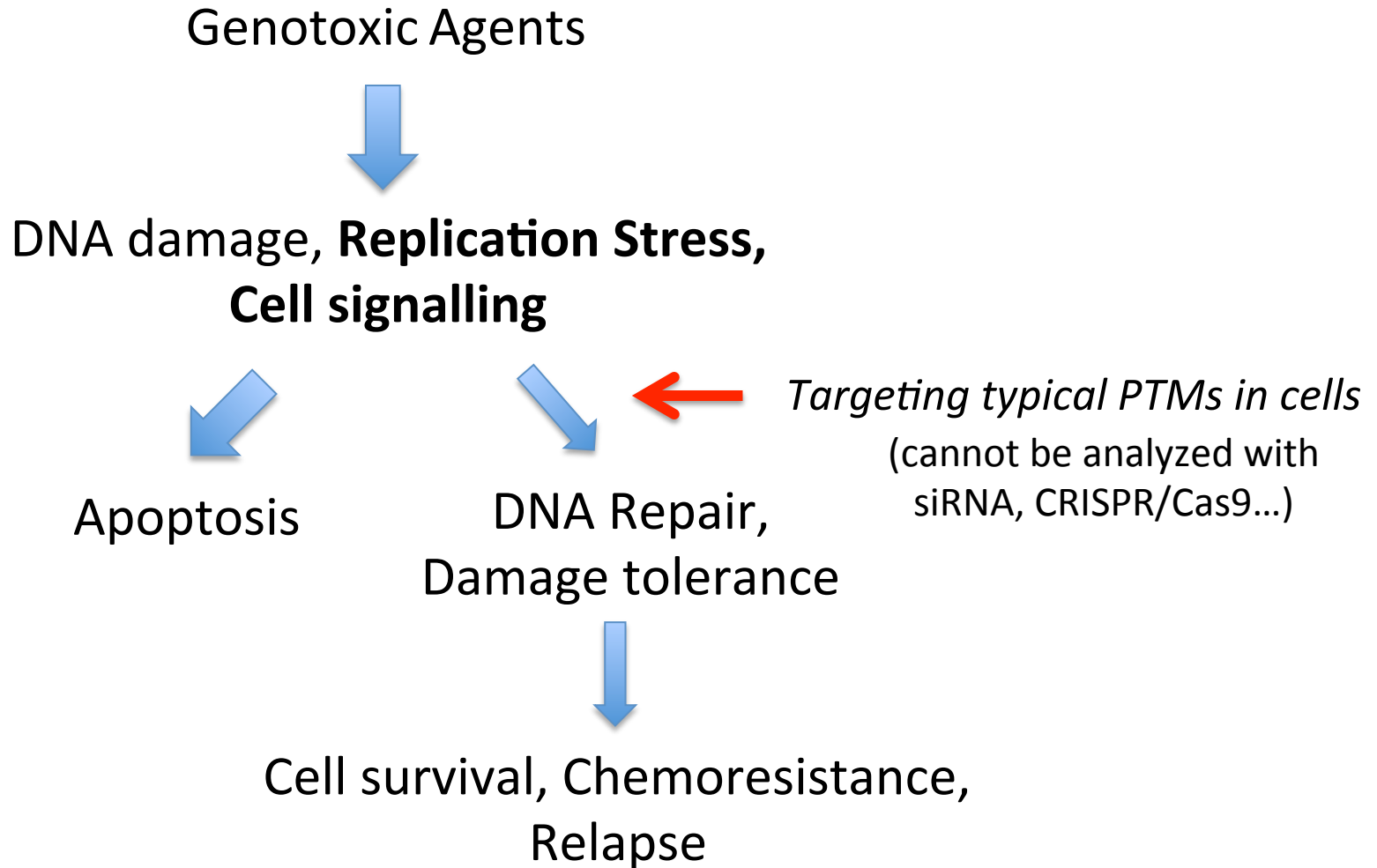


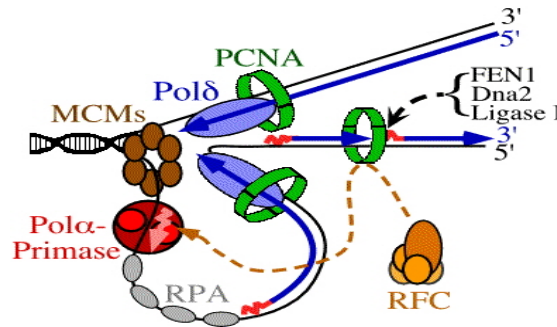
Intervenir dans les cellules cancéreuses
avec des sondes immunologiques:
quel intérêt?

Stratégie de l'équipe "Modifications post-traductionnelles et cancérogénèse"

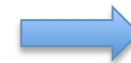


Antigènes et mécanismes ciblés

- PCNA qui peut être phosphorylé et/ou ubiquitinylé :

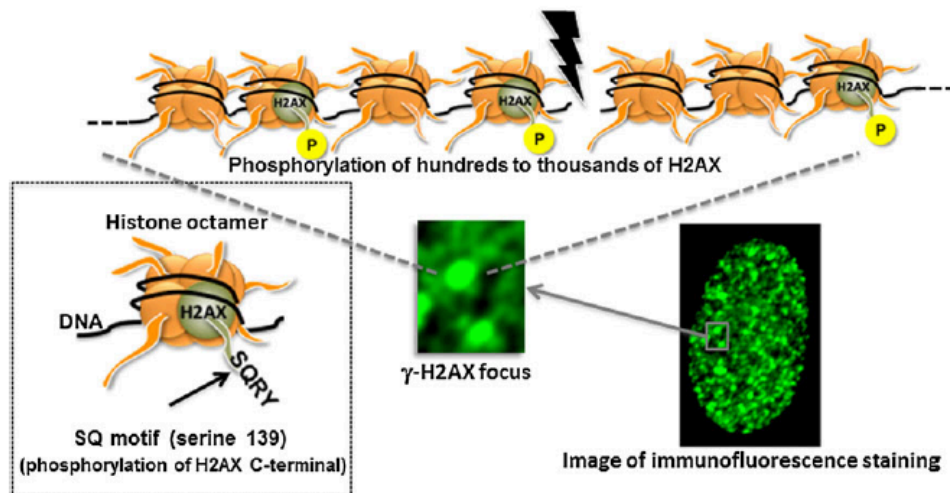


essentiel



REPLICATION
AND REPAIR
(TLS, NER)

- H2AX phosphorylée (γ -H2AX), biomarqueur des DSBs



fonctionnel

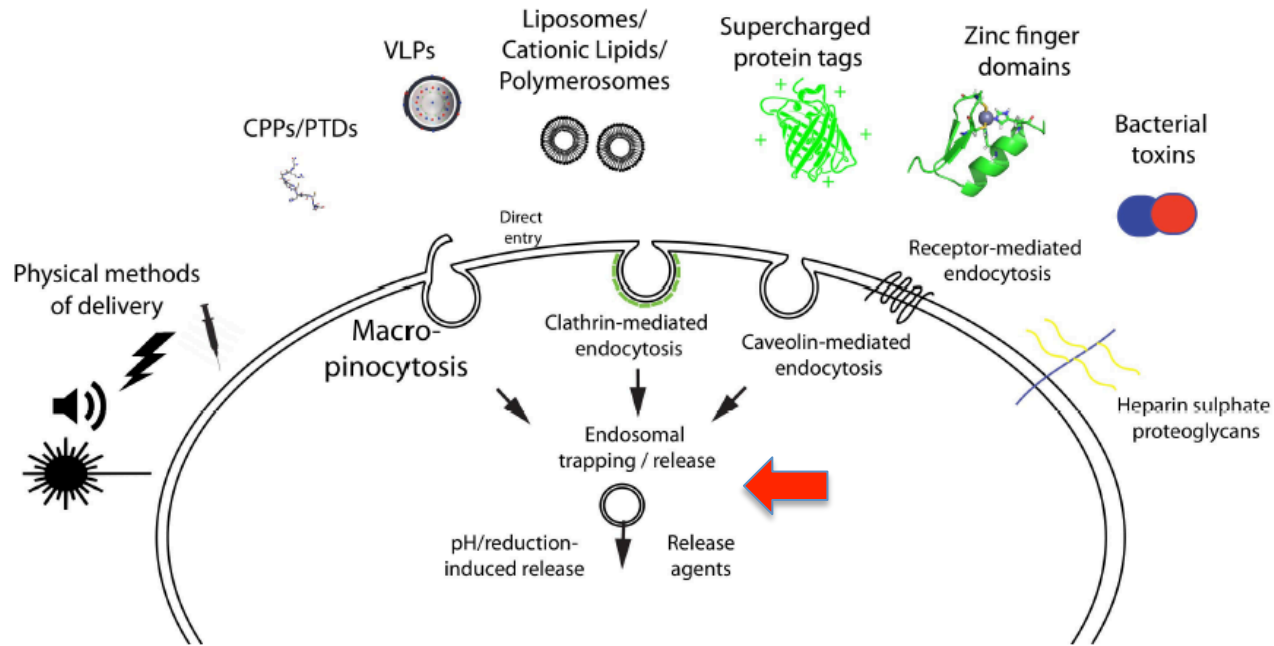


REPLICATION
STRESS RESPONSE /
DNA DAMAGE
RESPONSE



14 mAbs anti-PCNA et 4 mAbs anti- γ -H2AX validés par IF

Transfert intracellulaire



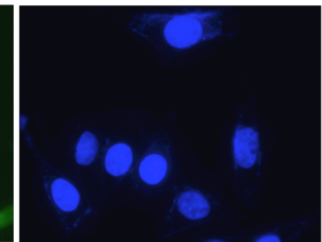
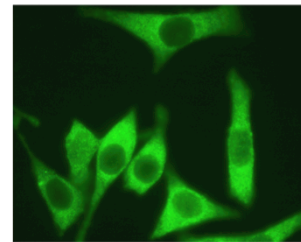
d'après Miersch & Sidh, 2016



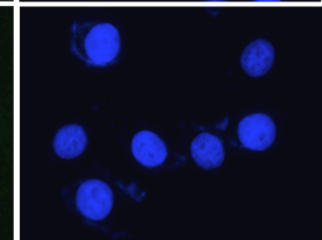
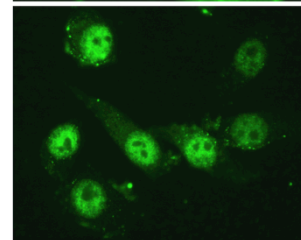
Protocole d'électroporation d'anticorps:

- Viabilité des cellules: 98%
- Efficacité de transduction: 100%
- 1 μg = 100.000 molécules internalisées

4C6



7C2



Freund et al. MAb, 2014

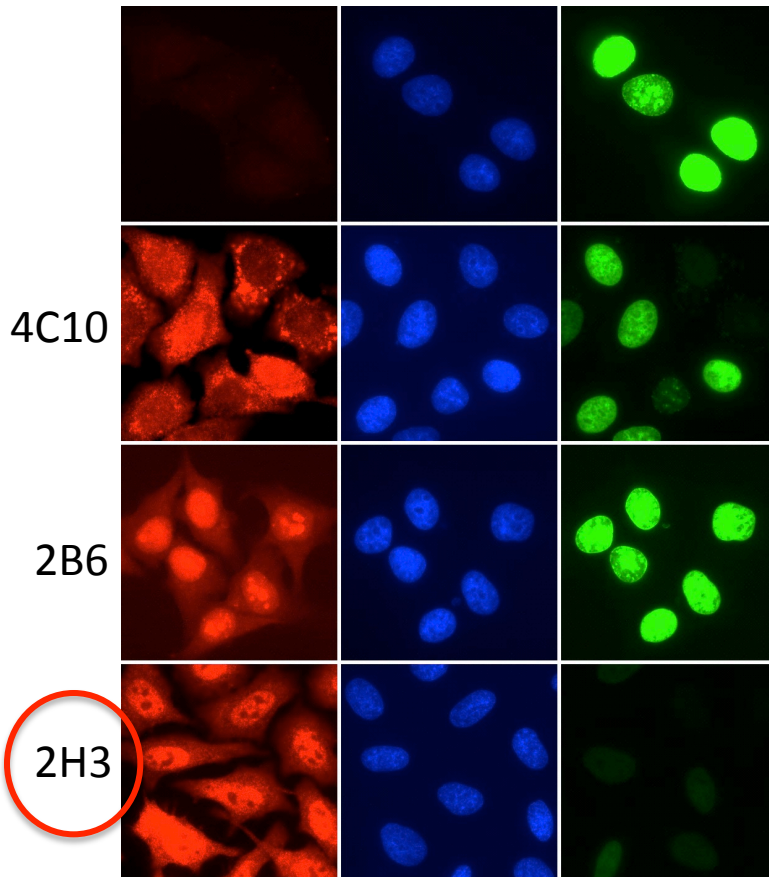
Ciblage de PCNA avec des Fab - 1

(HeLa, U2OS)

24 hr après transduction:

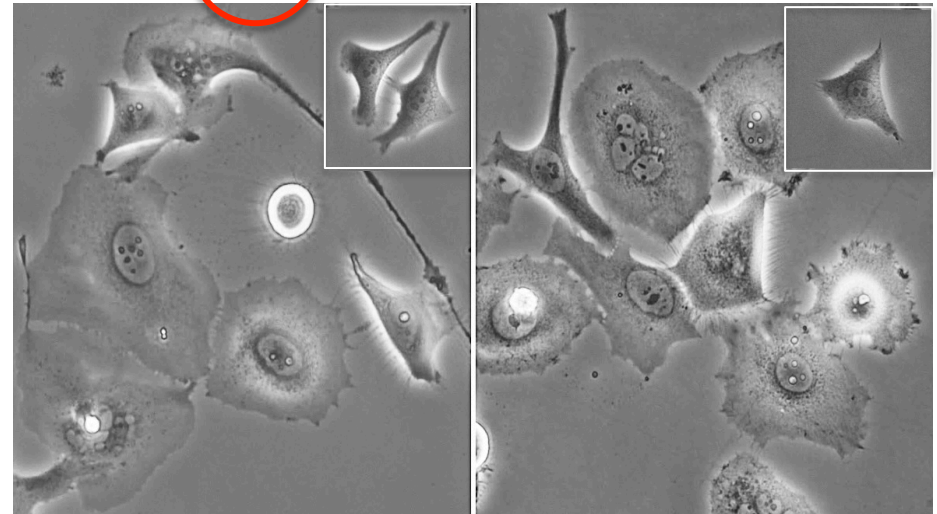
> 72 hr après transduction:

@myc DAPI EdU



2H3

CRISPR/Cas9



- Importance de l'accessibilité
- Senescence-like phenotype -> mort
- Aussi efficace que l'inactivation du gène
- = traitement avec de fortes doses d'HU

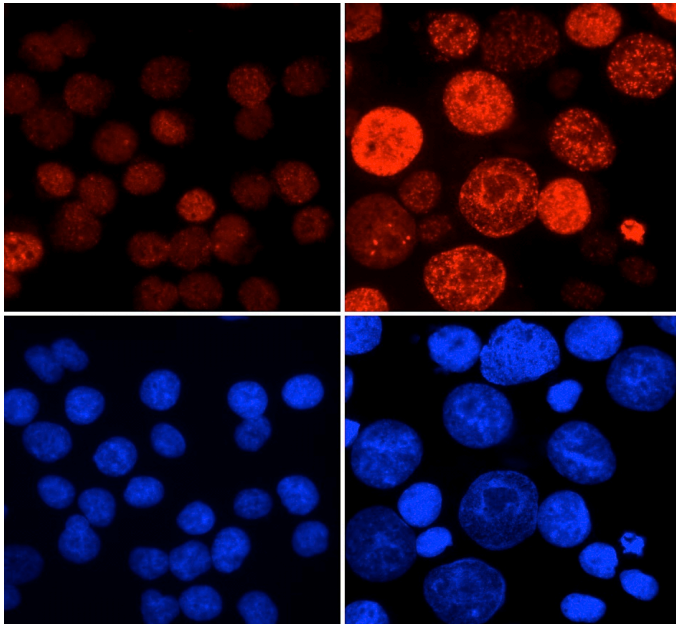
Ciblage de PCNA avec des Fab - 2

(HL60R: cellules résistantes à la daunorubicine et l'étoposide)

γ -H2AX – morphologie des noyaux :

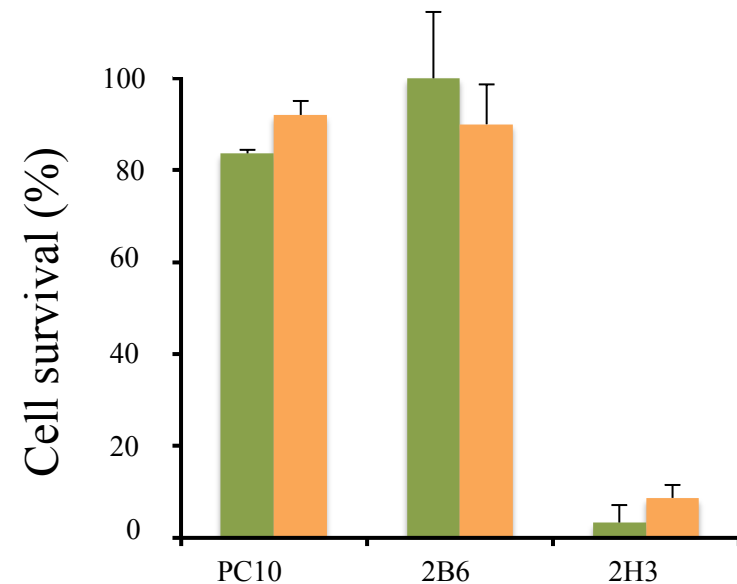
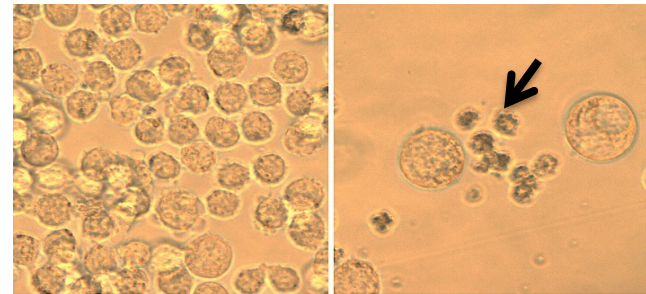
2B6

2H3



2B6

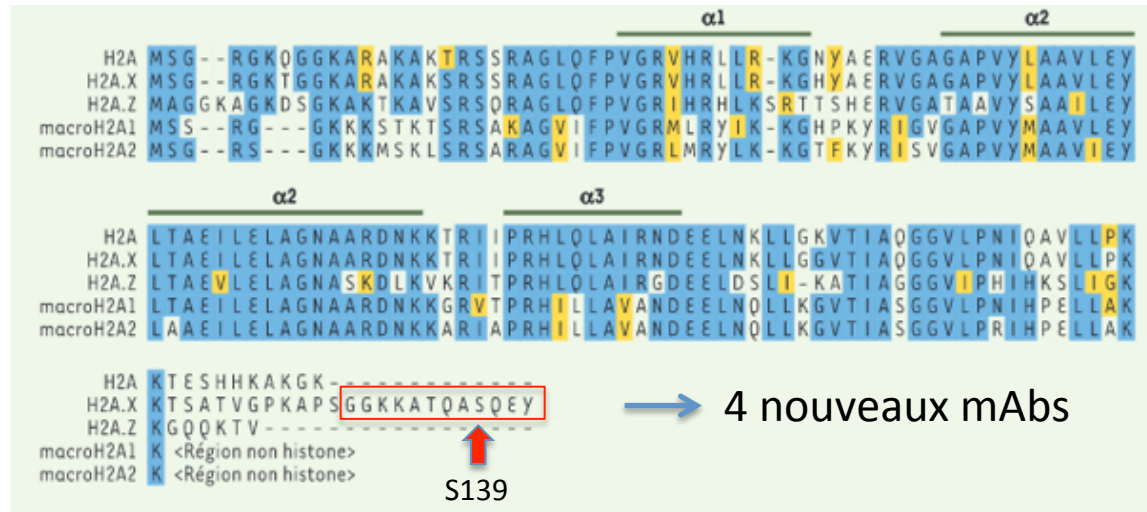
2H3



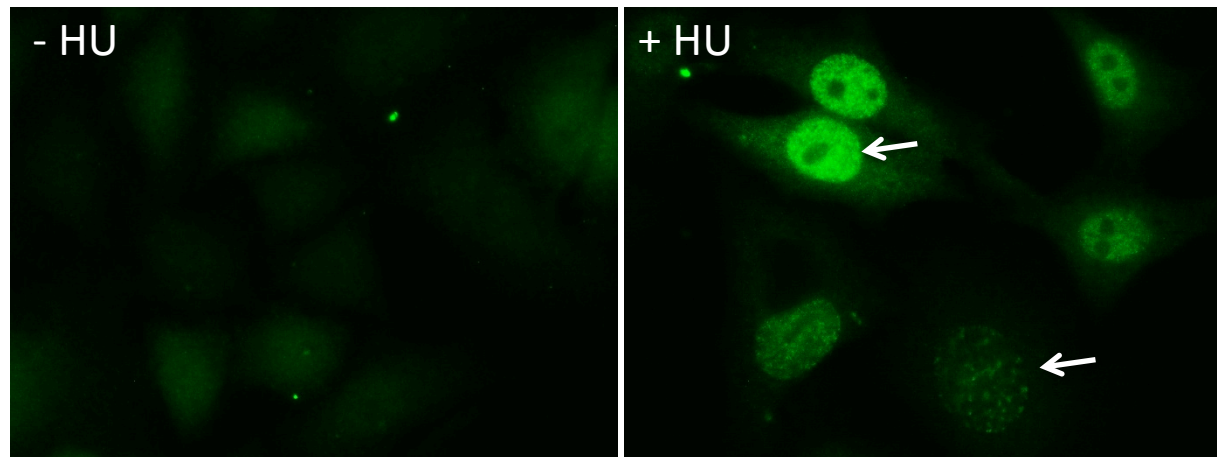
- mAb -> stress replicatif **léta**
(comme la combinaison de drogues de dernière génération)
- γ -H2AX marqueur pré-apoptotique?



Ciblage de γ -H2AX dans les cellules vivantes



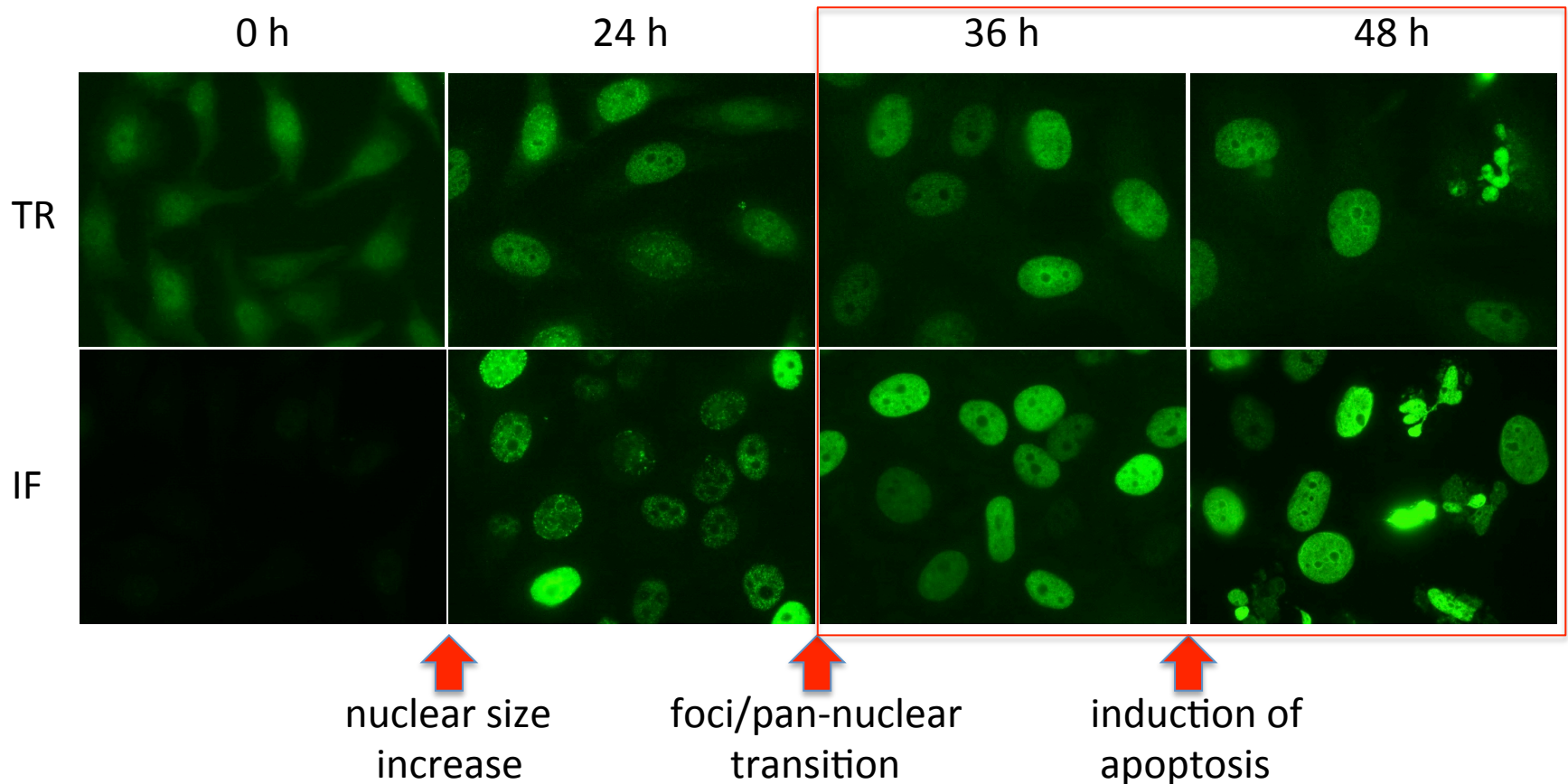
Transduction + addition d'hydroxyurée (HU) -> fixation et révélation après 24 hrs



- Imagerie spécifique d'une MPT sans lavage (pas de détergent)
- γ -H2AX est accessible dans les cellules

Dynamique de la phosphorylation de H2AX dans les cellules vivantes

(HeLa, + HU)



- TR = IF à partir de 36 h -> pas d'effet interférent dans ces conditions
- Coloration "pan-nuclear" = passage obligé pour favoriser la mort cellulaire?
- Outils pour la microscopie en temps réel de γ -H2AX sur C individuelles

mAb/Fab dans les cellules - quel intérêt?

LE PLUS:

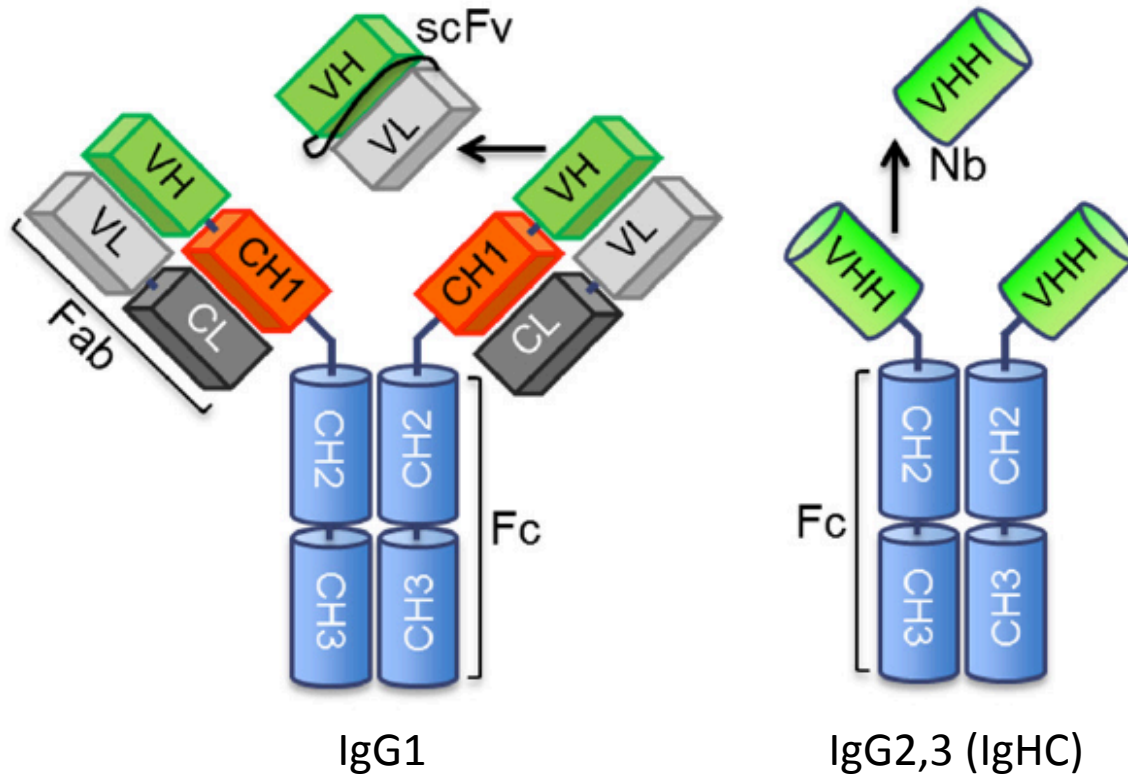
- Les anticorps sont opérationnels et ne sont pas toxiques dans les cellules
- Vectorisation contrôlée -> outils d'imagerie de **protéines endogènes** et de **MPT** dans les cellules vivantes
- Cartographie des sites (épitopes) accessibles dans des conditions ϕ
- Lorsque bloquant, on peut atteindre des cibles "non-druggables" (interactions prot-prot) -> **outils de validation de cibles intracellulaires**
- Anti-replisome (PCNA, DNA Pol alpha) -> "antibodyomics" -> nouvelles cibles

LE MOINS:

- Format Fab n'est pas aisément modifiable (ingénierie compliquée)
- Problème de marquage -> microscopie de super-résolution en temps réel
- Problème de la vectorisation pour des études *in vivo*

 NANOBODIES, une alternative?

Nanobodies: des fragments d'anticorps simple-domaine de camélidés

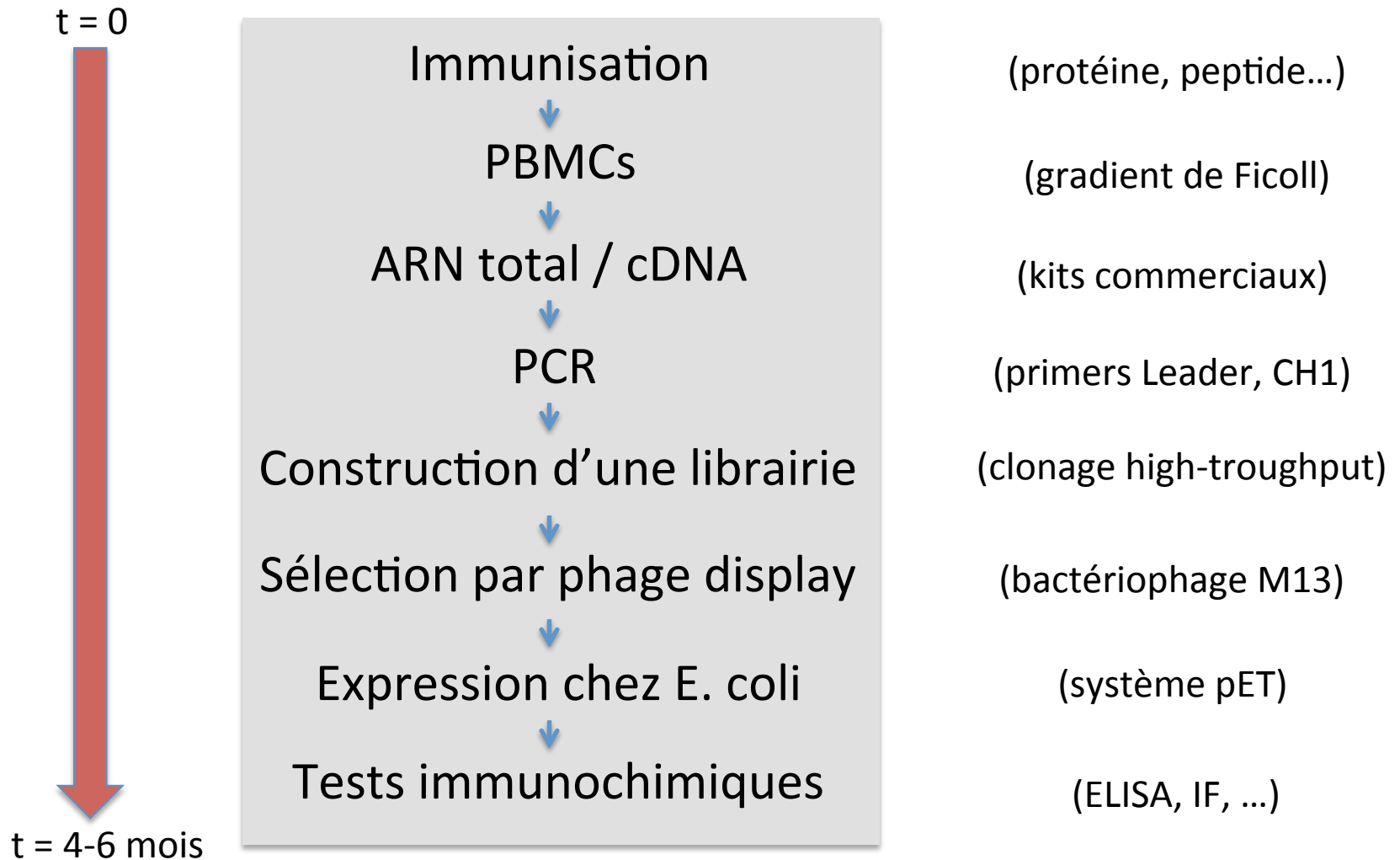


- 12-17 kDa (4 x 2 nm)
- Homology with human VH3
- Stable folding, robust
- Nanomolar affinity
- Engineering :
 - . genetic fusion
 - . selective labelling
 - . dimerization
- Production in *E. coli*

Applications: > 1000 publications à ce jour (source PubMed)

- Chaperons de cristallisation (GPCRs)
- Diagnostic – molecular imaging in vivo (SPECT, PET....)
- Thérapie: 23 in clinical trials (2 in Phase III)

Etapes pratiques d'obtention



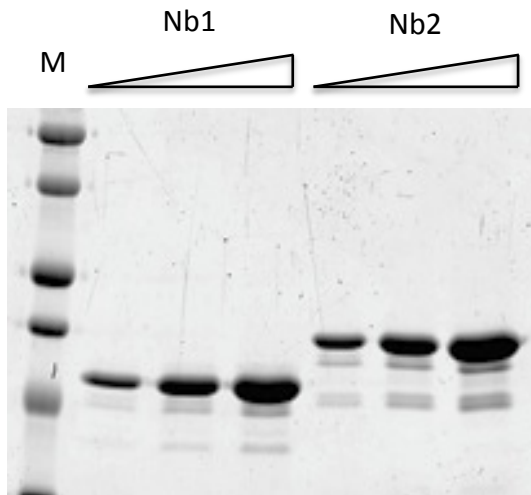
➡ coût des prestations (Genescript, Eurogentec...): 10.000 à 25.000 €

Sélection de nanobodies anti-PCNA et anti- γ H2AX / Fab

(en cours)

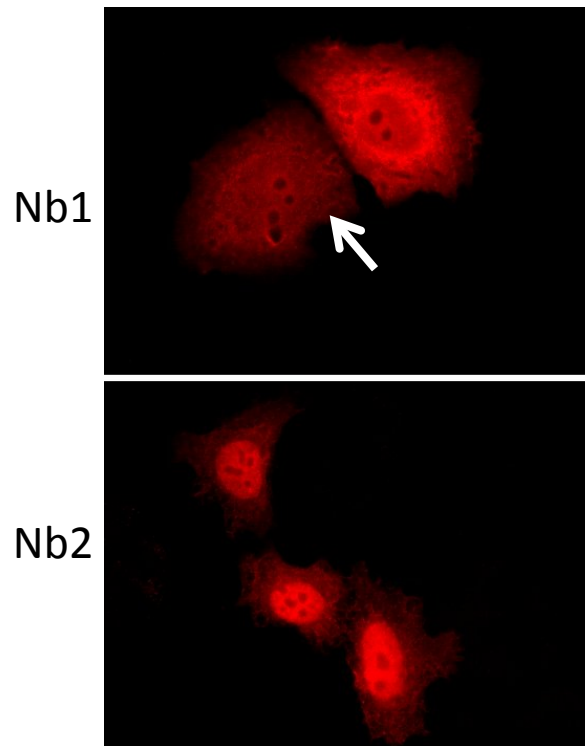
Immunisation d'alpagas -> construction de banques -> sélection PhD -> analyse *in vitro*

Expression chez E. coli
et purification

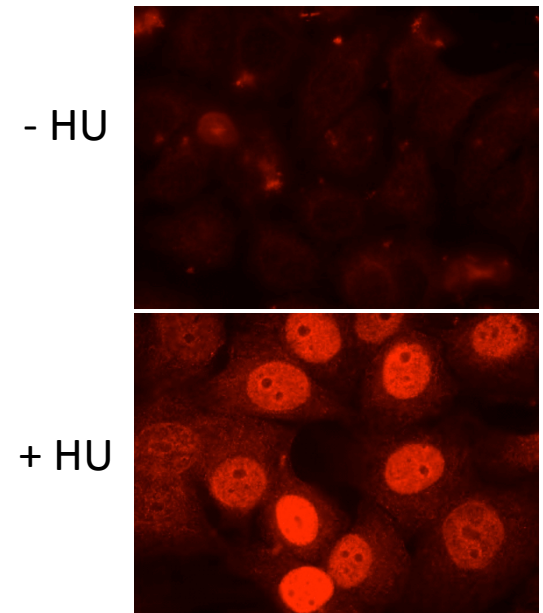


-> electroporation OK

Transfection et révélation par IF



Test du sérum par IF
(1/3000)



Détection de MPT possible



Technologie "in progress" au laboratoire

Conclusion et perspectives

- Démontrer que γ -H2AX étendu au noyau (pan-nuclear) est un biomarqueur du blocage généralisé de la replication et également de la transcription (collab. L. Tora, IGBMC) et correspond à un **signal** pour induire la mort cellulaire
 - > détection = test de l'efficacité des drogues utilisées en chimiothérapie?
- Développer un biocapteur du stress replicatif létal:
 - Expression synthétique d'un nanobody anti- γ H2AX
 - Cellules cancéreuses primaires
 - -> **Drug screening**
- Plate-forme technologique avec des animaux -> **nano-intrabodies** pour étudier d'autres cibles ou d'autres MPT impliquées dans des mécanismes de cancérogénèse
- Nanobodies et ciblage intracellulaire *in vivo*: le problème se situe au niveau de l'adressage et de la délivrance (nanoparticules? virus?)

Remerciements

Equipe MPTC (IREBS):

D. Desplancq

A. Stoessel

G. Freund

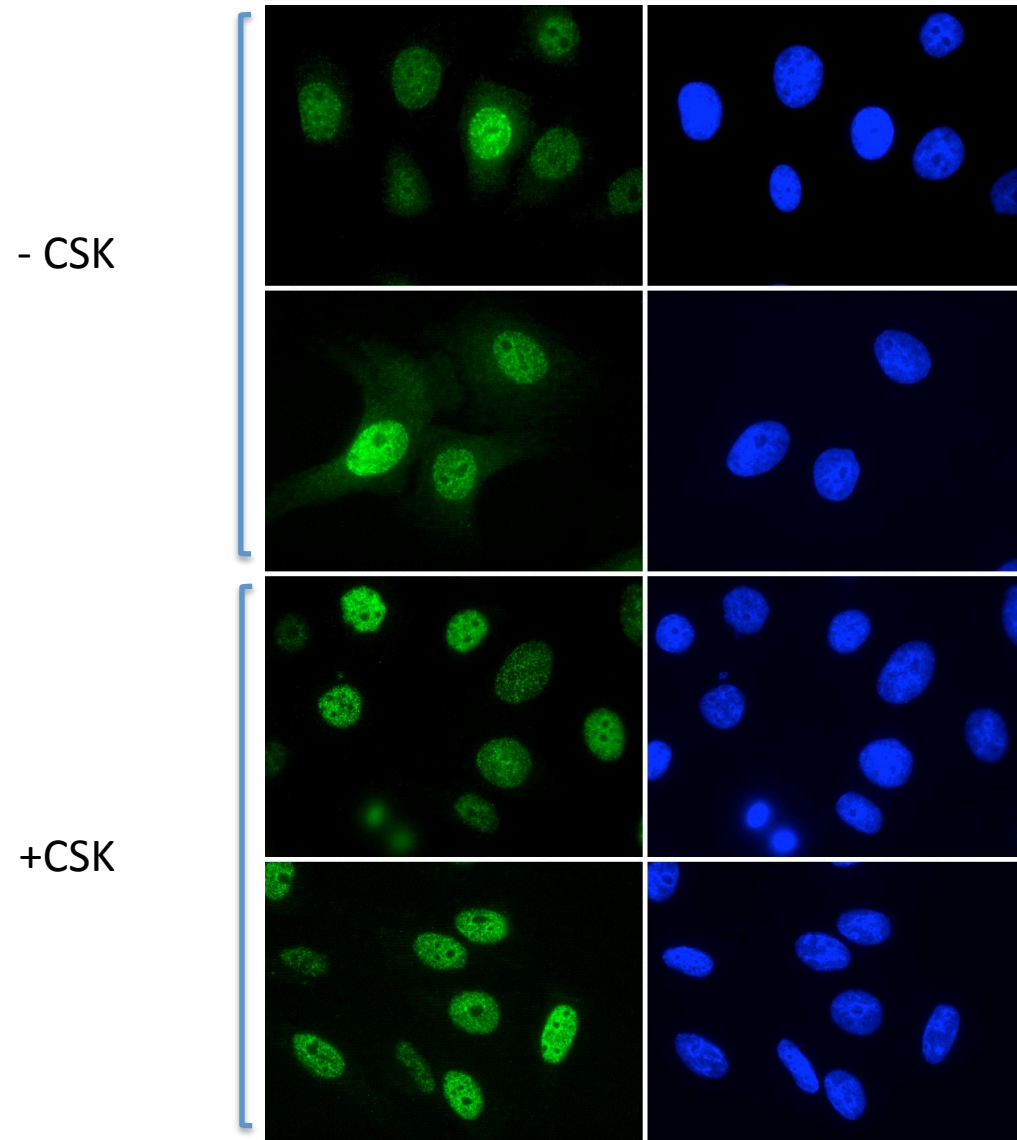
Plate-forme mAb (IGBMC):

M. Oulad-Abdelghani

Plate-forme RecAb (Institut Pasteur):

P. Lafaye





Binding specificity in cellulose.

