrement, en continuant progressivement à augmenter le volume de culture à chaque passage.

Le jour de la transfection (jour 0), les cellules ont été diluées (1 : 4) et comptées, confirmant une concentration de 8×10^6 cellules/mL pour procéder à l'étape de transfection.

La culture cellulaire a été préparée en diluant 338 mL de suspension cellulaire (8×10^6 cellules/mL) avec 112 mL de milieu de culture BalanCD Transfectory CHO et 375 μ L de DMA (pour un volume final de 450 mL) et incubée à 37 °C, 5% CO₂, avec une agitation orbitale de 120 rpm pendant 30 à 60 minutes. Le mélange d'ADN est composé de 1,1 μ g/mL d'ADN total avec ces proportions suivantes : 90% du plasmide d'intérêt (scFV_{CD3}, scFV_{CD19}, scFV_{PD-L1}, scFV_{PD1}, ou du Blinatumomab), 5% d'un plasmide codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP) et 5% du plasmide Bclx.

Le PEI a été dilué dans le milieu de culture à partir d'une concentration initiale de 1 mg/mL afin d'obtenir une concentration finale de 14,2 μ g/mL pour un volume de culture total de 500 mL. Pour ce faire, un volume de 7,1 mL de la solution mère de PEI (1 mg/mL dans l'eau distillée stérile) a été ajouté à 17,9 mL de milieu de culture BalanCD Transfectory CHO pour atteindre un volume de 25 mL. Ces 25 mL de PEI préparés (d'une concentration de 14,2 μ g/mL) ont été mélangés aux 25 mL de la solution de plasmides préparée composée de 90% du plasmide d'intérêt, 5% d'un plasmide codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP) et 5% du plasmide Bclx, donnant un volume total de 50 mL. Le mélange obtenu est incubé à 37 °C pendant 7 minutes avant d'être ajouté aux 450 mL de la culture cellulaire, pour un volume final de 500 mL et d'une concentration finale de PEI de 14,2 μ g/mL, suivis d'une incubation à 37 °C, 5% CO₂ avec agitation orbitale à 120 rpm pendant 24 heures. Le suivi post-transfection a été réalisé à différents jours. Au jour 1, le glucose a été ajusté à 40 mM, un comptage cellulaire a été effectué, et 0,2% d'Anticlumping, un agent empêchant l'agrégation des cellules en suspension, ainsi que 2,5 % de BalanCD CHO Feed 4 (0,8 \times), un supplément nutritif favorisant la croissance des lignées cellulaires CHO et la production de protéines, ont été ajoutés pour optimiser les conditions de culture. L'efficacité de la transfection a ensuite été vérifiée par la mesure de la fluorescence GFP à l'aide du compteur de viabilité cellulaire fluorescent (Cellometer K2). À partir du premier jour, les conditions d'incubation ont été modifiées pour une incubation à 32 °C, sous 5% de CO₂ avec une agitation orbitale à 120 rpm. Aux jours 5, 7 et 9, un comptage cellulaire a été réalisé avec un ajustement du glucose à 40 mM et l'ajout de Feed (5% aux jours 5 et 7, 7,5% au jour 9), tout en maintenant ces mêmes conditions d'incubation.

2.1.4 Récolte du surnageant et analyse par Western blot

Au jour 12, les cellules ont été récoltées, centrifugées à 4000 rpm pendant 20 minutes à 22 °C et filtrées à travers un filtre de 0,22 μ m. Dans le cas d'une baisse de viabilité cellulaire à 70% ou moins avant le jour 12, les cellules ont été récoltées prématurément.

Afin de déterminer si la production a bien eu lieu et pour estimer la quantité de protéine produite et par conséquent choisir la taille de la colonne adéquate pour la purification, un Western blot a été effectué en utilisant le surnageant récolté.

Pour la migration sur gel, les échantillons ont été préparés avec un contrôle positif (protéine marquée avec un His-tag, 0,8 mg/mL), un contrôle négatif (protéine sans His-tag) et des surnageants de culture. Une fois les deux contrôles dilués de manière appropriée, tous les échantillons ont été combinés avec le tampon XT non réducteur (sans DTT), un tampon de charge capable de maintenir l'intégrité des ponts disulfures entre les sous-unités d'une protéine, et chauffés à 70 °C pendant 10 minutes. Le gel a été monté dans la cuve de migration avec les échantillons déposés dans les puits selon un schéma précis. La migration a été réalisée sous 200V pendant 40 minutes suivi d'un transfert rapide des protéines migrées. Pour ceci le gel a été pressé contre une membrane de nitrocellulose après élimination des bulles d'air et un courant électrique fait passer les échantillons du gel vers la membrane. Une fois le transfert terminé, la membrane a été placée dans un tube magnétique, rincée, bloquée avec une solution spécifique de blocage (45 mL PBS-Tween 20 0,1%, 5mL western blocking (Bio-rad) 10×, 50 µL Thimerosal 10%) pendant 30 minutes, puis lavée avant incubation avec l'anticorps anti His-tag monoclonal marqué avec le fluorophore Alexa 488 dilué (1 :1000) pendant une heure sous agitation. Après plusieurs lavages avec la solution PBS-Tween20 0,1%, la membrane a été analysée à l'aide du système d'imagerie ChemiDoc MP (Bio-Rad). L'excitation a été effectuée à la longueur d'onde spécifique d'Alexa 488 (488 nm) et l'émission correspondante (519 nm) a été captée par le détecteur pour visualiser et quantifier les protéines.

2.1.5 Purification des scFv produits

Les protéines d'intérêt ont été purifiées à l'aide d'une colonne de résine (Nickel Excel 2,5 mL), préalablement équilibrée successivement avec 2 volumes de colonne (CV) d'eau, 5 CV de NaOH 0,1 N, puis avec 1 CV PBS stérile. L'échantillon a été chargé sur la colonne et élué toute la nuit à un débit de 0,5 mL/min. Le lendemain, 37,5 µL du flux en cours de purification (solution brute) et 37,5 µL du flux passant (flow-through), c'est-à-dire le liquide non retenu par la colonne avant l'étape d'élution, ont été prélevés pour une analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) qui permet de séparer les protéines en fonction de leur taille moléculaire après dénaturation par le SDS.

Une fois l'échantillon entièrement passé à travers la colonne, un premier lavage a été effectué avec 5 CV du tampon de lavage stérile (50 mM NaPo₄, 300 mM NaCl, pH 7), suivi d'un prélèvement de 37,5 µL du produit de lavage pour analyse par SDS-PAGE. Un second lavage a été ensuite réalisé avec 5 CV du même tampon contenant 10 mM d'imidazole, préparé sous

hotte. Un volume de 37,5 μL du produit est prélevé pour analyse par SDS-PAGE. Toutes les solutions sont stériles afin de diminuer la contamination par les endotoxines provenant de bactéries. L'élution se fait ensuite en collectant 9 tubes de 900 μL avec le tampon d'élution 1 (300 mM imidazole), puis 5 tubes de 900 μL supplémentaires avec le tampon d'élution 2 (500 mM imidazole). Après la collecte de ces 14 tubes de 900 μL chacun, la concentration en protéine (scFv_{CD3}, scFv_{CD19}, ScFv_{PD1}, scFv_{PD-L1}, et Blinatumomab) a été mesurée en utilisant un spectromètre Nanodrop, en mesurant l'absorption de la lumière à une longueur d'onde de 280 nm et en utilisant l'absorbance à 1% (Abs (1%)) spécifique pour chaque protéine obtenue via le site ExPASy (22,4, 21,3, 18,8, 22,5 et 22,4 respectivement).

Les tubes présentant les concentrations les plus élevées, à l'exception du premier, ont été regroupés, et leur concentration est à nouveau contrôlée. Enfin, la colonne a été lavée et désinfectée en faisant passer 2 CV d'eau distillée, 5 CV de NaOH 0,1 N, puis rincée avec le tampon Phosphate-Buffered Saline PBS 1 \times (137 Mm NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 2,7 Mm KCl, 0,0067 M PO₄, pH 7) jusqu'à un pH final égal 7 avant d'être conservée dans une solution de 20 % d'éthanol aqueux. Après la purification, le tampon a été remplacé par du PBS à l'aide d'une colonne NAP-25 (2.5 mL). Pour cela, 2,5 mL de l'échantillon (1 CV) ont été déposés sur la colonne et laissés à s'écouler par gravité. Un tube stérile a été placé en dessous de la colonne pour recueillir les protéines détachées après son lavage avec 3,5 mL de PBS. Après l'élution, la concentration de l'échantillon récupéré a été mesurée via son absorbance à 280 nm en utilisant le spectromètre Nanodrop, puis l'éluat a été filtré à l'aide d'un filtre de 0,22 μm et réparti en aliquotes de 5 mL sous hotte biologique avant une nouvelle mesure de concentration.

2.1.6 SDS-PAGE et deuxième purification

Toutes les fractions collectées (échantillon en cours de purification, lavage 1, lavage 2, flux non retenu, produit filtré réduit et le produit filtré non réduit) ont été analysées par SDS-PAGE pour évaluer la présence, la pureté et l'intégrité des protéines à chaque étape du processus de purification. Tous les échantillons récupérés avec un volume de 37,5 μL , à l'exception des produits finaux, ont directement été mélangés avec 12,5 μL de tampon de chargement XT (sans DTT). Pour les produits finaux, leur concentration était ajustée à 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ avant d'être combinés avec 6,25 μL du tampon XT adapté (avec ou sans DTT). Après un chauffage à 70 °C pendant 10 minutes, les échantillons ont été déposés sur gel SDS- PAGE avec un marqueur de taille, et la migration a été lancée sous 200 V pour 40 minutes. Le gel a été ensuite coloré au bleu de Coomassie, lavé, décoloré, puis analysé par imagerie pour visualiser les bandes de protéines.

Pour le PD1, le résultat de SDS-PAGE a montré que la purification n'a pas été réussie à la suite de l'observation des bandes contaminantes plus foncées que la bande de la protéine désirée (≈ 25 kDa). Pour cela, le produit PD1 a été repurifié une deuxième fois en utilisant cette fois-ci une colonne d'affinité au cobalt (Fractogel Cobalt, 1 mL). La première étape consiste à passer l'échantillon (PD1), préalablement purifié sur une colonne d'affinité au Nickel, sur une colonne d'affinité au cobalt (Fractogel Cobalt, 1 mL) préalablement équilibrée avec 10 CV de DPBS stérile.

Un volume de 37,5 μ L de la solution brute au cours de la purification et du flux sortant (flowthrough) a été prélevé pour une analyse par SDS-PAGE. Lorsque tout le volume de PD1 est passé par la colonne, deux étapes de lavage ont eu lieu avec 10 CV de tampon de lavage 1 (sans imidazole) et 10 CV de tampon de lavage 2 (25 nM imidazole). À chaque étape de lavage, un volume de 37,5 mL a été prélevé pour analyser par SDS-PAGE. L'élution a été faite par un tampon d'élution d'une concentration de 300 nM d'imidazole dans 6 tubes de 500 μ L chacun. La concentration en protéine de chaque tube a été déterminée par absorbance à 280 nm et les tubes présentant les concentrations les plus élevées ont été regroupés et passés sur une colonne Nap 25 pour effectuer un dessalage et un changement du tampon pour le PBS.

2.2 Production des différents hybrides S22-scFv_{PD1}; S23-scFv_{CD19} et S24-scFv_{CD3}

2.2.1 Réduction des scFv (scFv_{CD19}, scFv_{CD3} et scFv_{PD-L1})

Dans ce travail, trois méthodes de réduction des fragments scFv ont été évaluées afin d'optimiser l'efficacité de la réduction des ponts disulfure tout en limitant les pertes de protéine. Ces approches reposaient sur l'utilisation de différents agents réducteurs, à savoir le DTT, le TCEP en solution, et le TCEP immobilisé.

La première approche de réduction a été réalisée à l'aide du dithiothréitol (DTT). Afin d'évaluer l'impact de la concentration du réducteur sur l'efficacité de la réduction, différentes concentrations de DTT, comprises entre 5 mM et 45 mM, ont été testées. Une solution mère de DTT à 100 mM a été préparée, puis un volume précis de cette solution a été ajouté à des tubes contenant chacun 1 nmole de scFv, de manière à obtenir une concentration finale de DTT comprise entre 5 et 45 mM. Chaque tube contenait ainsi une quantité constante de scFv (1 nmole) et une concentration croissante de DTT. Les mélanges réactionnels ont été incubés pendant 40 minutes à température ambiante. À l'issue de l'incubation, l'élimination de l'excès de DTT a été effectuée à l'aide de filtres de centrifugation à coupure moléculaire de 10 kDa, par 5 à 7 cycles de lavage, chaque cycle consistant en une centrifugation à 14000 g pendant

10 minutes. L'efficacité de l'élimination du DTT a été contrôlée à l'aide du réactif DNTB (acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque), réactif d'Ellman). Le DNTB a été préparé à une concentration de 4 mg/mL dans du PBS. Après chaque cycle de lavage, la solution sortante du filtre de centrifugation a été incubée avec le DNTB, et la présence résiduelle de DTT a été évaluée par l'apparition d'une coloration jaune, indicative de la présence de groupements thiols libres. L'absorbance a été mesurée à 412 nm (A412). L'absence de coloration et une absorbance négligeable à 412 nm ont confirmé l'élimination complète du DTT. Après élimination de l'agent réducteur, les scFv réduits ont été récupérés par inversion du filtre de centrifugation, suivie d'une centrifugation à 1000 g pendant 5 minutes. Une quantité de 0,09 nmole de scFv réduit a été analysée par électrophorèse sur gel dénaturant pendant 80 minutes à 80 V afin de vérifier l'efficacité de la réduction.

La deuxième approche de réduction a été réalisée à l'aide du tris(2-carboxyéthyl) phosphine (TCEP) en solution. Une solution de TCEP à 8 mM a été préparée, et différents équivalents molaires de TCEP par rapport aux scFv ont été testés, allant de 25× à 800×. Chaque tube contenait 4 nmoles de scFv et le TCEP en solution à l'équivalent souhaité. Les mélanges réactionnels ont été incubés pendant 40 minutes à température ambiante afin de permettre la réduction efficace des ponts disulfure. À la fin de l'incubation, le TCEP en solution a été éliminé par filtre de centrifugation à coupure moléculaire de 10 kDa, selon le même protocole que pour la méthode DTT. Les différents scFv réduits ont été récupérés par inversion du filtre suivie d'une centrifugation à 1000 g pendant 5 minutes. Une quantité de 0,09 nmoles de scFv réduit a ensuite été analysée par électrophorèse sur gel dénaturant (SDS-PAGE), réalisée pendant 80 minutes à 80 V, afin de vérifier l'efficacité de la réduction par TCEP en solution.

La troisième approche de réduction a été réalisée à l'aide du TCEP immobilisé, suivant la méthode préconisée par ThermoFisher. Le volume de TCEP utilisé pour la réduction de chaque scFv correspondait à deux fois le volume de scFv à réduire, représentant un excès molaire de TCEP compris entre 357× et 507× pour le scFv_{CD3} et de 173× pour le scFv_{CD19}. La protéine scFv_{PD-L1} n'a pas été réduite et elle a été utilisée directement pour la conjugaison, car l'analyse SDS-PAGE (Figure 3.4-c) a montré que sa bande monomérique était beaucoup plus intense que la bande dimérique, indiquant une proportion majoritaire de monomères stables. Le volume de TCEP immobilisé a été préalablement lavé trois fois avec du tampon TAE 1× afin d'éliminer les excès de réactifs. Le mélange scFv-TCEP immobilisé et lavé a été incubé pendant 2 heures à température ambiante sous agitation (360 rpm). Après l'incubation, le TCEP immobilisé a été séparé du scFv réduit par centrifugation à 0,1×g pendant 1 minute, à l'aide de filtres de centrifugation (0,45 µm, 2 mL), et les scFv récupérés ont été analysés, comme pour les autres méthodes, sur gel dénaturant pour vérifier la réduction. Une quantité

molaire de 0,09 nmoles de chaque scFv réduit a été chargé sur le gel et migré pendant 80 minutes à 80 V.

Toutes les analyses d'électrophorèse sur gel dénaturant ont été effectuées en utilisant le tampon Tris-Glycine avec SDS comme tampon de migration.

2.2.2 Déprotection des brins d'ADN-maléimide (s22, s23 et s24) et leur conjugaison avec les scFv

Les différents fragments d'ADN utilisés pour la formation des hybrides ADN-scFv ont été générés en analysant les interactions potentielles entre différentes séquences. Pour chaque nouveau fragment, les séquences candidates ont été comparées à leurs séquences cibles à l'aide de l'outil OligoAnalyzer d'IDT DNA. Le calcul du ΔG des hétérodimères a permis d'évaluer la susceptibilité des brins à interagir entre eux. Les séquences présentant des valeurs de ΔG proches de zéro ont été sélectionnées, afin de minimiser les interactions indésirables et de favoriser l'assemblage spécifique des hybrides ADN-scFv. Ce processus a été répété pour tous les fragments, assurant que chaque brin d'ADN se comporte de manière stable et spécifique dans les étapes de conjugaison et d'assemblage.

Les quatre brins d'ADN sélectionnés pour la conjugaison avec les scFv ont été achetés auprès de Genelink comme des oligonucléotides 5'-maléimide lyophilisés et présentés sous une forme protégée de cycloadduit maléimide-2,5-diméthylfurane. Chaque brin d'ADN a été re-suspendu dans 1 mL d'eau distillée afin de déterminer sa concentration à l'aide d'un lecteur de microplaques Cytation 5 (Biotek) en mesurant l'absorbance à 260 nm. La déprotection de chaque ADN 5'-maléimide a été effectuée selon deux méthodes : La méthode par irradiation par micro-onde et la méthode par chauffage médiée par le toluène anhydre.

Pour la première méthode testée, 1 nmole d'ADN-maléimide (forme protégée) a été mélangée avec 100 μ L d'un mélange méthanol/eau (1 :1) pour obtenir une concentration finale en ADN de 10 μ M. Ce mélange a été placé dans un réacteur à micro-ondes (système CEM Discover, USA), équipé d'un dispositif de régulation de pression. Une méthode « dynamique » a été appliquée ($T = 90$ °C, puissance = 300 W), maintenant automatiquement la température à 90 °C par ajustement de la puissance. L'augmentation de la pression a empêché l'ébullition de l'échantillon, et la fonction PowerMax a été activée pour assurer le refroidissement par air comprimé. La réaction a été effectuée pendant 90 minutes. Une fois le mélange refroidi, il a été transféré dans un tube Eppendorf et séché à l'aide du système SpeedVac, un dispositif fonctionnant sous vide et centrifugation, permettant l'élimination efficace du mélange eau-méthanol par évaporation. Le séchage a été réalisé pendant 1 h à 35 °C.

Un nanomole de scFv préalablement réduit avec 800 nmoles de TCEP immobilisé (40 minutes d'agitation à 360 rpm à température ambiante) a été ajouté à l'ADN préalablement séché, de

manière à obtenir un ratio ADN : scFv de 1 :1 dans un volume final de 100 μ L, correspondant à une concentration finale en ADN de 10 μ M. Le mélange réactionnel a ensuite été incubé pendant 24 heures à température ambiante, puis analysé par électrophorèse sur gel natif afin de vérifier l'efficacité de la conjugaison.

Concernant la méthode médiée par le toluène anhydre, toutes les réactions ont été effectuées dans des conditions strictement exemptes d'humidité. Les réactions ont été réalisées dans des tubes en verre ambré compatibles HPLC (2 mL), fermés à l'aide de capuchons à vis munis de septa, spécifiquement choisis pour leur faible perméabilité à l'humidité. Tout d'abord, chaque oligonucléotide 5'-maléimide (8 nmoles) a été lyophilisé à l'aide d'un lyophilisateur (LABCONCO), en appliquant un flux d'argon à la sortie du tube pour éviter toute entrée d'humidité, suivi de l'ajout de 1 mL d'acétonitrile anhydre (sous argon) et d'une évaporation rotative sous vide (Rotavapor R-210 BUCHI (40 °C, 70 mbar). L'appareil d'évaporation rotative a été par la suite purgé avec de l'argon pour rétablir la pression atmosphérique et retiré de l'appareil d'évaporation rotative avant l'ajout, trois fois successifs, de 1 mL de toluène anhydre (sous argon) et l'évaporation de ce dernier utilisant l'appareil d'évaporation rotative (40 °C, 50 mbar). Après cette étape de 3 cycles successifs du traitement par le toluène anhydre, le tube sorti de l'appareil d'évaporation rotative a été rempli de nouveau avec 1 mL du toluène anhydre et porté à 90 °C pendant 4 heures sous bain d'huile en agitation avant d'être évaporé sous l'appareil d'évaporation rotative. Le tube contenant l'ADN sec est maintenant prêt pour la prochaine étape de la conjugaison en ajoutant la protéine réduite par TCEP immobilisé.

Un premier essai a été effectué avec un ratio ADN : scFv de 1 :1 en utilisant le tampon PBS 1 \times comme tampon de conjugaison. Sur la base des résultats obtenus, les conditions ont été optimisées en ajustant le ratio ADN : scFv de 4 :1 et en utilisant le tampon TAE comme tampon de conjugaison. Le mélange de 2 nmoles de scFv réduit avec 8 nmoles d'ADN déprotégé (ratio 1 :4) a été préparé en ajoutant du tampon TAE 10 \times (pH 7) et de l'eau afin d'ajuster la concentration finale de l'ADN à 20 μ M et celle du tampon TAE à 1 \times . La réaction a été laissée pendant 24 heures à température ambiante sous agitation à 360 rpm. Dans le but de confirmer la conjugaison, le produit de la réaction de la conjugaison a été testé par une électrophorèse sur polyacrylamide prêt à l'emploi (4-15%), en déposant 0.03 nmoles d'ADN dans chaque puit avec 2 μ L de glycérol et de tampon TAE 1 \times pour un volume final de 15 μ L. Une quantité de 0,03 nmoles d'ADN seul et 2,5 μ g de scFv ont été migrés sur le gel comme de contrôles négatifs. Le gel a été migré pendant 60 minutes à 80 V en utilisant le tampon Tris-Borate-EDTA (TBE 1 \times) comme tampon de migration avant d'être révélé par coloration avec le GelRed (Sigma Aldrich) pour visualiser l'ADN sous UV.

Pour vérifier la conjugaison entre les ADN et leurs scFv spécifiques, une analyse sur gel dénaturant a été réalisée en migrant les protéines contenues dans le mélange physique à

travers un gel en présence du tampon de migration incluant du SDS. Pour chaque analyse trois échantillons ont été déposés sur gel, 0,09 nmol de scFv non conjugués utilisés comme premier contrôle négatif afin d'évaluer sa migration non conjuguée, 0,03 nmol d'ADN libre, un second contrôle négatif dans le but d'observer l'effet de l'ADN sur la migration, et 0,09 nmol de scFv contenant dans le mélange réactionnel à tester. La migration a été effectuée en utilisant le tampon Tris-Glycine avec SDS, pendant 80 minutes à 80 V, suivie d'une visualisation directe sous UV.

2.3 Purification des bio-conjugués produits

Dans cette étude tous les mélanges réactionnels sont formés par un mélange d'ADN libre, la protéine scFv sous ses formes monomériques et dimériques et du bio-conjugué d'intérêt formé lors de la réaction de la conjugaison. Tous les bio-conjugués produits (scFv_{CD3-S24} ; scFv_{CD19-S23} ; scFv_{PD-L1-S22}) ont été purifiés à l'aide de la technique de la chromatographie échangeuse de cations automatisée avec le système de chromatographie liquide rapide des protéines (FLPC) (Système de chromatographie ÄKTA start™) utilisant une colonne (HiTrap, Capto SP ImpRes) de 5 mL à base de résines recouvertes de groupements sulfonates chargés négativement sur laquelle seules les protéines avec une charge plus positive vont s'y fixer. Afin d'optimiser la technique et déterminer les fractions d'élution pour chaque composant séparément, trois contrôles (ADN seul, scFv seul, mélange physique du scFv et de l'ADN) ont été appliqués sur la colonne avant d'appliquer les milieux réactionnels sur la colonne. La colonne a été équilibrée avec 2 CV de tampon TA sans MgCl₂ 1× (40 mM Tris, 20 mM acide acétique (glacial), pH ajusté à 7,4) avant l'injection des différents échantillons de contrôle, séparément, à travers la valve de l'injection puis élués en utilisant un gradient d'élution croissant de chlorure de magnésium hexahydraté allant d'une concentration de 0 M à 1 M sur un volume d'élution total correspondant à 3 CV. Ceci permet de libérer sélectivement les différentes protéines retenues sur la matrice de la colonne selon leur affinité électrostatique vis à vis à celui-ci. L'élution de chaque molécule présente dans l'échantillon est suivie en temps réel sous forme d'un profil chromatographique. Toutes les fractions présentant un pic ont été récupérées et concentrées à l'aide des filtres centrifuges Amicon 15 mL de 5 kDa pour retenir l'ADN libre de taille moléculaire d'environ 7 kDa (5000 ×g, 60 minutes) et filtres centrifuges Amicon 15 mL de 10 kDa pour retenir les bio-conjugués de taille moléculaire d'environ 34 kDa et les scFv monomériques (27 kDa) et dimériques (50 kDa) sous une centrifugation de 5000 ×g pendant 40 minutes.

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre présente les différents résultats obtenus et leur interprétation durant cette étude. Il inclut toutes les données expérimentales d'une manière structurée et organisée dans l'ordre dans lequel les expériences ont été réalisées.

Deux volets principaux sont inclus dans cette section ; l'expression des différentes protéines nécessaires pour la production des premiers éléments constituant les anticorps tri-spécifiques (scFV_{CD19}, scFV_{CD3}, scFV_{PD1}, scFV_{PD-L1}), le blinatumomab comme un contrôle et la formation des différents hybrides, premiers composants, des TsAb.

3.1 Production des fragments scfv (CD3, CD19, PD-L1 et PD)

3.1.1 La viabilité et la densité cellulaire des cellules transfectées par les différents vecteurs de clonage.

L'utilisation des cellules CHO recombinantes comme un système d'expression dédié pour la production des molécules biopharmaceutiques a évolué et est devenue aujourd'hui un modèle de référence très rentable avec une concentration finale de protéine exprimée allant jusqu'à 5 à 10 g/L (Handlogten et al., 2018). Dans ce contexte, tous les gènes des protéines utilisés au cours de ce projet (scFV_{CD19}, scFV_{CD3}, scFV_{PD1}, scFV_{PD-L1} et le Blinatumomab) ont été exprimés dans les cellules hôtes CHO3E7 dans les laboratoires d'Yves Durocher au CNRC.

Toutes les séquences protéiques des scFv et celle de blinatumomab ont été modifiées par l'ajout d'autres séquences insérées à des positions différentes (Tableau 3.1). Les séquences de répétition G et S (jaune) ont été ajoutées au milieu pour lier les deux régions V_H et V_L de chaque anticorps monoclonal identifiées, permettant une meilleure flexibilité aux domaines. Également, à l'extrémité N-terminale de chaque séquence, un peptide signal (rouge) a été inséré facilitant l'expression extracellulaire de protéines produites. À l'extrémité C-terminale, une séquence de marquage (verte) formée de 6 histidines est ajoutée jouant le rôle d'un His-tag pour assurer une bonne purification de protéines excrétées à l'extérieur de cellules CHO, précédée d'une petite séquence contenant l'acide aminé cystéine (bleue) essentiel pour la réaction avec le groupement maléimide fixé à l'ADN. Ceci permet la conjugaison entre l'ADN-maléimide et le scFv et la formation des différents hybrides ciblés.

Tableau 3.1 Séquences protéiques des ScFv produites et du blinatumomab.

Protéines produites	Séquences protéiques de N au C-ter
scFv _{CD3}	MPLLLLLPLLWAGALA QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTR YTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSA SGGG GGSGGGSGSGGSDIQLTQSPAISASPGEKV TMTCRASSSVSYMN WYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAE DAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK ASGGCG HHHHHH
scFv _{CD19}	MPLLLLLPLLWAGALA DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYD GDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIH PVEKVDAAATYHCQSTEDPWTFGGGKLEIK GGGGSGGGGSGGGG S QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQG LEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKA TLTADESSSTAYMQLSSLASEDS AVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGT TVTVSS ASGGCG HHHHHH
Blinatumomab	MPLLLLLPLLWAGALA DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYD GDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDAS NLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAATYHCQSTEDPWTF G GGTKLEIK G GGGSGGGGSGGGGQVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSS YWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWP GDGDTNYNGKFKGKA TLTADESS STAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGT TVTV SS GGGGS DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRY TMHWVKQ RPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKA TLTTDKSSSTAYMQLSSLT SEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVE GGGSGGGSGG SGGVDDIQLTQSPAISASPGEKV TMTCRASSSVSYMNWYQQKSGT SPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAE DAATYYCQ QWSSNPLT FGAGTKLELK HHHHHH
scFv _{PD1}	MPLLLLLPLLWAGALA EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKR GGGGSGGGGSGGGGQV QLVESGGGVVQPQSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSKRYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYC ATNDYWGQGTLVTVSS ASGGCG HHHHHH
scFv _{PD-L1}	MPLLLLLPLLWAGALA VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDS WIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGS TYYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT TLTVS GGGGSGG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVS TAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYLYHPATFGQGTKVEIK ASGGCG HHHHHH

L'expression de ces différentes scFv a été réalisée dans des cellules CHO3E7 en culture semi-continu utilisant le plasmide pTT5, développé par l'équipe de Professeur Yves Durocher (Durocher et al., 2002), comme un vecteur de clonage pour insérer les différentes séquences nucléotidiques codantes pour chaque scFv d'intérêt. Ce plasmide est adapté aux cellules CHO et se distingue par la présence d'un promoteur viral puissant dérivé du cytomégalovirus (CMV). Ce promoteur induit une transcription élevée des séquences clonées, conduisant à des rendements protéiques purifiés pouvant atteindre 20 mg (Durocher et al., 2002). Également, la construction du plasmide pTT5 comprend un gène de résistance à l'ampicilline ce qui

garantit une bonne sélection de colonies transformées, ainsi que plusieurs sites de restriction utiles à l'insertion de l'insert d'intérêt. Pour l'expression de l'anticorps bispécifique blinatumomab, sa séquence codante a été insérée dans le plasmide pTwist optimisé pour l'expression de protéines dans les cellules hôtes CHO. Ce plasmide se caractérise par une forte transcription assurée par la présence du promoteur fort de type CMV et par la présence de plusieurs sites de restrictions accessibles aux enzymes de restriction pour insérer correctement la séquence nucléotidique du blinatumomab à produire.

Le suivi post-transfection incluant la mesure de la viabilité cellulaire (Figure 3.1) et la densité cellulaire (Figure 3.2) ont été réalisés à différents jours jusqu'au jour 12 de la récolte. La densité cellulaire de cellules transfectées (Figure 3.2) avec le plasmide pTT5-scFV_{CD3}CysH6 passe de $6,59 \times 10^6$ cellules /mL le jour 1 (avec une viabilité de 94,7%) à $8,42 \times 10^6$ cellules /mL (avec viabilité de 86,1%) le jour 5. Entre le jour 7 et le jour 9, la densité augmente de $8,45 \times 10^6$ cellules /mL (avec viabilité de 81,7%) à $1,14 \times 10^7$ cellules /mL (avec viabilité de 81,9%) le jour 9, jusqu'à arriver à $1,17 \times 10^7$ cellules /mL (avec une viabilité de 81,8%) le jour 12 de la récolte. Pour les cellules transfectées avec le plasmide pTT5- scFV_{CD19}CysH6, le jour 1 la densité cellulaire mesurée est à $7,1 \times 10^6$ cellules /mL (avec viabilité de 96,2%), puis entre le jour 5 et 7 elle a subi une augmentation allant de $9,65 \times 10^6$ cellules /mL (avec une viabilité de 84,3%) à $1,24 \times 10^7$ cellules /mL (avec une viabilité de 85,4%). Cette augmentation se poursuit jusqu'au le jour 9, avec une densité cellulaire égale à $1,43 \times 10^7$ cellules/mL (avec une viabilité de 84,9%) et arrive à $1,25 \times 10^7$ cellules/mL (avec une viabilité de 82,3%) le jour 12.

Également pour les cellules CHO3E7 transfectées avec le plasmide pTwist-blinatumomab, la densité mesurée (Figure 3.2) est égale à $7,29 \times 10^6$ cellules/mL le jour 1 puis elle a enregistré une augmentation, d'environ 61,4%, entre le jour 5 au jour 7 allant de $9,23 \times 10^6$ cellules/mL (avec une viabilité de 87%) à $1,49 \times 10^7$ cellules/mL (avec une viabilité de 86,8%). À partir du jour 9 cette densité a enregistré une légère diminution, d'environ 16,1%, passant à $1,25 \times 10^7$ cellules/mL (avec une viabilité de 85,9%) et elle a continué sa baisse jusqu'à arriver à $1,1 \times 10^7$ cellules/mL (avec une viabilité de 83,5%).

Concernant les cellules CHO3E7 introduite avec pTT5-scFV_{PD-1}CysH6, la densité et la viabilité ont également évolué durant toute la période de la culture. Au premier jour la densité cellulaire mesurée (Figure 3.2) est égale à $6,21 \times 10^6$ cellules/mL avec une viabilité élevée de 95,4 %. Puis le jour 5 elle est passée à $1,07 \times 10^7$ cellules/mL avec un taux de croissance d'environ de 72,3% associée à une viabilité importante de 97,9%. Cette augmentation de la densité s'est poursuivie durant toute la durée de la culture restante en allant de $1,22 \times 10^7$ cellules/mL (le jour 7) à $1,57 \times 10^7$ cellules/mL (le jour 9) jusqu'à atteindre la densité optimale de $1,92 \times 10^7$ cellules/mL (le jour 12). La viabilité de cellules comptées a subi une légère diminution durant

les jours 7, 9 et 12 mais est restée toujours au-dessus de 75%, qui est le seuil minimal accepté pour garantir les bonnes conditions expérimentales. De la même manière avec les cellules transfectées avec le plasmide pTT5-scFv_{PD-L1}CysH6, les paramètres de la densité et la viabilité ont été déterminés et les résultats obtenus montrent une augmentation de la densité de $5,84 \times 10^6$ cellules/mL le jour 1 à $9,03 \times 10^6$ cellules/mL le jour 5 contrairement à la viabilité qui a subi une chute importante allant de 95% (jour 1) à 78,5% (jour 5), puis au jour 7 la densité cellulaire et la viabilité ont de nouveau augmentées pour atteindre $1,15 \times 10^7$ cellules/mL avec 80,8% des cellules vivantes. Au jour 9, la densité cellulaire et la viabilité enregistrées ont poursuivi leur augmentation arrivant à $1,53 \times 10^7$ cellules/mL avec une viabilité importante de 83,4% avant de se stabiliser à une densité finale de $1,31 \times 10^7$ cellules/mL et une viabilité de 83,5%.

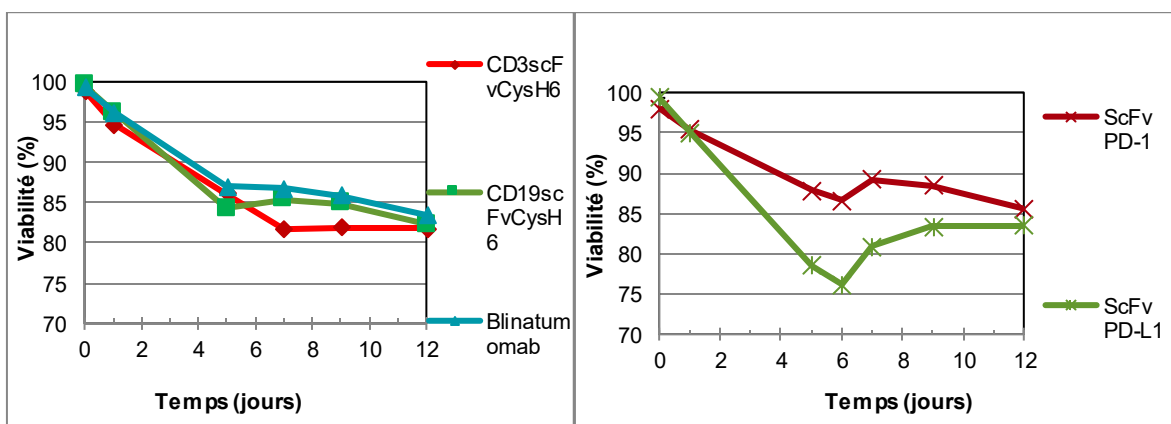


Figure 3.1 La viabilité des cellules CHO3E7 transfectées avec les différents vecteurs durant les 12 jours suivant la transfection.

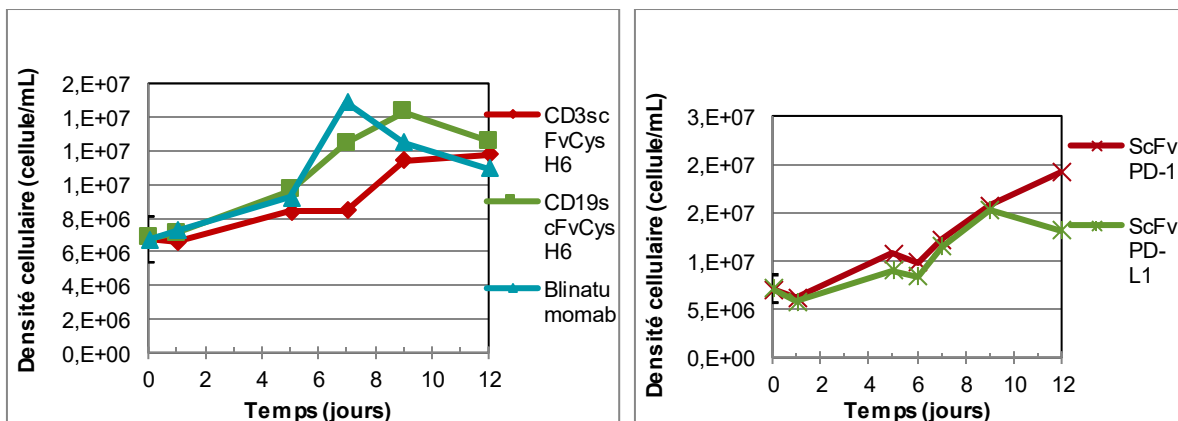


Figure 3.2 La densité cellulaire des cellules CHO3E7 transfectées avec les différents vecteurs durant les 12 jours suivant la transfection.

En analysant toutes les densités cellulaires et viabilités enregistrées chez toutes les cellules CHO3E7 transfectées, on constate que toutes ces données sont bien situées dans la fourchette supérieure habituellement enregistrée pour la culture des cellules CHO en suspension en présence de sélénium (Se) sous forme de sélénite pour la production des protéines recombinantes (1×10^7 cellules/mL) (Zhang et al., 2006).

Il convient de noter que la viabilité de toutes les cellules transfectées est restée toujours au-dessus du seuil minimal tout au long de la période de culture, sauf celle de la construction PD-L1 au niveau de la quelle une chute de viabilité a été détectée au jour 5 diminuant jusqu'à 78,5%. Cette perte de viabilité cellulaire a été rapidement rétablie le jour suivant, après l'enrichissement du milieu de culture en glucose et milieu nutritif, passant à 83,5% le jour 12. Cette diminution brusque de la viabilité détectée au sein des cellules transfectées avec le plasmide pTT5-ScFV_{PD-L1}-CysH6 suggère, principalement, que la protéine ScFV_{PD-L1} produite est toxique pour les cellules CHO3E7 ce qui a affecté négativement leur viabilité et ainsi émet l'hypothèse que l'accumulation de protéines mal repliées en quantité importante dans le réticulum endoplasmique (RE) peut réduire significativement le taux des cellules CHO vivantes lors de la production d'anticorps recombinants (Shibafuji et al., 2024). En fait, il existe des lignées de cellules hôtes CHO résistantes au stress du réticulum endoplasmique (RE). Ces lignées activent l'expression des gènes liés au cycle TCA, ce qui conduit à un apport accru d'énergie sous forme d'ATP et au maintien de mécanismes essentiels à la survie cellulaire. À l'inverse, chez les lignées cellulaires sensibles au stress du RE, l'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique induit l'activation de gènes et de voies menant à l'apoptose. Ce processus s'inscrit dans un mécanisme de défense cellulaire appelé réponse aux protéines mal repliées (UPR), qui entraîne en conséquence une diminution du nombre de cellules CHO viables. (Zhang et al., 2024), (Poulain, 2018). Le reste des cellules CHO tolérantes au stress RE présentes dans le milieu de culture continuent à se multiplier en présence de conditions favorables (glucose, milieu nutritif ...) ce qui traduit l'augmentation de nouveau de la viabilité des cellules au jour 7 post transfection.

Dans les cultures de cellules CHO (Chinese Hamster Ovary), la dynamique de viabilité cellulaire au cours du temps observée dans notre étude — avec une réduction progressive de la viabilité sur une période d'environ 12 jours — est en accord avec ce qui est décrit dans la littérature scientifique sur les cultures prolongées. En conditions standards de culture en batch ou fed-batch, les cellules CHO passent par une phase de croissance exponentielle suivie d'une diminution de la viabilité due à l'épuisement des nutriments, à l'accumulation de métabolites et au stress cellulaire, facteurs qui entraînent l'entrée en apoptose et une perte de viabilité au fil du temps ; ce profil dynamique a été documenté dans plusieurs études sur la production de protéines recombinantes en CHO, où la viabilité commence à décliner après la phase de croissance maximale et peut tomber en dessous de niveaux élevés après plusieurs jours de culture sans stratégies d'alimentation optimisées (Gyorgypal et al., 2025).

Par exemple, des études utilisant des milieux nourriciers standards ont montré que la viabilité des cultures fed-batch de CHO tend à chuter sous 80 % autour du jour 8–11 en l'absence de conditions spécifiques d'optimisation, alors que des stratégies d'alimentation adaptées

peuvent prolonger cette viabilité jusqu'à 14 jours ou plus (Gyorgypal et al., 2025).

De plus, des investigations métaboliques indiquent que le déclin de viabilité est associé à des changements physiologiques et au stress cellulaire au cours de la production, ce qui est compatible avec l'observation de pertes progressives de viabilité sur des périodes prolongées (Dean & Reddy, 2013).

Ainsi, la tendance observée dans nos cultures CHO3E7 s'inscrit dans le cadre des comportements rapportés dans la littérature et reflète une réponse cellulaire typique en l'absence de stratégies intensives de maintien de la viabilité.

3.1.2 Western blot

Afin de vérifier la production de ces différentes protéines et d'estimer la quantité produite par les cellules CHO3E7 transfectées, les différents surnageants obtenus ont été analysés par une électrophorèse de type Western blot en se basant sur un contrôle positif ayant des concentrations connues de ces analytes. En analysant le gel du Western blot (Figure 3.3-a), on constate que le gel montre l'absence de bandes dans le puit du contrôle négatif (puit 2) indiquant une bonne spécificité de l'anticorps anti-His Tag utilisé et un faible bruit de fond. Également, il montre les différentes bandes spécifiques dans les puits 3, 4 et 5 qui correspondent aux différentes tailles attendues de chaque protéine, situées entre 27 kDa pour la forme monomérique des scFv_{CD3} et scFv_{CD19} et ~ 55 kDa pour le blinatumomab. Les trois bandes détectées se caractérisent par des intensités différentes et nettement plus faibles que celles observées pour les contrôles positifs avec les différentes concentrations (10 ng/μL ; 20 ng/μL ; 40 ng/μL). Ceci indique que leur production a été effectuée avec des quantités variables et que leurs concentrations sont inférieures à 10 ng/μL.

De même, l'analyse du gel Western Blot obtenu pour les protéines scFv_{PD1} et scFv_{PD-L1} (Figure 3.3-b) a révélé l'absence de bandes dans le contrôle négatif (puit 2) et la présence de deux bandes dans le puit 3 et le puit 4 correspondant aux poids moléculaires attendus, environ ~27 kDa, avec intensité différente. Pour la protéine scFv_{PD1}, la bande détectée est faiblement visible indiquant une faible expression et une quantité produite très limitée de la protéine. Contrairement, la protéine scFv_{PD-L1} se caractérise par une bande spécifique à son poids moléculaire, environ ~27 kDa, détectable et très intense. Toutes les bandes détectées sont moins intenses que les bandes des protéines standards ce qui indique que leur concentration est plus faible que celle des standards.

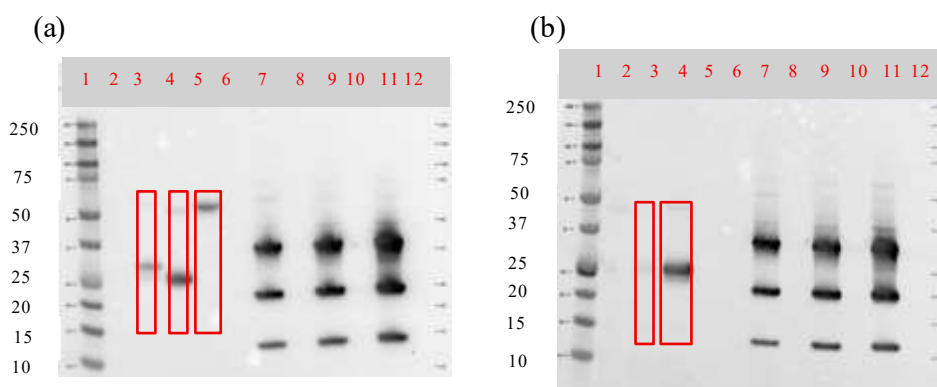


Figure 3.3 Résultats du Western Blot.

(a) Résultats du Western Blot pour ScFv CD3, ScFv CD19 et le Blinatumomab : 1-Marqueur de taille, 2-Protéine sans étiquette His Tag (Contrôle -), 3-ScFv CD3, 4-ScFv CD19, 5-Blinatumomab, 7- Protéine avec étiquette His Tag Contrôle + (10 ng/μL), 9-Protéine avec étiquette His Tag Contrôle + (20 ng/μL), 11-Protéine avec étiquette His Tag Contrôle + (40 ng/μL). (b) Résultats du Western Blot pour ScFv PD1 et ScFv PD-L1 : 1-Marqueur de taille, 2- Protéine sans étiquette His Tag (Contrôle -), 3-ScFvPD1, 4-scFvPD-L1, 7- Protéine avec étiquette His Tag Contrôle + (10 ng/μL), 9- Protéine avec étiquette His Tag Contrôle + (20 ng/μL), 11-Protéine avec étiquette His Tag Contrôle + (40 ng/μL).

3.1.3 SDS-PAGE

Toutes les fractions collectées des différentes protéines exprimées issues de la purification par chromatographie d'affinité sur nickel ont été analysées par une électrophorèse de type SDS-PAGE afin de tester leur pureté et d'assurer que chaque protéine cible est bien présente dans la fraction finale. Les résultats du gel SDS-PAGE pour les protéines scFv_{CD3} et scFv_{CD19} (Figure 3.4-a) montrent que les fractions de la solution brute et du flux sortant (2, 3, 9 et 10) ainsi que les fractions du deuxième lavage (puits 5 et 12) présentent plusieurs signaux protéiniques dont celle correspondant à la taille attendue pour scFv_{CD3} et scFv_{CD19} (environ ~27 kDa) tandis que les autres présentent des bandes de protéines contaminantes. Les fractions finales éluées (puits 6 et 7) de la protéine scFv_{CD3} révèlent encore différentes bandes d'impuretés moins abondantes que les premières fractions et la bande la plus intense est celle qui correspondant à la protéine désirée. Pour la protéine scFv_{CD19}, les résultats du SDS-PAGE montrent une purification beaucoup plus efficace. Les bandes contaminantes dans les fractions finales (puits 13 et 14) sont beaucoup moins abondantes et la bande la plus intense est la bande de la scFv sous sa forme monomérique (~ 27 kDa).

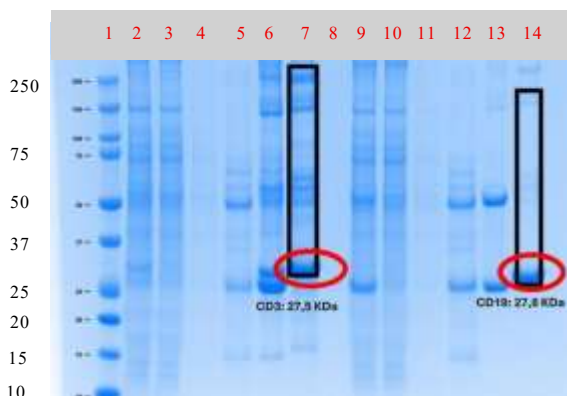
La réduction des ponts disulfure entre deux molécules scFv_{CD19} produit une seule bande sur le gel (puit 14) montrant la bonne purification de protéine scFv_{CD19} par chromatographie d'affinité sur nickel. Les mêmes résultats ont été observés sur le gel SDS PAGE pour le blinatumomab (Figure 3.4-b) avec une diminution des bandes contaminantes en progressant

vers les fractions finales (puits 6 et 7) qui présentent la bande la plus intense correspondant à la taille attendue du blinatumomab d'environ 55 kDa.

Le même test SDS-PAGE a été réalisé pour les différentes fractions de protéines scFv_{PD1} et scFv_{PD-L1} (Figure 3.4-c). Les données du gel SDS-PAGE obtenues montrent que les fractions de la solution brute et du flux sortant (puits 1, 2, 8 et 9) ainsi que les fractions de lavage (puits 3, 4, 10 et 11) présentent plusieurs bandes dont la bande la plus visible sur le gel (~ 27 kDa), correspond à la protéine cible. En analysant les fractions finales des scFv_{PD1} (puits 5 et 6) on constate qu'elles présentent plusieurs bandes contaminantes plus intenses que celle de la protéine d'intérêt qui est invisible sur le gel. Contrairement, les fractions finales de scFv_{PD-L1} (puits 15 et 16) se caractérisent par un nombre de bandes d'impuretés limitées de faible intensité et une bande très intense correspondant au scFv_{PD-L1} monomérique désiré (puit 16). Afin d'augmenter la pureté de la protéine scFv_{PD1}, une purification supplémentaire a été réalisée par chromatographie d'affinité sur cobalt. La purification initiale sur nickel permet de maximiser le rendement, car le nickel capture efficacement la majorité des protéines His-tag, mais sa sélectivité limitée entraîne la présence de protéines endogènes co-purifiées. Le cobalt, plus spécifique pour les résidus histidine, est utilisé ensuite comme étape de polissage afin de réduire les contaminants et d'obtenir des fractions plus homogènes. Cette stratégie combinée permet ainsi d'optimiser à la fois la quantité et la qualité de la scFv_{PD1} purifiée, garantissant une protéine finale adaptée aux analyses fonctionnelles ou structurales (<https://synapse.patsnap.com/article/compare-ni-nta-vs-co22B-resins-for-his-tag-proteins>, 2025).

Les résultats du gel SDS-PAGE obtenus (Figure 3.4-d) montrent que les fractions post-purification avec la colonne d'affinité au nickel de la solution brute et du flux sortant (puits 2 et 3) ainsi que les fractions de lavage (puit 4 et 5) sont majoritairement composées par les bandes contaminantes. Toutefois dans les fractions finales (puits 6, 7 et 8) les bandes contaminantes sont réduites et la bande correspondant à la protéine scFv_{PD1} cible est plus nette et intense.

(a)



(b)



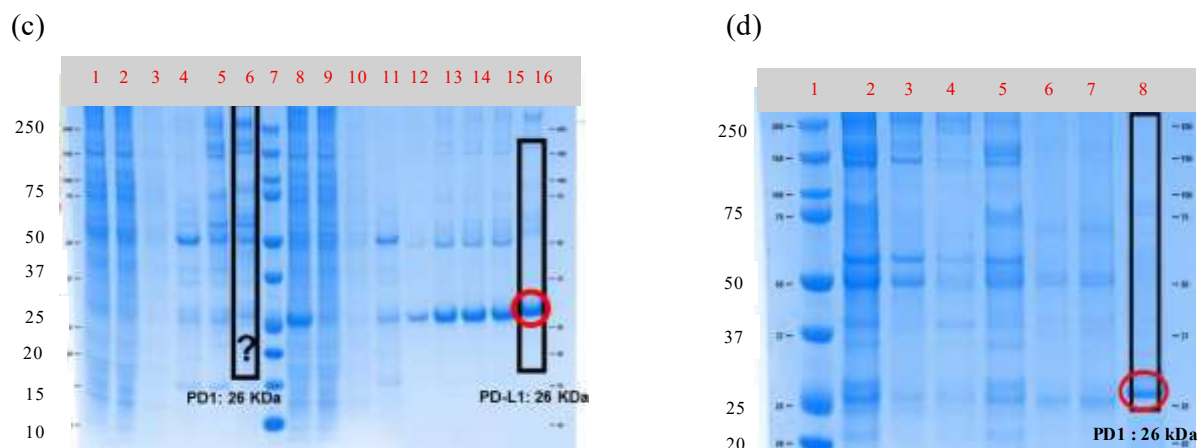


Figure 3.4 Résultats de SDS PAGE.

(a) Résultat de SDS PAGE pour scFv_{CD3} et scFv_{CD19} : Puit 1 : Marqueur de taille (kDa), Puit 2 et 9 : Surnageant avant la purification, Puit 3 et 10 : Flux sortant, Puit 4 et 10 : Lavage1, Puit : 5 et 12 : Lavage 2, Puit 6 : produit scFv_{CD3} non réduit, Puit 7 : produit scFv_{CD3} réduit, Puit 13 : produit scFv_{CD19} non réduit, Puit 14 : produit scFv_{CD19} réduit. (b) Résultat de SDS PAGE pour le blinatumomab : Puit 1 : Marqueur de taille (kDa), Puit 2 : Surnageant avant la purification, Puit 3 : Flux sortant, Puit 4 : Lavage1, Puit5 : Lavage 2, Puit 6 : produit blinatumomab non réduit, Puit 7 : produit blinatumomab réduit. (c) Résultat de SDS PAGE pour scFv_{PD1} et scFv_{PD-L1} : Puit 1 et 8 : Surnageant avant la purification, Puit 2 et 9 : Flux sortant, Puit 3 et 10 : Lavage1, Puit 4 et 11 : Lavage 2, Puit 5 : produit scFv_{PD1} non réduit, Puit 6 : produit scFv_{PD1} réduit, Puit 7 : Marqueur de taille (kDa), Puit 15 : produit scFv_{PD-L1} non réduit, Puit 16 : produit scFv_{PD-L1} réduit. (d) Résultat de SDS PAGE pour la deuxième purification de scFv_{PD1} avec Cobalt : Puit 1 : Marqueur de taille (kDa), Puit 2 : Solution PD1 purifié par Nickel, Puit 3 : Flux sortant, Puit 4 : Lavage1, Puit 5 : Lavage 2, Puit 6 : PD1 purifié avec Cobalt avant concentration, Puit 7 : produit scFv_{PD1} concentré non réduit, Puit 8 : produit scFv_{PD1} concentré réduit.

Les quantités purifiées obtenues après l'expression et purification sont résumées dans le Tableau 3.2. Les résultats montrent des différences marquées dans les rendements de production. Les scFv_{CD19} et scFv_{PD-L1} présentent les rendements les plus élevés (35 mg et 44 mg, respectivement), tandis que scFv_{CD3} et blinatumomab sont produits en quantités modérées (6,6 mg et 16 mg, respectivement). Finalement, la production de scFv_{PD1} est très faible (0,14 mg), ce qui peut être attribué à une instabilité intrinsèque de la protéine ou à des difficultés de repliement correct dans le système d'expression utilisé.

Sur la base des paramètres de viabilité et de densité cellulaire mesurés, la production des différentes protéines recombinantes par les cellules CHO3E7 a conduit à l'obtention de rendements élevés après les étapes de purification et de filtration. Ces rendements sont supérieurs à ceux rapportés dans la littérature pour des cultures discontinues, où la production est estimée à environ 1 mg/mL (Renate Kunert avril 2016). Cela est traduit principalement par la bonne densité et viabilité cellulaire enregistrées durant toute la période de culture. Cependant, une variabilité au niveau de la productivité a été observée qui diffère d'une

protéine exprimée à une autre (Tableau 3.2). Cette variation des concentrations observées suggère que chaque protéine recombinante produite se caractérise par une stabilité, une structure spécifique et une teneur importante en ponts disulfure qui sont possiblement responsables de l'induction d'une réponse au stress du RE influençant négativement son niveau de production et d'expression (Rives et al., 2025). Ces données pourraient expliquer la faible concentration observée pour la protéine scFv_{PD1} (0,27 mg/mL) et scFv_{CD3} (0,33 mg/mL), dont leur séquence protéique contient trois ponts disulfures compliquant leur repliement et favorisant leur rétention dans le RE et par conséquent leur faible expression dans le milieu de culture. Également, la protéine scFv_{PD-L1} contient un nombre de ponts disulfure égale à trois avec une productivité observée un peu plus importante (0,98 mg/mL). Concernant le blinatumomab, malgré la richesse de sa séquence peptidique en ponts disulfure (cinq ponts disulfures, due à la somme de scFv_{CD3} et scFv_{CD19} reliés *via* une liaison peptidique), son niveau de production obtenue est considéré aussi important comme celui observée pour scFv_{PD-L1} en raison de la position stéréotypée des ponts disulfures dans la molécule. En revanche, le scFv_{CD19}, qui ne contient que quatre cystéines, montre une structure plus simple et plus stable, ce qui se traduit par un rendement plus élevé (1,73 mg/mL) et une meilleure sécrétion.

En comparaison avec la littérature, les rendements de fragments d'anticorps de type scFv exprimés en systèmes mammifères sont généralement faibles à modérés quand la production n'est pas optimisée, avec des titres souvent observés dans la gamme de quelques dizaines de milligrammes par litre de culture pour des scFv exprimés en conditions similaires ; par exemple, des rapports indiquent des niveaux de production scFv jusqu'à ~32 mg/L dans des systèmes mammifères transitoires ou bioréacteurs, bien qu'une optimisation poussée soit nécessaire pour atteindre des titres plus élevés (Frenzel et al., 2013). Ainsi, les rendements obtenus pour scFv_{CD19} et scFv_{PD-L1} (35–44 mg) se situent dans une fourchette comparable voire supérieure à celle souvent rapportée dans la littérature pour des scFv produits en CHO ou en systèmes transitoires non optimisés, tandis que le rendement de scFv_{CD3} (6,6 mg) et de scFv_{PD-1} (0,14 mg) est plus faible mais reste compatible avec la variabilité des taux d'expression observée selon la séquence, la solubilité et l'efficacité de sécrétion des fragments. Par ailleurs, les anticorps bispécifiques de type BiTE, tels que le blinatumomab, sont connus pour présenter des rendements particulièrement bas en CHO comparés à des formats plus simples ou à d'autres systèmes d'expression : une étude rapporte qu'en CHO classique le titre de production de blinatumomab est d'environ 0,5 mg par litre, ce qui illustre bien la difficulté de produire ce type de molécule sans optimisation de procédé (Kim et al., 2025).

Tableau 3.2 Quantités finales obtenues de chaque produit.

Produits	Quantité (mg)
scFv _{CD3}	6,6
scFv _{CD19}	35
blinatumomab	16
scFv _{PD1}	0,14
scFv _{PD-L1}	44

3.2 Production et purification des hybrides ADN–scFv, en vue de préparer des Tsab

3.2.1 Formation des hybrides ADN-scFv

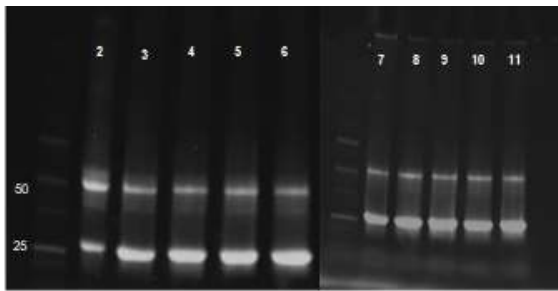
3.2.1.1 Réduction des scFv

Après validation de la production des scFv nécessaires à la conception des TsAb, nous avons entamé la deuxième étape qui est la formation des hybrides par conjugaison des scFv à l'ADN. Cette étape fondamentale commence tout d'abord par la réduction des scFv. Les gels SDS-PAGE non réducteurs des scFv produits ont systématiquement révélé des dimères (~50 kDa), mettant en évidence la nécessité d'une réduction préalable pour rompre les ponts disulfures et libérer les thiols essentiels aux étapes de conjugaison.

La poursuite des expériences avec la protéine scFv_{PD1} n'a pas été envisagée, en raison de contraintes de temps et de la quantité limitée de protéine obtenue lors de sa production/purification initiale. Compte tenu du faible rendement, il existait un risque élevé de perte de protéine au cours des étapes successives d'optimisation de la réduction des ponts disulfure et de conjugaison. Par conséquent, afin de garantir la réussite et la reproductibilité des expériences, les travaux se sont concentrés sur les protéines scFv_{CD3}, scFv_{CD19}, et scFv_{PD-L1} pour lesquelles une quantité suffisante de matériel était disponible pour effectuer les manipulations nécessaires.

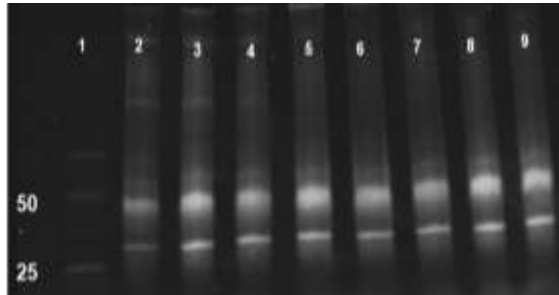
L'utilisation du DTT a été choisie comme première approche pour réduire les différents scFv. L'analyse des gels dénaturants mais non-réducteurs a montré que, pour les scFv_{CD19} et les scFv_{CD3}, les mêmes bandes sont apparues dans tous les puits (Figure 3.5(a) et 3.5 (b)), y compris à la concentration maximale de DTT testée (45 mM), reproduisant ainsi le profil observé dans le contrôle sans DTT. En revanche, pour le scFv_{PD-L1}, une diminution de l'intensité de la bande dimère (~50 kDa,) (Figure 3.5 (c) ; puits 7) a été observée, indiquant que la réduction à 45 mM de DTT était efficace pour ce fragment.

(a)



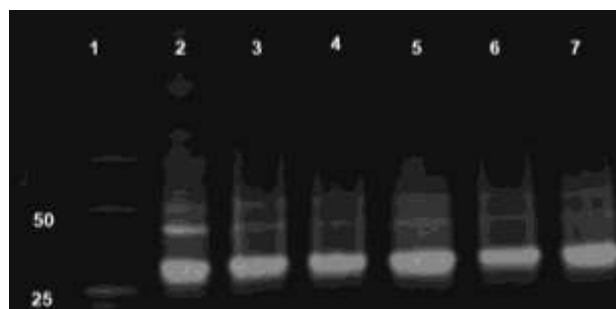
Réduction de la protéine
scFv_{CD19} avec le DTT

(b)



Réduction de la protéine
scFv_{CD3} avec le DTT

(c)



Réduction de la protéine
scFv_{PD-L1} avec le DTT

Figure 3.5 Résultats de l'électrophorèse sur gel dénaturant de la réduction des scFv avec le DTT.

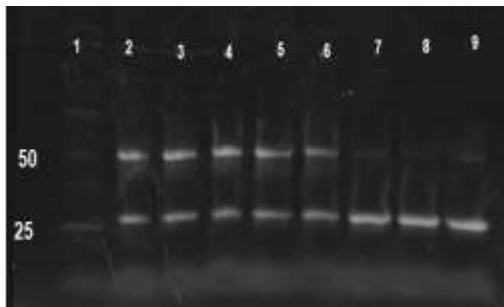
(a) Résultats de l'électrophorèse sur gel dénaturant de la réduction de scFv_{CD19}. Puit1 : Marqueur de taille (kDa), puit 2 : scFv_{CD19} non réduit (contrôle négatif), puit 3 : scFv_{CD19} réduit avec 5 mM de DTT, puit4 : scFv_{CD19} réduit avec 10 mM, puit5 : scFv_{CD19} réduit avec 15 mM, puit6 : scFv_{CD19} réduit avec 20 mM, puit7 : scFv_{CD19} réduit avec 25 mM, puit8 : scFv_{CD19} réduit avec 30 mM, puit9 : scFv_{CD19} réduit avec 35 mM, puit 10 : scFv_{CD19} réduit avec 40 mM et puit 11 : scFv_{CD19} réduit avec 45 mM

(b) Résultats de l'électrophorèse sur gel dénaturant de la réduction de scFv_{CD3}. Puit 1 : Marqueur de taille (kDa), puit 2 : scFv_{CD3} non réduit (contrôle négatif), puit 3 : scFv_{CD3} réduit avec 5 mM de DTT, puit 4 : scFv_{CD3} réduit avec 10 mM, puit5 : scFv_{CD3} réduit avec 20 mM, puit 6 : scFv_{CD3} réduit avec 30 mM, puit 7 : scFv_{CD3} réduit avec 35 mM, puit 8 : scFv_{CD3} réduit avec 40 mM, puit 9 : scFv_{CD3} réduit avec 45 mM.

(c) Résultats de l'électrophorèse sur gel dénaturant de la réduction de scFv_{PD-L1}. Puit 1 : Marqueur de taille (kDa), puit 2 : scFv_{PD-L1} non réduit (contrôle négatif), puit 3 : scFv_{PD-L1} réduit avec 10 mM de DTT, puit 4 : scFv_{PD-L1} réduit avec 20 mM, puit5 : scFv_{PD-L1} réduit avec 30 mM, puit 6 : scFv_{PD-L1} réduit avec 40 mM, puit 7 : scFv_{PD-L1} réduit avec 45 mM.

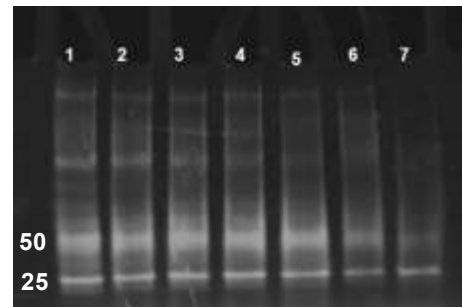
Ces observations suggèrent que, bien que DTT permette une réduction satisfaisante pour le scFv_{PD-L1}, l'efficacité de réduction paraît varier selon le fragment étudié. Ces résultats ont mis en valeur la mise en place d'une deuxième approche de réduction qui est l'utilisation du TCEP en solution, visant à améliorer la libération des groupements thiols libres, indispensables pour les étapes de conjugaison ultérieures, et à standardiser l'efficacité de réduction pour l'ensemble des scFv.

(a)



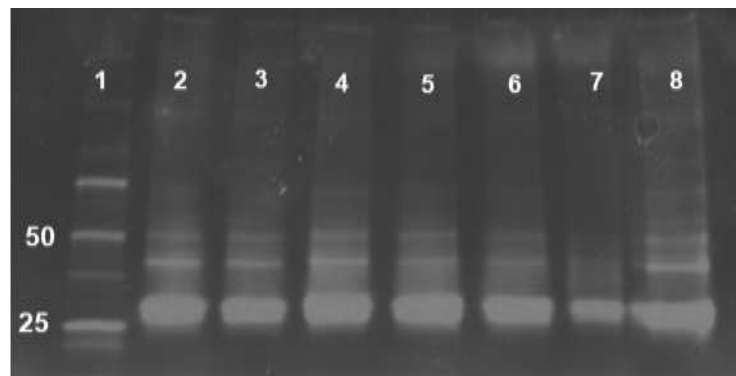
Réduction de la protéine scFv_{CD19}
par avec TCEP en solution

(b)



Réduction de la protéine scFv_{CD3}
par avec TCEP en solution

(c)



Réduction de la protéine scFv_{PD-L1} par
avec TCEP en solution

Figure 3.6 Résultats de l'électrophorèse sur gel dénaturant de la réduction des scFv avec TCEP en solution.

(a) Résultats de l'électrophorèse sur gel dénaturant de la réduction de scFv_{CD19}. Puit 1 : Marqueur de taille (kDa), puit 2 : scFv_{CD19} non réduit (contrôle négatif), puit 3 : scFv_{CD19} réduit avec 25 x de TCEP en solution, puit 4 : scFv_{CD19} réduit avec 50 x de TCEP en solution, puit 5 : scFv_{CD19} réduit 100 x de TCEP en solution, puit 6 : scFv_{CD19} réduit avec 200 x de TCEP en solution, puit 7 : scFv_{CD19} réduit avec 400 x de TCEP en solution, puit 8 : scFv_{CD19} réduit avec 600 x de TCEP en solution, puit 9 : scFv_{CD19} réduit avec 800 x de TCEP en solution.

(b) Résultats de l'électrophorèse sur gel dénaturant de la réduction de scFv_{CD3}. Puit 1 : scFv_{CD3} non réduit (contrôle négatif), puit 2 : scFv_{CD3} réduit avec 25 x de TCEP en solution, puit 3 : scFv_{CD3} réduit avec 50 x de TCEP en solution, puit 4 : scFv_{CD3} réduit 100 x de TCEP en solution, puit 5 : scFv_{CD3} réduit avec 200 x de TCEP en solution, puit 6 : scFv_{CD3} réduit avec 400 x de TCEP en solution, puit 7 : scFv_{CD3} réduit avec 800 x de TCEP en solution.

(c) Résultats de l'électrophorèse sur gel dénaturant de la réduction de scFv_{PD-L1}. Puit 1 : Marqueur de taille (kDa), puit 2 : scFv_{PD-L1} non réduit (contrôle négatif), puit 3 : scFv_{PD-L1} réduit avec 25 x de TCEP en solution, puit 4 : scFv_{PD-L1} réduit avec 50 x de TCEP en solution, puit 5 : scFv_{PD-L1} réduit 100 x de TCEP en solution, puit 6 : scFv_{PD-L1} réduit avec 200 x de TCEP en solution, puit 7 : scFv_{PD-L1} réduit avec 400 x de TCEP en solution, puit 8 : scFv_{PD-L1} réduit avec 800 x de TCEP en solution.

L'analyse des gels dénaturants mais non-réducteurs révèle que l'efficacité de la réduction par TCEP en solution dépend fortement du type de scFv. Pour le scFv_{CD19}, la disparition complète de la bande dimère (~50 kDa) est observée à partir de 400× équivalents de TCEP (puits 7, figure 3.6a). En revanche, pour le scFv_{CD3}, la bande dimère persiste même à 800× équivalents de TCEP (puits 7, figure 3.6b), et le scFv_{PD-L1} présente un profil similaire. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la concentration de TCEP ne garantit pas une réduction uniforme pour tous les scFv et pourrait altérer la conformation et la fonctionnalité des protéines en cas d'excès.

Pour cette raison, une approche alternative basée sur le protocole ThermoFisher a été adoptée pour le troisième essai, visant à optimiser l'efficacité de réduction tout en préservant l'intégrité structurale des scFv. Tous les scFv ont été réduits en utilisant un volume de TCEP immobilisé équivalent à deux fois celui de l'échantillon, comme décrit dans le protocole fourni par ThermoFisher. Les résultats obtenus (Figure 3.7) montrent l'efficacité de la réduction des scFv dimères en monomères. Les puits 2, 5 et 8 contiennent respectivement les scFv_{CD3}, scFv_{CD19} et scFv_{PD-L1} non réduits, tandis que les puits 3, 6 et 9 contiennent les mêmes scFv après réduction avec un volume de TCEP immobilisé équivalent à 2× celui des protéines. Le gel montre une réduction de l'intensité du dimère indiquant que la réduction à l'aide de TCEP immobilisé a dissocié une partie des dimères en monomères.

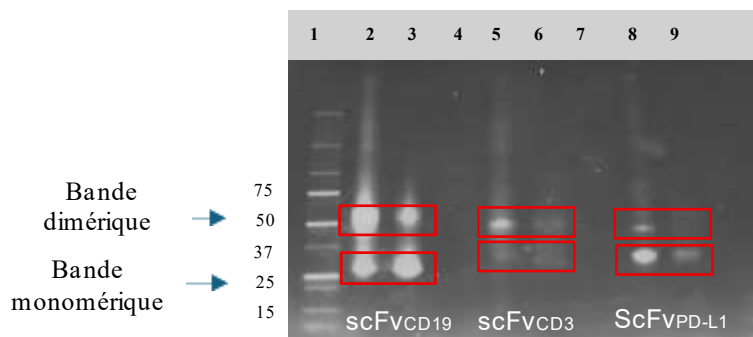


Figure 3.7 Résultat de l'électrophorèse SDS-PAGE de scFv réduit par TCEP immobilisé.

Puit 1 : Marqueur de taille, Puit 2 : scFv_{CD19} non réduit, Puit 3 : scFv_{CD19} réduit, Puit 5 : scFv_{CD3} non réduit, Puit 6 : scFv_{CD3} réduit, Puit 7 : scFv_{PD-L1} non réduit, Puit 8 : scFv_{PD-L1} réduit.

Les résultats de la réduction des scFv dimères en monomères montrent que le TCEP immobilisé s'est révélé efficace comme en témoignent les profils électrophorétiques : les bandes caractéristiques des dimères (~50 kDa) ont disparu dans les puits contenant les scFv réduits (3, 6 et 9), contrairement aux puits contenant les scFv non réduits (2, 5 et 8). Cette observation confirme que l'utilisation d'un volume de TCEP immobilisé équivalent à 2× celui des protéines permet une réduction complète des ponts disulfures. En effet, cette réaction de réduction des scFv est une étape critique et sensible, car la présence de dimères peut limiter la réactivité des

fragments pour la formation des hybrides ADN–scFv. Nos résultats soulignent que l'optimisation de cette étape est essentielle pour garantir que les scFv soient dans un état monomérique, réactif et homogène, condition indispensable pour maximiser l'efficacité de la conjugaison.

Bien que le DTT et le TCEP en solution soient des agents réducteurs couramment utilisés, leurs applications dans notre système ont montré plusieurs limitations. L'utilisation du DTT impose une élimination complète du réducteur avant la conjugaison thiol–maléimide, car sa présence résiduelle peut interférer avec la réaction. Les étapes de purification nécessaires ont entraîné des pertes de scFv et une diminution de la concentration finale, limitant ainsi l'efficacité globale du processus.

Concernant le TCEP en solution, une réduction excessive ou mal contrôlée a été observée selon les conditions expérimentales, ce qui pouvait affecter la stabilité du scFv et compromettre la conjugaison ultérieure. De plus, le choix du tampon s'est révélé déterminant : le PBS s'est montré moins adapté, pouvant désactiver le TCEP et offrir un environnement moins favorable à une réduction contrôlée. À l'inverse, le tampon TAE a permis d'améliorer la reproductibilité et l'efficacité des réactions, ce qui en fait un choix plus approprié pour les étapes de réduction et de conjugaison dans ce travail.

À noter, les scFv présentaient initialement des agrégats visibles en solution. La présence de ces agrégats a entraîné des pertes importantes de protéine lors de l'élimination des agents réducteurs (DTT ou TCEP en solution). En effet, lors des étapes de purification et de concentration nécessaires pour retirer ces réducteurs, une partie des agrégats a été éliminée ou retenue par les dispositifs de filtration, réduisant ainsi la quantité finale de scFv récupérée.

Ces observations sont en accord avec la littérature sur la chimie des protéines et la réduction des ponts disulfures, qui montrent que des conditions contrôlées de réduction sont indispensables pour obtenir des protéines monomériques stables et fonctionnelles avant toute réaction de modification ou de conjugaison. L'efficacité de cette étape simplifie également les étapes expérimentales suivantes, en réduisant le risque de formation de produits hétérogènes et en facilitant la production d'hybrides ADN–scFv de haute qualité. (Chauhan et al., 2024)

3.2.1.2 La déprotection des ADN–maléimide (S22, S23 et S24) et conjugaison avec scFv

Après avoir optimisé les conditions de réduction des scFv, l'étape suivante s'intéresse à la conjugaison chimique entre les scFv réduits et les différents brins d'ADN. Dans ce contexte, plusieurs réactions chimiques sont aujourd'hui utilisées dans la recherche scientifique comme des méthodes de marquage de biomolécules ou également comme des approches chimiques pour former de bio-conjugués, notamment la réaction thiol-maléimide utilisée essentiellement

pour coupler une protéine avec un fragment d'ADN. Cette méthode est très recherchée dans le domaine de développement des molécules biopharmaceutiques et particulièrement dans la synthèse des anticorps multi-spécifiques (Ornes, 2013). Cette réaction se réalise selon le mécanisme d'addition de type Michael (Figure 3.8) entre un groupement thiol (-SH) hautement nucléophile et un groupement du maléimide électrophile formé d'une double liaison (C=C).

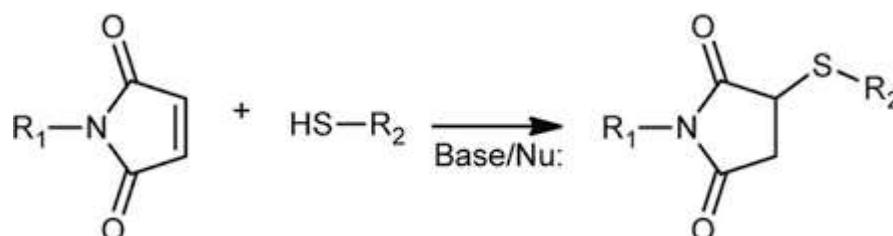


Figure 3.8 Le mécanisme d'addition de type Michael.

En milieu légèrement basique, le groupement thiol provenant de l'acide aminé cystéine perd un proton pour former un anion thiolate ($-S^-$) très nucléophile capable d'attaquer le carbone β de la double liaison du maléimide et par conséquent la formation d'une liaison thioéther covalente et stable (McLaughlin, 2025). Dans cette étude, les maléimides fixés sur chaque brin d'ADN (Tableau 3.3) sont protégés par le diène 2,5-diméthylfurane via une réaction de cycloaddition Diels-Alder impliquant la double liaison C=C du maléimide hautement réactive (diénophile) et les électrons du diène afin d'assurer sa préservation.

Tableau 3.3 Séquences des ADN utilisées pour la formation des hybrides.

ADN	Séquences de 5'-3'	scFv correspondant
S22 (24 bases)	[Mal]TTTTCCCTCTTACTA	ScFV _{PD-L1}
S23 (24 bases)	[Mal]TTTTGTTGGAGTGTA	scFV _{CD19}
S24 (24 bases)	[Mal]TTTTCACACGGTCTC	scFV _{CD3}

À l'issue, il est indispensable de procéder à la levée de cette protection afin de libérer le groupement maléimide nécessaire à la conjugaison (Figure 3.9). Cette déprotection s'effectue par une réaction chimique de rétro-Diels-Alder, permettant une rupture thermique de la liaison C-C formée lors de la cycloaddition Diels-Alder entre le diène 2,5-diméthylfurane et le groupement maléimide.

Ceci, provoque la libération du diène 2,5-diméthylfurane et le rétablissement simultanément le groupement électrophile actif sur l'ADN.

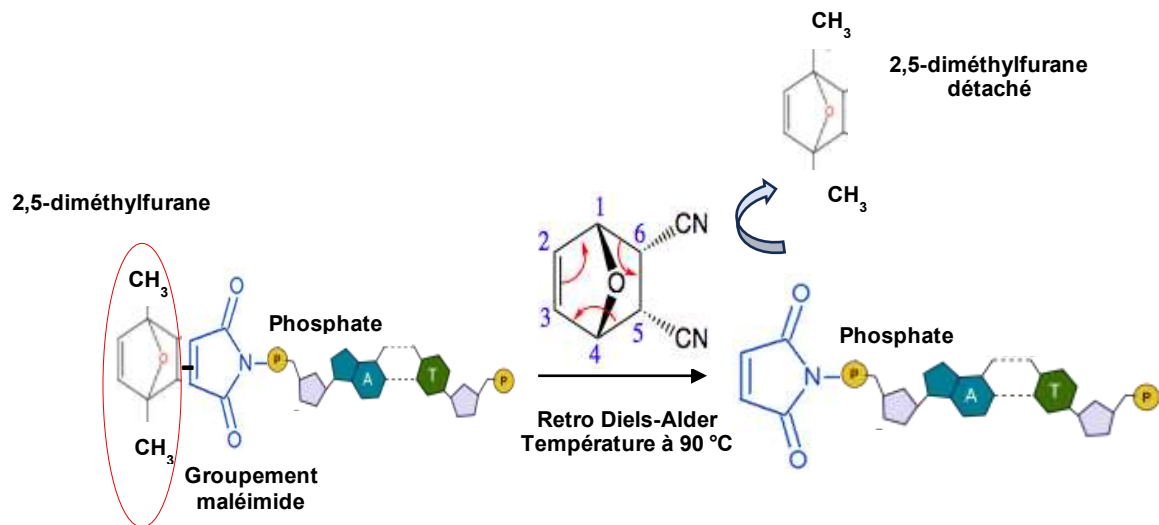


Figure 3.9 Réaction de Retro Diels-Alder responsable à la déprotection de l'ADN.

Dans cette étude, deux techniques de déprotection ont été testées afin de maximiser le rendement de la réaction et obtenir une conjugaison complète. La première méthode utilisée a été la méthode de déprotection par irradiation micro-ondes réalisée dans un mélange 1:1 H₂O/MeOH à 90 °C pendant 90 minutes et suivie de l'ajout du scFv (réduit par le TCEP immobilisé) dans un ratio 1:1, conformément aux conditions expérimentales précédemment décrites (Messaoudi et al., 2024). L'analyse sur gel a été effectuée pour évaluer la formation de l'hybride ADN–scFv. Le résultat de l'électrophorèse sur gel natif obtenu (Figure 3.10) montre que le profil de bandes obtenu pour le contrôle négatif (ADN seul ; puit 3) est similaire à celui de l'échantillon de réaction (mélange réactionnel de l'ADN déprotégé avec le scFv réduit ; puit 5) avec l'absence d'une bande de taille plus importante caractéristique à l'hybride attendu. Ces résultats montrent que cette méthode n'a pas permis d'obtenir le produit souhaité dans les conditions expérimentales réalisées.

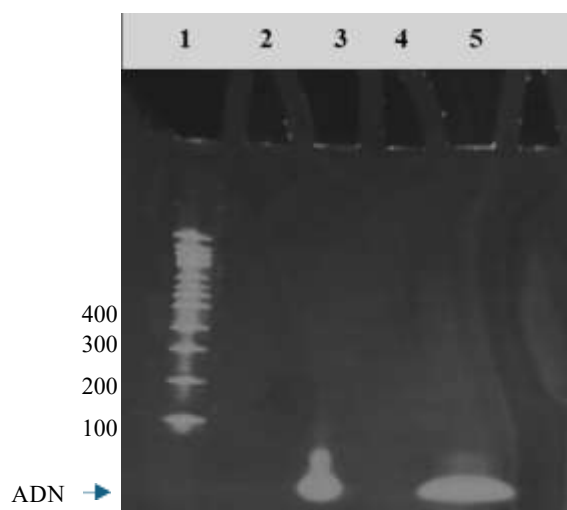


Figure 3.10 Résultat de l'électrophorèse sur gel natif ; Puit 1 : Marqueur de taille (pb), Puit 2 : ADN libre (contrôle négatif), Puit 5 : Échantillon du milieu réactionnel

Cet échec peut s'expliquer par plusieurs facteurs tels qu' une dégradation partielle de l'ADN sous irradiation (Zhao & Shen, 2016), un échauffement inhomogène ou une réactivation insuffisante du maléimide, malgré les conditions décrites dans le protocole de (Genelink) ou par des facteurs liés à l'instrumentation qui incluent la répartition de l'énergie micro-ondes inégale, entraînant un chauffage non uniforme des échantillons et réduisant ainsi l'efficacité de la réaction rétro-Diels–Alder.

Un autre essai supplémentaire a été réalisé pour la déprotection de l'ADN par irradiation micro-ondes, en modifiant les paramètres expérimentaux, avec une augmentation de la température à 95 °C et une durée d'incubation prolongée à 2 h. Toutefois, le même profil électrophorétique a été observé, caractérisé par la présence d'une seule bande, correspondant à celle de l'ADN non conjugué. Ces résultats indiquent que l'augmentation de la température et du temps d'incubation n'a pas permis d'améliorer l'efficacité de la déprotection dans ces conditions.

La seconde méthode testée pour déprotéger l'ADN reposait sur le chauffage dans le toluène anhydre à 90 °C pendant quatre heures comme décrit dans le protocole de Genelink. Dans un premier temps, un ratio équimolaire 1:1 entre l'ADN et le scFv a été testé afin de maximiser le rendement et de favoriser la formation complète de l'hybride, dans le but d'obtenir jusqu'à 100 % de produit sans recourir à une étape de purification supplémentaire. Les résultats de l'électrophorèse sur gel natif (Figure 3.11) montrent un profil similaire à celui obtenu lors de l'expérience précédente avec la méthode de déprotection par irradiation micro-ondes. En effet, dans le puit 5, correspondant au milieu réactionnel, aucune bande de taille supérieure à celle

de l'ADN seul (contrôle négatif, puits 3) n'a été détectée. Ces observations ont mis en valeur la nécessité d'optimiser les conditions de réaction pour favoriser la formation de l'hybride.

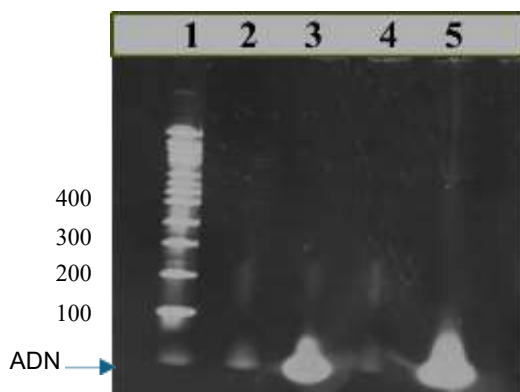


Figure 3.11 Résultats de l'électrophorèse sur gel natif.

Puit 1 : Marqueur de taille, Puit 3 : ADN seul, Puit 5 : Puit 5 : échantillon de la réaction (ADN déprotégé + scFv réduit), montrant uniquement la bande de l'ADN libre, sans apparition de la bande retardée correspondant à l'hybride ADN-scFv

Lors du troisième essai, les conditions expérimentales ont été modifiées afin de favoriser la formation de l'hybride : le tampon PBS a été remplacé par le tampon TAE et le ratio scFv/ADN ajusté à 1:4. Après réduction des scFv avec le TCEP immobilisé, 2 nanomoles de chaque scFv ont été ajoutés à 8 nanomoles d'ADN déprotégé par chauffage dans le toluène anhydre, obtenant une concentration finale d'ADN comprise entre 10 et 20 μM . Après l'incubation de la réaction durant 24 h sous une agitation douce, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide native (4–15 %) ainsi que sur gel de polyacrylamide dénaturante (SDS-PAGE) ont été réalisées pour vérifier la conjugaison et la formation des hybrides. En analysant les résultats du gel natif de la première réaction $\text{ADN}_{\text{S24}}\text{-scFv}_{\text{CD3}}$ (Figure 3.10), on constate que le puit 2, contenant 0,03 nanomoles d' ADN_{S24} utilisé comme contrôle négatif, présente une seule bande correspondant à l'ADN libre, toutefois le puit 5 incluant un total de 0,03 nanomoles d'ADN du mélange réactionnel révèle deux bandes avec des niveaux de migration différents. La migration électrophorétique met en évidence une bande dont la mobilité est similaire à celle observée dans le puits 2, correspondant à l'ADN S_{24} libre non conjugué. Une seconde bande, située dans la partie supérieure du gel, présente une mobilité réduite, traduisant une augmentation du poids moléculaire et une migration plus lente à travers la matrice du gel. Cette bande est celle du bioconjugué $\text{ADN}_{\text{S24}}\text{-scFv}_{\text{CD3}}$ qui présente environ 16,5% d'intensité par rapport à la bande de l'ADN résiduel en bas du gel, déterminé à l'aide du logiciel ImageJ (Figure 3.12). Ce résultat est logique en raison du ratio ADN / ScFv 4 / 1 utilisé dans le mélange réactionnel correspondant à un taux de conversion de 65% pour la protéine.

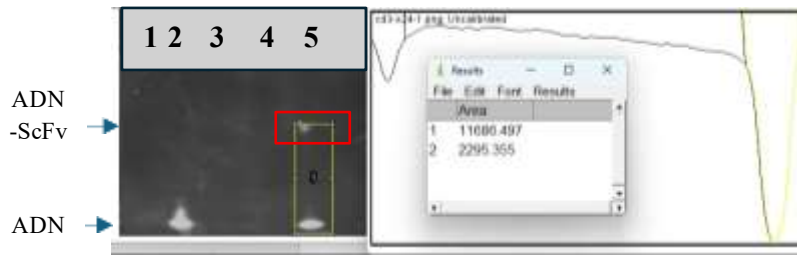


Figure 3.12 Résultat d'électrophorèse sur gel natif et pourcentage de bande détectée.

Cette conjugaison S_{24} -scFv_{CD3} a été confirmée par l'électrophorèse sur gel du polyacrylamide dénaturante (SDS-PAGE) où un échantillon du produit de la conjugaison a été migré (puit 7) avec la protéine scFv_{CD3} seule (puit 5) et les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 3.13. Le gel obtenu montre que le puit 5, contenant 0,09 nanomoles de scFv_{CD3}, révèle deux bandes, une en bas du gel de taille environ ~27 kDa correspondant au scFv monomérique résiduel et une bande supérieure de taille environ 50 kDa présente la forme dimérique de la protéine scFv_{CD3}. En plus de ces deux bandes majeures, le puit 5 du milieu réactionnel révèle une bande supplémentaire d'une taille intermédiaire d'environ 37 kDa correspondant au conjugué ADN_{S24}-scFv_{CD3} (35 kDa = 27 kDa pour le scFv + 8 kDa pour l'ADN).

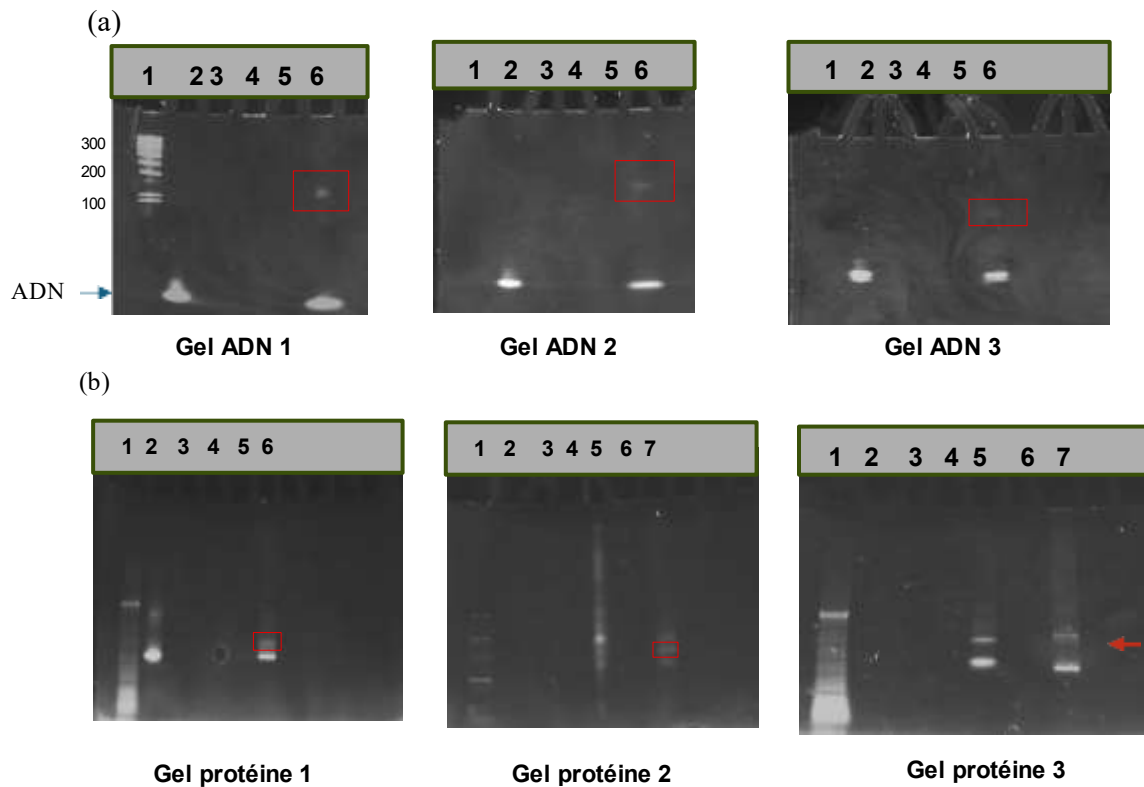


Figure 3.13 Résultats de l'électrophorèse. (a) Analyse électrophorèse sur gel natif des hybrides produits. (b) Analyse électrophorèse sur gel dénaturant des hybrides produits

(a) Analyse électrophorèse sur gel natif des hybrides produits : Gel ADN 1 : Conjugaison entre scFv_{CD19} et ADN_{S24} ; Puit 1 : Marqueur de taille (kDa), Puit 2 : ADN_{S24} seul (contrôle négatif), Puit 4 : scFv_{CD19} seul, Puit 6 : mélange réactionnel entre ADN_{S24} et scFv_{CD19} avec un ratio 4 : 1. Gel ADN 2 : Conjugaison entre scFv_{CD3} et ADN_{S23} ; Puit 2 : ADN_{S23} seul (contrôle négatif), Puit 4 : scFv_{CD3} seul, Puit 6 : mélange réactionnel entre ADN_{S23} et scFv_{CD3} avec un ratio 4 / 1. Gel ADN 3 : Conjugaison entre scFv_{PD-L1} et ADN_{S22} ; Puit 2 : ADN_{S22} seul (contrôle négatif), Puit 4 : scFv_{PD-L1} seul, Puit 6 : mélange réactionnel entre ADN_{S22} et scFv_{PD-L1} avec un ratio 4 : 1.

(b) Analyse électrophorèse sur gel dénaturant SDS-PAGE des hybrides produits. Gel protéine 1: Conjugaison entre CD19 et S24 : Puit 1: Marqueur de taille, Puit 2: CD19 réduit avec TCEP (contrôle négatif) immobilisé, Puit 4: S24 seul, puit 6: mélange réactionnel entre S24 et CD19 avec un ration 4 :1. Gel protéine 2: Conjugaison entre CD3 et S23: Puit 1: Marqueur de taille, Puit 2: S23 seul, Puit 5: CD19 réduit avec TCEP (contrôle négatif) immobilisé, puit 7: mélange réactionnel entre S23 et CD3 avec un ration 4 : 1. Gel protéine 3: Conjugaison entre PD-L1 et S22: Puit 1: Marqueur de taille, Puit 2: S22 seul, Puit 5: PD-L1 réduit avec TCEP (contrôle négatif) immobilisé, puit 7: mélange réactionnel entre S22 et PD-L1 avec un ration 4 :1.

Le troisième essai a montré que l'ajustement des conditions expérimentales en remplaçant le tampon PBS par le tampon TAE et le passage à un ratio scFv/ADN de 1 / 4 permettait la formation effective de l'hybride ADN-scFv. L'apparition d'une bande caractéristique sur gel, absente dans les essais précédents, confirme l'efficacité de ces modifications. La conjugaison ADN-scFv est une réaction délicate et sensible, dépendante de nombreux paramètres tels que la stœchiométrie, le tampon, la solubilité et la réactivité des composants. Nos résultats soulignent que l'optimisation des conditions expérimentales est donc indispensable pour obtenir un produit homogène et un rendement élevé.

Ces résultats obtenus confirment l'efficacité de la méthode de protection basée sur l'usage du toluène comme un solvant pour éliminer le groupement 2,5-diméthylfurane introduit à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide. Ce solvant organique apolaire favorise la rupture des liaisons cycloadduites formés lors de la réaction de Diels-Alder tout en évitant des réactions chimiques secondaires grâce à sa faible réactivité chimique (Stevenson & De Bo, 2017). Il est important de noter aussi le rôle de la haute température arrivée jusqu'à 90 °C comme une source d'énergie thermique utile pour surmonter la barrière énergétique de la réaction rétro-Diels-Alder et la libération de groupement maléimide. En conséquence, ces conditions utilisées ont bien abouti à une déprotection efficace et contrôlée de l'ADN nécessaire pour la réaction de conjugaison entre le maléimide et thiol porté par chaque scFv et la formation des différents hybrides d'intérêt. Cela met en évidence l'efficacité de la méthode chimique thiol-maléimide utilisée comme une approche sûre pour la production des bio-conjugués destinés pour des utilités thérapeutiques comme déjà montré par les travaux de Tapia (Tapia et al., 2024). En mesurant l'intensité de chaque bande du conjugué formé, on constate qu'environ 14% d'ADN a été converti en hybride ADN-scFv alors que le reste se trouve sous forme d'ADN non conjugué (Figure 3.13). Ce rendement obtenu reste faible comparant à celui rapporté par Tapia (Tapia et al., 2024) qui ont pu avoir un rendement allant jusqu'à 93% en quinze minutes. Cette différence pourrait être expliquée par le placement du résidu de la cystéine sur la séquence peptidique des scFv qui influence directement l'accessibilité du thiol et par conséquent le taux du succès de la conjugaison comme montré par le travail de Hervé-Aubert (Hervé-Aubert et al., 2018). En fait, leur étude a montré qu'une cystéine placée au début de la chaîne d'acides aminés (extrémité N-terminale) permet une meilleure exposition du thiol, favorisant un couplage ADN-scFv plus efficace et un taux de conversion deux fois supérieur à d'autres positions de cystéine. Dans notre étude, tous les scFv possèdent une cystéine à la fin de la séquence peptidique en position C-terminal, ce qui pourrait traduire le rendement inférieur observé (~14 %), comparé aux 93 % rapportés par Tapia (Tapia et al., 2024). Ces évidences expérimentales mettent l'accent sur l'importance du rôle de la position de la cystéine pour optimiser l'efficacité de la réaction de conjugaison ADN-scFv.

D'autre part, le faible rendement de la conjugaison entre l'ADN et le scFv observé pourrait être également lié à la réaction incomplète de la réduction de pont disulfure ce qui diminue significativement le nombre de thiols libres disponibles pour être engagés à la liaison avec le maléimide.

Même si le réactif de conjugaison est utilisé en excès, le nombre de sites réellement accessibles pourrait être insuffisant, entraînant un rendement de conjugaison sous-optimal. Cette hypothèse est cohérente avec le constat de Kirley et al. (Kirley et al., 2016), qui soulignent dans leur étude que la réduction des ponts disulfures dans les fragments Fab n'est souvent pas quantitative, ce qui entraîne une hétérogénéité des sites de conjugaison et un rendement sous-optimal.

3.2.2 Purification des hybrides formés

Une fois les hybrides d'intérêt produits (ADN_{S24} -scFv_{CD3} ; ADN_{S23} -scFv_{CD19} et ADN_{S22} -scFv_{PD-L1}), l'étape subséquente consiste à les purifier en utilisant la technique de la chromatographie échangeuse de cations. Cette méthode repose sur la séparation des différentes molécules contenues dans un échantillon se en basant sur leur charge globale. En effet, la chromatographie échangeuse de cation est un type de chromatographie échangeuse d'ions qui utilise une phase immobile sous forme de petites billes (résine) sur laquelle sont attachés des groupes fonctionnels chargés négativement et ainsi attirant toutes molécules ayant une charge positive. (Imiolek et al., 2025). L'élution de protéines attachées à la colonne se base sur le principe de la compétition entre des ions présents en solution ayant la même charge que les protéines et les protéines à éluer pour gagner un site de liaison sur la matrice échangeuse d'ions. En fait, l'élution se fait par un gradient d'élution linéaire allant d'une faible concentration en sel à une forte concentration ce qui aide à libérer progressivement les protéines selon leur affinité électrostatique croissante pour la colonne. À faible concentration en ion concurrent, seules les protéines faiblement attachées sont éluées dans les premières fractions suivi du reste de protéines ayant des nombres de liaisons ioniques important et une interaction plus forte avec la colonne cèdent leur site aux ions et seront éluées par la suite dans les dernières fractions (Janson, 2011).

En analysant le chromatogramme 1 obtenu après l'application de l'ADN seul sur la colonne (Figure 3.14 a), on observe l'apparition d'un pic dans les premières fractions (Fractions 1, 2, 3 et 4) qui s'explique par l'exclusion de l'ADN de la colonne en raison de sa charge négative qui lui empêche de s'y attacher. Sur le chromatogramme 2 obtenu après l'application du scFv seul (Figure 3.14 b), un pic décalé est obtenu par rapport au pic de l'ADN seul observé sur le chromatogramme 1. Ceci se traduit par la plus forte affinité des protéines vis à vis de la colonne en raison de charges positives sur leur surface. Un temps d'élution plus long et des

concentrations en $MgCl_2$ plus importantes sont nécessaires pour éluer le scFv par rapport à l'ADN. Les mêmes résultats sont observés pour le mélange physique d'ADN et de scFv (sans conjugaison ; Figure 3.14 c). Deux différents pics décalés dans le temps sont détectés, le premier pic obtenu correspond au pic de l'ADN libre (Fractions 1, 2, 3 et 4) et le deuxième pic correspond au pic du scFv monomère monomérique (Fractions 26, 27, 28, 29 et 30).

À la suite de la purification de l'hybride ADN_{S24} -scFv $_{CD3}$, le chromatogramme obtenu (Figure 3.14 d) montre un profil d'élution comparable à celui obtenu à la suite de la purification de l'échantillon de contrôle contenant un mélange d'ADN et scFv sans conjugaison. En effet, les deux pics caractéristiques de l'ADN libre (pic 1) et de protéine monomérique (pic 2) sont présents dans les fractions d'élution T2- T8 et T26-T31 respectivement, avec l'apparition d'un nouveau pic supplémentaire dans les fractions T9-T12 situé directement après le pic de l'ADN libre et avant le pic de protéines détachées. Ce pic correspond au pic de l'hybride ADN_{S24} -scFv $_{CD3}$ purifié dont une partie de la charge nette positive de la protéine scFv $_{CD3}$ est neutralisée à la suite de sa conjugaison avec l' ADN_{S24} chargé négativement. Cette conjugaison réduit la charge positive de scFv $_{CD3}$ et par conséquent la diminution de l'affinité vis-à-vis de la colonne (chargée négativement) et l'élution rapide comparativement aux protéines libres qui nécessitent des concentrations en $MgCl_2$ plus importantes et un temps d'élution plus long pour être éluées.

Toutes les fractions collectées et concentrées et correspondant aux trois éléments (ADN libre, hybride ADN-scFv et les protéines non conjuguées) ont été analysées sur gel d'électrophorèse natif afin de vérifier leur purification et les identifier. En analysant le résultat du gel (Figure 3.15), on constate la présence d'une seule bande en bas du gel dans le puit 1 chargé par les fractions d'ADN libre collectées correspond à la même bande observée pour l'ADN non conjugué (ADN protégé). Dans le puit 2 chargé avec les fractions des hybrides collectées, le gel révèle une seule bande en haut du gel qui présente la bande de l'ADN couplé au scFv purifié.

Cependant le puit 3 contenant les fractions des protéines non-conjuguées ne révèle aucune bande d'ADN. Ces résultats confirment et valident très bien l'efficacité de la purification des hybrides par la technique de la chromatographie échangeuse de cations.

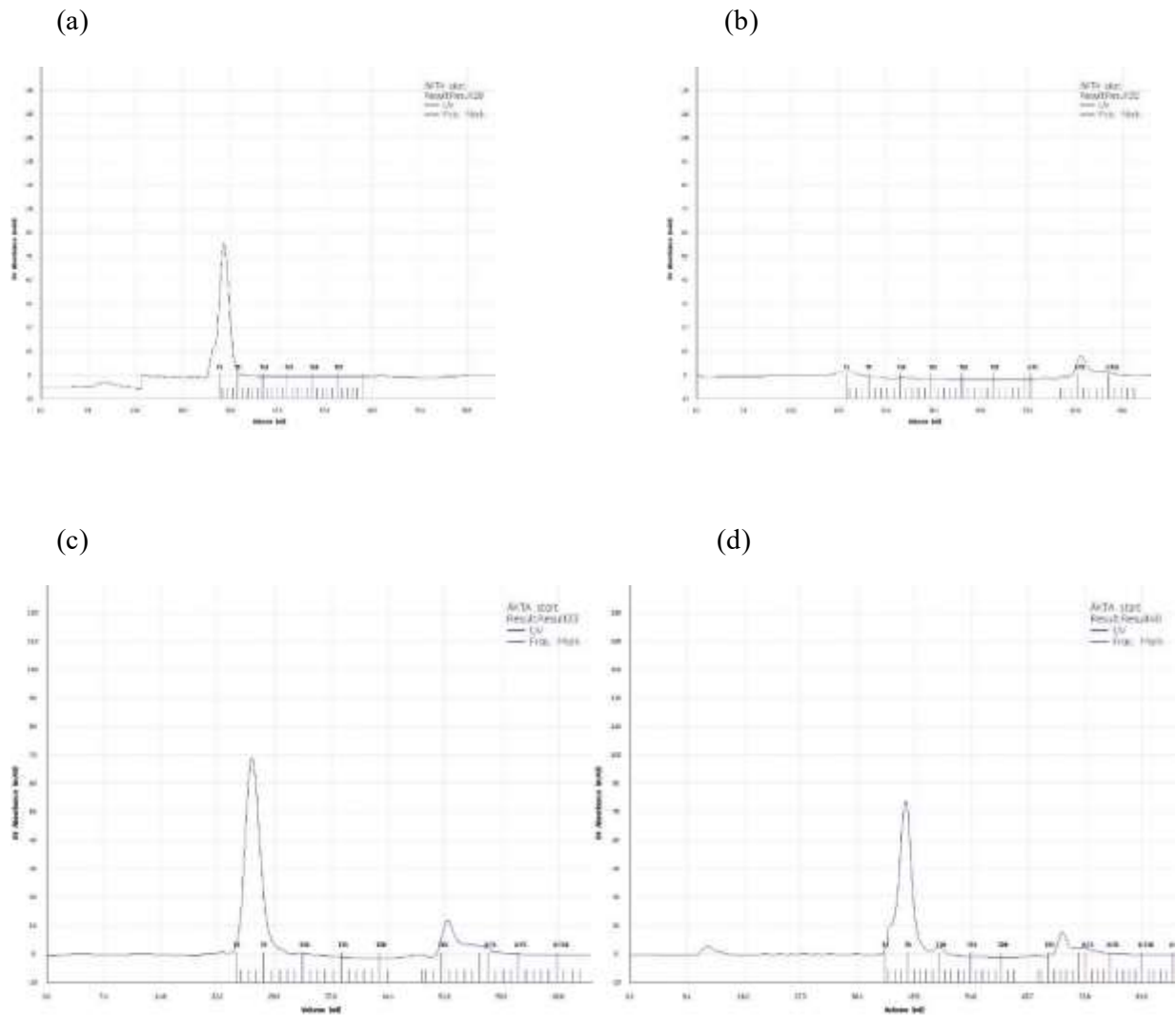


Figure 3.14 Résultats de la purification des contrôles.

(a) Chromatogramme de l'ADN_{S24} seul. (b) Chromatogramme de scFv_{CD3} seul. (c) Chromatogramme du mélange physique ADN_{S24}-scFv_{CD3}. (d) Chromatogramme de l'hybride ADN_{S24}-scFv_{CD3}.

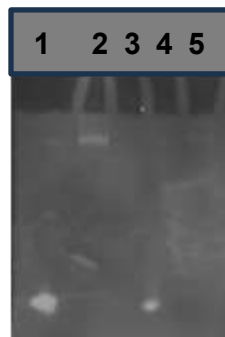


Figure 3.15 Résultat du gel d'électrophorèse natif de la purification des produits de contrôle.

Puit 1 : Fractions d'ADN S23 libre, Puit 2 : Fraction du pic du bio-conjugué S23-scFv_{CD3}, Puit 3 : Fractions de protéines non conjuguées.

Les mêmes résultats ont été observés pour la purification des bio-conjugués ADN_{S22}-scFv_{PD-L1} et ADN_{S24}-scFv_{CD19}. Les chromatogrammes obtenus (Figure 3.16) révèlent l'apparition d'un pic intermédiaire (Fractions 5-10), situé entre le pic correspondant à l'ADN libre et celui des protéines non conjuguées. Cette nouvelle population est cohérente avec la formation des hybrides ADN-scFv.

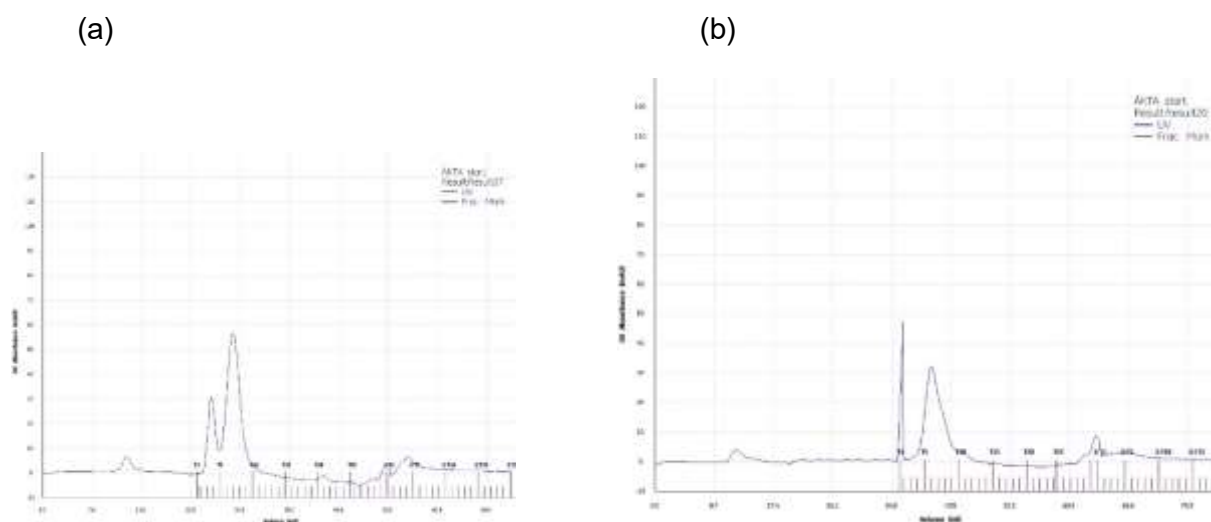


Figure 3.16 Résultats de la purification. (a) chromatogramme de la purification de S23-scFv_{CD19}. (b) chromatogramme de la purification de S22-scFv_{PD-L1}

Cette technique utilisée pour purifier nos hybrides est similaire à celle rapportée par Pan et al. (2020) (Pan et al., 2020) qui ont purifié des hybrides SMCC-PEG₂-ADN-L-scFv-_{CD3} et SMCC-PEG₂-ADN-L-scFv-_{CD19} à partir du mélange réactionnel contenant l'ensemble des hybrides, l'ADN libre et le reste de protéines non conjuguées. L'élimination de l'ADN libre a été réalisée par une chromatographie d'affinité sur Strep-Tactin permettant de retenir toutes les protéines marquées par un Strep-tag et se débarrasser de l'ADN, suivi d'une chromatographie d'échange d'ions au cours laquelle une élution séquentielle, utilisant 20 CV du volume de gradient d'élution allant de 15 mM NaCl au 1M NaCl, a été appliquée pour séparer les hybrides des protéines libres non conjuguées dans des fractions différentes (McLaughlin, 2025). Les résultats rapportés par cet article démontrent l'efficacité de la technique de la chromatographie d'échange d'ions comme une méthode de référence pour purifier les hybrides ADN-scFv ce qui valide notre choix d'utiliser la chromatographie d'échange de cations pour purifier ce type des bio-conjugués. La présence d'un nouveau pic entre l'ADN libre et les protéines non conjuguées indique que la conjugaison ADN-scFv modifie la charge nette de la protéine, réduisant son interaction électrostatique avec la colonne. Ce phénomène explique le décalage d'élution observé pour l'hybride, confirmant que la purification a permis d'isoler le produit conjugué de manière spécifique.

Les résultats obtenus sont en accord avec les principes de la chromatographie échangeuse d'ions, où l'affinité des molécules pour la résine est proportionnelle à leur charge nette et à leur pI (Imiołek et al., 2025). Dans ce contexte, l'ADN libre n'interagit pas avec la colonne, tandis que les protéines scFv sont retenues selon leur charge, et les hybrides présentent une élution intermédiaire en raison de la neutralisation partielle de la charge négative par l'ADN. Ces observations confirment que la technique utilisée est appropriée pour purifier des hybrides ADN–scFv à partir d'un mélange réactionnel complexe contenant ADN libre, protéines monomères/dimères et bio-conjugués. Cette approche simplifie le processus expérimental et permet d'obtenir des hybrides de haute qualité, prêts pour les analyses fonctionnelles ultérieures.

Après purification par chromatographie échangeuse de cations, toutes les fractions collectées contenant les hybrides ADN–scFv ont été concentrées à l'aide de filtres centrifuges présentant un seuil de coupure de 10 kDa. Cette approche est appropriée compte tenu de la masse moléculaire estimée des hybrides (~35 kDa), largement supérieure à la coupure de la membrane, assurant ainsi une rétention efficace du produit d'intérêt tout en permettant l'élimination des sels et des petites molécules résiduelles.

L'ultrafiltration centrifuge constitue une méthode couramment employée pour la concentration de protéines et de conjugués protéiques, en particulier après des étapes chromatographiques, en raison de sa simplicité et de sa compatibilité avec de faibles volumes. Toutefois, malgré cette adéquation théorique entre la taille des hybrides et la coupure de membrane, des pertes de matière peuvent survenir. Ces pertes sont fréquemment attribuées à l'adsorption non spécifique des protéines sur la membrane ou à la rétention préférentielle d'espèces agrégées, un phénomène d'autant plus marqué pour des protéines présentant une hétérogénéité conformationnelle ou une tendance à l'agrégation (van Reis & Zydney, 2007).

4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail était de mettre au point une nouvelle génération de TsAb pouvant se lier à plusieurs cibles sur différentes cellules et rediriger le système immunitaire des patients afin de détruire leurs cellules cancéreuses. Ces nouvelles molécules possèdent une structure complexe composé d'ADN-scFv qui peuvent être utilisés dans les stratégies d'immunothérapie spécifique pour de nombreuses maladies cancéreuses. Pour cela, nous avons exploité la nanotechnologie de l'ADN comme une approche innovante pour créer une bibliothèque d'anticorps tri-spécifique appliqués au traitement de la leucémie.

L'ingénierie d'anticorps bispécifiques basée sur la nanotechnologie de l'ADN, réalisée dans notre laboratoire (Messaoudi et al., 2024), figure parmi les premières à mettre en évidence une stratégie innovante d'assemblage des anticorps reposant sur la nanotechnologie d'ADN qui exploite le principe d'hybridation par complémentarité des bases pour assembler de manière coordonnée des oligonucléotides d'ADN en nanostructures d'une complexité remarquable. Cette nouvelle approche permet de substituer les liaisons peptidiques liant les différentes protéines ciblant les antigènes par des nanostructures d'ADN ce qui donne la main pour contrôler l'influence fondamentale de l'organisation spatiale, la flexibilité et la valence des anticorps sur l'activité fonctionnelle, et propose un outil conceptuel accessible pour identifier et visualiser ces tendances de design difficile à atteindre avec les méthodes traditionnelles. Ces données sont importantes car notre compréhension du fonctionnement de ces anticorps multi-spécifiques et des moyens de les optimiser reste limitée ce qui limite la découverte de nouveaux médicaments.

À ce jour, seules trois études ont rapporté l'utilisation de supports d'ADN pour construire des anticorps bispécifiques (Kazane et al., 2013), (Pan et al., 2020) et (Messaoudi et al., 2024). Bien que ces études démontrent la faisabilité de l'assemblage de fragments d'anticorps sur des architectures d'ADN, elles se limitent à les greffer et à les interchanger sur une seule nanostructure, sans optimisation structurale des anticorps obtenus ni analyse des relations structure-activité. Par ailleurs, trois autres travaux ont rapporté le greffage d'anticorps IgG, complets ou fragmentés, sur des constructions de DNA-origami (Zhou et al., 2025) ,(Winegar et al., 2022). Toutefois, ces structures, bien qu'utiles comme modèles d'étude, restent de très grande taille et ne correspondent pas à des formats compatibles avec le développement biopharmaceutique, ce qui limite leur transposition en produits pharmaceutiques finaux.

Au cours de ce travail, nous avons produit quatre scFv ciblant CD3, CD19, PD1 et PD-L1, ainsi que le blinatumomab comme contrôle, et nous les avons conjugués à des oligonucléotides fonctionnalisés par un groupement maléimide.

À travers cette étude, nous avons démontré l'efficacité de la réduction des scFv dimériques en formes monomériques, une condition essentielle pour garantir une conjugaison optimale et réduire l'hétérogénéité des produits réactionnels. L'utilisation d'un volume de TCEP immobilisé équivalent à 2× celui des protéines, tel que recommandé dans le protocole de réduction de Thermo Fisher Scientific, a permis une réduction des ponts disulfure, ce qui a favorisé ensuite le couplage avec l'ADN activé. Par ailleurs, l'adoption de la méthode de déprotection par chauffage dans le toluène anhydre s'est révélée plus fiable que l'irradiation micro-ondes. En effet, l'échec des essais par micro-ondes pourrait s'expliquer par les limites inhérentes à l'instrument : la distribution non homogène de l'énergie et l'absence d'un contrôle interne précis de la température réactionnelle, paramètres pourtant déterminants dans les réactions rétro-Diels–Alder, dont l'activation complète du groupement maléimide dépend étroitement.

Le troisième essai d'optimisation basé sur le passage du tampon PBS au tampon TAE et l'augmentation du ratio scFv/ADN à 1:4 a finalement permis la détection d'un profil de migration différencié, confirmant l'apparition d'une espèce de plus haut poids moléculaire compatible avec l'hybride attendu. Cette amélioration illustre bien la nature délicate et sensible de la conjugaison ADN–scFv, qui reste dépendante de multiples facteurs physico-chimiques (tampon, pH, stœchiométrie et solubilité).

La purification des hybrides par chromatographie échangeuse de cations a été validée par électrophorèse sur gel natif, confirmant la séparation efficace de l'ADN libre, des protéines non conjuguées et des hybrides purifiés. Cette étape a permis d'obtenir des produits essentiels pour la suite des analyses. En effet, l'optimisation des étapes clés comme la déprotection de l'ADN, la réduction des scFv et la conjugaison via la réaction thiol-maléimide a été déterminante pour la réussite de la formation des hybrides.

L'une des limites de ce travail est liée aux contraintes temporelles, qui ne nous ont pas permis de finaliser l'assemblage complet des structures tri-spécifiques (formes tétraédriques et triangulaires), ni d'effectuer les tests biologiques fonctionnels *in vitro* initialement prévus. Toutefois, malgré cette contrainte, notre contribution demeure originale. En effet, contrairement aux approches existantes, nous proposons une stratégie de conception fondée non pas sur une seule structure ADN porteuse, mais sur une bibliothèque de formats géométriques diversifiés, potentiellement compatibles avec le développement de molécules biopharmaceutiques.

L'impact potentiel de cette plateforme est significatif : si cette technologie est finalisée et validée biologiquement, elle pourrait offrir une nouvelle voie thérapeutique personnalisable, permettant un ciblage immunitaire plus maîtrisé, une modulation de la valence des scFv et, à terme, la réduction de certains effets indésirables associés au blocage non modulé de PD-1.

(Jyh Liang et al., 2025). De plus, grâce aux structures triangulaires et tétraédriques, il serait possible de mieux contrôler l'orientation et la distribution spatiale des scFv, ce qui constitue un atout pour minimiser l'effet négatif du blocage de PD-1. L'intégration des scFv sur des architectures ADN pourrait également ouvrir la voie à des thérapies multi-ciblées plus efficaces, contrôlables et mieux visualisables dès les phases de design moléculaire.

Les résultats obtenus dans ce projet constituent une base prometteuse pour le développement d'anticorps tri-spécifiques modulables sur ADN. Les prochaines étapes devront se concentrer sur la validation biologique *in vitro*, notamment l'évaluation de l'affinité et de la spécificité des hybrides scFv-ADN pour leurs cibles, ainsi que sur leur capacité à activer les LT et induire la cytotoxicité des cellules cancéreuses. Parallèlement, des études *in vivo* dans des modèles murins humanisés permettront d'évaluer la pharmacocinétique, la bio-distribution, l'efficacité antitumorale et la sécurité des molécules. Enfin, l'optimisation des formats et des conditions de conjugaison scFv-ADN pourrait améliorer les rendements, la stabilité et la modularité des anticorps, ouvrant la voie à la conception future d'immunothérapies multi-spécifiques efficaces et adaptées à un usage thérapeutique.

En conclusion, ce travail pose les bases d'une plateforme originale, combinant la bio-conjugaison d'ADN-scFv et les principes de nanotechnologie de l'ADN pour guider l'ingénierie structurale des futurs anticorps tri-spécifiques. Ce concept, encore peu exploré dans la littérature, pourrait jouer un rôle transformationnel dans le développement de nouvelles immunothérapies contre la leucémie et d'autres cancers si les défis restants liés au contrôle thermique des instruments, à la stabilité des scFv réduits et à l'homogénéité des assemblages sont résolus par des optimisations futures.

5 BIBLIOGRAPHIE

- Adilet, B., Yean Leng Loke, Sook Jing Goh, Hui Nee Geo, Malar Mugila, Misni Misran, Lip Yong Chung, Lik Voon Kiew, Steve Roffler, & Téo, Y. Y. (2023). Anticorps bispécifiques pour l'administration ciblée d'agents thérapeutiques anticancéreux : une revue. *Journal de libération contrôlée*.
- Alhallak, A. J., Parc Chaelee, Jessica Yavner, Hannah Bash, Berit Lubben, Ola Adebayo, Ayah Khaskiah et Abdel Kareem Azab (2021). Engageurs de lymphocytes T bispécifiques pour le traitement du myélome multiple : réalisations et défis *Cancers*.
- Amgen. (2014). BLINCYTO est la première et la seule immunothérapie bispécifique ciblant les lymphocytes T CD3 et dirigée contre le CD19 (BiTE®) à avoir été approuvée par la FDA. Amgen Press Release.
- Atanasov, M. G., Moneva-Sakelarieva,, Yozlem Ali Kobakova, Stefka Achkova Ivanova, Maria Vakrilova Becheva, Angelina Georgieva Kirkova-Bogdanova, Maria Sevdelinova Chaneva, V. P. A., Radoslav Fedeev Todorov, Nikolaï Zarkov Bashev, Ismail Elhanov Bashov, & Adel Habib Ibrahim. (2025). Anticorps monoclonaux : leur place en médecine appliquée et leur rôle dans les maladies infectieuses les plus récentes – histoire, situation actuelle et perspectives d'avenir. *Revue de la littérature. PHARMACIE*.
- Babaesfahani , K. N., Kuns B. Natalizumab. (2022). Natalizumab. National library of Medicine.
- Barrière, S., El-Ghazzi, N., Garcia, M., & Guièze, R. (2021). Anticorps bispecifiques en oncohématologie: applications et perspectives. *Bulletin du cancer*.
- Bellet, D., & Dangles-Marie, V. (2005). Anticorps humanisés en thérapeutique. *M/S: médecine sciences*.
- Burt, R., Dana Warcel, & Fielding, A. K. (2019). Blinatumomab, un anticorps bispécifique engageant les cellules B et T, dans le traitement des tumeurs malignes à cellules B. *Hum Vaccin Immunother*.
- Caffrey, M. (2025). Les anticorps bispécifiques dans le myélome multiple passent des essais cliniques à la pratique courante. *AJMC*.
- Capuano, C., Romanelli, M., Pighi, C., Cimino, G., Rago, A., Molfetta, R., Paolini, R., Santoni, A., & Galandrini, R. (2015). Anti-CD20 therapy acts via FcγRIIIA to diminish responsiveness of human natural killer cells. *Cancer research*.
- Chauhan, P., Ragendu V., Mohan Kumar, Rajib Molla , Surya Dev Mishra , Sneha Basa , & Rai, V. (2024). Principes de technologie chimique pour la bioconjugaison sélective des protéines et des anticorps. *Chemical Society Reviews*.

- Chu, Q. (2025). Thérapie par lymphocytes T à récepteur antigénique chimérique (CAR-T). Hémato-oncologie Université Laval.
- Cigalotto, D. M. (2024). Granzymes et santé : le bon, le mauvais et le pire. *Front. Immunol.*
- David, W. L. (2020). Anticorps monoclonaux dans le traitement du cancer. *Anticorps.*
- Dean, Jason,, & Reddy, P. (2013). Analyse métabolique des cellules CHO productrices d'anticorps en production en mode fed-batch. *Biotechnol Bioeng.*
- Deligne, C., & Gros, L. (2019). Les anticorps monoclonaux anti-tumoraux-Nouvelles perspectives pour générer une réponse immunitaire protectrice et durable. *médecine/sciences.*
- Dong, F., & Tariq, G. (2019). Progrès récents dans le développement thérapeutique basé sur les DVD-Ig. *La découverte de médicaments aujourd'hui : les technologies.*
- Durocher, Y., Sylvie Perret, & Kamen, A. (2002). Production de protéines recombinantes de haut niveau et à haut débit par transfection transitoire de cellules humaines 293-EBNA1 en croissance en suspension. *Nucleic Acids Res.*
- Engelberts, P. J., Ida H. Hiemstra, Bart de Jong, Danita H. Schuurhuis, Joyce Meesters, Irati Beltran Hernández, & coll. (2020). DuoBody-CD3xCD20 induit une puissante destruction des cellules B malignes médiée par les lymphocytes T dans des modèles précliniques et offre des possibilités d'administration sous-cutanée. *EBioMedicine.*
- Evans, A. R., Michael T. Capaldi, Geetha Goparajulcône, David Colterlcône, Frank F. Shilcône, & Aubert, S. (2019). Utilisation d'anticorps bispécifiques dans des études de dégradation forcée pour analyser les relations structure-fonction d'anticorps modifiés symétriquement et asymétriquement. *mAbs.*
- Fan, G., Wang, Z., Hao, M., & Li, J. (2015). Bispecific antibodies and their applications. *Journal of hematology & oncology.*
- FDA. (2017). La FDA approuve le tisagenlecleucel pour la leucémie lymphoblastique aiguë à cellules B et le tocilizumab pour le syndrome de libération de cytokines.
- Frenzel, A., Michael Hust, & Schirrmann, T. (2013). Expression d'anticorps recombinants. *Front Immunol.*
- Garegnani, L., Styrnisdottir, L., Rodriguez, P. R., Liquitay, C. M. E., Esteban, I., & Franco, J. V. (2021). Palivizumab for preventing severe respiratory syncytial virus (RSV) infection in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews.*
- Genelink. Bulletin technique – Phosphoramidite modifié 5'-Maléimide.
- Genmab A/S (2007). Bispecific antibodies formed by controlled Fab-arm exchange (WO Patent No).
- GLOBOCAN. (2021). World Health Organization. : Global cancer statistics 2020.

- Godar, M., Deswarte, K., Vergote, K., Saunders, M., de Haard, H., Hammad, H., Blanchetot, C., & Lambrecht, B. N. (2018). A bispecific antibody strategy to target multiple type 2 cytokines in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.
- Goshen. (2025). Relations structure-fonction des sous-classes d'IgG humaines : implications pour l'ingénierie des anticorps thérapeutiques et les applications cliniques. *Discov Appl Sci*.
- Goulet, D. R., Steven J. Orcutt, Adam Zwolak, Theo Rispens, Aran F. Labrijn, Rob N. de Jong, William M. Atkins, & Chiu, M. L. (2018). Mécanisme cinétique d'échange contrôlé Fab-bras pour la formation d'anticorps bispécifiques d'immunoglobuline G1. *Journal de chimie biologique JBC*.
- Greillier, L., & Grigoriu, B. (2021). Maladies auto-immunes, cancers bronchiques et immunothérapies: Autoimmune diseases, lung cancers and immunotherapies. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités*.
- Guo, X., Wu, Y., Xue, Y., Xie, N., & Shen, G. (2023). Revolutionizing cancer immunotherapy: unleashing the potential of bispecific antibodies for targeted treatment [Review]. *Frontiers in Immunology*.
- Gyorgypal, A., Antash Chaturvedi, Viki Chopda, Haoran Zhang, & Chundawat, S. P. (2025). Évaluation de l'impact des combinaisons de milieux et d'aliments sur les performances de culture de cellules CHO et la production d'anticorps monoclonaux (trastuzumab). *Cytotechnology*.
- Handlogten, M. W., Lee-O'Brien, A., Roy, G., Levitskaya, S. V., Venkat, R., Singh, S., & Ahuja, S. (2018). Intracellular response to process optimization and impact on productivity and product aggregates for a high-titer CHO cell process. *Biotechnology and bioengineering*.
- Hannemann, K. (2025). What is CAR T-cell therapy and how does it work? . *PharmD*.
- Hervé-Aubert, K., Allard-Vannier, E., Joubert, N., Lakhrif, Z., Alric, C., Martin, C., Viaud-Massuard, M.-C., Dimier-Poisson, I., Aubrey, N., & Chourpa, I. (2018). Impact of site-specific conjugation of ScFv to multifunctional nanomedicines using second generation maleimide. *Bioconjugate Chemistry*.
- Hou, Z., Wang, D., Li, Y., Zhao, R., Wan, C., Ma, Y., Lian, C., Yin, F., & Li, Z. (2020). A sulfonium triggered thiol-yne reaction for cysteine modification. *The Journal of Organic Chemistry*.
<https://synapse.patsnap.com/article/compare-ni-nta-vs-co22B-resins-for-his-tag-proteins>.
- (2025). Comparaison des résines Ni-NTA et Co²⁺ pour les protéines à étiquette His
- Imiolek, M., Fekete, S., Rudaz, S., & Guillaume, D. (2025). Ion exchange chromatography of biotherapeutics: Fundamental principles and advanced approaches. *Journal of Chromatography A*.

- Janson, J.-c. (2011). Purification des protéines Principe, high resolution methods and application Wiley Series in Methods of biochemical Analysis.
- Jiang, X., Jie Wang, Xiangying Deng, Fang Xiong, Junshang Ge, Bo Xiang, Xu Wu, Jian Ma, Ming Zhou, Xiaoling Li, Yong Li, Guiyuan Li, Wei Xiong, Can Guo, & Zeng, Z. (2019). Rôle du microenvironnement tumoral dans l'échappement immunitaire tumoral médié par-L1/-1 Mol Cancer.
- Johnson, S., Burke, S., Huang, L., Gorlatov, S., Li, H., Wang, W., Zhang, W., Tuailon, N., Rainey, J., & Barat, B. (2010a). Effector cell recruitment with novel Fv-based dual-affinity re-targeting protein leads to potent tumor cytotoxicity and in vivo B-cell depletion. Journal of molecular biology.
- Johnson, S., Burke, S., Huang, L., Gorlatov, S., Li, H., Wang, W., Zhang, W., Tuailon, N., Rainey, J., & Barat, B. (2010b). Le recrutement de cellules effectrices grâce à une nouvelle protéine de reciblage à double affinité basée sur Fv conduit à une puissante cytotoxicité tumorale et à une déplétion des cellules B in vivo. Journal of molecular biology.
- Jung, G., Freimann, U., Marschall, Z. V., Reisfeld, R. A., & Wilmanns, W. (1991). Target cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments. European journal of immunology.
- Jyh Liang, H., Schrom Edward C, Wong-Rolle Abigail, Vistain Luke, Shang Wanjing, Dong Qiang, Zhao Chen, Jin Chengcheng, & Germain Ronald N. (2025). Inhibitory PD-1 axis maintains high-avidity stem-like CD8+ T cells. Nature.
- Kang, J., Sun, T., & Zhang, Y. (2022). Immunotherapeutic progress and application of bispecific antibody in cancer. Frontiers in Immunology.
- Kazane, S. A., Axup, J. Y., Kim, C. H., Ciobanu, M., Wold, E. D., Barluenga, S., Hutchins, B. A., Schultz, P. G., Winssinger, N., & Smider, V. V. (2013). Self-assembled antibody multimers through peptide nucleic acid conjugation. Journal of the American Chemical Society.
- Kim, B., Kyu Tae Byun , Seung Hyeon Lee , So Yeong Cheon, & Chan Gil Kim. (2025). Mise en place d'un système de production et étude in vitro de l'anticorps anti-morsure CD19/CD3ε sécrété par Pichia pastoris. Sci Rep.
- Kirley, T. L., Greis, K. D., & Norman, A. B. (2016). Selective disulfide reduction for labeling and enhancement of Fab antibody fragments. Biochemical and biophysical research communications.
- Klein, Wolfgang, S., Joerg T, R., Charles, D., Ulrich, B., Marina, B., & Pablo, U. (2019). Conception d'anticorps bispécifiques thérapeutiques à l'aide de la technologie CrossMab. Methods.

- Klein, C., Brinkmann, U., Reichert, J. M., & Kontermann, R. E. (2024). Le présent et l'avenir des anticorps bispécifiques pour la thérapie du cancer. *Nature reviews Drug discovery*.
- Klein, C., Wolfgang Schaefer, & Regula, J. T. (2016). L'utilisation de la technologie CrossMAb pour la génération d'anticorps bi- et multispécifiques. *MAbs*.
- Klein, C., Wolfgang Schäfer, Joerg T. Regula, Charles Dumontetc , Ulrich Brinkmann, Marina Bacac , & , P. U. (2019). Concevoir des anticorps bispécifiques thérapeutiques à l'aide de la technologie CrossMab. *Méthodes*.
- Kontermann, R. (2012a). Stratégies de ciblage double avec des anticorps bispécifiques. *mAbs*.
- Kontermann, R. (2012b). Stratégies de double ciblage avec des anticorps bispécifiques. *mAbs*.
- Labrijn, A. F., Joyce I. Meesters, Bart E. C. G. de Goeij, & Parren, P. W. H. I. (2013). Génération efficace d'IgG1 bispécifiques stables par échange contrôlé du bras Fab. *PNAS*.
- Lan, W., Edouard Seung , Ling Xu , Ercole Rao , Dana M.Seigneur , Ronnie R. Wei , Virna Cortez-Retamozo , Béatriz Ospina , Valérie Posternak , Grégory Ulinski , Peter Piepenhagen , Élisabeth Francesconi , Nizar El-Murr , Christian Beil , Patrick Kirby , Aiqun Li , Jennifer Fretland , Rita Vicente , Gejing Deng , . . . J.Nabel, e. G. (2020). Les anticorps trispécifiques améliorent l'efficacité thérapeutique des lymphocytes T dirigés vers la tumeur grâce à la co-stimulation des récepteurs des lymphocytes T. *Cancer national* 1 , 86-98 (2020). *Cancer national*.
- Lebranchu. (2018). Histoire des anticorps thérapeutiques. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 202, Issues.
- Ling, S. P., Long Chiau Ming, Jagjit Singh Dhaliwal , Madhu Gupta , Chrismawan Ardianto, Khang Wen Goh , Zahid Hussain , & Shafqat, N. (2022). Rôle de l'immunothérapie dans le traitement du cancer : une revue systématique. *Cancers (Basel)*.
- Linke, R., Anke Klein, & Seimetz, D. (2010). Catumaxomab : développement clinique et orientations futures. . *mAbs*.
- Mack, M., Riethmüller GERT , & Peter Kufer. (1995). Un petit anticorps bispécifique exprimé sous forme de molécule fonctionnelle à chaîne unique présentant une forte cytotoxicité envers les cellules tumorales. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- McLaughlin, L. (2025). Conjugaison de biomolécules avec peptides pénétrants cellulaires (CPP). *BiotechnologyReviews*.
- Meric-Bernstam, F., Beeram, M., Blum, M. A., Hausman, D. F., Infante, J. R., Patnaik, A., Piha-Paul, S. A., Rasco, D. W., Rowse, G., & Thimmarayappa, J. (2017). Phase 1 dose escalation of ZW25, a HER2-targeted bispecific antibody, in patients (pts) with HER2-expressing cancers. In: *American Society of Clinical Oncology*.

- Messaoudi, S., Wai, K., Marple, A., Baniahmad, S. F., Wylie, R. G., Pelletier, M., Craig, M., Durocher, Y., Greschner, A. A., & Gauthier, M. A. (2024). Rapid Systematic Screening of Bispecific Antibody Surrogate Geometries for T-Cell Engagement Using DNA Nanotechnology. *Journal of the American Chemical Society*.
- Milstein, C., A.C Cuello, & (1983). Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature*.
- Milstein, G. K. e. C. (1975). Cultures continues de cellules fusionnées sécrétant des anticorps de spécificité prédéfinie. *Nature*.
- Misorin, A. K., Darya O. Chernyshova, & Karbychev, M. S. (2023). Approches de pointe en matière d'expression hétérologue d'anticorps bispécifiques ciblant les tumeurs solides. *Biochemistry Moscow*.
- Molloy, M. E., Richard J. Austin, Bryan D. Citron, Wade H. Aaron, Vaishnavi Ganti, Adrie Jones, Susan D. Jones, Kathryn L. Strobel, Purbasa Patnaik, Kenneth Sexton, Laurie Tatalick, Timothy Z. Yu, Patrick A. Baeuerle, Loi Che-Leung, & Wesche, H. (2021). Caractérisation préclinique de HPN536, une protéine trispécifique activant les lymphocytes T pour le traitement des tumeurs solides exprimant la mésothéline *Clin Cancer Res*.
- Moore, P. A., Wenjun Zhang, G. Jonah Rainey, Steve Burke, Hua Li, Ling Huang, Sergueï Gorlatov, Maria Concetta Veri, Sudeepta Aggarwal, Yinhua Yang, Kalpana Shah, Linda Jin, Sunan Zhang, Leilei He, Tengfei Zhang, Valentina Ciccarone, Scott Koenig, Ezio Bonvini, & Johnson, S. (2011). Application de molécules de reciblage à double affinité pour obtenir une destruction optimale des lymphomes à cellules B par les lymphocytes T redirigés. *Sang*.
- Murphy, K. (2012). *Immunobiology*. Garland Science.
- Nagorsen, D., Peter Kufer, Patrick A. Baeuerle, & Bargou, R. (2012). Blinatumomab : une perspective historique. *Pharmacologie et thérapeutique*.
- Nagorsen, P. A. B., Ralf Bargou. (2012). Blinatumomab : une perspective historique. *Pharmacologie et thérapeutique*.
- NIH, I. N. d. c. (2022). Inhibiteurs de points de contrôle immunitaires
- OCDE. (2025). *Panorama de la santé 2025 : Indicateurs de l'OCDE*, Éditions OCDE, Paris.
- Ornes, S. (2013). Antibody–drug conjugates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Pan, L., Cao, C., Run, C., Zhou, L., & Chou, J. J. (2020). DNA-Mediated Assembly of Multispecific Antibodies for T Cell Engaging and Tumor Killing. *Advanced Science*.
- Poulain, A. (2018). Caractérisation du système inductible au cumate pour la production de protéines thérapeutiques en cellules CHO.

- Promsote, W., Xu, L., Hataye, J., Fabozzi, G., March, K., Almasri, C. G., DeMouth, M. E., Lovelace, S. E., Talana, C. A., & Doria-Rose, N. A. (2023). Trispecific antibody targeting HIV-1 and T cells activates and eliminates latently-infected cells in HIV/SHIV infections. *Nature Communications*.
- Przepiorka, D., Ko, C.-W., Deisseroth, A., Yancey, C. L., Candau-Chacon, R., Chiu, H.-J., Gehrke, B. J., Gomez-Broughton, C., Kane, R. C., & Kirshner, S. (2015). FDA approval: blinatumomab. *Clinical Cancer Research*.
- Renate Kunert, D. R. (avril 2016). Avancées dans la fabrication d'anticorps recombinants. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Rives, T. D., Richbourg, S. G., Julia Martone, & Mark A. Blenner. (2025). Avancées récentes dans l'ingénierie de la réponse protéique non repliée dans les lignées cellulaires d'ovaires de hamster chinois recombinants. *nt. J. Mol. Sci*.
- Routier, É., Robert, C., & Mateus, C. (2014). L'immunothérapie dans le mélanome. *Bulletin du cancer*.
- Sabatine, M. S., Robert P Giugliano, Anthony C Keech, Narimon Honarpour, Stephen D Wiviott, Sabina A Murphy, Julia F Kuder, Huei Wang, Thomas Liu, Scott M Wasserman, Peter S Sever, & Pedersen, T. R. (2017). Évolocumab et résultats cliniques chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires. *N Engl J Med*.
- Schaefer, W., Regula, J. T., Böhner, M., Schanzer, J., Croasdale, R., Dürr, H., Gassner, C., Georges, G., Kettenberger, H., & Imhof-Jung, S. (2011). Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Shibafuji, Y., Nagao N, Nagashima Y, Kawano Y, & Ishino T. (2024). Antibody Productivity of CHO Cells is Altered by ER Stress Tolerance of the Host Cell. *Adv Biochem Biotechnol*.
- Spasevska, I. (2013). An outlook on bispecific antibodies: Methods of production and therapeutic benefits. *BioSciences Master Reviews: Lyon, France*.
- Spiess, C., Zhai, Q., & Carter, P. J. (2015). Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Molecular immunology*.
- Stevenson, R., & De Bo, G. (2017). Controlling reactivity by geometry in retro-Diels–Alder reactions under tension. *Journal of the American Chemical Society*.
- Tang, X., MS Pepler, R. T. Irvin, & Suresh, M. (2004). Utilisation d'anticorps bispécifiques dans les tests Velcro moléculaires dont la spécificité se rapproche de la limite théorique de l'immunodétection de Bordetella pertussis. *Clin Diagn Lab Immunol*.
- Tapia-Galisteo, Marta Compte, Luis Álvarez-Vallina, & Sanz, L. (2023). Quand trois n'est pas une foule : anticorps trispécifiques pour une immunothérapie améliorée du cancer. *Théranostique*.

- Tapia-Galisteo, A., Marta Compte, Luis Álvarez-Vallina, & Sanz, L. (2023). Quand trois n'est pas une foule : des anticorps trispécifiques pour une immunothérapie améliorée contre le cancer. *Theranostics*.
- Tapia, A. R., Abgottsson, F., Nilvebrant, J., Nygren, P.-Å., Ivetich, S. D., Hernandez, A. J. B., Thanasi, I. A., Szijj, P. A., Sekkat, G., & Cuenot, F. M. (2024). Site-directed conjugation of single-stranded DNA to affinity proteins: quantifying the importance of conjugation strategy. *Chemical Science*.
- Techaapornkun, P., Waranyoo Rojpalakorn, N. M., Asmita Khaniya, Arsa Thammahong, Mai Soe Jeu, Nattiya Hirankarn, & Pitakkitnukun, P. (2025). Efficacité et innocuité comparatives des cellules CAR-T ciblant BCMA et des BiTE dans le myélome multiple en rechute ou réfractaire : une méta-analyse d'études interventionnelles et en vie réelle. *Ann Hématol*.
- Theodora, A., & Joachim, A. (2019). Mécanismes d'action et toxicités potentielles des anticorps monoclonaux. *médecine/sciences*.
- Thorsten Gantke, M. W., Carmen Herbrecht, Uwe Reusch, Kristina Ellwanger, Ivica Fucek, Markus Eser, Thomas Muller, Remko Griep, Vera Molkenthin, Eugène A Joukovski, Martin Treder (2017). Trispecific antibodies for CD16A-directed NK cell engagement and dual-targeting of tumor cells. *Protein Eng Des Sel*.
- Tian, M. L., Ya Zhang et Xin Wang. (2021). Les activateurs bispécifiques de lymphocytes T : une thérapie émergente pour la prise en charge des hémopathies malignes. *J Hematol Oncol*.
- van Reis, R., & Zydney, A. (2007). Technologie des membranes pour les bioprocédés *Journal of Membrane Science*.
- Winegar, P. H., Figg, C. A., Teplensky, M. H., Ramani, N., & Mirkin, C. A. (2022). Modular nucleic acid scaffolds for synthesizing monodisperse and sequence-encoded antibody oligomers. *Chem*.
- Wu, C., Hua Ying, Christine Grinnell, Shaughn Bryant, Renée Miller, Anca Clabbers, Sahana Bose, Donna McCarthy, Rong-Rong Zhu, Ling Santora, Rachel Davis-Taber, Yune Kunes, Emma Fung, Annette Schwartz, Paul Sakorafas, Jijie Gu, Modifier Tarcsa, Anwar Murtaza, & Ghayur, T. (2007). Ciblage simultané de plusieurs médiateurs de la maladie par une immunoglobuline à double domaine variable. *Biotechnologie naturelle*.
- Wu, X., Richard Yuan, Michaël Bacica, & Demarest, S. J. (2018). Génération de formats orthogonaux d'anticorps trispécifiques à base de Fab. *Protein Engineering, Design and Selection*.
- Yang, W. W., et Wei Jun Qin. (2017). Les anticorps bispécifiques comme plateforme de développement pour de nouveaux concepts et stratégies de traitement. *Int. J. Mol. Sc*.

- Yanyan Han , D. L. e. L. L. (2020). Voie PD-1/PD-L1 : recherches actuelles sur le cancer. Am J Cancer Res.
- Yardumian, K., Konciak, D., Vandervelden, J., & Sugiyama, M. . (2025). T-cell redirection in oncology: Advancing roles of bispecific T-cell engagers and CAR T (White paper) ClearView Healthcare Partners.
- Yun, J., Lee, S.-H., Kim, S.-Y., Jeong, S.-Y., Kim, J.-H., Pyo, K.-H., Park, C.-W., Heo, S. G., Yun, M. R., & Lim, S. (2020). Antitumor activity of amivantamab (JNJ-61186372), an EGFR–MET bispecific antibody, in diverse models of EGFR exon 20 insertion–driven NSCLC. *Cancer Discovery*.
- Zhang, C., Yunhui Fu, Wenyun Zheng, Feng Chang , Yue Shen , Jinping Niu , Yangmin Wang, & Ma, X. (2024). Amélioration de l'efficacité de production d'anticorps des cellules ovariennes de hamster chinois grâce à l'amélioration de la capacité de repliement des liaisons disulfure et de la résistance à l'apoptose. *Cells*.
- Zhang, J., Robinson David, & Salmon Peter. (2006). A novel function for selenium in biological system: selenite as a highly effective iron carrier for Chinese hamster ovary cell growth and monoclonal antibody production. *Biotechnology and bioengineering*.
- Zhang, X., Yuan Yuan Yang , Dongmei Fan, & Xiong, D. (2017). Le développement d'anticorps bispécifiques et leurs applications dans l'évasion immunitaire des tumeurs. *Exp Hematol Oncol*.
- Zhao, H., & Shen, K. (2016). Microwave-induced inactivation of DNA-based hybrid catalyst in asymmetric catalysis. *International journal of biological macromolecules*.
- Zhou, L., Bi, J., Chang, S., Bai, Z., Yu, J., Wang, R., Li, Z., Zhang, X., Chou, J. J., & Pan, L. (2025). Self-Assembled Antibody-Oligonucleotide Conjugates for Targeted Delivery of Complementary Antisense Oligonucleotides. *Angewandte Chemie International Edition*.