THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En ingénierie biomoléculaire

École doctorale ED 459 Sciences Chimiques Balard

Unité de recherche UMR 5247 – Institut des Biomolécules Max Mousseron

Développement de systèmes artificiels de reconnaissance de protéines par mimes peptidiques et par empreintes moléculaires

Présentée par Margaux Clavié
Le 9 décembre 2022

Sous la direction de Gilles Subra et Pascal Dumy

Devant le jury composé de

Didier Boturyn Directeur de recherches, UMR 5250 : Département de Chimie Moléculaire, Université de Grenoble	**Président du Jury** **Rapporteur**
Annemieke Madder Professeur, Département de Chimie Organique et Macromoléculaire, Université de Gand	**Rapportrice**
Elisabeth Garanger Chargée de recherche, UMR 5629 : Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques, Université de Bordeaux	**Examinatrice**
Ahmad Mehdi Professeur, UMR 5253 : Institut Charles Gerhardt, Université de Montpellier	**Membre invité**
Gilles Subra Professeur, UMR 5247 : Institut des biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier	**Directeur de thèse**
Pascal Dumy Professeur, UMR 5247 : Institut des biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier	**Co-directeur de thèse**

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'équipe « acides aminés, peptides et protéines » de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) et est issu de deux collaborations. La première collaboration a été réalisée avec le Laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques de Grenoble (LRB - INSERM U1039). La seconde collaboration a été menée avec quatre laboratoires montpelliérains : l'Institut des Biomolécules Max Mousseron, l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier, le Laboratoire Charles Coulomb et l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, et a été financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR).

Je remercie chaleureusement le Pr. Annemieke Madder et le Dr. Didier Boturyn pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également le Dr. Elisabeth Garanger d'avoir accepté d'être examinatrice lors de ma soutenance.

Je tiens à remercier mon co-directeur de thèse, le Pr. Pascal Dumy, pour m'avoir accueillie au sein de l'IBMM et pour m'avoir encadrée pendant ces trois ans. Je remercie également le Dr. Muriel Amblard pour m'avoir accueillie dans l'équipe F9.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à mon directeur de thèse, le Pr. Gilles Subra, pour son encadrement sans limite et pour la confiance qu'il m'a accordée, on ne peut rêver d'un meilleur directeur de thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude à toutes les personnes avec qui j'ai eu l'occasion de travailler au cours de ces trois dernières années. Je remercie mes collaborateurs de Grenoble, le Dr. Charlotte Lombardi et le Dr. Alexis Broisat, pour votre disponibilité et pour tous nos échanges. Je remercie également mes collaborateurs de Montpellier, le Pr. Ahmad Mehdi, le Pr. Catherine Perrin et le Pr. Pascal Etienne, ainsi que le Dr. Martine Pugnière, le Dr. Pierre Martineau et le Dr. Yoann Ladner. Je ne vous remercierais jamais assez pour tout ce que vous m'avez appris et apporté durant ces trois années. Je tiens à remercier tout particulièrement Raquel, Jérémie et Giang avec qui j'ai eu le plaisir de travailler quotidiennement dans la bonne humeur.

Je remercie Aurélien Lebrun et Karine Parra pour leur disponibilité et leur aide en RMN, ainsi que Pierre Sanchez pour les analyses LC/MS. Je tiens à remercier le Dr. Pascal Verdier, Luc Brunel et Elodie Carretero de la plateforme SynBio3 pour leur aide, leur accueil et leurs différentes formations. Je remercie également tous les permanents de mon équipe d'accueil, Ludovic, Nicolas, Jean-François, Séverine, JAF, Sonia, Laurent, Lubomir et Anthony, pour leur accueil, leur aide, leur disponibilité et leur gentillesse. Je tiens également à remercier tous les doctorants et post-doctorants que j'ai pu côtoyer au laboratoire au cours de ces trois dernières

années : Alex, Prisca, Anna, Miyanou, Ameni, Samantha, Audrey, Hélène, Quentin, Cécile, Pauline et Nicole.

Je remercie tout particulièrement mes collègues de laboratoire : Mathilde, Laurine et Aïcha, merci pour votre gentillesse, pour l'ambiance incroyable au labo, les fous rires et les sessions SPPS-karaoké. Je remercie également mes collègues de bureau : Fabien, Titouan, Jules, Célia, Chloé, Mylene et Anthony, pour nos discussions plus ou moins constructives et toujours dans la bonne humeur. Un grand merci à vous tous, pour tous ces moments que l'on a partagés, au labo ou au bureau.

Je tiens à remercier mes parents qui m'ont toujours soutenue et épaulée pendant toutes mes études, ainsi que mon frère et ma sœur d'avoir toujours été là pour moi. Merci également à Céline, Maxime, Marius, Margot, Marine et Kevin. Une pensée particulière à Laetitia qui ne m'a jamais lâchée. Enfin, je remercie Alexis, qui m'épaule et qui m'encourage au quotidien, et sans qui ces dernières années auraient été bien différentes.

Productions scientifiques

Publications

Gutiérrez-Climente R., Ngo G., **Clavié M.**, Gouyon J., Ladner Y., Etienne P., Dumy P., Perrin C., Mehdi A., Martineau P., Pugnière M. and Subra G. **Sol-gel polymerization of silylated amino acids around a protein template yields selective biomimetic imprints**, Materials today Chemistry, Volume 27, January 2023, 101317

Gutiérrez-Climente R., **Clavié M.**, Gouyon J., Ngo G., Ladner Y., Etienne P., Dumy P., Martineau P., Pugnière M., Perrin C., Subra G., and Mehdi A. **Development of Amino Acids Functionalized SBA-15 for the Improvement of Protein Adsorption**, *Molecules* 2021, 26, 6085.

Gutiérrez-Climente R., **Clavié M.**, Dumy P., Mehdi A., and Subra C. **Sol–gel process: the inorganic approach in protein imprinting**, *J. Mater. Chem. B*, 2021, 9, 2155.

Congrès

Communications orales

Clavié M., Gutiérrez-Climente R., Ngo G., Gouyon J., Ladner Y., Perrin C., Etienne P., Dumy P., Martineau P., Pugnière M., Mehdi A. and Subra G. **Novel hybrid precursors for sol-gel protein imprinting: silylated amino acid derivatives**, GFPP22 - BPGM5 symposium, Port-Leucate 2022.

Clavié M., Gutiérrez-Climente R., Ngo G., Gouyon J., Ladner Y., Perrin C., Etienne P., Dumy P., Martineau P., Pugnière M., Medhi A. and Subra G. **Silylated amino acids as hybrid precursors for molecularly imprinted polymers**, 9ème édition des Journées Méditerranéennes des Jeunes Chercheur(e)s, Montpellier 2021.

Poster

Clavié M., Gutiérrez-Climente R., Gouyon J., Ngo G., Ladner Y., Etienne P., Dumy P., Martineau P., Pugnière M., Perrin C., Medhi A. and Subra G. **Silylated amino acid derivatives as novel hybrid precursors for sol-gel protein imprinting**, 36th European and 12th International Peptide Symposium, Sitges 2022.

Clavié M., Gouyon J., Gutiérrez-Climente R., Mehdi A., Dumy P., Etienne P., Ladner Y., Perrin C. and Subra G. **Silylated amino acids as hybrid sol-gel precursors for protein-biomimetic surface coating: application to electrophoretic separations**, 19th International Symposium on Silicon Chemistry, online 2021.

Article de vulgarisation

Clavié M. et Subra G. **Enquête sur des systèmes de reconnaissance des protéines : les empreintes moléculaires biomimétiques**, UPVDoc 2020 (premier prix).

Table des matières

Publications 5

Congrès 5

Communications orales 5

Poster 5

Article de vulgarisation 5

Liste des figures 13

Liste des tableaux 17

Liste des équations 19

Liste des abréviations 21

Liste des aminoacides utilisés 25

Résumé 27

Abstract 29

Introduction 31

Introduction 33

Chapitre 1 37

Bibliographie : vers des anticorps artificiels 37

1 Introduction : les immunoglobulines et leurs dérivés 39

1.1 Immunoglobulines G : structures, fonctions, intérêts thérapeutiques 39

1.2 Mimes d'Immunoglobulines 42

1.2.1 Dérivés immunoglobuliques 42

1.2.2 Dérivés non-immunoglobuliques 46

2. Dérivés peptidiques – mimes des CDR 48

2.1. Ruban β 48

2.2. Criblage 49

2.3. Anticorps synthétiques 50

2.4 Multivalence 50

2.4.1 Châssis moléculaires 51

2.4.2 Nanoparticules fonctionnalisées 52

3 Les polymères à empreintes moléculaires (MIP) 54
3.1 Historique : la découverte des MIP 54
3.2 Principe général 55
3.2.1 Approche covalente 56
3.2.2 Approche non covalente 56
3.2.3 Approche semi-covalente 56
3.3 Eléments fondamentaux des empreintes 57
3.3.1 La molécule cible 57
3.3.2 Les monomères fonctionnels 58
3.3.3 La méthode de polymérisation 58
3.4 Méthodes de caractérisation 62
3.5 Propriétés de reconnaissance 63
3.6 Les empreintes de protéines par procédé sol-gel 63
3.6.1 Méthode d'immobilisation des protéines 64
3.6.2 Les monomères fonctionnels 67
3.6.3 Applications des MIP de protéines par sol-gel 71
4 Conclusion et positionnement du travail 74
Chapitre 2 75
Mimes du nanobody anti-mésothéline 75
1 Introduction 77
1.1 La mésothéline 77
1.2 Le nanobody anti-mésothéline 78
1.3 Stratégie générale 78
2 Conception et synthèse des peptides 80
2.1 Peptides linéaires 80
2.1.1 Synthèse des peptides 80
2.1.2 Ajout du bras solubilisant 81
2.1.3 Capacité de liaison à la mésothéline 82
2.2 Peptides cycliques 82
2.2.1 Synthèse de l'ATC 85

2.2.2 Synthèse des peptides cycliques 85
2.2.3 Etude structurale 88
2.2.4 Capacité de liaison à la mésothéline 91
2.3 Conclusion 93
3 Les nanoparticules fonctionnalisées 94
3.1 Nanoparticules fonctionnalisées avec les peptides mimes de CDR 95
3.1.1 Synthèse des nanoparticules de silice 95
3.1.2 Synthèse des peptides silylés 96
3.1.3 Greffages des peptides sur les nanoparticules 99
3.1.4 Capacité de liaison à la mésothéline 101
3.2 Nanoparticules fonctionnalisées avec les PEG-peptides 105
3.2.1 Synthèse des nanoparticules 106
3.2.2 Synthèse des Si-PEG-peptides 106
3.2.3 Greffage des Si-PEG-peptides sur les nanoparticules 109
3.3 Perspectives 110
4 Conclusion 111
Chapitre 3 113
Anticorps artificiels : empreintes de protéines 113
1 Description de la stratégie 115
2 Conception et synthèse des monomères fonctionnels 118
2.1 Le choix des acides aminés 118
2.2 Les dicétopipérazines 118
2.2.1 Choix du groupement protecteur de l'alcoxysilane 119
2.2.2 Synthèse des dicétopipérazines 119
2.2.3 Stabilité du groupement protecteur de l'alcoxysilane 122
2.2.4 Conclusion 124
2.3 Les dérivés acides aminés silylés 124
2.3.1 Conditions a : la DIEA comme base 125
2.3.2 Conditions b : le $NaHCO_3$ comme base pour Ser, Arg et Leu 126
2.3.3 Conditions c : le cas de l'acide glutamique 127

2.3.4 Vérification de l'état d'hydrolyse des Si-AA-NH_2 129
2.4 Conclusion 130
3 Fonctionnalisation des capillaires d'électrophorèse capillaire avec les Si-AA-NH_2 132
3.1 Introduction à l'électrophorèse capillaire 132
3.2 Greffage des Si-AA-NH_2 dans les capillaires 134
3.3 Détermination du flux électroosmotique 135
3.4 L'adsorption des protéines 136
3.5 Conclusion 138
4 Synthèse des empreintes 140
4.1 Les protéines modèles 141
4.2 Synthèse des nanoparticules magnétiques core-shell 141
4.3 Adsorption de la protéine 142
4.4 Synthèse des MIP 144
4.4.1 Fe_3O_4@MIP/NIP-1 : CytC - APTES, PTES, TEOS 146
4.4.2 Fe_3O_4@MIP/NIP-2 : CytC – Si-Arg-NH_2, Si-Leu-NH_2, TEOS 147
4.4.3 Fe_3O_4@MIP/NIP-3 : CytC - Si-Tyr-NH_2, Si-Ser-NH_2, TEOS 149
4.4.4 Fe_3O_4@MIP/NIP-4 : CytC - Si-Tyr-NH_2, Si-Ser-NH2, Si-Arg-NH_2, Si-Leu-NH_2, TEOS ... 150
4.4.5 Fe_3O_4@MIP/NIP-5 : CytC - Si-Tyr-NH_2, Si-Ser-NH_2, Si-Arg-NH_2, Si-Leu-NH_2 151
4.4.6 Fe_3O_4@MIP/NIP-6 : Lyz - Si-Tyr-NH2, Si-Ser-NH2, Si-Arg-NH2, Si-Leu-NH2 152
4.4.7 Détermination de la composition en monomères des Fe_3O_4@MIP/NIP-5 et Fe_3O_4@MIP/NIP-6 153
4.5 Etude des performances des Fe_3O_4@MIP-5 et Fe_3O_4@MIP-6 156
4.5.1 QCM-d 156
4.5.2 ELISA magnétique 160
4.6 Conclusion 162
5 Empreintes d'épitopes 163
5.1 Synthèse de l'épitope 164
5.1.1 Choix de l'épitope 164
5.1.2 Conception des peptides 164
5.1.3 Synthèse des peptides 165

5.1.4 Analyse de l'hélicité par dichroïsme circulaire 166
5.1.5 Introduction du lien clivable et synthèse des empreintes 168
5.2 Conclusion 169
6 Vers des MIP sur différents supports 170
6.1 Sur les puces de la QCM-d 170
6.2 Dans les capillaires d'électrophorèse capillaire 171
6.2.1 Stratégie 2D 171
6.2.2 Stratégie 3D 172
6.2.3 Capacité de reconnaissance des MIP en capillaires 173
7 Conclusion 176
Conclusion 179
Références 183
Partie expérimentale 193

Liste des figures

Figure 1 - Stratégie générale des systèmes artificiels de reconnaissance de protéines 35
Figure 2 - Structure d'une immunoglobuline G 39
Figure 3 - Anticorps mono et polyclonaux 40
Figure 4 - Méthodes de production des anticorps monoclonaux 41
Figure 5 - Dérivés d'anticorps à structure immunoglobulique 42
Figure 6 - Structure des nanobodies VHH et V_{NAR} 44
Figure 7 - Structure des assemblages protéiques bispécifiques 45
Figure 8 - Structures de dérivés non-immunoglobuliques 46
Figure 9 - Mime de ruban β induit par un motif d-pro-L-Pro (adapté de Robinson[52]) 48
Figure 10 - Structure générale d'un β-body (adapté de Hu et al.[56]) 49
Figure 11 - Criblage par chimie click *in situ* ciblant les épitopes (adapté de Das et al.[57]) 50
Figure 12 - Anticorps synthétiques proposés par McEnaney *et al.*[58] 50
Figure 13 - Structure générique d'un RAFT 51
Figure 14 - Structure des peptidomimétiques dérivés de CDR utilisant le cyclotrivératrylène comme châssis moléculaire (adapté de Longin *et al*.[62]) 52
Figure 15 - Principe général des polymères à empreintes moléculaires. 55
Figure 16 - Approche covalente 56
Figure 17 - Approche non covalente 56
Figure 18 - Approche semi-covalente 57
Figure 19 - Structures générales de monomères fonctionnels avec en rouge l'unité polymérisable et en bleu l'unité de reconnaissance 58
Figure 20 - Mécanisme général de polymérisation radicalaire avec l'AIBN comme initiateur. 59
Figure 21 - Réactions d'hydrolyse et de condensation d'un alcoxyde de silicium 60
Figure 22 - Cinétique de l'hydrolyse (rouge) et de la condensation (bleu) du TEOS en fonction du pH[89] et influence du pH sur la morphologie finale du matériau 60
Figure 23 - Monomères hybrides organiques-inorganiques modulant les propriétés physico-chimiques des matériaux à base de silice 61
Figure 24 - Matériaux hybrides de classes I et II 62
Figure 25 - Principales réactions entre le GA et des amines primaires 65
Figure 26 - Réactions possibles entre le GA et des alcools et thiols 66
Figure 27 - Approche semi-covalente des MIP de protéines 67
Figure 28 - Monomères fonctionnels organiques (à gauche)[65] et inorganiques (à droite) commerciaux mimant les chaînes latérales des acides aminés protéogéniques 67
Figure 29 - Monomères fonctionnels commerciaux et de synthèse utilisés pour les empreintes moléculaires de protéines par procédé sol-gel 68

Figure 30 - Synthèse des acides aminés N-Boc silylés sur la fonction acide via un anhydride mixte 69
Figure 31 - Synthèse des acides aminés silylés sur la fonction acide via une activation au benzotriazole 69
Figure 32 - Silylation d'acide aminés sur la fonction amine avec l'ICPTES 70
Figure 33 - Synthèse de la tyrosine bisilylée (TBOS) 70
Figure 34 - Silylation de la cystéine sur sa chaîne latérale 71
Figure 35 - Structure de la Mésothéline A prédite par AlphaFold 77
Figure 36 - Stratégie générale pour l'obtention de mimes du nanobody anti-mésothéline 79
Figure 37 - Synthèses et évaluation des peptides par test ELISA 80
Figure 38 - Valeur d'absorbance détectée à 450 nm pour les tests ELISA des peptides A7 à A12 à 10 et 100 µmol/L, en rouge avec la mésothéline et en bleu sans la mésothéline 82
Figure 39 - Structure générique d'un (S)-ATC 83
Figure 40 - Synthèse divergente des peptides cycliques. 84
Figure 41 - Synthèse de l'ATC 85
Figure 46 - Type de corrélations NOE attendues avec un coude β 88
Figure 47 - Composé A36 89
Figure 48 - Corrélations NOE fortes et moyennes 91
Figure 42 - Evaluation des peptides cycliques par test ELISA 91
Figure 43 - Valeur d'absorbance détectée à 450 nm pour les tests ELISA des peptides A34, A36 et A38 à différentes concentrations 92
Figure 44 - Principe du BLI 92
Figure 45 - Liaisons des peptides et du nanobody avec la mésothéline obtenues par BLI 93
Figure 49 - Comportement schématique des PEG ou des peptides greffés sur la surface d'une nanoparticule, en fonction du rayon de Flory R_F et de la distance entre deux points d'ancrage D 94
Figure 50 - Synthèse des nanoparticules fluorescentes 95
Figure 51 - Déplacement chimique des trois acides aminés fluorés utilisés pour la quantification des peptides greffés 97
Figure 52 - LC/MS d'un peptide silylé - exemple du composé A40 98
Figure 53 - Synthèse et greffage des peptides silylés 100
Figure 54 - Test ELISA simplifié 102
Figure 55 - Résultats des tests ELISA 102
Figure 56 - Analyses des nanoparticules par QCM-d 104
Figure 57 - Immobilisation de la mésothéline 104
Figure 58 - Interactions entre la mésothéline et les NP@CDR2-N-C-ter et NP@CDR3-N-C-ter. 105
Figure 59 - Synthèse et greffage des PEG-peptides silylés 106

Figure 60 - Vérification des couplages BocHN-PEG-peptide avec les spectres RMN HMBC (^{1}H-^{13}C) de 1,5 à 5,5 ppm (^{1}H) et de 160 à 185 ppm (^{13}C) 108
Figure 61 - Vérification des couplages BocHN-PEG-peptide avec les spectres RMN HMBC (^{1}H-^{13}C) de 2,0 à 5,5 ppm (^{1}H) et de 160 à 185 ppm (^{13}C) 111
Figure 62 - Stratégie Générale pour l'obtention d'empreintes de protéines 117
Figure 63 - Acides aminés choisis et structures des monomères fonctionnels 118
Figure 64 - Mécanisme de formation des dicétopipérazines sur résine Wang lors de la déprotection du second aminoacide, en stratégie Fmoc 119
Figure 65 - Voie de synthèse des dicétopipérazines silylées 120
Figure 66 - Analyse LC/MS et RMN ^{1}H de la DKP-Tyr (composé B8) 122
Figure 67 - Etude de la stabilité du groupement TMS dans le D_2O/CD_3CN/0,1%TFA et dans le TFA-d 123
Figure 68 - Silylation des amides aminés avec l'ICPTES 124
Figure 69 - Synthèse des Si-AA-NH_2 avec l'ICPTES et la DIEA comme base (conditions a) 125
Figure 70 - Calcul du pourcentage de la DIEA par RMN ^{1}H (500 MHz, 25°C) 126
Figure 71 - Synthèse des Si-AA-NH_2 avec l'ICPTES et le $NaHCO_3$ comme base (conditions b) 127
Figure 72 - Comparaison des spectres RMN ^{1}H de la Si-Ser-NH_2 synthétisée avec de la DIEA (rouge) ou du $NaHCO_3$ (bleu) 127
Figure 73 - Silylation de l'isoglutamine avec le N-[3-tris(triméthylsiloxy)silylpropyl]-imidazole-1-carboxamide 128
Figure 74 - Synthèse Si-Glu-NH_2 avec l'ICPTES et le TFA comme contre-ion (conditions c) 129
Figure 75 - Vérification de l'état d'hydrolyse des Si-AA-NH_2. Exemple sur le composé B13a ... 129
Figure 76 - Spectres RMN ^{1}H des Si-AA-NH_2 130
Figure 77 - Principe de l'électrophorèse capillaire 132
Figure 78 - Mobilités électrophorétique, électroosmotique et apparente 133
Figure 79 - Fonctionnalisation des capillaires 134
Figure 80 - Variation du flux électroosmotique à pH2 et pH7 et à t0 et t7j en fonction du Si-AA-NH_2 greffé 135
Figure 81 - Electrophérogrammes de Lys, RibA et CytC à pH7 et pH2 138
Figure 82 - Image MET des nanoparticules magnétiques core-shell Fe_3O_4@SiO_2 141
Figure 83 - Analyses nanoDSF du CytC et du Lyz à pH 6,5 ; 7,4 et 9,5 142
Figure 84 - Synthèse des Fe_3O_4@MIP et des Fe_3O_4@NIP 146
Figure 85 - Image MET du Fe_3O_4@MIP/NIP-1 147
Figure 86 - Image MET du Fe_3O_4@MIP/NIP-2 148
Figure 87 - Image MET du Fe_3O_4@MIP/NIP-3 149
Figure 88 - Image MET du Fe_3O_4@MIP/NIP-4 150
Figure 89 - Image MET du Fe_3O_4@MIP/NIP-5 151
Figure 90 - Image MET du Fe_3O_4@MIP/NIP-6 152

Figure 91 - Structures du CytC (PDB : 1HRC) et Lyz (PDB : 4LZM) en couleur pour visualiser les zones hydrophobes (jaune), chargées positivement (rouge) et négativement (bleu) 153
Figure 92 - Spectres RMN ^{1}H de SiO_2@MIP-5, SiO_2@MIP-6, SiO_2@NIP-5, SiO_2@NIP-6, et sol (600 MHz, NaOD 1,5 mol/L, 25°C). 154
Figure 93 - Cinétique d'hydrolyse des Si-AA-NH_2 dans les conditions de synthèse des MIP 155
Figure 94 - Principe de l'analyse des MIP/NIP par microbalance à quartz avec étude de la dissipation 157
Figure 95 - Masse par cm² et facteur d'empreinte des particules MIP/NIP-1 à 5 liées au CytC immobilisé à la surface du capteur QCM-d 158
Figure 96 – Masse par cm² et facteur d'empreinte des particules MIP/NIP-5 et 6 liées aux protéines modèles (CytC et Lyz) et non modèles (BSA et Lac) 160
Figure 97 - Principe du test ELISA magnétique utilisé pour analyser la sélectivité des MIP : exemple du CytC 161
Figure 98 - Résultats des tests mELISA du Fe_3O_4@MIP/NIP-5 (gauche) pour le CytC seul et en mélange et du Fe_3O_4@MIP/NIP-6 (droite) pour le Lyz seul et en mélange 162
Figure 99 - Stratégie générale de la synthèse d'empreintes de l'épitope de la kallikréine 164
Figure 100 - Structure de la kallikréine porcine pancréatique (PDB : 2PKA) et des peptides synthétisés 165
Figure 101 - Structures des peptides imaginés 165
Figure 102 - Produits secondaires formés pendant la métathèse. Exemple du composé B21. 166
Figure 103 - Spectres dichroïques des composés B20 à B22 à 200 µmol/L dans de l'eau contenant 0,1% de triéthanolamine 167
Figure 104 - Préparation des films, estimation de l'épaisseur et liaison avec le CytC 170
Figure 105 - Synthèse du monolithe dans le capillaire 172
Figure 106 - Comparaison des électrophérogrammes obtenus dans les capillaires NIP-3D et MIP-3D-Lyz pour le Lyz (en bleu), le CytC (en rouge) et la RibA (en vert) 174
Figure 107 - Facteurs de rétention et facteurs d'empreinte obtenus pour les MIP-Lyz et MIP-CytC par stratégie 3D et 2D avec le Lyz, le CytC et la RibA 175
Figure 108 - Courbe de calibration de la fluorescéine dans une solution de NaOH à 1,5 mol/L 223

Liste des tableaux

Tableau 1 - Séquences des premiers peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline 81
Tableau 2 - Séquences des peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline après l'ajout du bras solubilisant. 81
Tableau 3 - Structures des peptides cycliques mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline 87
Tableau 4 - Attributions des déplacements chimiques des protons 89
Tableau 5 - Attributions des déplacements chimiques des carbones et des azotes 89
Tableau 6 - Volumes des CH_2 diastéréotopiques utilisés pour la calibration 90
Tableau 7 - Taches de corrélation NOE avec un volume supérieur à 0,502 $Å^3$ 90
Tableau 8 - Séquences des peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline avant silylation 97
Tableau 9 - Séquences des peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline après silylation 99
Tableau 10 - Tailles et fonctionnalisations des nanoparticules avec les peptides silylés 101
Tableau 11 - Mesures de taille et de potentiel zêta des nanoparticules fonctionnalisées analysées par QCM-d 102
Tableau 12 - Séquences des peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline avant PEGylation 107
Tableau 13 - Séquences des peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline après PEGylation 107
Tableau 14 - Séquences des peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline après déprotection de l'amine N-Boc 108
Tableau 15 - Séquences des peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline après silylation 108
Tableau 16 - Synthèse du PEG fluoré silylé 109
Tableau 17 - Taille, potentiel zêta et densité de greffages des nanoparticules fonctionnalisées par les PEG-ligands A73, A74 et A78 109
Tableau 18 - Séquences des peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline après PEGylation 110
Tableau 19 - Dicétopipérazines obtenues à partir du composé B2 122
Tableau 20 - Résumé des conditions de synthèse des dérivés d'acides aminés silylés avec l'ICPTES 131
Tableau 21 - Mobilité électrophorétique (μ_{EP})et taux d'adsorption (Ads) des protéines sur les capillaires fonctionnalisés 137
Tableau 22 - Récapitulatif structural des protéines utilisées 141

Tableau 23 - Composition de synthèse des Fe_3O_4@MIP/NIP (sur 100 mg de nanoparticules Fe_3O_4@SiO_2) 145
Tableau 24 - Composition et propriétés des particules avec et sans empreintes 146
Tableau 25 - Composition et propriétés des particules de silices avec et sans empreintes ... 153
Tableau 26 - Composition en Si-AA-NH_2 des empreintes obtenues à partir des intégrales RMN normalisées et déplacements chimiques des signaux de référence 154
Tableau 27 - Propriétés des protéines et des couches de protéines immobilisées sur le capteur QCM-d 159
Tableau 28 - Pourcentage d'hélicité des composés B20 à B22 en fonction du pourcentage de TFE 167
Tableau 29 - Attributions des déplacements chimiques des protons du composé A64 239
Tableau 30 - Attributions des déplacements chimiques des carbones du composé A64 239
Tableau 31 - Attributions des déplacements chimiques des protons du composé A65 240
Tableau 32 - Attributions des déplacements chimiques des carbones du composé A65 240
Tableau 33 - Attributions des déplacements chimiques des protons du composé A66 240
Tableau 34 - Attributions des déplacements chimiques des carbones du composé A66 241
Tableau 35 - Attributions des déplacements chimiques des protons et des carbones du BocHN-PEG(2000)-CO_2H (1) 241
Tableau 36 - Attributions des déplacements chimiques des protons du composé A67 côté peptide 242
Tableau 37 - Attributions des déplacements chimiques des carbones du composé A67 côté peptide 242
Tableau 38 - Attributions des déplacements chimiques des protons et des carbones du composé A67 côté PEG 242
Tableau 39 - Attributions des déplacements chimiques des protons du composé A68 côté peptide 243
Tableau 40 - Attributions des déplacements chimiques des carbones du composé A68 côté peptide 243
Tableau 41 - Attributions des déplacements chimiques des protons et des carbones du composé A68 côté PEG 243
Tableau 42 - Attributions des déplacements chimiques des protons du composé A69 côté peptide 244
Tableau 43 - Attributions des déplacements chimiques des carbones du composé A69 côté peptide 244
Tableau 44 - Attributions des déplacements chimiques des protons et des carbones du composé A69 côté PEG 244
Tableau 45 - Attributions des déplacements chimiques des protons et des carbones du BocHN-PEG(2000)-CO_2H (2) 251

Liste des équations

Équation 1 - Détermination du facteur d'empreinte (FE), où Q_{MIP} est la quantité de cibles liées au MIP et Q_{NIP} la quantité de cibles liées au NIP 63
Équation 2 - Détermination du volume d'une tache de corrélation ($Å^3$) ; avec C la calibration ($Å^{-3}$) et r la distance ($Å^6$) 90
Équation 3 - Calibration du spectre 90
Équation 4 - Rayon de Flory avec α la longueur effective du monomère et N le degré de polymérisation 94
Équation 5 - Distance entre deux points d'ancrage avec σ la densité de greffage par unité de surface (N/nm^2) 94
Équation 6 - Equation de Sauerbrey 103
Équation 7 - Détermination du flux électroosmotique 135
Équation 8 - Détermination du volume de la particule sphérique $Fe_3O_4@SiO_2$ (Tableau 24) .. 143
Équation 9 - Détermination du nombre de particules engagées dans la synthèse 143
Équation 10 - Détermination du nombre de CytC par nanoparticule, avec N_A la constante d'Avogadro 143
Équation 11 - Détermination de la surface d'une particule sphérique avec r le rayon de la particule $Fe_3O_4@SiO_2$ (Tableau 24) 143
Équation 12 - Détermination du nombre de CytC par nm^2 sur la particule $Fe_3O_4@SiO_2$ 144
Équation 13 - Détermination du facteur d'empreinte (FE) 158
Équation 14 - Détermination du pourcentage d'hélicité à 222 nm[195] 167
Équation 15 - Détermination du facteur de rétention k, où t_r est le temps de rétention, μ_{EOF} le flux électroosmotique, μ_{EP} la mobilité électrophorétique, V la tension, l la longueur de détection et L la longueur du capillaire 174
Équation 16 - Détermination du facteur d'empreinte à partir des facteurs de rétention 174
Équation 17 - Détermination de la quantité de fluorescéine encapsulée dans les nanoparticules lyophilisées. 223
Équation 18 - Détermination du nombre de nanoparticules à partir de la masse de nanoparticules 223
Équation 19 - Détermination du nombre de fluorescéines par nanoparticules 224

Liste des abréviations

[TMSPMIM]Cl	1-(3-trimethoxysilylpropyl)-3-methylimidazolium chloride
3F	(3,3,3-trifluoropropyl)triméthoxysilane
AA	Aminoacide
Ac	Acétyle
Ac1	Anticorps primaire
ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2
ACN	Acétonitrile
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Acide adénosine-diphosphorique
Alloc	Allyloxycarbonyle
APTES	3-aminopropyltriéthyxosilane
APTMS	3-aminopropyltrimethoxysiloxane
AR	Répétition de l'ankyrine
ATC	Acide 4-amino(méthyle)-1,3-thiazole-5-carboxylique
ATG	Analyse thermogravimétrique
AU	Arbitrary unit
BGE	Background electrolyte
BHb	Hémoglobine bovine
bIgG	Bovine immunoglobulin G
BITE	Bispecific T cell engager
BLI	Biolayer interferometry
Boc	tert-Butyloxycarbonyle
BSA	Bovin Serum Albumin
CDI	Carbonyldiimidazole
CDR	Région déterminant la complémentarité
CDR-H	Région déterminant la complémentarité de la chaîne H
CDR-L	Région déterminant la complémentarité de la chaîne L
CH1	1er domaine constant de la chaîne H
CH2	2e domaine constant de la chaîne H
CH3	3e domaine constant de la chaîne H
CL	Domaine constant de la chaîne L
COSY	COrrelated SpectroscopY
CuAAc	Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition
CytC	Cytochrome C
d	Doublet
DARPin	Designed ankyrin repeat proteins
DART	Dual affinity re-targeting
DCE	1,2-dichloroéthane
DCM	Dichlorométhane
dd	Doublet dédoublé
DIC	Diisopropylcarbodiimide
DIEA	Diisopropyléthylamine
DKP	Dicétopipérazine
DLS	Dynamic Light Scattering
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMDMS	Diméthyldiméthoxysilane
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxide
DMSO-d6	Diméthylsulfoxide deutéré
EC	Electrophorèse capillaire
ECZ	Electrophorèse capillaire de zone
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

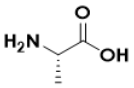
EOF	Mobilité/flux électroosmotique
EP	Mobilité/flux électrophorétique
ESI+	Electrospray mode positif
Et2O	Diéthyle éther
EtOH	Ethanol
Fab	Fragment antigen-binding
Fc	Fragment crystallizable
FcγR	Fc-gamma receptors
FDA	Food and Drug Administration
FE	Facteur d'empreinte
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle
GA	Glutaraldéhyde
GFP	Green fluorescent protein
GPI	Glycophosphatidylinositol
GPTMS	(3-Glycidyloxypropyl)triméthoxysilane
HAPTES	Bis(2-hydroxy-ethyl)aminopropyltriéthoxysilane
HATU	Hexafluorophosphate Azabenzotriazole Tetramethyl Uronium
HCAb	Heavy chain only antibodies
HMBA	4-Hydroxymethylbenzoic acid
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	Chromatographie liquide haute pression
HRP	Horseradish peroxidase
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
HV	Région hypervariable
ICPTES	Isocyanatopropyltriéthoxysilane
IgG	Immunoglobuline G
IgNAR	Immunoglobulin new antigen receptors
IL-1β	Interleukin 1 beta
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
KH-570	3-methacryloxypropyltrimethoxysilane
KLK	Kallikréine
k_{off}	Constante de dissociation
k_{on}	Constante d'association
Lac	Lactalbumine
LC/MS	Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse
LiHMDS	bis(triméthylsilyle)-amidure de lithium
Lyz	Lysozyme
m	Multiplet
MEB	Microscop(i)e électronique à balayage
mELISA	Magnetic Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
MeOH	Méthanol
MeOH-d4	Méthanol deutéré
MET	Microscop(i)e électronique à transmission
MF	Monomère fonctionnel
MIP	Molecularly imprinted polymer
MPEPTMS	2-[methoxy(polyethyleneoxy)propyl]triméthoxysilane(oligo-(ethyleneoxide)-silane)
MRE	Mean residue ellipticity
MS	Spectrométrie de masse
MSLN	Mésothéline
MTMS	Méthyltriméthoxysilane
nano-DSF	Nano-differential scanning fluorimetry
Nb	Nanobody
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NIP	Non molecularly imprinted polymer
NOE	Nuclear Overhauser effect

NP	Nanoparticule
NVOC	Nitrovératryloxycarbonyle
ODTMS	Octadécyltriméthoxysilane
OTES	n-Octyltriéthoxysilane
OTMS	n-Octyltriméthoxysilane
pBQ	p-Benzoquinone
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein data bank
PEG	Polyéthylène glycol
pH	Potentiel hydrogène
pI	Point isoélectrique
pNPP	para-Nitrophénylphosphate
PS	Polystyrène
PSA	Prostate-specific antigen
PSAM	Prostate-specific membrane antigen
PTEOS	Phenyltriéthoxysilane
PTES	n-Propyltriéthoxysilane
PTMOS	Phenyltriméthoxysilane
PTMS	n-Propyltriméthoxysilane
PyBop	1H-1, 2, 3-benzotriazol-1-yloxy)-tris(pyrrolidino)-phosphonium hexafluorophosphate
q	Quadruplet
QCM-d	Microbalance à quartz avec contrôle de la dissipation
R8	(R)-octénylalanine
RAFT	Regioselectively Addressable Functionalized Templates
Rdt	Rendement
RF	Rayon de Flory
RH	Rayon hydrodynamique
RibA	Ribonucléase A
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROESY	Rotating-Frame NOE Spectroscopy
rpm	Rotation par minute
s	Singulet
S5	(S)-penténylalanine
SAM	Monocouche auto-assemblée
SBA-15	Santa Barbara Amorphous-15
scFv	Single-chain variable fragment
SN2	Substitution nucléophile de type 2
sol-gel	Solution gélification
SPA	Staphylococcique A
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
SPR	Surface plasmon resonance
t	Triplet
TandAbs	Tetravalent tandem antibodies
TBOS	Tyrosine bissilylated organic precursor
tBu	tert-Butyle
TEA	Triéthylamine
TEOS	Tétraéthyle orthosilicate
TFA	Acide trifluoroacétique
TFE	Trifluoroéthanol
THF	Tétrahydrofurane
TIS	Triisopropylsilane
TMOS	Tétraméthyle orthosilicate
TMS	Triméthylsilyle
TNT	Trinitrotoluène
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy

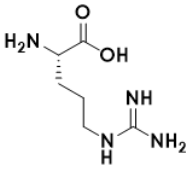
UPLC	Chromatographie liquide ultra-haute pression
UPLC/MS	Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse
UV-Vis	Ultraviolet visible
VH	Domaine variable de la chaîne H
VHH	Variable Domain of Heavy-chain Antibodies
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VL	Domaine variable de la chaîne L
VRS	Virus respiratoire syncytial humain
Z	Carboxybenzyle

Liste des aminoacides utilisés

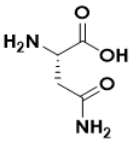
Alanine
Ala, A



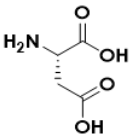
Arginine
Arg, R



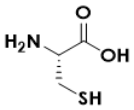
Asparagine
Asn, N



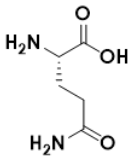
Acide aspartique
Asp, D



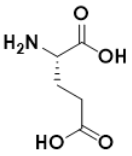
Cystéine
Cys, C



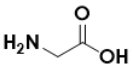
Glutamine
Gln, Q



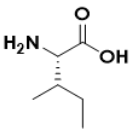
Acide glutamique
Glu, E



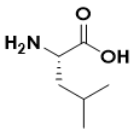
Glycine
Gly, G



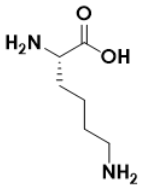
Isoleucine
Ile, I



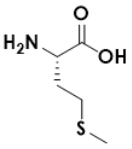
Leucine
Leu, L



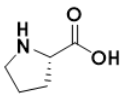
Lysine
Lys, K



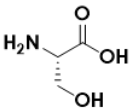
Méthionine
Met, M



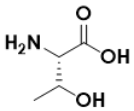
Proline
Pro, P



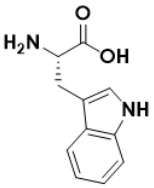
Sérine
Ser, S



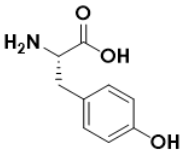
Thréonine
Thr, T



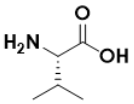
Tryptophane
Trp, W



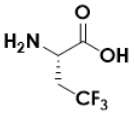
Tyrosine
Tyr, Y



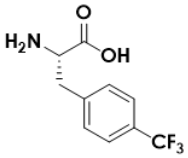
Valine
Val, V



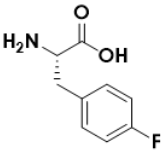
Trifluorométhylalanine
Ala(CF_3)



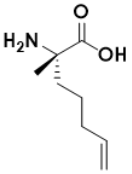
Trifluorométhylphénylalanine
Phe(CF_3)



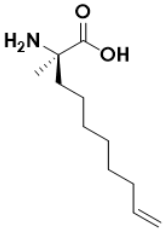
4-fluorophénylalanine
Phe(F)



(S)-pentenylalanine
S5



(R)-octenylalanine
R8



Résumé

Les anticorps présentent d'extraordinaires capacités de reconnaissance pour leurs cibles, mais leur poids moléculaire élevé et leur coût de fabrication freinent le développement de leurs applications. Ce travail de thèse porte donc sur le développement d'anticorps artificiels, présentant un poids moléculaire réduit et une meilleure stabilité. Ce manuscrit de thèse est divisé en trois chapitres, présentant dans un premier temps l'état de l'art des différents mimes d'anticorps protéiques, peptidiques et des matériaux présentant des capacités de reconnaissance pour une cible (les polymères à empreintes moléculaires), suivi des deux axes de développement du projet : la synthèse de mimes peptidiques d'un nanobody et la mise au point de polymères à empreintes moléculaires capables de reconnaître une protéine.

Le premier chapitre commence par une description structurelle et biologique des anticorps ainsi que leurs intérêts thérapeutiques, suivi d'un descriptif de mimes protéiques obtenus par expression recombinante. Ensuite, différents dérivés peptidiques sont présentés, ainsi que différentes stratégies pour une présentation multivalente de ces dérivés peptidiques. Enfin, une description des polymères à empreintes moléculaires est présentée ainsi que leur utilisation comme potentiels anticorps artificiels.

Le deuxième chapitre porte sur la synthèse de mimes du nanobody anti-mésothéline. Une brève introduction décrit l'intérêt de la mésothéline comme cible thérapeutique ainsi que le développement du nanobody anti-mésothéline, le modèle d'étude. Les séquences peptidiques d'intérêt ont été déterminée à partir des régions déterminant la complémentarité du nanobody. Dans un premier temps, des dérivés peptidiques linéaires puis cycliques ont été synthétisés et leur affinité pour la cible a été évaluée. Dans un second temps, ces dérivés peptidiques ont été greffés sur des nanoparticules de silice, afin d'augmenter leur affinité par un effet combiné d'avidité et de multivalence. Ces nanoparticules ont été caractérisées et leur affinité pour la cible a été évaluée.

Le troisième chapitre porte sur le développement des polymères à empreintes moléculaires de protéines. Afin de réaliser ces matériaux dans un milieu biocompatible permettant de conserver la structure des protéines, le procédé sol-gel a été choisi comme méthode de polymérisation. Dans un premier temps, de nouveaux monomères fonctionnels capables d'être engagés dans ce procédé et également d'établir des interactions avec les protéines ont été développés et ont été utilisés pour fonctionnaliser différents supports à base de silice afin d'en moduler les propriétés. Dans un second temps, ces nouveaux monomères fonctionnels ont été utilisés pour le développement d'empreintes de protéines dans des conditions biocompatibles. Enfin, cette méthode de synthèse d'empreintes a été adaptée à différents supports pour élargir le champ des applications de ces matériaux.

Au cours de cette thèse, deux stratégies ont été mises au point pour obtenir des mimes d'anticorps. Ces deux stratégies ont abouti au développement de nouveaux dérivés peptidiques ainsi que leur modification pour leur greffage sur des nanoparticules, et également au développement de nouveaux monomères fonctionnels permettant la synthèse d'empreintes de protéines. Différentes perspectives sont envisagées pour ces deux stratégies. D'une part, afin d'améliorer les propriétés de reconnaissance des nanoparticules mimes du nanobody anti-mésothéline, un motif PEG peut être ajouté pour obtenir une meilleure présentation des peptides. D'autre part, pour éviter l'utilisation de protéines entières lors de la synthèse des empreintes, la synthèse d'empreintes d'épitopes structurés est envisagée.

Abstract

Antibodies have extraordinary recognition capacities for their targets, but their high molecular weight and manufacturing cost hinder the development of their applications. This thesis focuses on the development of artificial antibodies, with a reduced molecular weight and a better stability. This thesis manuscript is divided into three chapters, first presenting the state of art of the different protein and peptide antibody mimes and the materials presenting recognition capacities for a target (molecularly imprinted polymers), followed by the two development axes of the project: the synthesis of peptide mimes of a nanobody and the development of molecularly imprinted polymers capable of recognizing a protein.

The first chapter starts with a structural and biological description of antibodies and their therapeutic interests, followed by a description of protein mimes obtained by recombinant expression. Then different peptide derivatives are described, as well as different strategies for a multivalent presentation of these peptide derivatives. Finally, a description of molecularly imprinted polymers is described as well as their use as potential artificial antibodies.

The second chapter focuses on the synthesis of anti-mesothelin nanobody mimics. A brief introduction describes the interest of mesothelin as a therapeutic target as well as the development of the anti-mesothelin nanobody, the study model. The peptide sequences of interest were determined from the complementarity determining regions of the nanobody. First, linear, and then cyclic peptide derivatives were synthesized and their affinity for the target was evaluated. In a second step, these peptide derivatives were grafted onto silica nanoparticles to increase their affinity by a combined effect of avidity and multivalence. These nanoparticles were characterized and their affinity for the target was evaluated.

The third chapter focuses on the development of protein molecular imprinted polymers. To realize these materials in a biocompatible medium allowing to preserve the protein structure, the sol-gel process was chosen as polymerization method. In a first step, new functional monomers able to be engaged in this process and to establish interactions with proteins were developed and used to functionalize different silica-based supports in order to modulate their properties. In a second step, these new functional monomers were used for the development of protein imprints under biocompatible conditions. Finally, this method of imprinting has been adapted to different supports to extend the range of applications of these materials.

During this thesis, two strategies were developed to obtain antibody mimics. These two strategies led to the development of new peptide derivatives and their modification for grafting onto nanoparticles, as well as to the development of new functional monomers allowing the synthesis of protein imprints. Different perspectives are envisaged for these two

strategies. On the one hand, to improve the recognition properties of anti-mesothelin nanobody mimics, a PEG moiety can be added to obtain a better presentation of the peptides. On the other hand, to avoid the use of whole proteins during the synthesis of the imprints, the synthesis of structured epitope imprints is considered.

Introduction

Introduction

Les anticorps sont des protéines produites par les lymphocytes B pour reconnaître spécifiquement des antigènes. Les antigènes sont des molécules exogènes qui peuvent être produites par des agents pathogènes, ou des biomolécules du soi dans le cas de maladies auto-immunes ou encore des cellules cancéreuses. Ces protéines hétérodimériques, d'environ 150 kDa, sont constituées de quatre chaînes (deux chaînes lourdes et deux chaînes légères) présentant chacune trois régions variables déterminant la complémentarité dans leur domaine N terminal. Les régions variables constituent le paratope qui permet la liaison spécifique à l'antigène. La partie de l'antigène reconnue par le paratope est appelé l'épitope.[1,2] La spécificité des anticorps pour leurs cibles les rend très attractifs comme agents thérapeutiques ou diagnostiques.[3] Pourtant, ils souffrent de plusieurs inconvénients qui freinent leur développement, en particulier leur poids moléculaire élevé qui rend difficile leur pénétration cellulaire et également leur coût de fabrication. Différentes structures protéiques ont été développées (e.g. Fragment Fab, Diabody, Adhirons, Avimères, …) ou découvert chez d'autres espèces (e.g. Nanobody). Leurs productions par expression recombinante et/ou par immunisation puis clonage sont des processus longs et onéreux qui orientent les chercheurs vers des dérivés peptidiques obtenus par synthèse chimique (SPPS) plus rapide et moins coûteuse. La synthèse chimique de peptides mimant les régions déterminant la complémentarité (CDR) est une stratégie utilisée par de nombreux groupes depuis les années 90. Leurs présentations sur différentes plateformes, ou à la surface de nanoparticules, permettent de mimer la multivalence des anticorps et également d'augmenter la stabilité des objets moléculaires, notamment par l'introduction de motifs non naturels (e.g. triazoles). A cette même période, un groupe développant des matériaux avec des propriétés de reconnaissance (empreintes moléculaires) a montré que ces empreintes pouvaient faire preuve d'une sélectivité comparable à celle d'une récepteur biologique.[4]

Dans ce contexte, j'ai choisi d'explorer deux stratégies pour développer des systèmes artificiels de reconnaissance de protéines. La première stratégie repose sur la conception de mimes peptidiques du domaine unique d'un nanobody, contenant seulement trois CDR, et sur leurs présentations à la surface de nanoparticules pour augmenter leur affinité par un effet combiné d'avidité et de multivalence. La seconde stratégie consiste à générer des empreintes de protéines à la surface d'un matériau. Ces empreintes, établissant des interactions avec les épitopes par leurs formes et leurs propriétés chimiques, miment la surface d'un paratope. La synthèse d'empreintes de protéines présentent plusieurs difficultés, en particulier la création d'interactions entre le matériau et la protéine sans la dénaturer. L'originalité de cette approche réside dans la synthèse de nouveaux monomères fonctionnels capables de mimer les interactions protéine-protéine et polymérisables dans des conditions biocompatibles.

Le premier chapitre du manuscrit commence par un état de l'art sur les anticorps et leurs dérivés : différentes structures protéiques développées (expression recombinante) ou découvertes chez d'autres espèces (immunisation puis clonage). Puis différentes stratégies déployées par les chercheurs pour mimer les CDR sont détaillées, ainsi que leurs présentations sur différentes plateformes. Enfin, ce chapitre bibliographique se termine par une présentation des polymères à empreintes moléculaires, en particulier ceux développés pour reconnaître des protéines.

Le second chapitre est consacré à la première stratégie que nous avons imaginée et s'intéresse au développement de mimes d'un nanobody ciblant la mésothéline, dont l'intérêt thérapeutique est discuté. La conception, la synthèse et l'évaluation biologique des différents peptides linéaires ou cycliques mimant les boucles des CDR sont présentées. La fin du chapitre détaille les travaux qui ont permis de présenter ces analogues peptiques à la surface de nanoparticules de silice, en utilisant des peptides silylés hybrides organiques-inorganiques permettant leur immobilisation en une seule étape.

Le développement d'empreintes moléculaires de protéines comme mimes d'anticorps fait l'objet du dernier chapitre de cette thèse. La synthèse de nouveaux dérivés d'acides aminés silylés est d'abord présentée. Ces nouveaux monomères fonctionnels, polymérisables par procédé sol-gel dans l'eau permet de créer des interactions avec des protéines dans des conditions non dénaturantes (catalyse basique à pH 8,5 ou catalyse nucléophile en présence de fluorure). Avant de les utiliser pour préparer des empreintes, nous avons utilisé nos monomères pour fonctionnaliser de la silice mésoporeuse (SBA-15) et des capillaires d'électrophorèse capillaire afin de moduler les propriétés d'adsorption des protéines de ces surfaces. La troisième partie de ce chapitre détaille l'optimisation de la synthèse des polymères à empreintes de protéines avec nos monomères fonctionnels, ainsi que l'évaluation de leur capacité de reconnaissance par QCM-d et par ELISA. Nous avons ensuite exploré la stratégie d'empreintes d'épitopes, en utilisant un peptide mimant l'hélice α accessible d'une protéine modèle, pour obtenir des empreintes « monoclonales » qui vont uniquement reconnaître l'hélice α accessible de la protéine modèle. Enfin, pour élargir le champ des applications de nos empreintes, nous avons adapté le protocole de synthèse de nos MIP pour obtenir des empreintes sous forme de film à la surface de puces de QCM-d et également à l'intérieur de capillaires d'électrophorèse capillaire.

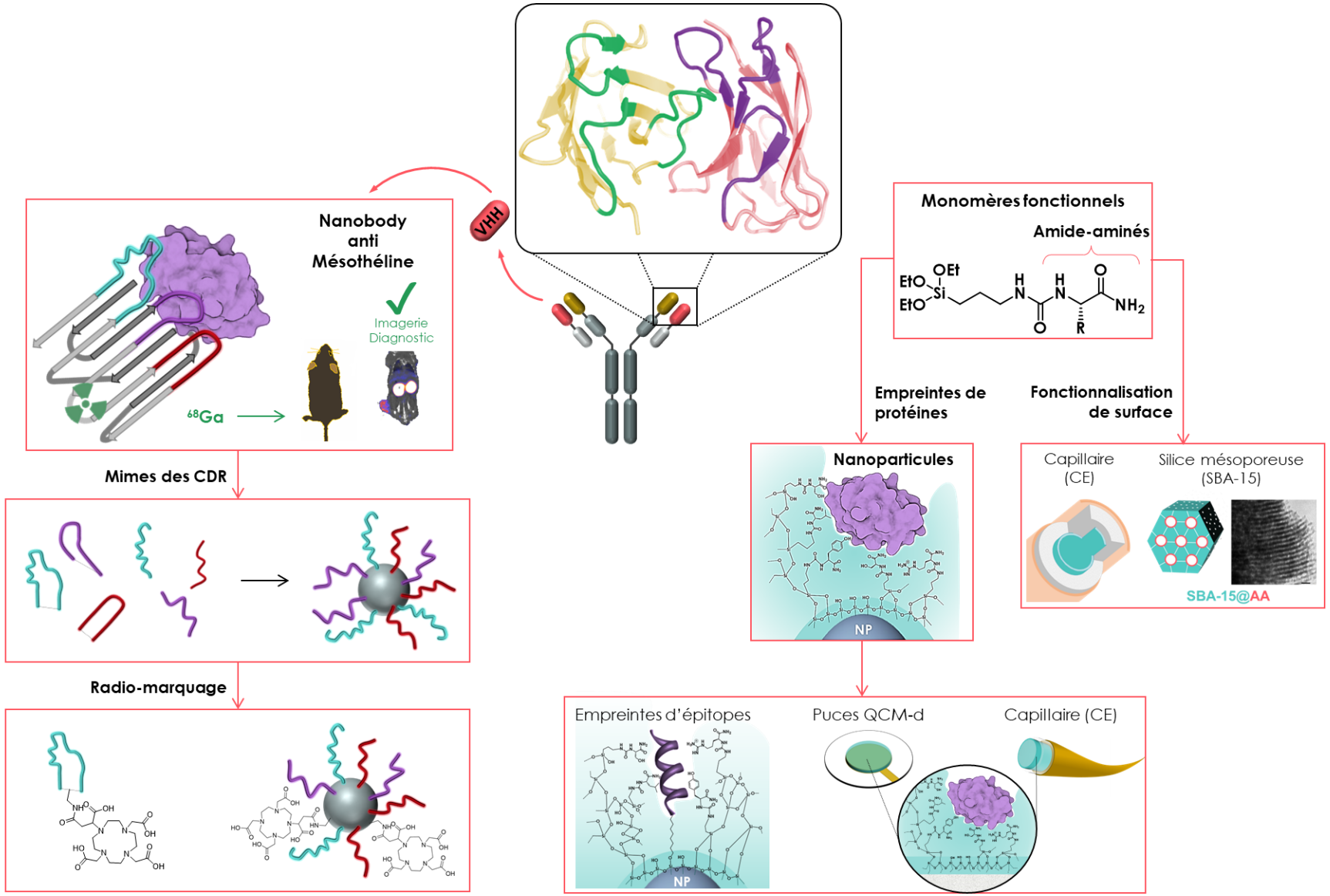


Figure 1 - Stratégie générale des systèmes artificiels de reconnaissance de protéines

Chapitre 1
Bibliographie : vers des anticorps artificiels

1 Introduction : les immunoglobulines et leurs dérivés

1.1 Immunoglobulines G : structures, fonctions, intérêts thérapeutiques

Les immunoglobulines (ou anticorps) sont produites par les lymphocytes B comme moyen de défense. Elles ciblent spécifiquement des antigènes (protéines, glucides, lipides, acides nucléiques), pouvant être produits par des agents pathogènes ou encore présents à la surface de cellules cancéreuses. Les anticorps peuvent également cibler des composants normaux de l'organisme dans le cas de maladies auto-immunes. La spécificité des anticorps pour leurs cibles les rend très attractifs comme agents thérapeutiques ou diagnostiques.[3]

Les immunoglobulines G (IgG) sont des protéines hétérodimériques, d'environ 150 kDa, constituées de deux chaînes lourdes H chacune possédant quatre domaines, et deux chaînes légères L possédant deux domaines (Figure 2). Les domaines N-terminaux des chaînes H et L sont variables (VH et VL) et les séquences restantes des chaînes H et L sont conservées (CH1 et CL). Le domaine C de la chaîne H peut être divisé en trois sections (CH1, CH2 et CH3), les deux dernières étant importantes pour le recrutement des cellules immunitaires.[5] Chaque domaine variable (V) présente trois régions déterminant la complémentarité (CDR-H1 à 3 pour VH et CDR-L1 à 3 pour VL). Ces six CDR sont à proximité des unes des autres, formant une surface complémentaire à l'épitope de l'antigène : le site de liaison (Figure 2).[1,2]

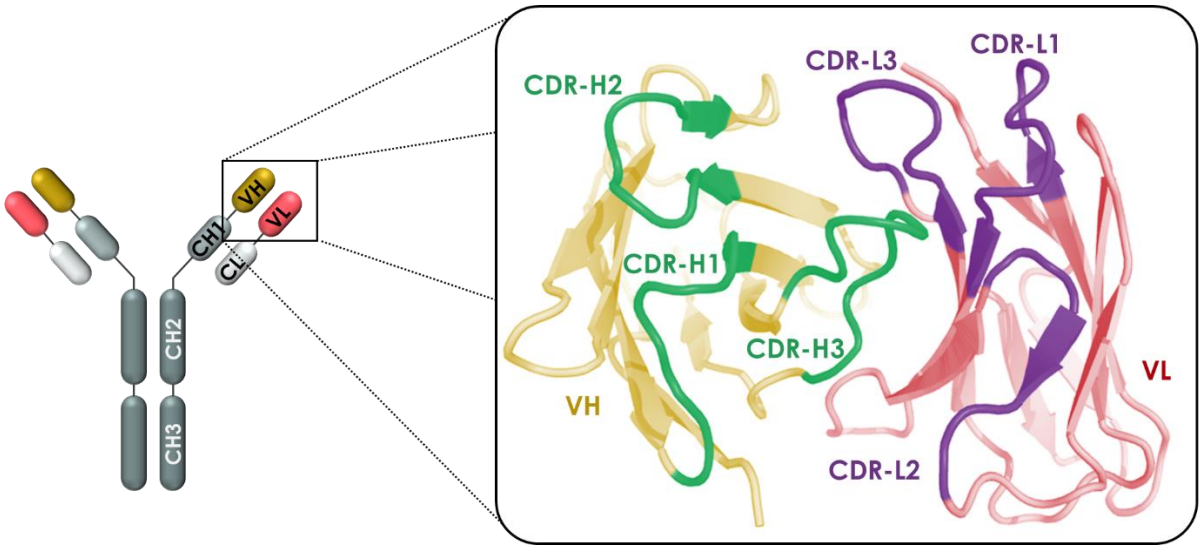


Figure 2 - Structure d'une immunoglobuline G

Lors d'une réponse immunitaire, un anticorps a trois fonctions : la liaison à l'antigène, l'activation du système de complément et le recrutement des cellules immunocompétentes. Souvent, un virus ou une bactérie ne devient pathogène qu'après sa fixation sur une cellule cible via son antigène. La liaison de l'anticorps à l'antigène empêche la fixation du virus (ou de la bactérie) sur la cellule cible, entraînant sa neutralisation. L'activation du système de

complément permet de déclencher une cascade aboutissant à la lyse de l'élément pathogène. Après la liaison à l'antigène par son domaine variable, l'anticorps peut recruter des macrophages par son domaine constant, déclenchant ainsi la phagocytose et l'élimination du pathogène.[6]

Une lignée de lymphocytes B produit un type d'anticorps qui reconnaît un type d'épitope sur l'antigène : les anticorps monoclonaux. Lorsque plusieurs lignées différentes de lymphocytes B produisent des anticorps, chacun reconnaît un type d'épitope sur l'antigène. Ces anticorps sont dits polyclonaux puisqu'ils visent différents épitopes d'un même antigène (Figure 3). Les anticorps polyclonaux sont produits lors d'une réponse immunitaire d'un organisme, tandis que les anticorps monoclonaux sont produits en laboratoire par la technique des hybridomes, développée par Köhler et Milstein en 1975.

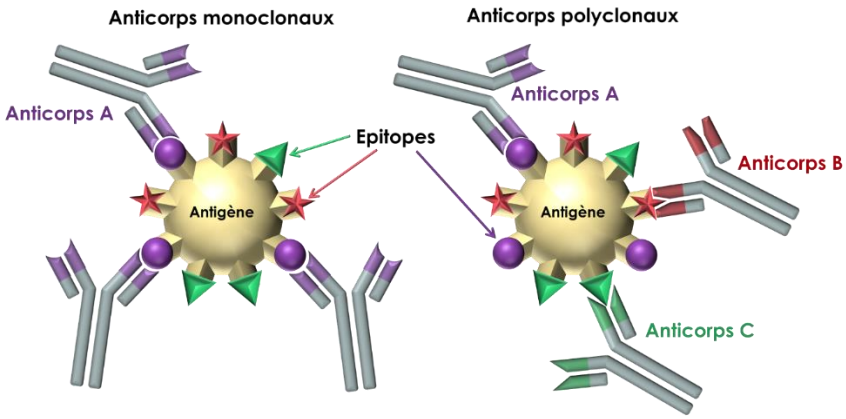


Figure 3 - Anticorps mono et polyclonaux

Les lymphocytes B d'une souris immunisée sont fusionnés *in vitro* avec une lignée cellulaire de myélome immortalisée, donnant les cellules d'hybridomes. Celles-ci contiennent les informations nécessaires pour la production et la multiplication des anticorps murins souhaités.[7] Ils sont ensuite utilisés pour générer des anticorps chimériques[8] ou humanisés[9] afin d'éviter toute immunogénicité (Figure 4A). Pour améliorer le screening des anticorps monoclonaux, Smith et Winter ont proposé d'utiliser les bactériophages pour constituer des librairies d'anticorps (ou de fragments d'anticorps). Ainsi, en les modifiant avec les gènes codant le domaine variable de ces anticorps, les fragments d'anticorps sont exprimés à l'extrémité des filaments des bactériophages, permettant le screening. Après plusieurs cycles de sélection avec la cible, les phages sélectionnés sont évalués par ELISA pour déterminer le ou les meilleurs candidats. Enfin, l'analyse de la séquence ADN incorporée dans le génome du bactériophage permet de reconstruire l'anticorps monoclonal correspondant (Figure 4B).[10,11] Pour faciliter l'obtention d'anticorps monoclonaux humains, des souris peuvent être génétiquement modifiées en remplaçant les gènes des immunoglobulines endogènes par ceux des immunoglobulines

humaines.[12] Générer des hybridomes à partir de telles souris permet l'obtention d'anticorps monoclonaux humains, et évite l'étape d'humanisation (Figure 4C).

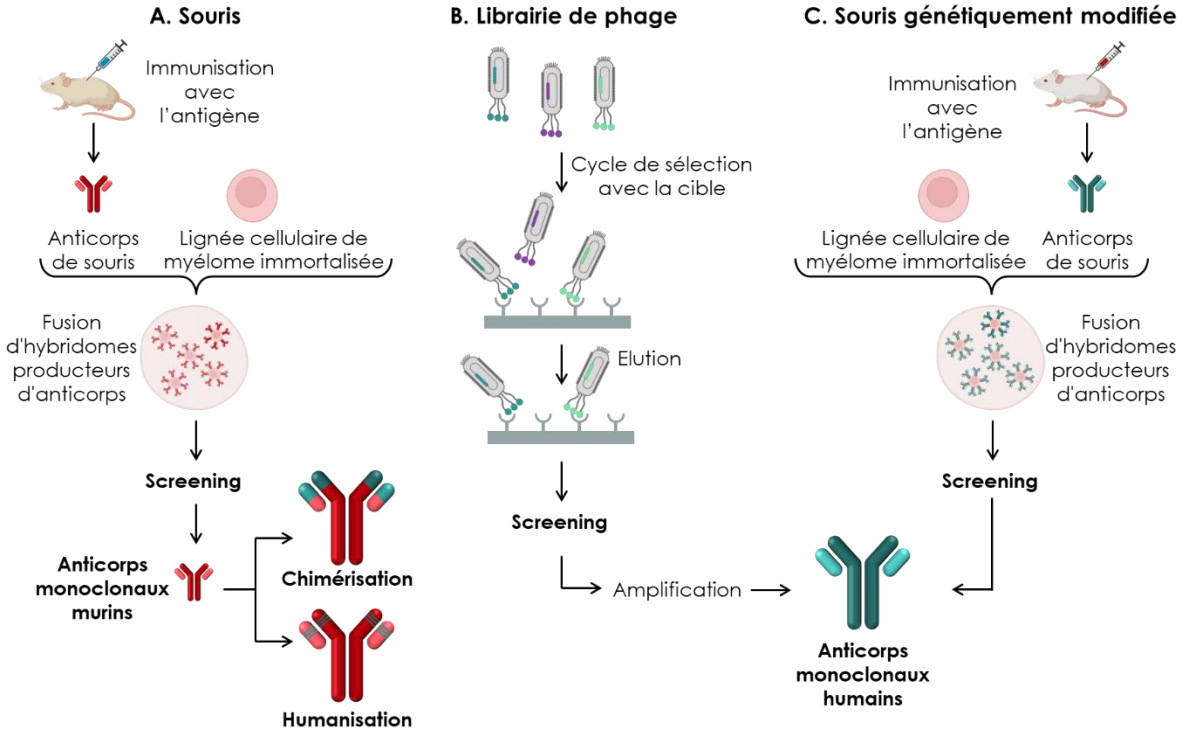


Figure 4 - Méthodes de production des anticorps monoclonaux

En 2019, 79 anticorps monoclonaux étaient approuvés par la FDA, principalement dans le domaine de la cancérologie (e.g. traitement des lymphomes hodgkiniens et non-hodgkiniens, des cancers du sein, de l'estomac, de la vessie, du cancer colorectal, de différents types de leucémie, myélome, sarcome, carcinome, etc.) ou pour le traitement de maladies inflammatoires (maladie de Crohn, arthrite, asthme, psoriasis, lupus, …). Leurs capacités de ciblage et de mobilisation du système immunitaire du malade font qu'ils peuvent être utilisés dans le traitement d'autres pathologies, comme certaines infections virales (VRS, VIH) ou bactériennes (Anthrax), des maladies génétiques (drépanocytose), ainsi que dans la prévention des migraines.[13] Fin 2020, 19 anticorps monoclonaux étaient en essais cliniques pour le traitement d'infections au SARS-CoV-2[14] à peine un an après le début de la pandémie.

Les anticorps sont extraordinairement utiles pour reconnaitre et se lier à protéines spécifiques. Pourtant, ils présentent plusieurs inconvénients qui freinent leur développement, en particulier leur coût de fabrication élevé et également leur poids moléculaire élevé qui nuit à leur pénétration dans les tissus. C'est pourquoi les chercheurs tentent de développer des mimes d'anticorps, notamment des IgG, pour pallier ces inconvénients.[15]

1.2 Mimes d'Immunoglobulines

1.2.1 Dérivés immunoglobuliques

Pour obtenir des mimes possédant des capacités de reconnaissance similaires à celles des anticorps, les chercheurs ont développé différentes structures moléculaires synthétiques basés sur le squelette des immunoglobulines.

Afin de diminuer leur poids moléculaire, le domaine constant est réduit ou supprimé. Le domaine variable est conservé afin de garder les spécificités antigéniques.

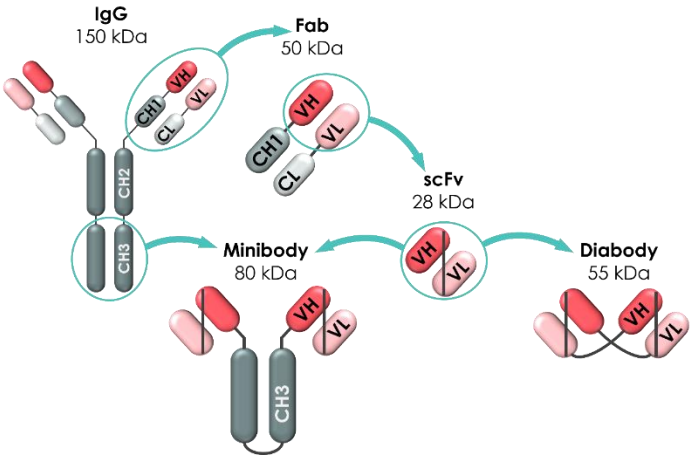


Figure 5 - Dérivés d'anticorps à structure immunoglobulique

Fragment Fab

Les fragments Fab sont des anticorps minimalistes, où les domaines CH2 et CH3 sont supprimés (Figure 5). Ils conservent donc leur reconnaissance de la cible, mais perdent les propriétés liées à ces deux domaines, comme la stimulation de la réponse immunitaire ou encore la longue demi-vie *in vivo*.[16] Comme ces fragments ont une courte existence dans le plasma, par rapport aux anticorps, les Fab peuvent être particulièrement utiles dans les applications qui favorisent ou exigent une durée de vie biologique plus courte (comme l'imagerie). Les fragments Fab sont le plus souvent produits par expression recombinante par des bactéries.[17] Les fragments Fab ont été utilisés à des fins thérapeutiques, ainsi que dans des applications de diagnostic, de détection, d'imagerie et de cristallographie.[18,19]

Fragment variable à chaîne unique (scFv)

Les scFv ont été signalés pour la première fois en 1988 comme une forme minimaliste d'un fragment Fab.[20] Ces fragments d'environ 28 kDa résultent de la liaison génétique de VH à VC, généralement avec un lien flexible de 10 à 25 résidus (Figure 5).[16] Contrairement aux anticorps et aux Fab qui présentent un grand nombre de ponts disulfures (jusqu'à 25 pour les IgG et 5

pour les Fab), les scFv n'en contiennent généralement que deux, ce qui simplifie leur expression recombinante et augmente leur stabilité dans les environnements réducteurs (comme le cytosol des bactéries).[21] Le scFv ne participe pas à la stimulation de la réponse immunitaire, sa durée de demi-vie est donc courte *in vivo*. Toutefois, sa petite taille et sa facilité d'expression font du scFv un anticorps minimaliste relativement simple à préparer et à manipuler en laboratoire. Sur le plan clinique, le scFv présente une meilleure pénétration tumorale, une clairance sanguine plus rapide, un temps de rétention plus court dans les tissus non ciblés et une immunogénicité réduite.[22]

Minibody

Les minibodies sont des polypeptides uniques constitués de scFv-CH3-CH3-scFv (Figure 5). Les minibodies fonctionnels peuvent être exprimés par recombinaison dans *E. coli*. L'inclusion de ces chaînes lourdes permet d'augmenter la demi-vie biologique par rapport au scFv.[23] Il existe d'autres minibodies avec des variantes au niveau de la région charnière (minibody flexible) ou ne contenant pas de région charnière (minibody LD). Deux scFv différents peuvent être utilisés au sein d'un même minibody, permettant une reconnaissance bispécifique.[24]

Diabody

Un diabody est un complexe composé de deux scFv (Figure 5).[25] Comme pour les minibodies, des domaines scFv ayant des cibles différentes peuvent être mixés, ce qui permet d'obtenir une reconnaissance bispécifique. Les diabodies ont une demi-vie *in vivo* relativement courte et sont bien plus petits que les IgG.[26] La plupart de leurs applications thérapeutiques sont autour de l'imagerie (tomographie par émission de positons). Certains diabodies ont été validés pour les cancers du pancréas et du sein.[27,28]

Nanobody

Des dérivés d'immunoglobulines dépourvus de chaînes légères L sont présents chez différentes espèces. Chez les camélidés, ces anticorps homodimériques sont également dépourvus du domaine constant CH1 (HCAb). La région N terminale de la chaîne H présente le domaine variable VHH qui permet d'associer le HCAb à son antigène. La structure et la fonction du VHH sont équivalentes au fragment Fab d'une immunoglobuline. Un VHH (environ 15 kDa) présente neuf brins β anti-parallèles structurés en deux feuillets β. Les régions déterminant la complémentarité sont situées dans les boucles B-C (CDR1), D-E (CDR2) et H-I (CDR3) et forment une surface continue complémentaire à celle de l'épitope de son antigène. Les CDR1 et 2 ont une longueur limitée (moins de dix résidus), la longueur du CDR3 étant variable selon le nanobody (Figure 6). Le fragment de liaison à l'antigène d'un HCAb permet d'identifier

facilement les VHH après immunisation d'un camélidé, de cloner le répertoire des cellules B du VHH et de faire un screening par phage-display. Les nanobodies (Nb) sont des VHH à domaine unique, c'est-à-dire spécifiques de l'antigène recombinant.[29]

Dans anticorps similaires aux HCAb ont été découverts chez les requins : les nouveaux anticorps récepteurs d'antigènes (IgNAR). Ce sont des anticorps homodimériques présentant cinq domaines constants espacés par une région flexible (entre CH3 et CH4) et un domaine variable V_{NAR}. Une autre forme d'IgNAR a été découverte chez le requin bambou, où les domaines constants CH2 et CH3 sont absents, le reste de la structure étant conservée. Le domaine V_{NAR} (environ 12 kDa) est composé de sept brins β anti-parallèles structurés en deux feuillets β. Les régions déterminant la complémentarité sont situées dans les boucles B-C (CDR1) et F-G (CDR3), les boucles C-D et D-E correspondant aux régions hypervariables (HV2 et HV4) du domaine variable (Figure 6).[30]

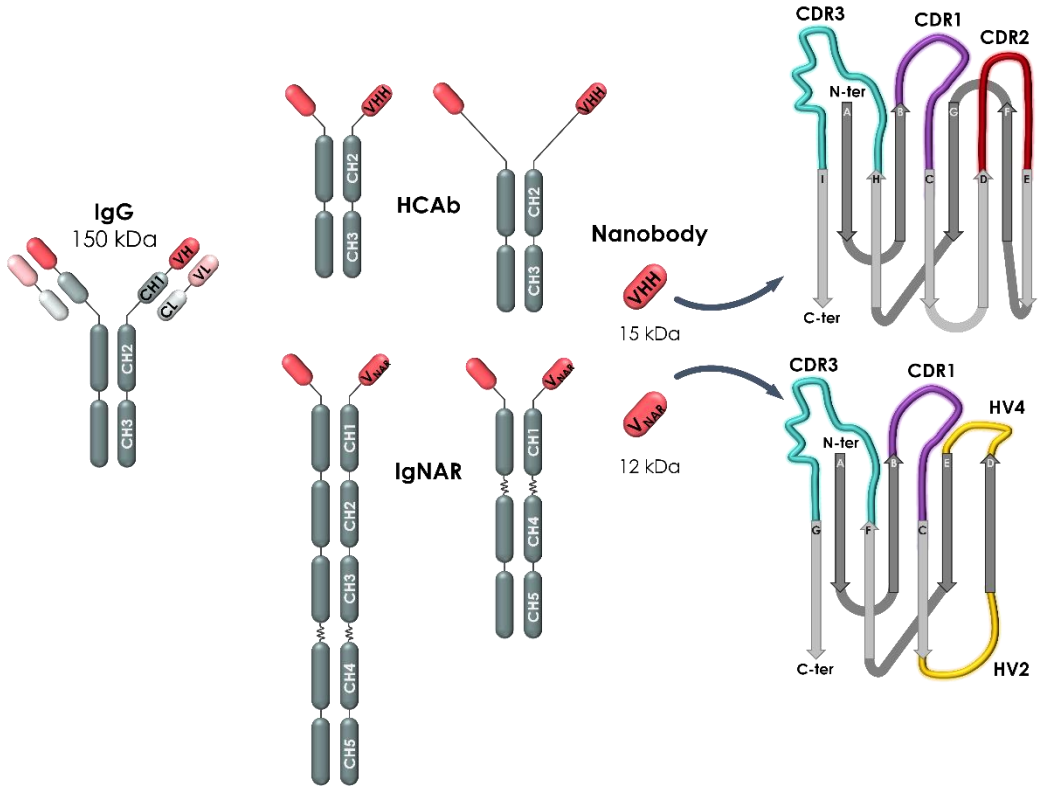


Figure 6 - Structure des nanobodies VHH et V_{NAR}

Assemblages protéiques bispécifiques

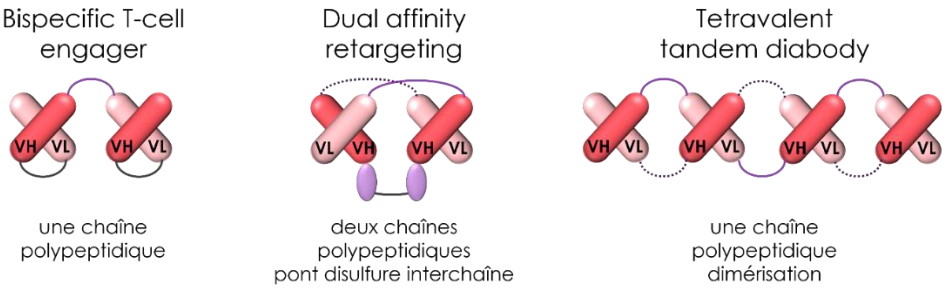


Figure 7 - Structure des assemblages protéiques bispécifiques

BiTE®: *Bispecific T cell engager*

Cet assemblage est un polypeptide unique de 55 kDa dans lequel deux scFv différents sont liés et fournissent des spécificités de liaisons à deux antigènes (Figure 7). Un des domaines variables est conçu contre l'antigène d'intérêt (marqueur de surface) et l'autre reconnaît le CD3 du complexe récepteur des cellules T, ce qui entraîne leur activation.[31] Un BiTE® est conçu pour cibler sélectivement les cellules T endogènes vers les cellules malignes. Les cellules T activées peuvent alors s'apparier avec les cellules malignes, ce qui entraîne une expansion des cellules T cytotoxiques locales en ciblant d'autres cellules malignes.[32]

DART: *Dual affinity re-targeting*

Les DART sont des protéines bispécifiques semblables aux diabodies, qui peuvent se lier à deux molécules distinctes de la surface cellulaire. Elles sont composées de deux VH et deux VL (Figure 7). Contrairement aux diabodies, la liaison entre les deux VH est covalente (pont disulfure du côté C terminal des VH), ce qui augmente leur stabilité.[25]

TandAbs : *Tetravalent tandem antibodies*

Les TandAbs sont des protéines tétravalentes bifonctionnelles en chaîne sinusoïdale qui reconnaissent une cible biologique spécifique et qui, grâce à leur seconde fonctionnalité, se lient à des récepteurs de cellules immunitaires pour éliminer la cellule cible. Ces molécules s'assemblent par dimérisation d'une protéine qui contient quatre chaînes H et L variables dans une orientation qui empêche un mauvais appariement intramoléculaire (Figure 7). Les TandAbs ont quatre sites de liaisons, ils sont plus grands que les BiTE® mais ne possèdent pas de fragment Fc. Leur poids moléculaire élevé (environ 110 kDa) améliore leur demi-vie dans le serum.[33]

1.2.2 Dérivés non-immunoglobuliques

D'autres protéines permettent d'orienter des boucles peptidiques d'une façon similaire aux CDR des anticorps. Des structures non immunoglobuliques ont pu être développées pour présenter une ou plusieurs boucles pouvant lier un antigène.

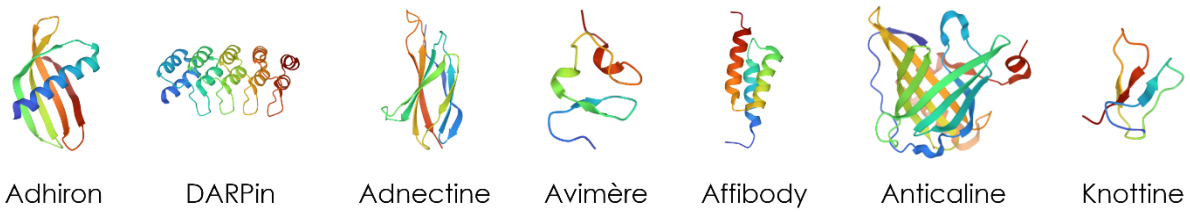


Figure 8 - Structures de dérivés non-immunoglobuliques
(PDB : 4N6U = Adhiron ; 5KNH = DARPin ; 7T0O = Adnectine ; 1AJJ = Avimère ; 2B88 = Affibody ; 1N0S = Anticaline ; 1Q3J = Knottine)

Adhirons

La structure des adhirons est basée sur la séquence de la phytocystatine. Ils présentent quatre brins β anti-parallèles positionnés autour d'une hélice α. Les deux boucles présentes entre les brins correspondent aux sites d'insertion des deux régions variables (Figure 8).[34]

DARPin

Les DARPin ont un squelette composé par des répétition de motifs de l'ankyrine empilées (AR) et présentent une affinité et une spécificité de liaison avec leurs cibles.[35] Chaque AR contient 33 aminoacides et se structure en coude β suivi de deux hélices α.[36,37] Généralement, les DARPin sont constitués de 4 à 6 répétitions et ont un poids moléculaire entre 14 et 18 kDa. La structure empilée permet à ce squelette de présenter une surface hydrophobe tandis que l'autre est accessible au solvant (Figure 8).[38,39]

Adnectine

Les adnectines ont une structure basée sur le 10e domaine de la fibronectine de type III.[40,41] Elles présentent une homologie structurale avec les domaines variables des anticorps : deux feuillets β anti-parallèles avec des boucles diversifiées accessibles aux solvants à chaque pôle du domaine (Figure 8).

Avimère

Les avimères sont des protéines multimériques artificielles à domaine unique. Leur structure est conçue pour augmenter l'affinité de liaison par la multimérisation du domaine unique.[42] Les

avimères sont constituées d'au moins deux séquences peptidiques de 30 à 35 résidus et sont repliées grâce à des peptides de liaison (Figure 8). Elles ont une grande affinité pour leurs ligands, présentent une faible immunogénicité et sont fortement exprimées dans des bactéries.[43]

Affibody

Les affibodies sont des protéines artificielles du domaine B de la protéine staphylococcique A (SPA), qui présente 58 résidus se reliant en 3 hélices α pouvant se lier à la portion Fc de l'IgG (Figure 8).[44] Les affibodies ont un faible poids moléculaire (environ 6 kDa), ce qui leur permet d'avoir une bonne pénétration cellulaire. De plus, leur temps de circulation est assez court, leur solubilité élevée et ils sont stables thermiquement (jusqu'à 70°C). Enfin, leur structure simple permet leur synthèse par SPPS comme par expression recombinante.[45,46]

Anticaline

Les anticalines sont des protéines artificielles structurellement similaires aux anticorps car dotées de ponts disulfures stabilisés. Elles sont des dérivées des lipocalines humaines et se composent d'un seul polypeptide non glycosylé d'environ 180 résidus pour un poids moléculaire de 20 kDa. Les anticalines ont une meilleure pénétration cellulaire que les anticorps monoclonaux, et présentent une certaine stabilité thermique (jusqu'à 70°C). Elles se structurent en tonneaux β anti-parallèles rigidement conservés avec 4 boucles variables qui forment la poche de liaison au ligand (Figure 8).[45,46]

Knottine

Les knottines (*cystine knot miniproteins*) présentent 30 à 50 résidus. Elles possèdent toutes un motif structurel commun : un noyau de brins anti-parallèles stabilisés par au moins 3 ponts disulfures (Cys^1-Cys^4/Cys^2-Cys^5/Cys^3-Cys^6) (Figure 8).[49] Elles présentent également une stabilité thermique (jusqu'à 95°C), chimique (guanidine, urée, pH acide) et protéolytique.[50]

Tous ces mimes sont obtenus via des protéines recombinantes, un procédé onéreux qui poussent les chercheurs à trouver des alternatives à ces mimes d'anticorps via des synthèses chimiques, des méthodes de productions plus rapides et moins onéreuses.

2. Dérivés peptidiques – mimes des CDR

Les boucles CDR déterminent la spécificité des anticorps. Différents groupes travaillent donc sur la synthèse chimique de mimes de CDR pour conserver la performance des anticorps tout en diminuant la taille et en augmentant leur stabilité métabolique des molécules. Ainsi, Park *et al.* ont synthétisé un peptide cyclique d'environ 1,5 kDa inspiré du CDR-H3 de l'anticorps monoclonal anti $p185^{her2/neu}$ qui se lie au récepteur du facteur de croissance épidermique humain (marqueur tumoral) avec une haute affinité (Kd = 300 nmol/L). Ce peptide a été l'un des premiers « anticorps mimétiques » avec une affinité et une activité comparables à celles de l'anticorps dont il est inspiré.[51]

2.1. Ruban β

Les boucles CDR présentent une conformation en ruban β, impliquant deux brins β antiparallèles reliés par un coude β.[52] Ce type de structure peut être obtenue avec un peptide cyclique possédant un motif induisant la boucle, comme le dipeptide d-pro-L-Pro.[53] L'introduction de ce motif au sein d'un peptide cyclique permet la formation de liaisons hydrogènes entre les deux brins antiparallèles, en commençant par les résidus adjacents au motif d-pro-L-Pro, stabilisant le feuillet β. Ce motif a été introduit par Favre *et al.*, pour préparer des mimes structurels des boucles hypervariables de l'anticorps HC19 anti-hémagglutinine de la grippe (Figure 9).[54]

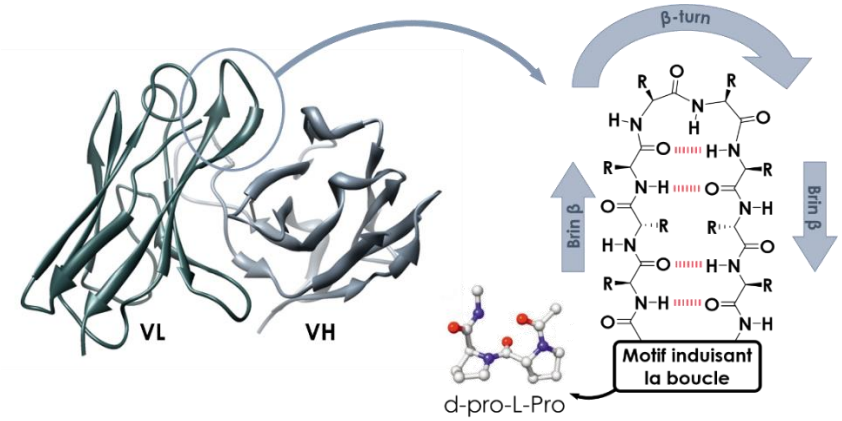


Figure 9 - Mime de ruban β induit par un motif d-pro-L-Pro (adapté de Robinson[52])

Dans une démarche similaire, Hu *et al*. ont développé les β-bodies : des peptides présentant un ruban β induit par le dipeptide Pro-Gly et stabilisés par une alternance des thréonines, favorisant une conformation étendue[55] et permettant l'orientation des résidus interagissant avec la cible sur une face de la structure (Figure 10). Une dizaine de ligands linéaires pour quatre protéines structurellement non apparentées (GFP, IL-1β, IL-2, and IL-6) ont été synthétisés par SPPS. Ils présentaient tous un ruban β stabilisé par des thréonines alternées sur une face du

peptide, la séquence de l'autre face étant conçue pour interagir avec la cible. Ces ligands ont présenté une haute affinité pour leur cible, sans réactivité croisée avec les autres cibles étudiées.[56]

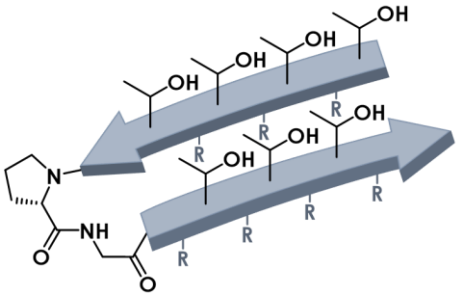


Figure 10 - Structure générale d'un β-body (adapté de Hu et al.[56])

2.2. Criblage

Pour obtenir des peptides cycliques ciblant des épitopes d'intérêts, Das *et al*. proposent une nouvelle stratégie de criblage utilisant la chimie click *in situ*.[57] Une chimiothèque « *one-bead-one-compound* » à cribler est synthétisée. Chaque bille présente un peptide à tester, linéaire ou cyclique et possédant un alcyne. L'épitope cible (SynEp) est ensuite synthétisé et présente une fonction azoture permettant la cycloaddition de Huisgen avec le peptide-alcyne présent sur la bille. Les deux partenaires de la cycloaddition sont stratégiquement introduits sur les deux ligands de sorte que, s'ils interagissent, ceux-ci soient correctement positionnés pour que la cycloaddition ait lieu sans catalyseur au cuivre. Pour éliminer les ligands non spécifiques, la bibliothèque est d'abord criblée contre une version *scrambled* du SynEp (où les résidus sont dans un ordre aléatoire). Les billes liées au SynEp *scrambled* par cycloaddition sont détectées par dosage enzymatique en utilisant la biotine comme marqueur et sont éliminées du criblage (Figure 11 – pré-screening). Les billes restantes sont ensuite criblées sur le SynEp cible. Les billes non liées sont lavées et éliminées du criblage, ne laissant que les billes présentant des ligands qui ont subi la cycloaddition avec le SynEp (Figure 11 – screening sur le SynEp). Après identification par dégradation d'Edman, les ligands sont testés sur la protéine entière pour identifier le meilleur d'entre eux. Leur méthode de criblage a permis d'obtenir douze ligands peptidiques de faible poids moléculaire présentant des EC50 compris entre 0,5 et 875 nmol/L pour différentes protéines cibles, comme les épitopes A (C terminal) à D (N terminal) de la PfHRP2 (protéine histidine riche 2 de plasmodium falciparum), qui présente respectivement des EC50 de 20 nmol/L et 4 nmol/L.

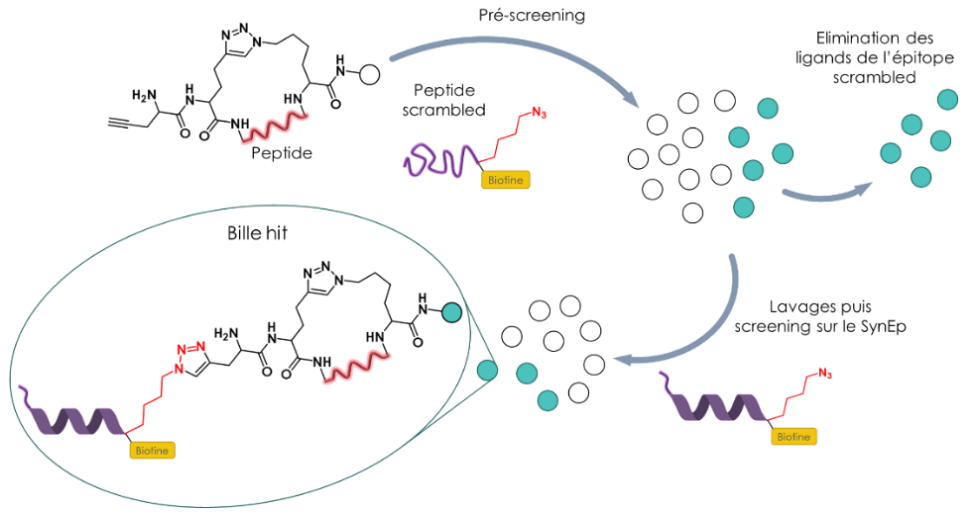


Figure 11 - Criblage par chimie click *in situ* ciblant les épitopes (adapté de Das et al.[57])

2.3. Anticorps synthétiques

Voulant mimer à la fois les fonctions de ciblage et les fonctions effectrices des immunoglobulines, McEnaney *et al*. ont proposé une nouvelle classe de molécules de tailles intermédiaires (environ 7 kDa) bispécifiques (Figure 12). Le domaine de ciblage, à base d'un motif glutamate-urée, se lie à l'antigène membranaire spécifique de la prostate (Figure 12, ovale rouge) et le domaine effecteur, qui s'associe au récepteur FcγR, est un peptide structuré en ruban β stabilisé par un pont disulfure identifié par phage display (Figure 12, pentagone bleu). L'anticorps synthétique peut présenter un motif de chaque domaine (SyAM-P1), deux domaines de ciblage et un domaine effecteur (SyAM-P2) ou deux motifs de chaque domaine (SyAM-P3), reliés par différents bras dont la distance d'environ 40 Å a été estimée par docking comme étant optimale pour lier à la fois le PSAM et le FcγR, entraînant la réponse immunitaire puis la phagocytose de la cellule cancéreuse. [58]

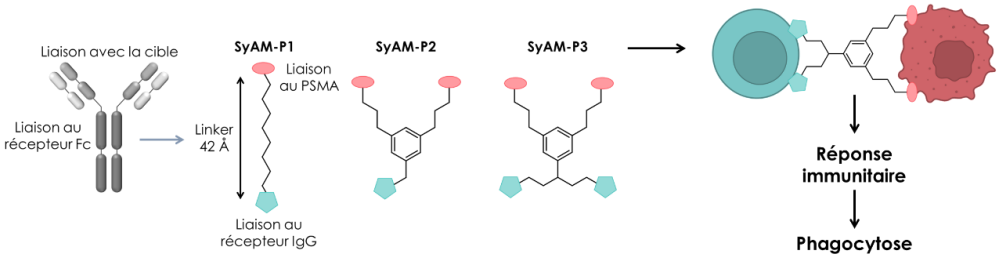


Figure 12 - Anticorps synthétiques proposés par McEnaney *et al.*[58]

2.4 Multivalence

Les différents mimes peptidiques d'anticorps présentés dans le paragraphe précédent sont composés d'une séquence peptidique mimant un CDR des six présents sur le paratope d'un anticorps. En plus de la reconnaissance liée à la séquence et à la structure des ligands, la multivalence créée en positionnant les ligands sur une plateforme, qui peut être un châssis

moléculaire ou la surface d'une nanoparticule, pourrait apporter un effet d'avidité qui renforcerait l'affinité. Cette avidité peut être due à un effet chélate lorsque les ligands sont différents. Dans ce cas, l'objet moléculaire peut se lier sur plusieurs sites, ce qui renforce l'affinité en défavorisant la dissociation. Lorsque de multiples versions d'un même ligand sont présentées sur une plateforme, la concentration locale en ligands est élevée et peut amener à une réassociation d'un ligand à la suite de la dissociation d'un autre. L'affinité du ligand pour sa cible n'est pas modifiée mais l'avidité créée par cet effet statistique la renforce.[59]

2.4.1 Châssis moléculaires

Différents châssis moléculaires ont été développés et utilisés pour présenter différents ligands et exploiter cet effet d'avidité. En 1995, Dumy *et al.* ont proposé un nouvel échafaudage peptidique cyclique appelé RAFT (*Regioselectively Addressable Functionalized Template*) permettant de positionner les ligands sur deux faces distinctes, entraînant une bi-fonctionnalité, où une face est dédiée au ciblage et l'autre à l'imagerie par exemple.[60] Ces RAFT peuvent contenir jusqu'à six résidus de lysine, orthogonalement protégées et/ou modifiées (e.g. azido-lysine), permettant leur fonctionnalisation contrôlée par des ligands linéaires ou cycliques. Les RAFT ont par exemple été utilisés pour améliorer l'efficacité de capture sélective de cellules exprimant l'$\alpha_v\beta_3$-intégrine par des ligands RGD cycliques. En effet, pour une même efficacité de capture sélective lors des tests d'adhésion cellulaire, la densité de RAFT tétravalent était cent fois plus faible que la densité de RAFT monovalent, montrant l'effet d'avidité et de multivalence.[61]

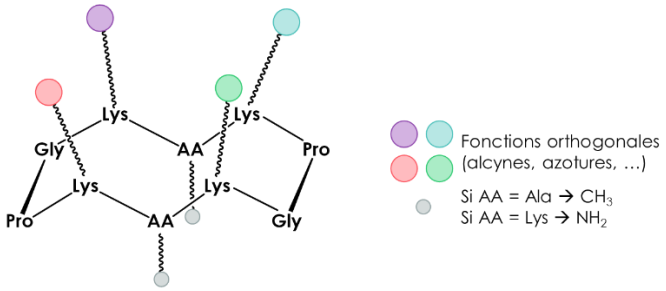


Figure 13 - Structure générique d'un RAFT

Dans une approche similaire, Longin *et al.* ont utilisé le cyclotrivératrylène comme échafaudage cyclique, sur lequel trois mimes de CDR sont introduits par CuAAc pour obtenir des anticorps synthétiques. Trois alcynes protégés de façon semi-orthogonale (un non protégé, un protégé par un motif triéthylsilyle et un protégé par un motif triisopropylsilyle) ont été introduits sur le cyclotrivératrylène afin d'ajouter les boucles CDR de façon contrôlée et successive sur le châssis moléculaire. Douze anticorps synthétiques ont ainsi été synthétisés pour mimer l'infliximab, un anticorps monoclonal ciblant le facteur humain de nécrose tumorale a (hTNFa) utilisé en clinique pour le traitement de maladies auto-immunes. Sur les douze mimes

synthétisés, ils ont pu montrer, via des tests de liaison par SPR, que sept d'entre eux étaient capables de lier le hTNFα, dont cinq avec des constantes de dissociation allant de 11 à 66 µmol/L, montrant l'effet de multivalence induit par la fixation des boucles appropriées.[62]

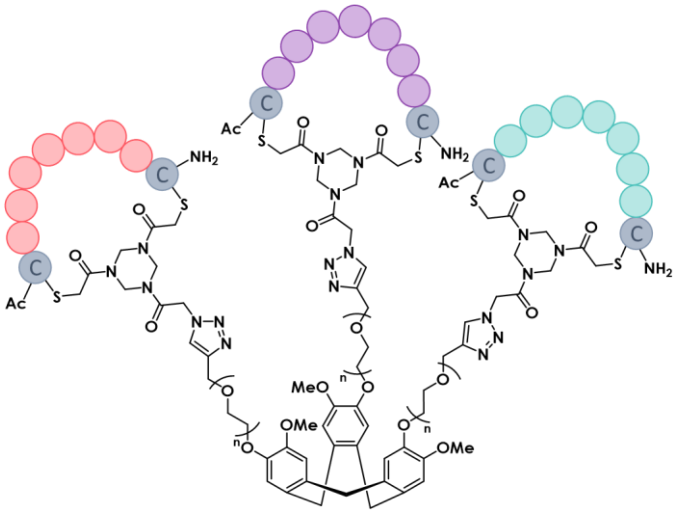


Figure 14 - Structure des peptidomimétiques dérivés de CDR utilisant le cyclotrivératrylène comme châssis moléculaire (adapté de Longin *et al.*[62])

2.4.2 Nanoparticules fonctionnalisées

Différents types de nanoparticules ont pu être mono ou multi fonctionnalisées avec des ligands peptidiques, linéaires et/ou cycliques pour apporter un effet d'avidité par chélation et/ou effet statistique. Dans cette optique, Yan *et al.* ont développé les « *gold-bodies* », des nanoparticules d'or mono-fonctionnalisées avec des peptides mimes de CDR d'anticorps d'intérêt présentant des fortes affinités pour leurs cibles. Leur hypothèse était que, en plus de l'avidité apportée par l'effet statistique, réduire l'espace conformationnel des peptides les rapprocherait de leur conformation « active ». Dans ce but, ils ont choisi de les greffer par deux points d'ancrages sur les nanoparticules en ajoutant une cystéine aux extrémités N et C terminales, et ainsi former une boucle plus contrainte qu'un peptide linéaire après greffage. Ils ont ainsi pu obtenir deux « *gold-bodies* » qui ciblent le lysozyme et le récepteur de croissance épidermique avec de fortes affinités.[63]

Afin de combiner les effets chélate et statistique, Maurel *et al.* ont conçu des nanoparticules de silice anti-angiogéniques multifonctionnelles, en les fonctionnalisant avec trois différents ligands PEG-peptides. La séquence cRDG cible d'intégrine $\alpha_v\beta_3$, surexprimée à la surface des cellules endothéliales activées. La séquence ATWLPPR cible la neuropiline 1, un co-récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire. Enfin, un polypeptide dérivé du collagène (GTPGKOGPRGQRGPTGPRGERGP), censé bloquer l'activité proangiogénique du facteur de croissance des fibroblastes 2, a été choisi. L'idée était de combiner ces trois ligands pour

bloquer différentes voies de signalisation proangiogéniques. Ces peptides ont d'abord été conjugués à des chaînes PEG afin de les éloigner des nanoparticules et de les rendre plus accessibles. Puis, après la silylation de l'amine N terminale des PEG-ligands, ceux-ci ont pu être greffés chimiosélectivement sur les nanoparticules de silice. Des tests préliminaires *in vitro* ont montré l'efficacité de ces nanoparticules, notamment sur des sphéroïdes cancéreux.[64]

La surface des nanoparticules peut également servir de support pour une classe de matériaux hybrides capables de reconnaître différentes molécules avec une forte affinité : les polymères à empreintes moléculaires.[65]

3 Les polymères à empreintes moléculaires (MIP)

3.1 Historique : la découverte des MIP

Les premiers travaux qui s'apparentent aux polymères à empreintes moléculaires remontent à 1931. Le groupe de Polyakov a décrit des propriétés d'adsorption particulières dans des particules de silice préparées en présence d'un additif organique (benzène, toluène ou xylène). Les matériaux obtenus avec ce procédé présentaient une sélectivité pour cet additif, due à des changements structurels dans la silice.[66] Par la suite, différents groupes ont travaillé sur des matériaux, principalement à base de silice, ayant des propriétés de reconnaissance. En utilisant les travaux de Pauling, qui ont permis de poser les bases des bio-empreintes[67,68], Dickey a préparé des gels de silice en présence de différents colorants (méthyle, éthyle, n-propyle et n-butyle orange), et a évalué l'affinité des gels pour ces quatre colorants après leur extraction. Il a ainsi montré que les silices se liaient préférentiellement au colorant avec lequel elles avaient été préparées plutôt qu'avec les autres.[69] L'extraction de la molécule cible, une fois l'empreinte créée autour d'elle, est un point clé de la préparation de ces matériaux et les méthodes de lavage ont été particulièrement étudiées. Dickey avait extrait les colorants grâce à plusieurs lavages au méthanol. Les travaux du groupe de Morrison ont montré que la procédure de lavage de Dickey n'était pas suffisante et qu'un lavage à l'eau ou à l'HCl aqueux était nécessaire. Ils ont pu estimer la quantité de molécules cibles restant dans le polymère en dissolvant la silice et en analysant la solution obtenue par spectroscopie.[70] Alors que Dickey avait conclu que les lavages acides permettaient une adsorption sélective plus élevée, Morrison a déduit de ses résultats que l'amélioration de l'adsorption suite aux lavages acides était due à une meilleure accessibilité des molécules cibles restées piégées dans le polymère. En 1955, Haldeman et Emmet ont introduit pour la première fois la notion d'empreinte en concluant que les interactions entre la silice et les colorants cibles seraient dues à des liaisons Hydrogène et des interactions de Van der Waals.[71]

Depuis la première publication de Polyakov, les travaux sur les empreintes moléculaires ne portaient que sur des matériaux à base de silice. Les premières empreintes moléculaires dans des polymères organiques ont été développées dans les années 70, près de quarante ans plus tard. En 1972, Wulff et Sarhan ont décrit une méthode de polymérisation de divinylbenzène en présence d'un dérivé polymérisable d'acide D-glycérique (acide D-glycérique (p-vinylaniline)-2,3-O-(p-vinylphénylboronate). L'hydrolyse ultérieure de la fonction glycérinée a révélé des empreintes montrant une reconnaissance chirale de l'acide D-glycérique.[72] La même année, Takagishi et Klotz ont montré que l'introduction de groupements hydrophobes dans un polymère hydrophile améliorait la liaison de méthyle orange (leur molécule cible) en milieu aqueux. Ils ont également démontré que l'introduction de réticulation au sein du polymère

permettait de limiter la mobilité des chaînes. Ils ont donc combiné ces deux aspects en introduisant des groupes caproyles et lauroyles dans des polymères polyéthylèneimine puis, après l'incubation du méthyle orange, ils ont modérément réticulé leur matériau par la formation de ponts disulfures (à partir de la thiobutyrolactone). Ils ont ainsi obtenu des empreintes qui ont montré une capacité d'adsorption plus élevée pour la cible que pour les autres molécules de référence.[73] Ces deux études sont à l'origine des approches qui seront dites « covalente»[72] et « non-covalente»[73] pour la synthèse de polymères à empreintes moléculaires. En 1984, le groupe de Mosbach a supposé que la sélectivité de la cible pour le polymère était due à sa liaison sur des sites spécifiques créés dans le polymère après la formation des empreintes, supposition qu'il confirme un an plus tard.[74,75] En 1993, le même groupe a présenté une étude démontrant pour la première fois que les empreintes moléculaires pouvaient faire preuve d'une sélectivité comparable à celle d'un récepteur biologique.[4] Depuis lors, le nombre de publications sur les polymères à empreintes moléculaires n'a cessé d'augmenter, avec une prédominance de polymères organiques de type polyacrylate.

3.2 Principe général

Les empreintes moléculaires sont définies comme la construction de sites de reconnaissances sélectifs de ligands (la molécule cible) dans des polymères synthétiques. Ces matériaux sont appelés polymères à empreintes moléculaires (MIP : *molecularly imprinted polymers*).[66]

Pour générer une empreinte, la molécule cible est immobilisée sur une surface sur laquelle une couche de MIP va être formée. Après l'immobilisation, les monomères fonctionnels sont ajoutés pour créer les interactions avec la cible et la polymérisation permet de les figer dans l'espace. Une fois la polymérisation terminée, la cible est retirée du matériau pour que la reconnaissance puisse avoir lieu dans les cavités ainsi formées (Figure 15).

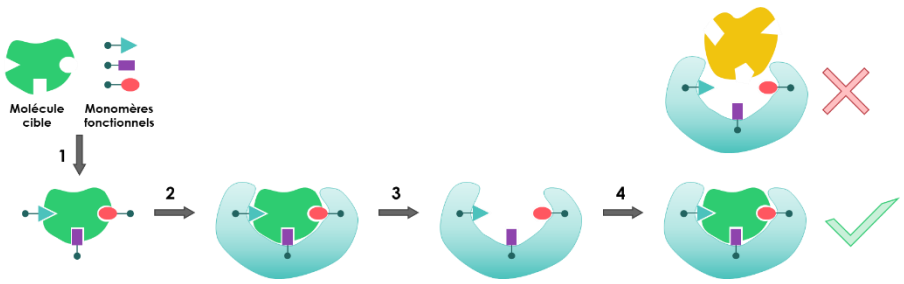


Figure 15 - Principe général des polymères à empreintes moléculaires.
1- Formation des interactions entre la cible et les monomères fonctionnels. 2- Polymérisation. 3- Extraction de la molécule cible. 4- Reconnaissance sélective de la cible

La reconnaissance sélective de l'empreinte est due aux interactions que les monomères fonctionnels vont pouvoir établir avec la cible. Il existe différentes approches pour

l'établissement de ces interactions, les principales étant les approches covalente, non covalente et semi-covalente.

3.2.1 Approche covalente

Dans l'approche covalente, toutes les interactions entre la cible et le matériau sont des liaisons covalentes réversibles. Après l'établissement de ces liaisons entre la cible et les monomères fonctionnels, la polymérisation est amorcée puis la cible est extraite du matériau par coupure des liens covalents (souvent par hydrolyse), laissant apparaître l'empreinte. Avec cette approche, la reconnaissance se fait par le rétablissement de ces liaisons covalentes réversibles entre la cible et les monomères fonctionnels (Figure 16).[76] Pour utiliser cette approche, la cible doit posséder des fonctions chimiques capables de former un lien covalent réversible (alcool, aldéhyde, amine, acide carboxylique, …).



Figure 16 - Approche covalente

1- Création de liens covalents réversibles entre la cible et les monomères fonctionnels. 2- Polymérisation. 3- Extraction de la cible par clivage des liaisons covalentes. 4- Reconnaissance de la cible via liaisons covalentes.

3.2.2 Approche non covalente

Dans l'approche non-covalente, l'immobilisation de la cible et les interactions entre la cible et les monomères fonctionnels, formées avant la polymérisation, sont des liaisons non covalentes, principalement des liaisons Hydrogène et des interactions ioniques. Après la polymérisation, la cible est extraite du matériau par lavages, révélant l'empreinte moléculaire (Figure 17). Cette approche est certainement la plus simple à mettre en œuvre, mais lorsque la cible est une petite molécule organique, les empreintes obtenues sont généralement peu robustes.[77]

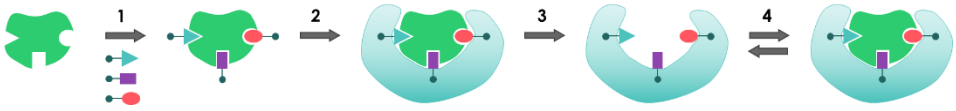


Figure 17 - Approche non covalente

1- Création des interactions non covalentes entre la cible et les monomères fonctionnels. 2- Polymérisation. 3- Extraction de la cible par lavages. 4- Reconnaissance de la cible via interactions non covalentes.

3.2.3 Approche semi-covalente

Cette approche est très similaire à l'approche non covalente. En effet, les interactions entre la cible et les monomères fonctionnels se font également par des liaisons non covalentes. La différence réside dans la méthode d'immobilisation de la cible. Dans ce cas, une liaison

covalente réversible va permettre de fixer la cible sur le support de l'empreinte (Figure 18). Cette méthode permet de combiner les avantages des deux approches précédentes tout en limitant leurs inconvénients.[78]

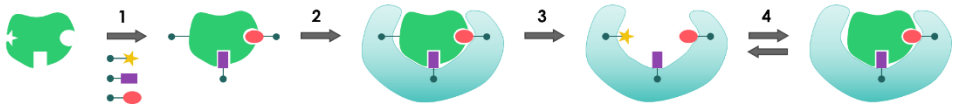


Figure 18 - Approche semi-covalente
1- Immobilisation de la cible avec une liaison covalente réversible et création des interactions non covalentes entre la cible et les monomères fonctionnels. 2- Polymérisation. 3- Extraction de la cible par rupture de la liaison covalente. 4- Reconnaissance de la cible via des interactions non covalentes.

Un grand nombre de paramètres va influencer le choix de l'approche employée : la molécule cible, la méthode de polymérisation, les monomères fonctionnels disponibles, etc… Finalement, l'approche covalente n'est presque plus utilisée aujourd'hui, les approches non covalente et semi-covalente étant plus simples à mettre en œuvre.

3.3 Eléments fondamentaux des empreintes

3.3.1 La molécule cible

Le but ultime est de générer une empreinte ayant une affinité et une spécificité pour sa cible comparables à celles des récepteurs biologiques (e.g. un anticorps), pour des applications de reconnaissance moléculaire. La molécule cible doit remplir trois exigences[76] :

1. Elle doit contenir des groupes fonctionnels qui n'empêchent pas la polymérisation.
2. Elle doit présenter une excellente stabilité chimique pendant la polymérisation.
3. Elle doit posséder des groupes fonctionnels pouvant interagir avec les monomères fonctionnels.

La molécule cible peut être aussi bien un ion qu'une macromolécule, mais ce sont les petites molécules qui ont été largement utilisées comme cibles depuis la découverte de cette technologie, pour obtenir des systèmes de détection et/ou de dosage. Ainsi, de nombreux MIP de pesticides[79,80] (atrazine, acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, …), de perturbateurs endocriniens[81,82] (bisphénol A, estradiol, …) et d'explosifs[83] (TNT, …) ont été préparés. Des MIP de molécules à visée thérapeutique ont également été élaborés. Schweitz *et al.* ont ainsi conçu des MIP du (R)-propranolol, utilisé comme phase stationnaire d'électrophorèse capillaire pour la séparation chirale et le dépistage de drogues.[84] Kempe et Mosbach ont, d'une façon similaire, préparé des phases stationnaires avec empreintes moléculaires pour la séparation d'aminoacides.[85] Des biomolécules peuvent également être utilisées comme cible, comme l'adénosine qui a été utilisée pour la synthèse de MIP pour la reconnaissance de protéines ADP-ribosylées.[86]

3.3.2 Les monomères fonctionnels

Le rôle des monomères fonctionnels (MF) est de former un complexe de pré-polymérisation avec la cible. Il est donc important de choisir des monomères fonctionnels appropriés qui puissent interagir fortement avec la cible. Un monomère fonctionnel doit posséder deux types d'unités : une unité responsable de la reconnaissance et une unité polymérisable.

L'unité polymérisable dépend de la méthode de polymérisation choisie, elle est souvent un dérivé acrylique lors d'une polymérisation radicalaire, ou un silane (e.g. triéthoxysilane) lors de la synthèse d'empreinte par sol-gel (Figure 19).

L'unité de reconnaissance va être déterminée par la molécule cible pour établir les interactions les plus fortes possibles. Même si un certain nombre de monomères fonctionnels sont commerciaux, il peut être nécessaire d'en synthétiser de nouveaux pour augmenter le panel d'interactions possibles entre le matériau et la cible.

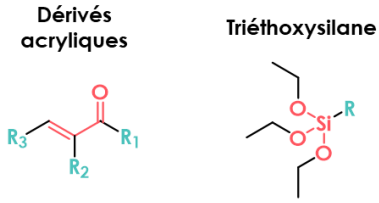


Figure 19 - Structures générales de monomères fonctionnels avec en rouge l'unité polymérisable et en bleu l'unité de reconnaissance

3.3.3 La méthode de polymérisation

Polymérisation radicalaire

La polymérisation radicalaire se déroule en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison. L'initiation permet de former le premier radical à l'origine de la polymérisation. Avant l'initiation, l'initiateur de radicaux, comme l'azobisisobutyronitrile (AIBN), se scinde en deux radicaux sous irradiation UV : c'est l'amorçage. Le radical A• permet d'initier la polymérisation par le transfert du radical sur un monomère. La propagation de la chaîne polymérique peut alors commencer. Cette étape correspond à la formation de la chaîne macromoléculaire par additions successives des monomères sur le macro-radical en croissance. Pour terminer la polymérisation, deux macro-radicaux se lient entre eux, soit par recombinaison (formation d'une liaison covalente entre deux macro-radicaux), soit par dismutation (transfert d'hydrogène entre deux macro-radicaux suivi d'une recombinaison) (Figure 20).[87]

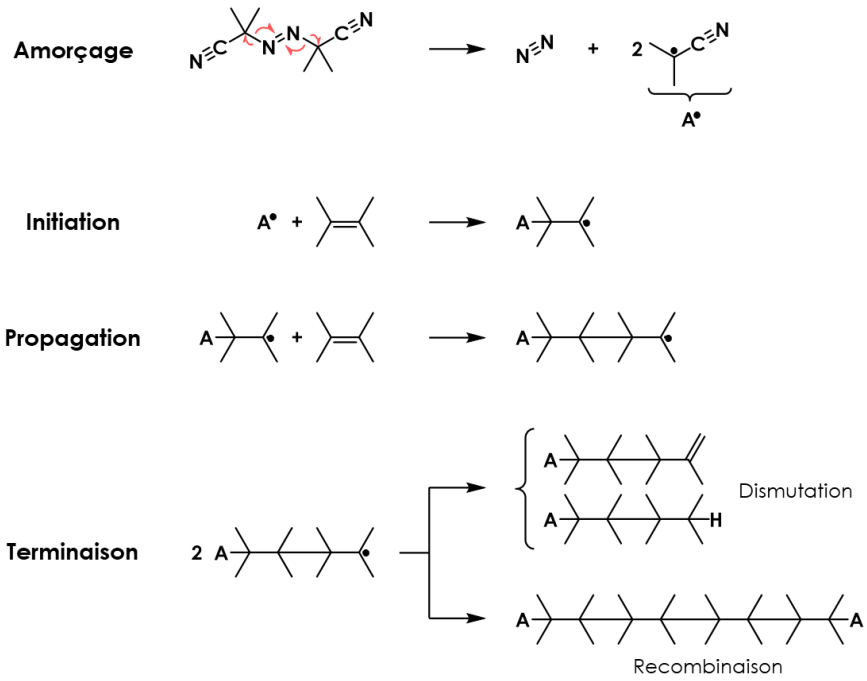


Figure 20 - Mécanisme général de polymérisation radicalaire avec l'AIBN comme initiateur

La polymérisation radicalaire est une méthode de polymérisation assez modulable. Elle peut avoir lieu dans une grande variété de solvants organiques tout comme dans des mélanges aqueux (e.g. méthanol/eau).[88] De plus, il existe une grande diversité de monomères fonctionnels de type acrylate permettant de couvrir un grand panel d'interactions. La nécessité d'utilisation d'un initiateur de radicaux peut limiter son usage pour la synthèse d'empreintes de molécules cibles fragiles, comme certaines biomolécules (e.g. protéines) qui peuvent se dégrader dans ces conditions.

Le procédé sol-gel et les matériaux hybrides

Le procédé sol-gel (solution-gélification) est une succession de réactions d'hydrolyse et de condensation d'un alcoxyde métallique (la plupart du temps un alcoxyde de silicium), pouvant se produire séquentiellement ou concomitamment et conduisant à un réseau inorganique.[89] L'hydrolyse correspond à la transformation des alcoxysilanes (Si-OR) en silanol (Si-OH) avec la libération d'alcool (R-OH). Dès la formation d'un groupement silanol, les réactions d'hydrolyse et de condensation se poursuivent simultanément, formant les liaisons siloxanes (≡Si-O-Si≡) qui construisent le réseau tridimensionnel de silice. La condensation peut se faire selon deux mécanismes : l'oxolation, où deux hydroxysilyles réagissent ensemble entraînant une libération d'eau, ou l'alkoxolation, où un hydroxysilyle réagit sur un alcoxysilyle entraînant une libération d'alcool (Figure 21).

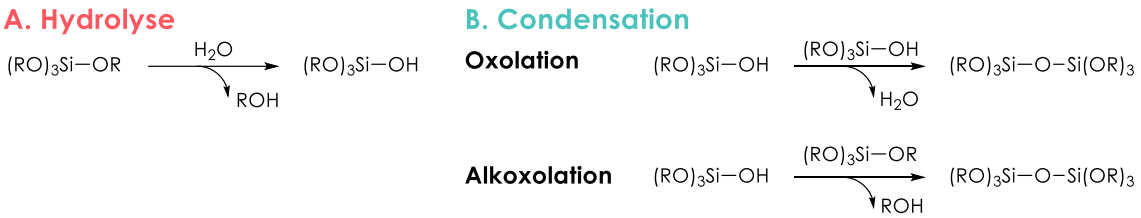


Figure 21 - Réactions d'hydrolyse et de condensation d'un alcoxyde de silicium

La cinétique de la réaction et la morphologie du matériau sont influencées par plusieurs paramètres, notamment le pH[90] et l'utilisation de catalyseurs (Figure 22). En milieu acide, l'hydrolyse est favorisée et peut être terminée avant que la condensation ne commence, conduisant à la formation d'un réseau faiblement réticulé et de faible densité (gel polymérique). En milieu basique, l'hydrolyse et la condensation ont lieu simultanément, formant des particules colloïdales plus denses car l'hydrolyse est l'étape limitante (gel colloïdal).[91] A pH neutre, l'hydrolyse a lieu très lentement. Pour accélérer cette réaction, l'utilisation d'un catalyseur ou d'une étape de pré-hydrolyse (acide ou basique) est nécessaire. Ainsi, les propriétés physico-chimiques du matériau dépendront de la cinétique d'hydrolyse et de condensation, dépendant elle-même du pH, du catalyseur, de la température et de la concentration en réactifs de départ. Le matériau peut donc être formé dans des conditions très douces, parfois même physiologiques.[92]

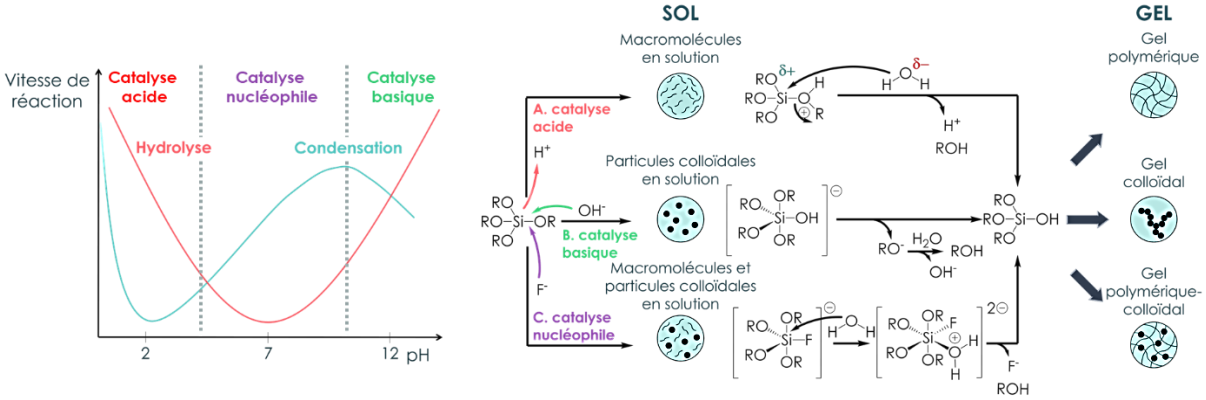


Figure 22 - Cinétique de l'hydrolyse (rouge) et de la condensation (bleu) du TEOS en fonction du pH[89] et influence du pH sur la morphologie finale du matériau

Le procédé sol-gel permet d'accéder facilement à des matériaux hybrides présentant des motifs organiques en utilisant une gamme de réactifs organiques silylés disponibles commercialement. Ces organosilanes présentent souvent des fonctions organiques simples (e.g. amine primaire, chaîne carbonée), entraînant la nécessité de synthétiser de nouveaux composés pour augmenter le panel d'interactions avec la molécule cible. Il est possible d'introduire des groupements silylés au sein de molécules organiques (et/ou biologiques), permettant d'élargir encore cette gamme de réactifs. L'introduction de groupes organiques au sein des matériaux permet d'en moduler les propriétés (résistance mécanique, transparence, propriétés électriques, mécaniques ou redox, …), ou d'ajouter de nouvelles

propriétés biologiques[93,94] (reconnaissance, biocompatibilité, …) ou physicochimiques[95,96] (balance hydrophobie/hydrophilie, mise en forme, propriétés électroniques, optiques, …). Par exemple, le DMDMS et le MTMS permettent d'augmenter l'hydrophobie des matériaux tout en réduisant l'expansion du réseau tridimensionnel (Figure 23).[97] Le GPTMS a également été utilisé pour moduler l'hydrophobie d'un matériau à empreinte de protéines[98], mais le motif époxyde présent peut entraîner la liaison covalente irréversible de la protéine au matériau.[99] Le 3-(triméthoxysilyl)-propylméthacrylate (KH-570), grâce à sa fonction méthacrylate, peut moduler l'hydrophobie d'un matériau, mais également être utilisé pour la synthèse de polymères hybrides organiques/inorganiques (Figure 23).[100,101] L'hydrophilie d'un matériau peut être modulée par ajout de motif PEG (2-[méthoxy(polyéthylèneoxy) propyl] triméthoxysilane (oligo (oxyde d'éthylène) silane, MPEPTMS), en complément du TMOS et du MTMS (Figure 23).[102,103] Certains de ces monomères hybrides peuvent également être sélectionnés pour leurs effets structuraux sur les protéines, comme des dérivés du trifluoroéthanol (TFE) ou l'hexafluoroisopropanol (HFIP), qui favorisent la formation de structures secondaires (hélices, feuillets). Ainsi, en s'inspirant de ces propriétés, Peng *et al.* ont utilisé le 3,3,3-(trifluoropropyl)triméthoxysilane (3F) pour préparer un gel hybride capable de piéger une protéine dans une conformation souhaitée (Figure 23).[104] Le matériau hybride a été polymérisé autour de la protéine β-lactoglobuline (BLG), induisant la formation d'une hélice α de la BLG plus forte que celle de la BLG dans l'HFIP.

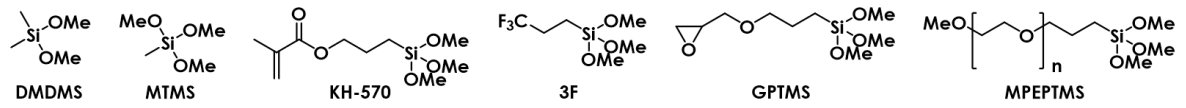


Figure 23 - Monomères hybrides organiques-inorganiques modulant les propriétés physico-chimiques des matériaux à base de silice

Les matériaux hybrides sont séparés dans deux classes distinctes. Dans la classe I (inorganiques-dans-organiques), la cohésion entre les fragments organiques et la matrice inorganique se fait par le biais d'interactions faibles (liaisons de Van der Waals, électrostatiques ou hydrogène). Dans la classe II (organiques-dans-inorganiques), les fragments organiques sont liés à la matrice par des liaisons covalentes Si-C stables.[95]

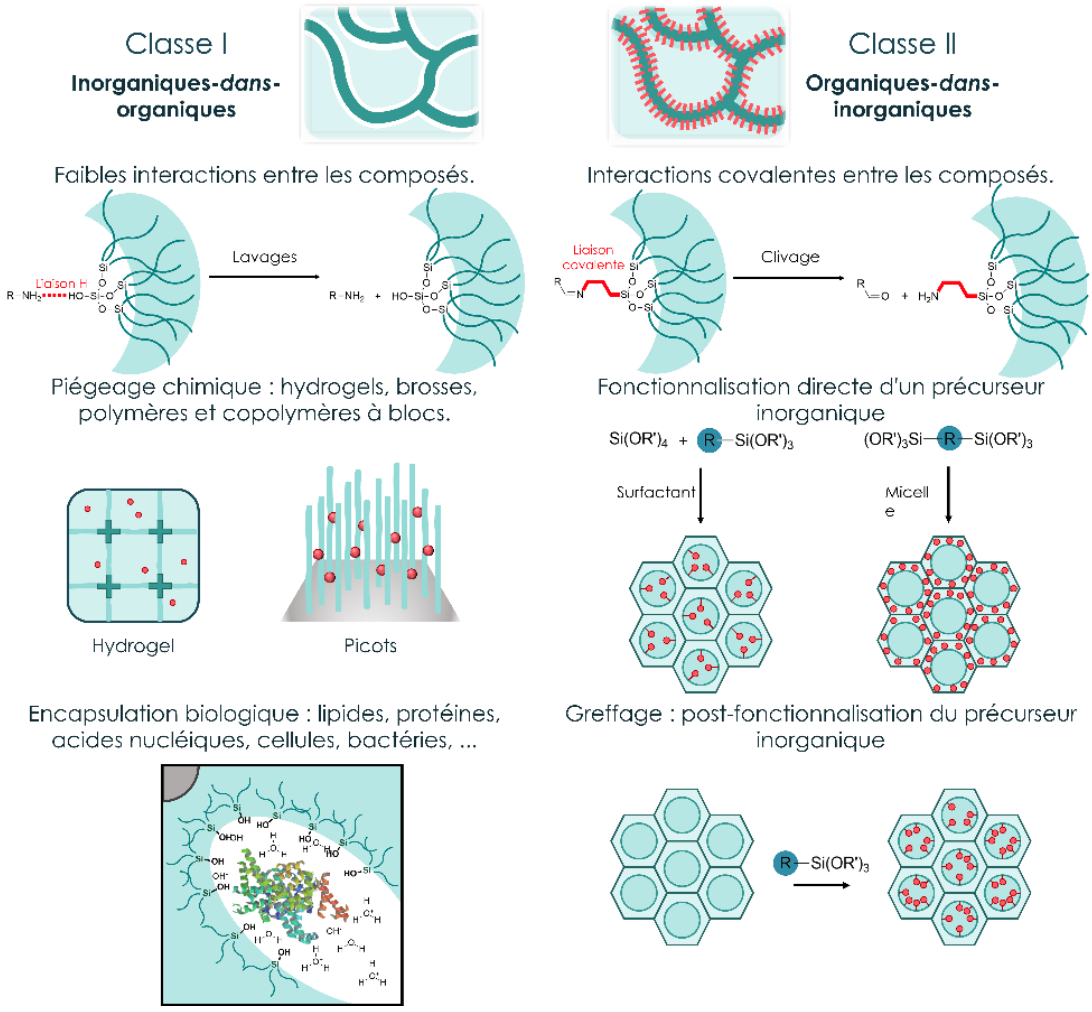


Figure 24 - Matériaux hybrides de classes I et II

3.4 Méthodes de caractérisation

Lorsque les MIP sont synthétisés sur des nanoparticules, il est nécessaire de caractériser leur taille. La DLS (*Dynamic Light Scattering*) permet d'obtenir des informations sur leur distribution en taille. Les particules, en suspension dans un solvant, sont irradiées par une onde lumineuse. La mesure de l'intensité de la lumière diffusée donne des informations sur le rayon hydrodynamique des particules en suspension dans l'échantillon.[105] La DLS permet également de mesurer le potentiel zêta d'une particule et donne ainsi une information sur son état de charge. La microscopie est une autre méthode permettant de visualiser les nanoparticules et également les différentes couches qui les composent. Ainsi, l'épaisseur de la couche de MIP peut être obtenue par microscopie électronique en transmission, qui mesure les électrons transmis et permet d'étudier les différences structurales entre les différentes couches. La microscopie électronique à balayage est basée sur la focalisation d'un faisceau d'électrons sur l'objet étudié. Le balayage du faisceau sur la surface de l'objet permet d'éjecter par la suite des électrons secondaires spécifiques qui vont être détectés, aboutissant à la

construction de l'image. Cette méthode peut être utilisée pour la caractérisation des MIP à la surface de nanoparticules mais également dans des monolithes.[106]

La composition chimique de l'empreinte peut être caractérisée par différentes méthodes, comme l'analyse thermogravimétrique (ATG) ou encore la résonance magnétique nucléaire (RMN) du liquide ou du solide. L'ATG enregistre la perte de masse d'un matériau en fonction de la température. En plus de fournir un profil de dégradation du matériau, et donc une fenêtre de stabilité thermique du MIP, l'ATG permet de détecter et de quantifier la partie organique du matériau.[107] L'analyse RMN, en plus de fournir des informations sur la composition chimique de l'empreinte, permet d'étudier le mécanisme de formation des empreintes moléculaires et de caractériser les interactions entre la cible et les monomères fonctionnels.[37]

Toutes les méthodes d'analyses permettant de caractériser des matériaux peuvent être employées pour caractériser une empreinte moléculaire.

3.5 Propriétés de reconnaissance

Pour évaluer les capacités de reconnaissance d'un MIP, il est nécessaire de synthétiser un matériau contrôle qui ne présente pas d'empreintes. Ce matériau, le NIP (*non imprinted polymer*), est préparé dans les mêmes conditions que le MIP sans la molécule cible. La sélectivité du MIP, c'est-à-dire à la proportion d'interactions spécifiques provenant de l'empreinte (MIP) par rapport aux interactions non spécifiques provenant du matériau en lui-même (NIP)[108], est représentée par le facteur d'empreinte (FE) qui est déterminé par l'Équation 1[109] :

$$FE = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}}$$

Équation 1 - Détermination du facteur d'empreinte (FE), où Q_{MIP} est la quantité de cibles liées au MIP et Q_{NIP} la quantité de cibles liées au NIP

Une empreinte est considérée comme réussie lorsque le facteur d'empreinte est supérieur à 1.

Un grand nombre de techniques peut être utilisé pour déterminer la quantité de cibles liées au MIP ou au NIP, comme des systèmes de type SPR (résonance plasmonique de surface) ou QCM (microbalance à quartz), ou encore des tests ELISA.

3.6 Les empreintes de protéines par procédé sol-gel

Les polymères à empreintes moléculaires peuvent donc être préparés de différentes manières. L'approche employée, la méthode de polymérisation et les monomères fonctionnels utilisés sont dépendants de la cible de l'empreinte.

Un des objectifs de ce travail est la préparation d'empreintes biomimétiques de protéines. Utiliser une protéine comme cible entraîne plusieurs contraintes, liées à sa stabilité chimique et à sa structure tridimensionnelle. En effet, pour obtenir une empreinte pertinente d'une protéine cible, elle ne doit être ni dénaturée pendant la formation de l'empreinte, ni déstructurée. Synthétiser le MIP dans des conditions biocompatibles devrait permettre d'éviter toutes dénaturation et déstructuration de la protéine, pour aboutir à une empreinte pertinente. Le procédé sol-gel a donc été choisi comme méthode de polymérisations puisqu'il permet une synthèse dans l'eau, à température ambiante et avec un contrôle du pH.

Une autre approche consiste à utiliser un peptide, composé d'une séquence en aminoacide correspondant à une partie de la protéine d'intérêt, comme molécule cible : les empreintes d'épitopes. Le peptide étant plus stable que sa protéine correspondante, des conditions de synthèse plus dures peuvent être employées. Toutefois, les empreintes d'épitopes présentent des résultats moins intéressants que les empreintes de la protéine native correspondante, souvent dus au fait que la structure tridimensionnelle de l'épitope dans la protéine native n'est pas forcément conservée dans le peptide.[110]

3.6.1 Méthode d'immobilisation des protéines

Les protéines présentent de nombreux donneurs et accepteurs de liaisons Hydrogène à leurs surfaces, elles peuvent donc facilement être adsorbées sur une surface de silice par le biais d'interactions faibles mais nombreuses et distribuées sur une grande surface (comparativement à une petite molécule organique). Le point isoélectrique de la protéine jouera un rôle dans le choix de l'approche. En effet, en considérant une synthèse d'empreinte à pH 7, une protéine avec un pI de 10 sera globalement chargée positivement et pourra facilement être adsorbée et l'approche non covalente sera envisagée. A l'inverse, une protéine avec un pI de 5 sera globalement neutre ou chargée négativement et ne pourra pas s'adsorber sur la silice, une approche semi-covalente sera probablement plus adaptée.

Approche non covalente

Les surfaces fonctionnalisées par des acides carboxyliques sont décrites comme étant beaucoup plus adaptées à l'adsorption de protéines que leurs homologues nus[111] en raison d'interactions électrostatiques ou de liaisons H[112] selon la nature de la protéine. Par exemple, Yang *et al*. ont pré-incubé le lysozyme (pI = 11,5) dans un tampon PBS (pH 7, 10 mmol/L) avec le monomère fonctionnel (APTES) pendant 3 h au contact de nanoparticules magnétiques (Fe_3O_4@CO_2H) avant d'ajouter le TEOS pré-hydrolysé.[113] La présence de groupements acides carboxyliques sur les nanoparticules a favorisé l'adsorption des protéines par interactions électrostatiques. D'une façon similaire, Zhang *et al.*[114] ont conjugué, via la formation de liaisons

amides, des quantum dots modifiés avec des carboxylates à la surface de particules de silices présentant des fonctions amines. En plus d'apporter des propriétés photoluminescentes aux nanoparticules de silice, ces quantum dots ont permis d'améliorer l'adsorption de la phycocyanine grâce aux carboxylates résiduels pendant les 30 minutes d'incubation avec l'APTES.

Approche semi-covalente

Une alternative à l'approche non covalente, lorsque l'adsorption de la protéine n'est pas efficace, est l'approche semi-covalente. La principale méthode rapportée pour l'immobilisation semi-covalente de protéines est la formation réversible d'une imine entre le glutaraldéhyde (GA) et une amine primaire présente sur la protéine (amine N-terminale ou chaîne ε de la lysine). La surface où le MIP va être préparé est d'abord modifiée avec une amine primaire (souvent avec l'APTES) qui va être pré-conjuguée avec le GA, avant d'être en contact avec la protéine. Cette réaction se fait à pH neutre dans l'eau, puis, après la polymérisation, la protéine est éliminée par lavages acides, régénérant l'aldéhyde de départ.

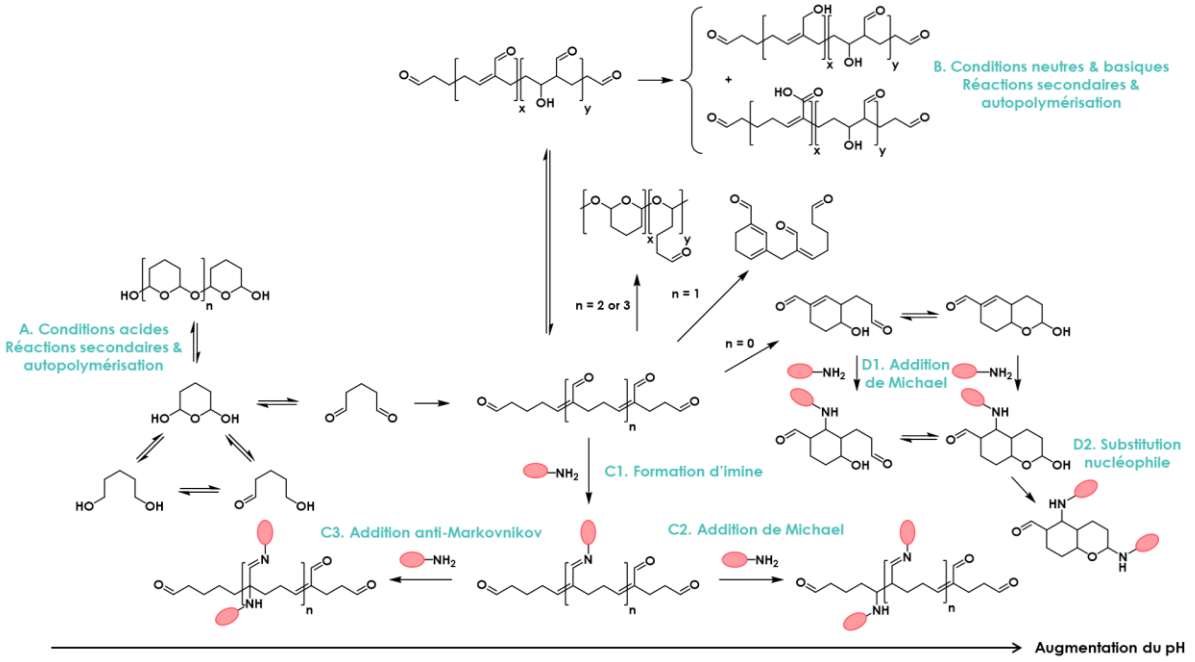


Figure 25 - Principales réactions entre le GA et des amines primaires

Le mécanisme de la réaction entre le GA et l'amine primaire, et donc le produit final, dépend de plusieurs paramètres, notamment la quantité de glutaraldéhyde utilisée. En effet, des réactions d'autopolymérisation du glutaraldéhyde peuvent se produire. En milieu acide, le GA polymérise sous forme de polyhémiacétal, alors qu'en milieu neutre ou basique, il polymérise sous forme de polymère d'aldéhyde α,β-insaturé, forme la plus réactive (Figure 25A et B).[115] L'aldéhyde α,β-insaturée réagit avec une première protéine en formant l'imine (Figure 25C1), puis, une seconde protéine peut réagir par addition anti-Markovnikov sur le carbone α (Figure

25C2), ou par addition de Michael sur le carbone β de l'insaturation (Figure 25C3), en fonction du pH.[116] En milieu basique, la protéine peut être directement liée de manière covalente par addition de Michael (Figure 25D1) ou par substitution nucléophile (Figure 25D2). Dans tous ces cas, la réaction aboutit à une liaison C-N irréversible, les protéines liées de cette façon au matériau ne pourront pas être enlevées.

D'autre part, en travaillant dans des conditions fortement acides pH (< 4), l'amine ε de la lysine, très réactive, est protonée et donc moins nucléophile. Ainsi, la formation d'hémiacétal avec un groupe hydroxyle est favorisée par rapport à la formation de l'imine. Ce mécanisme, établi par Farris *et al.*, montre qu'à pH acide, la formation d'hémiacétal avec le groupe hydroxyle de l'hydroxyproline ou de l'hydroxylysine est favorisée vis-à-vis de la formation de l'imine.[117] On peut supposer que cette réaction peut se produire dans les mêmes conditions avec le groupe hydroxyle de la sérine et de la thréonine et peut évoluer vers la formation d'acétals. De même, Baert *et al.* ont montré que la formation d'hémithioacétal puis de thioacétal pouvait avoir lieu entre le GA et le thiol d'une cystéine (Figure 26A1 et A2). En outre, si le GA est sous la forme polymère d'aldéhyde α,β-insaturé, le groupe sulfhydryle d'un résidu cystéine peut être un donneur de Michael et réagir avec l'aldéhyde α,β-insaturé.[118] Un second groupe sulfhydryle peut ensuite réagir avec l'aldéhyde pour former un hémithioacétal (Figure 26B1 et B2).[118]

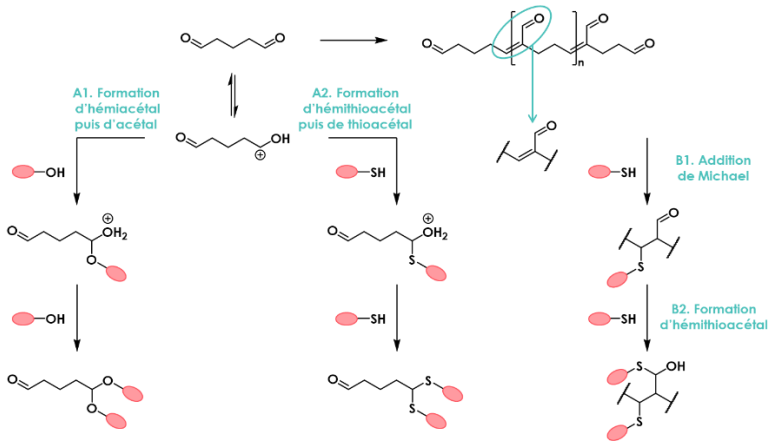


Figure 26 - Réactions possibles entre le GA et des alcools et thiols

Pour éviter ces réactions secondaires, une étude, menée sur l'immobilisation de la ribonucléase A par le glutaraldéhyde sur des billes Spherosil-amine, a montré que les conditions de pH sont déterminantes pour la conservation de l'activité enzymatique. L'immobilisation de protéines par le GA doit donc préférentiellement avoir lieu à température ambiante et avec un pH compris entre 6,3 et 6,5.[119]

Une alternative à l'immobilisation par le GA a été proposée par plusieurs équipes[120–122] : l'immobilisation par coordination métallique où un ion Cu^{2+} va se coordiner avec les carboxylates présents sur le support et l'azote π de l'imidazole d'une chaîne latérale d'histidine. Une étape de fonctionnalisation du support est donc nécessaire. Après la génération de

l'empreinte, la protéine est retirée par un simple lavage à l'imidazole (Figure 27).[120,122] Ainsi, les ions Cu^{2+} ont été utilisés comme points d'ancrages à la surface de la silice. Les empreintes de la BHb[121,122] et de la PSA[120] ont été obtenues après immobilisation au cuivre, avec une capacité d'adsorption de 110-180 mg/g et 20 mg/g respectivement. Le nombre plus élevé de résidus histidine accessibles sur la BHb (24) que sur la PSA (2) peut expliquer cette différence.[122] Dans les deux cas, la capacité d'adsorption est significativement augmentée par rapport au MIP préparé sans le cuivre, d'un facteur 2 pour la BHb et d'un facteur 10 pour la PSA.

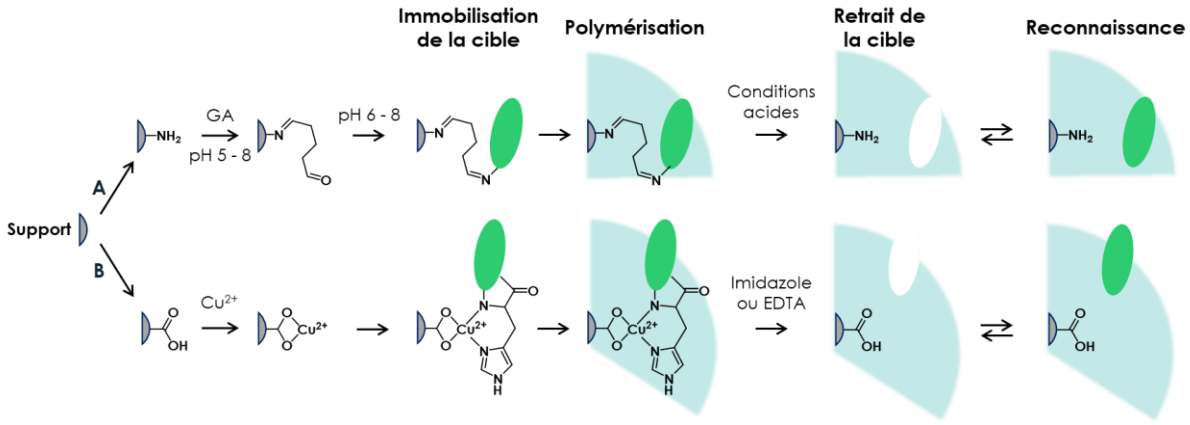


Figure 27 - Approche semi-covalente des MIP de protéines
A- Immobilisation par le glutaraldéhyde. B- Immobilisation par le Cu^{2+}

3.6.2 Les monomères fonctionnels

Les acides aminés constituant les protéines sont responsables des interactions protéine-protéine. Des monomères fonctionnels mimant les chaînes latérales d'acides aminés permettraient d'obtenir un maximum d'interactions entre l'empreinte et la protéine. Contrairement aux monomères fonctionnels organiques (type acrylate ou vinyle), seuls deux monomères fonctionnels possédant des groupements chimiques présents dans certains aminoacides sont commercialement disponibles à ce jour (Figure 28).

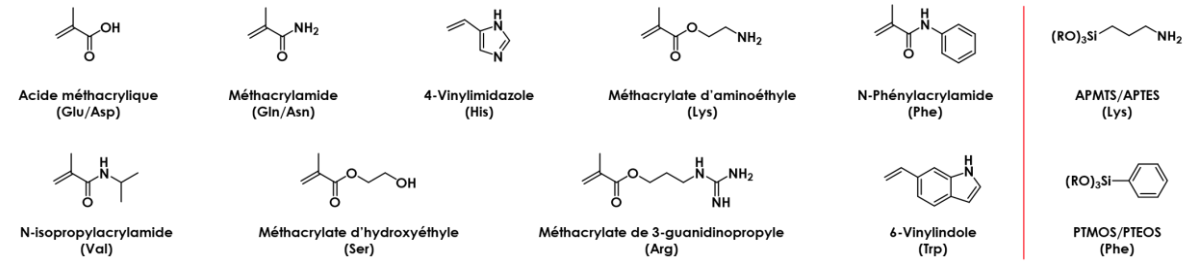


Figure 28 - Monomères fonctionnels organiques (à gauche)[65] et inorganiques (à droite) commerciaux mimant les chaînes latérales des acides aminés protéogéniques

Les monomères fonctionnels apportent au matériau la partie organique, souvent des fonctions amines ou alcools pour les interactions ioniques et hydrogènes, ou encore des dérivés aromatiques pour des interactions de type π-stacking (Figure 29). Deux types de monomères

fonctionnels ont été longtemps étudiés pour les MIP de protéines par sol-gel : l'OTMS pour les interactions hydrophobes générées par la chaîne octyle et l'APTES/APTMS pour l'amine primaire protonable. Ce dernier était particulièrement populaire pour les MIP de protéines acides comme la BSA (pI = 4,5).[123] A l'inverse, aucun monomère fonctionnel chargé négativement permettant d'interagir avec des protéines basiques, comme le lysozyme (pI = 11,5), n'a été rapporté. L'incorporation de nanoparticules magnétiques fonctionnalisées avec un motif carboxylate (Fe_3O_4@CO_2H) comme co-monomère est une alternative pour introduire la charge négative permettant l'interaction avec une protéine à point isoélectrique élevé.[113]

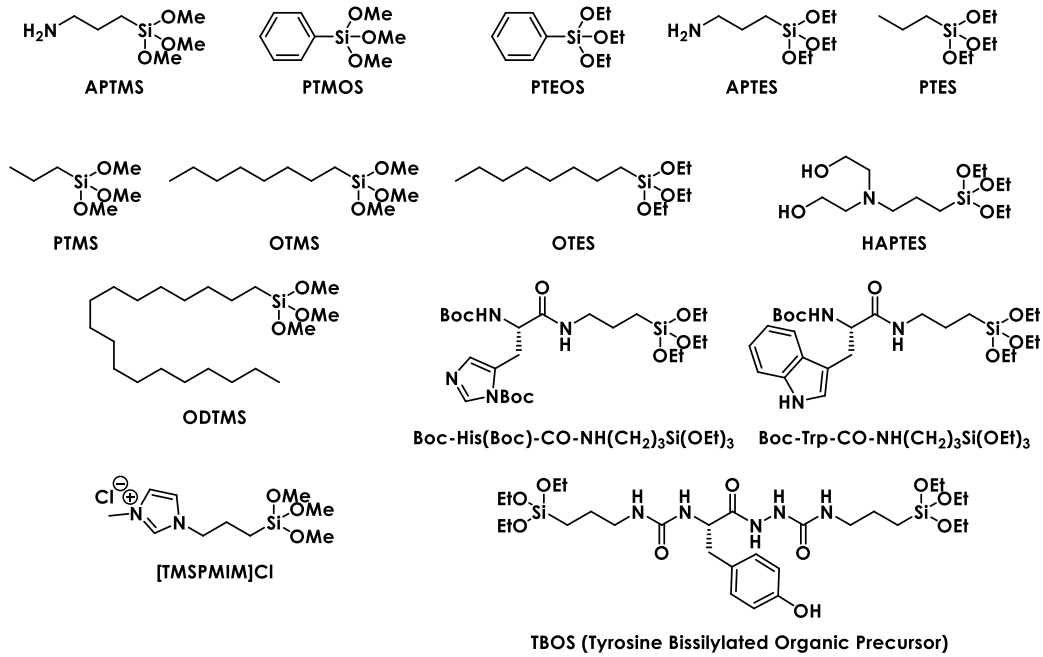


Figure 29 - Monomères fonctionnels commerciaux et de synthèse utilisés pour les empreintes moléculaires de protéines par procédé sol-gel

Comme mentionné précédemment, mimer les chaînes latérales des acides aminés naturels permettrait de créer des interactions avec les protéines. Dans ce sens, Liu *et al.* ont utilisé le [TMSPMIM]Cl, un liquide ionique présentant une fonction imidazolium (mime de la chaîne latérale de l'histidine) comme monomère fonctionnel pour créer des empreintes de la BSA.[124] La forte interaction électrostatique entre le cation imidazolium et la BSA stabilise le complexe cible/MF, entraînant une capacité de liaison et une sélectivité plus élevée. De plus, la formation de ce complexe, suivie par spectroscopie UV-Vis, a pu être optimisée. Enfin, l'utilisation de triméthoxysilanes, dont les cinétiques d'hydrolyse et de condensation sont plus rapides que pour les triéthoxysilanes, a permis d'accélérer la polymérisation en milieu basique (2 h à pH 9), où on observe les interactions les plus fortes pour cette cible et ce monomère fonctionnel (Figure 29).

D'autres monomères fonctionnels originaux mimes d'acides aminés, développés pour des MIP de petites molécules ou pour l'adsorption de protéines, pourraient être employés pour des MIP

de protéines. En effet, Christoforidis *et al.* ont préparé des empreintes de la para-benzoquinone (pBQ) avec des acides aminés N-Boc silylés (Boc-His(Boc)-NH-$(CH_2)_3Si(OEt)_3$ et Boc-Trp-NH-$(CH_2)_3Si(OEt)_3$).[125] Pour obtenir ces acides aminés silylés, la fonction acide est activée sous forme d'anhydride mixte avec du chloroformiate d'isobutyle en milieu basique. L'APTES (3-aminopropyltriéthoxysilane) est directement ajouté au mélange après 3 min d'agitation. Une fois l'APTES entièrement consommé, le mélange est filtré à froid sur célite puis le solvant est évaporé (Figure 30). Ces monomères ont été condensés avec du TEOS en présence de pBQ, générant des matériaux hybrides de classe II. Après retrait de la cible, les amines N-Boc ont été déprotégées par un traitement au TFA. Les deux MIP ainsi obtenus sont les premiers matériaux synthétiques biomimétiques des photosystèmes I (pour la silice Trp) et II (pour la silice His).

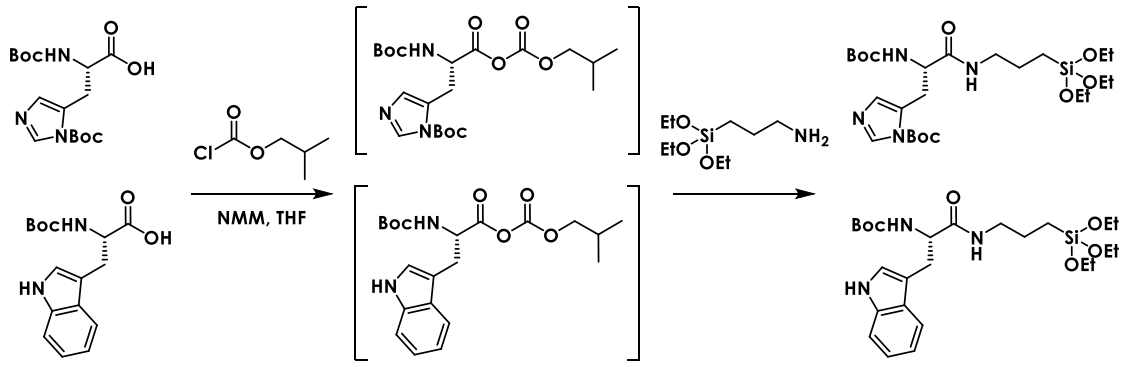


Figure 30 - Synthèse des acides aminés N-Boc silylés sur la fonction acide via un anhydride mixte

De façon similaire, Öztürk-Öncel *et al.* ont utilisé la leucine et l'histidine silylées pour améliorer les propriétés d'adhésion cellulaire d'un matériau à base de poly(diméthylsiloxane) (PDMS).[126] Dans ce but, ils ont silylé la leucine et l'histidine (protégées sur l'amine par un groupement Z) sur la fonction acide, en utilisant du benzotriazole comme agent de couplage. Les lamelles recouvertes de PDMS ont été activées au plasma d'oxygène, puis ont été plongées dans une solution d'histidine silylée (ou de leucine silylée) dans de l'éthanol pour former une monocouche auto-assemblée (Figure 31). Les lamelles ainsi obtenues ont montré une amélioration du comportement cellulaire *in vitro*, notamment lorsqu'elles sont fonctionnalisées avec l'histidine silylée.

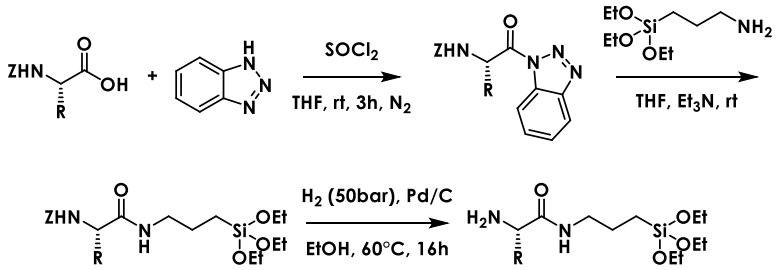


Figure 31 - Synthèse des acides aminés silylés sur la fonction acide via une activation au benzotriazole

Les acides aminés peuvent également être silylés sur leur fonction amine en utilisant l'isocyanatopropyltriéthoxysilane (ICPTES). Warren *et al.* ont utilisé l'ICPTES comme agent de

silylation pour générer divers précurseurs de sol-gel multifonctionnels (acides aminés, hydroxy acides, peptides, alcoxyde de silicium).[127] Ces précurseurs ont ensuite été couplés à différents acétates de métal afin d'améliorer la conductivité électrique de matériaux poreux à base de silice, qui sont habituellement des matériaux isolants (Figure 32).

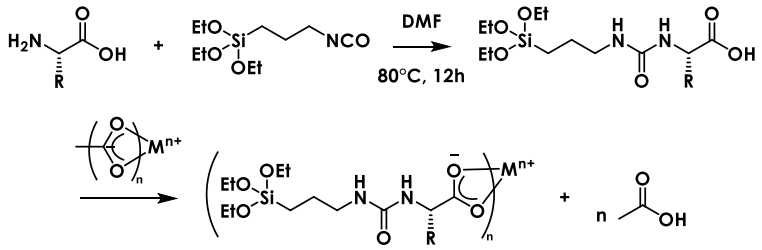


Figure 32 - Silylation d'acide aminés sur la fonction amine avec l'ICPTES

Ratirotjanakul *et al.* ont étudié l'influence d'acides aminés sur la biodégradation de nanoparticules de silice mésoporeuse.[128] Ce type de nanoparticules peut avoir de nombreuses applications dans des systèmes biologiques, mais elles provoquent une toxicité cumulative, qui pourrait être réduite si ces nanoparticules présentaient une meilleure biodégradation. Pour cela, ils ont utilisé la voie de synthèse développée par Warren *et al.* pour silyler la glycine, la cystéine et l'acide aspartique pour les incorporer dans les nanoparticules. Ils ont ensuite étudié le mécanisme de dégradation et ont montré que l'augmentation du nombre de fonctions carboxylates entraînait une dégradation de la silice plus rapide. Ainsi, ils ont montré que leurs nanoparticules fonctionnalisées avec l'acide aspartique présentaient une cytotoxicité négligeable contre les fibroblastes L929.

Les acides aminés peuvent également être doublement fonctionnalisés (Figure 33). Ainsi, Wang *et al.* ont synthétisé une silice mésoporeuse SBA-15 en présence d'un précurseur organique bisilylé de tyrosine (TBOS) pour améliorer l'adsorption de la peroxydase de raifort (HRP).[129]

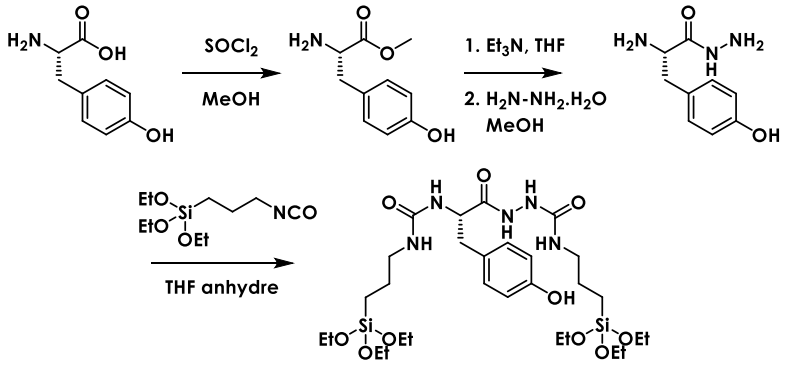


Figure 33 - Synthèse de la tyrosine bisilylée (TBOS)

L'impact du pourcentage de TBOS a été étudié sur la structure mésoporeuse finale et sur sa capacité à immobiliser l'enzyme. Les matériaux fonctionnalisés avec la tyrosine présentaient une structure mésoporeuse hexagonale bien ordonnée, et la présence de TBOS a amélioré la

flexibilité du matériau final. Les meilleurs résultats pour l'immobilisation de la HRP ont été obtenus avec un ratio de 10% molaire de TBOS. La liaison de la protéine est principalement favorisée par les charges du matériau, conduisant à des adsorptions plus élevées à un pH inférieur à 7, où la charge globale de la HRP est positive (pI = 8,9) alors que la charge globale de la surface est négative (pI de la silice = 2).

Dans un autre article, Wang *et al.* ont utilisé l'histidine bisilylée (His-BOP avec la même voie de synthèse que pour la tyrosine) pour améliorer la flexibilité du matériau ainsi que sa sensibilité à la réponse au pH pour des applications de délivrance de principes actifs, notamment le paclitaxel.[130] Sur un matériau à 10% molaire d'His-BOP, les résultats ont montré que le pourcentage et la vitesse de libération du paclitaxel ont augmenté avec la diminution du pH.

Certains acides aminés peuvent également être silylés sur leurs chaînes latérales (Figure 34). Ainsi, pour limiter la formation de couronnes protéiques autour de nanoparticules de silice, Mahmoudi *et al.* ont silylé la cystéine sur sa chaîne latérale pour obtenir une espèce zwitterionique silylée.[131] En effet, la présence de zwitterions à la surface des nanoparticules a permis de prévenir la formation d'une couronne protéique et a également amélioré la capacité de ciblage des nanoparticules. Cela permettrait le développement de systèmes d'administration de médicaments à base de NP plus efficaces pour le traitement de maladies. On notera que l'amine protonée non nucléophile ne réagit pas sur l'isocyanate, et que le thiol étant bien moins réactif, la formation du thiocarbamate est bien plus lente que la formation de l'urée.

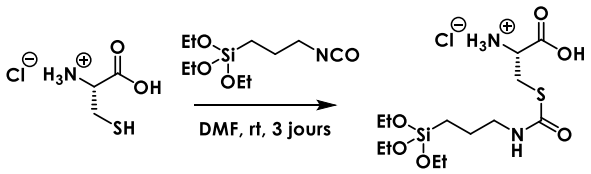


Figure 34 - Silylation de la cystéine sur sa chaîne latérale

Comme dit précédemment, peu de monomères fonctionnels sont disponibles commercialement pour mimer les interactions protéine-protéine, et l'utilisation des monomères fonctionnels mimes d'acides aminés est encore sous exploitée pour générer des empreintes de protéines. En effet, sur les sept synthèses de monomères fonctionnels présentées dans ce paragraphe, un seul a été synthétisé pour être utilisé comme monomère fonctionnel pour la génération d'empreintes de protéines.

3.6.3 Applications des MIP de protéines par sol-gel

Contrairement aux acides nucléiques qui peuvent être amplifiés puis détectés par PCR, la concentration des protéines ne peut pas être augmentée et il est nécessaire d'imaginer des

solutions pour permettre leur détection à des concentrations très faibles dans des milieux complexes. Les empreintes de protéines peuvent ainsi être utilisées pour la conception de nouveaux systèmes de détection et de séparation. L'application envisagée de l'empreinte va déterminer le choix de son support (nanoparticules, monolithes, capteurs, etc…).

Différentes sortes de nanoparticules ont été utilisées comme support pour des MIP de protéines par procédé sol-gel. Des nanoparticules de silicate de calcium[100], des nanoparticules de silice[132] et des billes de chitosan[133] ont été utilisés comme support pour générer des empreintes de la BSA[100] ou du Lyz[132,133] avec des facteurs d'empreinte compris entre 2 et 2,5. Des expériences de liaisons avec des protéines compétitrices ont été menées sur ces trois MIP et ont mis en évidence des capacités de liaisons deux fois plus élevées pour la protéine cible, illustrant la diversité des supports non magnétiques utilisables pour la synthèse de MIP ayant des résultats prometteurs pour la séparation de protéines. Cependant, les nanoparticules magnétiques sont souvent privilégiées car leur cœur magnétique permet une séparation avec un aimant plus rapide que la centrifugation et réduit également l'agglomération des nanoparticules.[134,135]

Des résines échangeuses d'ions à base d'agarose peuvent aussi être modifiées et présenter une couche de MIP à leur surface pour créer des résines à double reconnaissance : ionique et spatiale. En effet, les protéines peuvent être immobilisées sur la résine par interactions électrostatiques puis une couche de MIP peut être synthétisée, les fonctions hydroxy de l'agarose pouvant être impliquées dans le procédé sol-gel. Ainsi, des MIP de la BSA et de la bIgG ont pu être préparés directement sur une résine échangeuse d'ions (DEAE Bestarose FF). La double reconnaissance permet d'améliorer l'adsorption statique mais présente également une capacité d'adsorption plus élevée et plus rapide de la protéine cible que des protéines concurrentes.[136] Des monolithes peuvent être modifiés pour obtenir des systèmes d'extraction en phase solide qui, couplés à un système chromatographique (HPLC), permettent la séparation et la détection de protéines cibles.[137]

Les MIP de protéines peuvent également être utilisés dans la conception de nouveaux capteurs. Pour cela, la protéine cible doit interagir avec un élément de reconnaissance (le MIP), qui est en contact avec un transducteur. Dans le cas de la microbalance à quartz, le transducteur est une électrode en or utilisant l'effet piézoélectrique du quartz. L'électrode va être chimiquement fonctionnalisée pour pouvoir immobiliser la protéine cible, puis le MIP va être synthétisé sur l'électrode sous forme de film dont l'épaisseur est contrôlée (dip-coating ou spin-coating). L'élimination de la protéine, ainsi que les mesures de liaison, pourront être observées directement grâce aux changements de fréquences mesurés.[138,139] La sensibilité de la microbalance à quartz pourrait permettre la détection de protéines dans des quantités particulièrement faibles.

Tous ces exemples de MIP de protéines par procédé sol-gel ont été préparés avec des monomères fonctionnels commerciaux, en particulier l'APTES, mais aussi les PTEOS, PTMOS et OTMS. Ces monomères fonctionnels, présentant respectivement des motifs amine primaire (interactions ioniques et hydrogène), phényle (π-stacking) et octyle (interactions hydrophobes), font partis des rares alcoxysilanes commerciaux pouvant générer des interactions avec des protéines. Synthétiser et intégrer dans les MIP de nouveaux monomères fonctionnels dérivés d'acides aminés permettrait d'augmenter le panel d'interactions avec la protéine cible grâce à la diversité des chaînes latérales des acides aminés, et ainsi améliorer leur facteur d'empreinte.

4 Conclusion et positionnement du travail

Malgré leurs excellentes capacités de reconnaissance pour leurs cibles grâce aux CDR présents sur leurs paratopes, les anticorps présentent des inconvénients pour le développement d'applications, en particulier leur coût de fabrication et leur poids moléculaire élevé. L'expression de protéines recombinantes a permis le développement de différentes structures protéiques mimant les anticorps. Ainsi, le poids moléculaire de ces mimes est réduit par rapport à celui d'un anticorps, augmentant leur pénétration cellulaire. Ces mimes présentent souvent une meilleure stabilité que les anticorps, grâce à l'ajout de plusieurs pont disulfures par exemple. Toutefois, la production de ce type de mimes d'anticorps est un procédé onéreux par rapport à une synthèse chimique qui permet l'obtention de composés beaucoup plus stables en milieu biologique.

La liaison entre un anticorps et sa cible ayant lieu au niveau des CDR de l'anticorps, différents dérivés peptidiques ont été développés à partir des séquences en aminoacides composant ces CDR. Leur structure tridimensionnelle est capitale pour que la reconnaissance ait lieu, les CDR s'organisant sous forme de boucles entre deux brins β, des structures en coudes β ont d'abord été proposés. Une immunoglobuline présentant six boucles CDR, plusieurs plateformes ont été développées pour présenter plusieurs CDR sur un même objet. Enfin, ces CDR peuvent également être présentés à la surface de nanoparticules. La première partie de ce travail consiste en la synthèse de mimes peptidiques d'un nanobody anti-mésothéline, dont les résultats sont présentés dans le chapitre deux.

Des matériaux peuvent également présenter une reconnaissance spécifique pour une cible : les polymères à empreintes moléculaires. Les empreintes sont des sites de reconnaissance sélectifs de ligands. Lorsque le ligand est une protéine, l'empreinte peut alors être assimilée à un anticorps artificiel. La synthèse de MIP de protéines présente de nombreux défis, notamment liés à la faible stabilité chimique des protéines. En effet, la polymérisation ayant lieu en présence des protéines, les conditions doivent être non dénaturantes pour obtenir une empreinte pertinente. Le procédé sol-gel, qui permet de générer des matériaux dans des conditions aqueuses avec un contrôle du pH, semble être une méthode appropriée pour générer des empreintes de protéines. De plus, pour établir des interactions entre la cible et le matériau, le choix des monomères fonctionnels est primordial. Peu d'alcoxysilanes présentant des fonctionnalités chimiques capables d'interagir avec une protéines sont commercialement disponibles. La synthèse de nouveaux monomères fonctionnels répondant à cette problématique, ainsi que leur utilisation pour créer de nouveaux matériaux hybrides tels que les MIP, fait l'objet de la seconde partie de ce travail, dont les résultats sont présentés dans le chapitre trois.

Chapitre 2
Mimes du nanobody anti-mésothéline

1 Introduction

1.1 La mésothéline

La mésothéline (MSLN) est une glycoprotéine de surface liée au glycophosphatidylinositol (GPI). Sa forme immature (71 kDa) est clivée par une endoprotéase pour libérer la région N terminale, un facteur de potentialisation des mégacaryocytes, générant la MSLN mature (41 kDa), un facteur de différenciation des cellules mésothéliales dont la fonction biologique reste floue. Son expression normale se limite à ces cellules mésothéliales, qui forment le mésothélium (membrane recouvrant la plèvre, le péritoine et le péricarde) un tissu non crucial pour le fonctionnement de l'organisme. La mésothéline est surexprimée dans un certain nombre de cancers, comme l'adénocarcinome pancréatique et le cancer du sein triple négatif, deux cancers pour lesquels il n'existe pas encore de thérapie ciblée. Cette surexpression fait de la mésothéline une cible thérapeutique pertinente avec un risque de toxicité non spécifique réduit.[140]

La structure cristallographique de la MSLN entière n'est pas encore résolue, seule le domaine N terminal de la MSLN immature a pu être co-cristallisé en présence de l'anticorps MORAb-009.[141] Cependant, grâce à des outils d'intelligence artificielle comme AlphaFold, une prédiction de structure tridimensionnelle a déterminé que la MSLN possèderait une structure super-hélicoïdale avec des répétitions de type amyloïde (Figure 35).

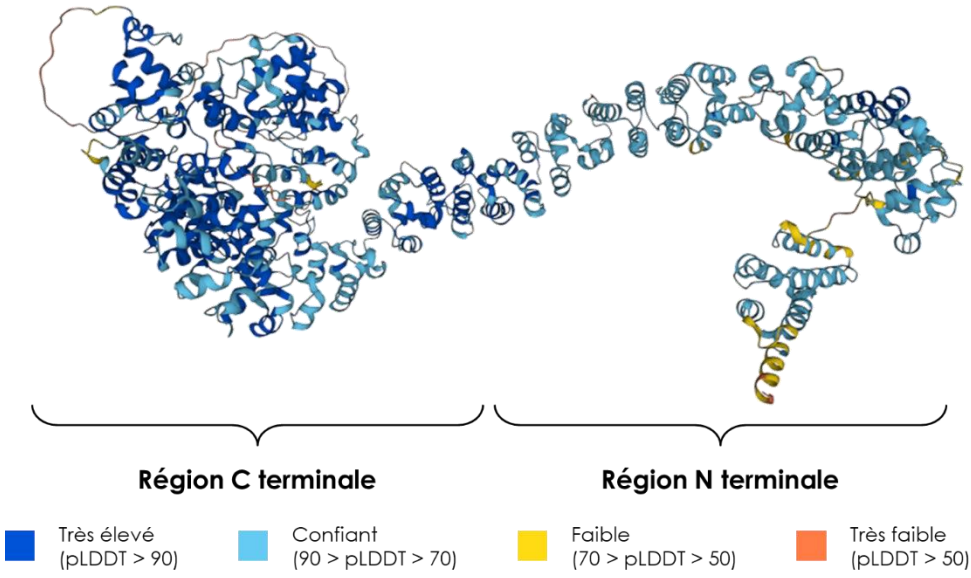


Figure 35 - Structure de la Mésothéline A prédite par AlphaFold
L'indice de confiance par résidu (pLDDT)[142], compris entre 0 et 100, est déterminé par le test de différence de distance locale, qui évalue les différences de distance locale de tous les atomes du modèle.

1.2 Le nanobody anti-mésothéline

Le laboratoire radiopharmaceutiques biocliniques (LRB) de Grenoble a récemment développé un nanobody anti-mésothéline permettant de détecter des tumeurs exprimant la mésothéline. Couplé à un radioélément (^{99}Tc, demi-vie d'environ 6h), il est possible d'utiliser ce nanobody comme agent d'imagerie nucléaire et de test compagnon pour identifier les patients pouvant bénéficier de thérapies ciblant la mésothéline.[143] S'il était couplé à un radioélément émetteur de rayon β+ (^{177}Lu, demi-vie d'environ 7 jours), il pourrait être utilisé comme agent thérapeutique. Une rétention non spécifique du nanobody dans les reins a été détectée lors des tests préliminaires, limitant son utilisation comme agent thérapeutique.[143,144]

L'objectif est donc d'obtenir un mime du nanobody anti-mésothéline de faible taille et de bonne affinité. En présentant un profil pharmacocinétique adapté à une approche théranostique, ces mimes pourraient cibler spécifiquement les cancers surexprimant la mésothéline.

Le nanobody anti-mésothéline, composé de 117 résidus, présente neufs brin β anti-parallèles structurés en deux feuillets β. Les boucles CDR (CDR1 : **Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg** ; CDR2 : **Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser** ; CDR3 : **Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr**) sont structurées en coudes β et forment la surface de liaison à la mésothéline.

1.3 Stratégie générale

Deux approches sont envisagées pour le développement de ces mimes (Figure 36). La première est d'utiliser chacune des boucles CDR de façon isolée. Pour cela, la synthèse de peptides dérivés des CDR du nanobody a été réalisée. Il s'agit de peptides linéaires puis cycliques afin de mimer leurs structures au sein du nanobody.

La seconde approche consiste à combiner certaines de ces boucles sur un châssis moléculaire afin de les présenter d'une façon similaire à leur présentation dans le nanobody, comme cela a été fait sur les RAFT[60,61,145–147] ou encore sur des châssis aromatiques[62,148]. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons choisi de greffer de multiples copies de ces peptides analogues de CDR, avec différents ratios à la surface de nanoparticules de silice, en espérant augmenter leur affinité par un effet combiné d'avidité et de multivalence (Figure 36).

Ce travail a été mené en collaboration avec le laboratoire pharmaceutiques biocliniques de Grenoble (INSERM U1039). Les tests d'interactions (Biacore, ELISA) avec la mésothéline ont été réalisés au LRB de Grenoble par le Dr. Charlotte Lombardi et le Dr. Alexis Broisat.

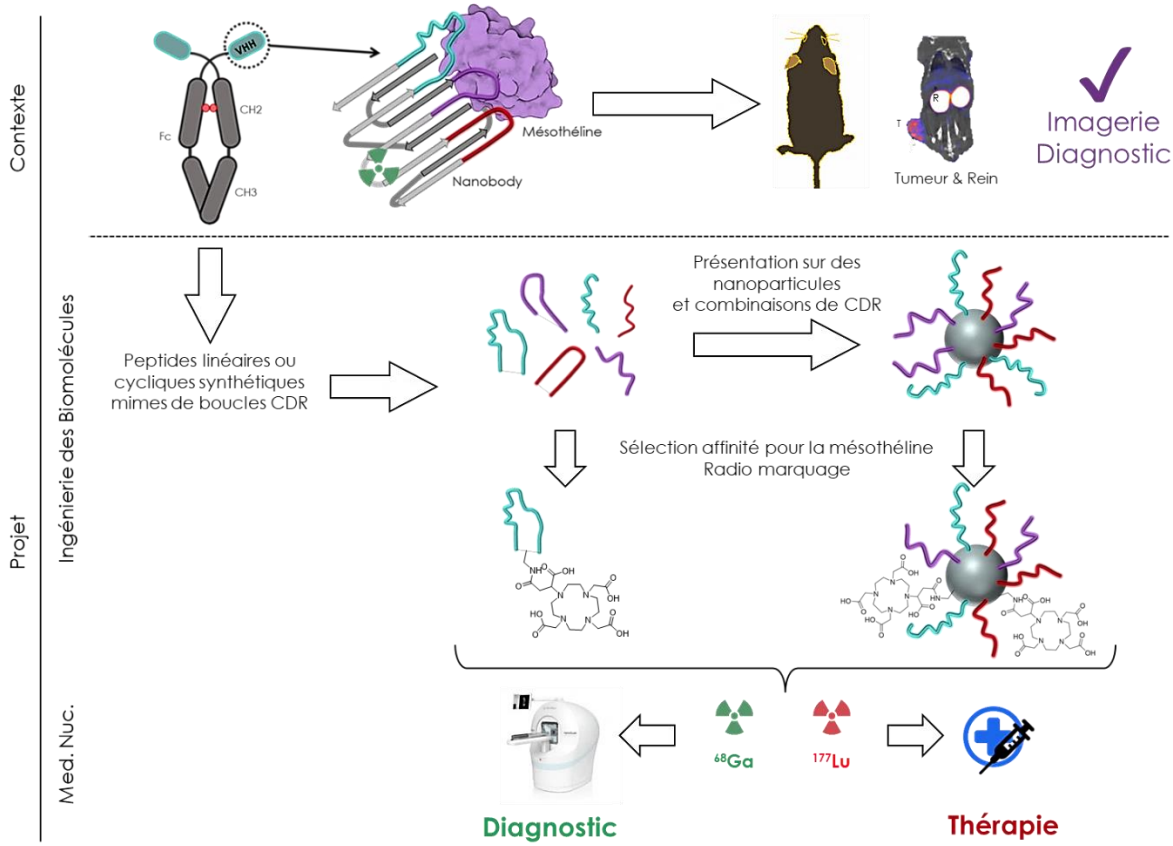


Figure 36 - Stratégie générale pour l'obtention de mimes du nanobody anti-mésothéline

2 Conception et synthèse des peptides

2.1 Peptides linéaires

2.1.1 Synthèse des peptides

Des peptides linéaires correspondant aux séquences des CDR sont préparés. Pour chaque CDR, deux versions sont synthétisées : une correspondant à la séquence exacte (composés A1, A3 et A5) et une incluant les trois résidus des brins β avant et après le CDR (composés A2, A4 et A6) (Tableau 1). Les peptides, dont l'affinité pour la mésothéline est mesurée par test ELISA, sont biotinylés à l'extrémité N terminale pour pouvoir être détectés avec la streptavidine/HRP. L'extrémité C terminale est sous forme amide pour éviter toute interaction avec la charge négative apportée par l'acide C terminal (Figure 37).

Le nanobody anti-mésothéline a un poids moléculaire d'environ 12 800 Da. Les peptides synthétisés ici, dont le poids moléculaire est compris entre 933 Da et 2 230 Da en fonction des séquence et de l'inclusion des résidus des brins β, représente entre 1/13ème et 1/5ème du poids moléculaire du nanobody.

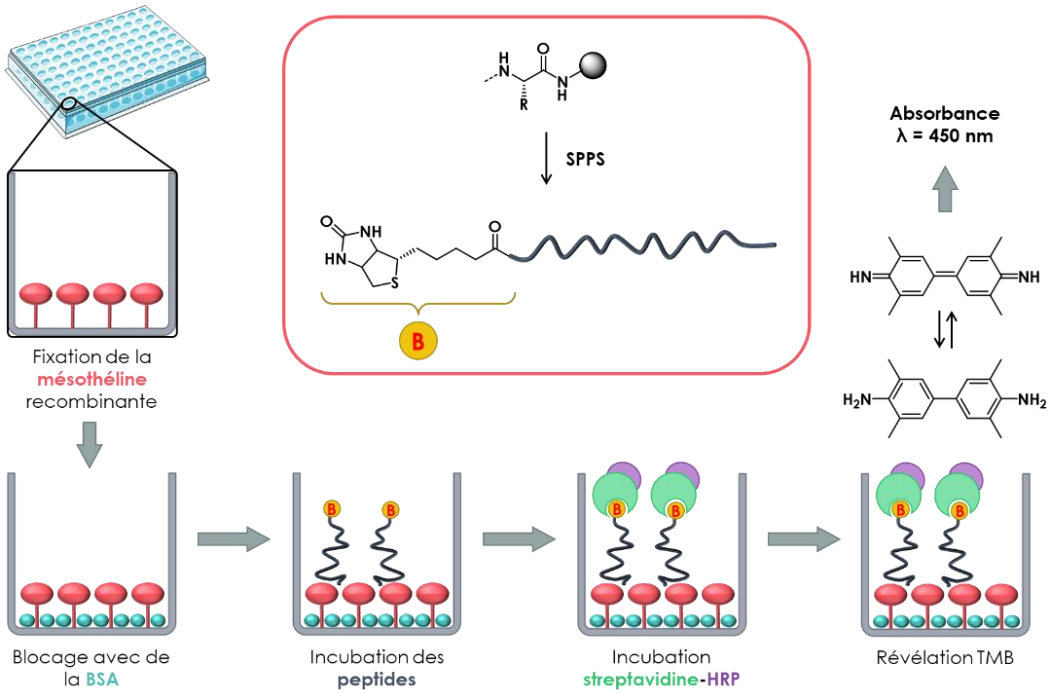


Figure 37 - Synthèses et évaluation des peptides par test ELISA

Cette série de peptides est synthétisée sur support solide par stratégie Fmoc/tBu sur une résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g). Les peptides bruts obtenus après clivage ont été purifiés par HPLC préparative avant d'être analysés par UPLC-MS.

Tableau 1 - Séquences des premiers peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline

CDR	N°	Séquence	Rdt	Pureté
CDR1	A1	Biotin-**Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg**-NH_2	31%	91%
	A2	Biotin-**Ala-Ala-Ser**-**Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg**-**Met-Arg-Trp**-NH_2	22%	91%
CDR2	A3	Biotin-**Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser**-NH_2	43%	86%
	A4	Biotin-**Val-Ala-Leu**-**Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser**-**Tyr-Tyr-Glu**-NH_2	18%	85%
CDR3	A5	Biotin-**Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr**-NH_2	27%	94%
	A6	Biotin-**Tyr-Tyr-Cys**-**Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr**-**Trp-Gly-Gln**-NH_2	11%	90%

La partie en violet correspond au CDR1, en rouge au CDR2, en bleu au CDR3 et en gras aux résidus présents dans les brins β.

Après clivage, les peptides se sont avérés délicats à analyser et à purifier à cause de leur faible solubilité aqueuse. En effet, ils présentent de nombreux résidus hydrophobes, et la biotinylation de l'extrémité N terminale augmente cette hydrophobie. Des tests de solubilisation à une concentration de 5 mmol/L ont été réalisés pour trouver des conditions d'analyses convenables. Aucune séquence n'était soluble à cette concentration dans l'eau (eau milliQ et tampon PBS pH 7,4), dans différents mélanges eau/ACN ou encore dans l'ACN pur. Nous avons été contraints d'utiliser des mélanges PBS pH7.4/DMSO. Entre 5 et 10% (v/v) de DMSO, aucune séquence n'est soluble. A 20% DMSO, seuls les composés A1, A3 et A5 sont solubles (séquences « courtes »). Les composés A2, A4 et A6 (séquences « longues ») n'ont pas pu être solubilisées même à 40% DMSO. Nous avons donc envisagé de modifier ces séquences afin de leur conférer une meilleure solubilité.

2.1.2 Ajout du bras solubilisant

Un bras tétrapeptidique espaceur contenant des résidus hydrophiles cationiques (Arg-Gly-Arg-Gly, indiqué RGRG dans le Tableau 2), dit « solubilisant », a été introduit du côté N terminal, afin d'augmenter la solubilité des peptides. Ces peptides (composés A7 à A12) ont été synthétisés et purifiés de la même manière que la première série (Tableau 2).

Tableau 2 - Séquences des peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline après l'ajout du bras solubilisant.

CDR	N°	Séquence	Rdt	Pureté
CDR1	A7	Biotin-RGRG-**Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg**-NH_2	60%	94%
	A8	Biotin-RGRG-**Ala-Ala-Ser**-**Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg**-**Met-Arg-Trp**-NH_2	10%	85%
CDR2	A9	Biotin-RGRG-**Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser**-NH_2	99%	95%
	A10	Biotin-RGRG-**Val-Ala-Leu**-**Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser**-**Tyr-Tyr-Glu**-NH_2	12%	97%
CDR3	A11	Biotin-RGRG-**Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr**-NH_2	46%	89%
	A12	Biotin-RGRG-**Tyr-Tyr-Cys**-**Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr**-**Trp-Gly-Gln**-NH_2	13%	93%

La partie en violet correspond au CDR1, en rouge au CDR2, en bleu au CDR3, en gras aux résidus présents dans les brins β et en gris le bras solubilisant.

A 5 mmol/L, les composés A7, A9 et A11 (séquences « courtes ») présentant le bras solubilisant se sont avérés solubles dans le PBS pH 7,4. Les composés A8, A10 et A 12 (séquences « longues ») ont pu être solubilisés dans un mélange 10% v/v DMSO/PBS pH 7,4. Les échantillons préparés directement dans un mélange 10% v/v DMSO/PBS pH 7,4 à 5 mmol/L n'étaient pas totalement solubles. Il a fallu préparer une solution mère de peptides à 50 mmol/L dans 100% DMSO puis la diluer par 10 avec le PBS pour obtenir une solution limpide.

2.1.3 Capacité de liaison à la mésothéline

La capacité de liaison des peptides A7 à A12 à la mésothéline a été évaluée par test ELISA. La mésothéline recombinante a été immobilisée dans les puits d'une plaque 96 puits et bloquée avec de la BSA. Les peptides ont ensuite été incubés dans les puits, à 10 µmol/L et 100 µmol/L. La streptavidine/HRP est ensuite incubée, la streptavidine se liant à la biotine des peptides liés à la mésothéline. Enfin, le 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine est ajouté et est oxydé par l'action de la HPR, formant le dérivé diimide détectable à 450 nm (Figure 38).

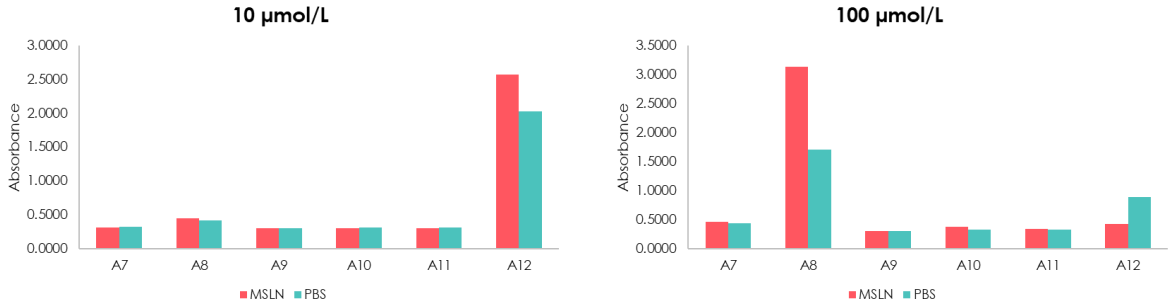


Figure 38 - Valeur d'absorbance détectée à 450 nm pour les tests ELISA des peptides A7 à A12 à 10 et 100 µmol/L, en rouge avec la mésothéline et en bleu sans la mésothéline

Aucune différence notable n'a été observée pour ces tests avec ou sans mésothéline. Ces peptides synthétisés n'ont pas été capable de se lier à la mésothéline avec une affinité mesurable. Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer ces résultats. D'abord, les peptides seuls peuvent ne pas être capables de reconnaître leur cible, une synergie entre deux ou trois CDR est peut-être nécessaire. Ensuite, les peptides linéaires n'adoptent probablement pas la même structure que les CDR au sein du nanobody. Une nouvelle série de peptides, présentant un coude β pour mimer la structure des CDR dans le nanobody, est préparée.

2.2 Peptides cycliques

Pour induire ce coude β, différents motifs peuvent être insérés dans une séquence peptidique, linéaire ou cyclique. comme les séquences dipeptidiques d-pro-L-Pro ou encore Pro-Gly.[52,56] Au sein du l'équipe F9 de l'IBMM, les acides 4-amino(méthyle)-1,3-thiazole-5-carboxyliques (ATC), initialement développés pour l'obtention de foldamères γ-peptidiques hélicoïdaux dans le cas de (S)-ATC[149], permettent également d'induire un coude β entre deux brins antiparallèles dans le cas de (R)-ATC. Ainsi, l'incorporation d'ATC au sein d'une séquence cyclique a permis d'obtenir un analogue de la gramicidine S, présentant une forte activité antibactérienne.[150] L'ATC, en plus d'induire la structure secondaire, permet l'introduction de points de fonctionnalisation pouvant être mis à profit pour intégrer les peptides sur différents châssis moléculaires (Figure 39).

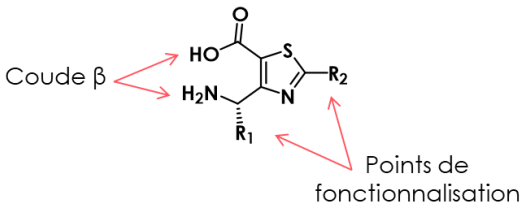


Figure 39 - Structure générique d'un (S)-ATC

Nous avons donc décidé de synthétiser un nouvel ATC et de l'utiliser comme point de cyclisation pour concevoir les peptides cycliques mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline. L'ATC, ne présentant pas de carbone asymétrique en α de la fonction, la cyclisation peut avoir lieu via l'acide de l'ATC sans risque d'épimérisation par formation d'oxazolone.

Nous avons considéré que les peptides cycliques auraient probablement des propriétés physico-chimiques proches des peptides linéaires, y compris leur solubilité. Il nous est apparu judicieux d'ajouter le bras solubilisant. De plus, afin d'éviter toute interaction due aux résidus de ce bras, nous avons décidé de l'incorporer de façon exo-cyclique, sur le point de fonctionnalisation supplémentaire de l'ATC, qui doit présenter une amine primaire pouvant être engagée dans une liaison amide. Le bras solubilisant est donc synthétisé à part pour être ajouté sur les peptides mimes de CDR après leurs cyclisations par son extrémité C terminale. L'acide aminé C terminal des deux bras solubilisants étant la glycine, ces couplages par fragments ne présentent aucun risque d'épimérisation par formation d'oxazolone.

L'ATC et le bras solubilisant sont deux éléments communs à tous les mimes de CDR, ce qui permet d'envisager une synthèse convergente. Dans un premier temps, l'élongation des mimes de CDR et du bras solubilisant est réalisée sur support solide avec un linker 2-chlorochlorotrityl, un linker très acido labile permettant l'obtention de peptides acides protégés sur les chaînes latérales. L'ATC est ancré sur la résine qui est ensuite séparée en différents lots pour les élongations des CDR (Figure 40A). De la même façon, après élongation du bras solubilisant, la résine est séparée en deux lots pour modifier l'extrémité N terminale, soit par ajout d'une biotine, soit par acétylation (Figure 40B). Ces différentes extrémités permettent d'envisager différents tests biologiques. Les lots biotinylés peuvent être évalués par tests ELISA, comme les peptides linéaires A7 à A12, mais également par interférométrie biocouche (BLI : *BioLayer Interferometry*) tandis que les lots acétylés pourront être analysés avec des tests de compétition par tests ELISA. Une fois toutes les élongations terminées, les peptides sont récupérés par clivage ménagé (Figure 40C), ce qui permet de conserver les protections des chaînes latérales et donc une cyclisation en solution (Figure 40D). L'amine de l'ATC, présentant une protection orthogonale, est déprotégée (Figure 40E) pour coupler les bras solubilisants sur les peptides cycliques (Figure 40F). Enfin, après déprotection des chaînes latérales (Figure 40G), les peptides peuvent être purifiés par HPLC préparative.

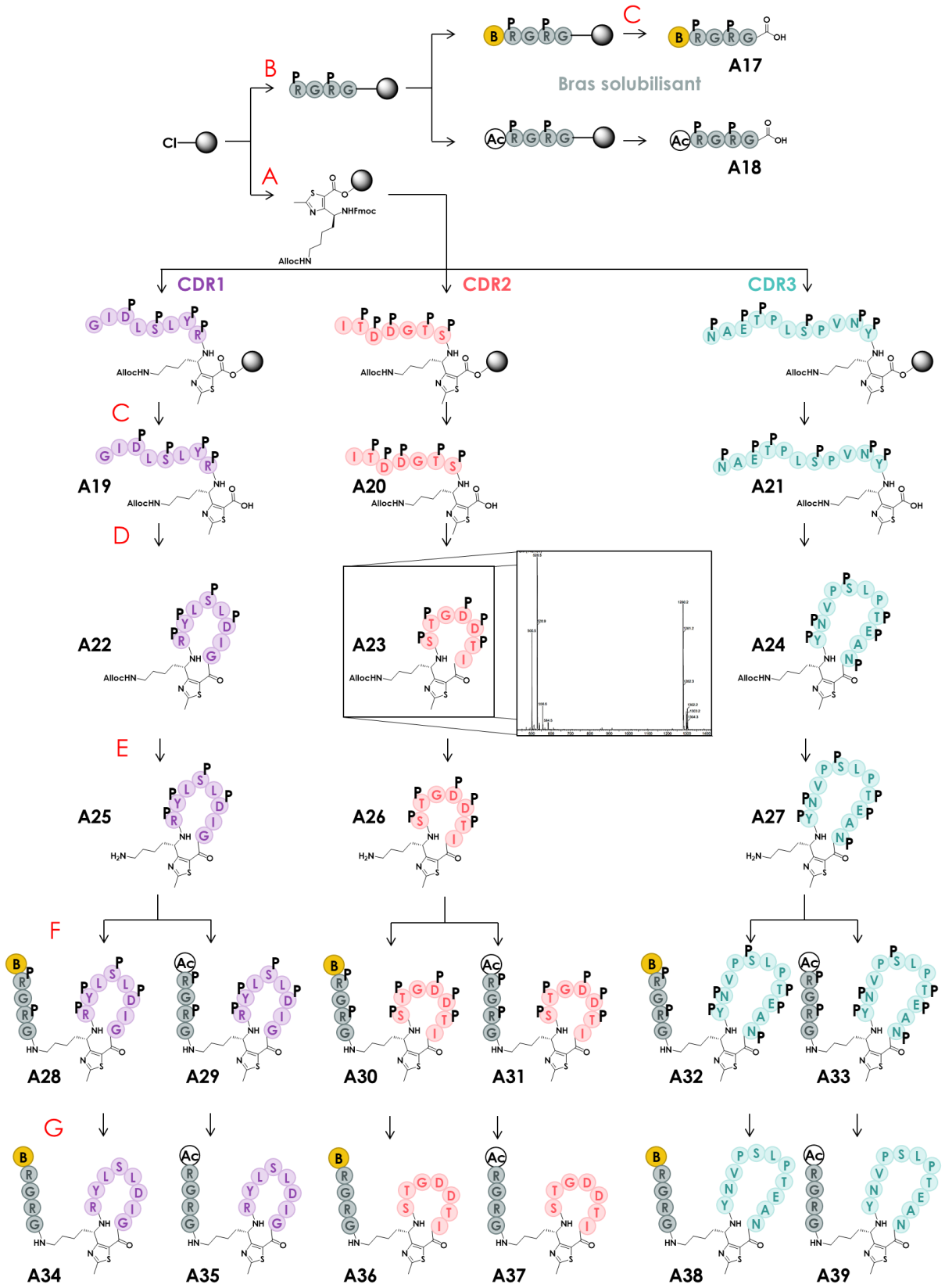


Figure 40 - Synthèse divergente des peptides cycliques.
A : ancrage de l'ATC sur la résine. B : ancrage et élongation des bras solubilisants. C : clivage ménagé. D : cyclisation. E : déprotection de l'amine N-Alloc. F : couplage des bras solubilisants. G : déprotection des chaînes latérales.

Compte tenu de l'absence de résultats des peptides linéaires, que ce soit avec ou sans les résidus présents dans les brins β, seules les séquences « courtes » sont synthétisées. Les affinités obtenues sur ces séquences nous permettront d'envisager la synthèse des séquences « longues ».

Dans un premier temps, l'ATC de configuration S a été préparé comme contrôle négatif pour synthétiser les peptides cycliques non structurés. Les peptides structurés seront synthétisés à partir de l'ATC de configuration R.

2.2.1 Synthèse de l'ATC

Le groupement protecteur Alloc a été choisi comme protection orthogonale de l'amine ε de l'ATC. Pour l'introduire dans l'ATC, celui-ci a été synthétisé à partir de la Fmoc-Lys(Alloc)-OH. Dans un premier temps, le β-cétoester A13 est préparé à partir de cet acide aminé et de l'acétate de diméthylallyle, selon une condensation de Cross-Claisen. Après purification, le composé A13 est engagé dans une réaction de monobromation (composé A14). Le produit mono-bromé brut est cyclisé selon la cyclisation de Hantzsch avec du thioacétamide pour obtenir le thiazole correspondant (composé A15).[151] Enfin, après purification, l'ester de diméthylallyle, habituellement déprotégé en utilisant le palladium tétrakis triphénylphosphine ($Pd(PPh_3)_4$) en présence de phénylsilane (conditions de Tsuji-Trost), a été ici déprotégé par hydrolyse acide (HCl/dioxane 4N), pour obtenir l'ATC A16 avec la protection N-Alloc conservée.

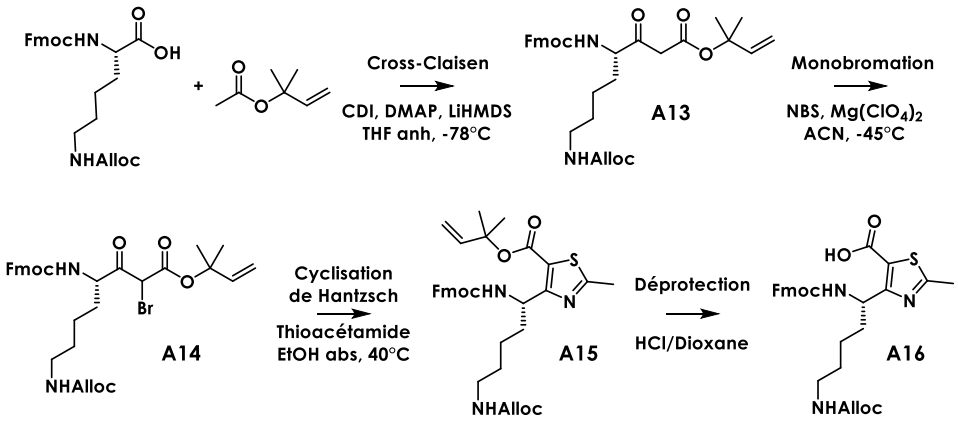


Figure 41 - Synthèse de l'ATC

2.2.2 Synthèse des peptides cycliques

L'ATC obtenu a été ancré en premier sur la résine polystyrène 2-chlorochlorotrityl présentant une charge théorique de 1,6 mmol/g. Compte tenu de la faible réactivité de l'ATC par rapport à un acide aminé conventionnel, la résine a dû être pré-activée et l'ancrage effectué deux fois afin d'obtenir une charge d'environ 0,3 mmol/g ce qui correspond à un rendement de

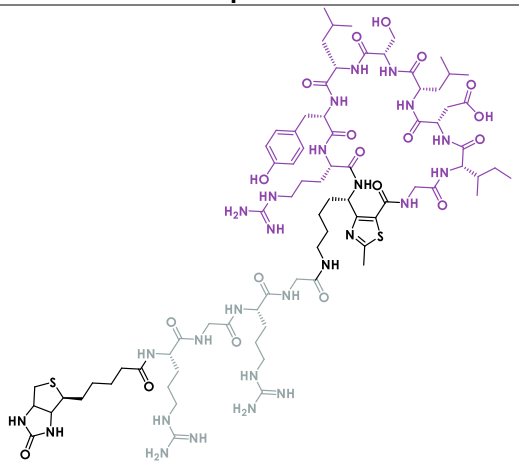
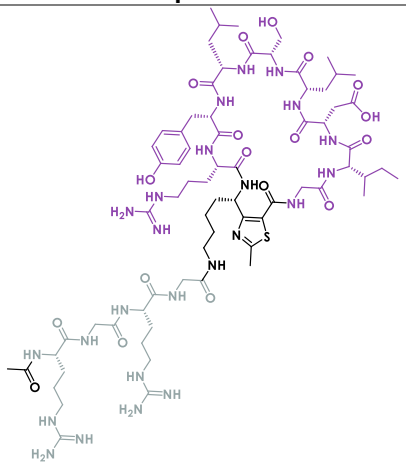
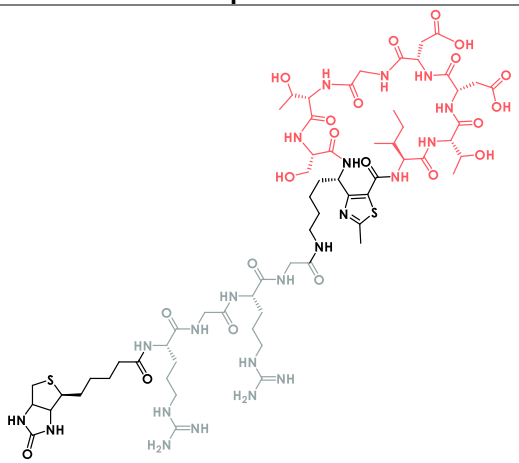
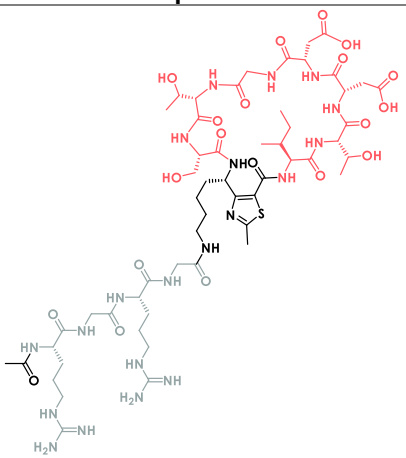
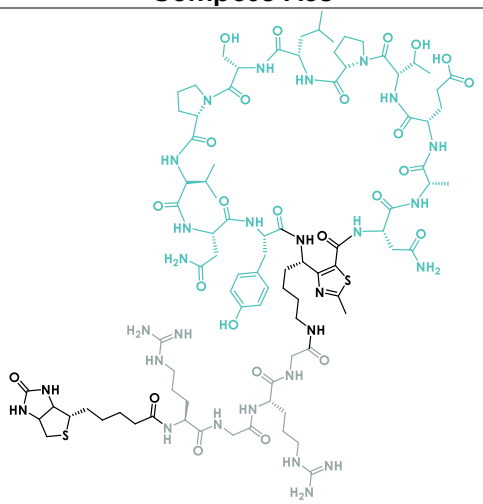
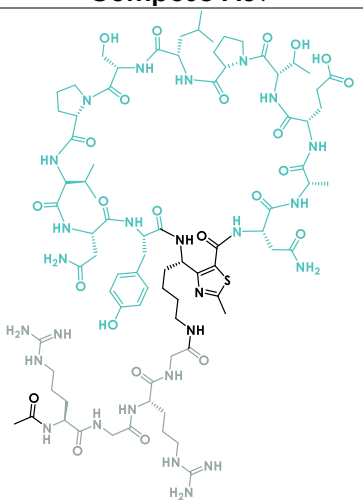
greffage de 26% environ. En effet, le linker 2-chlorochlorotrityl, très réactif, peut s'hydrolyser dans le temps, entraînant une chute de la charge. La préactivation, effectuée ici avec du chlorure d'acétyle dans le toluène à 60°C, permet de reformer le linker et donc de récupérer la charge initiale de la résine. Une fois l'ATC ancré sur la résine, celle-ci est divisée en trois lots pour les élongations des trois CDR selon la stratégie Fmoc/tBu. Un clivage ménagé est ensuite effectué dans un mélange DCM/TFE/AcOH (7/2/1, v/v/v) pendant heure (Figure 40A et C). Avant d'engager les cyclisations, la structure des peptides linéaires protégés sur les chaînes latérales est vérifiée par LC/MS. Les cyclisations, réalisées en solution pendant 4h et suivies par LC/MS, ont été effectuées dans un milieu dilué à une concentration de 1 mg/mL afin de favoriser la réaction intra-moléculaire (Figure 40D). Les analyses LC/MS ont permis de confirmer l'obtention des produits cycliques désirés, et non des multimères, cycliques ou linéaires. Par exemple, pour la cyclisation du peptide CDR2 (composés A20 et A23), le spectre de masse associé au produit formé montre la présence d'un ion monochargé $[M+H]^+$ présentant un m/z de 1280,2, ce qui correspond bien au composé cyclique A23, et non à un multimère (Figure 40D).

Les bras solubilisants (biotinylé et acétylé), ont également été synthétisés sur la résine polystyrène chlorotrytil (1,6 mmol/g) en stratégie Fmoc/tBu. L'ancrage de la Fmoc-Gly-OH étant bien plus facile que celui de l'ATC, la réaction a pu être effectuée qu'une seule fois sans pré-activation pour obtenir une charge de 0,3 mmol/g obtenue après 2h de réaction. Après les élongations, les peptides ont été clivés de la même manière que les peptides cycliques (Figure 40B et C).

L'amine N-Alloc des peptides cycliques a été déprotégée avec une quantité catalytique de palladium tétrakis triphénylphosphine (0,03 équivalent) et un léger excès de phénylsilane (1,2 équivalents) (Figure 40E). Le couplage du bras solubilisant sur l'amine primaire déprotégée a été effectué en solution et suivi par LC/MS (Figure 40F), puis les chaînes latérales ont été déprotégées dans un mélange TFA/TIS/eau (90/5/5, v/v/v). Enfin, les produits A34-39 obtenus ont été purifiés par HPLC préparative (Figure 40G et Tableau 3).

Afin de vérifier que nos peptides ne sont pas structurés et servent donc de contrôle négatif, l'étude structurale du composé A36 a été réalisée par RMN.

Tableau 3 - Structures des peptides cycliques mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline

	Composé A34	Composé A35
CDR1	 Rdt = 3,3% Pureté = 90%	 Rdt = 4,2% Pureté = 88%
	Composé A36	**Composé A37**
CDR2	 Rdt = 1,8% Pureté = 95%	 Rdt = 2,7% Pureté = 98%
	Composé A38	**Composé A39**
CDR3	 Rdt = 1,6% Pureté = 78%	 Rdt = 0,7% Pureté = 87%

La partie violette correspond au CDR1, la rouge au CDR2, la bleue au CDR3 et la grise au bras solubilisant

2.2.3 Etude structurale

En RMN, l'effet Overhausser nucléaire (effet NOE) décrit une interaction entre deux spins à travers l'espace (jusqu'à 5 Å), contrairement à un couplage scalaire qui montre une interaction à travers des liaisons chimiques. L'étude de ces interactions permet de mettre en évidence la structure secondaire du composé. Dans le cas des peptides, les premières interactions NOE recherchées sont celles générées à partir des protons des amides peptidiques, facilement identifiables et indicatrices de la structure du squelette peptidique. Ces protons échangeables doivent donc être visibles en RMN, et non échangés par un deutérium provenant du solvant deutéré. L'analyse doit donc avoir lieu dans un solvant deutéré où les deutérium ne sont pas échangeables, ou alors dans un mélange de type H_2O/D_2O (9/1, v/v) par exemple, où les 10% de D_2O sont nécessaires à l'acquisition. Les volumes des taches de corrélation NOE sont représentatifs de la force de l'interaction NOE correspondant à ces corrélations. Ces volumes permettent ensuite de réaliser une modélisation sous contrainte RMN pour visualiser la structure secondaire du peptide.

L'incorporation d'un ATC au sein d'une séquence peptidique cyclique est censée induire un coude β, structurant le peptide en deux brins β antiparallèles (Figure 42).

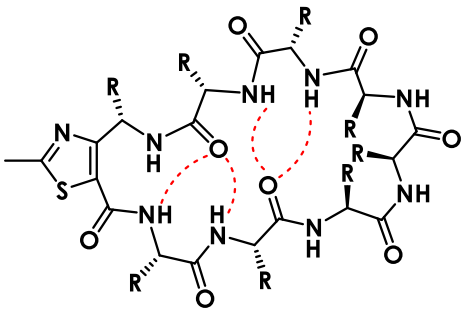


Figure 42 - Type de corrélations NOE attendues avec un coude β

Une étude structurale a été réalisée sur le composé A36 pour montrer que ces peptides cycliques, obtenus avec l'ATC de configuration S, ne présentent pas de coude β et servent donc de contrôle négatif, a été réalisée par RMN (^1H, ^{13}C et ^{15}N). Pour cela, 7 mg du peptide A36 ont été dissous dans un mélange H_2O/D_2O (9/1, v/v). L'analyse structurale a été réalisée sur le spectromètre RMN BRUKER Avance III – 600MHz (aimant de 14,1 Teslas) à 303K. Les expériences COSY, TOCSY, HSCQ (^1H-^{13}C et ^1H-^{15}N) ont permis d'attribuer tous les signaux (Figure 43, Tableau 4 et Tableau 5).

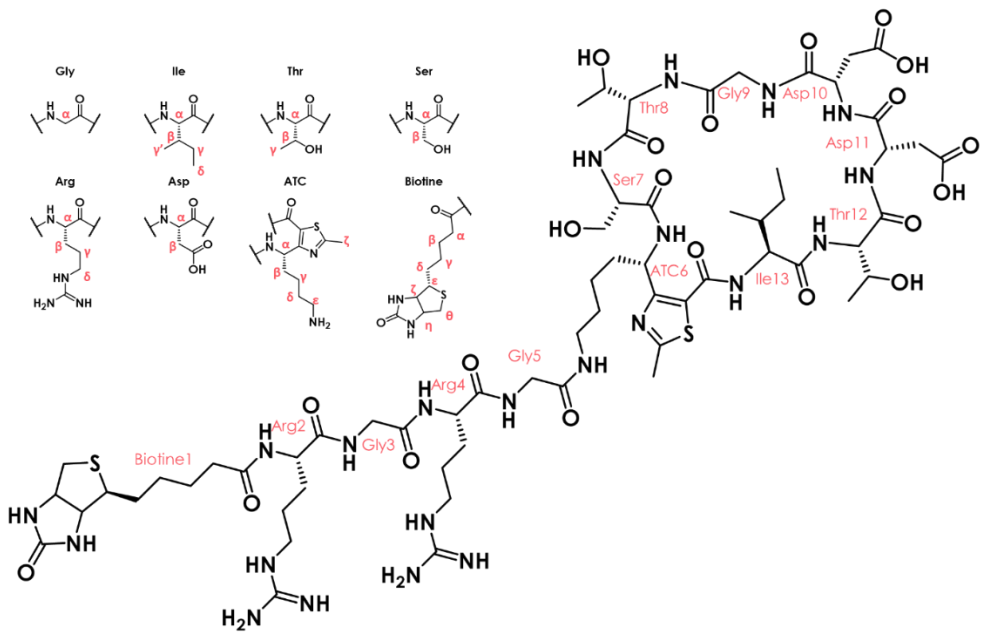


Figure 43 - Composé A36

Tableau 4 - Attributions des déplacements chimiques des protons

		NH	Hα1	Hα2	Hβ1	Hβ2	Hγ1	Hγ2	Hγ'	Hδ	Hε	Hζ	Hη	Hθ1	Hθ2
Bras solubilisant	Biotine1		2,49		1,55		1,34			1,86	3,47	4,76	4,76	3,14	2,93
	Arg2	8,49	4,46		1,91	2,02	1,82			3,37	7,37				
	Gly3	8,66	4,13												
	Arg4	8,37	4,50		1,94	2,07	1,81			3,38	7,37				
	Gly5	8,52	4,02												
N ter	ATC6	8,97	5,37		1,24	1,35	1,56			3,27	7,84	2,86			
	Ser7	8,19	4,64		4,01						3,47	4,76	4,76		
	Thr8	8,435	4,69		4,59		1,367				7,37				
	Gly9	8,34	4,19	4,33											
	Asp10	8,44	5,00		2,96	3,08					7,37				
	Asp11	8,72	4,8		3,07	3,13									
C ter	Thr12	8,45	4,63		4,49		1,37				7,84		2,86		
	Ile13	9,18	4,61		2,18		1,75	1,43	1,15	1,08	3,47	4,76	4,76		

Tableau 5 - Attributions des déplacements chimiques des carbones et des azotes

		NH	Cα	Cβ	Cγ	Cγ'	Cδ	Cε	Cζ	Nζ	Cη	Cθ
Bras solubilisant	Biotine1		36,7	29,3	21,6		29,5	57,0	61,2		61,2	41,3
	Arg2	126,3	55,3	29,5	26,2		42,3	84,9				
	Gly3	110,0	44,3									
	Arg4	120,8	55,3	29,5	26,2		42,3	84,9				
	Gly5	110,3	44,3									
N ter	ATC6	131,3	51,2	34,4	24,1		29,4	40,8		120,7		
	Ser7	116,6	57,2	62,6								
	Thr8	111,8	60,8	68,3	20,4							
	Gly9	108,9	44,8									
	Asp10	117,2	51,6	37,7								
	Asp11	118,9	52,9	36,9								
C ter	Thr12	118,4	60,9	69,1	20,4							
	Ile13	127,9	61,2	37,3	16,4	26,6	11,8					

L'expérience ROESY a permis d'identifier les corrélations NOE entre les signaux identifiés précédemment. Grâce au logiciel NMRViewJ, le volume des taches de corrélation est déterminé (Équation 2).

$$V = \frac{C}{r^6}$$

Équation 2 - Détermination du volume d'une tache de corrélation (Å^3) ; avec C la calibration (Å^{-3}) et r la distance (Å^6)

Une corrélation NOE est considérée forte pour une distance de 1,8 Å, moyenne pour une distance de 2,7 Å et faible pour une distance de 3,3 Å. La calibration du spectre ROESY est déterminée à partir de taches de corrélation NOE forte (r = 1,8 Å), comme une corrélation entre deux protons non équivalents sur un CH_2. Trois CH_2 diastéréotopiques ont été identifiés et utilisés pour calibrer le spectre (Tableau 6).

Tableau 6 - Volumes des CH_2 diastéréotopiques utilisés pour la calibration

CH_2 diastéréotopique	**Volume (Å^3)**
Gly9	20.5144
Asp11	19.771
ATC6	16.9392
Moyenne	**19.0749**

Pour une corrélation NOE forte de 1,8 Å, le volume est donc de 19,0749 Å^3 et la calibration est :

$$C = V \times r^6 = 648{,}78\ \text{Å}^{-3}$$

Équation 3 - Calibration du spectre

Pour une corrélation NOE moyenne de 2,7 Å, le volume est de 1,675 Å^3 et pour une corrélation NOE faible de 3,3 Å, le volume est de 0,502 Å^3. Autrement dit, lorsque le volume d'une tache de corrélation est supérieur à 1,675 Å^3, la corrélation NOE est forte, lorsqu'il est compris entre 0,502 et 1,675 Å^3, la corrélation NOE est moyenne et lorsqu'il est inférieur à 0,502 Å^3, la corrélation est faible. Les corrélations NOE fortes ont été identifiées et sont résumées dans le Tableau 7.

Tableau 7 - Taches de corrélation NOE avec un volume supérieur à 0,502 Å^3

N° AA	**H**	**N° AA**	**H**	**NOE**
Ile13	NH	ATC6	Hα	**1.80807**
Asp11	NH	Thr12	Hα	**2.79902**
Asp11	NH	Thr12	Hβ	**3.42099**
Gly3	NH	Arg2	Hα	**5.01016**
Gly3	NH	Arg2	Hβ	0.688663
Gly3	NH	Arg2	Hβ	0.58857
Gly5	NH	Arg4	Hα	**4.44965**
Gly5	NH	Arg4	Hβ	0.507567
Arg2	NH	Biotine1	Hα	**5.86905**
Arg4	NH	Gly3	Hα	**6.44198**
Gly9	NH	Asp10	Hα	1.48167
Ser7	NH	Thr8	Hα	**2.45429**
Ser7	NH	Thr8	Hβ	**1.68385**
ATC6	Hε	Gly5	Hα	**5.0422**

Les corrélations fortes sont en rouge et les moyennes en noir

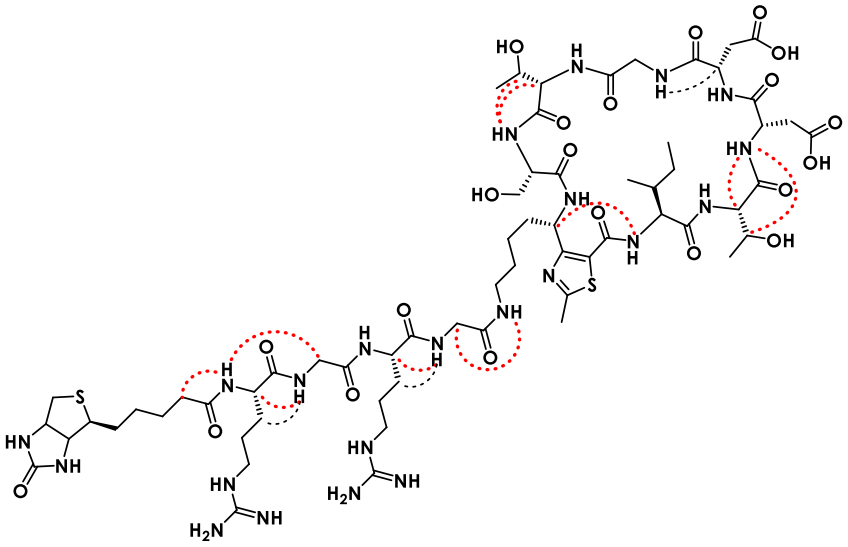


Figure 44 - Corrélations NOE fortes et moyennes

Les corrélations NOE identifiées montrent bien que le peptide n'est pas structuré et confirme que le (S)-ATC n'entraîne aucune structuration. Le (R)-ATC doit encore être synthétiser pour être incorporé dans nos séquences et induire ce coude β.[150]

2.2.4 Capacité de liaison à la mésothéline

Les peptides cycliques non structurés A34, A36 et A38 ont été évalués de la même manière que les peptides linéaires A7 à A12 (Figure 45).

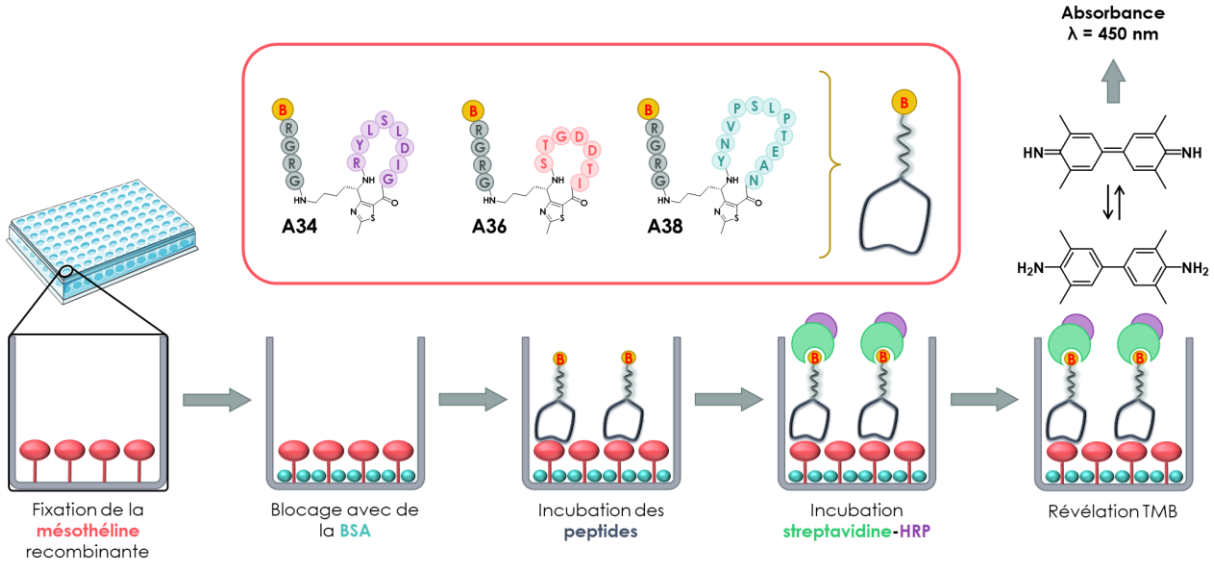


Figure 45 - Evaluation des peptides cycliques par test ELISA

Une concentration croissante en peptides a été incubée dans les puits avec et sans mésothéline. Comme le montre la Figure 46, aucune différence notable n'a été observée pour aucun des peptides. Ces résultats sont probablement dus à l'absence de structuration des peptides.

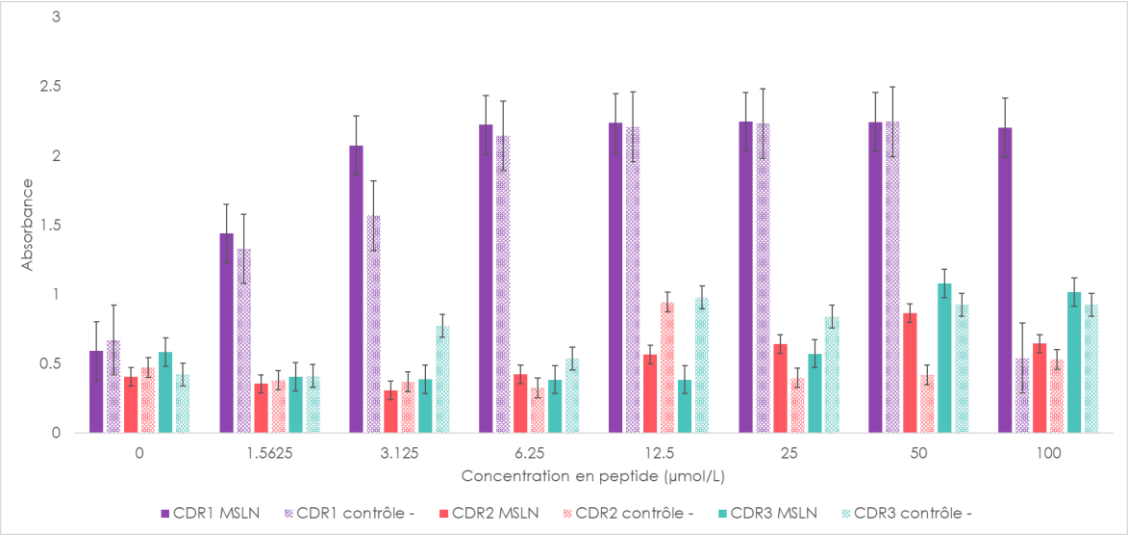


Figure 46 - Valeur d'absorbance détectée à 450 nm pour les tests ELISA des peptides A34, A36 et A38 à différentes concentrations
Les barres pleines correspondent aux tests avec la mésothéline et les barres en pointillés correspondent aux contrôles négatifs.

Afin de vérifier ces résultats, la liaison à la mésothéline a été évaluée avec une méthode plus sensible : l'interférométrie biocouche. Le BLI est une technique optique qui permet de mesurer les interactions macromoléculaires en analysant les modèles d'interférence de la lumière blanche réfléchie par la surface de la pointe du capteur (Figure 47). Cette technique permet de déterminer la cinétique et l'affinité des interactions moléculaires. Pour cela, le ligand (ici les peptides A34, à36 et A38) est immobilisé sur le capteur et la liaison à la cible (la mésothéline) est mesurée en plongeant le capteur dans un puits contenant la solution d'analyte. Le changement du nombre de molécules liées au capteur entraîne un décalage du motif d'interférence, mesuré en temps réel.

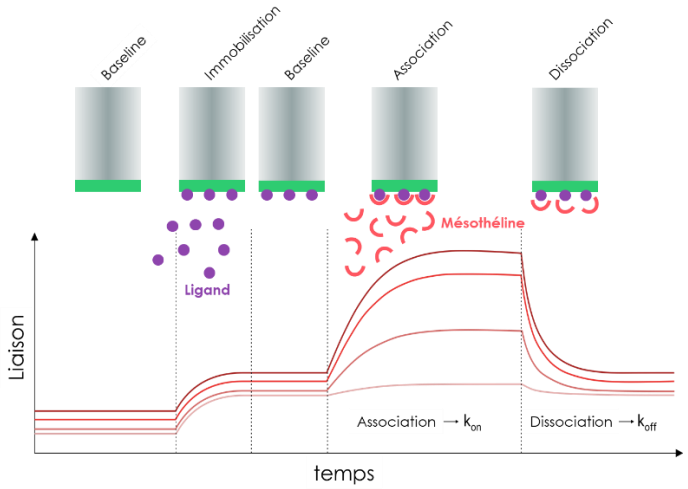


Figure 47 - Principe du BLI

Le capteur utilisé dans notre cas présente une couche de streptavidine à sa surface, ainsi les peptides peuvent y être facilement immobilisés. Le capteur est alors plongé dans un puits

contenant une solution de mésothéline et l'association est mesurée, ce qui permet d'obtenir le k_{on}. La dissociation est également mesurée, permettant d'obtenir le k_{off}.

La capacité de liaison du nanobody anti-mésothéline est mesurée comme contrôle positif (VHH). Comme le montre la Figure 48, aucune liaison n'est détectée pour les peptides cycliques A34, A36 et A38, ce qui confirme les résultats des tests ELISA.

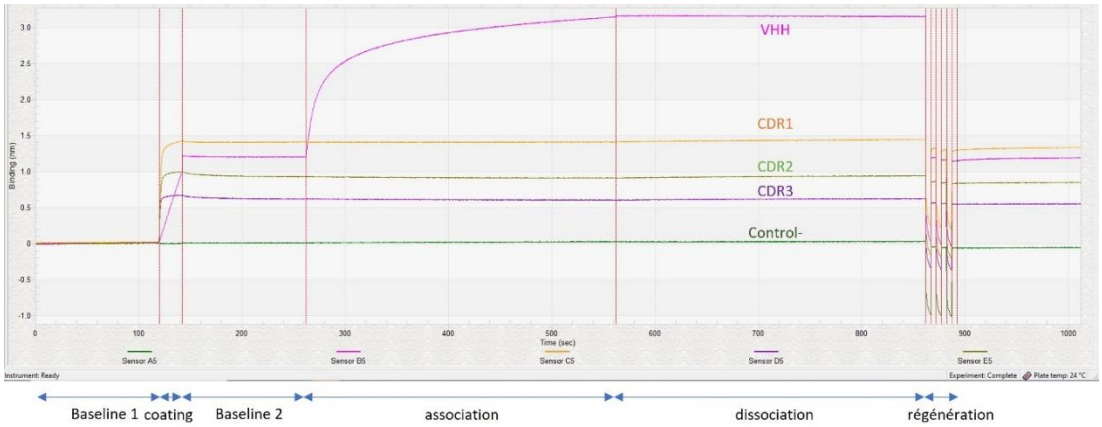


Figure 48 - Liaisons des peptides et du nanobody avec la mésothéline obtenues par BLI

L'absence de liaison à la cible de nos peptides cycliques est probablement due à l'absence de coude β permettant de mimer la structure des CDR au sein du nanobody. De nouvelles synthèses doivent encore être réalisées pour avec l'ATC de configuration R afin de vérifier cette hypothèse.

2.3 Conclusion

Dans cette section, plusieurs lots de peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline ont été présentés, synthétisés et caractérisés. L'affinité avec la mésothéline a été mesurée par SPR (Biacore) ou par test ELISA, en fonction des lots. Malheureusement, ni les peptides linéaires ni les peptides cycliques n'ont montré une capacité de liaison à la mésothéline avec une affinité mesurable. Comme aucun peptide ne présente une structure similaire à la présentation des CDR au sein du nanobody, le manque de structuration est probablement à l'origine de l'absence d'affinité pour la mésothéline. De plus, un effet synergique peut être nécessaire à l'interaction.

Les peptides cycliques pourraient être resynthétisés en utilisant la Fmoc-D-Lys(Alloc)-OH pour obtenir des séquences structurées. De plus, ces peptides pourraient être disposés sur une plateforme multivalente, de type RAFT par exemple, pour les présenter d'une façon similaire au paratope du nanobody. Dans cette optique, nous avons choisi d'utiliser des nanoparticules de silice comme support pour présenter de multiples copies des peptides analogues de CDR, en espérant augmenter leurs affinités par un effet combiné d'avidité et de multivalence.

3 Les nanoparticules fonctionnalisées

Nous avons émis l'hypothèse que le greffage des peptides linéaires à la surface de nanoparticules permettrait d'augmenter leur concentration locale et donc, par un effet de multivalence, d'améliorer leur affinité pour la mésothéline.

La silice étant un matériau biocompatible[152], des nanoparticules de silices peuvent être utilisées comme support pour présenter ces peptides. La silice est un support facilement fonctionnalisable avec des composés présentant un motif triéthoxysilane. La silylation des peptides sur différentes positions (extrémités N et/ou C terminales) permet d'obtenir des nanoparticules mono- ou pluri-fonctionnalisées en une seule étape de synthèse.

La conformation (brosse, intermédiaire, champignon) des ligands greffés à la surface des nanoparticules peut être déterminée en utilisant le rapport R_F/D, avec D la distance moyenne entre deux points d'ancrage et R_F le rayon de Flory, qui correspond approximativement à l'espace que le ligand peut occuper.[64]

$$R_F = \alpha N^{3/5}$$

Équation 4 - Rayon de Flory avec α la longueur effective du monomère et N le degré de polymérisation

$$D = 2(\pi\sigma)^{-1/2}$$

Équation 5 - Distance entre deux points d'ancrage avec σ la densité de greffage par unité de surface (N/nm²)

Habituellement, cette méthode est utilisée pour des ligands de type PEG (α = 0,358 nm), où le rayon de Flory peut être appliqué. Lorsque le ligand est un peptide, qui est un polyamide, on peut supposer que la longueur effective d'un aminoacide est la même que celle d'un monomère de PEG, et que le degré de polymérisation correspond au nombre d'aminoacides qui compose le peptide (Figure 49).

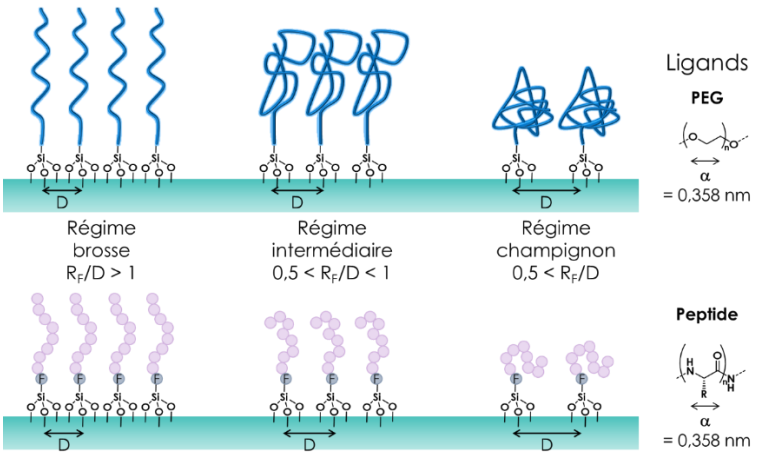


Figure 49 - Comportement schématique des PEG ou des peptides greffés sur la surface d'une nanoparticule, en fonction du rayon de Flory R_F et de la distance entre deux points d'ancrage D

3.1 Nanoparticules fonctionnalisées avec les peptides mimes de CDR

3.1.1 Synthèse des nanoparticules de silice

Nous avons choisi d'étudier la liaison des nanoparticules avec la mésothéline par tests ELISA. Habituellement, après immobilisation des nanoparticules et interactions avec la protéine cible, la détection a lieu grâce à un anticorps primaire (Ac1) anti-protéine cible puis un anticorps secondaire anti-Ac1. Pour simplifier ces tests, nous avons décidé de synthétiser et d'utiliser des nanoparticules fluorescentes pour les détecter directement. Ainsi, après immobilisation de la protéine cible, la mésothéline, et incubation des nanoparticules fonctionnalisées, la mesure de la fluorescence permet de détecter directement les nanoparticules liées à la mésothéline. De la fluorescéine a été encapsulée au cœur des nanoparticules pendant leur synthèse pour permettre leur détection. Nous avons choisi de synthétiser des nanoparticules d'environ 100 nm, cette taille permettant une large gamme d'applications biologiques.[153]

Ces nanoparticules ont été synthétisées via le procédé Stöber[154], en ajoutant de la fluorescéine préalablement silylée à la préparation en suivant un protocole mis au point au sein de notre laboratoire (Figure 50).[155] Après plusieurs lavages à l'éthanol puis à l'eau jusqu'à neutralisation du pH, les nanoparticules sont stockées dans 10 mL d'eau milliQ. Comme attendu, les nanoparticules synthétisées possèdent diamètre moyen de 114 nm et quasiment monodisperses (PDI = 0,1488) et présentent un potentiel zêta de -51,4 dans l'eau milliQ à pH 7 (Figure 50). La quantité de fluorescéine encapsulée a été déterminée par spectroscopie UV-Vis après dissolution d'une quantité connue de nanoparticules dans une solution de NaOH 1,5 mol/L. Chaque nanoparticule contient environ 15 000 fluorescéines, ce qui est suffisant pour détecter les nanoparticules lors des tests ELISA simplifiés.

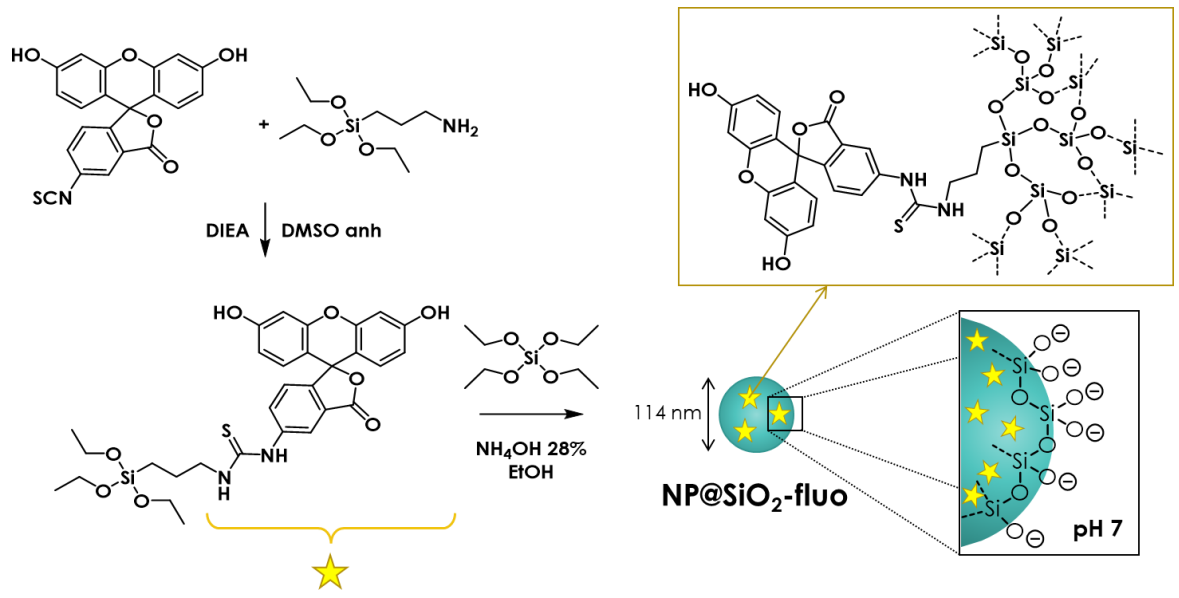


Figure 50 - Synthèse des nanoparticules fluorescentes

3.1.2 Synthèse des peptides silylés

Le greffage de peptides silylés à la surface de nanoparticules de silice est une méthode de fonctionnalisation rapide et efficace d'une surface, sans ajout de réactif. En effet, celle-ci ne nécessite pas l'utilisation de protection orthogonale, de chimie click ou encore de modification préalable de la surface.[155] La concentration en peptides silylés est un paramètre crucial lors du greffage car elle est directement liée aux nombres de peptides greffés par nm². En effet, plus cette concentration est élevée, plus la densité de peptides greffés à la surface est élevée.[64] La densité de greffage influence grandement l'affinité de la surface pour sa cible. Une étude récente a montré que l'espacement critique entre deux ligands sur une surface est de 2 nm, ce qui correspond à une densité d'environ 0,5 peptide/nm².[156]

La faible solubilité des peptides en milieu aqueux n'est pas un problème pour leur greffage et nous avons donc utilisé les séquences des boucles CDR telles qu'elles sont dans le nanobody (sans le bras solubilisant). En effet, les peptides vont être greffés sur les nanoparticules de silice. Il suffit donc que leur version silylée soit soluble dans un mélange DMF/AcOH (99/1, v/v), le solvant de greffage.

Pour étudier l'importance de l'orientation des séquences sur les nanoparticules, nous avons préparé trois versions pour chaque peptide mime de CDR : une version silylée à l'extrémité N terminale, une version silylée à l'extrémité C terminale (par ajout d'un résidu Lys en C terminal pour silyler sur l'amine ε), et une version par les deux extrémités. Cette dernière permet de mimer les boucles CDR du nanobody si le peptide réagi avec la surface par ses deux extrémités, et offre également la possibilité de former une multicouche, augmentant l'avidité des nanoparticules. Pour vérifier que la spécificité des peptides est liée à la séquence et non aux résidus présents, une version *scrambled* (où les résidus ne sont pas dans l'ordre des CDR du nanobody) des trois CDR silylés en N terminal a été préparée.

Enfin, pour connaître la densité de greffage, nous devons connaître la quantité de peptides greffés sur chaque particule. La méthode développée par le laboratoire permet d'obtenir des densités de greffage variant de 0,1 à 1 peptides/nm². Une méthode de quantification par RMN ^{19}F a été mise au point pour déterminer la quantité de chaque ligand greffé à la nanoparticule. En effet, différents aminoacides fluorés, présentant des déplacements chimiques différents en RMN ^{19}F, sont ajoutés aux séquences peptidiques, permettant d'identifier le peptide (grâce au déplacement chimique) et d'estimer sa quantité (grâce à un étalon interne). Cette méthode permet donc de déterminer la quantité de peptides greffés et également le ratio des différents ligands lorsqu'un mélange est greffé.

Pour utiliser cette méthode de quantification, nous avons introduit à l'extrémité N terminale de chaque séquence un acide aminé fluoré présentant un déplacement chimique unique en RMN ^{19}F (CDR1 : Phe(CF_3) δ = - 61,9 ppm ; CDR2 : Phe(4-F) δ = - 117,6 ppm ; CDR3 : Ala(CF_3) δ = - 63,4 ppm) (Figure 51).

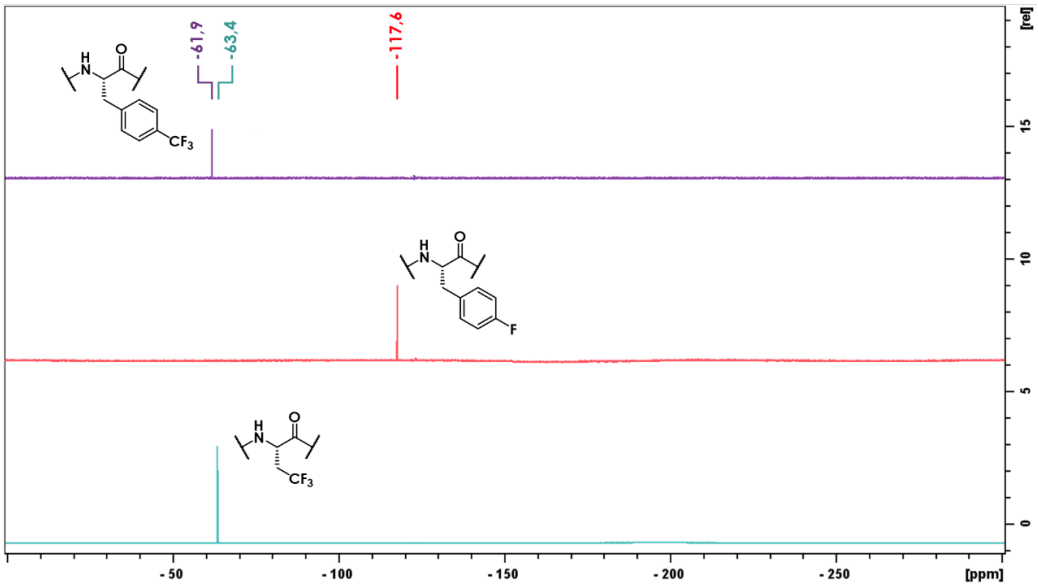


Figure 51 - Déplacement chimique des trois acides aminés fluorés utilisés pour la quantification des peptides greffés

Dans un premier temps, des nanoparticules monofonctionnelles avec des peptides linéaires sont préparées et leur capacité de liaison à la mésothéline est évaluée. Des nanoparticules multifonctionnelles et/ou avec des peptides cycliques seront envisagées en fonction des résultats obtenus.

Les peptides A40 à A51 ont été synthétisés sur support solide selon une stratégie Fmoc/tBu sur une résine amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) (Tableau 8). La pureté des peptides après clivage était comprise entre 55 et 98%. Nous avons donc continué les synthèses sans purification.

Tableau 8 - Séquences des peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline avant silylation

Peptide	N°	Séquence	Rdt	Pureté
CDR1 N-ter	A40	H-Phe(CF_3)-**Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg**-NH_2	74 %	90%
CDR1 C-ter	A41	Ac-Phe(CF_3)-**Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg**-Lys-NH_2	70 %	72%
CDR1 N-C-ter	A42	H-Phe(CF_3)-**Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg**-Lys-NH_2	65 %	83%
CDR1 sc	A43	H-Phe(CF_3)-**Asp-Leu-Ser-Arg-Leu-Ile-Gly-Tyr**-NH_2	70 %	72%
CDR2 N-ter	A44	H-Phe(F)-**Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser**-NH_2	96 %	89%
CDR2 C-ter	A45	Ac-Phe(F)-**Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser**-Lys-NH_2	81 %	85%
CDR2 N-C-ter	A46	H-Phe(F)-**Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser**-Lys-NH_2	98 %	87%
CDR2 sc	A47	H-Phe(F)-**Gly-Asp-Thr-Thr-Asp-Ser-Ile**-NH_2	59 %	78%
CDR3 N-ter	A48	H-Ala(CF_3)-**Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr**-NH_2	80 %	88%
CDR3 C-ter	A49	Ac-Ala(CF_3)-**Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr**-Lys-NH_2	70 %	85%
CDR3 N-C-ter	A50	H-Ala(CF_3)-**Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr**-Lys-NH_2	81 %	82%
CDR3 sc	A51	H-Ala(CF_3)-**Asn-Asn-Pro-Pro-Tyr-Thr-Ala-Leu-Ser-Glu-Val**-NH_2	46 %	55%

Les peptides sont ensuite silylés via la formation d'une urée entre les amines libres des peptides (l'amine N terminale et/ou l'amine ε de la lysine) et la fonction isocyanate de l'ICPTES (Figure 53). L'absence de lysine sur les trois séquences d'intérêt a permis cette stratégie de synthèse. En effet, parmi tous les résidus possédant une chaîne latérale nucléophile, seule l'amine ε d'une lysine peut réagir sur l'isocyanate dans nos conditions de synthèse, raison pour laquelle elle est ajoutée pour les peptides silylés à l'extrémité C-terminale. Dans le cas où une lysine est présente dans la séquence peptidique d'intérêt, une protection de type NVOC peut être envisagée. Ce groupement protecteur, stable dans les conditions de clivage, pourrait être retiré après silylation par photolyse.[157]

La silylation est réalisée dans un minimum de DMF anhydre en milieu basique (DIEA) pour déprotoner les amines, obtenues sous forme de sels de TFA après clivage. L'utilisation de l'ICPTES nécessite des conditions anhydres, non seulement pour éviter la conversion de l'isocyanate en amine primaire par la formation d'acide carbamique, suivie d'une décarboxylation, mais aussi l'hydrolyse prématurée du motif triéthoxysilane et sa condensation ultérieure. La réaction s'est déroulée pendant 4h avec un léger excès d'ICPTES (1,2 équivalents d'ICPTES par amine), afin de s'assurer de la conversion totale de l'amine en urée. Les peptides silylés ont été précipités dans de l'éther diéthylique à froid et lavés plusieurs fois à l'éther diéthylique afin d'éliminer l'ICPTES en excès ainsi que la DIEA. La conversion totale a été vérifiée par LC/MS par l'absence des peptides non silylés. Il convient de noter que l'analyse ayant lieu dans un milieu aqueux, nous pouvons observer les différentes formes d'alcoxysilane hydrolysés, comme le montre la Figure 52, où seul le peptide silylé complètement hydrolysé est observé.

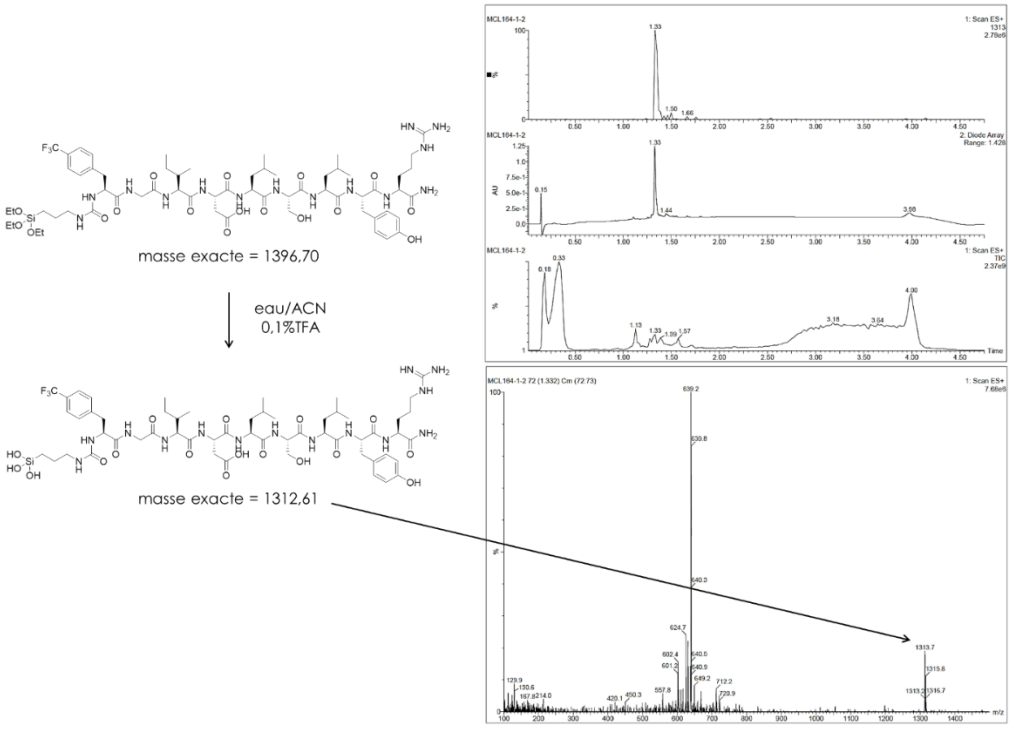


Figure 52 - LC/MS d'un peptide silylé - exemple du composé A40

Les peptides obtenus sont conservés sous argon afin d'éviter leur hydrolyse prématurée. Avec toutes les précautions employées lors de la synthèse et du stockage, nous avons considéré que l'hydrolyse n'a pas commencé et que les peptides peuvent être greffés. De plus, afin d'éviter tout risque d'hydrolyse, nous réalisons la silylation au maximum une semaine avant le greffage des peptides.

Tableau 9 - Séquences des peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline après silylation

CDR	N°	Séquence	Rdt	% Silylation
CDR1 N-ter	A52	**Si**-Phe(CF_3)-**Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg**-NH_2	71 %	100 %
CDR1 C-ter	A53	Ac-Phe(CF_3)-**Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg**-Lys(**Si**)-NH_2	88 %	50 %
CDR1 N-C-ter	A54	**Si**-Phe(CF_3)-**Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg**-Lys(**Si**)-NH_2	62 %	50 %
CDR1 sc	A55	**Si**-Phe(CF_3)-**Asp-Leu-Ser-Arg-Leu-Ile-Gly-Tyr**-NH_2	83 %	100 %
CDR2 N-ter	A56	**Si**-Phe(F)-**Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser**-NH_2	99 %	100 %
CDR2 C-ter	A57	Ac-Phe(F)-**Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser**-Lys(**Si**)-NH_2	99 %	100 %
CDR2 N-C-ter	A58	**Si**-Phe(F)-**Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser**-Lys(**Si**)-NH_2	66 %	100 %
CDR2 sc	A59	**Si**-Phe(F)-**Gly-Asp-Thr-Thr-Asp-Ser-Ile**-NH_2	82 %	100 %
CDR3 N-ter	A60	**Si**-Ala(CF_3)-**Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr**-NH_2	99 %	100 %
CDR3 C-ter	A61	Ac-Ala(CF_3)-**Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr**-Lys(**Si**)-NH_2	98 %	100 %
CDR3 N-C-ter	A62	**Si**-Ala(CF_3)-**Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr**-Lys(**Si**)-NH_2	81 %	100 %
CDR3 sc	A63	**Si**-Ala(CF_3)-**Asn-Asn-Pro-Pro-Tyr-Thr-Ala-Leu-Ser-Glu-Val**-NH_2	88 %	100 %

Le « **Si** » correspond au motif $(EtO)_3Si(CH_2)_3HN(CO)$ introduit par l'ICPTES

Les rendements et les pourcentages de silylation des différents peptides sont résumés dans le Tableau 9. Tous les peptides ont pu être silylés à 100 %, sauf les composés A53 et A54, qui ont montré un pourcentage de silylation de 50 %. Les quantités de ces composés ont donc été doublées lors du greffage, afin d'avoir la même concentration en peptides silylés que pour les autres lots.

3.1.3 Greffages des peptides sur les nanoparticules

Les peptides silylés sont greffés sur les nanoparticules selon le protocole décrit par Maurel *et al.*[64] Les nanoparticules sont d'abord centrifugées pour éliminer l'eau dans laquelle elles étaient stockées. Ensuite, les peptides silylés, préalablement dissous dans un mélange DMF/AcOH (99/1, v/v), sont ajoutés sur les nanoparticules (Figure 53). Les nanoparticules sont bien remises en suspension avant d'être agitées à 65°C pendant 18 h. Une fois le greffage terminé, les nanoparticules sont plusieurs fois lavées pour retirer les peptides n'ayant pas réagi (DMF, eau, DMSO) et les particules sont stockées dans 1,5 mL de DMSO. Les nanoparticules semblaient particulièrement agrégées, notamment lors des lavages à l'eau, c'est pourquoi elles ont été resuspendues (vortex et sonication) et conservées dans le DMSO. Pour connaître la concentration en nanoparticules, 200 µL de chaque suspension sont prélevés. Les nanoparticules sont alors lavées deux fois à l'eau pour enlever le DMSO avant d'être lyophilisées puis pesées. Les nanoparticules peuvent alors être analysées par DLS, à une concentration de 0,05 mg/mL dans un mélange eau/DMSO (95/5, v/v). Les analyses de DLS nous indiquent le rayon hydrodynamique moyen des nanoparticules (Z-average) ainsi que l'indice de polydispersité (PDI) qui est un indicateur d'agrégation. Plus cet indice est faible, plus

les particules sont dites « monodisperses », c'est-à-dire régulières et non agrégées. Afin de quantifier les peptides greffés, les quelques milligrammes (entre 3 et 5 mg en fonction des lots) de nanoparticules lyophilisées ayant servi à déterminer la concentration sont dissoutes dans 1 mL de NaOD (1,5 mol/L). Après dissolution des nanoparticules, la quantification des peptides a été faite en utilisant du TFA comme étalon interne (δ = -75,5 ppm) à une concentration de 0,05 mmol/L. Ces résultats sont résumés dans le Tableau 10.

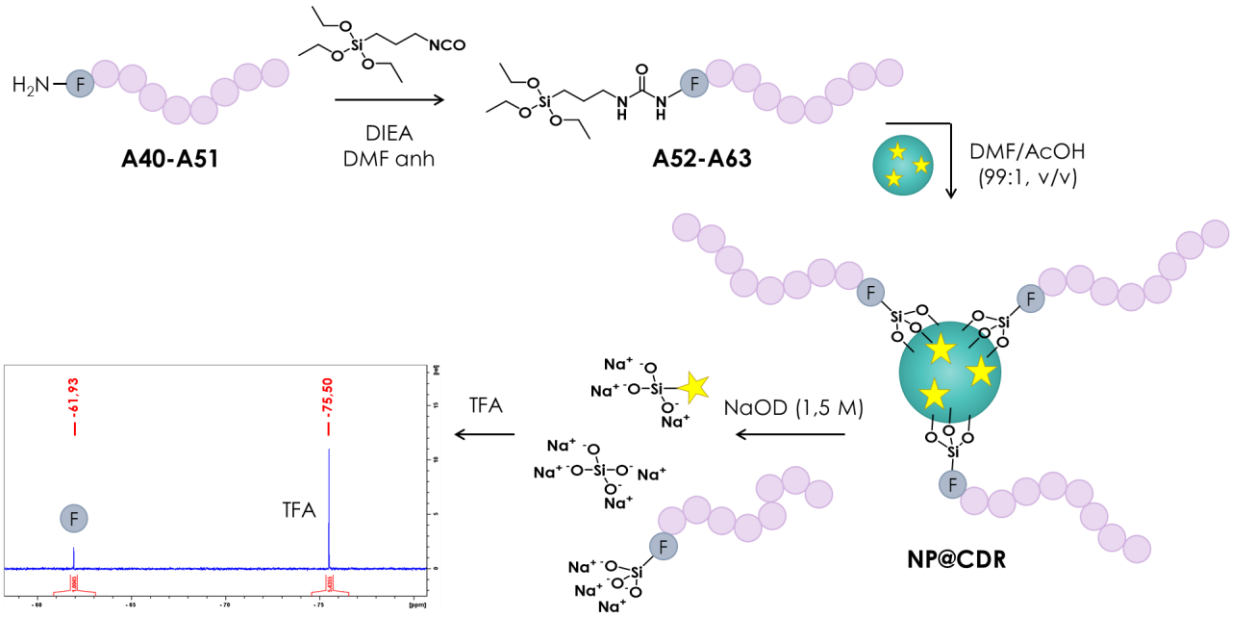


Figure 53 - Synthèse et greffage des peptides silylés

Les peptides ayant été clivés dans du TFA, ils présentaient tous une quantité de contre-ions TFA, sous-estimant la quantité de peptides greffés. Pour faire ces quantifications, 5.10^{-8} mol de TFA sont ajoutés dans le tube comme étalon interne. En considérant les moyennes de greffage obtenu, soit environ 6.10^{-9} mol de peptides greffés, et un contre-ion TFA par peptide, il y aurait 6.10^{-9} mol de TFA en plus des 5.10^{-8}. Il y aurait donc au moins 10% de TFA en plus que la quantité ajoutée comme étalon interne. La quantité de peptide par nanoparticule a donc été sous-estimée. Pour les futures quantifications par RMN ^{19}F, le TFE sera utilisé comme étalon interne (δ = -76.2 ppm).

Les greffages des peptides ont pu être réalisés dans les conditions choisies, bien que la densité de greffage soit plus faible qu'attendu pour tous les lots.

Le greffage des peptides silylés semble dépendre essentiellement de la séquence en aminoacides et également de la position de silylation. En effet, les séquences CDR1 (composés A52 à A55) sont les séquences qui se greffent le mieux, peu importe la position de silylation. La séquence du CDR1 semble être à l'origine de l'agrégation des nanoparticules, puisque les nanoparticules fonctionnalisées avec les CDR2 et CDR3 (peu importe le(s) point(s) d'ancrage) ne semblent pas agrégées. Les séquences CDR3 (composés A60 à A63) se greffent également

bien, avec un greffage préférentiel du côté C-terminal. Enfin, les séquences CDR2 (composés A56 à A59) sont les séquences qui se greffent le moins bien, avec une fonctionnalisation presque inexistante du côté C-terminal. Ce greffage a été refait sans succès (*NP@CDR2-C-ter bis*). Pour ces trois séquences peptidiques, le greffage des peptides bisilylés est celui qui a le mieux fonctionné, avec presque 0,1 peptide/nm², sans pour autant induire d'agrégation. Les nanoparticules sont donc suffisamment diluées lors de la fonctionnalisation pour éviter la liaison de plusieurs particules via les peptides bisilylés (composés A54, A58 et A62). Ces nanoparticules doivent donc présenter les peptides sous forme de boucle. On s'attend donc à de meilleurs résultats pour ces particules car certains peptides auront pu se structurer d'une façon similaire à la structure des CDR au sein du nanobody. Avec un R_F/D inférieur à 0,5, toutes les nanoparticules présentent des ligands avec un régime « champignon ». Les nanoparticules fonctionnalisées avec les peptides bisilylés (composés A54, A58 et A62) sont celles qui présentent le R_F/D le plus élevé et le plus proche de 0,5. On peut s'attendre à une conformation plus proche du régime intermédiaire et donc à une meilleure accessibilité des peptides. Tous les lots de nanoparticules ont été envoyés pour analyses, même ceux très faiblement fonctionnalisés.

Tableau 10 - Tailles et fonctionnalisations des nanoparticules avec les peptides silylés

NP@CDR	Concentration (mg/mL)	Nb peptide/NP	Nb peptide/nm²	Z-average (nm)	PDI	Aspect	R_F/D
NP@**CDR1-N-ter**	13,22	1630	0,0418	4712	1,86	Très agrégées	0,26
NP@**CDR1-C-ter**	15,33	1203	0,0295	3256	1,47	Très agrégées	0,22
NP@**CDR1-N-C-ter**	11,57	3900	0,0955	4403	1,62	Très agrégées	0,37
NP@**CDR1-sc**	11,55	1407	0,0361	4462	1,66	Très agrégées	0,23
NP@**CDR2-N-ter**	14,88	484	0,0124	130,3	0,17	Non agrégées	0,13
NP@**CDR2-C-ter**	17,09	88	0,0022	143,1	0,22	Non agrégées	0,06
*NP@**CDR2-C-ter bis***	*4,30*	*16*	*0,0004*	*308,1*	*0,43*	*Non agrégées*	*0,02*
NP@**CDR2-N-C-ter**	12,18	3819	0,0935	131,6	0,16	Non agrégées	0,34
NP@**CDR2-sc**	15,58	1207	0,0310	127	0,19	Non agrégées	0,19
NP@**CDR3-N-ter**	13,67	800	0,0205	289,8	0,47	Peu agrégées	0,21
NP@**CDR3-C-ter**	13,79	2803	0,0687	136,1	0,18	Non agrégées	0,39
NP@**CDR3-N-C-ter**	17,01	3791	0,0929	164,2	0,36	Non agrégées	0,43
NP@**CDR3-sc**	15,27	740	0,0190	209,1	0.39	Peu agrégées	0,19

3.1.4 Capacité de liaison à la mésothéline

Test ELISA

Les nanoparticules fonctionnalisées sont testées par un test ELISA simplifié. La mésothéline recombinante est immobilisée dans les puits. De la BSA est ensuite ajoutée pour saturer les puits, les zones du puits dépourvues de mésothéline sont donc recouvertes de BSA. Les nanoparticules peuvent être analysées (Figure 54). Deux concentrations ont été testées : 0,1 mg/L (mélange PBS/DMSO 99/1, v/v) et 1 mg/mL (mélange PBS/DMSO 90/10, v/v).

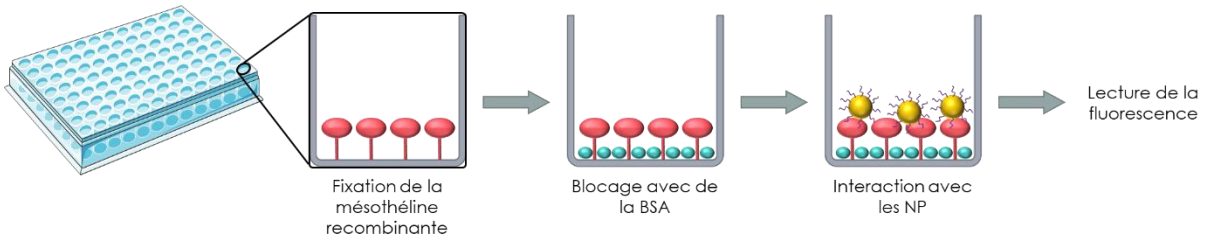


Figure 54 - Test ELISA simplifié

Pour vérifier que la mésothéline est correctement fixée dans les puits, un test de liaison avec le nanobody anti-mésothéline a été réalisé avec succès. De plus, un contrôle négatif (sans mésothéline) a été réalisé pour toutes les nanoparticules. Les résultats obtenus avec ce test ELISA simplifié montre que les nanoparticules se lient aussi bien dans les puits contenant la mésothéline que dans les puits n'en contenant pas, ce qui implique de fortes interactions non spécifiques (Figure 55).

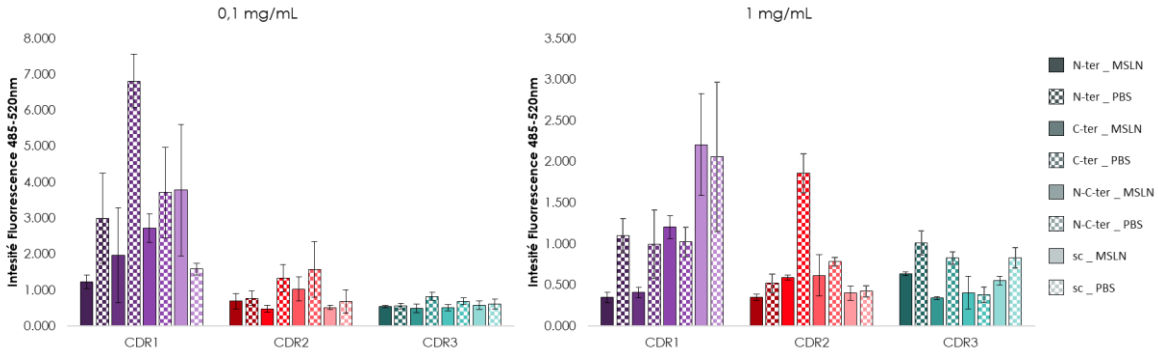


Figure 55 - Résultats des tests ELISA

Etant donné ces fortes interactions non spécifiques, de nouvelles mesures de DLS ont été réalisées sur les lots présentant les meilleurs greffages et état d'agrégation : les CDR sc et les CDR N-C-ter. En effet, les potentiels zêta des nanoparticules n'avaient pas été mesurés. L'état de charge des nanoparticules pourraient être une explication de ces interactions non spécifiques. Ces mesures ont été réalisées dans un mélange eau/DMSO (95/5, v/v) avec une concentration en nanoparticules de 0,05 mg/mL.

Tableau 11 - Mesures de taille et de potentiel zêta des nanoparticules fonctionnalisées analysées par QCM-d

NP@CDR	Z-average (nm)	PDI	Potentiel zêta	pH
NP@CDR1-N-C-ter	2787	0,3213	-7,894	7,38
NP@CDR1-sc	157,6	0,1423	-35,44	7,22
NP@CDR2-N-C-ter	166,5	0,1726	-35,08	7,29
NP@CDR2-sc	136,7	0,1772	-38,91	7,38
NP@CDR3-N-C-ter	185,4	0,2048	-30,76	7,12
NP@CDR3-sc	142,8	0,1063	-34,18	7,23

Tous les lots présentent un potentiel zêta entre -30 et -40, sauf les NP@CDR1-N-C-ter. La forte agrégation de ces nanoparticules pourrait expliquer la différence de potentiel zêta observée par rapport aux autres lots. Ces valeurs montrent que les nanoparticules sont fortement

chargées négativement au pH de mesure (entre 7,1 et 7,4 en fonction des lots). Etant donné que la mésothéline présente un point isoélectrique acide ($pI^{théorique}$ = 5,77)[158], tout comme la BSA (pI = 4,5), elles seraient toutes les deux chargées négativement au pH de mesure. La répulsion électrostatique entre ces deux entités chargées négativement pourrait expliquer les résultats similaires entre la liaison à la mésothéline et le contrôle négatif.

Afin de vérifier les résultats obtenus avec ces tests ELISA simplifiés, des expériences préliminaires de QCM-d ont été réalisées à l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM) par le Dr Giang Ngo. Seules les particules présentant le moins d'agrégation ont été analysées (NP@CDR2-N-C-ter et NP@CDR3-N-C-ter) (Figure 56).

QCM-d

La microbalance à quartz utilise l'effet piézoélectrique des cristaux de quartz pour mesurer des changements de masse (de l'ordre de quelques ng à quelques µg) à la surface du capteur en quartz. L'adsorption d'un objet ou d'une molécule sur ce capteur va entraîner un changement de la fréquence de résonance du quartz. Le modèle de Sauerbrey (Équation 6) permet de déterminer la masse adsorbée en fonction de la variation de fréquence selon l'équation suivante :

$$\Delta m = \frac{C}{n}\Delta f$$

Équation 6 - Equation de Sauerbrey
Où Δm est la masse adsorbée par unité de surface (ng/cm^2), Δf la variation de fréquence de résonance (Hz), n le nombre de modes harmoniques et C une constante dépendant de l'épaisseur et de la densité du quartz (C = 17.7 ng/Hz.cm^2 pour un cristal de 5 MHz).

Le modèle de Sauerbrey est valable lorsque :

1. La masse adsorbée est faible par rapport à la masse du cristal de quartz.
2. La masse est adsorbée de manière rigide (liaison covalente).
3. La masse adsorbée est répartie uniformément sur le cristal.

L'étude de la dissipation permet d'obtenir des informations sur les propriétés viscoélastiques de la couche adsorbée. Par exemple, lorsqu'un ligand se lie de manière covalente au capteur, la fréquence de résonance va être modifié sans modification de la dissipation (modèle de Sauerbrey). En revanche, lorsqu'un ligand interagit de façon non covalente avec le capteur, la fréquence de résonance et la dissipation vont être modifiées. Dans ce cas, différents modèles plus complexes prenant en compte les variations de fréquence et de dissipation, ainsi que les modes harmoniques, pourront être utilisés pour déduire la masse adsorbée, mais aussi d'autres données comme l'épaisseur, la densité ou encore la viscosité de la couche adsorbée.[159]

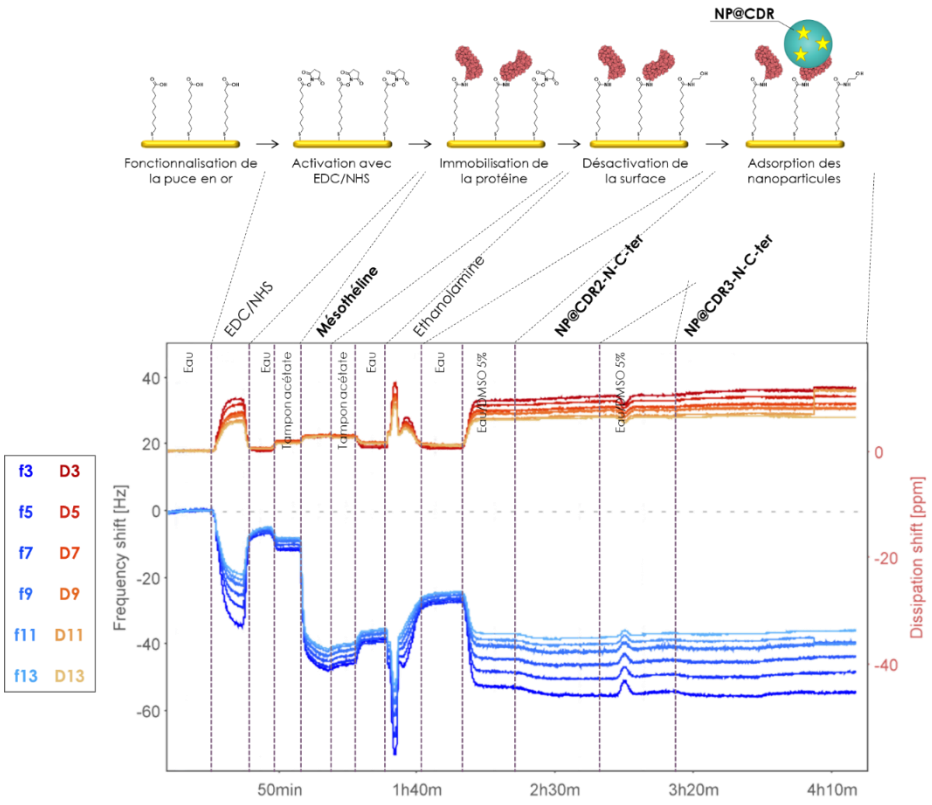


Figure 56 - Analyses des nanoparticules par QCM-d

Dans un premier temps, la puce en or a été fonctionnalisée avec de l'acide 11-mercaptoundécanoïque. Puis, l'acide est activé avec un mélange NHS/EDC pour pouvoir immobiliser la mésothéline sur ses amines libres (l'amine N terminale et les amines ε des lysines). Les acides activés qui n'ont pas réagi sont bloqués avec de l'éthanolamine. L'équation de Sauerbrey (Équation 6) a permis de déterminer la quantité de mésothéline immobilisée, soit 354 ng/cm² (8,85 pmol/cm²) (Figure 57).

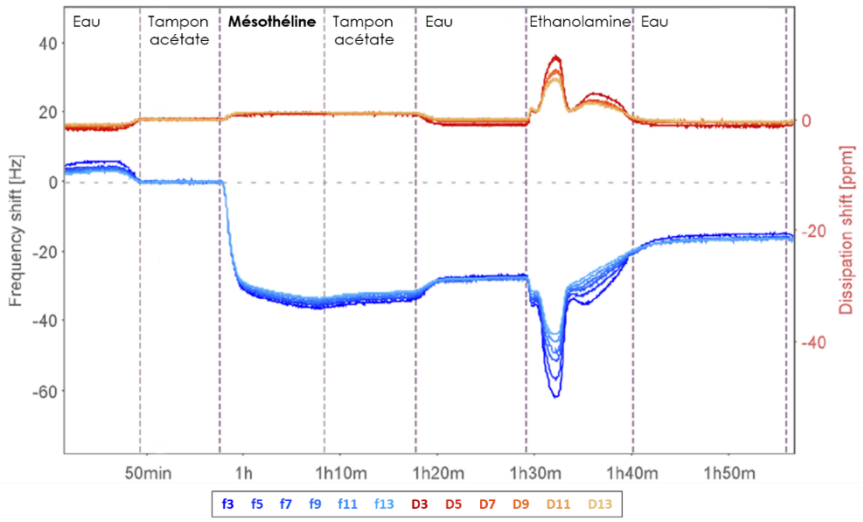


Figure 57 - Immobilisation de la mésothéline

Après équilibration du système dans un mélange eau/DMSO (95/5, v/v), les nanoparticules peuvent être analysées. Celles-ci sont injectées sur la puce à une concentration de 0,5 mg/mL avec un débit de 15 µL/min pendant au moins 30 min. La liaison obtenue avec les NP@CDR2-N-C-ter est insignifiante. De même, la liaison avec les NP@CDR3-N-C-ter est très faible (Figure 58).

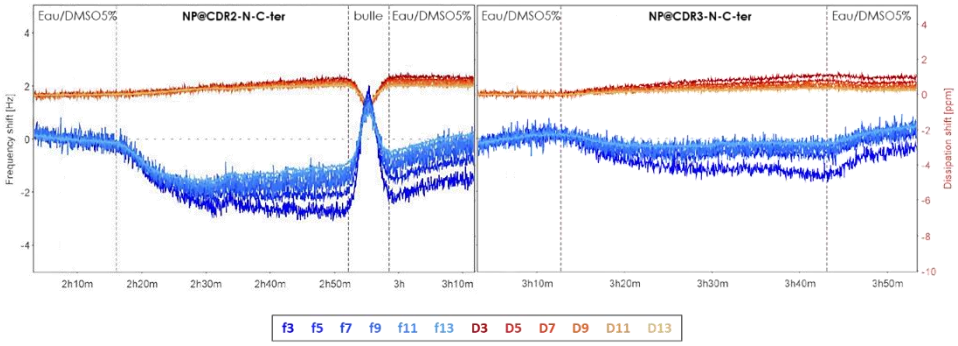


Figure 58 - Interactions entre la mésothéline et les NP@CDR2-N-C-ter et NP@CDR3-N-C-ter

Les résultats de QCM-d confirment ceux obtenus par les tests ELISA simplifiés. Nous avons l'hypothèse que, en plus du manque d'accessibilité des peptides liés à leur conformation en « champignon », la charge globale des nanoparticules génère une répulsion électrostatique lors des différents tests de liaisons avec la mésothéline. Pour limiter cette répulsion, la charge globale des particules doit être neutralisée. Pour cela, un motif PEG peut être introduit entre la particule et les peptides. L'introduction de ce motif devrait également permettre à obtenir des nanoparticules fonctionnalisées avec des ligands en régime « brosse » et donc plus accessibles.

3.2 Nanoparticules fonctionnalisées avec les PEG-peptides

Il a été montré qu'une couronne de PEG autour d'une nanoparticule de silice modifiait à la fois de rayon hydrodynamique de la particule, mais également son potentiel zêta, le rapprochant de la neutralité.[160] Nous espérons donc que l'introduction d'un motif PEG entre la particule et le mime de CDR permettrait de diminuer le potentiel zêta des nanoparticules, et donc la répulsion électrostatique résultante. De cette manière, nous espérons obtenir une liaison entre les nanoparticules et la mésothéline. Des PEG-peptides silylés mimes de CDR sont donc préparés pour être greffés à la surface de nanoparticules de silices. Un motif PEG(2000) a été sélectionné pour la synthèse de ces ligands hybrides. En effet, il a été montré que cette longueur de PEG permet de positionner les ligands en régime « brosse » lorsque la densité de greffage est supérieure à 0,1 ligand/nm². Cette géométrie permet de garantir l'accessibilité des ligands peptidiques positionnés à l'extrémité du PEG. Avec une densité de greffage inférieure à 0,1 ligand/nm², les chaînes PEG-peptides se structurent en régime « champignon » où le ligand peptidique est masqué sous le PEG (Figure 49).[64]

Des nanoparticules fonctionnalisées avec un ligand PEG fluoré préalablement synthétisé sont également préparées pour servir de contrôle négatif lors des expériences de liaison à la mésothéline. Etant donné la sensibilité de la QCM-d pour ce type de mesure, nous avons décidé de tester les nanoparticules fonctionnalisées avec des PEG-peptides silylés avec cette méthode. En QCM-d, plus la différence de masse entre l'objet immobilisé et l'objet lié est grande, plus la mesure est sensible. Ce nouveau lot de nanoparticules fonctionnalisées est donc préparé à partir de nanoparticules de silice d'environ 200 nm de diamètre. La fluorescence n'étant pas utile pour les mesures de QCM-d, les premiers essais ont lieu avec des nanoparticules non fluorescentes.

3.2.1 Synthèse des nanoparticules

Le procédé Stöber permet la synthèse de nanoparticules de silice de 50 à 2000 nm de diamètre selon les proportions d'ammoniac et de TEOS ajoutés lors de la synthèse.[154] Pour obtenir nos nanoparticules d'environ 200 nm de diamètre, 15 mL de TEOS ont été ajoutés dans un mélange NH_4OH(30%)/EtOH absolu (90/10, v/v) et le mélange a été agité à 30°C pendant 22h à 600 rpm. Après plusieurs lavages à l'EtOH et l'eau jusqu'à neutralisation du pH, les nanoparticules sont stockées dans 100 mL d'eau milliQ. Comme attendu, les nanoparticules synthétisées possèdent un diamètre moyen de 227 nm avec un indice de polydispersité de 0,036, et présentent un potentiel zêta de -49,8 dans l'eau milliQ à pH 7.

3.2.2 Synthèse des Si-PEG-peptides

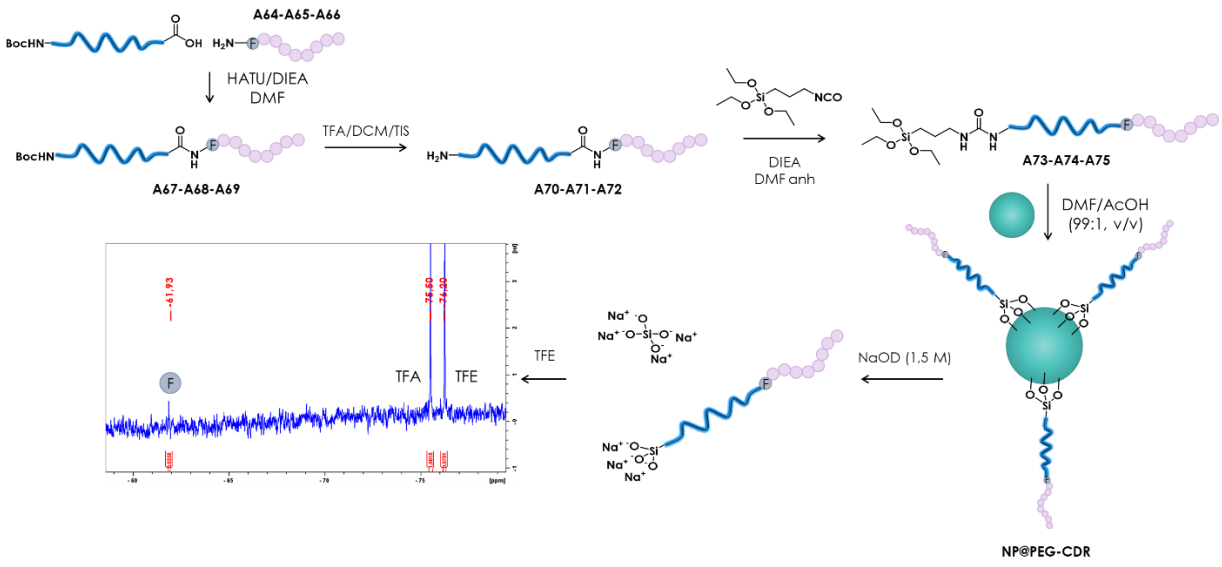


Figure 59 - Synthèse et greffage des PEG-peptides silylés

Nous avons choisi de commencer par synthétiser une seule série de peptides PEGylés parmi les trois possibilités présentées dans la section précédente (i.e. ancrage par l'extrémité N-terminale et/ou C-terminale) : les peptides silylés à l'extrémité N terminale (Tableau 12). Les

peptides A64, A65 et A66 ont été synthétisés comme les peptides A40, A44 et A48 sur une résine RinkAmide ChemMatrix (0,47 mmol/g). Le choix de la résine ChemMatrix (100% PEG) vis-à-vis de la résine amphisphère (PEG-PS) a permis l'obtention de peptides bruts avec une pureté plus importante. Nous avons donc poursuivi la synthèse sans purification.

Tableau 12 - Séquences des peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline avant PEGylation

Peptide	N°	Séquence	Rdt	Pureté
CDR1	A64	H-Phe(CF_3)-**Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg**-NH_2	55 %	81%
CDR2	A65	H-Phe(F)-**Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser**-NH_2	69 %	95%
CDR3	A66	H-Ala(CF_3)-**Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr**-NH_2	61 %	90%

Après clivage, les peptides sont PEGylés du côté N-terminal en couplant le BocHN-PEG(2000)-CO_2H sur l'amine N-terminale des peptides A64 à A66. Pour cela, le BocHN-PEG(2000)-CO_2H a été pré-activé en solution en utilisant 1 équivalent de HATU et 2 équivalents de DIEA dans un minimum de DMF. Le peptide (A64 à A66) en excès (1,5 équivalents) est solubilisé dans un minimum de DMF et de la DIEA est ajoutée jusqu'à ce que le pH soit supérieur à 9. Le BocHN-PEG(2000)-CO_2H activé est ensuite ajouté en goutte à goutte sur le peptide en solution et le mélange est agité durant 4h, puis le produit est précipité dans de l'éther diéthylique. Le peptide à PEGyler est utilisé en excès afin de s'assurer du couplage total du BocHN-PEG(2000)-CO_2H. En effet, le BocHN-PEG(2000)-CO_2H seul et le BocHN-PEG(2000)-peptide ne sont pas séparables par HPLC préparative, alors que le peptide l'est du PEG seul et du PEG-peptide. Le BocHN-PEG(2000)-peptide (A67-69, Tableau 13 et Figure 59) est ensuite purifié sur HPLC préparative pour éliminer le peptide qui n'a pas réagi. La purification par HPLC préparative entraînant une perte conséquente de produit (rendement entre 17 et 50% après purification, Tableau 13), chaque PEGylation a été réalisée deux fois pour obtenir suffisamment de chaque BocHN-PEG(2000)-peptide.

Tableau 13 - Séquences des peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline après PEGylation

Peptide	N°	Séquence	Rdt	Taux de PEGylation
CDR1	A67a	BocHN-**PEG**-Phe(CF_3)-**Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg**-NH_2	50%	100%
	A67b		42%	100%
CDR2	A68a	BocHN-**PEG**-Phe(F)-**Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser**-NH_2	53%	100%
	A68b		50%	100%
CDR3	A69a	BocHN-**PEG**-Ala(CF_3)-**Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr**-NH_2	38%	100%
	A69b		17%	100%

Le BocHN-PEG(2000)CO_2H et les BocHN-PEG(2000)-peptides A67 à A69 n'étant pas séparables par chromatographie, le taux de couplage n'a pas pu être estimé par LC/MS. Il a été mesuré par RMN grâce à des expériences de couplages hétéronucléaires HMBC (^1H-^{13}C). Le spectre RMN HMBC (^1H-^{13}C) du BocHN-PEG(2000)-CO_2H a permis d'identifier le CH_2 ($\delta(H)$ = 2,47 ppm, $\delta(C)$ = 30,9 ppm) en α de l'acide ainsi que le C^{IV} de l'acide ($\delta(C)$ = 178,7 ppm) (Figure 60 – spectre gris). Les spectres RMN HMBC (^1H-^{13}C) des BocHN-PEG(2000)-peptides A64 à A66 ont également permis d'identifier les CH_2 en α de l'amide formé ($\delta(H)$ = 2,30-2,31-2,42 ppm, pour

les composés A64, A65 et A66 respectivement, δ(C) = 31,9 ppm), ainsi que le C^{IV} de l'amide (δ(C) = 176,1-175,9-176,0 ppm, pour les composés A64, A65 et A66 respectivement). L'absence des signaux caractéristiques du BocHN-PEG(2000)-CO_2H montre que le taux de couplage des trois PEGylation est de 100 % (Figure 60). Les lots a et b de chaque BocHN-PEG(2000)-peptides, montrant le même taux de PEGylation, sont rassemblés pour poursuivre les synthèses (A67a+A67b, A68a+A687b, A69a+A69b).

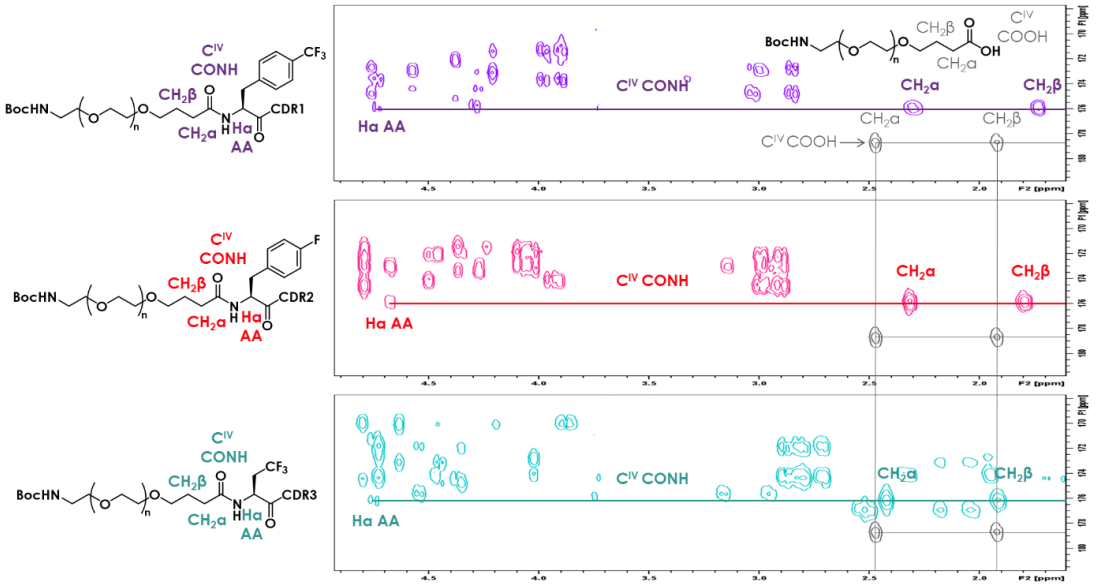


Figure 60 - Vérification des couplages BocHN-PEG-peptide avec les spectres RMN HMBC (^1H-^{13}C) de 1,5 à 5,5 ppm (^1H) et de 160 à 185 ppm (^{13}C)

L'amine N-Boc des composés A64 à A66 est déprotégée dans un mélange TFA/DCM (50/50, v/v) en utilisant 2 équivalents de TIS comme scavenger pour obtenir les composés A67 à A69 (Tableau 14 et Figure 59). L'absence du groupement Boc est vérifiée par RMN pour les trois H_2N-PEG(2000)-peptides.

Tableau 14 - Séquences des peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline après déprotection de l'amine N-Boc

CDR	N°	Séquence	Rdt
CDR1	A70	H_2N-**PEG**-Phe(CF_3)-**Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg**-NH_2	100%
CDR2	A71	H_2N-**PEG**-Phe(F)-**Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser**-NH_2	86%
CDR3	A72	H_2N-**PEG**-Ala(CF_3)-**Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr**-NH_2	97%

Enfin, les composés A70 à A72 sont silylés avec 2 équivalents d'ICPTES dans du DMF anhydre et en milieu basique pour obtenir les Si-PEG-peptides A73 à A75 (Tableau 15 et Figure 59).

Tableau 15 - Séquences des peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline après silylation

CDR	N°	Séquence	Rdt
CDR1	A73	**Si-PEG**-Phe(CF_3)-**Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg**-NH_2	85
CDR2	A74	**Si-PEG**-Phe(F)-**Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser**-NH_2	97
CDR3	A75	**Si-PEG**-Ala(CF_3)-**Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr**-NH_2	-

Le « **Si** » correspond au motif $(EtO)_3Si(CH_2)_3HN(CO)$- introduit par l'ICPTES

Les composés A73 et A74 ont été obtenu avec une pureté et en quantité suffisante pour les greffer sur les nanoparticules de silice préalablement synthétisées. Malgré deux essais, la silylation du composé A72 n'a pas fonctionné, le spectre RMN montrant une dégradation du peptide. Le composé A75 n'a pas pu être obtenu pour être greffé.

Enfin, le PEG fluoré silylé est synthétisé pour être utilisé comme contrôle négatif en utilisant la même voie de synthèse que celle des PEG-peptides silylés. Le BocHN-PEG(2000)-CO_2H est solubilisé dans le DMF, le mélange est basifié en utilisant 4 équivalents de DIEA puis 2 équivalents du chlorhydrate de 2-fluoroéthylamine est ajouté au mélange, suivi de 2 équivalents d'HATU. Le mélange est agité pendant 1h à température ambiante puis le DMF est évaporé et le produit est précipité dans de l'éther diéthylique avant d'être purifié sur HPLC préparative pour obtenir le composé A76. L'amine N-Boc est déprotégée dans un mélange TFA/DCM (50/50, v/v) pour donner le produit A77 avec un rendement de 100%. Enfin, ce composé est silylé en utilisant 4 équivalents d'ICPTES dans du DMF anhydre en milieu basique pour obtenir le composé A78 (Tableau 16).

Tableau 16 - Synthèse du PEG fluoré silylé

N°	Séquence	Rdt
A76	BocHN-**PEG**-F	73%
A77	H_2N-**PEG**-F	100%
A78	**Si**-**PEG**-F	77%

Le « **Si** » correspond au motif $(EtO)_3Si(CH_2)_3HN(CO)$- introduit par l'ICPTES

3.2.3 Greffage des Si-PEG-peptides sur les nanoparticules

Le greffage des ligands PEGylés (A73, A74 et A78) a été réalisé de la même façon que le greffage des peptides silylés A52 à A63 . Les nanoparticules fonctionnalisées (NP@PEG-CDR1, NP@PEG-CDR2 et NP@PEG-F) ont été analysées par DLS (taille et potentiel zêta) et, après dissolution d'une quantité connue de nanoparticules, la quantité de ligands greffés a été estimée par RMN ^{19}F (Tableau 17).

Tableau 17 - Taille, potentiel zêta et densité de greffages des nanoparticules fonctionnalisées par les PEG-ligands A73, A74 et A78

NP@CDR	Nb peptide/NP	Nb peptide/nm²	Potentiel zêta	Z-average (nm)	PDI	Aspect	R_F/D
NP@SiO_2	-	-	-49,8	227,6	0,02	non agrégées	-
NP@**PEG-CDR1**	1730	0,0106	-44,63	242,3	0,08	non agrégées	0,32
NP@**PEG-CDR2**	0	0	-41,71	252,9	0,15	non agrégées	-
NP@**PEG-F**	0	0	-45,28	225,9	0,03	non agrégées	-

L'augmentation du diamètre des particules NP@PEG-CDR1 et NP@PEG-CDR2, ainsi que l'augmentation du potentiel zêta, semblent indiquer que le greffage des ligands a fonctionné pour ces deux lots. Concernant les NP@PEG-F, seule l'augmentation du potentiel zêta indique une modification de la surface des particules. La quantification des ligands greffés par RMN ^{19}F indique une très faible fonctionnalisation pour les NP@PEG-CDR1 et aucune

fonctionnalisation pour les NP@PEG-CDR2 et NP@PEG-F. Avec cette méthode de greffage, la quantité de ligands greffés attendue est d'environ 0,5 ligand/nm² (soit environ 80 000 peptides/NP pour des particules de 220 nm de diamètre).[64] Tous les éléments de cette réaction ont été testés et aucune explication n'a été trouvée pour expliquer l'échec du greffage des ligands. On peut noter que le rapport R_F/D des NP@PEG-CDR1 a augmenté par rapport à celui des NP@CDR1-N-ter, analogue non PEGylé du ligand PEG-CDR1 (0,32 et 0,26 respectivement, Tableau 10 et Tableau 17) alors que le nombre de ligands par nm² a été divisé par quatre (0,0106 et 0,0418 respectivement, Tableau 10 et Tableau 17). Ce résultat tend à montrer l'importance du motif PEG dans ces nanoparticules fonctionnalisées.

3.3 Perspectives

Pour trouver des conditions de greffage efficaces, des tests de greffages de la fluorescéine silylée ont été réalisés avec différents pourcentages d'acide acétique (de 1 à 10%) et il semblerait que le greffage fonctionne à 10% d'acide acétique. La synthèse d'un nouveau lot de ligands PEGylés est en cours et ces conditions de greffages seront testées.

De nouveaux lots de PEG-peptides sont en cours de préparation à partir d'un nouveau BocHN-PEG(2000)-CO_2H, entraînant un changement des marqueurs RMN pour la vérification du couplage. Les BocHN-PEG-peptides sont synthétisés comme suit : le BocHN-PEG(2000)-CO_2H est pré-activé en solution en utilisant 1,1 équivalents de HATU et 2,2 équivalents de DIEA dans un minimum de DMF. 1 équivalent de peptide (A64 à A66) est solubilisé dans un minimum de DMF et de la DIEA est ajoutée jusqu'à ce que le pH soit supérieur à 9. Le BocHN-PEG(2000)-CO_2H activé est ensuite ajouté en goutte à goutte sur le peptide en solution et le mélange est agité durant 4h. Le traitement de la réaction a été modifié pour éviter la purification par HPLC préparative et la perte de produit associée : afin d'éliminer l'HATU en excès, le DMF est évaporé et le produit est solubilisé dans de l'eau milliQ, faisant précipiter l'HATU. Après filtration, le BocHN-PEG(2000)-peptide (A79, A80 et A81) en solution dans l'eau est lyophilisé, le produit est lavé avec de l'éther diéthylique et est séché sous vide. Le BocHN-PEG(2000)-F A82 est synthétisé suivant la même voie de synthèse (Tableau 18).

Tableau 18 - Séquences des peptides mimes des CDR du nanobody anti-mésothéline après PEGylation

Peptide	N°	Séquence	Rdt	Taux de PEGylation
CDR1	A79	BocHN-**PEG**-Phe(CF_3)-**Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg**-NH_2	98%	100%
CDR2	A80	BocHN-**PEG**-Phe(F)-**Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser**-NH_2	97%	100%
CDR3	A81	BocHN-**PEG**-Ala(CF_3)-**Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr**-NH_2	98%	100%
-	A82	BocHN-**PEG**-F	95%	100%

Comme avec le précédent lot de ligands PEGylés, la corrélation entre le CH_2 en α de l'acide et le C^{IV} de l'acide a été identifié sur le spectre HMBC (^1H-^{13}C). L'absence de ce signal sur les quatre PEG-ligands montre que la totalité du PEG a été fonctionnalisé. De plus, la présence

d'une nouvelle corrélation entre le CH_2 en α de l'acide et le C^{IV} de l'amide formé confirme le couplage.

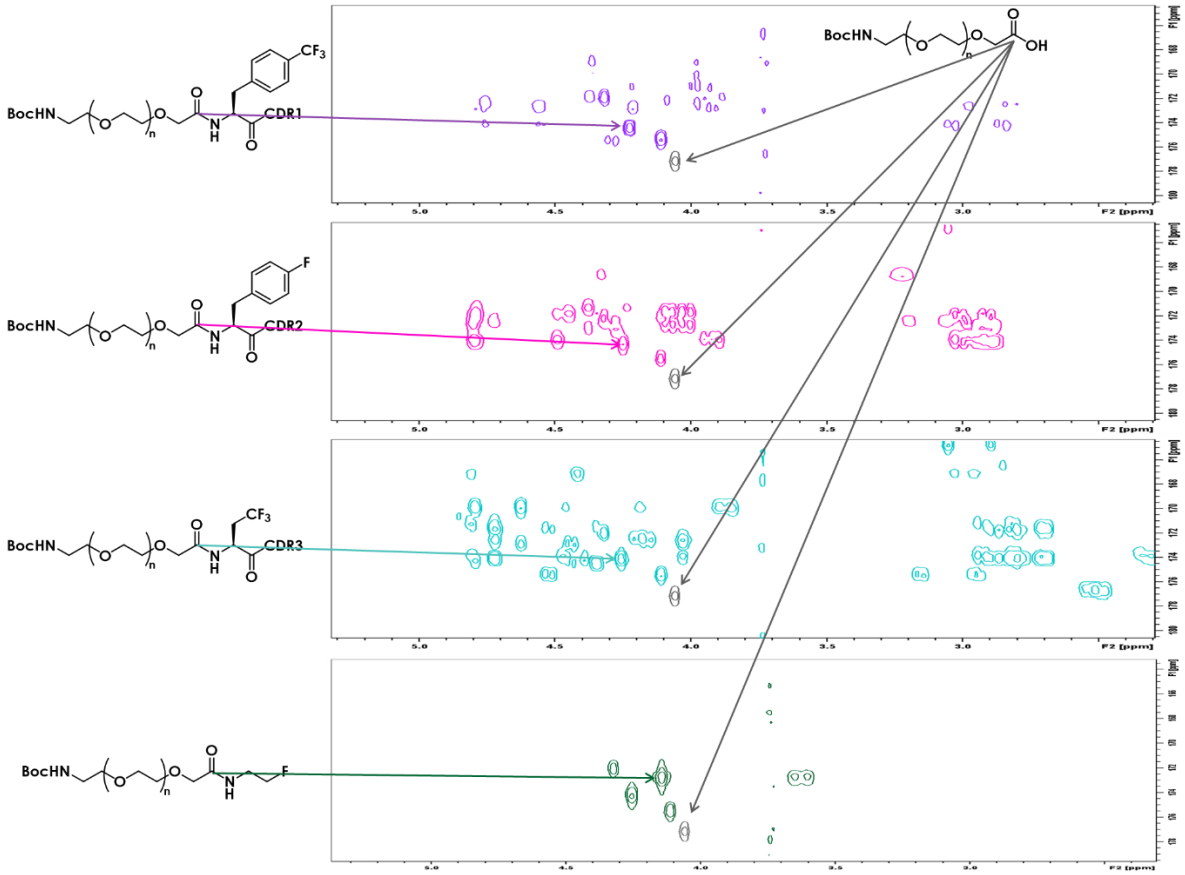


Figure 61 - Vérification des couplages BocHN-PEG-peptide avec les spectres RMN HMBC (^{1}H-^{13}C) de 2,0 à 5,5 ppm (^{1}H) et de 160 à 185 ppm (^{13}C)

La synthèse de ces nouveaux PEG-peptides est en cours. Après la déprotection de l'amine N-Boc des composés A79 à A82, qui aura lieu dans les mêmes conditions de synthèse des produits A70, A71, A72 et A77, la silylation pourra être réalisée dans les mêmes conditions que précédemment (composés A73, A74, A75 et A78). Le greffage sur les $NP@SiO_2$ sera alors tenté en utilisant un mélange DMF/AcOH (90/10, v/v) au lieu de DMF/AcOH (99/1, v/v).

4 Conclusion

Dans cette première partie, des peptides linéaires et cycliques non structurés mimes des trois CDR du nanobody anti-mésothéline ont été synthétisés. Ils présentent tous un bras solubilisant afin d'augmenter leur solubilité en milieu biocompatible, ainsi qu'une biotine permettant de réaliser les tests d'affinités avec la mésothéline. La capacité de reconnaissance des peptides pour la mésothéline a été évaluée grâce à des tests ELISA, en utilisant la streptavidine-HRP pour la détection. Aucun peptide n'a montré une affinité mesurable pour la mésothéline. Les peptides cycliques ont également été testés par interférométrie biocouche. Plusieurs

hypothèses sont avancées pour expliquer cette absence d'affinité, comme le manque de structuration des peptides. Une synergie pourrait être nécessaire pour montrer une affinité pour la cible. De nouveaux peptides présentant une structure secondaire en coude β pourraient être synthétisés et testés seuls et en mélange pour vérifier ces hypothèses.

Des peptides silylés ont également été synthétisés et greffés à la surface de nanoparticules de silice pour augmenter la concentration locale en peptides. Dans un premier temps, des nanoparticules de silice fluorescentes d'une centaine de nanomètres de diamètre ont été synthétisées et utilisées comme support, permettant de réaliser des tests ELISA simplifiés grâce à la fluorescence des nanoparticules. Ces nanoparticules mono-fonctionnalisées obtenues ont été caractérisées pour déterminer le nombre de ligands qu'elles présentaient, ainsi que leur conformation. Ces tests ELISA n'ont montré aucune affinité des nanoparticules pour la mésothéline. La faible fonctionnalisation des nanoparticules a entraîné une structuration des ligands sous forme « champignon », limitant leur accessibilité pour leur cible. De plus, la charge globale des nanoparticules, fortement négative, peut être à l'origine de répulsion électrostatique avec la mésothéline, également chargée négativement à pH physiologique. Pour éviter ce phénomène de répulsion, ainsi que l'organisation des peptides sous forme de « brosse » pour une meilleure accessibilité, de nouveaux ligands PEG-peptides sont en cours de synthèse pour fonctionnaliser de nouvelles nanoparticules, dont l'affinité pour la mésothéline sera déterminée grâce à une microbalance à quartz avec contrôle de la dissipation (QCM-d).

Chapitre 3
Anticorps artificiels : empreintes de protéines

1 Description de la stratégie

Grâce à leur capacité de reconnaissance, les polymères à empreintes moléculaires (MIP : *Molecularly Imprinted Polymers*), peuvent être utilisés comme des anticorps artificiels dirigés contre une cible d'intérêt biologique, en particulier des protéines. Ces macromolécules étant fragiles, la synthèse de l'empreinte polymère autour de celle-ci doit se faire dans des conditions non dénaturantes pour obtenir une empreinte pertinente. Le procédé sol-gel permet la synthèse de matériau dans l'eau, à température ambiante et à pH contrôlé, et a été choisi comme méthode de polymérisation.

Pour mimer les interactions protéine-protéine entre le matériau et la protéine cible, des monomères fonctionnels mimes d'acides aminés ont été utilisés lors de la synthèse des MIP. Peu d'alcoxysilanes possédant des fonctions présentées par les acides aminés sont commercialement disponibles et aucun d'entre eux ne présente la structure complète des aminoacides. Le premier objectif de cette partie est donc la synthèse de ces monomères fonctionnels. Ceux-ci sont utilisés à la fois pour la synthèse des empreintes, mais aussi pour fonctionnaliser différents supports à base de silice afin d'en moduler les propriétés. Des capillaires d'électrophorèse capillaire ont été modifiés pour moduler les propriétés d'adsorption des protéines. De la silice mésoporeuse (SBA-15) a également été fonctionnalisée avec ces monomères fonctionnels. Les résultats obtenus, ayant fait l'objet d'une publication, ne sont pas présentés dans ce manuscrit de thèse.[161]

Afin d'optimiser les chances d'obtenir un MIP ayant une forte sélectivité et spécificité pour sa cible, deux stratégies ont été employées. Dans un premier temps, des MIP de protéines entières ont été synthétisés et leurs performances ont été évaluées. La spécificité des empreintes a été déterminée par microbalance à quartz avec étude de la dissipation (QCM-d) et la sélectivité par des tests ELISA en présence de protéines compétitrices. Puis, dans un second temps, après la synthèse d'un épitope structuré, celui-ci a été utilisé comme modèle à la place de la protéine entière. Pour chaque MIP obtenu, un matériau sans empreinte (NIP : *Non-Imprinted Polymer*) est synthétisé comme contrôle négatif.

Enfin, la méthode de synthèse des MIP développée sur la surface de nanoparticules a été adaptée pour obtenir des MIP sur d'autres supports, comme à l'intérieur de capillaires d'électrophorèse, ou encore à la surface de puces de microbalance à quartz.

Le but est donc la génération d'anticorps artificiels via des matériaux capables de reconnaître spécifiquement et sélectivement des protéines d'intérêt biologique. Différentes protéines ont été choisies comme modèles à cette fin. Le cytochrome C (CytC) et le lysozyme (Lyz), deux protéines globulaires similaires en termes de taille (12 kDa pour le CytC et 14 kDa pour le Lyz)

et de point isoélectrique (9,6 pour le CytC et 11,5 pour le Lyz), nous ont servi à optimiser la méthode de préparation des MIP. La kallikréine (KLK), une autre protéine globulaire présentant plusieurs hélices α dont une accessible à la surface (Y^{234}-N^{245}), nous a permis de développer la méthode par empreintes d'épitope. L'épitope préalablement synthétisé est utilisé comme cible à la place de la protéine entière, permettant l'obtention de l'empreinte d'une partie de la protéine d'intérêt. L'application finale visée est la préparation d'un matériau capable de reconnaître la Mésothéline (MSLN).

Ces travaux ont été menés dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Yoann Ladner et le Pr. Catherine Perrin de l'équipe F12 de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron, le Pr. Ahmad Medhi de l'Institut Charles Gerhart de Montpellier, le Pr. Pascal Etienne du Laboratoire Charles Coulomb de Montpellier et le Dr. Martine Pugnière et le Dr. Pierre Martineau de l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier. La fonctionnalisation des capillaires a été réalisée par le Dr. Jérémie Gouyon et le Dr. Yoann Ladner, la synthèse des nanoparticules par le Dr. Raquel Gutiérrez-Climente et l'évaluation des MIP par le Dr. Giang Ngo.

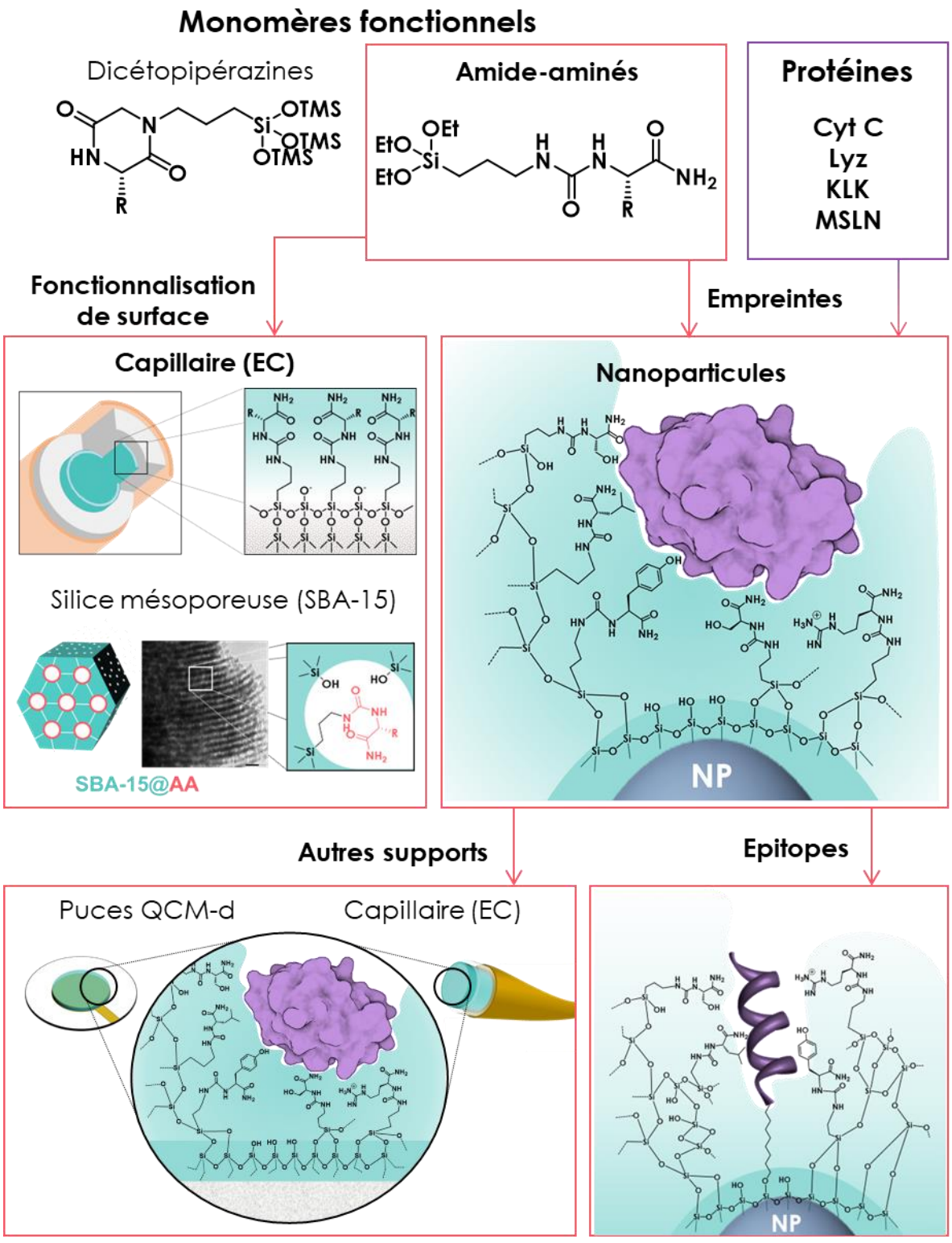


Figure 62 - Stratégie Générale pour l'obtention d'empreintes de protéines

2 Conception et synthèse des monomères fonctionnels

Les monomères fonctionnels permettent d'établir des interactions spécifiques entre la protéine cible et le matériau. Ces molécules doivent donc présenter une fonction polymérisable par procédé sol-gel, un alcoxysilane, et un groupement fonctionnel qui va interagir avec la protéine. Au contraire des MIP développés jusqu'à présent, une approche biomimétique a été développée et ce sont des chaînes latérales d'acide aminés qui assureront ces interactions spécifiques.

2.1 Le choix des acides aminés

Comme dit précédemment, peu d'alcoxysilanes commerciaux présentent des fonctions chimiques capables d'interagir avec des protéines, en particulier en mimant les interactions protéine-protéine. Afin de mimer et récapituler la diversité des interactions protéine/protéine possibles, cinq acides aminés ont été sélectionnés. La tyrosine et la sérine, les acides aminés les plus impliqués dans les interactions paratopiques[162], vont générer des liaisons Hydrogène ainsi que du π-stacking. La leucine permet de créer des interactions lipophiles, tandis que l'arginine et l'acide glutamique sont responsables des interactions ioniques (Figure 63).

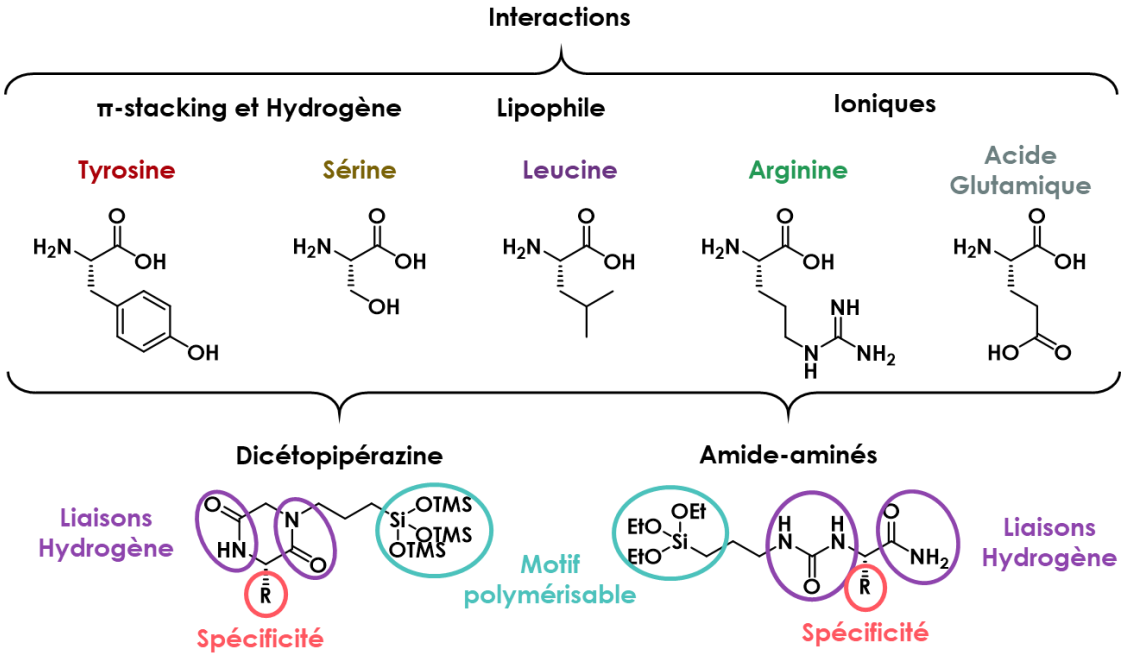


Figure 63 - Acides aminés choisis et structures des monomères fonctionnels

2.2 Les dicétopipérazines

Les dicétopipérazines, grâce à leur squelette peptidique, permettent de générer des interactions grâce la chaîne latérale des acides aminés, mais également grâce aux deux

amides secondaires du cycle qui miment les liaisons peptidiques des protéines. Pour utiliser les dicétopipérazines comme monomères fonctionnels, celles-ci doivent présenter un motif alcoxysilane (Figure 63).

2.2.1 Choix du groupement protecteur de l'alcoxysilane

Les alcoxysilanes les plus utilisés comme précurseurs du procédé sol-gel sont les triméthoxysilanes et les triéthoxysilanes.[163,164] Les protections méthyle et éthyle des silanols sont très fragiles et risquent de s'hydrolyser lors de la synthèse des dicétopipérazines, engendrant la condensation prématurée des monomères fonctionnels. Un groupement plus stable a été sélectionné : le triméthylsiloxy (TMS). De la même façon qu'un alcool protégé par un TMS, le triméthylsiloxysilane (Si-OTMS) pourra être déprotégé en silanol en présence de fluorure.

2.2.2 Synthèse des dicétopipérazines

La formation de dicétopipérazines est une réaction secondaire indésirable intervenant à l'étape de déprotection N-terminale d'un dipeptide protégé sous forme d'ester du coté C-terminal. Elle est très connue en synthèse peptidique sur support solide, favorisée par différents facteurs (Figure 64) dont la présence de glycine et/ou de proline, d'aminoacides N-substitués qui favorisent une conformation *cis* de la liaison amide du dipeptide et permet de positionner l'amine au plus près de l'ester, facilitant la réaction.[165] L'utilisation de la stratégie Fmoc/tBu, libérant l'amine nucléophile, sur une résine de type Wang répond aux conditions réactionnelles nécessaires à l'attaque de l'amine sur l'ester ancrant le premier acide aminé sur la résine.

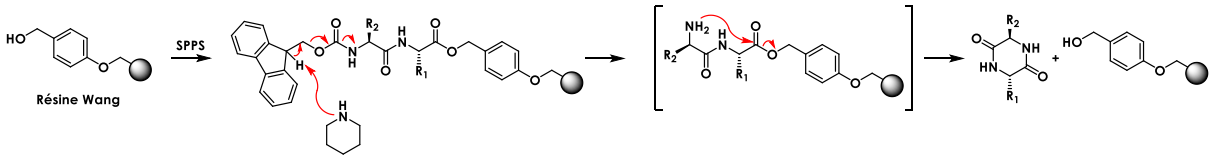


Figure 64 - Mécanisme de formation des dicétopipérazines sur résine Wang lors de la déprotection du second aminoacide, en stratégie Fmoc

Toutes ces conditions, habituellement évitées ou limitées lors de la synthèse de peptides sur support solide, sont utilisées pour obtenir les dicétopipérazines silylées.

Zuckermann a développé une méthode pour obtenir des dérivés peptidiques présentant un enchaînement d'aminoacides N-substitués : les peptoïdes.[166] Cette stratégie permet l'incorporation de glycines N-substituées, favorisant la formation de dicétopipérazine. Pour obtenir ces peptoïdes, le brome de l'acide bromoacétique, préalablement ancré sur la résine ou couplé sur un peptide en élongation, est substitué par une amine primaire. Cette S_N2 permet l'incorporation de la chaîne latérale de l'acide aminé sur l'azote au lieu du carbone α.

Cette méthode a été employée ici pour incorporer le motif alcoxysilane nécessaire pour utiliser les dicétopipérazines comme monomères fonctionnels, tout en intégrant une glycine N-substituée favorisant la formation de la dicétopipérazine. L'acide bromoacétique est ancré sur la résine par une estérification de type Steglich (intermédiaire B1).[167] Le brome est ensuite substitué par l'amine du (3-aminopropyl)tris(triméthylsiloxy)silane (intermédiaire B2). L'aminoacide apportant la chaîne latérale nécessaire aux interactions (Tyr, Ser, Leu, Arg ou Glu) est couplé sur l'amine secondaire précédemment formée (intermédiaires B3 à B7). Enfin, l'amine N terminale est déprotégée, engendrant la cyclisation et la libération de la dicétopipérazine du support (composés B8 à B12). Cette voie de synthèse présente l'avantage d'être divergente, la première étape étant commune à la synthèse des cinq dicétopipérazines (Figure 65).

En utilisant des acides aminés N-Fmoc, l'adduit dibenzofulvène-pipéridine, formé lors de la déprotection de l'amine, serait en mélange avec les dicétopipérazines obtenues. Nous avons donc choisi d'utiliser des aminoacides N-Boc. De cette manière, après la déprotection de l'amine N-Boc en milieu acide, le dipeptide, sous forme d'ammonium, reste ancré sur la résine, ce qui permet d'éliminer les sous-produits de déprotection par lavage. Un traitement de la résine en milieu basique libère alors la dicétopipérazine. Le linker Wang n'étant pas stable en conditions acides, nous avons sélectionné le linker HMBA. En effet, celui-ci étant stable en conditions acides, les acides aminés N-Boc peuvent être déprotégés sans cliver le dipeptide du support. De plus, les effets électroattracteurs de l'amide en para du point d'ancrage permettent de favoriser l'attaque nucléophile de l'amine sur l'ester lors de la formation de la dicétopipérazine.

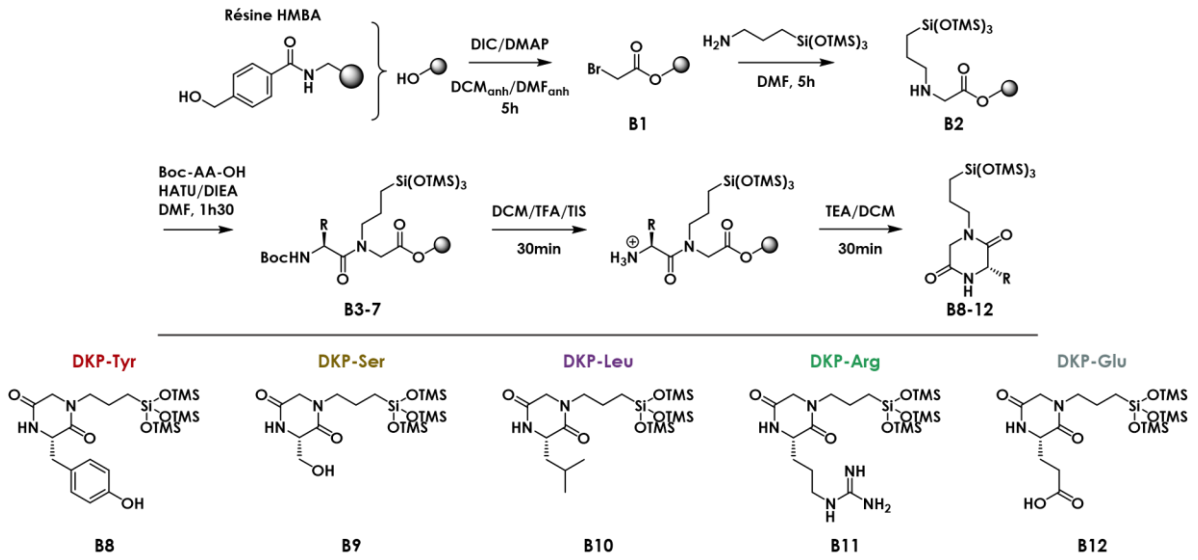


Figure 65 - Voie de synthèse des dicétopipérazines silylées

L'acide bromoacétique est donc ancré sur une résine HMBA-Novagel avec une charge de 0,7 mmol/g. L'acide est préactivé en utilisant le diisopropylcarbodiimide dans du DCM anhydre

sous Argon à 0°C. L'acide préactivé précipitant dans le DCM, du DMF anhydre est ajouté pour solubiliser l'acide activé. Après 10 minutes d'activation, l'acide activé est ajouté sur la résine à température ambiante sous Argon, puis de la diméthylaminopyridine (DMAP) est ajoutée en quantité catalytique pour accélérer la réaction. Après 5h d'activation, la résine est filtrée, lavée et séchée sous vide. Le rendement d'ancrage, et donc la charge effective de la résine, est estimé par le dosage du dibenzofulvène à 301 nm généré à l'issu de la déprotection de l'amine N-Fmoc après substitution du brome par la Fmoc-hydrazine sur quelques milligrammes de résine. En considérant la substitution du brome totale, la charge effective de la résine est d'environ 0,30 mmol/g après ancrage de l'acide bromoacétique (Figure 65 - intermédiaire B1).

L'amine de (3-aminopropyl)tris(triméthylsiloxy)silane est alors engagée dans la substitution nucléophile du brome. Habituellement, cette substitution a lieu en ajoutant un large excès d'amine (40 équivalents) et la réaction a lieu dans du DMSO pendant 2h. Afin d'éviter l'utilisation d'un trop large excès de silane, seuls 10 équivalents sont ajoutés sur la résine et la réaction est laissée sous agitation à température ambiante. De plus, le (3-aminopropyl)-tris(triméthylsiloxy)silane n'étant pas miscible avec le DMSO, la réaction est réalisée dans du DCM. Après 5h de réaction, un microclivage de la résine est réalisée avec une solution de NaOH à 0,1 mol/L dans un mélange dioxane/eau (8/2, v/v) pour vérifier l'absence de l'acide bromoacétique par LC/MS.

La résine peut alors être divisée en 5 lots pour le couplage des Boc-AA-OH sur l'amine secondaire obtenue à l'étape précédente (Figure 65 - intermédiaire B2). Les amines secondaires étant moins réactives que les amines primaires, le couplage est effectué en utilisant 5 équivalents de Boc-AA-OH à 0,5 mol/L dans du DMF, 5 équivalents d'HATU à 0,5 mol/L dans du DMF et 10 équivalents de DIEA pendant 1h30. Après filtration et lavages, un microclivage est également réalisé à cette étape pour vérifier l'absence de l'intermédiaire B2. Les intermédiaires B3 à B7 ont été ainsi obtenus (Figure 65). Les acides aminés utilisés pour ce couplage n'ont pas nécessairement besoin d'être protégés sur leurs chaînes latérales. En effet, seul l'acide glutamique doit nécessairement être protégé pour éviter le couplage de l'acide de sa chaîne latérale. La tyrosine est également utilisée protégée sur sa chaîne latérale.

L'amine N-Boc est ensuite déprotégée par un traitement de la résine au TFA pendant 30 minutes. Du triisopropylsilane est ajouté comme scavenger pour piéger le cation *tert*-butilique. Cette étape permet également de déprotéger les chaînes latérales de la tyrosine (intermédiaire B3) et de l'acide glutamique (intermédiaire B7). Enfin, la dicétopipérazine est formée par un traitement à la triéthylamine dans du DMF pendant 30 minutes. Le filtrat est récupéré, évaporé et la dicétopipérazine obtenue est précipité dans de l'éther diéthylique. La structure des dicétopipérazines obtenues (Figure 65 - composés B8 à B12) est vérifiée par LC/MS.

Tableau 19 - Dicétopipérazines obtenues à partir du composé B2

DKP	m résine (g)	n (mmol)	Boc-AA(P)-OH	Quantité (mg)	Rendement (%)
DKP-Tyr (B8)	1.039	0,31	Boc-Tyr(tBu)-OH	45	26
DKP-Ser (B9)	0,868	0,26	Boc-Ser-OH	30	24
DKP-Leu (B10)	0,876	0,26	Boc-Leu-OH	38	27
DKP-Arg (B11)	0,869	0,26	Boc-Arg-OH	34	26
DKP-Glu (B12)	0,863	0,26	Boc-Glu(tBu)-OH	31	23

Cette voie de synthèse divergente a permis l'obtention des cinq dicétopipérazines envisagées facilement et rapidement.

2.2.3 Stabilité du groupement protecteur de l'alcoxysilane

Toutefois, les analyses LC/MS des cinq dicétopipérazines (produits B8 à B12) révèlent la présence de composés dont le motif tris(triméthylsiloxy)silane a été partiellement hydrolysé. Par exemple, la Figure 66 montre la présence des dicétopipérazines de la tyrosine présentant deux et trois protections triméthylsiloxy respectivement. Cette légère hydrolyse pourrait être liée aux conditions d'analyse LC/MS, c'est pourquoi une analyse RMN ^{1}H a été effectuée pour le composé B8. Comme le montre la Figure 66, la RMN ^{1}H met également en évidence l'hydrolyse partielle du tris(triméthylsiloxy)silane où le singulet correspondant aux neuf méthyles du motif intègre pour 13 protons au lieu des 27 attendus, indiquant un mélange de dicétopipérazines avec un et deux TMS.

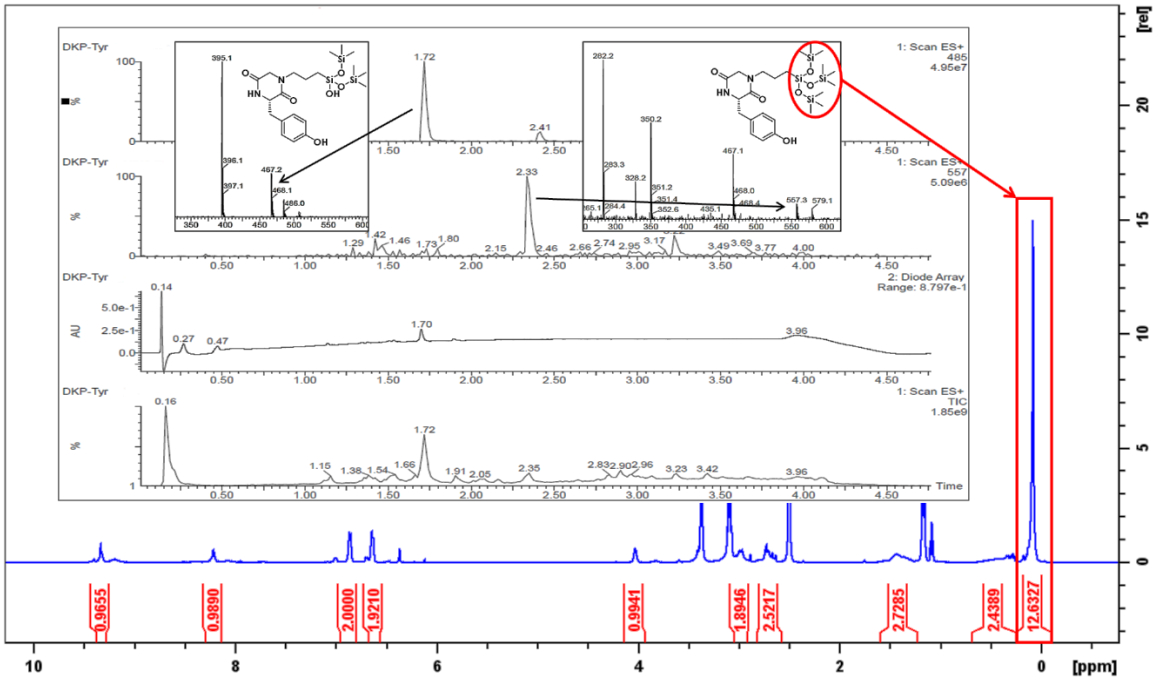


Figure 66 - Analyse LC/MS et RMN ^{1}H de la DKP-Tyr (composé B8)

Une étude de la stabilité de ce groupement a donc été réalisée par RMN ^{1}H afin de déterminer si les éthers de triméthylsilyle peuvent être déprotégés en milieu acide ou supporter une

analyse LC/MS en gradient eau/ACN 0,1%TFA. Le (3-aminopropyl)-tris(triméthylsiloxy)silane a servi de modèle pour ces expériences de cinétiques.

Une première étude a été réalisée dans les conditions d'analyses LC/MS, soit dans un mélange D_2O/CD_3CN 0,1%TFA. L'environnement chimique du silicium exerce une grande influence sur le déplacement chimique des protons en α, β et γ du silicium. En effet, un blindage de ces signaux est observé lors de l'hydrolyse d'un alcoxysilane en silanol. Dans cette étude, deux triplets correspondent aux CH_2 en γ du silicium, significatif de deux environnements chimiques différents autour du silicium. L'intégration de ces deux signaux au cours du temps montre aucune évolution pendant les trois heures de la cinétique, indiquant la stabilité des éthers de triméthylsilyle dans les conditions d'analyses LC/MS. En effet, l'absence d'évolution sur trois heures malgré un début d'hydrolyse semble indiquer que le produit était déjà partiellement hydrolysé avant le début de l'étude (Figure 67 – courbe rouge).

Une seconde étude a été menée dans du TFA-d pour vérifier la stabilité des éthers de triméthylsilyle dans les conditions de déprotection de l'amine N-Boc. La faible résolution des signaux des CH_2 en α, β et γ du silicium ne permet pas, dans ce cas, d'obtenir de bonnes intégrations pour estimer l'état d'hydrolyse du tris(triméthylsiloxy)silane. Dans ce cas, la génération de triméthylsilanol est donc révélatrice de l'hydrolyse. L'intégration des méthyles des triméthylsilyles permet d'estimer la quantité de triméthylsilanol formé, et donc la quantité d'alcoxysilane déprotégé dans ces conditions (Figure 67 – courbe bleue).

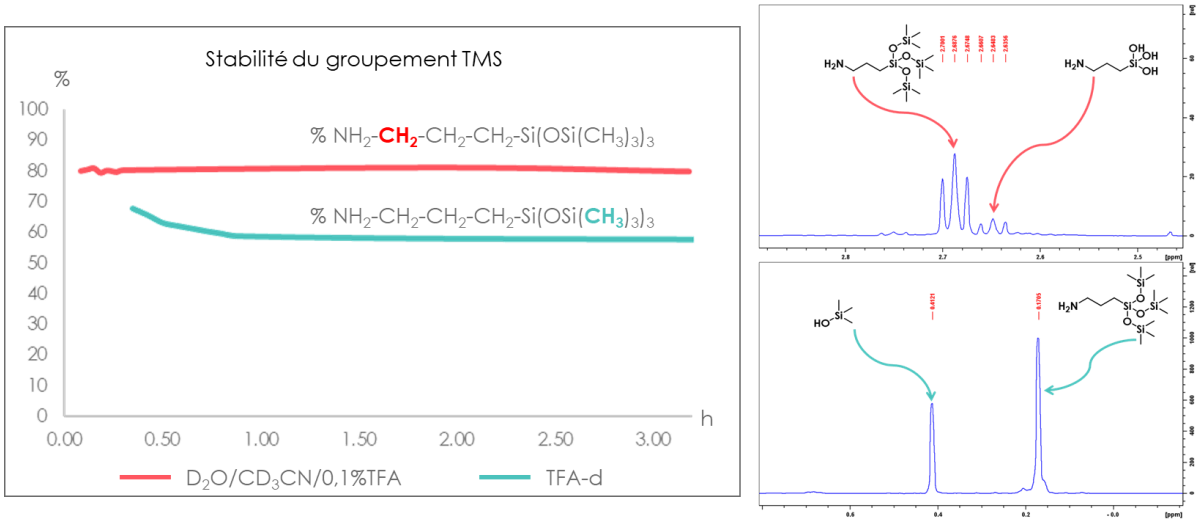


Figure 67 - Etude de la stabilité du groupement TMS dans le D_2O/CD_3CN/0,1%TFA et dans le TFA-d

Dans les conditions d'analyses LC/MS, les CH_2 en γ de l'alcoxysilane représentent 80% des CH_2 en γ de silicium et ce pourcentage reste stable pendant 3 h. Les 20% de CH_2 en γ de silanol sont probablement présents dans le produit avant le début de la cinétique. Ces conditions n'amorcent pas d'hydrolyse supplémentaire (Figure 67 – courbe rouge). Après 30 min dans le TFA, plus que 60% de l'alcoxysilane est protégé par les TMS. Ce pourcentage diminue à 50%

après 1 h et reste stable les 2 h suivantes (Figure 67 – courbe bleue). L'hydrolyse partielle observée par LC/MS est donc due à la déprotection de l'amine N-Boc dans le TFA. Cette hydrolyse partielle ne devrait pas être gênante pour la synthèse d'un matériau si les DKP sont rapidement engagées dans cette synthèse.

2.2.4 Conclusion

Cette stratégie de synthèse divergente a permis l'obtention des cinq dicétopipérazines souhaitées, présentant à la fois une chaîne latérale d'aminoacides capables de créer des interactions avec la protéine cible, et le motif tris(triméthylsiloxy)silane permet d'intégrer ces dicétopipérazines dans un matériau par procédé sol-gel. De plus, les aminoacides N-Boc utilisés dans cette voie de synthèse n'ont pas forcément besoin d'être protégés sur la chaîne latérale. Seul l'acide glutamique doit être protégé pour éviter la formation de sous-produits liés au couplage de l'acide de la chaîne latérale.

Les rendements globaux (entre 23 et 27%, Tableau 19) et la faible charge de la résine après l'ancrage de l'acide bromoacétique (0,30 mmol/g) ne permettent pas d'obtenir suffisamment de produits pour les utiliser comme monomères fonctionnels. Des optimisations seraient nécessaires pour la montée en échelle.

Des dérivés d'acides aminés silylés linéaires ont donc été synthétisés pour remplacer les dicétopipérazines comme monomères fonctionnels.

2.3 Les dérivés acides aminés silylés

Un aminoacide, dans un contexte protéique, ne présente aucune charge à ses extrémités N et C terminales. Pour mimer au mieux les interactions entre la surface de deux protéines, nous avons choisi de concevoir des dérivés d'acides aminés silylés ne présentant aucune charge à leurs extrémités N et C terminales, limitant ce rôle aux différentes chaînes latérales. Ainsi, l'acide carboxylique a été remplacé par un amide primaire, et la fonction amine a été engagée dans une liaison urée formée à la suite de la réaction avec le 3-isocyanatopropyl-triéthoxysilane (ICPTES) (Figure 68). Nous avons émis l'hypothèse que ces deux fonctions, pouvant être donneurs et accepteurs de liaisons Hydrogène, pourraient imiter les liaisons peptidiques présentes dans les protéines (Figure 63).

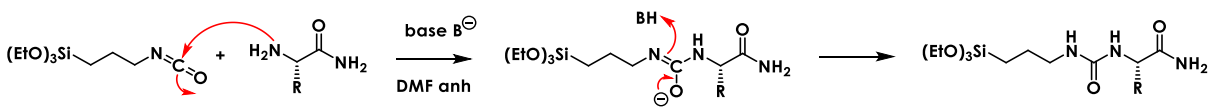


Figure 68 - Silylation des amides aminés avec l'ICPTES

Les amides aminés silylés (Si-AA-NH_2) ont été préparés à partir des amides aminés commerciaux correspondants (H-AA-NH_2) dans du DMF anhydre et en milieu basique (Figure 68). Le milieu anhydre est nécessaire pour éviter la conversion de l'isocyanate en amine primaire, mais également l'hydrolyse prématurée du triéthoxysilane. De plus, les chaînes latérales des H-AA-NH_2 étant déprotégées, nous avons utilisé un défaut d'ICPTES (0,95 équivalent) pour obtenir une réaction chimiosélective de l'amine primaire et éviter les réactions indésirables potentielles avec les chaînes latérales nucléophiles. En effet, le phénol de la tyrosine et l'alcool primaire de la sérine pourraient former un carbamate en réagissant sur l'ICPTES. Enfin, les H-AA-NH_2 étant la plupart du temps sous forme de sel de chlorhydrate, le milieu basique est nécessaire pour régénérer la nucléophilie de l'amine. Cependant, un excès de base pourrait rendre certaines chaînes latérales plus nucléophiles que l'amine N terminale, comme le phénol de la tyrosine qui, une fois déprotoné, devient un suffisamment bon nucléophile pour réagir préférentiellement vis-à-vis de l'amine.

La fragilité du motif triéthoxysilane rendant les purifications extrêmement délicates, les conditions de synthèse de chaque dérivé d'aminoacide silylé ont été optimisées pour obtenir le produit le plus pur possible.

2.3.1 Conditions a : la DIEA comme base

Dans un premier temps, 3 équivalents de N,N-diisopropyléthylamine (DIEA, base organique non nucléophile) ont été utilisés pour s'assurer de la déprotonation de l'amine. Après réaction avec l'ICPTES (entre 4 et 24h en fonction des H-AA-NH_2), le DMF est évaporé et le produit est précipité dans de l'éther diéthylique afin d'éliminer la DIEA restante et les traces de DMF. Le produit final est ensuite séché sous vide (Figure 69).

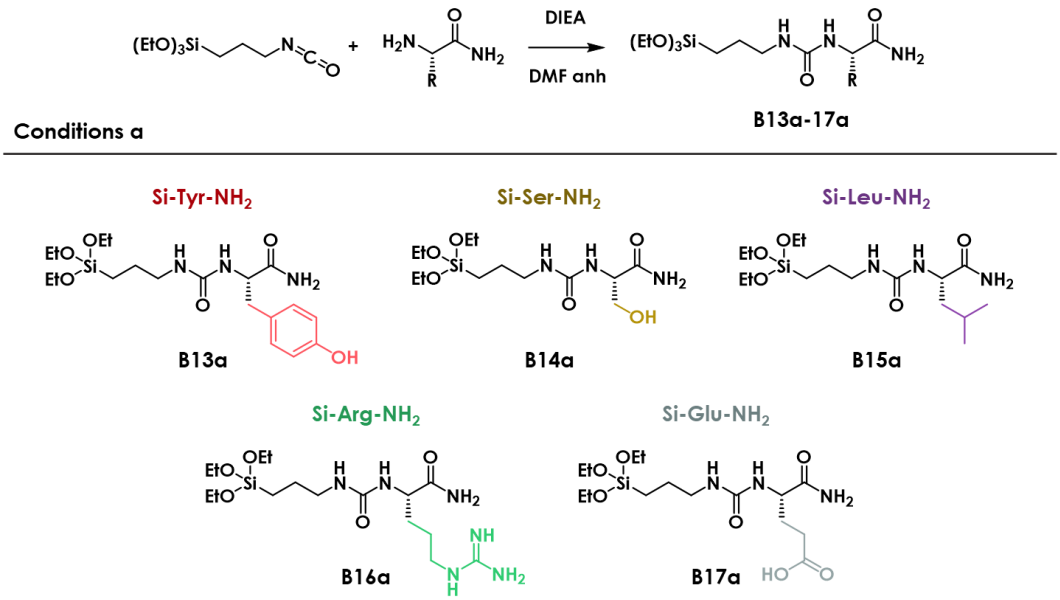


Figure 69 - Synthèse des Si-AA-NH_2 avec l'ICPTES et la DIEA comme base (conditions a)

La Si-Tyr-NH_2 (B13a) est facilement obtenue après 4h de réaction et le produit précipite sous forme de poudre blanche dans l'éther diéthylique avec un rendement de 80% (Tableau 20). Les composés B14a-16a sont obtenus après 16 à 24h de réaction. Contrairement à la Si-Tyr-NH_2, ces composés précipitent sous forme de gel, piégeant la DIEA. La quantité de DIEA résiduelle a été déterminée par RMN ^1H (Figure 70) et représente en moyenne 25% molaire pour la Si-Ser-NH_2 (B14a) et jusqu'à 50 à 60% molaire pour Si-Leu-NH_2 (B15a) et Si-Arg-NH_2 (B16a), respectivement. Il convient de noter que la Si-Glu-NH_2 (composé B17a) n'a pas pu être obtenue par cette approche car l'isoglutamine de départ n'est pas soluble dans les solvants organiques.

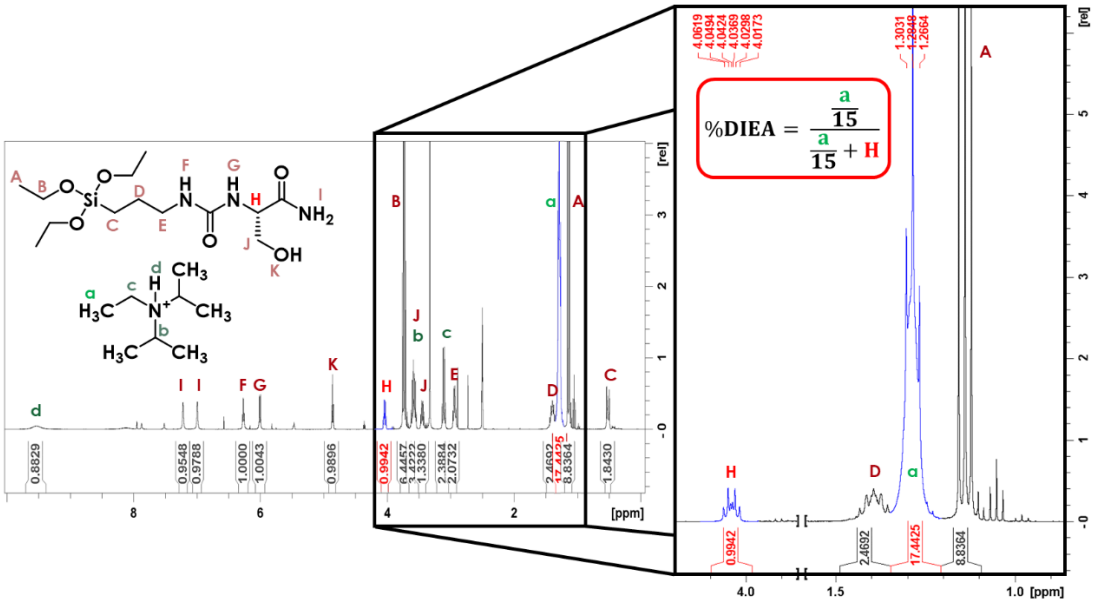


Figure 70 - Calcul du pourcentage de la DIEA par RMN ^1H (500 MHz, 25°C)
Exemple de la Si-Ser-NH_2. Le pourcentage de la DIEA a été déterminé en utilisant les signaux des CH_3 de la DIEA (1,26-1,31 ppm) et le CHα du Si-AA-NH_2 (4,01-4,26 ppm selon le Si-AA-NH_2).

2.3.2 Conditions b : le $NaHCO_3$ comme base pour Ser, Arg et Leu

La DIEA, restant piégée dans les produits B14a-16a après plusieurs lavages à l'éther diéthylique, est remplacée par une base minérale, le bicarbonate de sodium, insoluble dans le DMF (Figure 71). Le $NaHCO_3$ étant une base minérale faible et non soluble dans le milieu réactionnel, la cinétique de la déprotonation de l'amine est plus lente qu'avec la DIEA. Pour s'assurer d'une conversion totale, la réaction est effectuée pendant 48h. Le bicarbonate est ensuite retiré du milieu réactionnel par filtration, le DMF est évaporé et les Si-AA-NH_2 sont récupérés sous forme de poudre blanche après précipitation avec des rendements de 73 à 85% (Tableau 20).

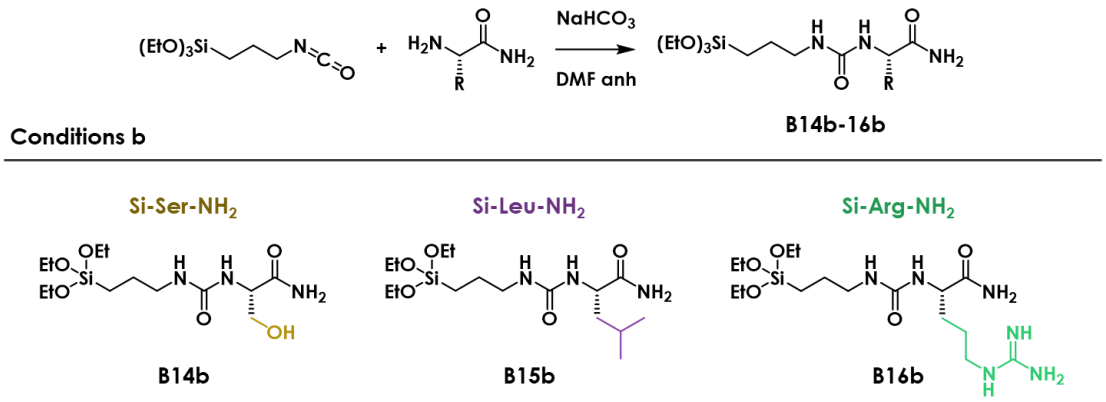


Figure 71 - Synthèse des Si-AA-NH_2 avec l'ICPTES et le $NaHCO_3$ comme base (conditions b)

Les composés B14b et B16b sont précipités dans l'éther diéthylique et lavés plusieurs fois à l'éther diéthylique pour éliminer les traces de DMF. Le composé B15b étant partiellement soluble dans l'éther diéthylique, la précipitation et les lavages ont été réalisés dans de l'éther de pétrole. Un dernier lavage à l'éther diéthylique est effectué avant de sécher le produit sous vide. La pureté des produits est vérifiée par RMN ^1H, où aucune trace de contaminant n'est détectable (Figure 72).

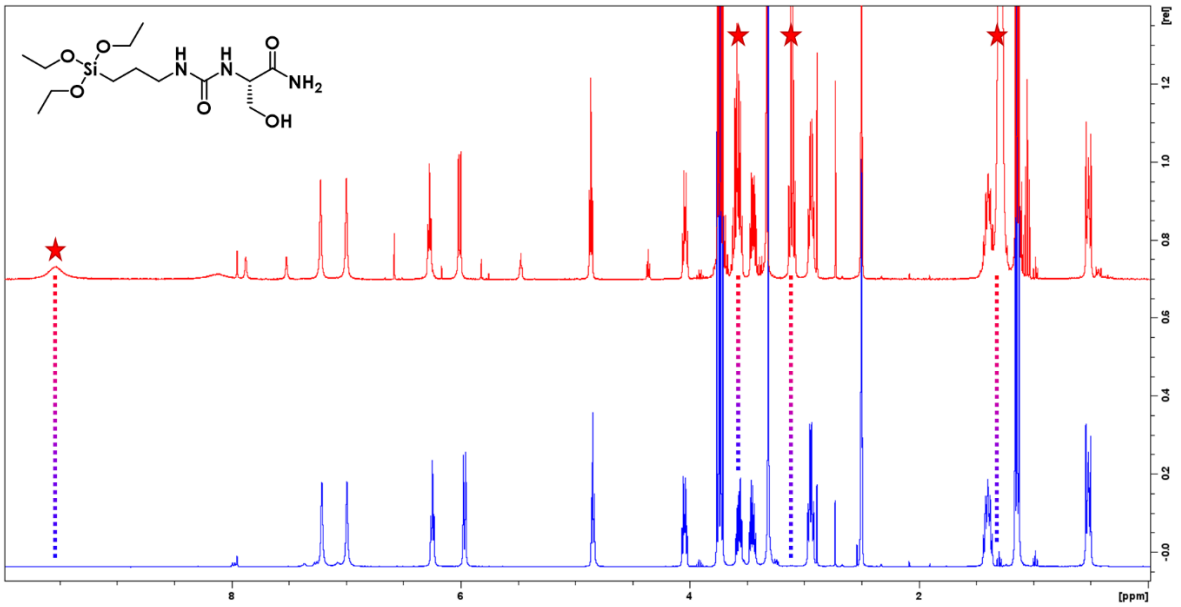


Figure 72 - Comparaison des spectres RMN ^1H de la Si-Ser-NH_2 synthétisée avec de la DIEA (rouge) ou du $NaHCO_3$ (bleu)
Les signaux marqués d'une étoile correspondent aux signaux de la DIEA.

2.3.3 Conditions c : le cas de l'acide glutamique

N'étant pas soluble dans les solvants organiques, l'isoglutamine n'a pas pu être silylée en utilisant les conditions précédentes, malgré de nombreux essais dans différents solvants anhydres en milieu hétérogène. Il était donc nécessaire d'utiliser un réactif de silylation sur mesure, pouvant réagir en milieu aqueux basique sans risquer l'hydrolyse de l'alcoxysilane (Figure 73). L'imidazolecarboxamide B18 a été préparé à partir du (3-aminopropyl)-

tris(triméthylsiloxy)silane et de carbonyldiimidazole (CDI) dans du DCM anhydre en présence de DIEA. Une fois la réaction terminée, le solvant est évaporé. Le produit est précipité dans de l'eau, puis la poudre obtenue a été lyophilisée afin d'éliminer les traces d'eau. Ce nouveau réactif de silylation, insoluble dans l'eau mais soluble dans un mélange eau/acétonitrile (35/65, v/v) a pu être utilisé pour silyler l'isoglutamine, en présence de DIEA, pour donner la Si-Glu-NH_2 B19.

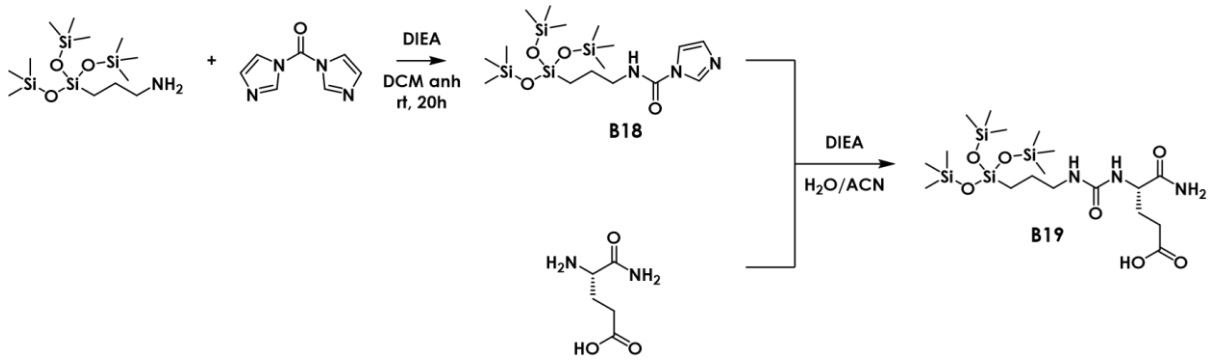


Figure 73 - Silylation de l'isoglutamine avec le N-[3-tris(triméthylsiloxy)silylpropyl]-imidazole-1-carboxamide

En revanche, ce composé B19 présente un inconvénient pour la synthèse des MIP. En effet, l'hydrolyse des groupements triméthylsiloxy génère du triméthylsilanol qui peut se condenser en même temps que les Si-AA-NH_2 dans le réseau du matériau de l'empreinte, de façon non contrôlée. Pour éviter la présence de triméthylsilanol, il était nécessaire d'obtenir le Si-Glu-NH_2 sous la même forme que les autres Si-AA-NH_2.

Nous avons émis l'hypothèse que l'insolubilité de l'isoglutamine en milieu organique était liée à sa forme zwitterionique et aux charges qui en résultent. L'ajout d'un contre-ion TFA pourrait donc augmenter sa solubilité en milieu organique. L'isoglutamine a été solubilisée dans du TFA et après évaporation du TFA et précipitation dans l'éther diéthylique, la H-Glu-NH_2.TFA est séchée sous vide. Sous cette forme, l'isoglutamine s'est avérée soluble dans le DMF anhydre et a pu être silylée avec l'ICPTES.

De la DIEA est ajoutée jusqu'à l'obtention d'un pH basique afin de rendre sa nucléophilie à l'amine, entraînant la précipitation de l'isoglutamine par la déprotonation de l'acide carboxylique. Après l'ajout de l'ICPTES, le mélange hétérogène se solubilise petit à petit, ce qui est révélateur de la silylation de l'isoglutamine (Figure 74). Après 2h d'agitation, le DMF est évaporé et le Si-Glu-NH_2 est précipité dans l'éther diéthylique avant d'être séché sous vide. Le Si-Glu-NH_2 (B17c) a été obtenu avec un rendement de 82% (Tableau 20) et a été caractérisé par RMN ^1H.

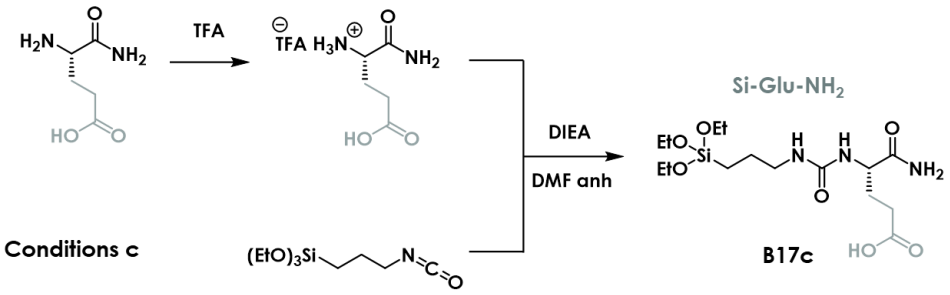


Figure 74 - Synthèse Si-Glu-NH_2 avec l'ICPTES et le TFA comme contre-ion (conditions c)

2.3.4 Vérification de l'état d'hydrolyse des Si-AA-NH_2

Etant donné la fragilité de la protection éthoxy des silanols, il est nécessaire de vérifier l'état d'hydrolyse des précurseurs avant de les engager dans la synthèse de MIP. Certains signaux en RMN ^1H permettent de vérifier cet état. Lors de l'hydrolyse, de l'éthanol est libéré. La présence d'éthanol peut témoigner d'une hydrolyse prématurée du monomère. De plus, l'environnement chimique du silicium exerçant une grande influence sur le déplacement chimique des protons voisins, il est possible de déterminer si le silicium est sous forme silanol ou triéthoxysilane. Ainsi, le CH_2 en α du silicium sera plus blindé pour un silanol que pour un triéthoxysilane. La Figure 75 illustre bien la formation d'éthanol grâce au triplet à 1,09 ppm (déplacement caractéristique du CH_3 de l'éthanol dans le DMSO-d6[168]), ainsi que l'apparition du CH_2 en α du silanol, plus blindé que le CH_2 en α du triéthoxysilane.

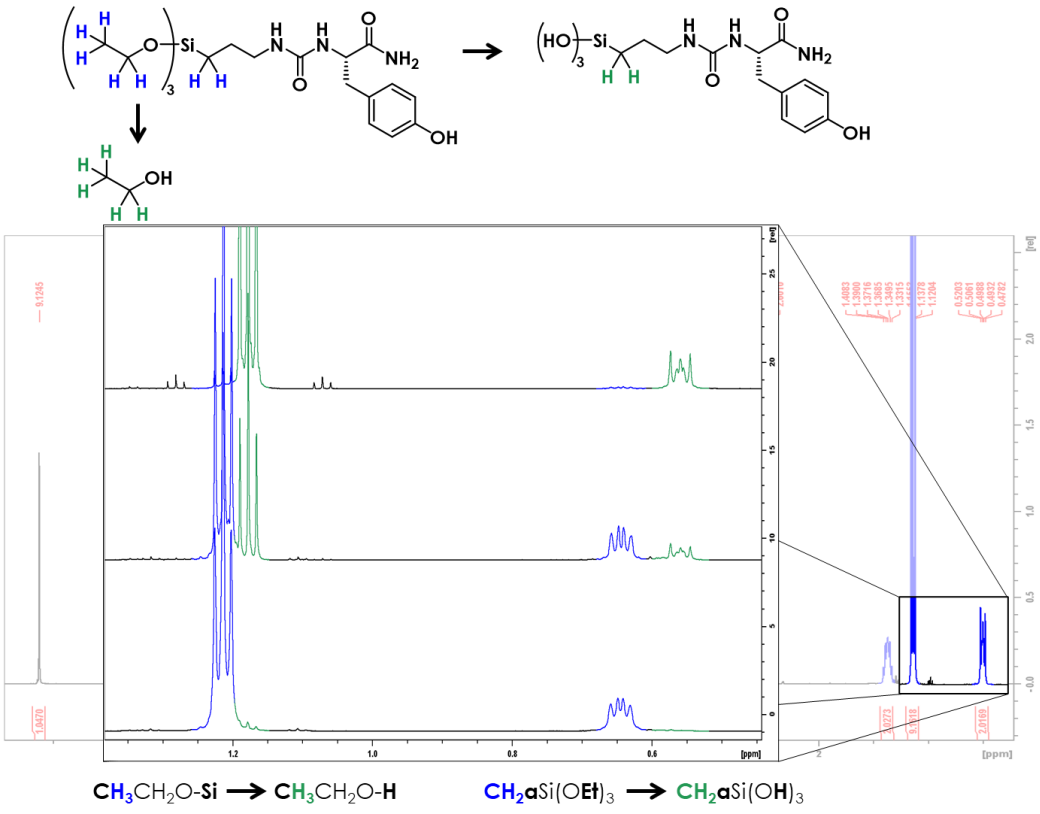


Figure 75 - Vérification de l'état d'hydrolyse des Si-AA-NH_2. Exemple sur le composé B13a

Des analyses RMN ^{1}H ont été effectuées dans du DMSO-d6 pour les cinq Si-AA-NH_2 synthétisés avec l'ICPTES (B13a ; B14b ; B15b ; B16b ; B17c). En plus de ces marqueurs d'hydrolyse, les valeurs d'intégration des signaux correspondant aux éthoxy ont été relevés. En effet, l'hydrolyse pourrait avoir lieu pendant la synthèse et l'éthanol formé pourrait être éliminé au cours des différents traitements sans que l'on ne puisse le détecter par RMN. Le rapport entre le CHα du motif acide aminé et des CH_2 et CH_3 de l'éthoxy doit être de 1/6/9 pour un précurseur non hydrolysé, ce qui correspond à trois éthoxy pour un acide aminé. Les composés B13a, B14b, B15b et B16b répondent à cette condition. Ils sont suffisamment stables pour être stockés quelques semaines sous argon avant le début de l'hydrolyse. Le composé B17c, quant à lui, présente un rapport CHα/CH_2/CH_3 de 1/4/6, soit deux éthoxy pour un acide aminé, révélateur d'un début d'hydrolyse (Figure 76). Ce composé n'est pas stable et doit être préparé quelques jours avant son utilisation. Etant donné l'absence d'éthanol sur le spectre RMN ^{1}H, l'hydrolyse a probablement lieu pendant la synthèse et est liée à l'hygroscopie de l'isoglutamine.

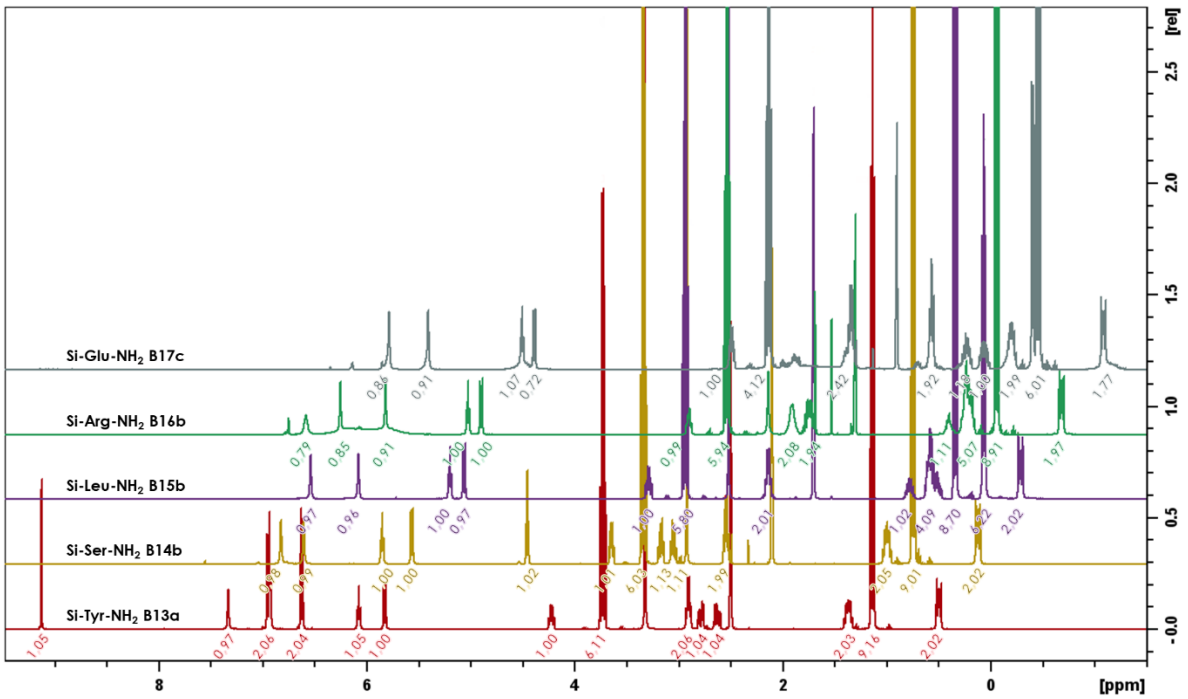


Figure 76 - Spectres RMN ^{1}H des Si-AA-NH_2

2.4 Conclusion

Une voie de synthèse pour le développement de dicétopipérazines silylées a été développée sur support solide. Cette voie de synthèse nécessiterait des optimisations pour obtenir les DKP en quantité suffisante pour envisager leur utilisation comme monomères fonctionnels pour les empreintes moléculaires. Pour cette raison, des dérivés d'acides aminés silylés ont été préparés. La voie de synthèse a été optimisée pour chaque acide aminé (Tableau 20) et tous les Si-AA-NH_2 ont été obtenus avec de bons rendements et une bonne reproductibilité, ce qui

permet leur utilisation comme monomères fonctionnels. Enfin, un nouveau réactif de silylation a été développé et permet la silylation dans en milieu aqueux.

Tableau 20 - Résumé des conditions de synthèse des dérivés d'acides aminés silylés avec l'ICPTES

Si-AA-NH_2	**Sel**	**H-AA-NH_2 (mg)**	**DMF (mL)**	**DIEA (mL)**	**$NaHCO_3$ (mg)**	**ICPTES (mL)**	**Durée (h)**	**Rendement (%)**	**Précipitation**
Si-Tyr-NH_2	-	360	6,2	0,784	-	0,495	4	80	Et_2O
Si-Ser-NH_2	Cl	281	6,2	-	504	0,495	48	73	Et_2O
Si-Leu-NH_2	Cl	333	6,2	-	504	0,495	48	73	Ether de pétrole
Si-Arg-NH_2	Cl	492	6,2	-	1000	0,495	48	85	Et_2O
Si-Glu-NH_2	TFA	146	7	0,523	-	0,248	2	82	Et_2O

3 Fonctionnalisation des capillaires d'électrophorèse capillaire avec les Si-AA-NH_2

Les Si-AA-NH_2 obtenus précédemment ont été synthétisés pour servir de monomères fonctionnels dans la synthèse d'empreintes moléculaires. Les monomères fonctionnels permettent d'établir les interactions avec la cible, ils apportent donc des fonctionnalités chimiques qui pourraient également servir à moduler les propriétés physico-chimiques de matériaux. Dans cette optique, les Si-AA-NH_2 ont été utilisés pour fonctionnaliser la surface des capillaires d'électrophorèse capillaire (EC), afin d'en moduler les propriétés.

3.1 Introduction à l'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique de séparation analytique. Quelques nanolitres de l'échantillon sont injectés dans le capillaire rempli d'un électrolyte de fond (BGE : *background electrolyte*), puis un champ électrique est appliqué, permettant aux molécules de migrer dans le capillaire, souvent en silice fondue, entre le flacon « source » et le flacon « destination ». Les analytes sont ensuite détectés et la séparation est visualisée sous la forme d'un électrophérogramme (Figure 77).[169]

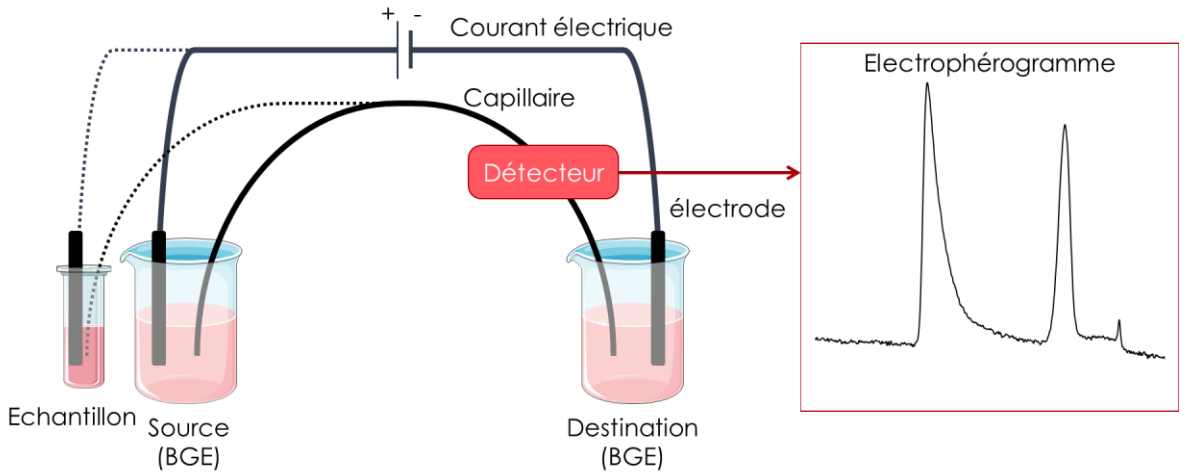


Figure 77 - Principe de l'électrophorèse capillaire

La migration dépend de la mobilité électroosmotique (μ_{eof}) et de la mobilité électrophorétique (μ_{ep}). La mobilité électroosmotique est liée à l'état de charge du capillaire. Elle dépend donc de la surface du capillaire, du pH et du BGE. La mobilité électrophorétique, quant à elle, est propre à chaque analyte. Par exemple, un analyte chargé positivement sera attiré vers la cathode (-), tandis qu'un analyte chargé positivement dans les mêmes conditions sera attiré vers l'anode (+), selon leurs mobilités électrophorétiques. Pour des pH supérieurs à 4, le capillaire en silice fondue sera chargé négativement (pKa silanol ≈ 3-4) et présentera une

couche de contre-ions (chargés positivement) provenant du BGE. Le flux électroosmotique sera donc dirigé vers la cathode (-). La mobilité apparente (μ_{app}) de chaque analyte correspond à la somme des mobilités électrophorétique et électroosmotique (Figure 78).

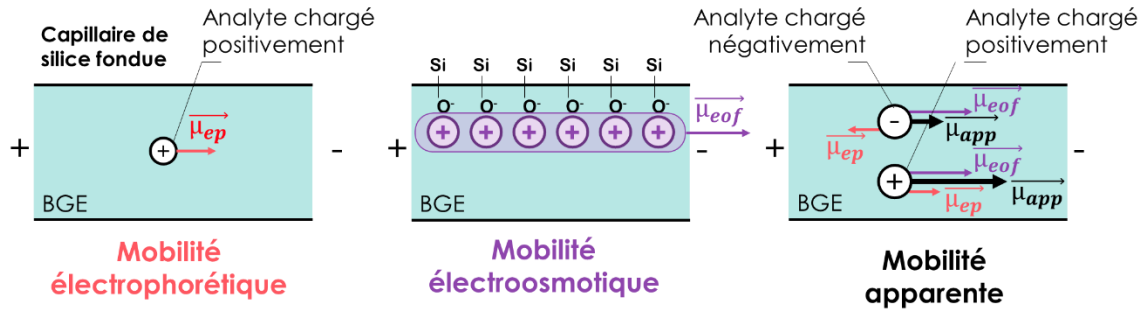


Figure 78 - Mobilités électrophorétique, électroosmotique et apparente

L'injection de l'échantillon peut se faire de deux façons différentes. L'injection hydrodynamique se fait en appliquant une surpression dans le flacon source (ou le vide dans le flacon destination) pour introduire l'échantillon dans le capillaire. L'injection électrocinétique se fait en appliquant une tension aux bornes du capillaire, permettant à l'échantillon de pénétrer dans le capillaire par électroosmose.

Les protéines, solubles dans un milieu aqueux tamponné et présentant des charges à leur surface, peuvent être analysées par électrophorèse capillaire. L'analyse de protéines par électrophorèse capillaire présente un défi majeur : l'adsorption des protéines à la surface du capillaire. En effet, les protéines peuvent interagir avec les silanolates du capillaire, par interactions électrostatiques, liaisons Hydrogène ou encore interactions hydrophobes. Leur adsorption peut entraîner un élargissement, une déformation, ou encore une disparition du pic correspondant. L'adsorption peut également entraîner une modification du flux électroosmotique.[170] Pour limiter l'adsorption des protéines, la surface du capillaire peut être modifiée.[171]

Des dérivés d'acides aminés silylés peuvent être greffés à la surface de matériaux innovants pour en moduler les propriétés (conductivité électrique[127], chiralité[172], sensibilité de la réponse au pH[130], ...). En fonctionnalisant les capillaires avec les Si-AA-NH_2, qui récapitulent les interactions protéine-protéine, le flux électroosmotique pourrait être modulé. De plus, greffer un mélange des dérivés d'acides aminés silylés permettraient de combiner leurs différents effets, pour ajuster le potentiel zêta de la surface par exemple, et générer ainsi des surfaces à façon en fonction des besoins.

Le greffage des Si-AA-NH_2 pourrait également modifier les interactions entre le capillaire et les protéines, en limitant les interactions électrostatiques dues au silanol ou en générant de

nouvelles interactions, ce qui peut être intéressant pour le développement de futurs matériaux biomimétiques.

3.2 Greffage des Si-AA-NH_2 dans les capillaires

Le capillaire en silice fondue présente les fonctions Si-OH de façon irrégulière à sa surface (Figure 79A). Avant de greffer les Si-AA-NH_2 à sa surface, une étape de silanisation est réalisée au préalable, permettant d'obtenir une surface où les fonctions Si-OH sont présentées de façon homogène (Figure 79B). Après différents lavages du capillaire (soude, acide chlorhydrique, eau distillée), la silanisation est réalisée par injection d'une solution de tétraéthyle orthosilicate hydrolysé en conditions acides dans le capillaire. Ces conditions, défavorables pour la condensation, permettent de créer une couche fine et régulière de silice à l'intérieur du capillaire, sans en modifier son diamètre interne.

Pour pouvoir appliquer le protocole de greffage des Si-AA-NH_2 à de futures applications, celui-ci a été effectué dans des conditions biocompatibles dans un tampon phosphate (100 mmol/L, pH 7). L'hydrolyse et la condensation étant défavorisées à pH 7, l'ajout d'un catalyseur nucléophile (NH_4F, Figure 79C) est nécessaire pour que le sol-gel ait lieu. La solution de greffage du Si-AA-NH_2 est donc préparée dans du tampon phosphate (267 µL, 100 mmol/L, pH 7) en ajoutant le NH_4F comme catalyseur. L'ajout de méthanol (60 µL) est nécessaire à la solubilisation totale du monomère fonctionnel. Malgré l'ajout du catalyseur, l'hydrolyse est lente à pH neutre. L'injection de la solution de greffage dans le capillaire est suivie d'un temps de repos de 18h, où les deux extrémités du capillaires sont immergées dans la solution de greffage, pour permettre à la condensation d'avoir lieu (Figure 79 C).

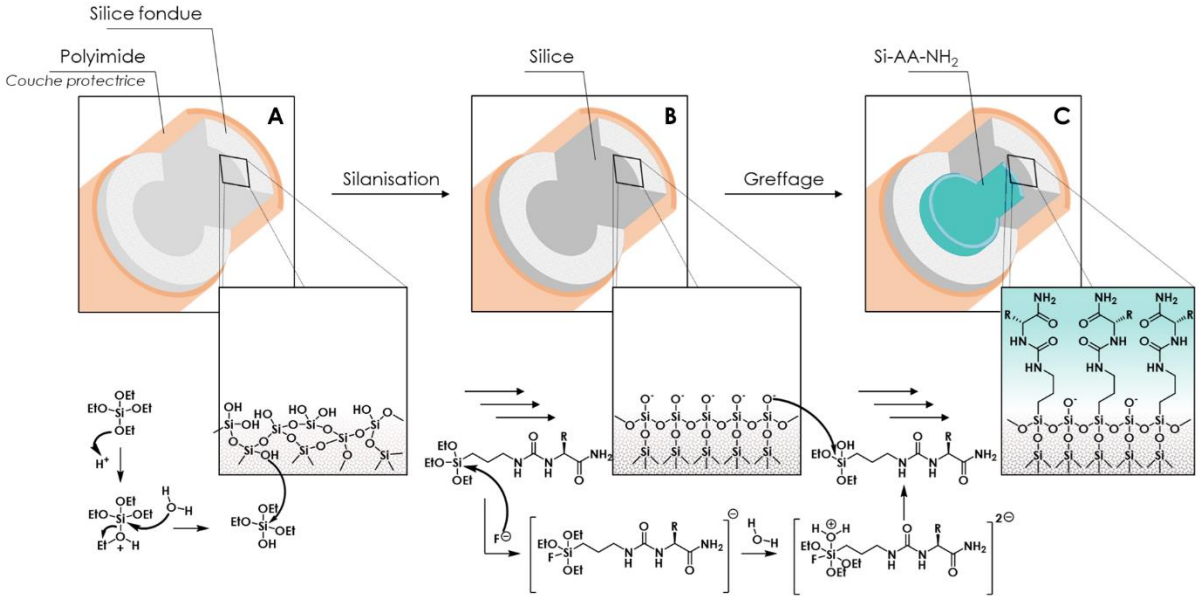


Figure 79 - Fonctionnalisation des capillaires

3.3 Détermination du flux électroosmotique

Le flux électroosmotique étant dépendant de la surface du capillaire et de la composition du BGE (pH, force ionique), l'EOF a été déterminé à pH 2 et à pH 7. Le DMF, détectable à 214 nm, a été choisi comme marqueur pour déterminer le flux électroosmotique ($cm^2/V.s$) de chaque capillaire, selon la formule suivante :

$$\mu_{EOF} = \frac{L_{det}.L_{tot}}{U.t_m}$$

Équation 7 - Détermination du flux électroosmotique
Avec L_{det} la longueur de détection (cm) ; L_{tot} la longueur du capillaire (cm) ; U la tension appliquée (V) et t_m le temps de migration du DMF (s).

Deux contrôles ont été réalisés, le premier sur un capillaire de silice fondue et le second sur un capillaire non fonctionnalisé mais ayant subi les mêmes étapes que les capillaires fonctionnalisés.

Les mesures des flux électroosmotiques, à pH 2 et pH 7, ont été réalisées juste après la fonctionnalisation (t 0) et après une période de stockage d'une semaine dans le BGE pH 7, pour se rapprocher des conditions physiologiques (t 7j).

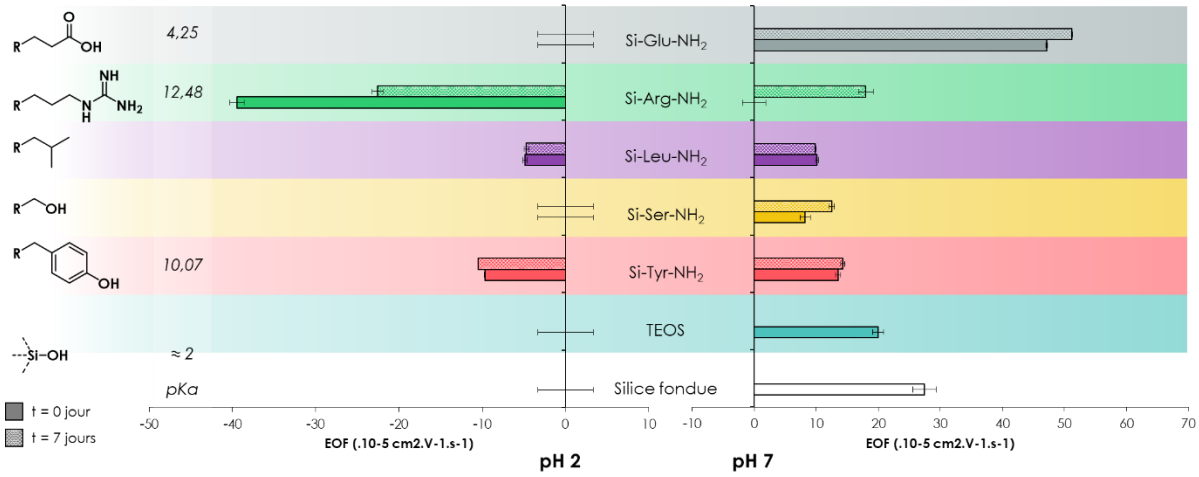


Figure 80 - Variation du flux électroosmotique à pH2 et pH7 et à t0 et t7j en fonction du Si-AA-NH_2 greffé

Les mesures contrôles effectuées sur le capillaire de silice fondue sont en accord avec les mesures habituelles. A pH 7, l'EOF est fortement positif ($+27,42 \pm 1,87.10^5$ $cm^2/V.s$) . Le pKa d'un silanol étant autour de 3, la silice présente des silanolates à pH 7, conduisant à une surface chargée négativement. A pH 2, la silice étant protonée, la surface du capillaire est globalement neutre, expliquant l'EOF presque nul. Lorsque du TEOS est déposé sur le capillaire, l'EOF à pH 7 diminue ($+19,96 \pm 0,85 .10^5$ $cm^2/V.s$), la surface est toujours chargée négativement mais moins que celle en silice fondue. La condensation du TEOS, conduisant à la formation de

liaisons Si-O-Si, entraîne une diminution des silanols libres à la surface du capillaire, et donc une diminution de la charge.

La même observation peut être faite pour les capillaires modifiés par Si-Tyr-NH_2, Si-Ser-NH_2 et Si-Leu-NH_2. Ils présentent tous un EOF positif à pH 7 (+13,52 ± 0,42 ; +8,23 ± 0,81 et +10,14 ± 0,25 .10^5 cm^2/V.s respectivement) et un EOF neutre ou négatif à pH 2 (-9,69 ± 0,06 ; 0 et -4,86 ± 0,27 .10^5 cm^2/V.s respectivement). Comme ces trois dérivés d'acides aminés ne présentent aucune charge, la diminution de l'EOF indiquent que les Si-AA-NH_2 sont bien greffés et qu'il subsiste des silanols résiduels à la surface des capillaires. A t 7j, seul le capillaire Ser semble évoluer à pH 7 (EOF = +12,48 ± 0,50 .10^5 cm^2/V.s). Cette variation peut être due à une solvatation de la surface après l'exposition au tampon. Les capillaires Tyr et Leu semblent stables dans le temps.

Après greffage de la Si-Arg-NH_2, la surface du capillaire est censée être chargée positivement grâce au groupement guanidinium. A pH 2, l'EOF fortement négatif (-39,45 ± 0,48 .10^5 cm^2/V.s à t 0) semble confirmer la fonctionnalisation. Cependant, la couche d'arginine ne semble pas stable dans le temps. En effet, après 7 jours, l'EOF passe de -39,45 à -22,53 .10^5 cm^2/V.s à pH2 et de 0 à +17,99 .10^5 cm^2/V.s à pH7. Cette dégradation peut s'expliquer par la formation d'un intermédiaire silylé pentacoordonné par l'attaque nucléophile du doublet non liant de la guanidine de l'arginine.[161]

Le capillaire modifié avec la Si-Glu-NH_2 montre une surface globalement neutre à pH 2, t 0 et t 7j, avec un EOF variant de -3,33 à +3,33 .10^5 cm^2/V.s. La chaîne latérale de l'acide glutamique étant neutre à pH 2, ce résultat est cohérent, mais n'est pas révélateur de la réussite du greffage. A pH 7, à t 0 et t 7j, le capillaire présente un EOF fortement positif (47,13 ± 0,13 .10^5 cm^2/V.s et 51,24 ± 0,08 .10^5 cm^2/V.s respectivement). La valeur d'EOF a donc doublé par rapport à l'EOF à pH 7 d'un capillaire en silice fondue. Cette augmentation peut être expliquée par la délocalisation des charges négatives des carboxylates à la surface du capillaire, qui sont alors moins disponibles pour retenir la couche de cations. Cette augmentation est donc révélatrice du greffage de la Si-Glu-NH_2. De plus, les valeurs d'EOF ne variant pas entre t 0 et t 7j à pH 2 et pH 7, le greffage de ce précurseur semble stable dans le temps dans ces deux conditions de pH.

La différence de comportement observée pour chaque capillaire fonctionnalisé peut être directement attribuée à la chaîne latérale de l'acide aminé.

3.4 L'adsorption des protéines

Les chaînes latérales des acides aminés apportent de nouvelles propriétés physico-chimiques au capillaire. Des injections de protéines modèles ont été réalisées pour observer l'impact de ces revêtements sur l'adsorption des protéines. L'objectif était d'évaluer les performances des

capillaires disposant d'une surface biomimétique de protéines, couverte d'aminoacides, pour analyser des protéines dans des conditions physiologiques et ainsi éviter toute dénaturation.

Trois protéines modèles ont été choisies. Elles présentent toutes un haut point isoélectrique (Lyz, pI = 11,5 ; RibA, pI = 9,6 ; CytC, pI = 9,6) et sont donc fortement sujettes à l'adsorption. Leur comportement électrophorétique a également été évalué. Les mesures ont été réalisées par électrophorèse capillaire de zone (ECZ). Cette méthode repose sur la migration de l'analyte en fonction de sa mobilité électrophorétique et du flux électroosmotique sous l'effet d'un courant électrique. En d'autres termes, aucune pression n'est appliquée pour cette séparation. Ces mesures ont été réalisées à pH 7, avec le signal de référence (aire du pic) de chaque protéine pour chaque capillaire préalablement enregistré à pH 2, en supposant qu'aucune adsorption ne se produise dans ces conditions.

Tableau 21 - Mobilité électrophorétique (μ_{EP})et taux d'adsorption (Ads) des protéines sur les capillaires fonctionnalisés

Support	Lysozyme			Ribonucléase A			Cytochrome C	
	μ_{EP} pH2	μ_{EP} pH7	Ads	μ_{EP} pH2	μ_{EP} pH7	Ads	μ_{EP} pH2	μ_{EP} pH7
Silice fondue	+30,78 ± 0,64	-	1	+25,69 ± 0,37	-	1	+26,79 ± 0,23	-
Si-Tyr-NH_2	+24,82 ± 2,68	-	1,13	+19,99 ± 4,68	-	1,28	+23,25 ± 1,76	-
Si-Ser-NH_2	+29,42 ± 0,63	+9,60	0,07	+24,56 ± 0,83	+4,74	0,24	+22,16 ± 1,03	+19,56
Si-Leu-NH_2	+28,10 ± 0,63	-	0,70	+24,44 ± 0,68	+9,97	0,58	-	-
Si-Arg-NH_2	+32,45 ± 2,32	+10,92	0,43	+29,38 ± 0,94	+5,82	1,83	+32,26 ± 0,15	+10,16

La mobilité électrophorétique μ_{EP} est exprimée en $.10^{-5}$ $cm^2/V.s$

Les tests d'adsorption sur le capillaire en silice fondue ont permis d'obtenir les valeurs d'EOF contrôles pour chaque protéine à pH 2 et à pH 7. Comme attendu, aucun signal n'a été détecté à pH 7 pour les trois protéines, celles-ci s'étant totalement adsorbées. A pH 2, les valeurs d'EOF de référence ont été mesurées et sont caractéristiques d'une surface chargée fortement négativement. Les taux d'adsorption de Lyz et RibA ont pu être calculés. Le CytC s'adsorbant de façon irréversible, son taux d'adsorption n'a pas pu être déterminé (Tableau 21).

A pH 2, pour tous les revêtements, l'EOF de chaque protéine est similaire et cohérent par rapport à celui mesuré dans le capillaire de silice fondue. En effet, à ce pH, tous les capillaires sont neutres ou chargés positivement, limitant fortement les interactions électrostatiques avec les protéines (Figure 81).

A pH 7, le capillaire Tyr adsorbe également les trois protéines modèles. Cette adsorption est probablement due aux interactions π-stacking générées par le phénol de la tyrosine. Le capillaire Ser, quant à lui, semble limiter l'adsorption des trois protéines modèles. Le groupement hydroxy de la sérine, neutre à pH 7, limiterait l'adsorption non spécifique. Le

capillaire Leu adsorbe Lyz et CytC, mais ne retient pas RibA. Il semblerait que la chaîne isopropyle introduit des interactions hydrophobes. La rétention des protéines pourrait être liée à la présence de groupements hydrophobes à leur surface, interagissant avec les isopropyles du capillaire. Le capillaire Arg ne retient pas RibA et CytC mais semble générer une interaction faible avec Lyz, ce qui se traduit par un pic traînant pendant plusieurs minutes sur l'électrophérogramme. A pH 7, le capillaire Arg étant chargé positivement, on s'attendrait à une absence d'adsorption des protéines, en particulier celles avec un pI élevé. Or, l'adsorption du Lyz semble plutôt signifier un échange dynamique entre la surface du capillaire et la solution d'analyte (Figure 81).

La Si-Glu-NH_2 ayant été obtenue plus tardivement, les mesures des mobilités électrophorétiques et d'adsorption des protéines n'ont pas encore été réalisées sur le capillaire modifié avec la Si-Glu-NH_2. Etant donné les valeurs d'EOF proches d'un capillaire en silice fondue à pH 2 et deux fois plus importantes à pH 7, on s'attend à des résultats similaires à ceux obtenus sur le capillaire en silice fondue.

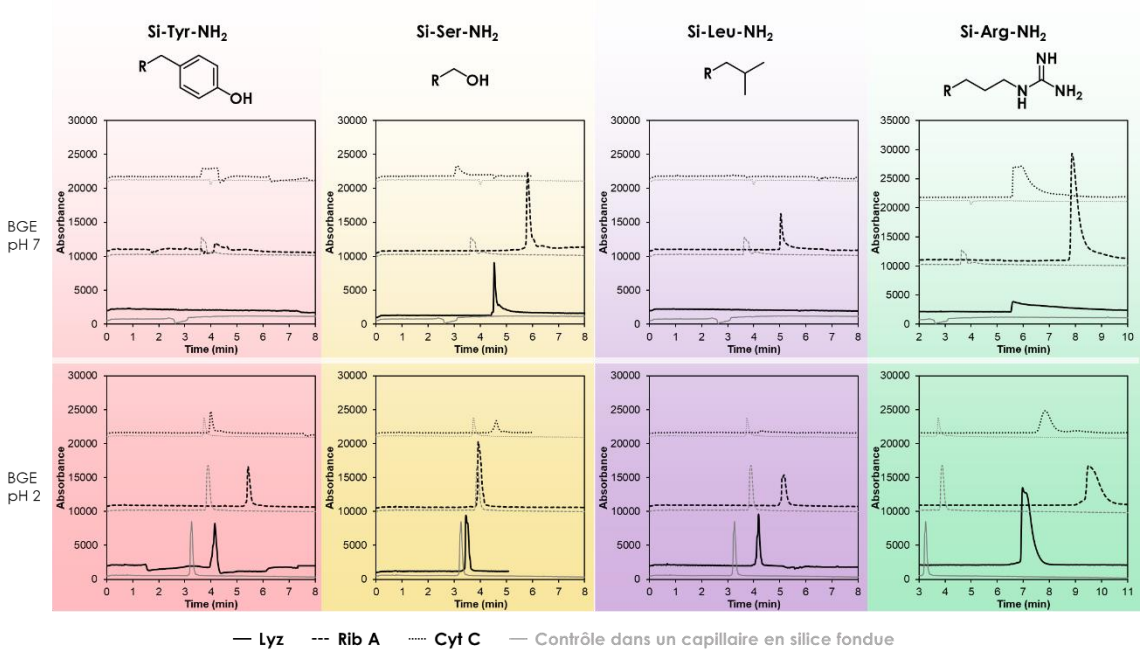


Figure 81 - Electrophérogrammes de Lys, RibA et CytC à pH7 et pH2
Les électrophérogrammes en gris correspondent aux mesures contrôles dans les capillaires en silice fondue et en noir aux mesures dans les capillaires fonctionnalisés.

3.5 Conclusion

Les électrophorèses capillaires de zone réalisées pour chaque protéine sur les différents capillaires ont permis de mettre en évidence les différences de comportement liées à l'acide aminé greffé dans le capillaire. Ainsi, à pH 7, en fonction de l'acide aminé greffé, il est possible de moduler l'adsorption des différentes protéines modèles. La sérine limite l'adsorption des trois

protéines alors que la tyrosine la favorise. La leucine et l'arginine permettent de limiter l'adsorption de certaines protéines, tout en la favorisant pour d'autres. De plus, le greffage ayant montré une modulation du flux électroosmotique, la fonctionnalisation de matériaux à base de silice avec les mimes d'acides aminés silylés semble prometteuse pour l'élaboration de MIP, puisque la sélectivité et la spécificité peuvent être modulées sur des capillaires en silice fondue.

4 Synthèse des empreintes

Les dérivés d'acides aminés silylés que nous avons conçus ont été utilisés comme monomères fonctionnels pour la synthèse de MIP de protéines (Figure 63).

Dans un premier temps, les MIP sont préparés sur des nanoparticules magnétiques, en utilisant des protéines entières comme molécules cibles. Notre choix s'est porté sur ce type de support car l'utilisation de nanoparticules magnétiques permet de faciliter le traitement à l'issue de chaque étape de synthèse des MIP, et même pendant l'étape ultérieure de recapture. Les nanoparticules magnétiques permettent de limiter l'usage de centrifugation qui peut entraîner une agrégation des protéines, et engendrer une couche de MIP irrégulière, affectant potentiellement les performances de l'empreinte. Nos nouveaux monomères fonctionnels sont utilisés pour obtenir des MIP bio-inspirés de deux protéines modèles : le Cytochrome C et le Lysozyme. À titre de comparaison et afin de montrer l'avantage des aminoacides silylés comme monomères pour la préparation d'empreintes, nous avons également préparé des MIP avec des organosilanes commerciaux classiquement utilisés pour générer des empreintes de protéines.

La synthèse du MIP a été optimisée pour obtenir les nanoparticules présentant les meilleures propriétés physico-chimiques, c'est à dire présentant une couche de MIP de quelques nanomètres d'épaisseur à leur surface et ne s'agrégeant pas pour ne pas impacter les applications biologiques. Idéalement, l'épaisseur du MIP doit être du même ordre de grandeur que le rayon hydrodynamique de la protéine modèle.[173]

La composition chimique des nanoparticules a également été analysée par RMN et ATG pour déterminer la proportion de chaque monomère fonctionnel. Enfin, les performances des MIP obtenus ont été évaluées. Des mesures de QCM-d de nos MIP sur différentes protéines ont permis d'évaluer la spécificité, et des tests de compétition par ELISA en montrent la sélectivité.

Les empreintes obtenues à partir d'une protéine entière dépendent de l'orientation de la protéine lors de son adsorption. Un MIP d'une protéine entière présente donc de multiples empreintes, comme des anticorps polyclonaux, dont certaines peuvent être plus efficaces que d'autres. Dans l'optique d'obtenir un MIP présentant des empreintes similaires, la stratégie d'empreintes d'épitopes est envisagée. Un épitope accessible d'une protéine modèle a été identifié : l'hélice α C-terminale de la Kallikréine. Un peptide agrafé correspondant à cette séquence a été synthétisé pour mimer sa structure en hélice. La structure du peptide a été vérifiée par dichroïsme circulaire. Pour immobiliser le peptide sur les nanoparticules, et pour pouvoir le retirer après la synthèse du MIP, celui-ci doit être fonctionnalisé avec un linker clivable silylé à l'autre extrémité. La centrifugation n'est plus un problème pour la synthèse du

MIP préparé avec un peptide. Aussi, des nanoparticules de silice non magnétiques pourront être utilisées.

4.1 Les protéines modèles

L'un des verrous majeurs des MIP de protéines est leur manque de spécificité. En effet, les protéines produisent des cavités volumineuses dans le matériau imprimé (en comparaison des MIP de petites molécules) qui peuvent facilement contenir d'autres biomolécules, en particulier lorsqu'elles présentent un point isoélectrique similaire. Ainsi, nous avons choisi le cytochrome C et le lysozyme comme protéines modèles, deux protéines globulaires proches en termes de taille (MW ≈ 13 kDa, Tableau 22) et de point isoélectrique (pI ≈ 10, Tableau 22), pour pouvoir comparer deux MIP de protéines structurellement proches.

Les performances des MIP obtenus sont également évaluées avec la BSA et la lactalbumine. Ces protéines présentant toutes les deux un point isoélectrique inférieur à 5 et étant de tailles différentes, elles permettent de vérifier la spécificité de nos empreintes (Tableau 22).

Tableau 22 - Récapitulatif structural des protéines utilisées

Protéine	MW (kDa)	pI	R_H
CytC	12	9,6	1,7nm
Lyz	14	11,5	1,9nm
BSA	66	4,5	5,5nm
Lac	14	4,5	1,8nm

4.2 Synthèse des nanoparticules magnétiques core-shell

Des particules d'oxyde de fer ont été préparées par une méthode solvothermique à partir de chlorure ferrique hexahydraté et d'acétate de sodium dans un mélange de diéthylène glycole et d'éthylène glycole.[174] La couche de silice a été ensuite synthétisée en ajoutant du TEOS en milieu basique à la suspension de particules de Fe_3O_4. Comme attendu, les nanoparticules Fe_3O_4@SiO_2 obtenues ont un diamètre de 221,8 nm et présentent une couche de silice de 20 nm d'épaisseur, avec un potentiel zêta de -42,3 mV et une densité de 2,96 g/cm^3 (Figure 82 et Tableau 24).

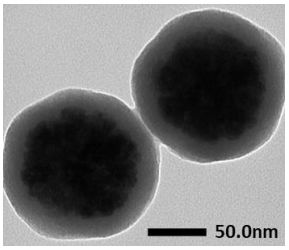


Figure 82 - Image MET des nanoparticules magnétiques core-shell Fe_3O_4@SiO_2

4.3 Adsorption de la protéine

La cinétique du procédé sol-gel est fortement dépendante du pH, la condensation ne peut commencer que lorsque l'hydrolyse est amorcée. A pH neutre, l'hydrolyse est défavorisée (Figure 22). Habituellement, lors de la synthèse d'un MIP de protéines par procédé sol-gel, les monomères fonctionnels sont pré-hydrolysés à pH 2 avant d'être ajoutés sur le support où la protéine est adsorbée (ou immobilisée).[161] Pour éviter cette étape de pré-hydrolyse, nous avons choisi de travailler à un pH légèrement basique (8,5) permettant d'amorcer l'hydrolyse et la condensation des alcoxysilanes, après l'adsorption des protéines modèles à pH 6,5. Avant de synthétiser nos MIP, il a fallu vérifier que nos conditions de synthèse n'altèrent pas la structure des protéines modèles.

La fluorimétrie à balayage différentiel (nanoDSF) est une méthode d'analyse de protéines en solution et sans marquage permettant de vérifier leur stabilité thermique. La nanoDSF analyse la fluorescence intrinsèque des résidus tryptophane de 330 (F330nm) et 350 nm (F350nm). En effet, lors de la dénaturation thermique, les propriétés photochimiques des tryptophanes sont modifiées, entraînant un déplacement du signal de la fluorescence et permettant de déterminer la température de dénaturation des protéines.

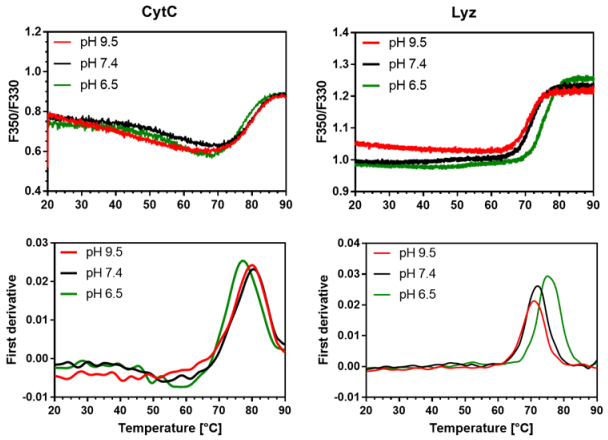


Figure 83 - Analyses nanoDSF du CytC et du Lyz à pH 6,5 ; 7,4 et 9,5
La partie supérieure correspond au rapport des mesures de fluorescence à 350 nm (F350) et à 330 nm (F330) en fonction du gradient de température. La partie inférieure correspond à la dérivée première de la courbe du rapport F350/F330 en fonction du gradient de température, à partir de laquelle la température de dénaturation est déduite.

Les mesures de nanoDSF de nos deux protéines modèles ont donc été réalisées sur une gamme de pH de 6,5 à 9,4 et ont montré que, quelle que soit la valeur du pH, la dénaturation des protéines a lieu lorsque la température est supérieure à 60°C (point d'inflexion, Figure 83). En effet, à pH 6,5, le dépliage du CytC a lieu à 77,3°C et celui du Lyz à 75,4°C. En augmentant le pH, le point d'inflexion du CytC se situe à une température légèrement plus élevée (80,4°C à pH 7,4 et 79,8°C à pH 9,5), indiquant que le CytC présente une structure plus compacte, ce qui augmente sa stabilité. Le point d'inflexion du Lyz se situe à des températures légèrement

plus faibles (71,8°C à pH 7,4 et 71,0°C à pH 9,5), ce qui correspond à une diminution de la stabilité. La synthèse des MIP se faisant à 25°C, la conformation des protéines modèles n'est pas impactée par les conditions de synthèse des MIP, leur structure est donc conservée.

Une fois les nanoparticules Fe_3O_4@SiO_2 obtenues, les protéines ont pu être adsorbées à leurs surfaces. Les protéines modèles présentant un point isoélectrique supérieur à 9,5, elles sont globalement chargées positivement au pH d'adsorption (6,8) et peuvent donc être adsorbées par des interactions électrostatiques avec les silanolates présents à la surface des nanoparticules Fe_3O_4@SiO_2.

Le CytC (2,5 mg), en solution dans 12,5 mL d'eau milliQ, a donc été ajouté sur 100 mg de nanoparticules en suspension dans 12,5 mL d'eau milliQ. Le mélange a été agité pendant 30 min à 25°C. Les nanoparticules ont ensuite été décantées à l'aide d'un aimant pour doser la quantité de CytC restant dans le surnageant par mesure de l'absorbance à 550 nm (coefficient d'extinction molaire du CytC : $2{,}11.10^4$ mol/L.cm[175]) et la quantité adsorbée a pu être déduite par différence : $3{,}85.10^{-7}$ mol.

En connaissant la taille, et donc le volume, d'une particule, sa densité et la masse de nanoparticules engagées dans la synthèse, le nombre de particules peut être déterminé :

$$\mathrm{V(NP)} = \frac{4}{3}\pi \mathrm{r}^3 = 5713250\ \mathrm{nm}^3 = 5{,}71.10^{-15}\mathrm{cm}^3$$

Équation 8 - Détermination du volume de la particule sphérique Fe_3O_4@SiO_2 (Tableau 24)

$$\mathrm{Nb(NP)} = \frac{\mathrm{m(NP)} \Big/ \mathrm{V(NP)}}{\mathrm{d}} = 5{,}91.10^{12}\ \text{particules}$$

Équation 9 - Détermination du nombre de particules engagées dans la synthèse

Nous pouvons en déduire que 39000 molécules de CytC ont été immobilisées sur chaque particule :

$$\mathrm{Nb}\left(\frac{\mathrm{CytC}}{\mathrm{NP}}\right) = \frac{\mathrm{n(CytC)} \times \mathrm{N_A}}{\mathrm{Nb(NP)}} = \frac{3{,}85.10^{-7} \times 6{,}02.10^{23}}{5{,}91.10^{12}} = 39216\ \mathrm{CytC/NP}$$

Équation 10 - Détermination du nombre de CytC par nanoparticule, avec N_A la constante d'Avogadro

La surface A d'une particule, obtenue par l'Équation 11, permet de déterminer le nombre de CytC par nm².

$$\mathrm{A(NP)} = 4 \times \pi \times \mathrm{r}^2 = 154\,551\ \mathrm{nm}^2$$

Équation 11 - Détermination de la surface d'une particule sphérique avec r le rayon de la particule Fe_3O_4@SiO_2 (Tableau 24)

En considérant le rayon hydrodynamique du CytC (1,7 nm, Tableau 22) et la surface d'une particule, le nombre théorique de CytC immobilisés en monocouche serait d'environ 17000.

Nous pouvons donc supposer que nous avons formé environ deux couches de protéines à la surface de la particule.

Nous pouvons également calculer la densité de protéines en faisant le rapport du nombre de CytC par la surface de la particule :

$$\mathrm{Nb}\left(\frac{\mathrm{CytC}}{\mathrm{nm^2}}\right) = \frac{\mathrm{Nb}\left(\frac{\mathrm{CytC}}{\mathrm{NP}}\right)}{\mathrm{A(NP)}} = 0{,}25\ \mathrm{CytC/nm^2}$$

Équation 12 - Détermination du nombre de CytC par nm² sur la particule Fe_3O_4@SiO_2

Nous obtenons 0,25 CytC/nm² ce qui correspond à environ 1 CytC pour 5 nm². Avec une monocouche de CytC, compte tenu de son rayon hydrodynamique, nous aurions au maximum 1 CytC pour 9 nm², ce qui confirme la présence de deux couches de CytC à la surface de la nanoparticule.

Nous considérons que l'espace libre entre chaque CytC est suffisant pour permettre aux monomères fonctionnels de polymériser dans l'espace restant à la surface de la nanoparticule. De plus, la présence de deux couches de protéines permet de doubler le nombre d'empreintes dans le matériau hybride (par rapport à une seule couche), sans pour autant être délétère à l'efficacité de l'empreinte, la couche inférieure restant accessible.

Une fois la protéine adsorbée, nos MIP ont été synthétisés.

4.4 Synthèse des MIP

Au moment où nous avons commencé notre étude encore le cas à ce jour, aucune étude ne rapporte la quantité idéale de monomères fonctionnels (MF) et d'agents de réticulation (TEOS) à utiliser pour la préparation d'empreintes de protéines par procédé sol-gel, ni la durée de réaction de la formation de la couche de MIP. Différentes procédures aux paramètres variés ont été décrites, avec notamment des ratios TEOS/MF compris entre un[114] et cinq[133,176–178], ou encore sans TEOS, et avec des temps de réaction de 12 à 48h.[120,174,179,180] Afin d'optimiser nos procédures, nous avons choisi d'explorer plusieurs possibilités en variant la nature et la quantité de monomères fonctionnels. Les différents lots obtenus sont présentés dans le Tableau 23.

Avant d'intégrer les dérivés d'acides aminés silylés comme MF, des premiers Fe_3O_4@MIP/NIP ont été préparés avec les monomères commerciaux classiquement utilisés, l'aminopropyl-triéthoxysilane (APTES) et le n-propyltriéthoxysilane (PTES), en présence de TEOS (Fe_3O_4@MIP/NIP-1).[181] Nous avons ensuite préparé de nouveaux MIP/NIP avec nos MF en présence de TEOS (Fe_3O_4@MIP/NIP-2-3-4). L'épaisseur idéale d'un MIP de protéine par procédé sol-gel étant comprise entre 5 et 12 nm[181], le ratio TEOS/MF a été modulé pour obtenir une fine

couche de matériau hybride. Dans cette optique, nous avons réalisé des empreintes sans TEOS (Fe_3O_4@MIP/NIP-5-6).

Tableau 23 - Composition de synthèse des Fe_3O_4@MIP/NIP (sur 100 mg de nanoparticules Fe_3O_4@SiO_2)

Nom du matériau	Protéine (mg/mL)	TEOS (mmol)	APTES (mmol)	PTEOS (mmol)	Si-Tyr-NH_2 (mmol)	Si-Leu-NH_2 (mmol)	Si-Ser-NH_2 (mmol)	Si-Arg-NH_2 (mmol)
Fe_3O_4@MIP-1	0,08 CytC	1,1	0,1	0,1	-	-	-	-
Fe_3O_4@NIP-1	-	1,1	0,1	0,1	-	-	-	-
Fe_3O_4@MIP-2	0,08 CytC	1,1	-	-	-	0,1	-	0,1
Fe_3O_4@NIP-2	-	1,1	-	-	-	0,1	-	0,1
Fe_3O_4@MIP-3	0,08 CytC	1,1	-	-	0,2	-	0,2	-
Fe_3O_4@NIP-3	-	1,1	-	-	0,2	-	0,2	-
Fe_3O_4@MIP-4	0,08 CytC	1,1	-	-	0,05	0,05	0,05	0,05
Fe_3O_4@NIP-4	-	1,1	-	-	0,05	0,05	0,05	0,05
Fe_3O_4@MIP-5	0,08 CytC	-	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2
Fe_3O_4@NIP-5	-	-	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2
Fe_3O_4@MIP-6	0,08 Lyz	-	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2
Fe_3O_4@NIP-6	-	-	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2

Tous nos MIP et nos NIP ont été préparés sur 100 mg de nanoparticules Fe_3O_4@SiO_2 en suspension dans 25 mL d'eau milliQ suivant le même protocole. Les monomères fonctionnels ont d'abord été solubilisés dans 5 mL d'un mélange eau/éthanol (6/4, v/v), l'éthanol étant nécessaire à la solubilisation de certains MF. Cette solution a ensuite été ajoutée à la suspension de nanoparticules, incubées ou pas avec les protéines modèles (le CytC ou le Lyz), pour former respectivement des Fe_3O_4@MIP et des Fe_3O_4@NIP. Pour ajuster le pH à 8,5, de la triéthanolamine a été rajouté au mélange (400µL d'une solution à 94 mg/mL). La réaction sol-gel a été placée sous agitation mécanique (250 rpm) à 25°C. Dans ces conditions, la réaction de condensation est plus favorisée que la réaction d'hydrolyse (Figure 22). Ainsi, lorsqu'un MF s'hydrolyse, sa condensation avec les silanolates de la surface des nanoparticules (déjà hydrolysés) est préférentielle vis-à-vis de sa condensation avec un autre MF, permettant la « croissance » du matériau hybride sur la surface de la particule.

La réaction sol-gel des Fe_3O_4@MIP/NIP-1, préparés avec des MF commerciaux, a été réalisée pendant 24 h pour éviter de former une couche de MIP trop épaisse.[182] En effet, le doublet non liant de l'amine pouvant se coordonner avec le silicium pour former un silicium pentavalent, l'APTES apporte un effet autocatalytique à la réaction sol-gel.[183,184]

Nous avons supposé que nos monomères fonctionnels n'apporteraient pas cet effet catalytique. La réaction sol-gel des autres Fe_3O_4@MIP/NIP (Fe_3O_4@MIP/NIP-2 à 6) a donc été réalisée pendant 72 h. L'épaisseur de la couche hybride a été vérifiée par imagerie MET pour chaque Fe_3O_4@MIP/NIP synthétisé.

La réaction sol-gel a été arrêtée par retrait du milieu réactionnel après décantation magnétique. Les nanoparticules ont été lavées plusieurs fois avec un mélange EtOH/eau (50/50, v/v) et avec de l'éthanol pour éliminer les MF n'ayant pas réagi. Puis la protéine a été retirée par lavages acides. Les nanoparticules sont conservées dans 10 mL d'éthanol pour

éviter toute dégradation. La même procédure a été utilisée pour la synthèse du MIP du Lyz (Figure 84).

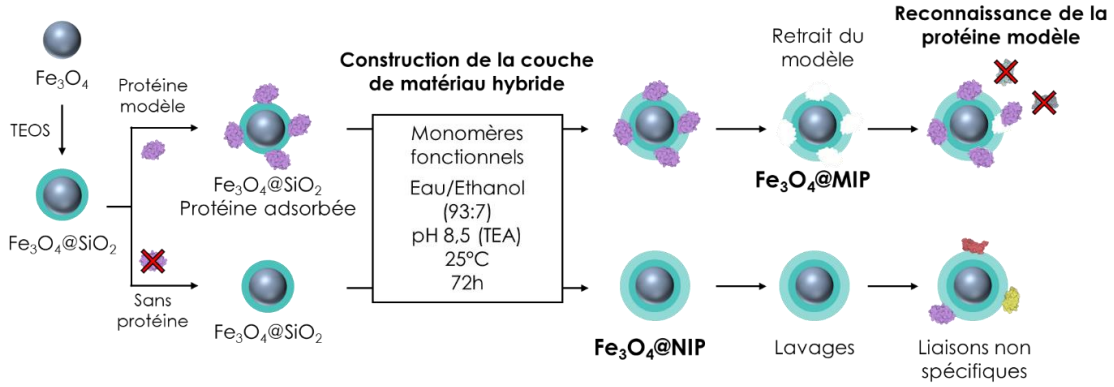


Figure 84 - Synthèse des Fe_3O_4@MIP et des Fe_3O_4@NIP

Les particules ont été analysées pour en déterminer la densité, la composition, la taille et le potentiel zêta à pH 7. Leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau 24.

Tableau 24 - Composition et propriétés des particules avec et sans empreintes

NP	Densité (g/cm³)	ATG		Diamètre de particules			Potentiel ζ
		(% masse perdue 200-900 °C)	mmol (MF**/g particules)	MET[a] (nm)	DLS[b] (nm)	PdI[b]	Water (mV)
Fe_3O_4	4,23 ± 0,02	3,28	-	210,1 ±33,6	214,42 ± 1,20	0,18 ± 0,03	-8,20±0,30
Fe_3O_4@SiO_2	2,96 ± 0,01	4,44	2,24	221,8 ± 45,4	251,13 ± 6,14	0,08 ± 0,06	-42,30 ± 0,40
Fe_3O_4@MIP-1	2,52 ± 0,02	9,25	0,90	246,0 ± 30,9	1145 ± 95,26*	0,44 ± 0,12*	-28,70 ± 0,20
Fe_3O_4@NIP-1	2,54 ± 0,01	8,22	0,65	252,0 ± 42,2	972,55 ± 103,90*	0,57 ± 0,17*	-28,10 ± 0,72
Fe_3O_4@MIP-2	2,70 ± 0,07	5,14	0,27	295,0 ± 51,9	482,15 ± 37,90	0,28 ± 0,04	1,51 ± 0,04
Fe_3O_4@NIP-2	2,93 ± 0,04	6,87	0,34	291,1 ± 38,9	694,33 ± 171,30	0,22 ± 0,15	1,78 ± 0,02
Fe_3O_4@MIP-3	2,99 ± 0,51	6,95	0,31	245,8 ± 45,6	492,24 ± 1,40	0,19 ± 0,04	-3,21 ± 0,08
Fe_3O_4@NIP-3	2,99 ± 0,02	6,06	0,27	250,9 ± 56,8	397,44 ± 20,51	0,34 ± 0,042	-3,41 ± 0,15
Fe_3O_4@MIP-4	2,37 ± 0,03	15,64	0,65	262,5 ± 20,7	774,06 ± 110,80*	0,53 ± 0,15*	19,10 ± 0,90
Fe_3O_4@NIP-4	2,33 ± 0,02	11,57	0,51	257,1 ± 36,0	763,01 ± 86,40*	0,53 ± 0,12*	26,90 ± 1,70
Fe_3O_4@MIP-5	2,74 ± 0,12	9,25	0,32	236,6 ± 38,9	259,83 ± 4,30	0,11 ± 0,03	-1,16 ± 2,0
Fe_3O_4@NIP-5	2,80 ± 0,01	9,54	0,44	243,2 ± 30,8	277,10 ± 2,90	0,12 ± 0,02	16,30 ± 2,05
Fe_3O_4@MIP-6	2,54 ± 0,02	14,43	0,60	260,1 ± 37,3	431,22± 18,35	0,26 ± 0,024	14,10 ± 1,68
Fe_3O_4@NIP-6	2,55 ± 0,002	14,41	0,59	272,1 ± 33,6	452,44 ± 25,02	0,31 ± 0,030	18,60 ± 2,52

La densité a été mesurée avec un pycnomètre, la perte de masse mesurée par analyse thermogravimétrique a été utilisée pour le calcul de la quantité de MF greffés sur le Fe_3O_4@MIP/NIP. Le diamètre des particules a été mesuré par microscopie électronique à transmission (MET) (n = 30[a]), et par DLS (n = 3[b]) dans de l'eau milliQ à une concentration de 25 µg/mL et à pH 7. La même solution a été utilisée pour la mesure du potentiel zêta (n=3). Dans les mesures DLS, * indique une mauvaise qualité de la mesure due à la présence de grands agrégats en solution. **Dans le cas de Fe_3O_4@SiO_2, la valeur indique le mmol de OH/g de particules.

4.4.1 Fe_3O_4@MIP/NIP-1 : CytC - APTES, PTES, TEOS

L'APTES et le PTES ont été utilisés en quantité équimolaire, à une concentration finale de 6,7 mmol/L. Ces monomères fonctionnels commerciaux sont habituellement utilisés pour fournir des interactions électrostatiques grâce à l'amine primaire de l'APTES ou favoriser les

interactions hydrophobes via la chaîne propyl du PTES. Une plus grande quantité de TEOS (36,7 mmol/L) a été ajoutée pour obtenir un ratio TEOS/MF de 5,5.

Comme attendu, le potentiel zêta des nanoparticules, mesuré à pH 7, a significativement augmenté, passant de -42,3 mV pour les NP non fonctionnalisées (Fe3O4@SiO_2) à -28,7 mV pour le Fe_3O_4@MIP-1 et -28,1 mV pour le Fe_3O_4@NIP-1. Ce changement est dû à la présence de la couche hybride, composée des amines primaires apportées par l'APTES pouvant être protonées et, plus généralement, par le masquage des silanolates libres de surface avec des composés organiques.

Dans la littérature, les auteurs ne précisent pas le pourcentage de MF greffés par rapport à la quantité initiale introduite pour la synthèse du MIP. Les mesures d'ATG nous ont permis de quantifier la partie organique présente dans notre matériau hybride (0,90 et 0,65 mmol de MF par gramme de particules pour le Fe_3O_4@MIP-1 et Fe_3O_4@NIP-1 respectivement), ce qui correspond à un pourcentage de greffage de 45% pour le Fe_3O_4@MIP-1 et de 32,5% pour le Fe_3O_4@NIP-1.

L'imagerie MET a permis d'estimer l'épaisseur de la couche hybride à environ 30 nm en mesurant le diamètre des particules (Figure 85). Les mesures de DLS, malgré un indice de polydispersité d'environ 0,5, montrent un fort état d'agrégation (Tableau 24). Le fait que le Fe_3O_4@NIP-1 soit aussi agrégé que le Fe_3O_4@MIP-1 montre que l'agrégation n'est pas due à la présence de protéines. L'APTES, catalysant fortement le procédé sol-gel et combiné avec la présence de TEOS, pourrait être à l'origine de cette agrégation.

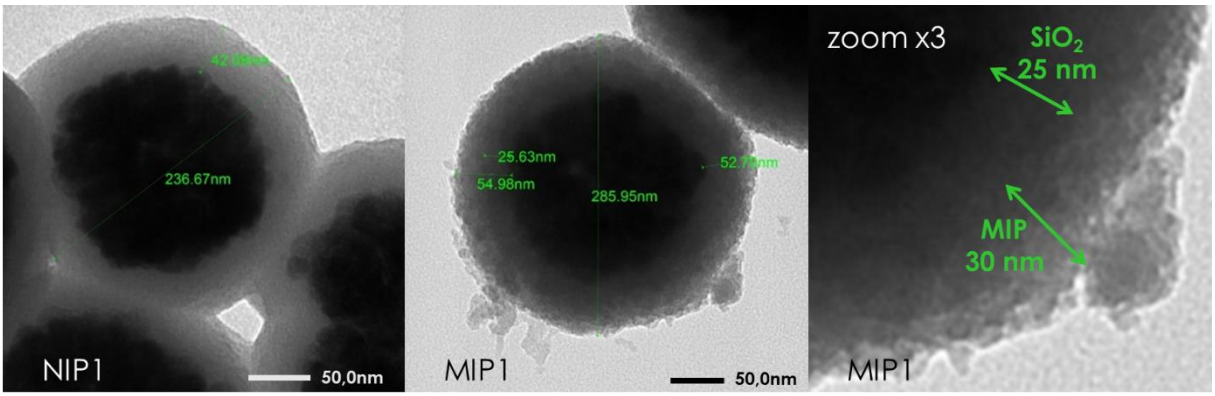


Figure 85 - Image MET du Fe_3O_4@MIP/NIP-1

4.4.2 Fe_3O_4@MIP/NIP-2 : CytC – Si-Arg-NH_2, Si-Leu-NH_2, TEOS

Pour la conception des premiers Fe_3O_4@MIP/NIP préparés à partir des monomères aminoacides silylés, nous avons choisi d'utiliser Si-Arg-NH_2 et Si-Leu-NH_2 dans les mêmes proportions que l'APTES et le PTES. En effet, ces monomères apportent des fonctions organiques analogues à l'empreinte (cationique et hydrophobe, respectivement). Le TEOS a également

été utilisé dans les mêmes proportions que pour les Fe_3O_4@MIP/NIP-1. En l'absence d'APTES qui catalyse la réaction sol-gel, nous avons choisi de laisser la polymérisation s'opérer pendant 72h.

Le potentiel zêta presque neutre (1,5 mV pour le Fe_3O_4@MIP-2 et 1,8 mV pour le Fe_3O_4@NIP-2) indique que l'apport en charges positives des résidus Arg contrebalance les charges négatives dues aux silanolates (Tableau 24).

L'imagerie MET montre une épaisseur de matériaux hybrides de 13 nm pour le Fe_3O_4@MIP-2 et de 19 nm pour le Fe_3O_4@NIP-2 (Figure 86). Ces couches plus fines que celles des Fe_3O_4@MIP/NIP-1 devraient bénéficier pour la qualité de l'empreinte.[181]

Les mesures d'ATG indiquent que le pourcentage de greffage des MF est de 13,5% pour le Fe_3O_4@MIP-2 et 17% pour le Fe_3O_4@NIP-2 (soit 0,27 mmol de MF/g de particules pour le MIP et 0,34 pour le NIP), soit deux à trois fois plus faible que le rendement de greffage des MF commerciaux pour les Fe_3O_4@MIP/NIP-1. Cette différence de rendement explique la différence d'épaisseur de la couche hybride observée à l'imagerie MET (13 nm pour le MIP-2 et 30 nm pour le MIP-1, Figure 86). De plus, la proportion en MF et en TEOS étant identique pour les Fe_3O_4@MIP/NIP-1 et Fe_3O_4@MIP/NIP-2, nous pouvons supposer que la différence de rendement, et donc d'épaisseur du matériau, est due à l'effet catalytique de l'APTES, d'autant plus que la réaction sol-gel des Fe_3O_4@MIP/NIP-2 a duré trois fois plus longtemps que la réaction sol-gel des Fe_3O_4@MIP/NIP-1. Compte tenu du mécanisme de l'effet catalytique de l'APTES, lié au doublet non liant de l'amine primaire, nous ne pouvons pas exclure que la Si-Arg-NH_2 en présente également un, dans une moindre mesure, lié au doublet non liant de la guanidine.

Enfin, les mesures de DLS, malgré un indice de polydispersité d'environ 0,25, montrent une forte agrégation, bien que moins importante que pour les Fe_3O_4@MIP/NIP-1 (Tableau 24). Cette agrégation pourrait être due au TEOS, présent en grande quantité (ration TEOS/MF de 5,5) dans les Fe_3O_4@MIP/NIP-1 et Fe_3O_4@MIP/NIP-2.

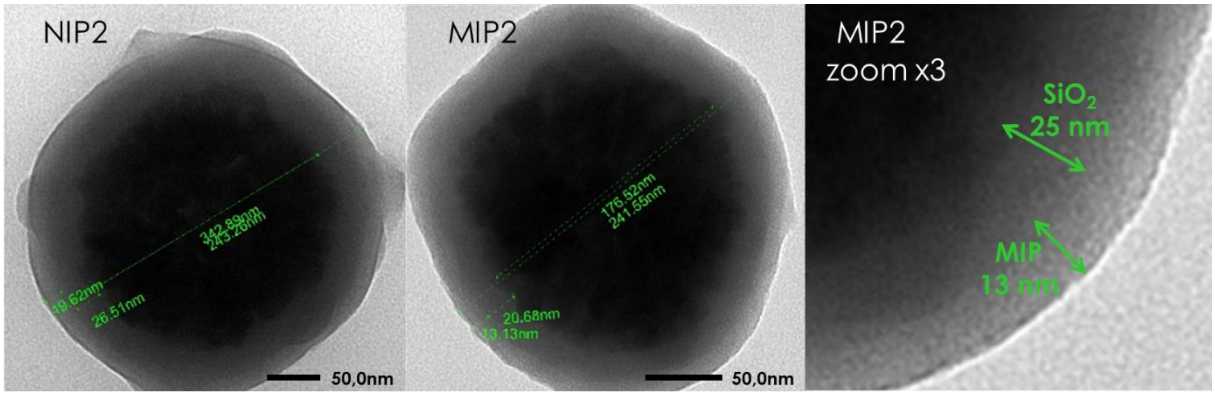


Figure 86 - Image MET du Fe_3O_4@MIP/NIP-2

4.4.3 Fe_3O_4@MIP/NIP-3 : CytC - Si-Tyr-NH_2, Si-Ser-NH_2, TEOS

Pour limiter l'agrégation liée à l'utilisation d'une quantité trop importante de TEOS, le ratio TEOS/MF a été réduit à 2,75 pour la synthèse des Fe_3O_4@MIP/NIP-3. Cette fois, les monomères fonctionnels sont Si-Tyr-NH_2 et Si-Ser-NH_2, des résidus très impliqués dans les interactions paratopiques.[162] Pour obtenir une concentration de 13,3 mmol/L en MF, la quantité des MF a été doublée (0,2 mmol pour les Fe_3O_4@MIP/NIP-3 au lieu de 0,1 mmol pour les Fe_3O_4@MIP/NIP-1 et 2). Comme précédemment, la réaction a été laissée 72h pour laisser le temps à la couche hybride de se former.

Le potentiel zêta atteint presque la neutralité (-3,2 mV pour le Fe_3O_4@MIP-3 et -3,4 mV pour le Fe_3O_4@NIP-3, Tableau 24), ce qui semble indiquer que la plupart des silanolates présents à la surface des Fe_3O_4@SiO_2 utilisées comme support sont impliqués dans des liaisons Si-O-Si. Contrairement aux Fe_3O_4@MIP/NIP-2 qui présentent des potentiels zêta positifs dus aux guanidinium des Si-Arg-NH_2, ces potentiels zêta presque neutres sont cohérents, puisqu'aucun des MF engagés dans ces Fe_3O_4@MIP/NIP n'apporte de charge positive.

Les mesures d'ATG indiquent un pourcentage de greffage de 7,8% pour le Fe_3O_4@MIP-3 et 6,8% pour le Fe_3O_4@NIP-3 (0,31 mmol de MF/g de particules pour le MIP et 0,27 pour le NIP). Ces faibles rendements semblent en cohérence avec les épaisseurs des couches des Fe_3O_4@MIP/NIP-3 mesurées par l'imagerie MET (Figure 87), où l'on observe une couche de matériau hybride plus fine que pour les Fe_3O_4@MIP/NIP-1 et 2 (environ 8 nm pour les Fe_3O_4@MIP/NIP-3 contre environ 20 et 30 nm pour les Fe_3O_4@MIP/NIP-1 et 2 respectivement). Cette couche de matériau hybride inférieure à 10 nm devrait bénéficier aux capacités de reconnaissance de l'empreintes.[181] La diminution du rendement de greffage par rapport aux Fe_3O_4@MIP/NIP-1 et 2 peut être liée à l'absence d'effet catalytique lié à l'APTES et à la Si-Arg-NH_2, et également à la modification du ratio TEOS/MF. En effet, ce ratio étant diminué de moitié par rapport aux Fe_3O_4@MIP/NIP-1 et 2, la compétition entre le TEOS et les MF est beaucoup plus importante pour les Fe_3O_4@MIP/NIP-3.

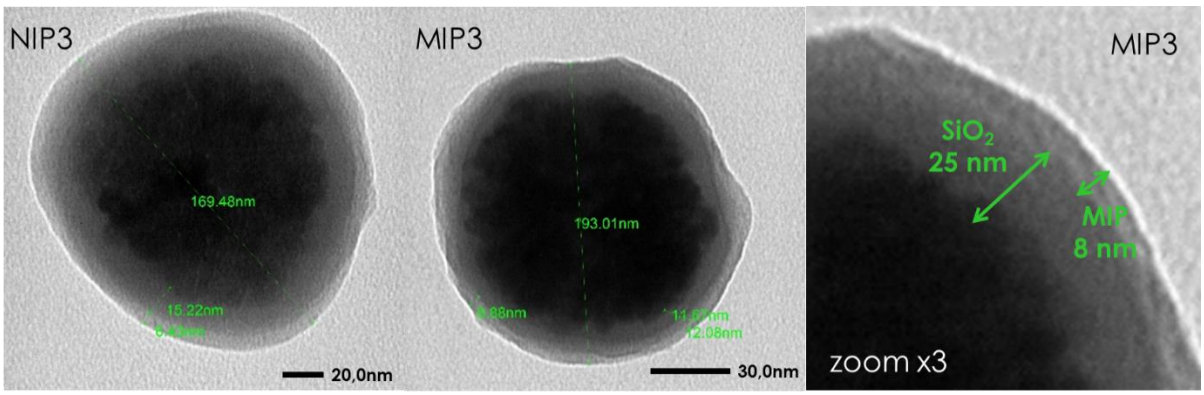


Figure 87 - Image MET du Fe_3O_4@MIP/NIP-3

Enfin, les mesures de DLS montrent une diminution de l'état d'agrégation avec la diminution du ratio TEOS/MF, ce qui semble confirmer que le TEOS est le responsable majeur de l'agrégation (Tableau 24).

4.4.4 Fe_3O_4@MIP/NIP-4 : CytC - Si-Tyr-NH_2, Si-Ser-NH2, Si-Arg-NH_2, Si-Leu-NH_2, TEOS

Pour augmenter la diversité des interactions entre le MIP et la protéine, les quatre MF ont été utilisés en mélange équimolaire. Comme l'agrégation semble liée à l'utilisation combinée de TEOS et d'une grande quantité MF à activité catalytique, le ratio TEOS/MF d'origine a été utilisé (soit 1,1 mmol de TEOS et 0,05 mmol de chaque MF : ratio de 5,5).

Le potentiel zêta fortement positif (19,1 mV pour le Fe_3O_4@MIP-4 et 26,9 mV pour le Fe_3O_4@NIP-4) laisse supposer l'absence de silanolates libres sur la couche hybride, mais également une certaine représentativité du résidu Arg, le seul MF chargé positivement dans le mélange.

Les mesures d'ATG montrent un pourcentage de greffage de 32,5% pour le Fe_3O_4@MIP-4 et 25,5% pour le Fe_3O_4@NIP-4 (0,65 mmol de MF/g de particules pour le MIP et 0,51 pour le NIP). L'imagerie MET montre une couche de matériau hybride d'environ 20 nm et la présence de nombreux agrégats, ce qui est confirmé par les mesures de DLS (Figure 88).

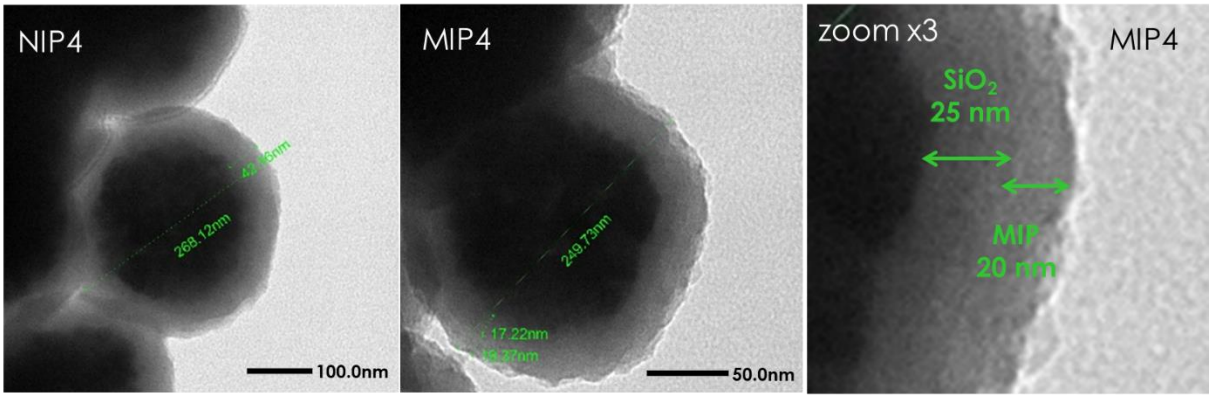


Figure 88 - Image MET du Fe_3O_4@MIP/NIP-4

Les quatre premiers Fe_3O_4@MIP/NIP synthétisés présentent une couche de matériau hybride d'au moins 13 nm. Il semblerait que l'incorporation de TEOS dans le mélange de monomères fonctionnels soit corrélée avec l'épaisseur du matériau. En effet, plus le ratio TEOS/MF est élevé, plus la couche de MIP est épaisse. Dans l'idéal, l'épaisseur du MIP doit être proche de la taille de la molécule cible.[173] Le CytC présentant un rayon hydrodynamique de 1,7 nm, une épaisseur de 13 nm semble trop élevée.

Partant de ces observations, nous avons choisi, pour la 5e expérience, de ne pas utiliser de TEOS et d'utiliser exclusivement un mélange de monomères fonctionnels. Ainsi, nous espérons

réduire la couche du MIP vers 5 nm. De plus, en utilisant exclusivement nos monomères fonctionnels, nous pouvons réduire au minimum la quantité d'atomes de silicium au sein de la couche hybride et obtenir ainsi des empreintes biomimétiques.

4.4.5 Fe_3O_4@MIP/NIP-5 : CytC - Si-Tyr-NH_2, Si-Ser-NH_2, Si-Arg-NH_2, Si-Leu-NH_2

Pour compenser l'absence de TEOS, la concentration de MF a été augmentée jusqu'à ce que la solubilité maximale des Si-AA-NH_2 soit atteinte, soit une concentration de 26,7 mmol/L, ce qui correspond à 0,2 mmol de chaque MF. Comme pour les synthèses précédentes, la réaction sol-gel a été réalisée pendant 72h.

Les mesures de potentiel zêta donnent des résultats tout à fait remarquables et différents pour le Fe_3O_4@MIP-5 et le Fe_3O_4@NIP-5 avec des valeurs de -1,2 mV et 16,3 mV respectivement, contrairement aux quatre MIP/NIP précédents. Cette différence spectaculaire d'état de charge nous permet de supposer des compositions différentes à la surface des matériaux hybrides, un résultat encourageant quant à la capacité des monomères à s'arranger au contact de la protéine, comme nous l'avions supposé.

Les mesures d'ATG indiquent un pourcentage de greffage de 4% pour le Fe_3O_4@MIP-4 et de 5,5% pour le Fe_3O_4@NIP-4 (0,32 et 0,44 mmol de MF par gramme de particules pour le MIP et NIP respectivement) (Tableau 24). La différence de rendement par rapport aux Fe_3O_4@MIP/NIP formulés avec du TEOS s'explique par le fait que le calcul du rendement n'implique pas la quantité de TEOS mais seulement celle des monomères fonctionnels.

La couche de matériaux hybrides, mesurée grâce à l'imagerie MET (Figure 89), montre une épaisseur de 6 et 8 nm pour le Fe_3O_4@MIP-5 et le Fe_3O_4@NIP-5 respectivement. Cette forte diminution par rapport aux Fe_3O_4@MIP/NIP-4, indique que l'absence de TEOS dans le mélange réactionnel est favorable à l'obtention d'une épaisseur optimale.[181] De plus, les analyses de DLS, qui n'indiquent aucune agrégation des nanoparticules, semblent confirmer la responsabilité de TEOS dans l'agrégation des précédents Fe_3O_4@MIP/NIP (Tableau 24).

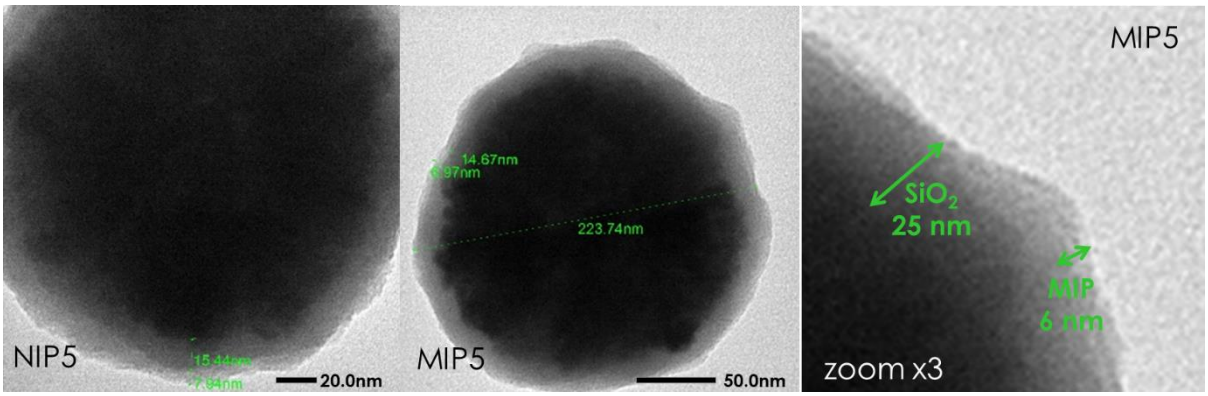


Figure 89 - Image MET du Fe_3O_4@MIP/NIP-5

Ce nouveau protocole, où seuls nos monomères fonctionnels sont utilisés pour générer la couche de matériau hybride, a permis l'obtention d'empreintes du CytC présentant des caractéristiques optimales (Fe_3O_4@MIP/NIP-5), soit une faible épaisseur, une absence d'agrégation des particules, et une composition à la surface différente pour le Fe_3O_4@MIP-5 et le Fe_3O_4@NIP-5. Nous avons donc décidé de réaliser un MIP du Lyz dans les mêmes conditions.

4.4.6 Fe_3O_4@MIP/NIP-6 : Lyz - Si-Tyr-NH2, Si-Ser-NH2, Si-Arg-NH2, Si-Leu-NH2

Le Fe_3O_4@MIP/NIP du Lyz a été synthétisé de la même manière que le Fe_3O_4@MIP/NIP du CytC.

Les mesures d'ATG montrent un pourcentage de greffage de 7,5% pour le Fe_3O_4@MIP-6 et le Fe_3O_4@NIP-6 (0,6 mmol de MF par gramme de particules), et l'imagerie MET montre une épaisseur de matériau hybride d'environ 7 nm (Figure 90). Ces résultats similaires à ceux des Fe_3O_4@MIP/NIP-5 semblent tendre vers une reproductibilité de notre protocole.

Les potentiels zêta du Fe_3O_4@MIP-6 (14,1 mV) et du Fe_3O_4@NIP-6 (18,6 mV) sont beaucoup plus proches que pour le CytC. Le Lyz et le CytC présentent des distributions de charges différentes (Figure 91) et le Lyz semble présenter plus de charges négatives à sa surface, qui peuvent interagir avec la Si-Arg-NH_2 chargée positivement. Ainsi, il est possible que la proportion de résidus Arg soit plus importante pour l'empreinte du Lyz (Fe_3O_4@MIP-6) que pour celle du CytC (Fe_3O_4@MIP-5).

Les analyses de DLS révèlent une certaine agrégation des particules. Bien que le Lyz et le CytC soient similaires en termes de taille et de point isoélectrique, ces deux protéines globulaires présentent des distributions de charges différentes (Figure 91). En effet, le CytC présente une zone électrostatique plus importante que le Lyz, ce qui peut favoriser son orientation pendant l'adsorption. La distribution des charges plus homogène dans le Lyz peut entraîner un phénomène de désorption-résorption de la protéine pendant la synthèse de l'empreinte, conduisant à cette légère agrégation.

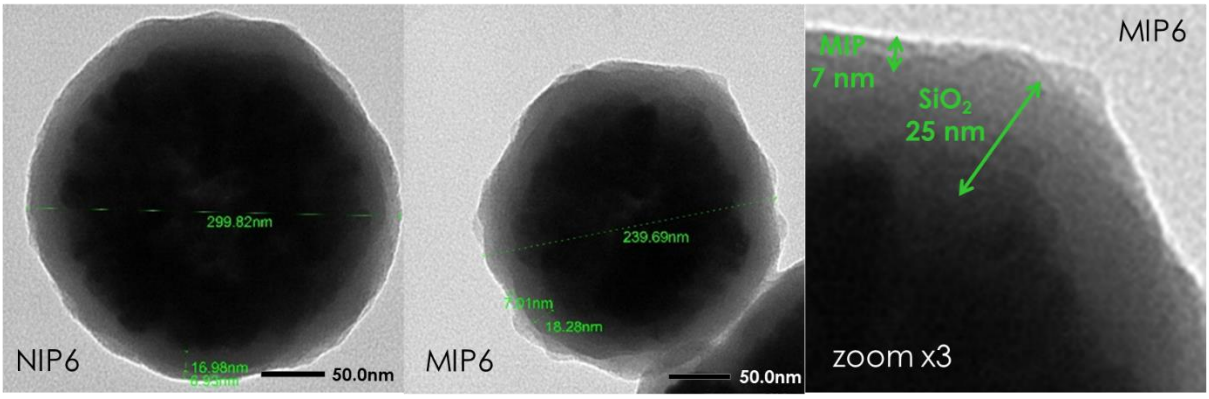


Figure 90 - Image MET du Fe_3O_4@MIP/NIP-6

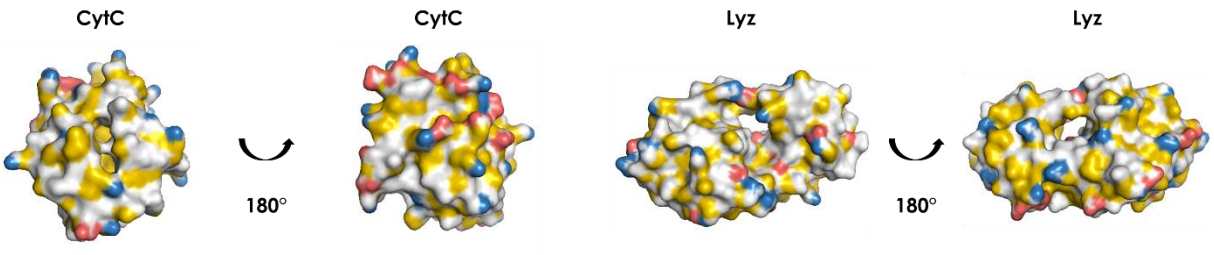


Figure 91 - Structures du CytC (PDB : 1HRC) et Lyz (PDB : 4LZM) en couleur pour visualiser les zones hydrophobes (jaune), chargées positivement (rouge) et négativement (bleu)
Les figures ont été créées selon le script qui fonctionne avec le logiciel PyMOL décrit par Hagemans et al.[185]

4.4.7 Détermination de la composition en monomères des Fe_3O_4@MIP/NIP-5 et Fe_3O_4@MIP/NIP-6

Nous avons estimé qu'une analyse RMN ^1H nous permettrait de déterminer la composition chimique des Fe_3O_4@MIP/NIP et la proportion de chaque MF. Pour cela, nous avons dissous le matériau hybride en hydrolysant les liaisons siloxanes dans du NaOD 1,5 mol/L. Le cœur magnétique s'étant également dissous, et malgré une décantation magnétique, les résidus d'oxyde de fer dans le tube RMN ont rendu l'acquisition difficile, aboutissant à un spectre RMN ^1H ininterprétable.

Les Fe_3O_4@MIP/NIP-5 et 6 ont donc été resynthétisés à la surface de nanoparticules de silice non magnétiques de même taille que les Fe_3O_4@SiO_2. Les nanoparticules obtenues ont été caractérisées afin de vérifier qu'elles étaient similaires à celles obtenues sur les nanoparticules magnétiques (Tableau 25). Comme attendu, des résultats comparables ont été obtenus, avec des potentiels zêta de -7,6 mV pour le SiO_2@MIP-5 (contre -1,16 mV pour le Fe_3O_4@MIP-5), 25,9 mV pour le SiO_2@MIP-6 (contre 14,1 mV pour le Fe_3O_4@MIP-5) et 26,9 et 28,5 mV pour les SiO_2@NIP-5-6 (contre 16,3 et 18,6 mV pour le Fe_3O_4@NIP-5-6).

Tableau 25 - Composition et propriétés des particules de silices avec et sans empreintes

NP	Densité (g/cm³)	ATG		Diamètre de particules			Potentiel ζ
		(% masse perdue 200-900 °C)	mmol (MF**/g particules)	MET[a] (nm)	DLS[b] (nm)	PdI[b]	(% masse perdue 200-900 °C)
SiO_2	2,24±0,01			267,90±33,03	282,23±1,82	0,074±0,009	-61,82±0,63
SiO_2@MIP-5	1,82±0,01	12,00	0,66	327,76±32,86	446,79±9,65	0,192±0,010	-7,63±0,51
SiO_2@NIP-5	1,84±0,01	13,55	0,71	327,08±23,71	425,32±18,74	0,243±0,017	26,91±1,58
SiO_2@MIP-6	1,80±0,03	13,73	0,73	317,63±28,30	363,43±15,95	0,262±0,054	25,90±1,02
SiO_2@NIP-6	1,78±0,04	12,43	0,39	300,86±24,07	369,21±2,52	0,204±0,026	28,51±1,10

La densité a été mesurée avec un pycnomètre, la perte de masse mesurée par analyse thermogravimétrique a été utilisée pour le calcul de la quantité de MF greffés sur le SiO_2@MIP/NIP. Pour ces calculs, les poids moléculaires du MIP et du NIP ont été calculé sur la base des résultats obtenus par RMN. Le diamètre des particules a été mesuré par microscopie électronique à transmission (MET) (n = 30[a]), et par DLS (n = 3[b]) dans de l'eau milliQ à une concentration de 25 µg/mL. La même solution a été utilisée pour la mesure du potentiel zêta (n=3).

Pour estimer la proportion de chaque résidu dans le matériau final, chaque monomère fonctionnel a d'abord été analysé indépendamment pour identifier un signal caractéristique, chacun étant répertorié dans le Tableau 26. Enfin, les particules SiO_2@MIP-5, SiO_2@MIP-6, SiO_2@NIP-5-6 ont été agitées dans le NaOD 1,5 mol/L jusqu'à dissolution totale (soit environ 20h pour environ 40 mg de particules). Les solutions ont été analysées par RMN ^{1}H pour donner les spectres présentés en Figure 92 et dont les pourcentages de chaque MF ont été résumés dans le Tableau 26. La solution de sol a également été analysée dans les mêmes conditions pour vérifier le ratio de MF initial.

Tableau 26 - Composition en Si-AA-NH_2 des empreintes obtenues à partir des intégrales RMN normalisées et déplacements chimiques des signaux de référence

	MIP-5	MIP-6	NIP-5	NIP-6	sol	δ (ppm)
% Tyr	46,5	47,0	52,8	52,8	24,2	**6,83**
% Ser	14,0	16,6	10,9	10,9	31,5	**3,66**
% Arg	18,0	16,1	14,0	14,0	28,4	**1,65**
% Leu	21,5	20,4	22,4	22,4	15,9	**0,77**

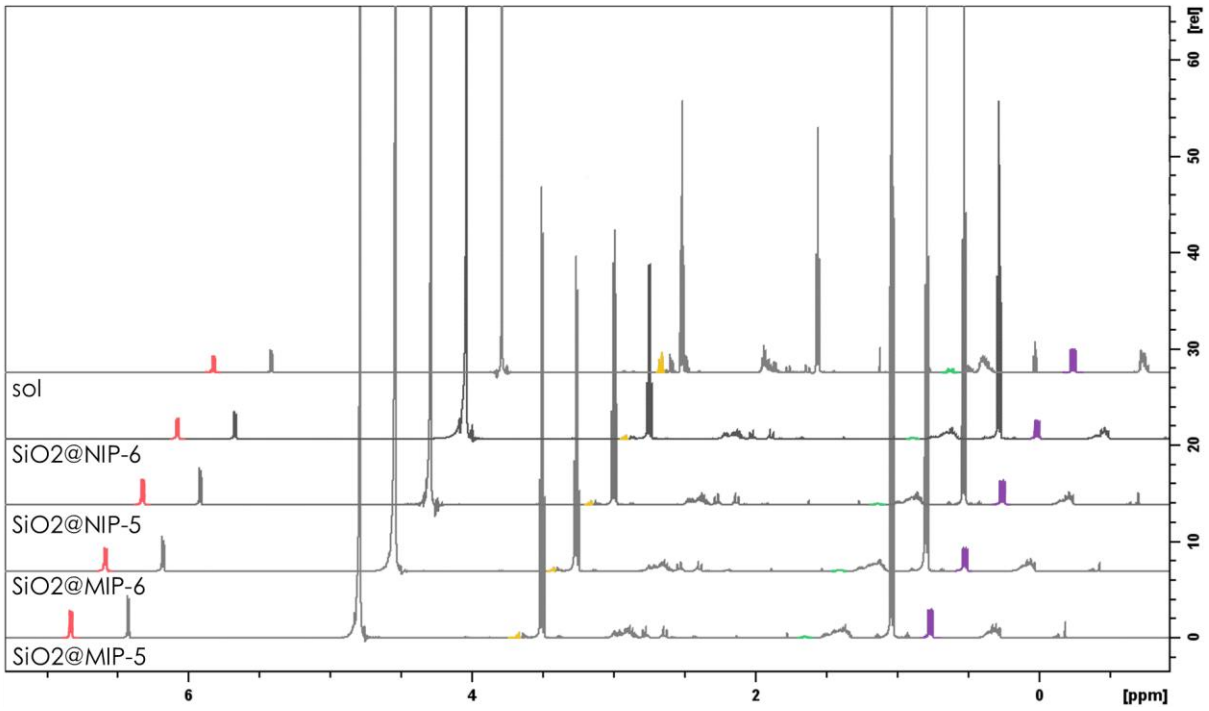


Figure 92 - Spectres RMN ^{1}H de SiO_2@MIP-5, SiO_2@MIP-6, SiO_2@NIP-5, SiO_2@NIP-6, et sol (600 MHz, NaOD 1,5 mol/L, 25°C).
Les signaux caractéristiques de chaque résidu sont en couleur (rouge : Tyr ; jaune : Ser ; vert : Arg ; violet : Leu)

La première observation que nous pouvons faire est que, bien qu'un mélange presque équimolaire ait été utilisé, les proportions en différents MF sont très variées, avec une forte représentation de la tyrosine. Ces différences de représentation pourraient être dues à des cinétiques d'hydrolyse et de condensation propres à chaque MF. Afin de confirmer notre hypothèse, des études de cinétique d'hydrolyse des Si-AA-NH_2 ont été réalisées par RMN ^{1}H

dans les conditions de synthèse du MIP pour expliquer les différences de proportions en MF entre le sol et les différents MIP/NIP (Figure 93). Pour cela, les proportions en Si-AA-NH_2, nanoparticules de silice (227 nm VS 214 nm pour Fe_3O_4@SiO_2) et triéthanolamine ont été adaptées pour un volume de 1 mL. Les acquisitions ont été effectuées dans un mélange D2O/MeOH-d4 (85/15, v/v) pendant 35 h.

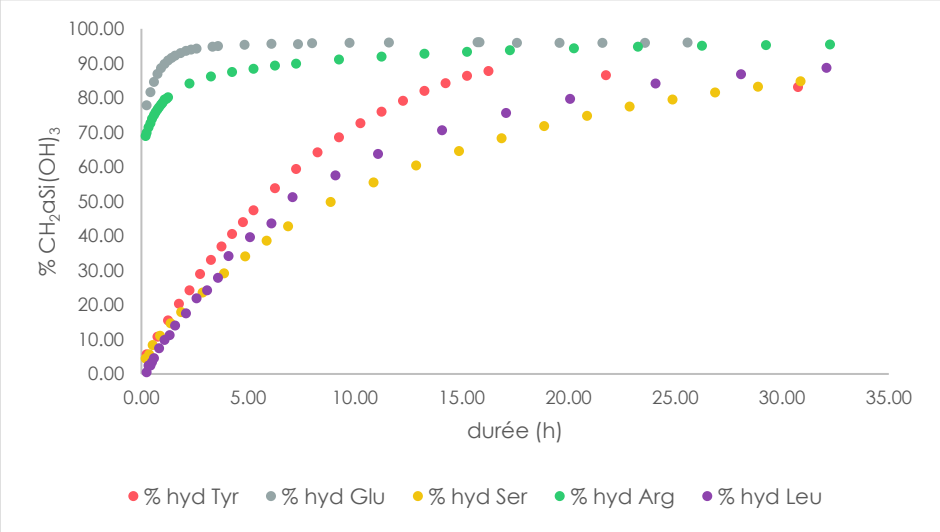


Figure 93 - Cinétique d'hydrolyse des Si-AA-NH_2 dans les conditions de synthèse des MIP

Comme attendu au vu des proportions en acides aminés dans les matériaux, la Si-Tyr-NH_2 s'hydrolyse plus rapidement que la Si-Ser-NH_2 et la Si-Leu-NH_2, ce qui explique cette différence de représentativité dans les matériaux. Curieusement, la Si-Arg-NH_2 semble s'hydrolyser beaucoup plus rapidement qu'attendu. Bien que la Si-Arg-NH_2 était partiellement hydrolysée avant le début de la cinétique, il semblerait que le plateau de l'hydrolyse soit atteint à environ 5h de réaction, alors qu'elle ne représente qu'environ 15% de la totalité des acides aminés (Tableau 26). La cinétique de la condensation peut ne pas être totalement dépendante de la cinétique d'hydrolyse. La Si-Arg-NH_2 pourrait donc s'hydrolyser très rapidement mais se condenser beaucoup plus lentement, expliquant cette faible représentativité dans le matériau final. De plus, la guanidine de l'arginine pouvant former un intermédiaire silylé pentacoordonné par attaque nucléophile[161], il se peut que, après condensation, la Si-Arg-NH_2 catalyse sa propre hydrolyse. Un équilibre entre une forme condensée et hydrolysée pourrait avoir lieu, entraînant un greffage partiel de la Si-Arg-NH_2. Enfin, la Si-Glu-NH_2 montre une cinétique d'hydrolyse rapide, ce qui est cohérent avec l'état d'hydrolyse des alcoxysilanes de ce monomère lorsque nous l'avons synthétisé (cf. Chapitre 3 paragraphe 2.3.3).

La seconde observation importante que nous pouvons faire est que, de façon surprenante au premier abord, les spectres RMN ^1H des SiO_2@NIP-5-6 et des SiO_2@MIP-5-6 montrent des compositions très similaires et ce, quel que soit la protéine utilisée. Cette grande similitude peut être expliquée par l'épaisseur des matériaux hybrides. En effet, seuls les acides aminés à la

surface du matériau vont pouvoir interagir avec les protéines, le reste étant piégé dans le matériau et donc inaccessible.

Pour vérifier cette hypothèse, le nombre de Si-AA-NH_2 en contact avec la protéine, par exemple le CytC, peut être estimé. Le nombre de CytC a été estimé précédemment à 0,25 CytC/nm². La DLS du Fe_3O_4@MIP-5 indique un diamètre de 259,8 nm. La densité de la silice (2,74 g/cm^3 - Tableau 24) et le volume de la particule (9,18.10^{-15} cm^3) permet d'en déterminer la masse (2,52.10^{-14} g). L'ATG indique 0,32 mmol de Si-AA-NH_2 par gramme de particules (Tableau 24), soit 8,05.10^{-15} mmol/NP. Grâce à la constante d'Avogadro, le nombre de Si-AA-NH_2/NP est calculé (4,85.10^9), correspondant à environ 22 850 Si-AA-NH_2/nm². Avec le nombre de Si-AA-NH_2 par nm² et le nombre de CytC par nm² (0,25), le nombre de Si-AA-NH_2 par CytC peut être déterminé et est estimé à 91420. Comme le CytC est composé de 105 résidus, au maximum, 105 Si-AA-NH_2 pourront être en contact avec le CytC, soit 0,115% du nombre total de Si-AA-NH_2 présents dans la couche hybride, ce qui explique la similarité des compositions des différentes MIP et NIP.

4.5 Etude des performances des Fe_3O_4@MIP-5 et Fe_3O_4@MIP-6

Pour étudier les performances de nos MIP, nous en avons d'abord évalué la sélectivité. Celle-ci correspond à l'affinité des empreintes créées vis-à-vis de la cible (ainsi que du nombre d'empreintes), c'est-à-dire à la proportion d'interactions spécifiques provenant de l'empreinte (MIP) par rapport aux interactions non spécifiques provenant du matériau en lui-même (NIP)[108]. La sélectivité peut donc être estimée à partir du facteur d'empreinte (FE). Pour évaluer la performance de nos MIP, nous avons d'abord calculé leurs facteurs d'empreintes (FE), pour leurs cibles respectives et également pour des protéines compétitrices, afin d'en déterminer leur sélectivité. Nous avons utilisé une microbalance à quartz (QCM) pour mesurer les interactions de nos MIP et NIP pour leurs protéines cibles et les protéines compétitrices, en immobilisant la protéine d'intérêt sur le capteur. Nous avons ensuite évalué la spécificité de nos empreintes, c'est-à-dire leur capacité à reconnaître leur cible vis-à-vis d'un ou plusieurs compétiteurs.[108] Nous avons réalisé un test ELISA modifié en mettant à profit le magnétisme de nos particules pour les immobiliser au fond des puits et ainsi estimer leur capacité de capture de la protéine cible (avec et sans protéine compétitrice) en la dosant avec un anticorps spécifique révélé par un anticorps secondaire couplé à de la streptavidine marquée à l'alkaline phosphatase.

4.5.1 QCM-d

Dans notre cas, nous avons choisi d'immobiliser différentes protéines à la surface du capteur afin de mesurer leur interactions avec les particules MIP ou NIP. Le capteur QCM-d en or a

d'abord été fonctionnalisé avec une monocouche auto-assemblée (SAM) d'acide 11-mercaptoundécanoïque (11-MUA), puis il a été placé dans la chambre QCM-d et stabilisé sous un flux d'eau milliQ. Les acides greffés sur la puce ont été activés avec EDC/NHS, puis la protéine, en solution à 0,1 mg/mL, est injectée dans le système, permettant l'immobilisation covalente avec la surface du capteur en formant non sélectivement des liaisons amides avec les amines ε des lysines et éventuellement avec l'amine N terminale. Une étape de capping, réalisée avec de l'éthanolamine (1 mol/L, pH 8,5), permet de consommer les esters n'ayant pas réagi en formant des motifs éthanolamides. L'ensemble de ces étapes de préparation est représenté en Figure 94.

Enfin, une suspension de particules de MIP ou de NIP à 25 µg/mL dans de l'eau milliQ (pH 7) a été injectée à 15 µL/min et leur rétention par les protéines immobilisées a été enregistrée en fonction du temps (Figure 94).

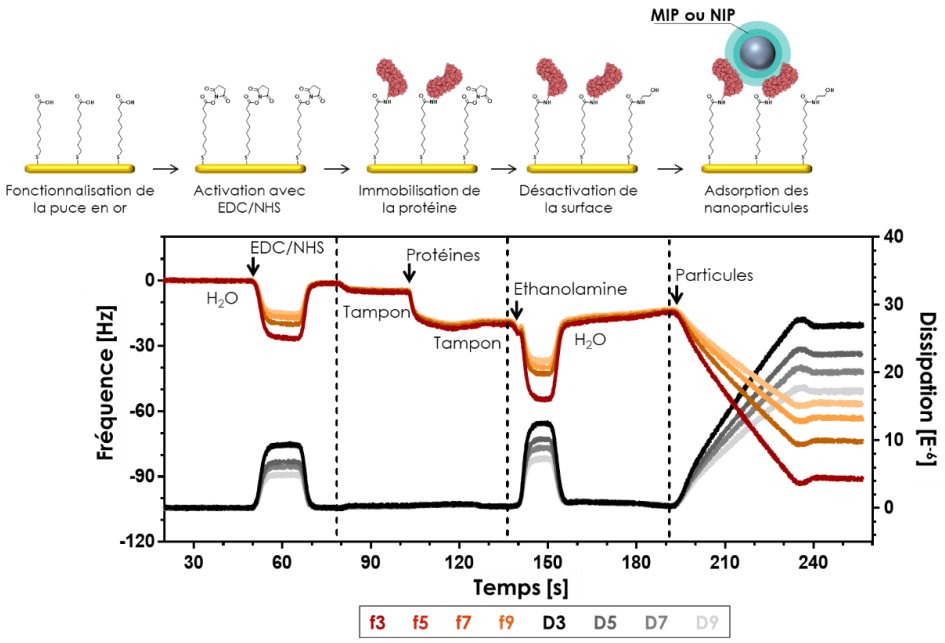


Figure 94 - Principe de l'analyse des MIP/NIP par microbalance à quartz avec étude de la dissipation

Nous avons commencé par évaluer les performances des MIP/NIP liant le CytC (Fe_3O_4@MIP-1 à 5 et Fe_3O_4@NIP-1 à 5). Le CytC a donc été immobilisé sur la puce en or. Pour vérifier l'immobilisation de la protéine, le modèle de Sauerbrey est utilisé (Équation 6). Ainsi, la densité de CytC immobilisée est de 27 ± 3 pmol/cm² (soit environ 0,16 CytC/nm²), avec une épaisseur de la couche de 2,67 ± 0,28 nm, correspondant à la formation d'une monocouche de CytC.

Le modèle de Sauerbrey ne pouvant être appliqué que lorsque la masse est adsorbée de façon covalente, la modification des harmoniques de fréquence et de dissipation a été utilisée pour appliquer le modèle viscoélastique. Ce modèle permet d'estimer la masse des particules adsorbées par unité de surface et ainsi de comparer leur capacité de reconnaissance pour

les différentes protéines testées. Le calcul a été effectué avec la fonction Smartfit du logiciel Dfind. La quantité de MIP et de NIP adsorbée sur la surface permet de déterminer le facteur d'empreinte (FE) du MIP. Ce facteur est représentatif de la performance du MIP. Plus le FE est élevé, plus le MIP est capable de lier sa cible par rapport au NIP.

$$FE = \frac{D_{MIP}}{D_{NIP}}$$

Équation 13 - Détermination du facteur d'empreinte (FE)
Où D_{MIP} est la densité de masse des particules MIP qui se lient à la couche de protéines de l'analyte (µg/cm²) et D_{NIP} est la densité de masse des particules NIP qui se lient à la couche de protéines de l'analyte (µg/cm²).

Les FE obtenus pour des MIP de protéines par sol-gel sur des nanoparticules magnétiques core-shell sont compris entre 1 et 4,79.[135,178,186–188]

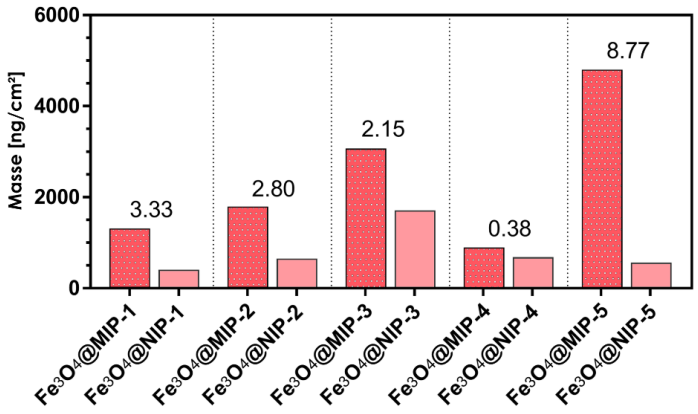


Figure 95 - Masse par cm² et facteur d'empreinte des particules MIP/NIP-1 à 5 liées au CytC immobilisé à la surface du capteur QCM-d

Les densités de masse obtenues pour les Fe_3O_4@MIP-2 et 3 sont de 1776,9 et 3051,09 ng/cm², montrant une augmentation significative par rapport au Fe_3O_4@MIP-1. Les MIP préparés à partir des Si-AA-NH_2 semblent mieux lier le CytC que le Fe_3O_4@MIP-1 préparé à partir des monomères commerciaux. Cependant, leurs facteurs d'empreintes sont plus faibles que celui du Fe_3O_4@MIP-1 (3,33 pour le Fe_3O_4@MIP-1, 2,80 pour le Fe_3O_4@MIP-2 et 2,15 pour le Fe_3O_4@MIP-3). Les Fe_3O_4@NIP préparés avec les Si-AA-NH_2 lient plus le CytC que le NIP préparé avec les monomères commerciaux, ce qui indique davantage d'interactions non spécifiques. Le Fe_3O_4@MIP/NIP-4 montre une plus faible liaison au CytC, ainsi qu'un facteur d'empreinte inférieur à 1, révélateur d'une empreinte infructueuse. Ce résultat est probablement dû à la forte agrégation de ce lot.

Les résultats les plus intéressants sont obtenus avec le Fe_3O_4@MIP-5, préparés uniquement avec nos blocs hybrides. Lorsque l'on utilise seulement nos MF pour préparer les empreintes (i.e. sans TEOS), on constate que le Fe_3O_4@MIP-5 obtenu se lie fortement à la cible (densité de masse : 4788,6 ng/cm²) tandis que le Fe_3O_4@NIP-5 se lie beaucoup moins (546,3 ng/cm²), conduisant à un facteur d'empreinte de 8,77, beaucoup plus élevé que les autres Fe_3O_4@MIP/NIP et

également très élevé en comparaison de la littérature (de 1 à 4,79).[135,178,186–188] Le Fe_3O_4@MIP-5 montre donc une forte capacité de liaison à sa cible et peu de liaison non spécifique. L'épaisseur du matériau plus faible, ainsi que la présence des Si-AA-NH_2, pouvant alors être considérée comme un biomimétique d'une surface de protéine. Ces empreintes sont capables de mieux récapituler les interactions protéine-protéine (Figure 95).

Les mêmes expériences ont pu être réalisées pour le Fe_3O_4@MIP/NIP-6 dirigé contre le Lyz. Pour cela, le Lyz a été immobilisé sur la puce en or en utilisant la méthode décrite précédemment. Dans ce cas également, le facteur d'empreinte du Fe_3O_4@MIP-6 est très élevé (8,75), ce qui indique que la méthode de préparation de nos MIP est suffisamment robuste pour être adaptée à d'autres protéines.

Pour approfondir la spécificité des Fe_3O_4@MIP/NIP-5 et 6 envers leur cible respective, l'interaction des nanoparticules pour d'autres protéines a été étudiée. Les protéines contrôles choisies dans la littérature ont parfois des tailles très différentes par rapport à la protéine modèle, ce qui conduit assez facilement à de bons résultats puisque les MIP discriminent les protéines par leur taille, et non par la possibilité de créer des interactions.[132,189]

De notre côté, pour évaluer la spécificité des MIP, nous avons choisi d'étudier l'effet de sa taille, mais également l'effet de sa charge en utilisant aussi des protéines relativement similaires en termes de tailles ou de point isoélectrique. Les performances des Fe_3O_4@MIP-5 et 6 ont donc été évaluées avec leur cible respective, le CytC et le Lyz, qui sont de tailles et de pI similaires, mais également avec la lactalbumine (Lac), qui est de taille similaire mais avec un pI différent, et avec l'albumine de sérum bovin (BSA) qui présente une taille et un pI différents (Tableau 27 et Figure 96). A chaque fois, les facteurs d'empreinte ont été calculés.

Tableau 27 - Propriétés des protéines et des couches de protéines immobilisées sur le capteur QCM-d

Protéine	MW (kDa)	Rayon hydrodynamique (nm)	pI	Densité de protéine immobilisée (pmol/cm²)	Epaisseur de la couche (nm)
CytC	12	1,7	9,6	27±3	2,67±0,28
Lyz	14	1,9	11,5	28±6	3,32±0,66
BSA	66	5,5	4,5	8±2	4,40±1,03
Lac	14	1,8	4,5	26±2	2,99±0,27

La première constatation que l'on peut faire est que, comme attendu, les Fe_3O_4@MIP-5 et 6 ne lient pas mieux la BSA ou la Lac que le Fe_3O_4@NIP. En effet, les Fe_3O_4@MIP-5 et 6 se lient environ 10 fois moins à la BSA et à la Lac qu'à leur protéine cible. Comme indiqué (Tableau 27), la BSA et la Lac ont des propriétés physicochimiques différentes du CytC ou du Lyz, ce qui permet une excellente discrimination.

En revanche, le Fe_3O_4@MIP-5 arrive tout de même à capturer le Lyz, de la même façon que le Fe_3O_4@MIP-6 capture le CytC (FE de 4,81 et 3,42, respectivement). Cela s'explique car le CytC

et le Lyz sont très similaires. Toutefois, ce FE reste inférieur à celui de leurs protéines cibles, ce qui indique une certaine spécificité.

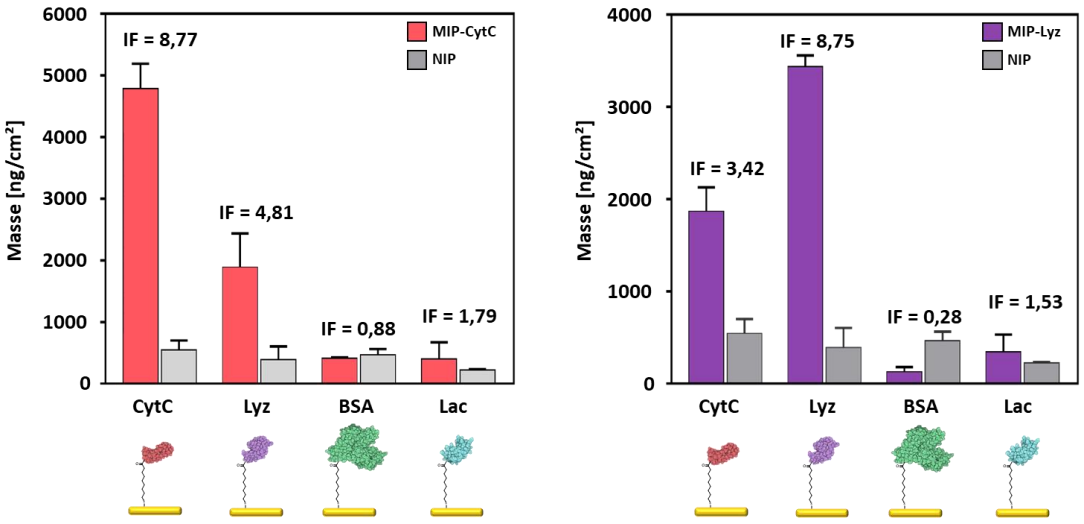


Figure 96 – Masse par cm² et facteur d'empreinte des particules MIP/NIP-5 et 6 liées aux protéines modèles (CytC et Lyz) et non modèles (BSA et Lac)

Bien que des interactions non spécifiques soient possibles, ces résultats mettent en évidence l'intérêt des MIP préparés avec des aminoacides silylés uniquement. Le réseau d'acides aminés silylés forme un matériau biomimétique avec des FE élevés qui peut interagir avec les différentes sites de la protéine cible. Le protocole de préparation des empreintes est robuste et peut être adapté à d'autres protéines.

4.5.2 ELISA magnétique

La liaison sélective de la protéine cible dans un mélange complexe est une condition nécessaire pour développer des applications de détection ou de séparation avec des MIP. Pour évaluer la sélectivité des MIP-5 et 6 vis-à-vis de leurs cibles, un test ELISA magnétique a été développé (Figure 97).

Le Fe_3O_4@MIP a été aimanté au fond d'une plaque 96 puits dont le fond est magnétique, facilitant les rinçages. Après immobilisation des particules avec une couche de BSA, la protéine cible (le CytC pour le Fe_3O_4@MIP-5 et le Lyz pour le Fe_3O_4@MIP-6) a été introduite dans le puits à différentes concentrations (de 0 à 2 µg/mL), seule ou en mélange avec une autre protéine (BSA, Lac, Lyz ou CytC) à une concentration fixe de 0,5 µg/mL. Après incubation et lavages, un anticorps primaire a été ajouté (anti-CytC pour le Fe_3O_4@MIP-5 et anti-Lyz pour le Fe_3O_4@MIP-6), suivi d'un anticorps secondaire conjugué à la biotine. La streptavidine, marquée à l'alcaline phosphatase, a été ajoutée dans les puits. Cette enzyme catalyse la transformation du *para*-nitrophénylphosphate (pNPP) en *para*-nitrophénol, détectable à 405

nm. Les courbes présentant l'absorbance en fonction de la concentration en protéine cible pour les Fe_3O_4@MIP/NIP-5 et 6 sont présentées en Figure 98.

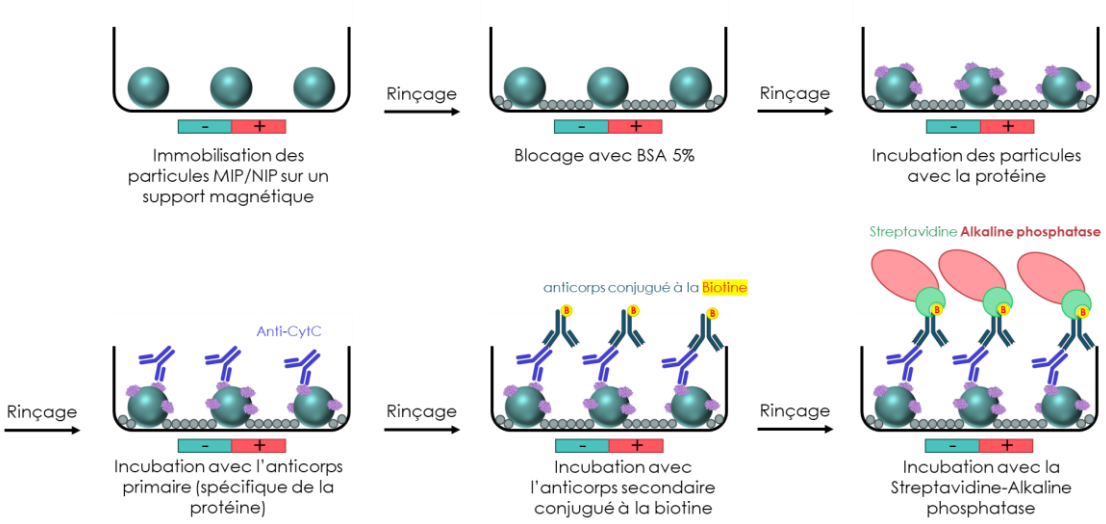


Figure 97 - Principe du test ELISA magnétique utilisé pour analyser la sélectivité des MIP : exemple du CytC

Comme attendu, en présence de la protéine cible seule dans le puits, une différence très importante de capture a été observée entre les MIP et les NIP. Pour le Fe_3O_4@MIP-5, la liaison du CytC augmente fortement avec la concentration en CytC (jusqu'à 0,83 AU – Figure 98, graphe MIP/NIP5, courbe rouge Fe_3O_4@MIP-5/CytC), alors qu'elle reste faible pour le Fe_3O_4@NIP-5 (jusqu'à 0,17 AU – Figure 98, graphe MIP/NIP5, courbe noire Fe_3O_4@NIP-5/CytC). De même pour le Fe_3O_4@MIP-6, la liaison au Lyz augmente avec la concentration (jusqu'à 1,76 AU – Figure 98, graphe MIP/NIP6, courbe violette Fe_3O_4@MIP-6/Lyz) alors que celle du Fe_3O_4@NIP-6 est faible (inférieur à 0,4 AU – Figure 98, graphe MIP/NIP6, courbe noire Fe_3O_4@NIP-6/Lyz). Ces résultats confirment la capacité de reconnaissance supérieure des MIP par rapport aux NIP.

La spécificité des MIP/NIP a été évaluée en présence d'une protéine compétitrice à une concentration fixe de 0,5 µg/mL. Lorsque la protéine est la BSA, aucune différence notable n'a été observée par rapport aux résultats avec la protéine modèle seule, pour le Fe_3O_4@MIP/NIP-5 et le Fe_3O_4@MIP/NIP-6. La présence de BSA n'a donc aucune incidence sur la capture du CytC par le Fe_3O_4@MIP-5 (Figure 98, graphe MIP/NIP5, courbe verte Fe_3O_4@MIP-5/CytC+BSA et noire Fe_3O_4@NIP-5/CytC+BSA), ni sur la capture du Lyz par le Fe_3O_4@MIP-6 (Figure 98, graphe MIP/NIP6, courbe verte Fe_3O_4@MIP-6/Lyz+BSA et noire Fe_3O_4@NIP-6/Lyz+BSA). Ce résultat est particulièrement intéressant et confirme les observations faites avec les mesures de QCM-d du paragraphe précédent (FE < 1 pour les Fe_3O_4@MIP-5 et 6 vers la BSA). En effet, comme discuté, la BSA est très différente des protéines cibles en termes de taille et de pI, elle n'est donc pas ou peu reconnue par les MIP du CytC et du Lyz.

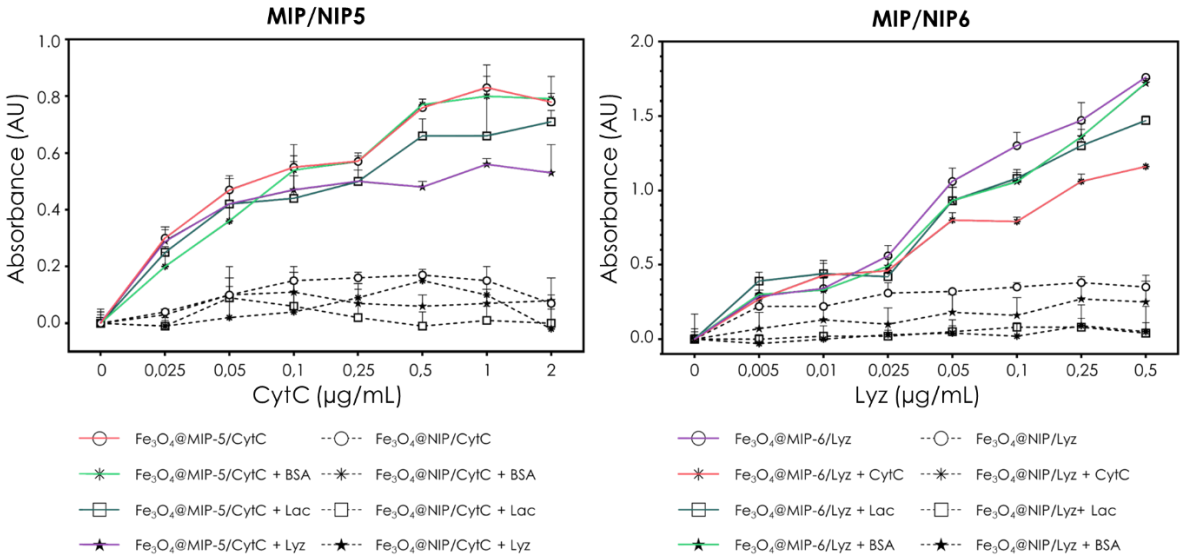


Figure 98 - Résultats des tests mELISA du Fe_3O_4@MIP/NIP-5 (gauche) pour le CytC seul et en mélange et du Fe_3O_4@MIP/NIP-6 (droite) pour le Lyz seul et en mélange

Les particules MIP/NIP ont été immobilisées à 5 µg/puits. La concentration de protéine compétitrice dans les mélanges a été fixée à 0,5 µg/mL. La concentration de CytC (gauche) ou de Lyz (droite) a varié de 0 à 2 µg/mL. Les barres verticales indiquent l'écart-type (n = 3).

En présence de Lac ou Lyz, la liaison du CytC par le Fe_3O_4@MIP-5 diminue légèrement de 10 à 20%. De même, en présence de Lac ou de CytC, la liaison du Lyz par le Fe_3O_4@MIP-6 diminue d'environ 20 à 30%. Les tailles et pI comparables du CytC et du Lyz peuvent expliquer que les protéines compétitrices puissent rentrer dans les empreintes et prendre la place de la protéine cible. Là encore, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par QCM-d, qui montrent quelques interactions non spécifiques entre le Lyz et le Fe_3O_4@MIP-5 et le CytC et le Fe_3O_4@MIP-6.

On peut se réjouir du fait que cet effet de compétition reste relativement faible et n'apparaisse qu'à des concentrations élevées (de 0,5 à 2 µg/mL pour le Fe_3O_4@MIP-5 et de 0,1 à 0,5 µg/mL pour le Fe_3O_4@MIP-6), sans affecter la spécificité ni la sélectivité à des concentration plus faibles (Figure 98).

4.6 Conclusion

Nous avons développé une nouvelle famille de MIP de protéines. La synthèse a lieu dans des conditions douces, permettant la conservation de la structure des protéines cibles.

Deux protéines à point isoélectrique élevé et de tailles similaires, le CytC et le Lyz, ont servi de modèles et ont été adsorbées à la surface de nanoparticules de silice à cœur magnétique. Les Si-AA-NH_2 décrits dans la section précédente ont été utilisés pour préparer ces empreintes. A cause des difficultés rencontrées lors de la synthèse du Si-Glu-NH_2, nous ne l'avons pas obtenu à temps pour l'intégrer dans le mélange de MF. De nouveaux MIP incluant ce

précurseur seront préparés après la rédaction de ce manuscrit. L'absence de TEOS et l'utilisation exclusive de nos monomères fonctionnels forment un matériau hybride constitué presque uniquement d'aminoacides qui, en ce sens, peut être considéré comme biomimétique des surfaces de paratopes.

La faible épaisseur des matériaux hybrides (inférieure à 10 nm) permet une exposition des empreintes à la surface de la particule (0,25 empreinte/nm²), facilitant l'élimination de la protéine lors de la synthèse du MIP, mais également sa liaison par la suite.

Les facteurs d'empreinte obtenus avec nos nouveaux monomères fonctionnels sont plus élevés que ceux obtenus avec les alcoxysilanes commerciaux classiquement utilisés, montrant l'intérêt de l'utilisation de dérivés d'acides aminés pouvant mimer les interactions protéine-protéine. Bien qu'aucune différence dans la composition de la couche hybride n'ait été observée, la différence de potentiel zêta, ainsi que les tests QCM-d et mELISA, montrent des compositions différentes en aminoacides à la surface, conduisant à une certaine sélectivité et spécificité des deux MIP.

5 Empreintes d'épitopes

Une des stratégies employées pour obtenir des MIP capables de reconnaître une protéine ciblée est de préparer des empreintes d'épitopes (cf. Chapitre 1 paragraphe 3.6). Dans le cas des empreintes moléculaires de protéines, un épitope est une séquence de la protéine cible, de préférence structurée comme une hélice α accessible, qui est utilisée comme modèle pour préparer le MIP.

L'empreinte obtenue est censée reconnaître la protéine possédant cet épitope. Un peptide étant plus stable qu'une protéine, cette stratégie permet d'élargir les conditions de synthèse (température, pH, solvants organiques…). De plus, une protéine peut présenter des régions similaires à d'autres protéines, limitant la spécificité des empreintes. Les empreintes d'épitopes peuvent résoudre ce problème.[190,191]

Cette approche présente toutefois deux verrous importants. D'abord, un peptide ne pèse que quelques kDa, et ne s'adsorbe pas aussi facilement qu'une protéine à la surface d'un matériau. Nous avons donc jugé préférable de l'immobilier de façon covalente grâce à un lien clivable, permettant à la fois de l'attacher mais également de le retirer après la génération des empreintes dans des conditions ne dénaturant pas le MIP.

Ensuite, les peptides utilisés dans la littérature sont courts et lorsqu'ils sont retirés de leur contexte protéique, ils perdent certainement leur structure, donnant lieu à des empreintes non pertinentes.[110]

Nous avons donc envisagé d'utiliser des peptides agrafés, qui présentent une liaison covalente entre deux résidus (i – i+4 ou i – i+7) permettant d'induire et de stabiliser la structure en hélice α.[192]

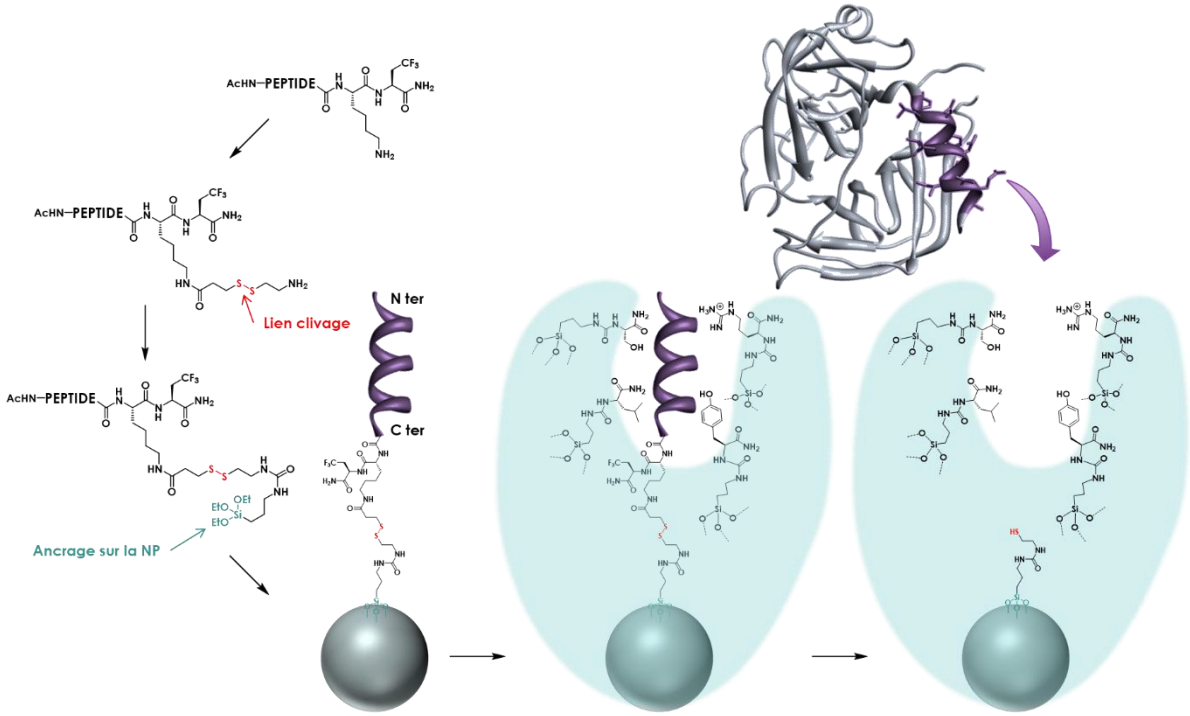


Figure 99 - Stratégie générale de la synthèse d'empreintes de l'épitope de la kallikréine

5.1 Synthèse de l'épitope

5.1.1 Choix de l'épitope

La kallikréine porcine pancréatique a été choisie comme modèle pour cette stratégie d'empreintes d'épitope. Structurellement proche de la kallikréine 3 humaine (KLK3), cette protéine présente un intérêt thérapeutique car sa présence est corrélée au cancer de la prostate.[193] Le domaine C terminal de la kallikréine est accessible et se présente en hélice α (Figure 100), ce qui en fait un excellent modèle pour la synthèse d'empreintes d'épitopes. La séquence d'intérêt est le dodécapeptide Y^{234}LDWIDDTITEN^{245}.

5.1.2 Conception des peptides

Nous avons choisi d'utiliser une stratégie d'agrafe hydrocarbonée[194–196] développée originellement par Verdine.[192] L'agrafe est obtenue en remplaçant deux résidus situés sur la même face de l'hélice α par des acides aminés non naturels : la (S)-pentenylalanine (ou S5) ou la (R)-octenylalanine (ou R8). Pour éviter tout biais d'interaction lié à l'agrafe, celle-ci est positionnée vers l'intérieur de la protéine. De cette manière, les résidus situés à la surface de la

protéine seront tous représentés et pourront générer des interactions avec les monomères fonctionnels.

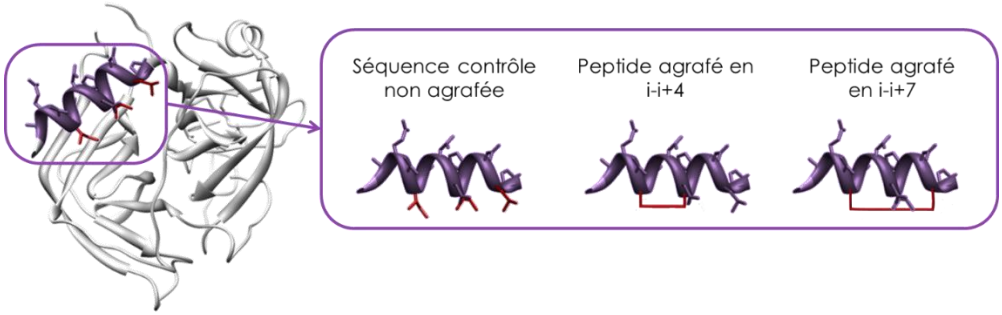


Figure 100 - Structure de la kallikréine porcine pancréatique (PDB : 2PKA) et des peptides synthétisés L'hélice d'intérêt est en violet et les résidus impliqués dans l'agrafe en rouge.

Deux peptides agrafés ont été imaginés. Le premier présente une agrafe en i – i+4 en remplaçant les deux résidus isoleucine par deux S5 (composé B21 - Figure 101). Le second présente une agrafe en i – i+7 en remplaçant la leucine 235 par un résidu R8 et l'isoleucine 242 par un résidu S5 (composé B22 - Figure 101). De plus, une séquence linéaire contrôle sans modification est également synthétisée (composé B20 - Figure 101).

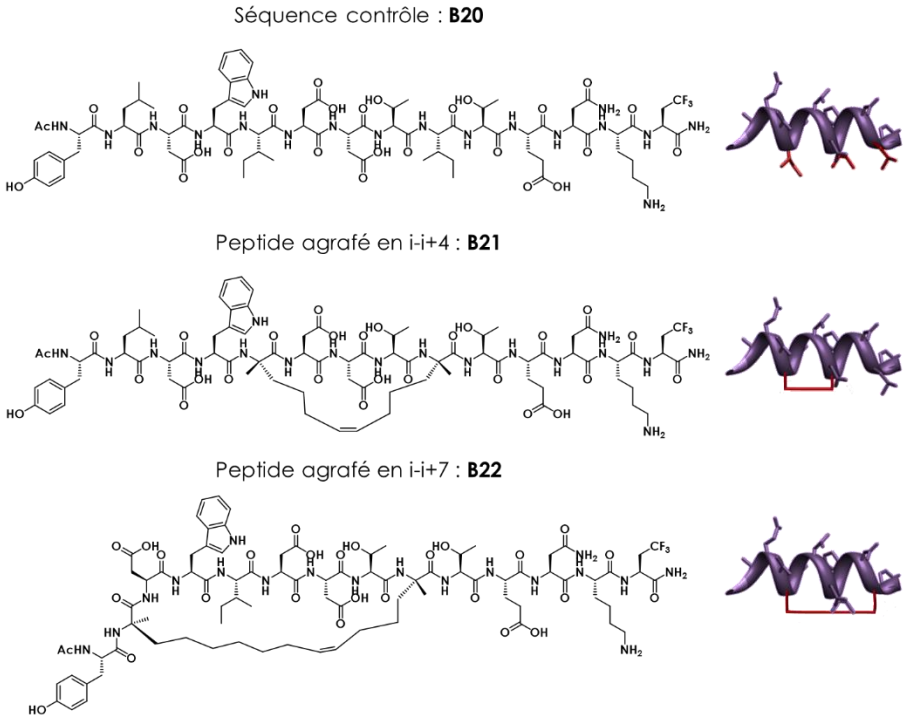


Figure 101 - Structures des peptides imaginés

5.1.3 Synthèse des peptides

Les peptides ont été synthétisés par stratégie Fmoc/tBu par SPPS sur une résine ChemMatrix RinkAmide (0,49 mmol/g). Une fois l'élongation terminée et après un microclivage pour contrôler la séquence, la métathèse a été effectuée sur support solide au micro-ondes

pendant 15 minutes à 80°C en utilisant 0,4 équivalents de catalyseur de Hoveyda-Grubbs. La réaction a été contrôlée par LC/MS après un second microclivage. Non totale, la métathèse provoque un certain nombre de sous-produits non identifiables (Figure 102). Nous avons donc choisi de ne pas relancer la réaction et les peptides ont été clivés du support pour être purifiés par HPLC préparative.

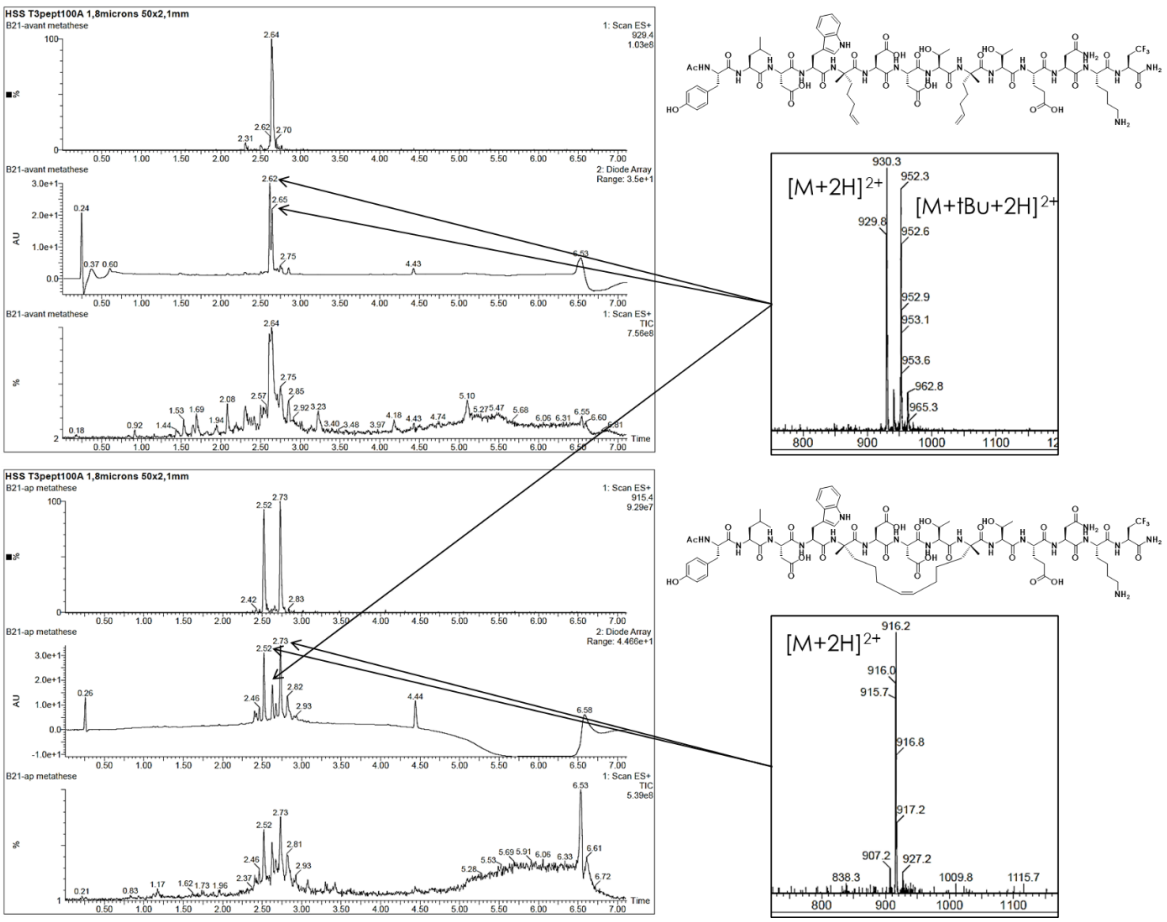


Figure 102 - Produits secondaires formés pendant la métathèse. Exemple du composé B21. Le chromatogramme du haut correspond au microclivage avant la métathèse, le chromatogramme du bas correspond au microclivage après la métathèse.

5.1.4 Analyse de l'hélicité par dichroïsme circulaire

L'hélicité des trois peptides a été contrôlée par dichroïsme circulaire.

Lors d'une mesure de dichroïsme circulaire, les polarisations droite et gauche de la lumière sont alternativement envoyées vers un échantillon, avec la même intensité et la même longueur d'onde. Lorsque l'échantillon a une structure chirale, comme dans une hélice, l'une des deux polarisations sera plus absorbée que l'autre : c'est le pouvoir dichroïque. La liaison peptidique étant le chromophore d'intérêt, ces expériences sont réalisées entre 195 et 260 nm, la plage d'absorbance de la liaison peptidique. Le pouvoir dichroïque de l'échantillon, mesuré par le polarimètre sur cette plage de longueur d'onde et exprimé en millidegrés, peut être converti

en ellipticité moyenne par liaison peptidique à 222 nm (MRE : *mean residue ellipticity*), puis en pourcentage d'hélicité selon l'équation suivante :

$$\%\ hélicité = \frac{MRE(222) * 100}{-39500\left(1 - \frac{2.57}{nombre\ liaisons\ peptidiques}\right)}$$

Équation 14 - Détermination du pourcentage d'hélicité à 222 nm[195]

La structure des trois peptides est évaluée par dichroïsme circulaire dans les conditions de synthèse des empreintes. Des solutions à 200 µmol/L sont préparées dans un mélange eau/triéthanolamine (99,9/0,1, v/v) contenant 0, 10, 20, 30, 40 et 50% de trifluoroéthanol, le TFE favorisant la structure en hélice. En effet, dans le cas de l'empreinte d'épitopes, les conditions biocompatibles ne sont pas nécessaires pour conserver la structure tridimensionnelle de la cible. L'Équation 14 a permis de déterminer les pourcentages d'hélicité des trois peptides dans les différentes conditions testées et sont résumées dans le Tableau 28.

Tableau 28 - Pourcentage d'hélicité des composés B20 à B22 en fonction du pourcentage de TFE

Composé	0% TFE	10% TFE	20% TFE	30% TFE	40% TFE	50% TFE
B20	8	4	13	14	21	22
B21	11	12	15	20	17	20
B22	14	14	15	20	23	21

Comme attendu, le pourcentage d'hélicité augmente avec le pourcentage de TFE dans l'échantillon. Il atteint une valeur critique autour de 20% d'hélicité à partir de 30% de TFE pour les deux peptides agrafés (B21 et B22) et 40% de TFE pour le peptide non agrafé (B20). Le gain en pourcentage d'hélicité pour le peptide agrafé B22 (i-i+7) n'étant que d'environ 5%, nous estimons que les 14% d'hélicité montrés dans 0% TFE sont suffisants pour la synthèse d'empreintes d'épitope.

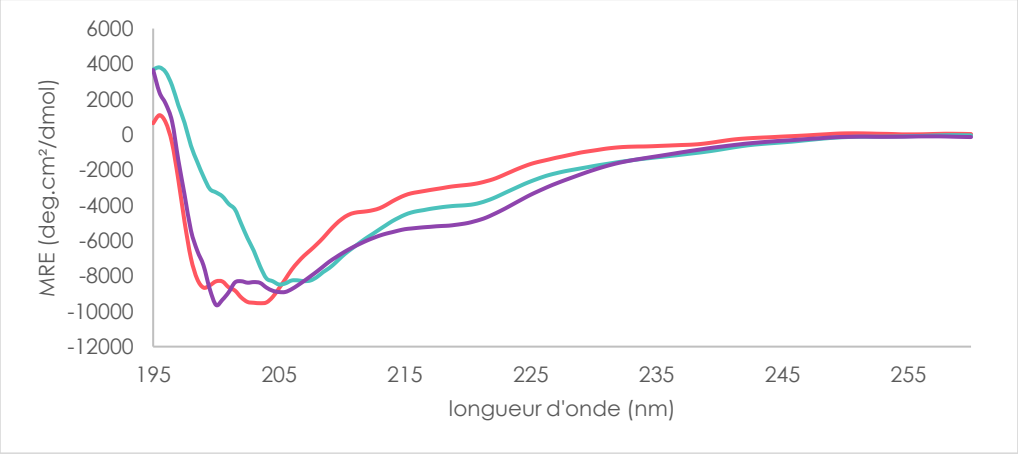


Figure 103 - Spectres dichroïques des composés B20 à B22 à 200 µmol/L dans de l'eau contenant 0,1% de triéthanolamine
La courbe rouge correspond au produit B20, la courbe bleue au produit B21 et la courbe violette au produit B22.

De plus, la différence d'hélicité entre les composés B20 (non agrafé), B1 (agrafe i-i+4) et B22 (agrafe i-i+7) pourrait montrer l'intérêt de l'agrafe dans cette stratégie. Comme on ne connaît pas les effets du TFE sur les propriétés physico-chimiques des matériaux hybrides obtenus avec nos monomères fonctionnels, des empreintes d'épitopes dans les conditions originales de synthèse de MIP (sans TFE) seront synthétisées dans un premier temps. En fonction des résultats, il sera envisagé de préparer de nouvelles empreintes en présence de TFE.

5.1.5 Introduction du lien clivable et synthèse des empreintes

Comme mentionné au début du chapitre, les peptides doivent posséder un lien clivable pour être retirés du matériau une fois les empreintes synthétisées. La position de ce lien est primordiale pour optimiser les interactions entre le matériau et la cible. L'hélice étant dans le domaine C terminal de la protéine, nous avons décidé de positionner le lien du côté C terminal du peptide (Figure 99). De plus, ce lien doit être clivable dans des conditions qui n'altèrent pas le matériau, ici dans des conditions pouvant réduire un pont disulfure.

L'acide 3-(2-aminoéthyle-disulfanyle)propanoïque possède un pont disulfure, dispose d'une amine primaire pouvant être silylée avec l'ICPTES et possède une fonction acide qui pourra être couplée à l'amine ε de la lysine que nous avons introduite du côté C-ter du peptide agrafé. De cette manière, le peptide peut être greffé sur la nanoparticule de silice par son côté C terminal et libéré du matériau dans des conditions n'altérant pas la structure de l'empreinte et ne laissant qu'une fonction thiol à la surface de la particule.

Au moment de la rédaction de ce manuscrit, seules la synthèse, la purification et l'analyse de l'hélicité des composés B20 à B22 ont été réalisées.

Le lien acide 3-((2-(*tert*-butoxycarbonylamino)éthyle)disulfanyle)propanoïque sera couplé en solution sur l'amine ε de la lysine. Pour éviter toute réaction secondaire liée aux quatre acides carboxyliques présents sur le peptide (cyclisation intra ou intermoléculaire par exemple), l'acide sera préactivé avec DIC/OxymaPure pendant 20 min à 0°C avant d'être ajouté goutte à goutte au peptide en solution. Comme le carbone en α de l'acide n'est pas un carbone asymétrique, la préactivation pourra avoir lieu sans risque d'épimérisation. Une fois la réaction terminée (suivi LC/MS), le peptide sera précipité dans de l'éther diéthylique, séché sous vide et caractérisé par LC/MS. La silylation se fera après déprotection de l'amine N-Boc du lien clivage avec l'ICPTES dans le DMF anhydre en présence de DIEA, comme les peptides silylés et les PEG-peptides silylés du chapitre précédent.

Etant donné les difficultés rencontrées lors des greffages des ligands silylés sur des nanoparticules via leurs alcoxysilanes présentées dans chapitre précédent, différentes conditions seront testées afin d'obtenir le meilleur greffage possible. Le greffage ayant lieu

dans des conditions acides, des essais dans de l'eau acidifiée à pH 2 pourront être envisagés, ainsi que dans du DMF avec différentes proportions d'acide acétique (de 1 à 10%). La quantité de peptides immobilisés sur les nanoparticules sera estimée par RMN ^{19}F en utilisant du trifluoroéthanol comme étalon interne (δ(TFE) = -76,2 ppm ; δ(Ala(CF_3)) = -63,4 ppm).

Les empreintes pourront ensuite être synthétisées en utilisant les conditions de synthèse des Fe_3O_4@MIP/NIP-5 et 6. De plus, le Si-Glu-NH_2 sera ajouté comme monomère anionique pour compléter le panel des interactions de nos empreintes. Une fois les empreintes obtenues, le peptide modèle sera retiré des nanoparticules en réduisant le pont disulfure. De nouvelles analyses RMN ^{19}F permettront de vérifier le retrait de la totalité du peptide, avant d'amorcer l'évaluation des performances des MIP obtenus.

5.2 Conclusion

Dans cette section, la stratégie de synthèse de MIP par empreintes d'épitopes a été présentée. Pour cela, deux peptides agrafés et un peptide contrôle, silylés sur une position stratégique et possédant une fonction clivage entre la fonction polymérisable et le peptide, ont été synthétisés et obtenus avec succès. Le greffage et la synthèse des MIP sont en cours de préparation.

6 Vers des MIP sur différents supports

Les empreintes des protéines entières à la surface de nanoparticules sont très prometteuses pour de multiples applications, comme de nouvelles méthodes de détection de protéines. Préparer des MIP directement sur les supports d'analyse pourrait ouvrir ce champ d'application, c'est pourquoi le protocole développé sur les nanoparticules est adapté à la synthèse de MIP sous forme de film directement sur une puce de microbalance à quartz, et également dans les capillaires d'EC.

6.1 Sur les puces de la QCM-d

Le protocole de synthèse des MIP à la surface des nanoparticules est adapté pour préparer un film sur une puce QCM-d en silice présentant des empreintes du CytC. Le Si-Glu-NH_2 ayant été obtenu, celui-ci est ajouté aux autres monomères fonctionnels.

Une première mixture, contenant les monomères Tyr, Ser, Arg et Glu en proportion équimolaire (0,02 mmol de chaque monomère), a été préparé dans un mélange eau/éthanol (95/5, v/v). Cette mixture de monomères fonctionnels a présenté de nombreux agrégats, empêchant son injection sur la puce QCM-d. Ces agrégats étaient très probablement dus aux interactions ioniques entre la Si-Arg-NH_2 et le Si-Glu-NH_2. Une nouvelle mixture, contenant les cinq monomères fonctionnels, a été préparée en diminuant par 5 la quantité de Si-Arg-NH_2 et de Si-Glu-NH_2. Une mixture totalement soluble a été obtenue. La protéine modèle (CytC) ainsi que le catalyseur (triéthanolamine) ont pu être ajoutés à la mixture.

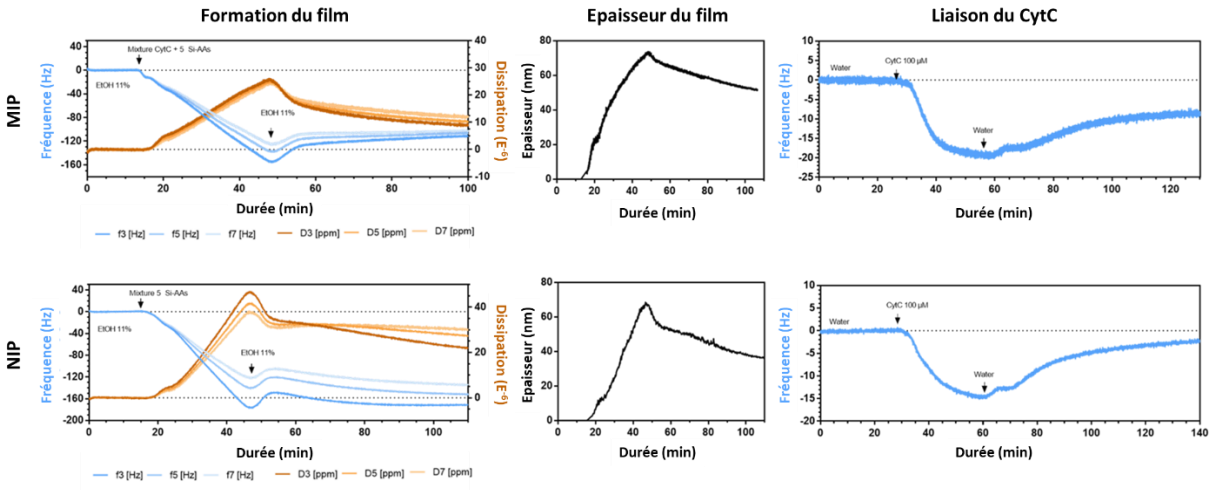


Figure 104 - Préparation des films, estimation de l'épaisseur et liaison avec le CytC

Finalement, une solution contenant 17 µmol de Si-Tyr-NH_2 et de Si-Leu-NH_2, 20 µmol de Si-Ser-NH_2, 4 µmol de Si-Arg-NH_2 et de Si-Glu-NH_2, 2,5 µmol de triéthanolamine et 0,2 µmol de CytC dans 1,8 mL d'un mélange eau/éthanol (88/22, v/v) a été préparée. Après 10 minutes

d'incubation, le mélange a pu être injecté sur le capteur à 15 µL/min pendant 30 minutes. Les modifications de fréquence et de dissipation permettent de suivre en temps réel la formation du film (Figure 104). Le CytC est éliminé du film par rinçage avec une solution de Glycine.HCl à 10 mmol/L (pH 1,7) pendant 20 minutes à 15 µL/min puis à l'eau milliQ. Le NIP a été préparé de la même façon sans le CytC.

Le logiciel de traitement Dfind a permis de déterminer les épaisseurs du MIP et du NIP, qui sont de 50 nm et de 40 nm respectivement. L'injection du CytC sur les deux capteurs a permis de mesurer la capacité de liaison du MIP et du NIP pour le CytC. La densité de masse du CytC lié au film, déterminée par l'équation de Sauerbrey (Équation 7), est de 159,3 ng/cm² pour le MIP et 53,1 ng/cm² pour le NIP, ce qui représente un facteur d'empreinte de 3 (Équation 13). Les expériences de liaisons avec des protéines compétitrices sont en cours pour déterminer la spécificité de l'empreinte.

6.2 Dans les capillaires d'électrophorèse capillaire

Les MIP ont été préparés dans les capillaires nus en silice fondue avec une dimension de 30 µm de diamètre interne, 375 µm de diamètre externe, 20 cm de longueur effective, 30 cm de longueur totale. Deux stratégies ont été employées pour obtenir des empreintes à l'intérieur d'un capillaire et dans chaque cas, un MIP de Lyz et un MIP de CytC ont été synthétisés, ainsi que les NIP correspondants.

Pour chaque capillaire préparé (MIP-2D-CytC, MIP-2D-Lyz, NIP-2D ; MIP-3D-CytC, MIP-3D-Lyz, NIP-3D), la capacité de reconnaissance des empreintes obtenues a été évaluée avec trois protéines proches en termes de taille et de point isoélectrique : le CytC, le Lyz et la RibA.

Des tests d'adsorption de nos protéines cibles (CytC et Lyz) ont été réalisés sur des capillaires en silices fondues, permettant de confirmer l'adsorption dans nos conditions d'injection (cf. Chapitre 3 paragraphe 3.4)

6.2.1 Stratégie 2D

Les MIP ont d'abord été préparés directement sur les parois du capillaire nu en silice fondue. Dans un premier temps, la protéine a été adsorbée sur les parois internes du capillaire (10 min à 20 psi).

Le MIP a ensuite été préparé en injectant un mélange équimolaire de Si-Tyr-NH_2, Si-Ser-NH_2 et Si-Arg-NH_2 utilisés comme monomères fonctionnels (20 µmol de chaque MF dans 1,75 mL d'une solution eau/EtOH (88/12, v/v) avec 40 µL de triéthylamine, 10 min à 20 psi). La formation de la

couche de matériau hybride a été confirmée par la modification du flux électroosmotique, dépendant de l'état de charge du capillaire (cf. Chapitre 3 paragraphe 3.1)

Enfin, le capillaire a été plusieurs fois lavé pour éliminer les MF n'ayant pas réagi (éthanol, éthanol/eau, eau) puis la protéine est décrochée du capillaire avec une solution d'HCl 0,1 mol/L.

Un capillaire NIP-2D a été préparé de la même manière sans l'adsorption de la protéine.

Pour évaluer les performances de nos MIP-2D en capillaire, les protéines testées (CytC, Lyz et RibA) ont été injectées et séparées en mode électrochromatographique dans du BGE (pH 7) avec une tension appliquée de +10 kV.

6.2.2 Stratégie 3D

Afin d'augmenter sa surface spécifique, et donc le nombre d'empreintes au sein du capillaire, un monolithe a été synthétisé à l'intérieur du capillaire avec une solution pré-hydrolysée de méthyltriméthoxysilane (MTMS) dans un mélange MeOH/HNO_3 1 mol/L (62/38, v/v). Les monolithes préparés à partir du TMOS rencontrent souvent des problèmes de rétrécissement des pores, c'est pourquoi le MTMS a été choisi comme précurseur. De plus, l'utilisation de méthanol comme solvant et comme agent porogène a permis l'obtention d'un monolithe présentant des pores d'environ 15 µm.[197]

Une fois le monolithe synthétisé à l'intérieur du capillaire, l'imagerie MEB et la microscopie optique ont permis de vérifier sa répartition et sa porosité uniformes au sein du capillaire (Figure 105). De plus, la détection du DMSO dans différentes conditions d'injections a permis de vérifier la bonne perméabilité du monolithe.

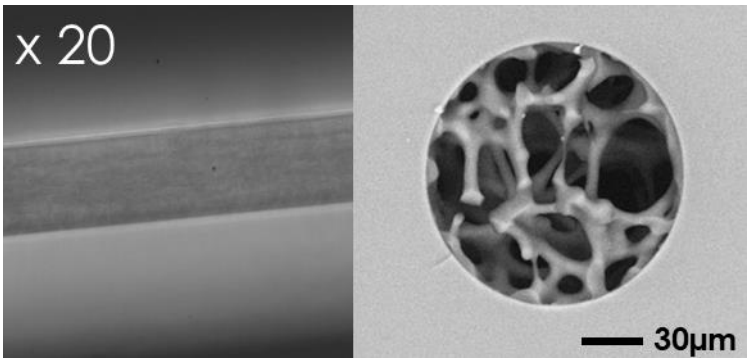


Figure 105 - Synthèse du monolithe dans le capillaire
A gauche une analyse en microscopie optique avec un grossissement fois 20. A droite une image MEB d'une coupe du capillaire où les pores sont visibles.

La protéine cible (le CytC ou le Lyz) est ensuite adsorbée dans le capillaire. La présence du monolithe impliquant une forte contre-pression (comparé à la stratégie 2D), la protéine a été injectée pendant 10 min à 50 psi.

Pour pouvoir comparer les deux stratégies, la même solution de MF a été préparée et a été injectée 10 min à 50 psi pour compenser la contre-pression. La formation de la couche de matériau hybride a également été confirmée par la modification du flux électroosmotique du capillaire.

Comme précédemment, le capillaire a été plusieurs fois lavé pour éliminer les MF n'ayant pas réagi (éthanol, éthanol/eau, eau) puis la protéine est décrochée du capillaire avec une solution d'HCl 0,1 mol/L.

Un capillaire NIP-3D a été préparé de la même manière sans l'adsorption de la protéine.

Une fois le MIP (ou le NIP) préparé sur le monolithe, des premiers essais d'injections et de séparations ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour la stratégie 2D. Les protéines n'ont pas pu être extraites des capillaires dans le BGE (pH 7), il a fallu ajouter 30% d'ACN au BGE pour désorber les protéines des MIP-3C. Dans ces conditions, il n'était pas possible de stabiliser le courant électrique nécessaire à une séparation électrochromatographique. Les protéines ont donc été analysées en mode chromatographique en appliquant une pression de 50 psi.

6.2.3 Capacité de reconnaissance des MIP en capillaires

Nos deux protéines cibles (CytC et Lyz) et une protéine compétitrice (RibA) ont été injectées indépendamment pour déterminer leur temps de rétention (t_r) dans chaque capillaire (MIP-2D-CytC, MIP-2D-Lyz, NIP-2D en mode électrochromatographique ; MIP-3D-CytC, MIP-3D-Lyz, NIP-3D en mode chromatographique). Plus le temps de rétention est élevé, plus la protéine est retenue par le capillaire, et donc par l'empreinte lorsque le capillaire est un MIP. C'est par exemple le cas du MIP-3D-Lyz par rapport au NIP-3D. En effet, les chromatogrammes enregistrés pour l'injection de ces trois protéines dans le capillaire NIP-3D montrent un temps de rétention identique, révélant aucune sélectivité du NIP. Lorsque ces protéines sont injectées dans le capillaire MIP-3D-Lyz, le Lyz est beaucoup plus retenu que le CytC et la RibA (tr = 12,61 ; 11,97 et 11,76 min respectivement, Figure 106).

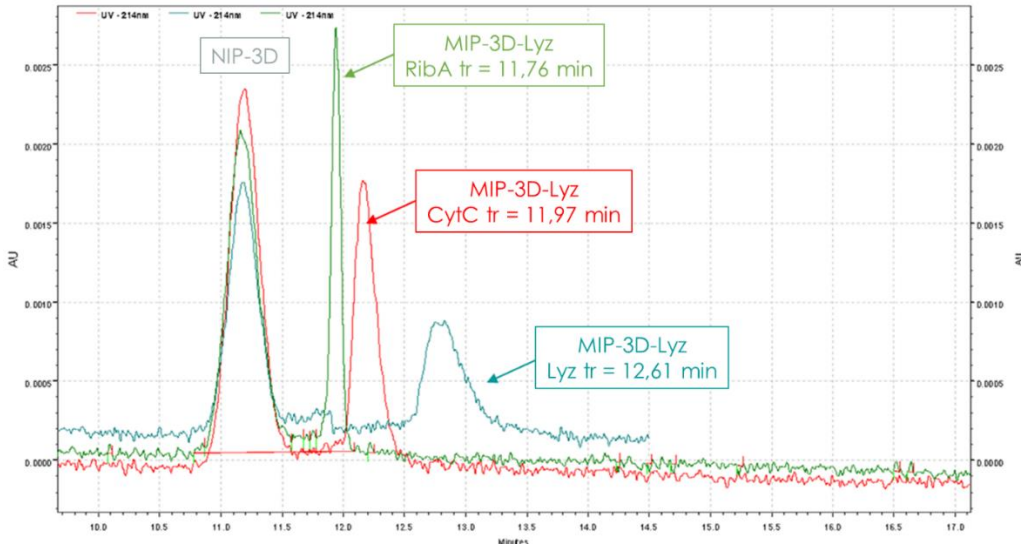


Figure 106 - Comparaison des électrophérogrammes obtenus dans les capillaires NIP-3D et MIP-3D-Lyz pour le Lyz (en bleu), le CytC (en rouge) et la RibA (en vert)

Le facteur de rétention, lié au temps de rétention et déterminé à partir de l'Équation 15, est représentatif de la capacité du capillaire à capturer une protéine.

$$k = \left(t_r \times (\mu_{EOF} + \mu_{EP}) \times \frac{V}{l.L}\right) - 1$$

Équation 15 - Détermination du facteur de rétention k, où t_r est le temps de rétention, μ_{EOF} le flux électroosmotique, μ_{EP} la mobilité électrophorétique, V la tension, l la longueur de détection et L la longueur du capillaire

Les facteurs de rétention du MIP et du NIP permettent d'obtenir le facteur d'empreinte du capillaire (Équation 16).

$$FE = \frac{k_{MIP}}{k_{NIP}}$$

Équation 16 - Détermination du facteur d'empreinte à partir des facteurs de rétention

Les facteurs d'empreinte obtenus pour nos MIP (2D et 3D) en capillaire montrent que notre méthode de préparation d'empreintes fonctionne. En effet, peu importe la stratégie employée (2D ou 3D), le FE de chaque MIP pour sa protéine cible est supérieur à 2, révélateur d'une bonne sélectivité, ainsi que des FE toujours inférieurs pour les protéines compétitrices, indiquant une bonne spécificité (Figure 107).

Nous pouvons également constater des FE impressionnants d'environ 5 pour les MIP-3D-CytC et MIP-2D-Lyz. Ce résultat est d'autant plus intéressant que leurs analogues, le MIP-2D-CytC et le MIP-3D-Lyz, présentent des FE plus faibles (d'environ 2). Mis à part le mode de séparation, la différence notable entre la stratégie 2D et la stratégie 3D est la présence d'ACN en stratégie 3D. La présence d'ACN pourrait donc améliorer les propriétés de reconnaissance du MIP du CytC, tandis que l'absence d'ACN améliorerait les performances du MIP du Lyz. Pour vérifier

cette hypothèse, une injection avec 30% d'ACN dans le BGE pourrait être réalisée dans les MIP-2D (Figure 107).

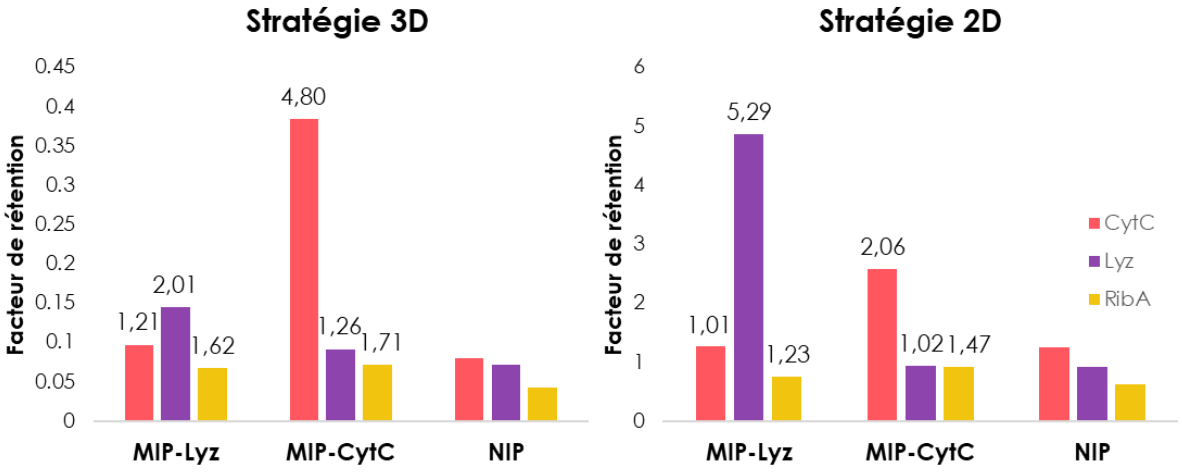


Figure 107 - Facteurs de rétention et facteurs d'empreinte obtenus pour les MIP-Lyz et MIP-CytC par stratégie 3D et 2D avec le Lyz, le CytC et la RibA

Ces résultats préliminaires sur la préparation de MIP en capillaire d'électrophorèse capillaire sont très prometteurs pour de futures applications en détection et en séparation. En effet, la stratégie MIP-2D, qui permet une préparation rapide du MIP dans le capillaire ainsi qu'une injection dans un milieu complètement aqueux et à pH 7, ouvre le champ des applications de détection dans des conditions biocompatibles. Avec une surface spécifique supérieure grâce à la présence du monolithe, la stratégie 3D, bien que plus longue à mettre en œuvre que la stratégie 2D, permet d'envisager des nouvelles méthodes de séparation de protéines. Ce protocole de préparation d'empreintes pourrait être adapté à d'autres systèmes que l'électrophorèse capillaire, comme des colonnes HPLC ou d'autres systèmes microfluidiques.

7 Conclusion

Dans cette seconde partie, le premier objectif était la conception et la synthèse de nouveaux monomères fonctionnels, polymérisables par procédé sol-gel et capables de créer des interactions avec des protéines. Dans un premier temps, des dicétopipérazines ont été conçues, synthétisées et caractérisées. Celles-ci présentaient un motif tris(triméthylsiloxy)silane stable en milieu aqueux et permettant l'obtention des silanols correspondant par hydrolyse acide ou nucléophile. Les rendements globaux assez faibles ne permettaient pas d'obtenir suffisamment de produits pour les utiliser comme monomères fonctionnels, des optimisations étant nécessaires pour la montée en échelle. Des dérivés d'acides aminés silylés linéaires ont donc été synthétisés pour remplacer les dicétopipérazines comme monomères fonctionnels. La voie de synthèse a été optimisée pour chaque acide aminé et tous les Si-AA-NH_2 ont été obtenus avec de bons rendements et une bonne reproductibilité, ce qui permet leur utilisation comme monomères fonctionnels. De plus, dans cette section, un nouveau réactif de silylation a été développé et permet la silylation en milieu aqueux. Ces monomères fonctionnels ont été utilisés pour fonctionnaliser différents supports à base de silice afin d'en moduler les propriétés, comme des nanoparticules de silice mésoporeuses (SBA-15), ou encore des capillaires d'électrophorèses capillaires. Ainsi, avec ces capillaires fonctionnalisés, il a été possible de moduler l'adsorption de différentes protéines en fonction du Si-AA-NH_2 greffé, ainsi que les flux électroosmotiques des capillaires.

Dans un second temps, ces nouveaux monomères fonctionnels ont été utilisés pour synthétiser des polymères à empreintes moléculaires de protéines par procédé sol-gel. La synthèse ayant lieu dans des conditions biocompatibles, la structure des deux protéines modèles (le CytC et le Lyz) a pu être conservée et des empreintes ont été obtenues à partir de quatre des cinq monomères fonctionnels synthétisés. Le Si-Glu-NH_2 n'ayant été obtenu que récemment, de nouveaux MIP incluant ce précurseur seront bientôt préparés. Les MIP obtenus avec les quatre précurseurs (Si-Tyr-NH_2, Si-Ser-NH_2, Si-Leu-NH_2 et Si-Arg-NH_2) ont montré des facteurs d'empreintes nettement plus élevés que les MIP obtenus avec des monomères fonctionnels commerciaux, montrant l'intérêt de l'utilisation de dérivés d'acides aminés pouvant mimer les interactions protéine-protéine. Bien qu'aucune différence dans la composition de la couche hybride n'ait été observée, la différence de potentiel zêta est significative d'une composition différente à la surface. Les tests QCM-d et ELISA, montrant une certaine spécificité et sélectivité des deux MIP, confirment cette différence de surface. Afin d'éviter l'utilisation de protéines entières pour la synthèse des empreintes, la stratégie « empreintes d'épitopes » est en cours de développement. Pour cela, un épitope accessible et structuré a été identifié et choisi comme modèle d'étude : l'hélice α C-terminale de la kallikréine. Deux peptides agrafés et un peptide non agrafé contrôle ont été synthétisés. La structure en hélice α été caractérisée par

dichroïsme circulaire dans différentes conditions pour trouver celles générant la meilleure hélicité. Ces peptides doivent encore être fonctionnalisés avec un lien clivable, puis être silylés pour être utilisés comme modèle pour la synthèse des empreintes.

Enfin, la voie de synthèse des MIP est en train d'être adaptée à différents supports. A ce jour, un film MIP a été synthétisé sur une puce de QCM-d avec les cinq Si-AA-NH_2 et présente un facteur d'empreinte de 3. Les expériences de liaisons avec des protéines non modèles sont en cours pour déterminer la spécificité de l'empreinte. De plus, deux stratégies ont été développées pour générer des MIP dans des capillaires d'électrophorèses capillaires. La stratégie 3D consiste à synthétiser un monolithe dans le capillaire avant de synthétiser les empreintes afin d'augmenter la surface spécifique du capillaire. Cette méthode nécessite l'utilisation de solvant organique pour l'élution des protéines, limitant son utilisation pour des applications biocompatibles mais permettant des applications séparatives. La stratégie 2D consiste à la synthèse des MIP directement sur les parois internes du capillaire. La surface spécifique étant beaucoup plus faible, cette stratégie limite les applications séparatives mais permet de travailler dans des conditions complètement biocompatibles.

La voie de synthèse de MIP utilisant les Si-AA-NH_2 a été utilisée pour générer des MIP à la surface de nanoparticules, directement sur une puce QCM-d et à l'intérieur de capillaires d'électrophorèse capillaire, ouvrant le champ des applications de nos empreintes de protéines.

Conclusion

Conclusion

Ce travail de thèse avait pour objectif l'obtention de mimes d'anticorps. Deux stratégies ont été développées pour répondre à cet objectif.

Nous nous sommes intéressés à la synthèse de mimes peptidiques du nanobody anti-mésothéline Des peptides linéaires et cycliques ont été synthétisés et leur affinité pour la mésothéline a été mesurée par test ELISA. Aucun peptide n'a montré une affinité mesurable par test ELISA. L'interférométrie biocouche a également été utilisée pour mesurer la capacité de reconnaissance des peptides cycliques pour la mésothéline, sans succès. La non-structuration en brin β anti-parallèles pourrait expliquer l'absence d'affinité. De plus, un nanobody présentant trois CDR à sa surface paratopique, un effet synergique peut être nécessaire pour obtenir une affinité pour la cible. De nouveaux peptides présentant un coude β pourraient être synthétisés et testés, d'abord de manière indépendante puis en synergie grâce à une co-présentation sur une plateforme multivalente ou sous forme d'hétéromultimères, pour vérifier ces hypothèses.

Pour augmenter la concentration locale en peptide et exploiter une effet de multivalence, des analogues peptidiques mimes de CDR possédant un groupement alcoxysilane ont été resynthétisés. Cette fonctionnalité nous a permis de les greffer en une seule étape à la surface de nanoparticules de silice. Afin de développer un test ELISA simplifié, des nanoparticules fluorescentes et fonctionnalisées par des peptides ont été synthétisées. Des nanoparticules mono-fonctionnalisées ont été préparées pour tester chaque séquence indépendamment et leur affinité pour la mésothéline a été mesurée par ce test ELISA simplifié et par QCM-d, révélant de fortes interactions non spécifiques. La faible fonctionnalisation des nanoparticules (moins de 0,1 peptide/nm²) entraîne un repliement des peptides (régime « champignon »), ce qui limite leur accessibilité. De plus, avec un potentiel zêta d'environ -35, la charge globale fortement négative des nanoparticules peut être à l'origine de répulsion électrostatiques. La géométrie des peptides à la surface des nanoparticules, ainsi que leur charge globale, peuvent être responsables de l'absence d'affinité observée. Pour limiter la répulsion électrostatique et améliorer l'accessibilité des peptides à la surface des nanoparticules (régime « brosse »), de nouveaux ligands PEG-peptides sont en cours de synthèse. L'affinité de ces particules pour la mésothéline sera déterminée avec une microbalance à quartz avec contrôle de la dissipation.

La seconde stratégie consiste à la préparation de polymères à empreintes moléculaires de protéines. Le procédé sol-gel a été choisi comme méthode de polymérisation pour pouvoir réaliser la synthèse des empreintes dans un milieu biocompatible. Le premier objectif de cette partie a été la synthèse de nouveaux monomères fonctionnels, polymérisable par procédé sol-

gel et capables de générer des interactions avec les protéines. Dans un premier temps, des dicétopipérazines ont été conçues, synthétisées et caractérisées. La voie de synthèse développée nécessitait des optimisations pour la montée en échelle, nous orientant vers la synthèse de dérivés d'acides aminés silylés. La voie de synthèse a été développée et optimisée pour les cinq acides aminés choisis, permettant l'obtention des cinq Si-AA-NH_2 avec de bons rendements et une bonne reproductibilité. Ils ont ainsi pu être utilisés pour modifier différentes surfaces de silice, comme de la silice mésoporeuse (SBA-15) dont les résultats ont fait l'objet d'une publication, ou encore des capillaires d'électrophorèse capillaire dont les résultats sont en cours de publication.

Le deuxième objectif de cette partie était la synthèse d'empreintes de protéines à la surface de nanoparticules. Des MIP du CytC et du Lyz ont été obtenue dans des conditions biocompatibles avec quatre des cinq monomères fonctionnels synthétisés. Les facteurs d'empreintes (8,77 pour le MIP-CytC et 8,75 pour le MIP-Lyz), nettement plus élevés que ceux de MIP obtenus avec des monomères fonctionnels commerciaux (3,33 pour le MIP-CytC obtenu avec l'APTES et le PTES), montrent l'intérêt d'intégrer des aminoacides dans le matériau hybride pour mimer les interactions protéine-protéine. En plus des très bons facteurs d'empreintes, nos MIP présentent une bonne sélectivité, les tests ELISA ne montrant un effet de compétition qu'à des concentrations élevées et avec une protéine compétitrice proche en taille et en point isoélectrique. Ces résultats ont également fait l'objet d'une publication.

Pour obtenir des empreintes capables de cibler une zone spécifique d'une protéine, comme une empreinte monoclonale, des peptides agrafés mimant l'hélice α C-terminale accessible de la kallikréine sont en cours de développement afin d'être utilisé comme modèle pour la synthèse d'empreinte.

Enfin, notre méthode de préparation de MIP est en train d'être adaptée à différents supports : les capteurs QCM-d et les capillaires d'électrophorèse capillaire.

Références

(1) Schroeder, H. W.; Cavacini, L. Structure and Function of Immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* **2010**, *125* (2 0 2), S41–S52. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046.

(2) Chiu, M. L.; Goulet, D. R.; Teplyakov, A.; Gilliland, G. L. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies* **2019**, *8* (4), 55. https://doi.org/10.3390/antib8040055.

(3) Ganten, D.; Ruckpaul, K. *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*, 1st ed.; Springer Berlin, Heidelberg.

(4) Vlatakis, G.; Andersson, L. I.; Müller, R.; Mosbach, K. Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting. *Nature* **1993**, *361* (6413), 645–647. https://doi.org/10.1038/361645a0.

(5) Padlan, E. A. Anatomy of the Antibody Molecule. *Mol. Immunol.* **1994**, *31* (3), 169–217. https://doi.org/10.1016/0161-5890(94)90001-9.

(6) Forthal, D. N. Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr* **2014**, *2* (4), 1–17.

(7) Köhler, G.; Milstein, C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* **1975**, *256* (5517), 495–497. https://doi.org/10.1038/256495a0.

(8) Dang, V. T.; Mandakhalikar, K. D.; Ng, O.-W.; Tan, Y.-J. A Simple Methodology for Conversion of Mouse Monoclonal Antibody to Human-Mouse Chimeric Form. *Clin Dev Immunol* **2013**, *2013*, 716961. https://doi.org/10.1155/2013/716961.

(9) Jones, P. T.; Dear, P. H.; Foote, J.; Neuberger, M. S.; Winter, G. Replacing the Complementarity-Determining Regions in a Human Antibody with Those from a Mouse. *Nature* **1986**, *321* (6069), 522–525. https://doi.org/10.1038/321522a0.

(10) Smith, G. P. Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science* **1985**, *228* (4705), 1315–1317. https://doi.org/10.1126/science.4001944.

(11) McCafferty, J.; Griffiths, A. D.; Winter, G.; Chiswell, D. J. Phage Antibodies: Filamentous Phage Displaying Antibody Variable Domains. *Nature* **1990**, *348* (6301), 552–554. https://doi.org/10.1038/348552a0.

(12) Lonberg, N.; Taylor, L. D.; Harding, F. A.; Trounstine, M.; Higgins, K. M.; Schramm, S. R.; Kuo, C.-C.; Mashayekh, R.; Wymore, K.; McCabe, J. G.; Munoz-O'Regan, D.; O'Donnell, S. L.; Lapachet, E. S. G.; Bengoechea, T.; Fishwild, D. M.; Carmack, C. E.; Kay, R. M.; Huszar, D. Antigen-Specific Human Antibodies from Mice Comprising Four Distinct Genetic Modifications. *Nature* **1994**, *368* (6474), 856–859. https://doi.org/10.1038/368856a0.

(13) Lu, R.-M.; Hwang, Y.-C.; Liu, I.-J.; Lee, C.-C.; Tsai, H.-Z.; Li, H.-J.; Wu, H.-C. Development of Therapeutic Antibodies for the Treatment of Diseases. *Journal of Biomedical Science* **2020**, *27* (1), 1. https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z.

(14) Taylor, P. C.; Adams, A. C.; Hufford, M. M.; de la Torre, I.; Winthrop, K.; Gottlieb, R. L. Neutralizing Monoclonal Antibodies for Treatment of COVID-19. *Nat Rev Immunol* **2021**, *21* (6), 382–393. https://doi.org/10.1038/s41577-021-00542-x.

(15) Azhar, A.; Ahmad, E.; Zia, Q.; Rauf, Mohd. A.; Owais, M.; Ashraf, G. M. Recent Advances in the Development of Novel Protein Scaffolds Based Therapeutics. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *102*, 630–641. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.045.

(16) Holliger, P.; Hudson, P. J. Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains. *Nature Biotechnology* **2005**, *23* (9), 1126–1136. https://doi.org/10.1038/nbt1142.

(17) Better, M.; Chang, C. P.; Robinson, R. R.; Horwitz, A. H. Escherichia Coli Secretion of an Active Chimeric Antibody Fragment. *Science* **1988**, *240* (4855), 1041–1043. https://doi.org/10.1126/science.3285471.

(18) Nelson, A. L.; Reichert, J. M. Development Trends for Therapeutic Antibody Fragments. *Nature Biotechnology* **2009**, *27* (4), 331–337. https://doi.org/10.1038/nbt0409-331.

(19) Reichert, J. M. Metrics for Antibody Therapeutics Development. *mAbs* **2010**, *2* (6), 695–700. https://doi.org/10.4161/mabs.2.6.13603.

(20) Huston, J. S.; Levinson, D.; Mudgett-Hunter, M.; Tai, M. S.; Novotný, J.; Margolies, M. N.; Ridge, R. J.; Bruccoleri, R. E.; Haber, E.; Crea, R. Protein Engineering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced in Escherichia Coli. *PNAS* **1988**, *85* (16), 5879–5883. https://doi.org/10.1073/pnas.85.16.5879.

(21) Matos, C. F. R. O.; Robinson, C.; Alanen, H. I.; Prus, P.; Uchida, Y.; Ruddock, L. W.; Freedman, R. B.; Keshavarz-Moore, E. Efficient Export of Prefolded, Disulfide-Bonded Recombinant Proteins to the Periplasm by the Tat Pathway in Escherichia Coli CyDisCo Strains. *Biotechnology Progress* **2014**, *30* (2), 281–290. https://doi.org/10.1002/btpr.1858.

(22) Weisser, N. E.; Hall, J. C. Applications of Single-Chain Variable Fragment Antibodies in Therapeutics and Diagnostics. *Biotechnology Advances* **2009**, *27* (4), 502–520. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.004.

(23) Hu, S.; Shively, L.; Raubitschek, A.; Sherman, M.; Williams, L. E.; Wong, J. Y. C.; Shively, J. E.; Wu, A. M. Minibody: A Novel Engineered Anti-Carcinoembryonic Antigen Antibody Fragment (Single-

Chain Fv-CH3) Which Exhibits Rapid, High-Level Targeting of Xenografts. *Cancer Res* **1996**, *56* (13), 3055–3061.
(24) Shahied, L. S.; Tang, Y.; Alpaugh, R. K.; Somer, R.; Greenspon, D.; Weiner, L. M. Bispecific Minibodies Targeting HER2/Neu and CD16 Exhibit Improved Tumor Lysis When Placed in a Divalent Tumor Antigen Binding Format. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (52), 53907–53914. https://doi.org/10.1074/jbc.M407888200.
(25) Holliger, P.; Prospero, T.; Winter, G. "Diabodies": Small Bivalent and Bispecific Antibody Fragments. *PNAS* **1993**, *90* (14), 6444–6448. https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6444.
(26) Design and Application of Diabodies, Triabodies and Tetrabodies for Cancer Targeting. *Journal of Immunological Methods* **2001**, *248* (1–2), 47–66. https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00342-2.
(27) Girgis, M. D.; Kenanova, V.; Olafsen, T.; McCabe, K. E.; Wu, A. M.; Tomlinson, J. S. Anti-CA19-9 Diabody as a PET Imaging Probe for Pancreas Cancer. *Journal of Surgical Research* **2011**, *170* (2), 169–178. https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.03.065.
(28) Reddy, S.; Shaller, C. C.; Doss, M.; Shchaveleva, I.; Marks, J. D.; Yu, J. Q.; Robinson, M. K. Evaluation of the Anti-HER2 C6.5 Diabody as a PET Radiotracer to Monitor HER2 Status and Predict Response to Trastuzumab Treatment. *Clin Cancer Res* **2011**, *17* (6), 1509–1520. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1654.
(29) Muyldermans, S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, *82* (1), 775–797. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449.
(30) Juma, S. N.; Gong, X.; Hu, S.; Lv, Z.; Shao, J.; Liu, L.; Chen, G. Shark New Antigen Receptor (IgNAR): Structure, Characteristics and Potential Biomedical Applications. *Cells* **2021**, *10* (5), 1140. https://doi.org/10.3390/cells10051140.
(31) Baeuerle, P. A.; Kufer, P.; Bargou, R. BiTE: Teaching Antibodies to Engage T-Cells for Cancer Therapy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2009**, *11* (1), 22–30.
(32) Wickramasinghe, D. Tumor and T Cell Engagement by BiTE. *Discov Med* **2013**, *16* (88), 149–152.
(33) Cochlovius, B.; Kipriyanov, S. M.; Stassar, M. J.; Schuhmacher, J.; Benner, A.; Moldenhauer, G.; Little, M. Cure of Burkitt's Lymphoma in Severe Combined Immunodeficiency Mice by T Cells, Tetravalent CD3 x CD19 Tandem Diabody, and CD28 Costimulation. *Cancer Res.* **2000**, *60* (16), 4336–4341.
(34) Tiede, C.; Tang, A. A. S.; Deacon, S. E.; Mandal, U.; Nettleship, J. E.; Owen, R. L.; George, S. E.; Harrison, D. J.; Owens, R. J.; Tomlinson, D. C.; McPherson, M. J. Adhiron: A Stable and Versatile Peptide Display Scaffold for Molecular Recognition Applications. *Protein Engineering, Design and Selection* **2014**, *27* (5), 145–155. https://doi.org/10.1093/protein/gzu007.
(35) Goldstein, R.; Sosabowski, J.; Livanos, M.; Leyton, J.; Vigor, K.; Bhavsar, G.; Nagy-Davidescu, G.; Rashid, M.; Miranda, E.; Yeung, J.; Tolner, B.; Plückthun, A.; Mather, S.; Meyer, T.; Chester, K. Development of the Designed Ankyrin Repeat Protein (DARPin) G3 for HER2 Molecular Imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2015**, *42* (2), 288–301. https://doi.org/10.1007/s00259-014-2940-2.
(36) Binz, H. K.; Stumpp, M. T.; Forrer, P.; Amstutz, P.; Plückthun, A. Designing Repeat Proteins: Well-Expressed, Soluble and Stable Proteins from Combinatorial Libraries of Consensus Ankyrin Repeat Proteins. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *332* (2), 489–503. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00896-9.
(37) Long, Y.; Philip, J. Y. N.; Schillén, K.; Liu, F.; Ye, L. Insight into Molecular Imprinting in Precipitation Polymerization Systems Using Solution NMR and Dynamic Light Scattering. *Journal of Molecular Recognition* **2011**, *24* (4), 619–630. https://doi.org/10.1002/jmr.1097.
(38) Kobe, B.; Kajava, A. V. When Protein Folding Is Simplified to Protein Coiling: The Continuum of Solenoid Protein Structures. *Trends in Biochemical Sciences* **2000**, *25* (10), 509–515. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01667-4.
(39) Sedgwick, S. G.; Smerdon, S. J. The Ankyrin Repeat: A Diversity of Interactions on a Common Structural Framework. *Trends in Biochemical Sciences* **1999**, *24* (8), 311–316. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01426-7.
(40) Lipovsek, D. Adnectins: Engineered Target-Binding Protein Therapeutics. *Protein Engineering Design and Selection* **2011**, *24* (1–2), 3–9. https://doi.org/10.1093/protein/gzq097.
(41) Mitchell, T.; Chao, G.; Sitkoff, D.; Lo, F.; Monshizadegan, H.; Meyers, D.; Low, S.; Russo, K.; DiBella, R.; Denhez, F.; Gao, M.; Myers, J.; Duke, G.; Witmer, M.; Miao, B.; Ho, S. P.; Khan, J.; Parker, R. A. Pharmacologic Profile of the Adnectin BMS-962476, a Small Protein Biologic Alternative to PCSK9 Antibodies for Low-Density Lipoprotein Lowering. *J Pharmacol Exp Ther* **2014**, *350* (2), 412–424. https://doi.org/10.1124/jpet.114.214221.
(42) AlDeghaither, D.; Smaglo, B. G.; Weiner, L. M. Beyond Peptides and MAbs—Current Status and Future Perspectives for Biotherapeutics with Novel Constructs. *The Journal of Clinical Pharmacology* **2015**, *55* (S3), S4–S20. https://doi.org/10.1002/jcph.407.
(43) Silverman, J.; Lu, Q.; Bakker, A.; To, W.; Duguay, A.; Alba, B. M.; Smith, R.; Rivas, A.; Li, P.; Le, H.; Whitehorn, E.; Moore, K. W.; Swimmer, C.; Perlroth, V.; Vogt, M.; Kolkman, J.; Stemmer, W. P. C.

Multivalent Avimer Proteins Evolved by Exon Shuffling of a Family of Human Receptor Domains. *Nature Biotechnology* **2005**, *23* (12), 1556–1561. https://doi.org/10.1038/nbt1166.

(44) Myers, J. K.; Oas, T. G. Preorganized Secondary Structure as an Important Determinant of Fast Protein Folding. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8* (6), 552–558. https://doi.org/10.1038/88626.

(45) Feldwisch, J.; Tolmachev, V.; Lendel, C.; Herne, N.; Sjöberg, A.; Larsson, B.; Rosik, D.; Lindqvist, E.; Fant, G.; Höidén-Guthenberg, I.; Galli, J.; Jonasson, P.; Abrahmsén, L. Design of an Optimized Scaffold for Affibody Molecules. *J. Mol. Biol.* **2010**, *398* (2), 232–247. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.03.002.

(46) Vazquez-Lombardi, R.; Phan, T. G.; Zimmermann, C.; Lowe, D.; Jermutus, L.; Christ, D. Challenges and Opportunities for Non-Antibody Scaffold Drugs. *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (10), 1271–1283. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.09.004.

(47) Skerra, A. Alternative Binding Proteins: Anticalins – Harnessing the Structural Plasticity of the Lipocalin Ligand Pocket to Engineer Novel Binding Activities. *The FEBS Journal* **2008**, *275* (11), 2677–2683. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06439.x.

(48) Schönfeld, D.; Matschiner, G.; Chatwell, L.; Trentmann, S.; Gille, H.; Hülsmeyer, M.; Brown, N.; Kaye, P. M.; Schlehuber, S.; Hohlbaum, A. M.; Skerra, A. An Engineered Lipocalin Specific for CTLA-4 Reveals a Combining Site with Structural and Conformational Features Similar to Antibodies. *PNAS* **2009**, *106* (20), 8198–8203. https://doi.org/10.1073/pnas.0813399106.

(49) Le Nguyen, D.; Heitz, A.; Chiche, L.; Castro, B.; Boigegrain, R. A.; Favel, A.; Coletti-Previero, M. A. Molecular Recognition between Serine Proteases and New Bioactive Microproteins with a Knotted Structure. *Biochimie* **1990**, *72* (6), 431–435. https://doi.org/10.1016/0300-9084(90)90067-Q.

(50) Colgrave, M. L.; Craik, D. J. Thermal, Chemical, and Enzymatic Stability of the Cyclotide Kalata B1: The Importance of the Cyclic Cystine Knot. *Biochemistry* **2004**, *43* (20), 5965–5975. https://doi.org/10.1021/bi049711q.

(51) Park, B.-W.; Zhang, H.-T.; Wu, C.; Berezov, A.; Zhang, X.; Dua, R.; Wang, Q.; Kao, G.; O'Rourke, D. M.; Greene, M. I.; Murali, R. Rationally Designed Anti-HER2/Neu Peptide Mimetic Disables P185HER2/Neu Tyrosine Kinases in Vitro and in Vivo. *Nat Biotechnol* **2000**, *18* (2), 194–198. https://doi.org/10.1038/72651.

(52) Robinson, J. A. Design and Applications of Protein Epitope Mimetics. *CHIMIA* **2013**, *67* (12), 885–890. https://doi.org/10.2533/chimia.2013.885.

(53) Jiang, L.; Moehle, K.; Dhanapal, B.; Obrecht, D.; Robinson, J. A. Combinatorial Biomimetic Chemistry: Parallel Synthesis of a Small Library of β-Hairpin Mimetics Based on Loop III from Human Platelet-Derived Growth Factor B. *Helvetica Chimica Acta* **2000**, *83* (12), 3097–3112. https://doi.org/10.1002/1522-2675(20001220)83:12<3097::AID-HLCA3097>3.0.CO;2-1.

(54) Favre, M.; Moehle, K.; Jiang, L.; Pfeiffer, B.; Robinson, J. A. Structural Mimicry of Canonical Conformations in Antibody Hypervariable Loops Using Cyclic Peptides Containing a Heterochiral Diproline Template. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (12), 2679–2685. https://doi.org/10.1021/ja984016p.

(55) Kinarsky, L.; Suryanarayanan, G.; Prakash, O.; Paulsen, H.; Clausen, H.; Hanisch, F.-G.; Hollingsworth, M. A.; Sherman, S. Conformational Studies on the MUC1 Tandem Repeat Glycopeptides: Implication for the Enzymatic O-Glycosylation of the Mucin Protein Core. *Glycobiology* **2003**, *13* (12), 929–939. https://doi.org/10.1093/glycob/cwg109.

(56) Hu, H.; Kofoed, C.; Li, M.; Gonçalves, J. P. L.; Hansen, J.; Wolfram, M.; Hansen, A. K.; Friis Hansen, C. H.; Diness, F.; Schoffelen, S.; Meldal, M. Computational Evolution of Threonine-Rich β-Hairpin Peptides Mimicking Specificity and Affinity of Antibodies. *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5* (2), 259–269. https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00614.

(57) Das, S.; Nag, A.; Liang, J.; Bunck, D. N.; Umeda, A.; Farrow, B.; Coppock, M. B.; Sarkes, D. A.; Finch, A. S.; Agnew, H. D.; Pitram, S.; Lai, B.; Yu, M. B.; Museth, A. K.; Deyle, K. M.; Lepe, B.; Rodriguez-Rivera, F. P.; McCarthy, A.; Alvarez-Villalonga, B.; Chen, A.; Heath, J.; Stratis-Cullum, D. N.; Heath, J. R. A General Synthetic Approach for Designing Epitope Targeted Macrocyclic Peptide Ligands. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (45), 13219–13224. https://doi.org/10.1002/anie.201505243.

(58) McEnaney, P. J.; Fitzgerald, K. J.; Zhang, A. X.; Douglass, E. F.; Shan, W.; Balog, A.; Kolesnikova, M. D.; Spiegel, D. A. Chemically Synthesized Molecules with the Targeting and Effector Functions of Antibodies. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (52), 18034–18043. https://doi.org/10.1021/ja509513c.

(59) Krishnamurthy, V. M.; Estroff, L. A.; Whitesides, G. M. Multivalency in Ligand Design. In *Fragment-based Approaches in Drug Discovery*; John Wiley & Sons, Ltd, 2006; pp 11–53. https://doi.org/10.1002/3527608761.ch2.

(60) Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M. A Convenient Synthesis of Cyclic Peptides as Regioselectively Addressable Functionalized Templates (RAFT). *Tetrahedron Letters* **1995**, *36* (8), 1255–1258. https://doi.org/10.1016/0040-4039(94)02481-P.

(61) Degardin, M.; Thakar, D.; Claron, M.; Richter, R. P.; Coche-Guérente, L.; Boturyn, D. Development of a Selective Cell Capture and Release Assay: Impact of Clustered RGD Ligands. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (24), 4745–4753. https://doi.org/10.1039/C7TB00630F.

(62) Longin, O.; Hezwani, M.; Langemheen, H. van de; Liskamp, R. M. J. Synthetic Antibody Protein Mimics of Infliximab by Molecular Scaffolding on Novel CycloTriVeratrilene (CTV) Derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (29), 5254–5274. https://doi.org/10.1039/C8OB01104D.

(63) Yan, G.-H.; Wang, K.; Shao, Z.; Luo, L.; Song, Z.-M.; Chen, J.; Jin, R.; Deng, X.; Wang, H.; Cao, Z.; Liu, Y.; Cao, A. Artificial Antibody Created by Conformational Reconstruction of the Complementary-Determining Region on Gold Nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115* (1), E34–E43. https://doi.org/10.1073/pnas.1713526115.

(64) Maurel, M.; Montheil, T.; Martin, J.; Chaar, L.; Guzman-Gonzalez, V.; Couvet, M.; Jacquet, T.; Jia, T.; Eymin, B.; Parra, K.; Dumy, P.; Martinez, J.; Ruggiero, F.; Vaganay, E.; Mehdi, A.; Coll, J.-L.; Subra, G. Design of PEGylated Three Ligands Silica Nanoparticles for Multi-Receptor Targeting. *Nanomaterials* **2021**, *11* (1), 177. https://doi.org/10.3390/nano11010177.

(65) Haupt, K.; Rangel, P. X. M.; Bui, B. T. S. Molecularly Imprinted Polymers: Antibody Mimics for Bioimaging and Therapy. *Chemical Reviews* **2020**. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00428.

(66) Alexander, C.; Andersson, H. S.; Andersson, L. I.; Ansell, R. J.; Kirsch, N.; Nicholls, I. A.; O'Mahony, J.; Whitcombe, M. J. Molecular Imprinting Science and Technology: A Survey of the Literature for the Years up to and Including 2003. *J. Mol. Recognit.* **2006**, *19* (2), 106–180. https://doi.org/10.1002/jmr.760.

(67) Pauling, L. A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies*. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62* (10), 2643–2657. https://doi.org/10.1021/ja01867a018.

(68) Stahl, M.; Mansson, M.-O.; Mosbach, K. The Synthesis of a D-Amino Acid Ester in an Organic Media with ?-Chymotrypsin Modified by a Bio-Imprinting Procedure. *Biotechnol Lett* **1990**, *12* (3), 161–166. https://doi.org/10.1007/BF01026792.

(69) Dickey, F. H. The Preparation of Specific Adsorbents. *PNAS* **1949**, *35* (5), 227–229. https://doi.org/10.1073/pnas.35.5.227.

(70) Morrison, J. L.; Worsley, M.; Shaw, D. R.; Hodgson, G. W. The Nature of the Specificity of Adsorption of Alkyl Orange Dyes on Silica Gel. *Can. J. Chem.* **1959**, *37* (12), 1986–1995. https://doi.org/10.1139/v59-291.

(71) Haldeman, R. G.; Emmett, P. H. Specific Adsorption of Alkyl Orange Dyes on Silica Gel. *The Journal of Physical Chemistry* **1955**, *59* (10), 1039–1043. https://doi.org/10.1021/j150532a012.

(72) Wulff, G.; Sarhan, A. Über Die Anwendung von Enzymanalog Gebauten Polymeren Zur Racemattrennung. *Angewandte Chemie* **1972**, *84* (8), 364–364. https://doi.org/10.1002/ange.19720840838.

(73) Takagishi, T.; Klotz, I. M. Macromolecule-Small Molecule Interactions; Introduction of Additional Binding Sites in Polyethyleneimine by Disulfide Cross–Linkages. *Biopolymers* **1972**, *11* (2), 483–491. https://doi.org/10.1002/bip.1972.360110213.

(74) Andersson, L.; Sellergren, B.; Mosbach, K. Imprinting of Amino Acid Derivatives in Macroporous Polymers. *Tetrahedron Letters* **1984**, *25* (45), 5211–5214. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)81566-5.

(75) Sellergren, B.; Ekberg, B.; Mosbach, K. Molecular Imprinting of Amino Acid Derivatives in Macroporous Polymers: Demonstration of Substrate- and Enantio-Selectivity by Chromatographic Resolution of Racemic Mixtures of Amino Acid Derivatives. *Journal of Chromatography A* **1985**, *347*, 1–10. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)95464-0.

(76) Wulff, G. Selective Binding to Polymers via Covalent Bonds. The Construction of Chiral Cavities as Specific Receptor Sites. *Pure and Applied Chemistry* **1982**, *54* (11), 2093–2102. https://doi.org/10.1351/pac198254112093.

(77) Lofgreen, J. E.; Ozin, G. A. Controlling Morphology and Porosity to Improve Performance of Molecularly Imprinted Sol–Gel Silica. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (3), 911–933. https://doi.org/10.1039/C3CS60276A.

(78) Whitcombe, M. J.; Rodriguez, M. E.; Villar, P.; Vulfson, E. N. A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (27), 7105–7111. https://doi.org/10.1021/ja00132a010.

(79) Shoji, R.; Takeuchi, T.; Kubo, I. Atrazine Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymer-Modified Gold Electrode. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (18), 4882–4886. https://doi.org/10.1021/ac020795n.

(80) Zhang, H.; Song, T.; Zhang, W.; Hua, W.; Pan, C. Retention Behavior of Phenoxyacetic Herbicides on a Molecularly Imprinted Polymer with Phenoxyacetic Acid as a Dummy Template Molecule. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15* (18), 6089–6095. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.06.039.

(81) Kawaguchi, M.; Hayatsu, Y.; Nakata, H.; Ishii, Y.; Ito, R.; Saito, K.; Nakazawa, H. Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction Using Stable Isotope Labeled Compounds as Template and

Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for Trace Analysis of Bisphenol A in Water Sample. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *539* (1), 83–89. https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.03.005.
(82) Rachkov, A.; McNiven, S.; El'skaya, A.; Yano, K.; Karube, I. Fluorescence Detection of β-Estradiol Using a Molecularly Imprinted Polymer. *Analytica Chimica Acta* **2000**, *405* (1), 23–29. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00743-6.
(83) Bunte, G.; Hürttlen, J.; Pontius, H.; Hartlieb, K.; Krause, H. Gas Phase Detection of Explosives Such as 2,4,6-Trinitrotoluene by Molecularly Imprinted Polymers. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *591* (1), 49–56. https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.02.014.
(84) Schweitz, L.; Andersson, L. I.; Nilsson, S. Molecular Imprinting for Chiral Separations and Drug Screening Purposes Using Monolithic Stationary Phases in CEC. *Chromatographia* **1999**, *49* (1), S93–S94. https://doi.org/10.1007/BF02468984.
(85) Kempe, M.; Mosbach, K. Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins on Molecularly Imprinted Stationary Phases. *Journal of Chromatography A* **1995**, *691* (1), 317–323. https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)00820-Y.
(86) Gong, X.; Tang, B.; Liu, J. J.; You, X. Y.; Gu, J.; Deng, J. Y.; Xie, W.-H. Synthesis of Adenosine-Imprinted Microspheres for the Recognition of ADP-Ribosylated Proteins. *Biosens Bioelectron* **2017**, *87*, 858–864. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.027.
(87) Włoch, M.; Datta, J. Chapter Two - Synthesis and Polymerisation Techniques of Molecularly Imprinted Polymers. In *Comprehensive Analytical Chemistry*; Marć, M., Ed.; Mip Synthesis, Characteristics and Analytical Application; Elsevier, 2019; Vol. 86, pp 17–40. https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.05.011.
(88) Moad, G.; Solomon, D. H. 8 - Controlling Polymerization. In *The Chemistry of Radical Polymerization (Second Edition)*; Moad, G., Solomon, D. H., Eds.; Elsevier Science Ltd: Amsterdam, 2005; pp 413–449. https://doi.org/10.1016/B978-008044288-4/50027-3.
(89) Brinker, C. J.; Scherer, G. W. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, 1st ed.; Academic Press, 1990.
(90) Pierre, A. C. The Chemistry of Precursors Solutions. In *Introduction to Sol-Gel Processing*; Pierre, A. C., Ed.; Springer: Boston, MA, 1998; Vol. 1.
(91) Khonina, T. G.; Safronov, A. P.; Shadrina, E. V.; Ivanenko, M. V.; Suvorova, A. I.; Chupakhin, O. N. Mechanism of Structural Networking in Hydrogels Based on Silicon and Titanium Glycerolates. *Journal of Colloid and Interface Science* **2012**, *365* (1), 81–89. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.09.018.
(92) *Procédé sol-gel de polymérisation*. Techniques de l'Ingénieur. https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/procedes-industriels-de-base-en-chimie-et-petrochimie-42329210/procede-sol-gel-de-polymerisation-j5820/ (accessed 2022-07-24).
(93) Echalier, C.; Jebors, S.; Laconde, G.; Brunel, L.; Verdié, P.; Causse, L.; Bethry, A.; Legrand, B.; Van Den Berghe, H.; Garric, X.; Noël, D.; Martinez, J.; Mehdi, A.; Subra, G. Sol–Gel Synthesis of Collagen-Inspired Peptide Hydrogel. *Materials Today* **2017**, *20* (2), 59–66. https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.02.001.
(94) Echalier, C.; Levato, R.; Mateos-Timoneda, M. A.; Castaño, O.; Déjean, S.; Garric, X.; Pinese, C.; Noël, D.; Engel, E.; Martinez, J.; Mehdi, A.; Subra, G. Modular Bioink for 3D Printing of Biocompatible Hydrogels: Sol–Gel Polymerization of Hybrid Peptides and Polymers. *RSC Adv.* **2017**, *7* (20), 12231–12235. https://doi.org/10.1039/C6RA28540F.
(95) Nicole, L.; Rozes, L.; Sanchez, C. Integrative Approaches to Hybrid Multifunctional Materials: From Multidisciplinary Research to Applied Technologies. *Advanced Materials* **2010**, *22* (29), 3208–3214. https://doi.org/10.1002/adma.201000231.
(96) Drisko, G. L.; Sanchez, C. Hybridization in Materials Science – Evolution, Current State, and Future Aspirations. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2012**, *2012* (32), 5097–5105. https://doi.org/10.1002/ejic.201201216.
(97) Venkateswara Rao, A.; Pajonk, G. M. Effect of Methyltrimethoxysilane as a Co-Precursor on the Optical Properties of Silica Aerogels. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2001**, *285* (1), 202–209. https://doi.org/10.1016/S0022-3093(01)00454-9.
(98) Li, F.; Li, J.; Zhang, S. Molecularly Imprinted Polymer Grafted on Polysaccharide Microsphere Surface by the Sol–Gel Process for Protein Recognition. *Talanta* **2008**, *74* (5), 1247–1255. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.08.032.
(99) Connell, L. S.; Gabrielli, L.; Mahony, O.; Russo, L.; Cipolla, L.; Jones, J. R. Functionalizing Natural Polymers with Alkoxysilane Coupling Agents: Reacting 3-Glycidoxypropyl Trimethoxysilane with Poly(γ-Glutamic Acid) and Gelatin. *Polym. Chem.* **2017**, *8* (6), 1095–1103. https://doi.org/10.1039/C6PY01425A.
(100) Feng, L.; Kan, B.; Zhao, K.; Wei, J.; Zhu, D.; Zhang, L. Preparation and Characterization of Protein Molecularly Imprinted Polysiloxane Using Mesoporous Calcium Silicate as Matrix by Sol-Gel

Technology. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2014**, *71* (3), 428–436. https://doi.org/10.1007/s10971-014-3396-3.
(101) Liu, D.; Zhao, K.; Qi, M.; Li, S.; Xu, G.; Wei, J.; He, X. Preparation of Protein Molecular-Imprinted Polysiloxane Membrane Using Calcium Alginate Film as Matrix and Its Application for Cell Culture. *Polymers (Basel, Switz.)* **2018**, *10* (2), 170/1-170/14. https://doi.org/10.3390/polym10020170.
(102) Roberts, C.; Chen, C. S.; Mrksich, M.; Martichonok, V.; Ingber, D. E.; Whitesides, G. M. Using Mixed Self-Assembled Monolayers Presenting RGD and (EG)3OH Groups To Characterize Long-Term Attachment of Bovine Capillary Endothelial Cells to Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (26), 6548–6555. https://doi.org/10.1021/ja972467o.
(103) Prime, K. L.; Whitesides, G. M. Adsorption of Proteins onto Surfaces Containing End-Attached Oligo(Ethylene Oxide): A Model System Using Self-Assembled Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (23), 10714–10721. https://doi.org/10.1021/ja00076a032.
(104) Peng, Y.; Turner, N. W.; Britt, D. W. Trifluorosilane Induced Structural Transitions in Beta-Lactoglobulin in Sol and Gel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *119*, 6–13. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.04.015.
(105) De Middeleer, G.; Dubruel, P.; De Saeger, S. Characterization of MIP and MIP Functionalized Surfaces: Current State-of-the-Art. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *76*, 71–85. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.007.
(106) Spivak, G. V.; Saparin, G. V.; Bykov, M. V. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY. *Sov. Phys. Usp.* **1970**, *12* (6), 756. https://doi.org/10.1070/PU1970v012n06ABEH003971.
(107) Sulitzky, C.; Rückert, B.; Hall, A. J.; Lanza, F.; Unger, K.; Sellergren, B. Grafting of Molecularly Imprinted Polymer Films on Silica Supports Containing Surface-Bound Free Radical Initiators. *Macromolecules* **2002**, *35* (1), 79–91. https://doi.org/10.1021/ma011303w.
(108) K. Reville, E.; H. Sylvester, E.; J. Benware, S.; S. Negi, S.; B. Berda, E. Customizable Molecular Recognition: Advancements in Design, Synthesis, and Application of Molecularly Imprinted Polymers. *Polymer Chemistry* **2022**, *13* (23), 3387–3411. https://doi.org/10.1039/D1PY01472B.
(109) Ndunda, E. N. Molecularly Imprinted Polymers—A Closer Look at the Control Polymer Used in Determining the Imprinting Effect: A Mini Review. *Journal of Molecular Recognition* **2020**, *33* (11), e2855. https://doi.org/10.1002/jmr.2855.
(110) Brown, M. E.; Puleo, D. A. Protein Binding to Peptide-Imprinted Porous Silica Scaffolds. *Chem. Eng. J. (Amsterdam, Neth.)* **2008**, *137* (1), 97–101. https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.09.002.
(111) Kamatchi, T. S.; Chitrapriya, N.; Kumar, S. L. A.; Jung, J. Y.; Puschmann, H.; Fronczek, F. R.; Natarajan, K. The Effect of Incorporating Carboxylic Acid Functionalities into 2,2'-Bipyridine on the Biological Activity of the Complexes Formed: Synthesis, Structure, DNA/Protein Interaction, Antioxidant Activity and Cytotoxicity. *RSC Adv.* **2017**, *7* (27), 16428–16443. https://doi.org/10.1039/C7RA00425G.
(112) Sawyer, L.; James, M. N. G. Carboxyl–Carboxylate Interactions in Proteins. *Nature* **1982**, *295* (5844), 79–80. https://doi.org/10.1038/295079a0.
(113) Yang, S.; Zhang, X.; Zhao, W.; Sun, L.; Luo, A. Preparation and Evaluation of Fe3O4 Nanoparticles Incorporated Molecularly Imprinted Polymers for Protein Separation. *J. Mater. Sci.* **2015**, *51* (2), 937–949. https://doi.org/10.1007/s10853-015-9423-0.
(114) Zhang, Z.; Li, J.; Wang, X.; Shen, D.; Chen, L. Quantum Dots Based Mesoporous Structured Imprinting Microspheres for the Sensitive Fluorescent Detection of Phycocyanin. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (17), 9118–9127. https://doi.org/10.1021/acsami.5b00908.
(115) Hardy, P. M.; Nicholls, A. C.; Rydon, H. N. The Nature of Glutaraldehyde in Aqueous Solution. *J. Chem. Soc. D* **1969**, No. 10, 565–566. https://doi.org/10.1039/C29690000565.
(116) Wine, Y.; Cohen-Hadar, N.; Freeman, A.; Frolow, F. Elucidation of the Mechanism and End Products of Glutaraldehyde Crosslinking Reaction by X-Ray Structure Analysis. *Biotechnology and Bioengineering* **2007**, *98* (3), 711–718. https://doi.org/10.1002/bit.21459.
(117) Farris, S.; Song, J.; Huang, Q. Alternative Reaction Mechanism for the Cross-Linking of Gelatin with Glutaraldehyde. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (2), 998–1003. https://doi.org/10.1021/jf9031603.
(118) Baert, J. J.; Clippeleer, J. D.; Cooman, L. D.; Aerts, G. Exploring the Binding Behavior of Beer Staling Aldehydes in Model Systems. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2015**, *73* (1), 100–108. https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2015-0109-01.
(119) Marty, J.-L. Application of Response Surface Methodology to Optimization of Glutaraldehyde Activation of a Support for Enzyme Immobilization. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1985**, *22* (2), 88–91. https://doi.org/10.1007/BF00250025.
(120) Liu, J.; Yang, K.; Deng, Q.; Li, Q.; Zhang, L.; Liang, Z.; Zhang, Y. Preparation of a New Type of Affinity Materials Combining Metal Coordination with Molecular Imprinting. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (13), 3969–3971. https://doi.org/10.1039/C0CC05317A.
(121) Shi, L.; Tang, Y.; Hao, Y.; He, G.; Gao, R.; Tang, X. Selective Adsorption of Protein by a High-Efficiency Cu2+-Cooperated Magnetic Imprinted Nanomaterial. *J. Sep. Sci.* **2016**, *39* (14), 2876–2883. https://doi.org/10.1002/jssc.201600413.

(122) Gao, R.; Cui, X.; Hao, Y.; He, G.; Zhang, M.; Tang, Y. Preparation of Cu2+-Mediated Magnetic Imprinted Polymers for the Selective Sorption of Bovine Hemoglobin. *Talanta* **2016**, *150*, 46–53. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.017.
(123) Jahanban-Esfahlan, A.; Roufegarinejad, L.; Jahanban-Esfahlan, R.; Tabibiazar, M.; Amarowicz, R. Latest Developments in the Detection and Separation of Bovine Serum Albumin Using Molecularly Imprinted Polymers. *Talanta* **2020**, *207*, 120317. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120317.
(124) Liu, M.; Pi, J.; Wang, X.; Huang, R.; Du, Y.; Yu, X.; Tan, W.; Liu, F.; Shea, K. J. A Sol-Gel Derived PH-Responsive Bovine Serum Albumin Molecularly Imprinted Poly(Ionic Liquids) on the Surface of Multiwall Carbon Nanotubes. *Analytica Chimica Acta* **2016**, *932*, 29–40. https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.020.
(125) Christoforidis, K. C.; Louloudi, M.; Rutherford, A. W.; Deligiannakis, Y. Semiquinone in Molecularly Imprinted Hybrid Amino Acid−SiO2 Biomimetic Materials. An Experimental and Theoretical Study. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112* (33), 12841–12852. https://doi.org/10.1021/jp800430n.
(126) Öztürk-Öncel, M. Ö.; Odabaş, S.; Uzun, L.; Hür, D.; Garipcan, B. A Facile Surface Modification of Poly(Dimethylsiloxane) with Amino Acid Conjugated Self-Assembled Monolayers for Enhanced Osteoblast Cell Behavior. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2020**, *196*, 111343. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111343.
(127) Warren, S. C.; Perkins, M. R.; Adams, A. M.; Kamperman, M.; Burns, A. A.; Arora, H.; Herz, E.; Suteewong, T.; Sai, H.; Li, Z.; Werner, J.; Song, J.; Werner-Zwanziger, U.; Zwanziger, J. W.; Grätzel, M.; DiSalvo, F. J.; Wiesner, U. A Silica Sol–Gel Design Strategy for Nanostructured Metallic Materials. *Nature Materials* **2012**, *11* (5), 460–467. https://doi.org/10.1038/nmat3274.
(128) Ratirotjanakul, W.; Suteewong, T.; Polpanich, D.; Tangboriboonrat, P. Amino Acid as a Biodegradation Accelerator of Mesoporous Silica Nanoparticles. *Microporous and Mesoporous Materials* **2019**, *282*, 243–251. https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2019.02.033.
(129) Wang, J.; Zhang, W.; Gu, C.; Zhang, W.; Zhou, M.; Wang, Z.; Guo, C.; Sun, L. Step-Up Synthesis of Periodic Mesoporous Organosilicas with a Tyrosine Framework and Performance in Horseradish Peroxidase Immobilization. *Chemistry – An Asian Journal* **2017**, *12* (24), 3162–3171. https://doi.org/10.1002/asia.201701285.
(130) Zhang, W.; Ma, H.; Hua, J.; Zhang, W.; Guo, C.; Wang, J. Construction of PH Responsive Periodic Mesoporous Organosilica with Histidine Framework (His-PMO) for Drug Delivery. *Journal of Solid State Chemistry* **2019**, *277*, 761–768. https://doi.org/10.1016/j.jssc.2019.07.049.
(131) Safavi-Sohi, R.; Maghari, S.; Raoufi, M.; Jalali, S. A.; Hajipour, M. J.; Ghassempour, A.; Mahmoudi, M. Bypassing Protein Corona Issue on Active Targeting: Zwitterionic Coatings Dictate Specific Interactions of Targeting Moieties and Cell Receptors. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (35), 22808–22818. https://doi.org/10.1021/acsami.6b05099.
(132) Zhang, C.; Wang, Y.; Zhou, Y.; Guo, J.; Liu, Y. Silica-Based Surface Molecular Imprinting for Recognition and Separation of Lysozymes. *Anal. Methods* **2014**, *6* (21), 8584–8591. https://doi.org/10.1039/C4AY01657B.
(133) Yang, S.; Wang, Y.; Xu, M.; He, M.; Zhang, M.; Ran, D.; Jia, X. Synthesis of Modified Chitosan-Based Molecularly Imprinted Polymers for Adsorptive Protein Separation. *Anal. Methods* **2013**, *5* (20), 5471–5477. https://doi.org/10.1039/C3AY41000E.
(134) Li, W.; Chen, M.; Xiong, H.; Wen, W.; He, H.; Zhang, X.; Wang, S. Surface Protein Imprinted Magnetic Nanoparticles for Specific Recognition of Bovine Hemoglobin. *New J. Chem.* **2016**, *40* (1), 564–570. https://doi.org/10.1039/C5NJ02879E.
(135) Gao, R.; Mu, X.; Zhang, J.; Tang, Y. Specific Recognition of Bovine Serum Albumin Using Superparamagnetic Molecularly Imprinted Nanomaterials Prepared by Two-Stage Core-Shell Sol-Gel Polymerization. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (7), 783–792. https://doi.org/10.1039/C3TB21424A.
(136) Shi, W.; Li, K.-B.; Zhang, S.-Q.; Lu, H.-L.; Shi, R.-H.; Zhan, Y.-G.; Tong, Z.-L.; Han, D.-M. Improvement of Adsorption Selectivity of Ion-Exchange Chromatography through the Double-Recognition Mode. *J. Chem. Eng. Data* **2019**, *64* (12), 5385–5397. https://doi.org/10.1021/acs.jced.9b00594.
(137) Chaves, A. R.; Costa Queiroz, M. E. In-Tube Solid-Phase Microextraction with Molecularly Imprinted Polymer to Determine Interferon Alpha 2a in Plasma Sample by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1318*, 43–48. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.018.
(138) Zhang, Z.; Long, Y.; Nie, L.; Yao, S. Molecularly Imprinted Thin Film Self-Assembled on Piezoelectric Quartz Crystal Surface by the Sol–Gel Process for Protein Recognition. *Biosensors and Bioelectronics* **2006**, *21* (7), 1244–1251. https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.05.009.
(139) Liu, N.; Li, X.; Ma, X.; Ou, G.; Gao, Z. Rapid and Multiple Detections of Staphylococcal Enterotoxins by Two-Dimensional Molecularly Imprinted Film-Coated QCM Sensor. *Sens. Actuators, B* **2014**, *191*, 326–331. https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.09.086.
(140) Hassan, R.; Thomas, A.; Alewine, C.; Le, D. T.; Jaffee, E. M.; Pastan, I. Mesothelin Immunotherapy for Cancer: Ready for Prime Time? *J Clin Oncol* **2016**, *34* (34), 4171–4179. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.68.3672.

(141) Ma, J.; Tang, W. K.; Esser, L.; Pastan, I.; Xia, D. Recognition of Mesothelin by the Therapeutic Antibody MORAb-009: STRUCTURAL AND MECHANISTIC INSIGHTS. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (40), 33123–33131. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.381756.

(142) Mariani, V.; Biasini, M.; Barbato, A.; Schwede, T. LDDT: A Local Superposition-Free Score for Comparing Protein Structures and Models Using Distance Difference Tests. *Bioinformatics* **2013**, *29* (21), 2722–2728. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt473.

(143) Montemagno, C.; Cassim, S.; Trichanh, D.; Savary, C.; Pouyssegur, J.; Pagès, G.; Fagret, D.; Broisat, A.; Ghezzi, C. 99mTc-A1 as a Novel Imaging Agent Targeting Mesothelin-Expressing Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)* **2019**, *11* (10), 1531. https://doi.org/10.3390/cancers11101531.

(144) Montemagno, C.; Bacot, S.; Ahmadi, M.; Kerfelec, B.; Baty, D.; Debiossat, M.; Soubies, A.; Perret, P.; Riou, L.; Fagret, D.; Broisat, A.; Ghezzi, C. Preclinical Evaluation of Mesothelin-Specific Ligands for SPECT Imaging of Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Nuclear Medicine* **2018**, *59* (7), 1056–1062. https://doi.org/10.2967/jnumed.117.203489.

(145) Nativi, C.; Papi, F.; Roelens, S. Tn Antigen Analogues: The Synthetic Way to "Upgrade" an Attracting Tumour Associated Carbohydrate Antigen (TACA). *Chemical Communications* **2019**, *55* (54), 7729–7736. https://doi.org/10.1039/C9CC02920F.

(146) Richichi, B.; Thomas, B.; Fiore, M.; Bosco, R.; Qureshi, H.; Nativi, C.; Renaudet, O.; BenMohamed, L. A Cancer Therapeutic Vaccine Based on Clustered Tn-Antigen Mimetics Induces Strong Antibody-Mediated Protective Immunity. *Angewandte Chemie* **2014**, *126* (44), 12111–12114. https://doi.org/10.1002/ange.201406897.

(147) Grassin, A.; Jourdan, M.; Dumy, P.; Boturyn, D. Influence of Pre-Organised Architecture on Cell Adhesion by Using Multivalent RGD Compounds. *ChemBioChem* **2016**, *17* (6), 515–520. https://doi.org/10.1002/cbic.201500495.

(148) Timmerman, P.; Barderas, R.; Desmet, J.; Altschuh, D.; Shochat, S.; Hollestelle, M. J.; Höppener, J. W. M.; Monasterio, A.; Casal, J. I.; Meloen, R. H. A Combinatorial Approach for the Design of Complementarity-Determining Region-Derived Peptidomimetics with in Vitro Anti-Tumoral Activity. *J Biol Chem* **2009**, *284* (49), 34126–34134. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041459.

(149) Mathieu, L.; Legrand, B.; Deng, C.; Vezenkov, L.; Wenger, E.; Didierjean, C.; Amblard, M.; Averlant-Petit, M.-C.; Masurier, N.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Maillard, L. T. Helical Oligomers of Thiazole-Based γ-Amino Acids: Synthesis and Structural Studies. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (23), 6006–6010. https://doi.org/10.1002/anie.201302106.

(150) Legrand, B.; Mathieu, L.; Lebrun, A.; Andriamanarivo, S.; Lisowski, V.; Masurier, N.; Zirah, S.; Kang, Y. K.; Martinez, J.; Maillard, L. T. Thiazole-Based γ-Building Blocks as Reverse-Turn Mimetic to Design a Gramicidin S Analogue: Conformational and Biological Evaluation. *Chemistry – A European Journal* **2014**, *20* (22), 6713–6720. https://doi.org/10.1002/chem.201402190.

(151) Mathieu, L.; Bonnel, C.; Masurier, N.; Maillard, L. T.; Martinez, J.; Lisowski, V. Cross-Claisen Condensation of N-Fmoc-Amino Acids – A Short Route to Heterocyclic γ-Amino Acids. *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, *2015* (10), 2262–2270. https://doi.org/10.1002/ejoc.201500012.

(152) Fontecave, T.; Sanchez, C.; Azaïs, T.; Boissière, C. Chemical Modification As a Versatile Tool for Tuning Stability of Silica Based Mesoporous Carriers in Biologically Relevant Conditions. *Chem. Mater.* **2012**, *24* (22), 4326–4336. https://doi.org/10.1021/cm302142k.

(153) Banik, B. L.; Fattahi, P.; Brown, J. L. Polymeric Nanoparticles: The Future of Nanomedicine. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* **2016**, *8* (2), 271–299. https://doi.org/10.1002/wnan.1364.

(154) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *Journal of Colloid and Interface Science* **1968**, *26* (1), 62–69. https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5.

(155) Ciccione, J.; Jia, T.; Coll, J.-L.; Parra, K.; Amblard, M.; Jebors, S.; Martinez, J.; Mehdi, A.; Subra, G. Unambiguous and Controlled One-Pot Synthesis of Multifunctional Silica Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2016**, *28* (3), 885–889. https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5b04398.

(156) Bar, L.; Dejeu, J.; Lartia, R.; Bano, F.; Richter, R.; Coche-Guerente, L.; Boturyn, D. Impact of Antigen Density on Recognition by Monoclonal Antibodies. *Analytical Chemistry* **2020**, *92* (7), 5396–5403. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00092.

(157) Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (6), 2455–2504. https://doi.org/10.1021/cr800323s.

(158) *Mesothelin Protein Overview: Sequence, Structure, Function and Protein Interaction | Sino Biological*. https://www.sinobiological.com/resource/mesothelin/proteins (accessed 2022-08-01).

(159) Dixon, M. C. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: Enabling Real-Time Characterization of Biological Materials and Their Interactions. *J Biomol Tech* **2008**, *19* (3), 151–158.

(160) Zara, G. P.; Cavalli, R.; Bargoni, A.; Fundarò, A.; Vighetto, D.; Gasco, M. R. Intravenous Administration to Rabbits of Non-Stealth and Stealth Doxorubicin-Loaded Solid Lipid

Nanoparticles at Increasing Concentrations of Stealth Agent: Pharmacokinetics and Distribution of Doxorubicin in Brain and Other Tissues. *Journal of Drug Targeting* **2002**, *10* (4), 327–335. https://doi.org/10.1080/10611860290031868.

(161) Gutiérrez-Climente, R.; Clavié, M.; Gouyon, J.; Ngo, G.; Ladner, Y.; Etienne, P.; Dumy, P.; Martineau, P.; Pugnière, M.; Perrin, C.; Subra, G.; Mehdi, A. Development of Amino Acids Functionalized SBA-15 for the Improvement of Protein Adsorption. *Molecules* **2021**, *26* (19), 6085. https://doi.org/10.3390/molecules26196085.

(162) Robin, G.; Sato, Y.; Desplancq, D.; Rochel, N.; Weiss, E.; Martineau, P. Restricted Diversity of Antigen Binding Residues of Antibodies Revealed by Computational Alanine Scanning of 227 Antibody-Antigen Complexes. *J Mol Biol* **2014**, *426* (22), 3729–3743. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.08.013.

(163) Schubert, U. Chemistry and Fundamentals of the Sol-Gel Process. In *Sol-Gel Handbook*; Levy, D., Zayat, M., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2015; Vol. 1, pp 3–27.

(164) Salon, M.-C. B.; Belgacem, M. N. Hydrolysis-Condensation Kinetics of Different Silane Coupling Agents. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **2011**, *186* (2), 240–254. https://doi.org/10.1080/10426507.2010.494644.

(165) Yang, Y.; Hansen, L. Optimized Fmoc-Removal Strategy to Suppress the Traceless and Conventional Diketopiperazine Formation in Solid-Phase Peptide Synthesis. *ACS Omega* **2022**, *7* (14), 12015–12020. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00214.

(166) Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Kent, S. B. H.; Moos, W. H. Efficient Method for the Preparation of Peptoids [Oligo(N-Substituted Glycines)] by Submonomer Solid-Phase Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (26), 10646–10647. https://doi.org/10.1021/ja00052a076.

(167) Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *MOLECULAR BIOTECHNOLOGY* **2006**, *33*, 16.

(168) Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, *29* (9), 2176–2179. https://doi.org/10.1021/om100106e.

(169) Delaunay, N. Électrophorèse capillaire - Principes. *Techniques d'analyse* **2019**. https://doi.org/10.51257/a-v2-p3365.

(170) Delaunay, N. Électrophorèse capillaire - Applications. *Techniques d'analyse* **2021**. https://doi.org/10.51257/a-v2-p3367.

(171) Zhang, H.; Fu, Q.-F.; Zheng, G.-C.; Yang, F.-Q. Modulation of Electroosmotic Flow in Open Tubular Capillary Electrochromatography by Chitosan-Assisted Titanium Oxide Nanoparticles Liquid Phase Deposition. *Chromatographia* **2019**, *82* (9), 1383–1393. https://doi.org/10.1007/s10337-019-03760-7.

(172) Cohen, O.; Abu-Reziq, R.; Gelman, D. Chiral Enantiopure Organosilane Precursors for the Synthesis of Periodic Mesoporous Organosilicas. *Tetrahedron: Asymmetry* **2017**, *28* (12), 1675–1685. https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2017.10.032.

(173) Jetzschmann, K. J.; Zhang, X.; Yarman, A.; Wollenberger, U.; Scheller, F. W. Label-Free MIP Sensors for Protein Biomarkers. In *Label-Free Biosensing: Advanced Materials, Devices and Applications*; Schöning, M. J., Poghossian, A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp 291–321.

(174) Gao, R.; Kong, X.; Wang, X.; He, X.; Chen, L.; Zhang, Y. Preparation and Characterization of Uniformly Sized Molecularly Imprinted Polymers Functionalized with Core–Shell Magnetic Nanoparticles for the Recognition and Enrichment of Protein. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21* (44), 17863–17871. https://doi.org/10.1039/C1JM12414E.

(175) Van Gelder, B. F.; Slater, E. C. The Extinction Coefficient of Cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta* **1962**, *58* (3), 593–595. https://doi.org/10.1016/0006-3002(62)90073-2.

(176) Han, X.; Han, W.; Zhang, S.; Liu, Z.; Fu, G. PEGylation of Protein-Imprinted Nanocomposites Sandwiching CdTe Quantum Dots with Enhanced Fluorescence Sensing Selectivity. *RSC Adv.* **2019**, *9* (65), 38165–38173. https://doi.org/10.1039/c9ra08556d.

(177) Zhang, W.; He, X.-W.; Chen, Y.; Li, W.-Y.; Zhang, Y.-K. Molecularly Imprinted Polymer Anchored on the Surface of Denatured Bovine Serum Albumin Modified CdTe Quantum Dots as Fluorescent Artificial Receptor for Recognition of Target Protein. *Biosensors and Bioelectronics* **2012**, *31* (1), 84–89. https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.09.042.

(178) Shi, L.; Tang, Y.; Hao, Y.; He, G.; Gao, R.; Tang, X. Selective Adsorption of Protein by a High-Efficiency Cu2+-Cooperated Magnetic Imprinted Nanomaterial. *Journal of Separation Science* **2016**, *39* (14), 2876–2883. https://doi.org/10.1002/jssc.201600413.

(179) Feng, L.; Kan, B.; Zhao, K.; Wei, J.; Zhu, D.; Zhang, L. Preparation and Characterization of Protein Molecularly Imprinted Polysiloxane Using Mesoporous Calcium Silicate as Matrix by Sol–Gel Technology. *J Sol-Gel Sci Technol* **2014**, *71* (3), 428–436. https://doi.org/10.1007/s10971-014-3396-3.

(180) Gao, R.; Cui, X.; Hao, Y.; He, G.; Zhang, M.; Tang, Y. Preparation of Cu2+-Mediated Magnetic Imprinted Polymers for the Selective Sorption of Bovine Hemoglobin. *Talanta* **2016**, *150*, 46–53. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.017.
(181) Gutiérrez-Climente, R.; Clavié, M.; Dumy, P.; Mehdi, A.; Subra, G. Sol–Gel Process: The Inorganic Approach in Protein Imprinting. *J. Mater. Chem. B* **2021**, *9* (9), 2155–2178. https://doi.org/10.1039/D0TB02941F.
(182) Tourné-Péteilh, C.; Gracy, G.; Clément, S.; Devoisselle, J.-M.; Mehdi, A. Ladder-like Aminopropylsilsesquioxane. A Nice Alternative for Controlled Drug Delivery. *RSC Adv.* **2013**, *3* (22), 8160–8163. https://doi.org/10.1039/C3RA41184B.
(183) Wang, F.; Ling, B.; Li, Q.; Abouhany, R. Dual Roles of 3-Aminopropyltriethoxysilane in Preparing Molecularly Imprinted Silica Particles for Specific Recognition of Target Molecules. *RSC Advances* **2020**, *10* (34), 20368–20373. https://doi.org/10.1039/D0RA01684E.
(184) Xu, L.; Cui, F.; Zhang, J.; Zhang, X.; Wang, Y.; Cui, T. A General Autocatalytic Route toward Silica Nanospheres with Ultrasmall Sized and Well-Dispersed Metal Oxide Nanoparticles. *Nanoscale* **2018**, *10* (20), 9460–9465. https://doi.org/10.1039/C8NR02299B.
(185) Hagemans, D.; van Belzen, I. A. E. M.; Morán Luengo, T.; Rüdiger, S. G. D. A Script to Highlight Hydrophobicity and Charge on Protein Surfaces. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2015**, *2*.
(186) Gao, R.; Mu, X.; Hao, Y.; Zhang, L.; Zhang, J.; Tang, Y. Combination of Surface Imprinting and Immobilized Template Techniques for Preparation of Core-Shell Molecularly Imprinted Polymers Based on Directly Amino-Modified Fe3O4 Nanoparticles for Specific Recognition of Bovine Hemoglobin. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (12), 1733–1741. https://doi.org/10.1039/C3TB21684E.
(187) Karimi, M. A.; Ranjbar, M.; Akbarpoor, M. Preparation of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Selective Adsorption and Separation of β-Estradiol. *J Clust Sci* **2016**, *27* (3), 1067–1080. https://doi.org/10.1007/s10876-016-0988-9.
(188) Kan, X.; Zhao, Q.; Shao, D.; Geng, Z.; Wang, Z.; Zhu, J.-J. Preparation and Recognition Properties of Bovine Hemoglobin Magnetic Molecularly Imprinted Polymers. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (11), 3999–4004. https://doi.org/10.1021/jp910060c.
(189) Yang, S.; Zhang, X.; Zhao, W.; Sun, L.; Luo, A. Preparation and Evaluation of Fe$$_{3}$$3O$$_{4}$$4nanoparticles Incorporated Molecularly Imprinted Polymers for Protein Separation. *J Mater Sci* **2015**, *51* (2), 937–949. https://doi.org/10.1007/s10853-015-9423-0.
(190) Boland, T. Molecular Imprinted Colored Silica Beads. WO/2015/021145, 2015.
(191) Yang, K.; Li, S.; Liu, L.; Chen, Y.; Zhou, W.; Pei, J.; Liang, Z.; Zhang, L.; Zhang, Y. Epitope Imprinting Technology: Progress, Applications, and Perspectives toward Artificial Antibodies. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2019**, *31* (50), 1902048. https://doi.org/10.1002/adma.201902048.
(192) Schafmeister, C. E.; Po, J.; Verdine, G. L. An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (24), 5891–5892. https://doi.org/10.1021/ja000563a.
(193) Catalona, W. J.; Richie, J. P.; Ahmann, F. R.; Hudson, M. A.; Scardino, P. T.; Flanigan, R. C.; Dekernion, J. B.; Ratliff, T. L.; Kavoussi, L. R.; Dalkin, B. L.; Waters, W. B.; Macfarlane, M. T.; Southwick, P. C. Comparison of Digital Rectal Examination and Serum Prostate Specific Antigen in the Early Detection of Prostate Cancer: Results of a Multicenter Clinical Trial of 6,630 Men. *The Journal of Urology* **1994**, *151* (5), 1283–1290. https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)35233-3.
(194) Bourbiaux, K.; Legrand, B.; Verdié, P.; Mallart, S.; Manette, G.; Minoletti, C.; Stepp, J. D.; Prigent, P.; Le Bail, J.-C.; Gauzy-Lazo, L.; Duclos, O.; Martinez, J.; Amblard, M. Potent Lys Patch-Containing Stapled Peptides Targeting PCSK9. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (15), 10834–10848. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02051.
(195) Simon, M.; Laroui, N.; Heyraud, M.; Laconde, G.; Ali, L. M. A.; Bourbiaux, K.; Subra, G.; Vezenkov, L. L.; Legrand, B.; Amblard, M.; Bettache, N. Hydrocarbon-Stapled Peptide Based-Nanoparticles for SiRNA Delivery. *Nanomaterials* **2020**, *10* (12), 2334. https://doi.org/10.3390/nano10122334.
(196) Bouclier, C.; Simon, M.; Laconde, G.; Pellerano, M.; Diot, S.; Lantuejoul, S.; Busser, B.; Vanwonterghem, L.; Vollaire, J.; Josserand, V.; Legrand, B.; Coll, J.-L.; Amblard, M.; Hurbin, A.; Morris, M. C. Stapled Peptide Targeting the CDK4/Cyclin D Interface Combined with Abemaciclib Inhibits KRAS Mutant Lung Cancer Growth. *Theranostics* **2020**, *10* (5), 2008–2028. https://doi.org/10.7150/thno.40971.
(197) Lin, Z.; Yang, F.; He, X.; Zhao, X.; Zhang, Y. Preparation and Evaluation of a Macroporous Molecularly Imprinted Hybrid Silica Monolithic Column for Recognition of Proteins by High Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (49), 8612–8622. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.025.

Partie expérimentale

1 Matériels et méthodes

1.1 Produits commerciaux et solvants

Tous les solvants et réactifs ont été utilisés tels que fournis. Le (3-aminopropyl)tris(trimethylsiloxy)-silane, le Boc-Glu(tBu)-OH, le Boc-Tyr(tBu)-OH, la Fmoc-hydrazine, la Fmoc-Phe(4-F)-OH, la Fmoc-Phe(CF_3)-OH, la H-Arg-NH_2.2HCl, la H-Glu-NH_2, la H-Leu-NH_2.HCl, H-Ser-NH_2.HCl, la H-Tyr-NH_2, le tétraéthyle orthosilicate et la triéthanolamine ont été achetés chez ABCR (Karlsruhe, Allemagne). Le 1,2-dichloroéthane, le N,N-diméthylformamide anhydre, le perchlorate de magnésium et la triéthylamine ont été achetés chez Accros Chemical (Geel, Belgique). La résine Amphisphère® RinkAmide (0,39 mmol/g) a été achetée chez Agilent Technologies (Santa Clara, Etats-Unis). L'acétate d'éthyle, l'acétonitrile, le cyclohexane, le dichlorométhane anhydre, le N,N-diméthylformamide, l'éther de pétrole, le méthanol, le tétrahydrofurane anhydre et le toluène anhydre ont été achetés chez Analytic lab (Castelnau-le-Lez, France). Le BocHN-PEG(2000)-CO_2H (2) a été acheté chez Biopharma PEG (Watertown, Etats-Unis). La pipéridine et l'acide trifluoroacétique ont été achetés chez Carlo Erba (Val de Reuil, France). Le chloroforme deutéré et le deutéroxyde de sodium ont été achetés chez Eurisotop (Tewksbury, Etats-Unis). L'acide chlorhydrique 4N dans dioxane, le sulfate de magnésium, le bicarbonate de sodium et les solutions aqueuses d'ammoniac à 35% et à 30% ont été achetés chez Fisher Scientific (Waltham, Etats-Unis). L'acide bromoacétique et l'hexafluorophosphate de N,N-diméthylméthaniminium (HATU) ont été acheté chez Fluorochem (Dublin, Irlande). L'oxyde de deutérium a été acheté chez Innovachem (Angervilliers, France). Le BocHN-PEG(2000)-CO_2H (1), le N,N'-diisopropylcarbodiimide, les Fmoc-AA-OH, la Fmoc-Ala(CF_3)-OH, l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium (PyBop) et la résine 2-chlorochlorotrityl PS ont été achetés chez Iris-Biotech (Marktredwitz, Allemagne). La Boc-Arg-OH et la résine HMBA Novagel ont été achetés chez Merck (Darmstadt, Allemagne). L'eau milliQ a été filtrée sur un système de purification acheté chez Millipore (Burlington, États-Unis). La résine ChemMatrix RinkAmide (0,49 mmol/g) a été achetée chez PCAS BioMatrix (St-Jean-sur-Richelieu, Canada). L'acétate de sodium anhydre, l'acide acétique, le 3-aminopropyltriéthoxysilane, le Boc-Leu-OH, la Boc-Ser-OH, le dichlorométhane, la N,N-diisopropyléthylamine, le diéthylène glycole, la diméthylaminopyridine, le diméthylsulfoxide deutéré, l'éther diéthylique, le chlorure ferrique hexahydraté, le Fmoc-(R8)-OH, le Fmoc-(S5)-OH, le catalyseur d'Hoveyda-Grubbs, l'isocyanatopropyltriéthoxysilane, le bis(triméthylsilyle)-amidure de lithium (LiHMDS), le méthanol deutéré, le N-bromosuccinimide, le tétrakis (triphénylphosphine) palladium, le phénylsilane, le trifluoroéthanol, le thioacétamide, le triisopropylsilane, le lysozyme de blanc d'œuf de poulet (Lyz), la ribonucléase A de pancréas bovin (RibA), le cytochrome C de cœur bovin (CytC), l'albumine de sérum bovin (BSA) et l'α-lactalbumine (Lact) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne). Le

carbonyldiimidazole, le chlorure d'acétyle, la fluorescéine isothiocyanate et l'hydrochlorate de 2-fluoroéthylamine ont été achetés chez TCI (Tokyo, Japan). L'acide citrique, l'éthanol absolu et l'éthylène glycol ont été achetés chez VWR (Fontenay-sous-bois, France)

1.2 Analyses : appareillages et protocoles

1.2.1 Spectrophotomètre UV-Visible

Les mesures d'absorbance ont été réalisées sur le spectrophotomètre Cary 60 UV-Vis Agilent.

1.2.2 Chromatographie liquide et chromatographie liquide haute performance couplées à la spectrométrie de masse

Les échantillons pour les analyses LC/MS ont été préparés dans un mélange eau/ACN (50/50 v/v), contenant 0,1% de TFA. La LC/MS et l'UPLC/MS sont pilotées avec le logiciel MassLynx 4.0. Les chromatographes ont été traités, visualisés et analysés avec le logiciel MassLynx 4.0.

LC/MS

Le système LC-MS utilisé est constitué d'une HPLC Waters Alliance 2695, couplée à un spectromètre Waters ZQ (Manchester, UK) (mode d'ionisation electrospray positif). L'identification a été effectuée à l'aide d'une colonne en phase inverse Merck Chromolith Speed rod C18, 25×4,6 mm. Un débit de 3 mL/min et un gradient de (0-100) % B sur 2,5 min ont été utilisés. Éluant A : eau 0,1% HCO_2H ; éluant B : acétonitrile 0,1% HCO_2H. Les temps de rétention (t_R) sont indiqués en minutes. Les spectres de masse ESI+ ont été acquis à un débit de solvant de 100 µL/min par l'intermédiaire d'un split. L'azote a été utilisé à la fois comme gaz de nébulisation et de séchage. Les données ont été obtenues dans un mode de balayage allant de 200 à 1600 m/z par intervalles de 1s ; 4 balayages ont été additionnés pour obtenir le spectre final.

UPLC/MS

Le système UPLC/MS utilisé est constitué d'une UPLC Waters Acquity HClassPlus (gradient quaternaire) couplée à un détecteur UV Waters PDA eλ Detector et un spectromètre Waters SQD2 (mode d'ionisation electrospray, ESI+ avec un analyseur quadrupôlaire). L'identification a été effectuée avec une colonne en phase inverse ACQUITY UPLC® Peptide, HSS T3, 100Å, 50×2 mm. Un débit de 0,8 mL/min et un gradient de (0-100) %B sur 5 min ont été utilisés. Eluant A : eau 0,1% HCO_2H (ou 0,05% TFA) ; éluant B : acétonitrile 0,1% HCO_2H (ou 0,05% TFA). Les temps de rétention (t_R) sont indiqués en minutes. Les spectres de masse ESI+ ont été acquis avec un débit de solvant de 0,8 mL/min. L'azote a été utilisé à la fois comme gaz de

nébulisation et de séchage. Les données ont été obtenues dans un mode de balayage allant de 200 à 1600 m/z par intervalles de 0,3 s ; 10 balayages ont été additionnés pour obtenir le spectre final.

1.2.3 Résonance Magnétique Nucléaire

Toutes les expériences de RMN ont été réalisées au Laboratoire de Mesures Physiques, plateforme technologique du Pôle Chimie Balard. Les acquisitions ont été réalisées dans différents solvants deutérés ($CDCl_3$, DMSO-d6, D_2O, NaOD 1,5 mol/L, D_2O/MeOH-d4) à 25°C. Les déplacements chimiques (δ) ont été rapportés en parties par million (ppm) en utilisant les pics résiduels non deutérés de ces solvants comme références internes ($CDCl_3$, δ(H) = 7,26 ppm ; DMSO-d6, δ(H) = 2,50 ppm ; D_2O, δ(H) = 4,79 ppm ; D_2O/MeOH-d4 et MeOH-d4 δ(H) = 3,31 ppm), ou le signal des CH_2 du PEG le cas échéant (δ(H) = 3,74 ppm ; δ(C) = 69,6 ppm). La multiplicité des signaux a été indiquée comme suit : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), dd (doublet dédoublé), m (multiplet). Les constantes de couplage (J) ont été mesurées en Hertz. Les spectres ont été traités, visualisés et analysés avec le logiciel Topspin 4.1.1 (Bruker Biospin).

Instrumentation

Les spectres RMN ^{1}H ont été enregistrés sur différents spectromètres :

- Le spectromètre RMN BRUKER Avance NEO – **400MHz** (aimant de 9 Teslas) équipé d'une sonde BBFO (large bande, optimisée pour l'observation de noyaux dans la gamme de fréquence comprise entre les noyaux ^{31}P et ^{15}N et l'observation du ^{19}F).
- Le spectromètre RMN BRUKER Avance III HD – **400MHz** (aimant de 9 Teslas) équipé d'une sonde BBI (large bande, optimisée pour l'observation ^{1}H).
- Le spectromètre RMN BRUKER Avance III HD – **400MHz** (aimant de 9 Teslas) équipé d'une sonde BBFO (large bande, optimisée pour l'observation de noyaux dans la gamme de fréquence comprise entre les noyaux ^{31}P et ^{15}N et l'observation du ^{19}F).
- Le spectromètre RMN BRUKER Avance III – **500MHz** (aimant de 11,7 Teslas) équipé d'une cryosonde Hélium BBO (large bande, optimisée pour l'observation de noyaux dans la gamme de fréquence comprise entre les noyaux ^{31}P et ^{15}N).
- Le spectromètre RMN BRUKER Avance III – **600MHz** (aimant de 14,1 Teslas) équipé d'une cryosonde azote Prodigy TCI (triple noyaux ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, optimisée pour la détection du ^{1}H).

Carbone

Les spectres RMN ^{13}C découplés du proton ont été enregistrés sur les spectromètres BRUKER Avance III HD – 400MHz et 500MHz aux fréquences de Larmor ^{13}C respectives de 100MHz et 125MHz.

Silicium

Les spectres RMN ^{29}Si ont été enregistrés sur le spectromètre RMN BRUKER Avance III – 500MHz à la fréquence de Larmor de 99,4MHz.

Fluor

Les spectres RMN ^{19}F découplés du proton ont été enregistrés sur les spectromètres RMN BRUKER Avance NEO – 400MHz et Avance III HD – 400MHz à la fréquence de Larmor de 376,5MHz.

Expériences RMN 2D

Les expériences RMN homonucléaires COSY (TD-F2 : 2048 ; TD-F1 : 512 ; NS : 2 à 8), TOCSY (TD-F2 : 2048 ; TD-F1 : 512 ; NS : 8), ROESY (TD-F2 : 2048 ; TD-F1 : 512 ; NS 32) et hétéronucléaires ^{13}C-^{1}H HSQC (TD-F2 : 2048 ; TD-F1 : 256 ; NS : 2 à 32) éditée ^{15}N-^{1}H HSQC (TD-F2 : 2048 ; TD-F1 : 128 ; NS : 32) éditée et ^{13}C-^{1}H HMBC (TD-F2 : 2048 ; TD-F1 : 256 à 512 ; NS : 48 à 64) ont été réalisées sur le spectromètre RMN BRUKER Avance III – 600MHz.

1.2.4 Interférométrie biocouche

Les analyses par interférométrie biocouche ont été réalisées sur le OctetRED96e de la plateforme SPR/BLI de l'institut de biologie structurale (UMR5075) de Grenoble. Le capteur est d'abord stabilisé dans un mélange PBS-Tween 0,02 pendant 2 min puis le ligand (nanobody ou peptide) est immobilisé (1 min pour le nanobody, 10 min pour les peptides). Le capteur est de nouveau stabilisé pendant 2 min dans un mélange PBS-Tween 0,02. L'association avec la mésothéline (10 nmol/L dans le PBS sans Tween 0,02) est mesurée pendant 5 min et la dissociation est mesurée pendant un mélange PBS-Tween 0,02 pendant 5 à 10 min. Le capteur est régénéré avec une solution de glycine à pH 2 puis neutralisé avec un mélange PBS-Tween 0,02 pendant trois fois 0,5 min.

1.2.5 Diffusion dynamique de la lumière

La taille des nanoparticules a été déterminée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) en utilisant un équipement Zetasizer Nano (Nano-S) de Malvern Panalytical à une concentration de 0,05 mg/mL à température ambiante (25°C). Le même équipement et la même

concentration d'échantillon ont été utilisés pour la caractérisation des charges de surface (potentiel zêta). Les paramètres de mesure de l'équipement étaient les suivants : une longueur d'onde laser de 633 nm et un angle de diffusion de 173°. L'indice de réfraction et l'adsorption de la particule et de la solution (1,45 et 1,33 respectivement) ont été obtenus à partir de la bibliothèque de l'instrument original. Des solutions de HCl 2 mol/L ou de NaOH 2 mol/L ont été utilisées pour ajuster le pH des solutions aqueuses. Toutes les mesures ont été effectuées en triplicata. Les données ont été acquises et traitées sur le logiciel ZS XPLORER.

1.2.6 Microbalance à quartz avec contrôle de la dissipation

La reconnaissance des nanoparticules pour leurs cibles (NP@CDR et MIP) a été suivie à l'aide d'une microbalance à quartz avec contrôle de la dissipation (QCM-d). Les expériences QCM-d ont été réalisées sur un instrument Q-sense explorer E1 (Biolin Scientific, Les Ulis, France), équipé d'une chambre d'écoulement QAFC 301. Les protéines cibles ont été immobilisées sur le capteur en or pré-revêtu d'une monocouche auto-assemblée en immergeant le quartz dans une solution éthanolique de 11-MUA à 5 mmol/L pendant 15 h à 4°C dans le noir. Le capteur a été rincé avec de l'éthanol et plusieurs fois avec de l'eau milliQ avant d'être séché avec du gaz N_2. Le capteur 11-MUA-Au a été monté dans la chambre QCM-d, de l'eau a été injecté sur le capteur avec un débit de 15 µL/min jusqu'à stabilisation du capteur. Après avoir obtenu une fréquence et une dissipation stable sous eau milliQ, la surface du capteur est activée avec un mélange EDC/NHS (400 mmol/L et 100 mmol/L respectivement) pendant 15 min à 15 µL/min. L'injection de la solution de protéines pour la fonctionnalisation du capteur activé a été réalisée à un débit de 30 µL/min pour atteindre les valeurs de fréquence et de dissipation souhaitées. Les ester de N-hydroxysuccinimides n'ayant pas réagi ont été désactivés par réaction avec de l'éthanolamine (1 mol/L) pendant 10 min à un débit de 15 µL/min, suivi d'un rinçage à l'eau milliQ à 15 µL/min jusqu'à stabilisation de la fréquence et de la dissipation. Les quantités de protéines immobilisées ont été déterminées par l'équation de Sauerbrey. Les nanoparticules analysées ont été mises en suspension dans eau/DMSO (95/5, v/v) pour les NP@CDR à une concentration de 50 µg/mL et dans de l'eau milliQ pour les MIP/NIP à une concentration de 25 µg/mL. Les particules sont injectées pendant 40 min à un débit de 15 µL/min pour interagir avec la protéine immobilisée, suivi d'une étape de rinçage à l'eau milliQ au même débit pendant 20 min pour éliminer les particules non liées. Toutes les mesures ont été effectuées à 25°C. Les variations de fréquence et de dissipation à différentes harmoniques ont été utilisés pour appliquer le modèle viscoélastique afin d'estimer la masse surfacique de nanoparticules liées à la protéine immobilisée (ng/cm²). La fonction Smartfit du logiciel Dfind a permis d'utiliser ce modèle à partir des mesures réalisées.

1.2.7 Electrophorèse capillaire

L'instrument Beckman P/ACE-MDQ (Fullerton, USA) équipé d'un système de détection UV a été utilisé pour les expériences d'EC. Les capillaires nus en silice fondue ont été obtenus auprès de Polymicro Technologies (Phoenix, USA), avec une dimension de 30 µm de diamètre interne, 375 µm de diamètre externe, 20 cm de longueur effective, 30 cm de longueur totale. Les données ont été acquises avec le logiciel 32 Karat (version 8.0, Beckman Coulter).

1.2.8 Fluorimétrie différentielle à balayage nanométrique

La fluorimétrie différentielle à balayage nanométrique a servi à vérifier la stabilité des protéines dans les conditions de synthèse des empreintes. Ces analyses ont été réalisées sur un Prometheous Nano Templer NT48. Des profils de dénaturation ont été réalisés dans la gamme de 20 à 90 °C par la mesure de la fluorescence à 350 nm et 330 nm.

1.2.9 Analyse thermogravimétrique

Les mesures d'analyse thermogravimétrique (ATG) ont été effectuées sur un PC/PG NETZSCH STA 409, avec un creuset en téflon et une vitesse de chauffage de 10°C/min sous air.

1.2.10 Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (MET) a été réalisée sur un microscope électronique à transmission flash JEOL JEM-1400, en utilisant une tension d'accélération de 120 kV. Des grilles de cuivre recouvertes de Formvar/carbone ont été utilisées pour le dépôt des échantillons.

1.2.11 Microscopie électronique à balayage

Les images de microscopie électronique à balayage (MEB) des capillaires ont été enregistrées sur un MEB QUANTA FEG 250 à émission de champ thermique (FEI Co., USA) à la plateforme MEA, Université de Montpellier.

1.2.12 Pycnomètre

La densité des nanoparticules a été déterminée par le pycnomètre AccuPyc II 1340, qui mesure le changement de pression de l'hélium (pur à 99,995%) dans un volume calibré. La densité a été calculée par différence entre le volume mesuré d'une cellule d'échantillon vide de 1 cm^3 et la même cellule avec l'échantillon (environ 100 mg à chaque fois).

1.2.13 Dichroïsme circulaire

Les expériences de dichroïsme circulaire ont été réalisées à l'aide d'un spectropolarimètre Jasco J815. Les peptides ont été dissous à une concentration de 200 µmol/L, dans une solution eau/triéthanolamine (99,9/0,1, v/v) contenant 0, 10, 20, 30, 40 et 50% de trifluoroéthanol. Les concentrations ont été vérifiées en mesurant l'absorbance à 280 nm. Les spectres ont été obtenus à l'aide d'une cuvette CD de 1 mm de trajet, à 20°C, sur une plage de longueurs d'onde de 195-260 nm. Le mode de balayage continu a été utilisé, avec une réponse de 1,0 s avec des pas de 0,5 nm et une largeur de bande de 2 nm. Le rapport signal/bruit a été amélioré en acquérant chaque spectre sur une moyenne de trois balayages. La ligne de base a été corrigée en soustrayant le blanc du spectre de l'échantillon.

1.3 Synthèses

1.3.1 SPPS Protocole 1 : synthèse des peptides C-terminaux amides en stratégie Fmoc/tBu

Les peptides amides ont été synthétisés sur des résines Amphisphère-RinkAmide avec une charge de 0,39 mmol/g ou ChemMatrix-RinkAmide avec une charge de 0,47 mmol/g. Le linker, protégé sous forme N-Fmoc, est d'abord déprotégé avec un mélange DMF/pipéridine (80/20, v/v) (deux cycles d'agitation d'une minute à 450 rpm). La résine est ensuite lavée deux fois au DMF, deux fois au DCM puis encore une fois au DMF. Enfin, pour 1 équivalent de linker, le Fmoc-AA-OH est ancré sur la résine, en utilisant 5 équivalents de Fmoc-AA-OH à 0,5 mol/L dans du DMF, 5 équivalents de HATU à 0,5 mol/L dans du DMF et 10 équivalents de DIEA. Cette réaction est réalisée pendant deux fois 5 min à 450 rpm. Une fois l'ancrage terminée, la résine est de nouveau lavée deux fois au DMF puis deux fois au DCM et encore une fois au DMF.

L'élongation des peptides a été réalisée en alternant des cycliques de déprotection de l'amine N-Fmoc suivi du couplage du Fmoc-AA-OH suivant. La déprotection de l'amine N-Fmoc est réalisée avec un mélange DMF/pipéridine (80/20, v/v) (deux cycles d'agitation d'une minute à 450 rpm). La résine est ensuite lavée deux fois au DMF, deux fois au DCM puis encore une fois au DMF. Enfin, le Fmoc-AA-OH est couplé sur l'amine libre en utilisant 5 équivalents de Fmoc-AA-OH à 0,5 mol/L dans du DMF, 5 équivalents de HATU à 0,5 mol/L dans du DMF et 10 équivalents de DIEA. Cette réaction est réalisée pendant deux fois 5 min à 450 rpm. La résine est ensuite lavée deux fois au DMF, deux fois au DCM puis encore une fois au DMF. A partir du 6ème couplage, le temps de déprotection est augmenté à 2 min et le temps de couplage à 10 min.

Les peptides ancrés sur les résines Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) et ChemMatrix RinkAmide (0,47 mmol/g) ont été clivés de la résine avec une solution de TFA/TIS/eau (90/5/5, v/v/v) (deux fois 2h). Après évaporation du solvant, les peptides bruts ont été récupérés par précipitation dans de l'éther diéthylique. Les bruts ont été lavés deux fois à l'éther diéthylique puis ont été séchés sous vide.

1.3.2 SPPS Protocole 2 : synthèse des peptides C-terminaux acides en stratégie Fmoc/tBu

Les peptides acides ont été synthétisés sur une résine PS-2-chlorochlorotrityl avec une charge de 1,6 mmol/g. La résine a pu être réactivée avec du chlorure d'acétyle (1 mL/g de résine) dans du toluène anhydre à 60°C pendant 3h. Après la réactivation, la résine est suspendue dans du DCM (1 mL/g de résine). Le Fmoc-AA-OH est ajouté (entre 0,45 et 0,5 équivalents pour 1 équivalent de linker, selon le Fmoc-AA-OH), ainsi que la DIEA (4 équivalents de DIEA pour 1 équivalent de Fmoc-AA-OH). Le mélange est agité entre 2h et une nuit à 450 rpm à température ambiante. La résine est ensuite filtrée et les linkers n'ayant pas réagi sont bloqués par trois lavages avec un mélange DCM/MeOH/DIEA (85/10/5, v/v/v) pendant 5 min. La résine est enfin lavée (deux fois au DCM puis deux fois au DMF puis deux fois au DCM) et est séchée sous vide. Un dosage Fmoc est alors effectué pour estimer la nouvelle charge de la résine.

L'élongation des peptides a été réalisée en alternant des cycliques de déprotection de l'amine N-Fmoc suivi du couplage du Fmoc-AA-OH suivant. La déprotection de l'amine N-Fmoc est réalisée avec un mélange DMF/pipéridine (80/20, v/v) (deux cycles d'agitation d'une minute à 450 rpm). La résine est ensuite lavée deux fois au DMF, deux fois au DCM puis encore une fois au DMF. Enfin, le Fmoc-AA-OH est couplé sur l'amine libre en utilisant 5 équivalents de Fmoc-AA-OH à 0,5 mol/L dans du DMF, 5 équivalents de HATU à 0,5 mol/L dans du DMF et 10 équivalents de DIEA. Cette réaction est réalisée pendant deux fois 5 min à 450 rpm. La résine est ensuite lavée deux fois au DMF, deux fois au DCM puis encore une fois au DMF. A partir du 6ème couplage, le temps de déprotection est augmenté à 2 min et le temps de couplage à 10 min.

Les peptides ancrés sur la résine PS-2-chlorochlorotrityl ont été clivés de façon ménagé afin de garder les protections sur les chaînes latérales. Pour cela, les peptides ont été clivés en utilisant une solution de DCM/AcOH/TFE (70/20/10, v/v/v) pendant 1 h. Après évaporation du solvant, les peptides ont été précipités dans de l'éther diéthylique, lavés deux fois à l'éther diéthylique et séchés sous vide.

1.3.3 Purification par HPLC-préparative

La purification par HPLC-préparative a été réalisée sur un appareil Gilson HPLC 2250, équipé d'une colonne C18 à phase inverse (Waters Deltapak C18 15µm 400×100mm). Les conditions de gradient standard utilisent le système d'élution A (eau 0,1% TFA) et B (acétonitrile 0,1% TFA) avec un débit de 50 mL/min et un gradient de (0-100) % B avec des temps adaptés, à une longueur d'onde de détection de 214 nm.

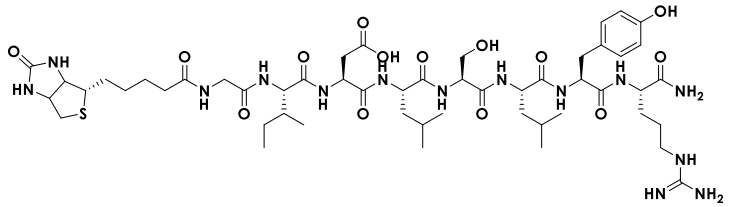
1.3.4 Micro-ondes

Les réactions au micro-ondes ont été réalisées sur le CEM Discover 2.0 dans des réacteurs de 35 mL à 80°C.

2 Partie expérimentale - Mimes du nanobody anti-mésothéline

2.1 Peptides linéaires

Synthèse du composé A1

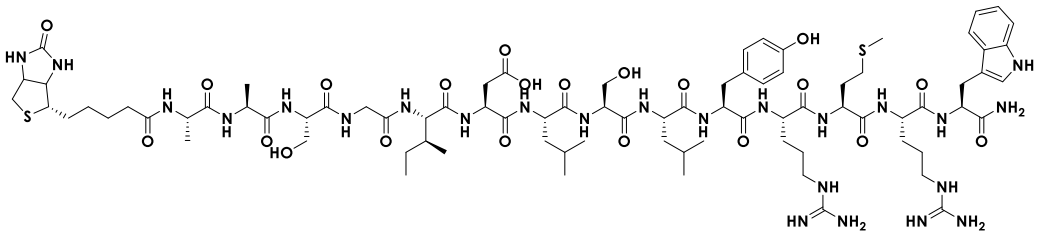


Biotine-Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg-NH_2

Le composé A1 a été synthétisé sur 1030 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1 et a été purifié par HPLC-préparative pour obtenir 141 mg, soit un rendement de 31% avec une pureté de 91%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 2,08 min, m/z 1161,7 $[M+H]^+$; m/z 581,4 $[M+2H]^{2+}$
MW^{th} = 1161,4 g/mol

Synthèse du composé A2

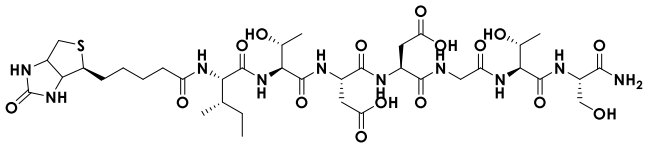


Biotine-Ala-Ala-Ser-Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg-Met-Arg-Trp-NH_2

Le composé A2 a été synthétisé sur 100 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1 et a été purifié par HPLC-préparative pour obtenir 30,8 mg, soit un rendement de 22% avec une pureté de 91%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 2,16 min, m/z 932,5 $[M+2H]^{2+}$; m/z 622,1 $[M+3H]^{3+}$
MW^{th} = 1864,2 g/mol

Synthèse du composé A3



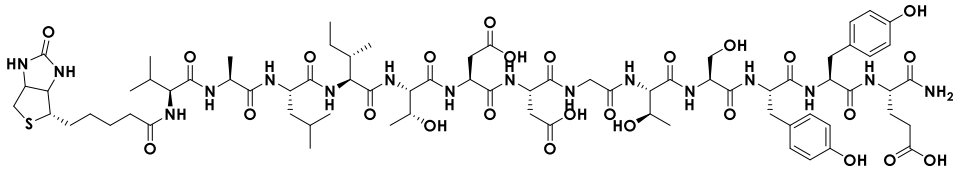
Biotine-Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser-NH_2

Le composé A3 a été synthétisé sur 100 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1 et a été purifié par HPLC-préparative pour obtenir 40,7 mg, soit un rendement de 43% avec une pureté de 86%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 1,57 min, m/z 933,5 $[M+H]^+$; m/z 467,2 $[M+2H]^{2+}$; t_R = 1,69 min, m/z 933,5 $[M+H]^+$; m/z 467,2 $[M+2H]^{2+}$

MW^{th} = 933,0 g/mol

Synthèse du composé A4



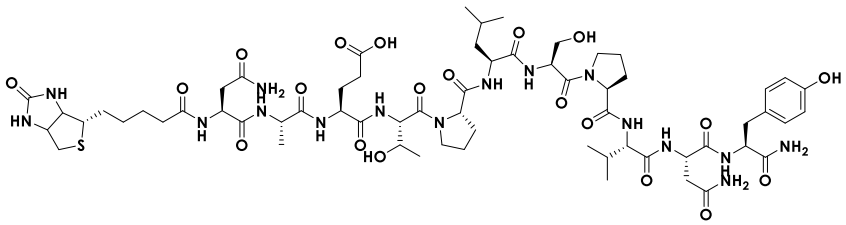
Biotine-Val-Ala-Leu-Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser-Tyr-Tyr-Glu-NH_2

Le composé A4 a été synthétisé sur 100 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1 et a été purifié par HPLC-préparative pour obtenir 30,8 mg, soit un rendement de 18% avec une pureté de 85%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 2,20 min, m/z 836,2 $[M+2H]^{2+}$; m/z 558,0 $[M+3H]^{3+}$; t_R = 2,34 min, 836,4 $[M+2H]^{2+}$; m/z 558,5 $[M+3H]^{3+}$

MW^{th} = 1671,8 g/mol

Synthèse du composé A5



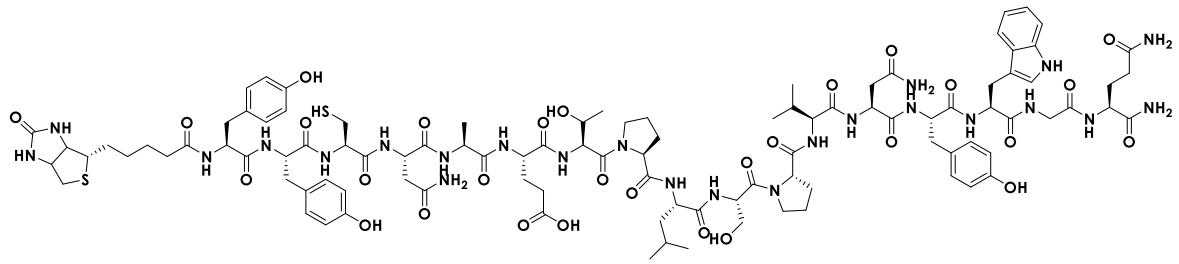
Biotine-Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr-NH_2

Le composé A5 a été synthétisé sur 100 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1 et a été purifié par HPLC-préparative pour obtenir 38,8 mg, soit un rendement de 27% avec une pureté de 94%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 1,93 min, m/z 1430,2 $[M+H]^+$; m/z 715,4 $[M+2H]^{2+}$

MW^{th} = 1429,6 g/mol

Synthèse du composé A6

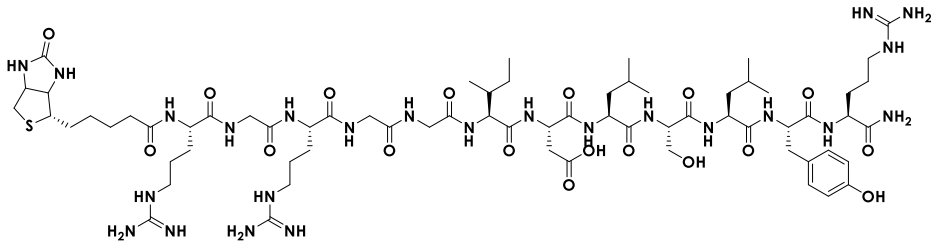


Biotine-Tyr-Tyr-Cys-Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr-Trp-Gly-Gln-NH_2

Le composé A6 a été synthétisé sur 100 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1 et a été purifié par HPLC-préparative pour obtenir 24 mg, soit un rendement de 11% avec une pureté de 90%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 2,34 min, m/z 1115,5 $[M+2H]^{2+}$; m/z 744,4 $[M+3H]^{3+}$
MW^{th} = 2230,5 g/mol

Synthèse du composé A7

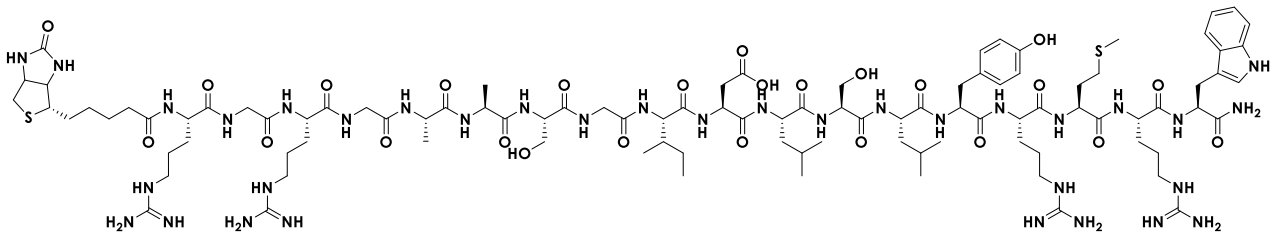


Biotine-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg-NH_2

Le composé A7 a été synthétisé sur 250 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1 et a été purifié par HPLC-préparative pour obtenir 37,4 mg, soit un rendement de 60% avec une pureté de 94%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 1,61 min, m/z 794,4 $[M+2H]^{2+}$; m/z 529,9 $[M+3H]^{3+}$
MW^{th} = 1587,9 g/mol

Synthèse du composé A8

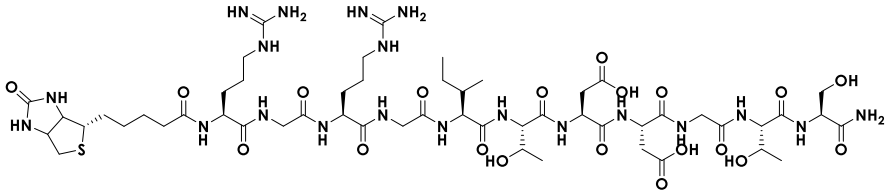


Biotine-Arg-Gly-Arg-Gly-Ala-Ala-Ser-Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg-Met-Arg-Trp-NH_2

Le composé A8 a été synthétisé sur 250 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1 et a été purifié par HPLC-préparative pour obtenir 9,1 mg, soit un rendement de 10% avec une pureté de 85%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 1,81 min, m/z 1146,0 $[M+2H]^{2+}$; m/z 764,4 $[M+3H]^{3+}$; m/z 573,5 $[M+4H]^{4+}$
MW^{th} = 2290,7 g/mol

Synthèse du composé A9

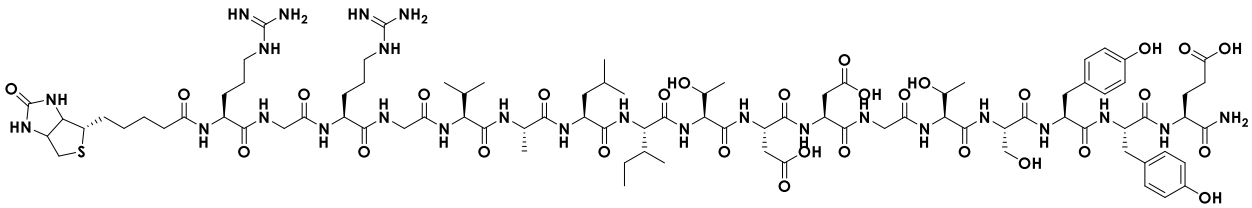


Biotine-Arg-Gly-Arg-Gly-Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser-NH_2

Le composé A9 a été synthétisé sur 250 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1 et a été purifié par HPLC-préparative pour obtenir 52,5 mg, soit un rendement de 99% avec une pureté de 95%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 1,24 min, m/z 680,3 $[M+2H]^{2+}$; m/z 454,0 $[M+3H]^{3+}$
MW^{th} = 1359,5 g/mol

Synthèse du composé A10

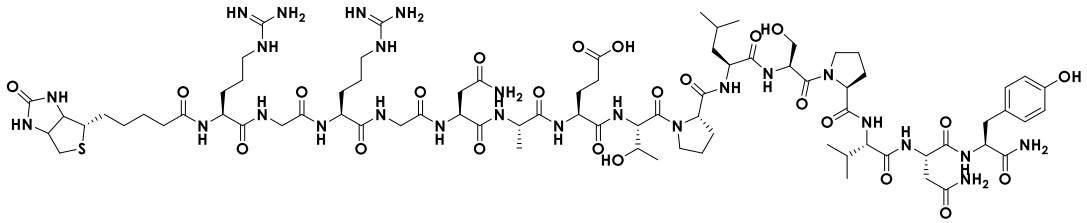


Biotine-Arg-Gly-Arg-Gly-Val-Ala-Leu-Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser-Tyr-Tyr-Glu-NH_2

Le composé A10 a été synthétisé sur 250 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1 et a été purifié par HPLC-préparative pour obtenir 9,9 mg, soit un rendement de 12% avec une pureté de 97%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 1,71 min, m/z 1049,8 $[M+2H]^{2+}$; m/z 700,0 $[M+3H]^{3+}$
MW^{th} = 2098,3 g/mol

Synthèse du composé A11

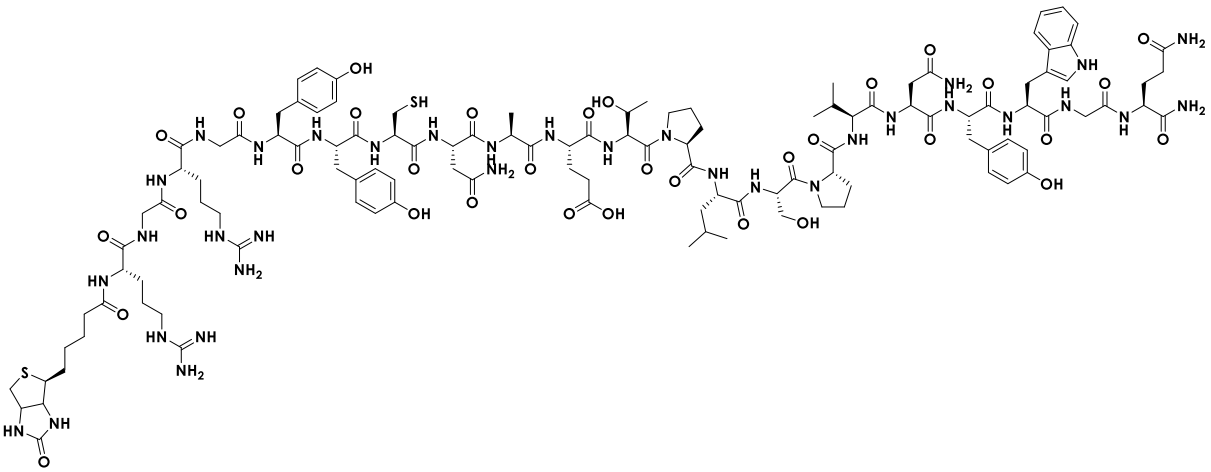


Biotine-Arg-Gly-Arg-Gly-Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr-NH_2

Le composé A11 a été synthétisé sur 250 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1 et a été purifié par HPLC-préparative pour obtenir 33,8 mg, soit un rendement de 46% avec une pureté de 89%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 0,96 min, m/z 928,7 $[M+2H]^{2+}$; m/z 619,4 $[M+3H]^{3+}$
MW^{th} = 1856,1 g/mol

Synthèse du composé A12



Biotine-Arg-Gly-Arg-Gly-Tyr-Tyr-Cys-Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr-Trp-Gly-Gln-NH_2

Le composé A12 a été synthétisé sur 250 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1 et a été purifié par HPLC-préparative pour obtenir 13,8 mg, soit un rendement de 13% avec une pureté de 93%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 1,91 min, m/z 1328,8 $[M+2H]^{2+}$; m/z 886,3 $[M+3H]^{3+}$
MW^{th} = 2657,0 g/mol

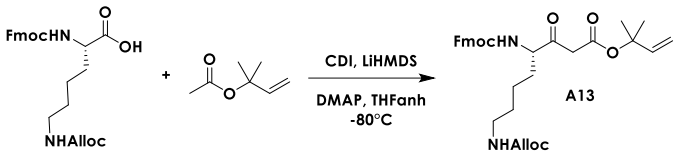
ELISA

La mésothéline recombinante est immobilisée dans les puits à 1 µg/mL pendant une nuit à 4°C. Les sites aspécifiques sont ensuite saturés avec une solution PBS-BSA 1% pendant 1h à température ambiante. Les peptides linéaires A7 à A12, à 100 µmol/L, sont incubés pendant 1h à température ambiante. Après incubation des peptides, la streptavidine-HRP est incubée puis les plaques sont révélées avec le 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine et les valeurs d'absorbances sont mesurées à 450 nm.

2.2 Peptides cycliques

2.2.1 Synthèse de l'ATC

Composé A13 : synthèse du β-cétoester



La Fmoc-Lys(Alloc)-OH (12,56 mg, 27,75 mmol, 1 équivalent) est solubilisée dans 150 mL de THF anhydre. Le CDI (1,15 équivalents) est ajouté en trois fois. Après 3 min d'agitation, la DMAP (0,04 équivalents) est ajoutée. Le mélange est agité à température ambiante pendant 40 min.

Dans un ballon tricol de 500 mL à -80°C sous Argon, le LiHMDS (22 équivalents) en solution à 1 mol/L dans du THF anhydre est solubilisé dans 50 mL de THF anhydre. L'acétate de diméthylallyle est ajouté en goutte à goutte pendant 5 min. Une fois l'addition terminée, le mélange est agité 10 min à -80°C puis 20 min à température ambiante et enfin 10 min à -80°C.

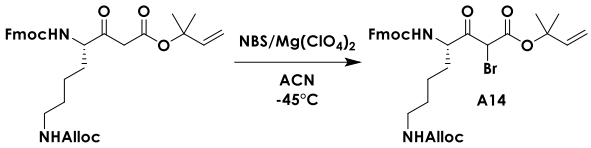
La Fmoc-Lys(Alloc)-OH activée est ajoutée sur l'énolate à -80°C en goutte à goutte pendant 10 min. Une fois l'addition terminée, le mélange est agité 5 min à -80°C puis la réaction est contrôlée par HPLC et est terminée. Le mélange est alors versé sur 200 mL d'acide citrique à 10% massique (pH 5). Le produit est extrait deux fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée en $NaHCO_3$ puis trois fois avec une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et concentrée. Le produit brut est purifié sur colonne de silice avec un gradient cyclohexane/acétate d'éthyle (8/2, v/v) sur 3 volumes de colonnes jusqu'à cyclohexane/acétate d'éthyle (6/4, v/v) pendant 10 volumes de colonnes pour obtenir le 6,676 g de produit pur avec un rendement de 43%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 2,12 min, m/z 563,3 $[M+H]^+$
MW^{th} = 562,7 g/mol

RMN ^1H ($CDCl_3$, 400MHz, 298K): δ = 1,33 (m, 2H) ; 1,53 (s, 6H) ; 1,69 (m, 2H) ; 1,91 (m, 2H) ; 3,18 (m, 2H) ; 3,42 (dd, J = 15,6 Hz, 1H) ; 3,49 (dd, J = 14,8 Hz, 1H) ; 4,21 (t, J = 6,6 Hz, 1H) ; 4,43 (m, 2H) ; 4,53 (m, 2H) ; 4,81 (m, 1H) ; 5,19 (m, 4H) ; 5,53 (m, 2H) ; 5,88 (m, 1H) ; 6,07 (dd, J = 10,9 Hz, 17,4 Hz, 1H) ; 7,31 (t, J = 7,4, 2H) ; 7,40 (t, J = 7,4, 2H) ; 7,59 (d, J = 7,4, 2H) ; 7,76 (d, J = 7,4, 2H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 400MHz, 298K): δ = 22,0 ; 26,3 (2C) ; 29,4 ; 30,4 ; 40,3 ; 47,3 (3C) ; 59,8 ; 65,5 ; 66,9 ; 113,4 ; 117,6 ; 120,0 (2C) ; 125,0 (2C) ; 127,1 (2C) ; 127,8 (2C) ; 132,9 ; 141,3 (2C) ; 141,7 (2C) ; 143,7 ; 156,1 ; 156,4 ; 165,6 ; 201,9.

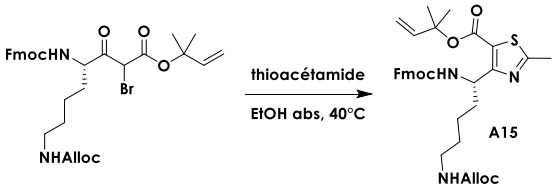
Composé A14 : monobromation du composé A13



Le β-cétoester A13 (6,678 g, 11,87 mmol, 1 équivalent) est dissout dans 100 mL d'ACN et est refroidi à -45°C. Le $Mg(ClO_4)_2$ (0,3 équivalents) est ajouté et le mélange est agité 10 min à -45°C. Le NBS (1,05 équivalents), préalablement dissout dans 80 mL d'ACN, est ajouté en goutte à goutte à la solution de βcétoester pendant 20 min à -45°C. Une fois l'addition terminée, le mélange est agité 5 min à -45°C. La réaction, contrôlée par CCM, est terminée. Le mélange est dilué dans 200 mL d'Et_2O et est remonté à température ambiante. La phase organique est lavée deux fois à l'eau puis trois fois avec une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ filtrée puis concentrée pour obtenir 7,29 g de produit brut, soit un rendement de 95%, qui est utilisé dans purification supplémentaire.

LC/MS (ESI+) : t_R = 2,24 min, m/z 641,2 $[M+H]^+$
MW^{th} = 641,7 g/mol

Composé A15 : cyclisation du composé A14



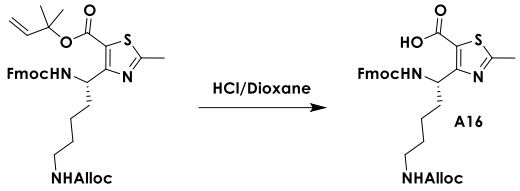
A 40°C, le composé A14 (7,29 g, 11,3 mmol, 1 équivalent) est dissout dans 150 mL d'éthanol absolu. Le thioacétamide (3 équivalents), préalablement dissout dans 140 mL d'éthanol absolu, est ajouté à la solution de composé A14. Le mélange agité 3h à 40°C et la réaction est suivie par LC/MS. Une fois la réaction terminée, l'éthanol est évaporé. L'huile jaune obtenue est extraite avec 100 mL d'acétate d'éthyle et est lavée trois fois avec de l'eau puis une fois avec une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et concentrée pour obtenir 3,99 g de produit brut. Le produit est purifié sur colonne de silice avec un gradient dichlorométhane/acétate d'éthyle (95/5, v/v) sur 2 volumes de colonnes jusqu'à cyclohexane/acétate d'éthyle (75/25, v/v) pendant 10 volumes de colonnes pour obtenir le 3,07 g de produit pur avec un rendement de 44%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 2,32 min, m/z 618,3 $[M+H]^+$
MW^{th} = 617,8 g/mol

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500MHz, 298K): δ = 1,39 (m, 2H) ; 1,55 (m, 2H) ; 1,65 (s, 6H) ; 1,77 (q, J = 7,3 Hz, 2H) ; 2,67 (s, 3H) ; 3,16 (m, 2H) ; 4,21 (t, J = 7,1 Hz, 1H) ; 4,36 (m, 2H) ; 4,52 (m, 2H) ; 4,81 (m, 1H) ; 5,15 (m, 2H) ; 5,27 (m, 1H) ; 5,59 (m, 1H) ; 5,88 (m, 1H) ; 6,16 (dd, J = 11,0 Hz, 17,4 Hz, 1H) ; 7,29 (m, 2H) ; 7,38 (t, J = 7,4 Hz, 2H) ; 7,59 (t, J = 7,4 Hz, 2H) ; 7,75 (d, J = 7,4 Hz, 2H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 500MHz, 298K): δ = 19,4 ; 22,8 ; 26,6 (2C) ; 29,5 ; 35,8 ; 40,8 ; 47,3 ; 50,0 ; 65,4 ; 66,7 ; 113,4 ; 117,5 ; 120,0 (2C) ; 125,2 (2C) ; 127,0 (2C) ; 127,6 (2C) ; 132,9 ; 141,3 (2C) ; 141,9 (2C) ; 143,9 ; 156,0 ; 156,3 ; 160,2 ; 161,6 ; 169,6.

Composé A16 : déprotection de l'ester de diméthylallyle

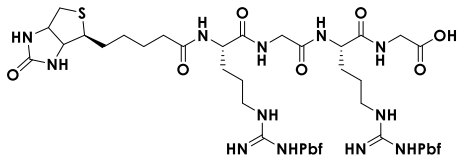


Le composé A16 (3 g, 4,86 mmol, 1 équivalent) est dissout dans 100 mL d'HCl/dioxane (4N). Le mélange est agité 3h à température ambiante et la réaction est suivie par LC/MS. Une fois la réaction terminée, le dioxane est évaporé et le produit est séché sous vide pour être utilisé sans purification supplémentaire.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,88 min, m/z 550,4 $[M+H]^+$
MW^{th} = 549,6 g/mol

2.2.2 Elongation des peptides

Synthèse du composé A17

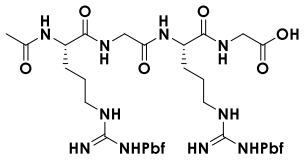


Biotine-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OH

Le composé A17 a été synthétisé sur 760 mg de résine PS-2-chlorochlorotrityl réactivée (1,6 mmol/g) en suivant le protocole 2. 0,5 équivalents de Fmoc-Gly-OH ont été chargés sur la résine pendant 2h pour obtenir une charge après ancrage de 0,28 mmol/g. Après clivage ménagé, 220 mg du composé A17 ont été obtenu, soit un rendement de 88%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,60 min, m/z 1175,8 $[M+H]^+$; m/z 588,6 $[M+2H]^{2+}$
MW^{th} = 1175,5 g/mol

Synthèse du composé A18

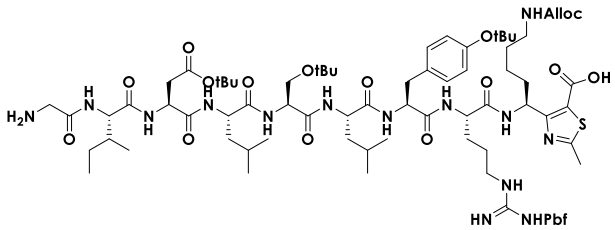


Ac-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OH

Le composé A18 a été synthétisé sur 680 mg de résine PS-2-chlorochlorotrityl réactivée (1,6 mmol/g) en suivant le protocole 2. 0,5 équivalents de Fmoc-Gly-OH ont été chargés sur la résine pendant une nuit pour obtenir une charge après ancrage de 0,34 mmol/g. Après clivage ménagé, 230 mg du composé A18 ont été obtenu, soit un rendement de 90%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,60 min, m/z 991,5 $[M+H]^+$; m/z 496,3 $[M+2H]^{2+}$
MW^{th} = 991,2 g/mol

Synthèse du composé A19

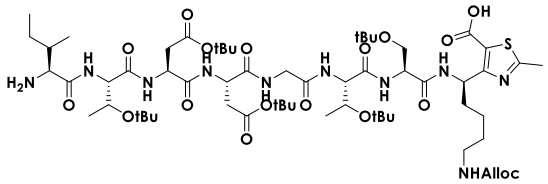


H-Gly-Ile-Asp(tBu)-Leu-Ser(tBu)-Leu-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-ATC(Alloc)-OH

Le composé A19 a été synthétisé sur 550 mg de résine PS-2-chlorochlorotrityl réactivée (1,6 mmol/g) en suivant le protocole 2. 0,45 équivalents de l'ATC A16 ont été chargés sur la résine pendant deux fois 2h pour obtenir une charge après ancrage de 0,36 mmol/g. Après clivage ménagé, 450 mg de composé A19 brut.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,96 min, m/z 834,0 $[M+2H]^{2+}$
MW^{th} = 1666,1 g/mol

Synthèse du composé A20

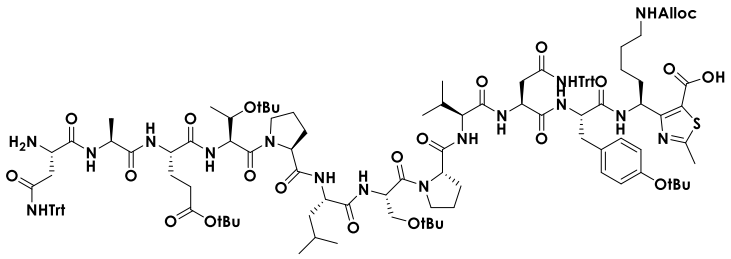


H-Ile-Thr(tBu)-Asp(tBu)-Asp(tBu)-Gly-Thr(tBu)-Ser(tBu)-ATC(Alloc)-OH

Le composé A20 a été synthétisé sur 550 mg de résine PS-2-chlorochlorotrityl réactivée (1,6 mmol/g) en suivant le protocole 2. 0,45 équivalents de l'ATC A16 ont été chargés sur la résine pendant deux fois 2h pour obtenir une charge après ancrage de 0,24 mmol/g. Après clivage ménagé, 168 mg de composé A20 brut.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,76 min, m/z 1298,2 $[M+H]^+$
MW^{th} = 1297,6 g/mol

Synthèse du composé A21



H-Asn(Trt)-Ala-Glu(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Leu-Ser(tBu)-Pro-Val-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-ATC(Alloc)-OH

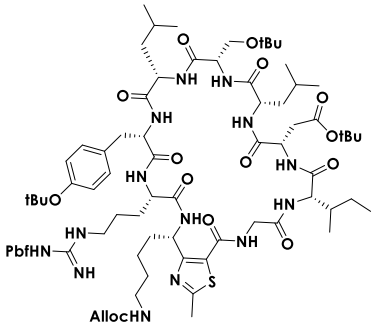
Le composé A21 a été synthétisé sur 550 mg de résine PS-2-chlorochlorotrityl réactivée (1,6 mmol/g) en suivant le protocole 2. 0,45 équivalents de l'ATC A16 ont été chargés sur la résine pendant deux fois 2h pour obtenir une charge après ancrage de 0,24 mmol/g. Après clivage ménagé, 233 mg de composé A21 brut.

LC/MS (ESI+) : t_R = 2,23 min, m/z 1112,5 $[M+H]^+$
MW^{th} = 2222,8 g/mol

2.2.3 Cyclisation

Le peptide (1 équivalent, 133 mmol de composé A19 ou 110 mmol de composé A20 ou 90 mmol de composé A21) a été dissout dans du DMF à une concentration de 1 mg/mL. 6 équivalents de DIEA ont été ajoutés pour basifier le milieu suivi de 2 équivalents de PyBop. La cyclisation a été monitorée par LC/MS et a duré en moyenne 4h. Une fois la réaction terminée, le DMF a été évaporé et les peptides cyclisés ont été utilisés sans traitement ni purification supplémentaire.

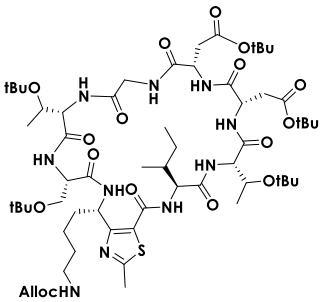
Synthèse du composé A22



LC/MS (ESI+) : t_R = 2,44 min, m/z 825,2 $[M+2H]^{2+}$; m/z 836,0 $[M+H+Na]^{2+}$

MW^{th} = 1648,1 g/mol

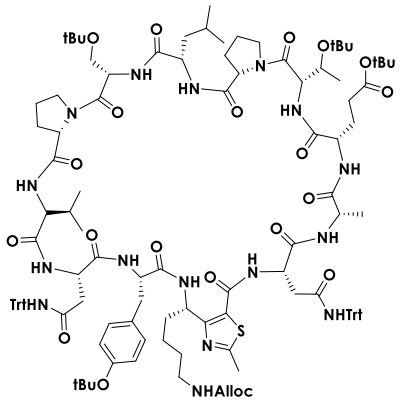
Synthèse du composé A23



LC/MS (ESI+) : t_R = 2,48 min, m/z 1280,2 $[M+H]^{+}$

MW^{th} = 1279,6 g/mol

Synthèse du composé A24



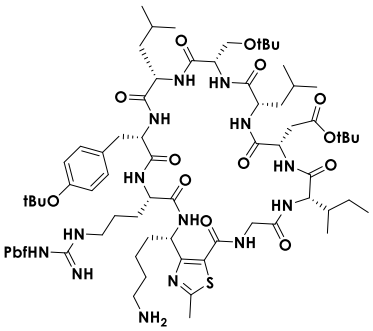
LC/MS (ESI+) : t_R = 2,83 min, m/z 1103,6 $[M+2H]^{2+}$

MW^{th} = 2204,8 g/mol

2.2.5 Déprotection de l'amine N-Alloc

Le peptide cyclique (1 équivalent) a été solubilisé dans du DMF anh (5 mL, composé A22) ou du THF anh (1 mL, composés A23 et A24). Le palladium tétrakis triphénylphosphine (0,05 équivalents a été ajouté, suivi du phénylsilane (1,2 équivalents). Le mélange a été ajouté à température ambiante et la réaction a été suivie par LC/MS. Après 1h d'agitation, la réaction n'évoluant plus, le solvant a été évaporé et le produit a été précipité dans de l'Et_2O à froid. Les solides obtenus ont été resolubilisés dans un mélange eau/ACN 0,1% TFA, lyophilisés et utilisés sans purification supplémentaire pour la suite des synthèses.

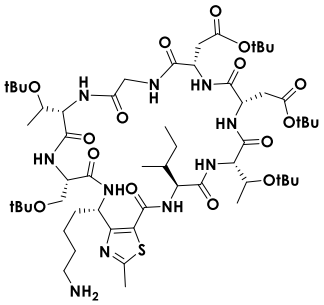
Synthèse du composé A25



LC/MS (ESI+) : t_R = 2,02 min, m/z 1564,7 $[M+H]^+$; m/z 783,1 $[M+2H]^{2+}$

MW^{th} = 1564,0 g/mol

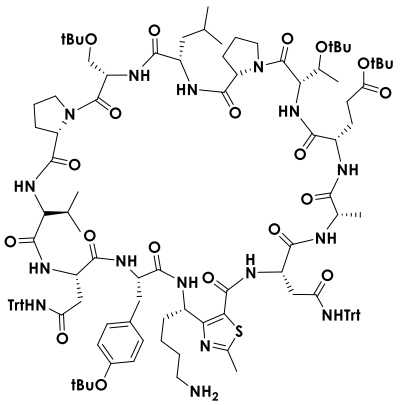
Synthèse du composé A26



LC/MS (ESI+) : t_R = 1,96 min, m/z 1196,6 $[M+H]^+$

MW^{th} = 1195,5 g/mol

Synthèse du composé A27



LC/MS (ESI+) : t_R = 2,42 min, m/z 1061,2 $[M+2H]^{2+}$

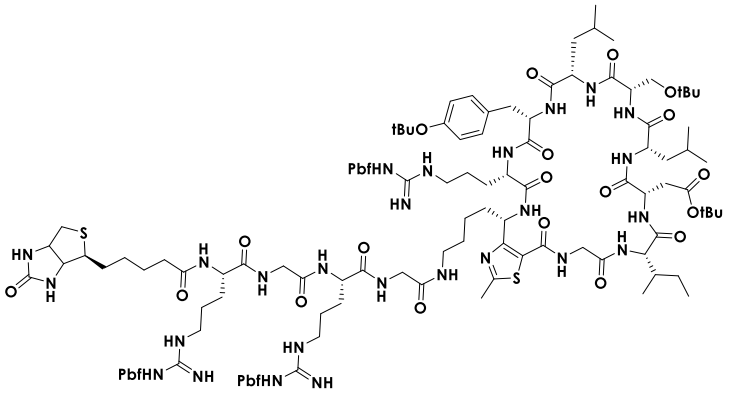
MW^{th} = 2120,7 g/mol

2.2.6 Couplage des bras solubilisants A17 et A18

Le couplage des bras solubilisant a été réalisé comme suit : 1 équivalent de peptide cyclique (A25, A26 ou A27) a été dissout dans 5 mL de DMF. Le mélange a été basifié en ajoutant 2,4 équivalents de DIEA. 1,1 équivalents de bras solubilisant ont ensuite été ajoutés dans le milieu réactionnel, suivi par 1,2 équivalents de PyBop. La réaction, monitorée par LC/MS, était terminée après 4h d'agitation à température ambiante. Après évaporation du DMF, les produits ont été précipités dans de l'Et_2O à froid. Les produits se trouvant à la fois dans les précipités et les filtrats, chaque précipité et filtrat ont été rassemblés puis de nouveau évaporés. Les produits A28 à A33 ont été utilisés sans traitement ni purification supplémentaire pour la suite des synthèses.

Les peptides cycliques A25, A26 et A27 ont été partagés en deux lots chacun pour coupler les composés A17 et A18 et obtenir les composés A28 à A33.

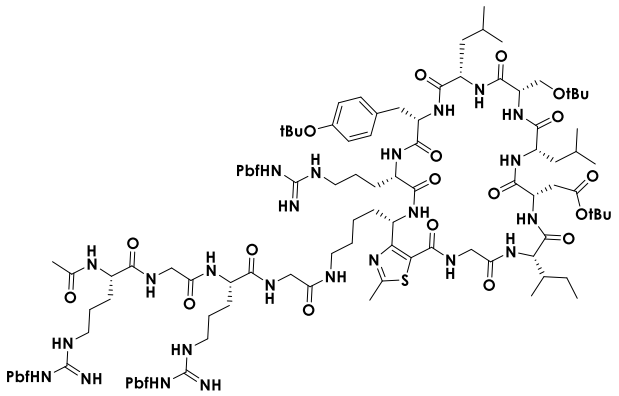
Synthèse du composé A28



LC/MS (ESI+) : t_R = 2,53 min, m/z 1362,0 $[M+2H]^{2+}$; m/z 907,9 $[M+3H]^{3+}$

MW^{th} = 2721,5 g/mol

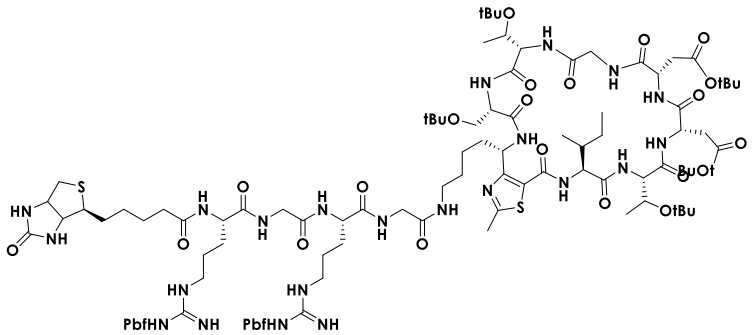
Synthèse du composé A29



LC/MS (ESI+) : t_R = 2,57 min, m/z 1269,6 $[M+2H]^{2+}$; m/z 846,7 $[M+3H]^{3+}$

MW^{th} = 2537,2 g/mol

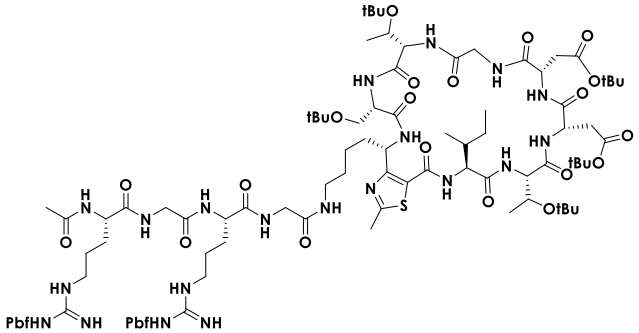
Synthèse du composé A30



LC/MS (ESI+) : t_R = 2,54 min, m/z 1177,5 $[M+2H]^{2+}$

MW^{th} = 2353,0 g/mol

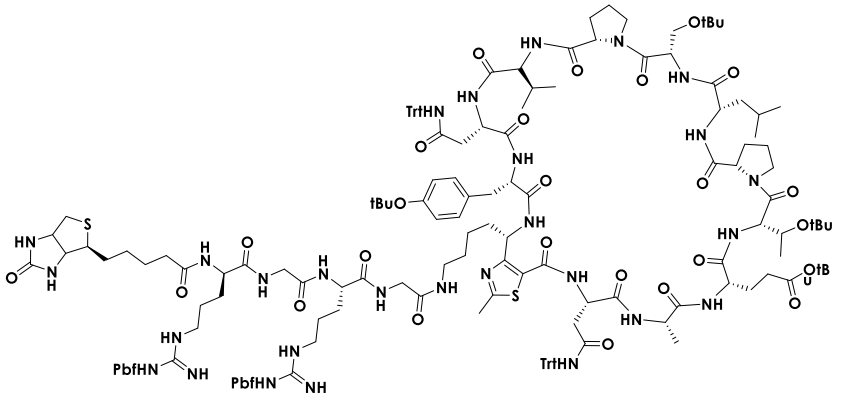
Synthèse du composé A31



LC/MS (ESI+) : t_R = 2,69 min, m/z 1085,3 $[M+2H]^{2+}$

MW^{th} = 2168,7 g/mol

Synthèse du composé A32

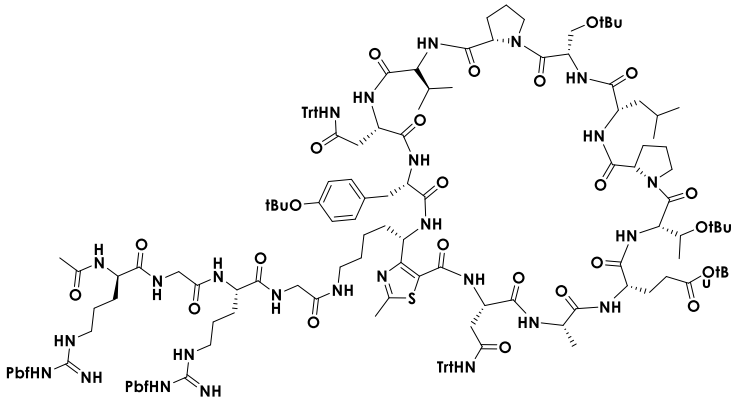


Le composé A32 n'ionise pas en mode positif. Comme la réaction est terminée après 4h d'agitation pour les composés A28 et A30, la réaction est considérée comme terminée après 4h d'agitation pour le composé A32.

LC/MS (ESI+) : t_R = 2,63 min

MW^{th} = 3278,1 g/mol

Synthèse du composé A33



Le composé A33 n'ionise pas en mode positif. Comme la réaction est terminée après 4h d'agitation pour les composés A29 et A31, la réaction est considérée comme terminée après 4h d'agitation pour le composé A33.

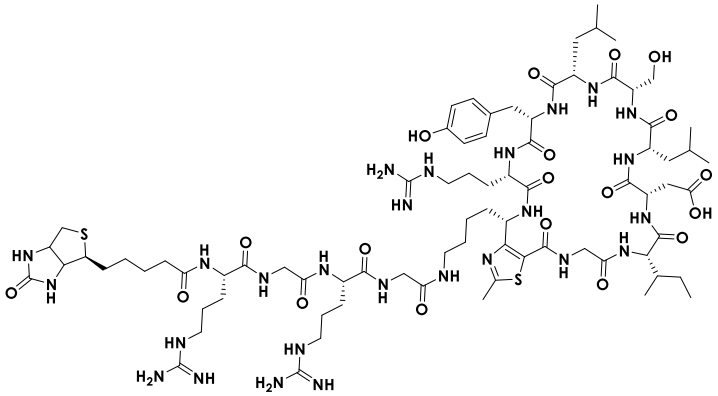
LC/MS (ESI+) : t_R = 2,66 min

MW^{th} = 3093,9 g/mol

2.2.7 Déprotection des chaînes latérales

La déprotection des chaînes latérales des composés A28 à A33 ont été réalisées par agitation à température ambiante dans 15 mL d'une solution de TFA/TIS/eau (95/25/25, v/v/v), suivi de l'évaporation du solvant, précipitation dans de l'Et_2O à froid et lavages à l'Et_2O à froid, solubilisation dans de l'eau puis lyophilisation avant purification sur HPLC préparative.

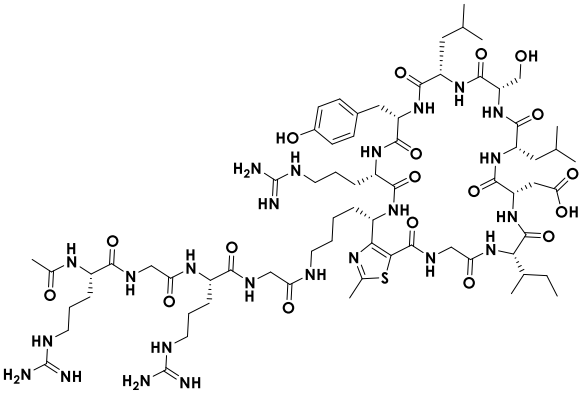
Synthèse du composé A34



Après purification, 3,6 mg de composé A34 ont été obtenus, soit un rendement global de 3,0%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 1,64 min, m/z 898,7 $[M+2H]^{2+}$; m/z 599,1 $[M+3H]^{3+}$
MW^{th} = 1796,2 g/mol

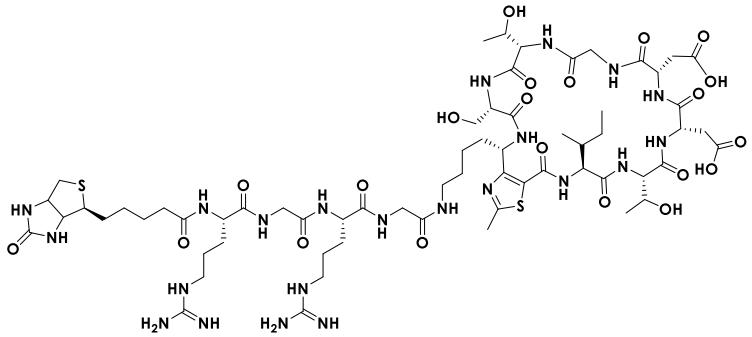
Synthèse du composé A35



Après purification, 4,5 mg de composé A35 ont été obtenus, soit un rendement global de 4,2%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 1,55 min, m/z 806,2 $[M+2H]^{2+}$; m/z 537,5 $[M+3H]^{3+}$
MW^{th} = 1611,9 g/mol

Synthèse du composé A36

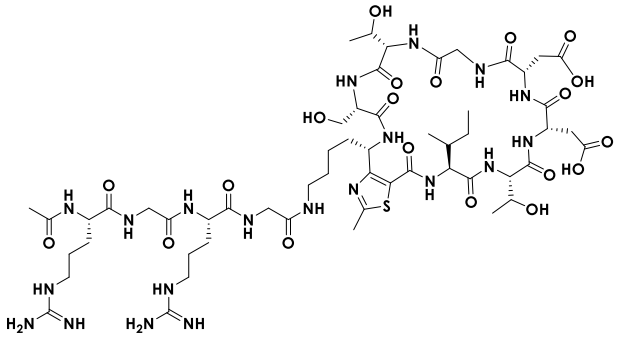


Après purification, 1,6 mg de composé A36 ont été obtenus, soit un rendement global de 1,8%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 1,58 min, m/z 784,3 $[M+2H]^{2+}$; m/z 523,5 $[M+3H]^{3+}$

MW^{th} = 1567,8 g/mol

Synthèse du composé A37

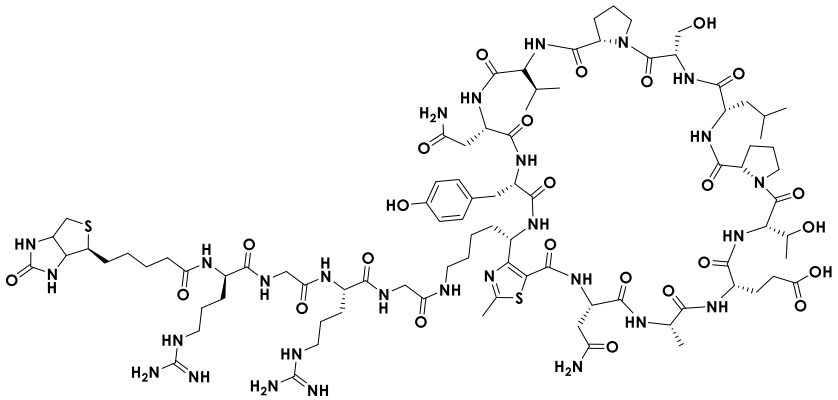


Après purification, 2,1 mg de composé A37 ont été obtenus, soit un rendement global de 2,7%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 1,48 min, m/z 1383,6 $[M+H]^{+}$; m/z 692,3 $[M+2H]^{2+}$; m/z 461,9 $[M+3H]^{3+}$

MW^{th} = 1383,5 g/mol

Synthèse du composé A38

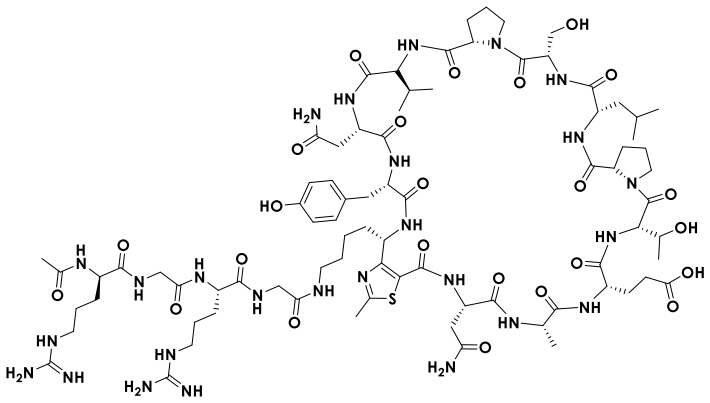


Après purification, 1,5 mg de composé A38 ont été obtenus, soit un rendement global de 1,6%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 1,79 min, m/z 1032,6 $[M+2H]^{2+}$; m/z 688,8 $[M+3H]^{3+}$

MW^{th} = 2064,4 g/mol

Synthèse du composé A39



Après purification, 0,6 mg de composé A39 ont été obtenus, soit un rendement global de 0,7%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,75 min, m/z 940,8 $[M+2H]^{2+}$; m/z 627,3 $[M+3H]^{3+}$
MW^{th} = 1880,1 g/mol

2.2.8 ELISA

La mésothéline recombinante est immobilisée dans les puits à 1 µg/mL pendant une nuit à 4°C. Les sites aspécifiques sont ensuite saturés avec une solution PBS-BSA 1% pendant 1h à température ambiante. Les peptides cycliques A34, A36 et A38 sont incubés pendant 1h à température ambiante à 0 ; 1,5625 ; 3,125 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 et 100 µmol/L. Après incubation des peptides, la streptavidine-HRP est incubée puis les plaques sont révélées avec le 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine et les valeurs d'absorbances sont mesurées à 450 nm.

2.3 Nanoparticules fonctionnalisées

2.3.1 Synthèse NP@SiO_2-fluo

Synthèse de la fluorescéine silylée

3,5 mg de fluorescéine isothiocyanate (1 équivalent, 0,009 mmol) a été dissoute dans 100µM de DMSO. 3,16 µL de DIEA (1,9 équivalents) ont été ajoutés à la solution, suivi de 4,7 µL d'APTES (2,2 équivalents). Le mélange a été agité 3h à température ambiante sous argon. La solution de fluorescéine silylée obtenue a été utilisée dans l'étape suivante sans traitement ni purification.

Synthèse des NP@SiO_2-fluo

Les nanoparticules de silice fluorescente ont été préparées en mélangeant la solution de fluorescéine silylée avec 1 mL de TEOS (4,48 mmol) dans un mélange EtOH/NH_4OH(35%) (95/5, v/v) pendant 19h à 25°C. Les NP@SiO_2-fluo ont été récupérées par centrifugation (15 min à

14000 rpm), lavées deux fois avec 10 mL d'éthanol et cinq fois avec 10 mL d'eau milliQ. Les nanoparticules ont été stockées dans 10 mL d'eau milliQ. Enfin, 500 µL de la suspension de nanoparticules ont été prélevés et lyophilisés pour déterminer la concentration.

Deux lots de NP@SiO_2-fluo ont été obtenus avec une concentration de 17,6 mg/mL pour le lot 1 et de 19,2 mg/mL pour le lot 2.

Une gamme étalon de fluorescéine a été réalisée dans une solution de NaOH à 1,5 mol/L pour déterminer la quantité de fluorescéine encapsulée dans les nanoparticules.

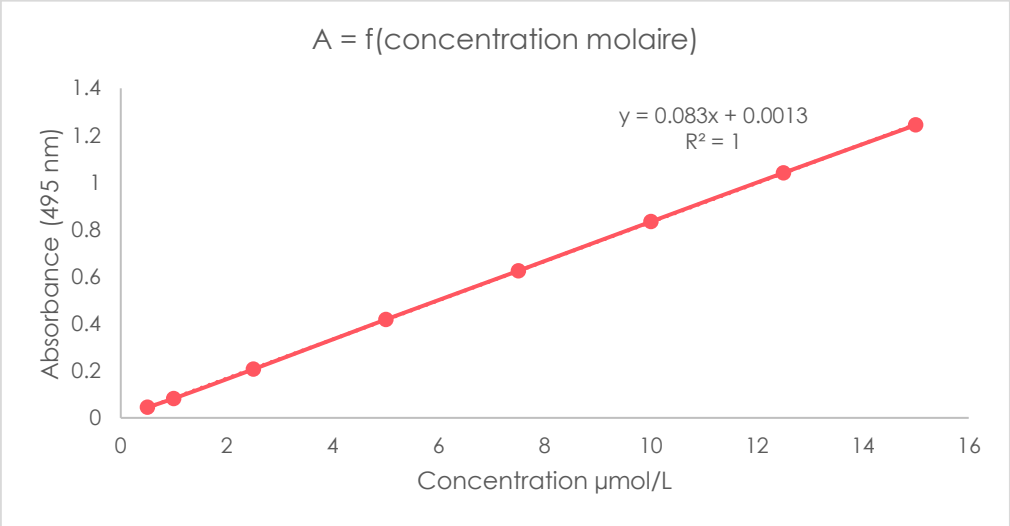


Figure 108 - Courbe de calibration de la fluorescéine dans une solution de NaOH à 1,5 mol/L

Les nanoparticules lyophilisées ont été dissoutes dans la même solution de NaOH à 1,5 mol/L. La solution obtenue a été diluée 10 fois puis l'absorbance a été mesurée à 495 nm. Cette mesure d'absorbance a permis de déterminer la quantité de fluorescéine présente dans les nanoparticules lyophilisées :

$$\mathrm{n(fluo)} = \left(\frac{\mathrm{A} - 0{,}0013}{0{,}083}\right) \times 10^{-6} \times 10$$

Équation 17 - Détermination de la quantité de fluorescéine encapsulée dans les nanoparticules lyophilisées.
n est exprimée en mol. Le facteur 10^{-6} permet de passer des µmol/L à des mol/L. Le facteur 10 est le facteur de dilution

A partir de la masse de nanoparticules lyophilisée, le nombre de nanoparticules peut être déterminé.

$$\mathrm{Nb(NP)} = \frac{\frac{\mathrm{m(NP)}}{\frac{4}{3}\pi \mathrm{r}^3}}{\mathrm{d(silice)}}$$

Équation 18 - Détermination du nombre de nanoparticules à partir de la masse de nanoparticules
m(NP) est exprimée en g, r en cm^3 et d(silice) = 2,2 g/cm^3.

Le nombre de fluorescéines encapsulées par nanoparticules est donc de :

$$\frac{\mathrm{Nb(fluo)}}{\mathrm{NP}} = \frac{\mathrm{n(fluo)} \times \mathrm{N_A}}{\mathrm{Nb(NP)}}$$

Équation 19 - Détermination du nombre de fluorescéines par nanoparticules
n est exprimée en mol et N_A est le nombre d'Avogadro

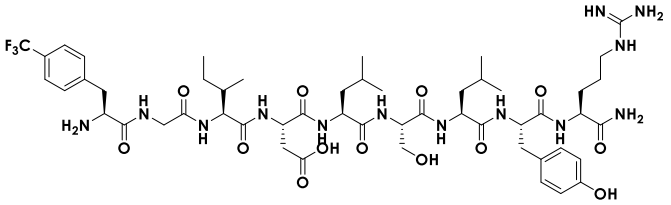
Le lots 1 et 2 présentaient respectivement environ 10000 et 12000 fluorescéines par nanoparticules.

Les NP@SiO_2-fluo 1 et 2 ont été analysées par DLS à une concentration de 0,05 mg/mL et présentaient respectivement un diamètre moyen de 111,4 et 114,0 nm avec un indice de polydispersité de 0,12 et 0,15.

2.3.2 Synthèse des peptides silylés

Synthèse des peptides

Synthèse du composé A40

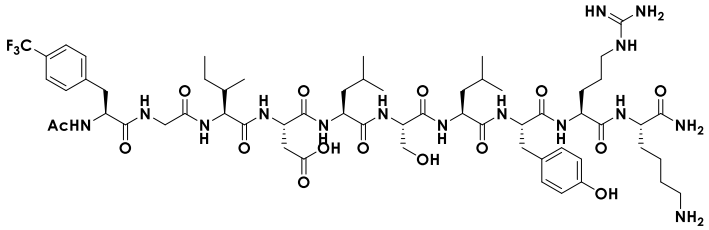


H-Phe(CF_3)-Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg-NH_2

Le composé A40 a été synthétisé sur 200 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Phe(CF_3)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après clivage et lavages à l'Et_2O, 67,3 mg de produit brut ont été obtenus, soit un rendement de 74% avec une pureté de 90%. Le produit brut a été utilisé sans purification pour la suite de la synthèse.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,24 min, m/z 1151,3 $[M+H]^+$; m/z 576,1 $[M+2H]^{2+}$
MW^{th} = 1150,3 g/mol

Synthèse du composé A41

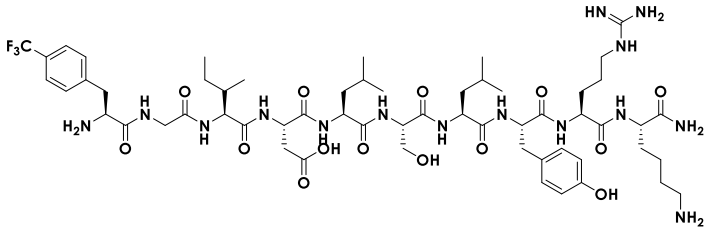


Ac-Phe(CF_3)-Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg-Lys-NH_2

Le composé A41 a été synthétisé sur 200 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1 , la Fmoc-Phe(CF_3)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après clivage et lavages à l'Et_2O, 72,9 mg de produit brut ont été obtenus, soit un rendement de 70% avec une pureté de 72%. Le produit brut a été utilisé sans purification pour la suite de la synthèse.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,29 min, m/z 1321,6 $[M+H]^+$; m/z 661,2 $[M+2H]^{2+}$
MW^{th} = 1320,5 g/mol

Synthèse du composé A42

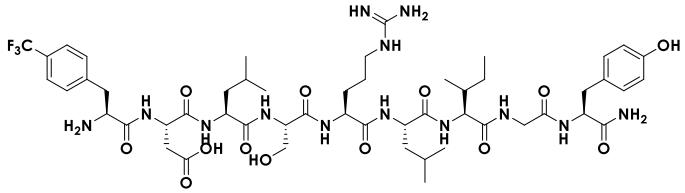


H-Phe(CF_3)-Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg-Lys-NH_2

Le composé A42 a été synthétisé sur 200 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Phe(CF_3)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après clivage et lavages à l'Et_2O, 65,7 mg de produit brut ont été obtenus, soit un rendement de 65% avec une pureté de 83%. Le produit brut a été utilisé sans purification pour la suite de la synthèse.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,16 min, m/z 1279,4 $[M+H]^+$; m/z 640,2 $[M+2H]^{2+}$; m/z 427,3 $[M+2H]^{2+}$
MW^{th} = 1278,4 g/mol

Synthèse du composé A43



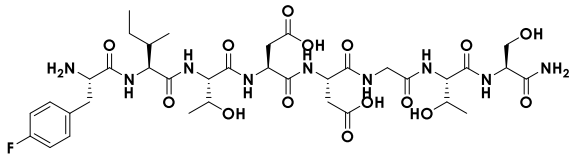
H-Phe(CF_3)-Asp-Leu-Ser-Arg-Leu-Ile-Gly-Tyr-NH_2

Le composé A43 a été synthétisé sur 330 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Phe(CF_3)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après clivage et lavages à l'Et_2O, 102 mg de produit brut ont été obtenus, soit un rendement de 70% avec une pureté de 72%. Le produit brut a été utilisé sans purification pour la suite de la synthèse.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,32 min, m/z 575,6 $[M+2H]^{2+}$

MW^{th} = 1150,3 g/mol

Synthèse du composé A44



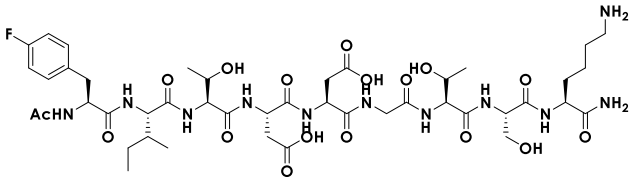
H-Phe(F)-Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser-NH_2

Le composé A44 a été synthétisé sur 200 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Phe(4-F)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après clivage et lavages à l'Et_2O, 65,6 mg de produit brut ont été obtenus, soit un rendement de 96% avec une pureté de 89%. Le produit brut a été utilisé sans purification pour la suite de la synthèse.

LC/MS (ESI+) : t_R = 0,84 min, m/z 873,0 $[M+H]^+$

MW^{th} = 871,9 g/mol

Synthèse du composé A45



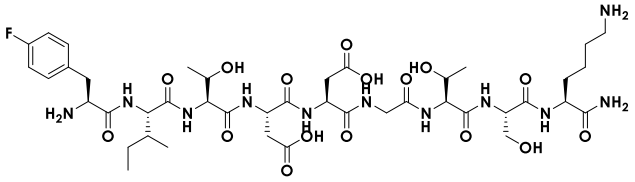
Ac-Phe(F)-Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser-Lys-NH_2

Le composé A45 a été synthétisé sur 200 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Phe(4-F)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après clivage et lavages à l'Et_2O, 66,2 mg de produit brut ont été obtenus, soit un rendement de 81% avec une pureté de 85%. Le produit brut a été utilisé sans purification pour la suite de la synthèse.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,01 min, m/z 1043,3 $[M+H]^+$

MW^{th} = 1042,1 g/mol

Synthèse du composé A46



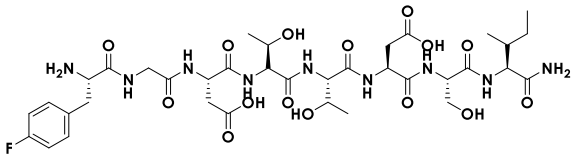
H-Phe(F)-Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser-Lys-NH_2

Le composé A46 a été synthétisé sur 200 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Phe(4-F)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après clivage et lavages à l'Et_2O, 77 mg de produit brut ont été obtenus, soit un rendement de 98% avec une pureté de 87%. Le produit brut a été utilisé sans purification pour la suite de la synthèse.

LC/MS (ESI+) : t_R = 0,80 min, m/z 1001,1 $[M+H]^+$; m/z 501,2 $[M+2H]^{2+}$

MW^{th} = 1000,1 g/mol

Synthèse du composé A47

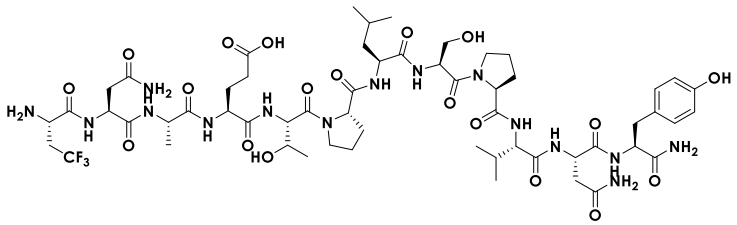


H-Phe(F)-Gly-Asp-Thr-Thr-Asp-Ser-Ile-NH_2

Le composé A47 a été synthétisé sur 320 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Phe(4-F)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après clivage et lavages à l'Et_2O, 63 mg de produit brut ont été obtenus, soit un rendement de 59% avec une pureté de 78%. Le produit brut a été utilisé sans purification pour la suite de la synthèse.

LC/MS (ESI+) : t_R = 0,96 min, m/z 872,4 $[M+H]^+$
MW^{th} = 871,9 g/mol

Synthèse du composé A48

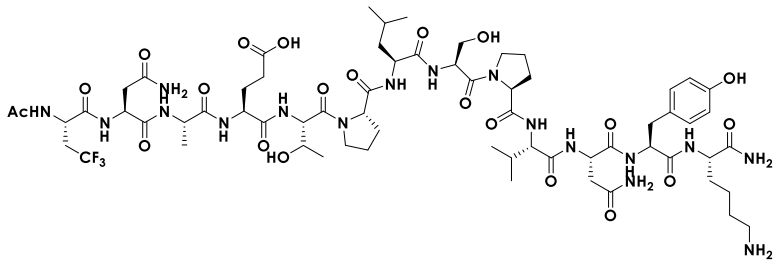


H-Ala(CF_3)-Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr-NH_2

Le composé A48 a été synthétisé sur 200 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Ala(CF_3)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après clivage et lavages à l'Et_2O, 77 mg de produit brut ont été obtenus, soit un rendement de 80% avec une pureté de 88%. Le produit brut a été utilisé sans purification pour la suite de la synthèse.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,01 min, m/z 1343,5 $[M+H]^+$
MW^{th} = 1342,4 g/mol

Synthèse du composé A49

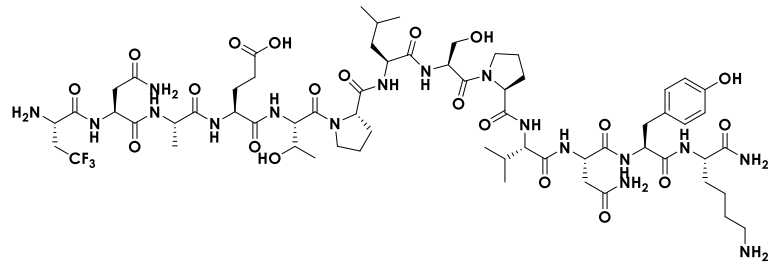


Ac-Ala(CF_3)-Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr-Lys-NH_2

Le composé A49 a été synthétisé sur 200 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Ala(CF_3)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après clivage et lavages à l'Et_2O, 83 mg de produit brut ont été obtenus, soit un rendement de 70% avec une pureté de 85%. Le produit brut a été utilisé sans purification pour la suite de la synthèse.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,07 min, m/z 1513,6 $[M+H]^+$; m/z 757,2 $[M+2H]^{2+}$
MW^{th} = 1512,6 g/mol

Synthèse du composé A50

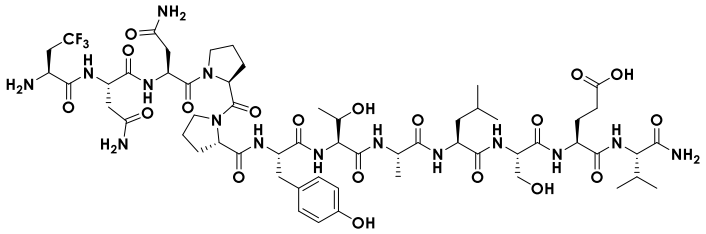


H-Ala(CF_3)-Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr-Lys-NH_2

Le composé A50 a été synthétisé sur 200 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Ala(CF_3)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après clivage et lavages à l'Et_2O, 93 mg de produit brut ont été obtenus, soit un rendement de 81% avec une pureté de 82%. Le produit brut a été utilisé sans purification pour la suite de la synthèse.

LC/MS (ESI+) : t_R = 0,94 min, m/z 1471,6 $[M+H]^+$; m/z 736,2 $[M+2H]^{2+}$
MW^{th} = 1470,6 g/mol

Synthèse du composé A51



H-Ala(CF_3)-Asn-Asn-Pro-Pro-Tyr-Thr-Ala-Leu-Ser-Glu-Val-NH_2

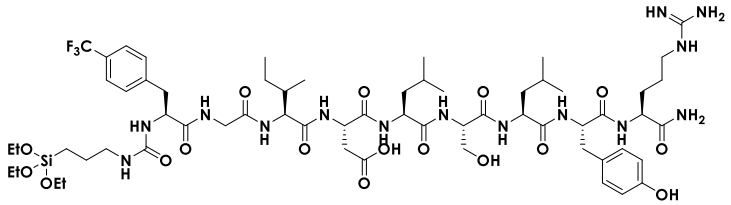
Le composé A51 a été synthétisé sur 320 mg de résine Amphisphère RinkAmide (0,39 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Ala(CF_3)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après clivage et lavages à l'Et_2O, 77 mg de produit brut ont été obtenus, soit un rendement de 46% avec une pureté de 55%. Le produit brut présente un mélange du produit voulu et du produit avec une délétion d'asparagine. Il a été utilisé sans purification pour la suite de la synthèse.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,08 min, m/z 1342,5 $[M+H]^+$; m/z 671,8 $[M+2H]^{2+}$
MW^{th} = 1342,4 g/mol

Silylation des peptides

Le symbole « **Si** » correspond au motif $(EtO_3)Si(CH_2)_3$-NH(CO) apporté par l'ICPTES.

Synthèse du composé A52

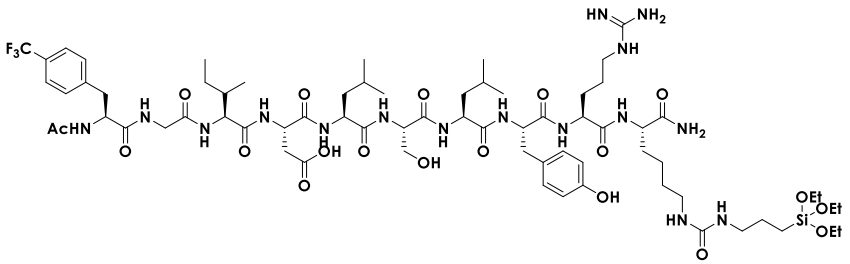


Si-Phe(CF_3)-Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg-NH_2

Le peptide A40 (67 mg, 0,058 mmol, 1 équivalent) a été solubilisé dans du DMF anhydre (3 mL). La DIEA (4 équivalents) et l'ICPTES (1,2 équivalents) ont été ajoutés sous agitation et sous atmosphère inerte (argon). La solution a été agitée à température ambiante pendant 2h30. Le produit a été précipité par addition d'Et_2O, le solide blanc obtenu a été lavé trois fois à l'Et_2O et le produit brut a été analysé par LC/MS. La présence de peptide non silylé a montré que la réaction n'était pas totale, elle a donc été relancée pendant 4h dans les mêmes conditions. Après traitement, 71 mg de peptide silylé A52 ont été obtenus, soit un rendement de 71% et un taux de silylation de 100%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,33 min, m/z 1313,7 $[M_{hydrolysé}+H]^+$
$M_{hydrolysé}$ correspond à la masse du composé hydrolysé sous forme de silanol
MW^{th} = 1397,6 g/mol ; $MW^{th}_{hydrolysé}$ = 1313,5 g/mol

Synthèse du composé A53



Ac-Phe(CF_3)-Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg-Lys(**Si**)-NH_2

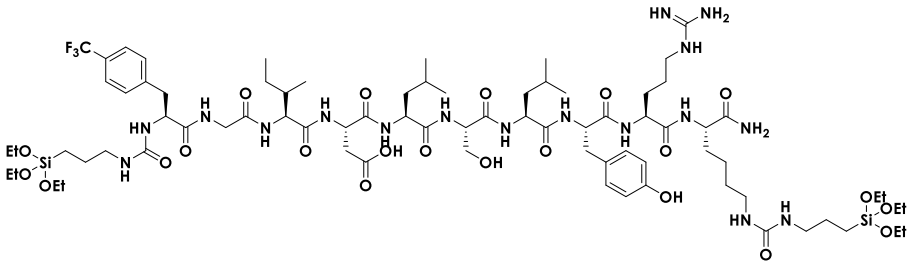
Le peptide A41 (72 mg, 0,055 mmol, 1 équivalent) a été solubilisé dans du DMF anhydre (3 mL). La DIEA (4 équivalents) et l'ICPTES (1,2 équivalents) ont été ajoutés sous agitation et sous atmosphère inerte (argon). La solution a été agitée à température ambiante pendant 2h30. Le produit a été précipité par addition d'Et_2O, le solide blanc obtenu a été lavé trois fois à l'Et_2O et le produit brut a été analysé par LC/MS. La présence de peptide non silylé a montré que la réaction n'était pas totale, elle a donc été relancée pendant 4h dans les mêmes conditions. Après traitement, 75 mg d'un mélange de peptides non silylé A41 et silylé A53 ont été obtenus à un ratio d'environ 1:1, soit un rendement de 88% et un taux de silylation de 50%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,29 min, m/z 660,8 $[M+2H]^{2+}$ (composé A41) ; t_R = 1,37 min, m/z 733,3 $[M_{hydrolysé}+2H]^{2+}$

$M_{hydrolysé}$ correspond à la masse du composé hydrolysé sous forme de silanol

MW^{th} = 1567,9 g/mol ; $MW^{th}_{hydrolysé}$ = 1483,7 g/mol

Synthèse du composé A54



Si-Phe(CF_3)-Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg-Lys(**Si**)-NH_2

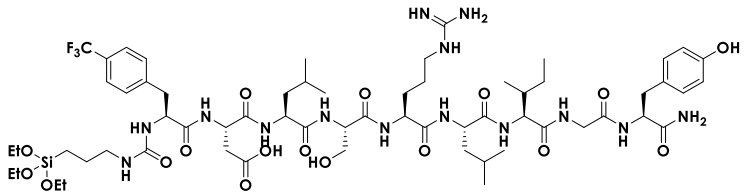
Le peptide A42 (65 mg, 0,051 mmol, 1 équivalent) a été solubilisé dans du DMF anhydre (3 mL). La DIEA (4 équivalents) et l'ICPTES (2,4 équivalents) ont été ajoutés sous agitation et sous atmosphère inerte (argon). La solution a été agitée à température ambiante pendant 2h30. Le produit a été précipité par addition d'Et_2O, le solide blanc obtenu a été lavé trois fois à l'Et_2O et le produit brut a été analysé par LC/MS. La présence de peptide non silylé a montré que la réaction n'était pas totale, elle a donc été relancée pendant 4h dans les mêmes conditions. Après traitement, 56 mg d'un mélange de peptides non silylé A42 et silylé A54 ont été obtenus à un ratio d'environ 1:1, soit un rendement de 62% et un taux de silylation de 50%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,18 min, m/z 639,8 $[M+2H]^{2+}$ (composé A42) ; t_R = 1,26 min, m/z 721,3 $[M_{hydrolysé}+2H]^{2+}$ (composé mono-silylé) ; t_R = 1,32 min, m/z 793,3 $[M_{hydrolysé}+H\text{-}OH]^{2+}$ (composé A54)

$M_{hydrolysé}$ correspond à la masse du composé hydrolysé sous forme de silanol

MW^{th} = 1773,2 g/mol ; $MW^{th}_{hydrolysé}$ = 1604,9 g/mol

Synthèse du composé A55



Si-Phe(CF_3)-Asp-Leu-Ser-Arg-Leu-Ile-Gly-Tyr-NH_2

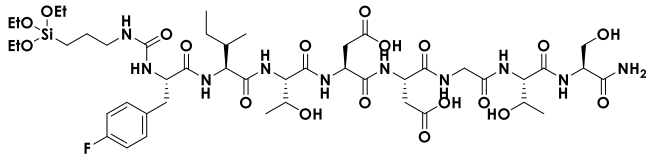
Le peptide A43 (102 mg, 0,088 mmol, 1 équivalent) a été solubilisé dans du DMF anhydre (3 mL). La DIEA (4 équivalents) et l'ICPTES (1,2 équivalents) ont été ajoutés sous agitation et sous atmosphère inerte (argon). La solution a été agitée à température ambiante pendant 4h. Le produit a été précipité par addition d'Et_2O, le solide blanc obtenu a été lavé trois fois à l'Et_2O et le produit brut a été analysé par LC/MS. La présence de peptide non silylé a montré que la réaction n'était pas totale, elle a donc été relancée pendant 4h dans les mêmes conditions. Après traitement, 83 mg de peptide silylé A55 ont été obtenus, soit un rendement de 83% et un taux de silylation de 100%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,40 min, m/z 1313,7 $[M_{hydrolysé}+H]^+$

$M_{hydrolysé}$ correspond à la masse du composé hydrolysé sous forme de silanol

MW^{th} = 1397,6 g/mol ; $MW^{th}_{hydrolysé}$ = 1313,5 g/mol

Synthèse du composé A56



Si-Phe(F)-Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser-NH_2

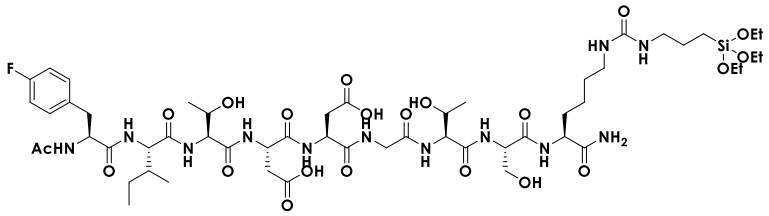
Le peptide A44 (65 mg, 0,075 mmol, 1 équivalent) a été solubilisé dans du DMF anhydre (2 mL). La DIEA (4 équivalents) et l'ICPTES (1,2 équivalents) ont été ajoutés sous agitation et sous atmosphère inerte (argon). La solution a été agitée à température ambiante pendant 2h30. Le produit a été précipité par addition d'Et_2O, le solide blanc obtenu a été lavé trois fois à l'Et_2O et le produit brut a été analysé par LC/MS. Après traitement, 93 mg de peptide silylé A56 ont été obtenus, soit un rendement de 99% et un taux de silylation de 100%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,75 min, m/z 1017,4 $[M_{hydrolysé}\text{-}OH]^+$

$M_{hydrolysé}$ correspond à la masse du composé hydrolysé sous forme de silanol

MW^{th} = 1119,2 g/mol ; $MW^{th}_{hydrolysé}$ = 1035,1 g/mol

Synthèse du composé A57



Ac-Phe(F)-Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser-Lys(**Si**)-NH_2

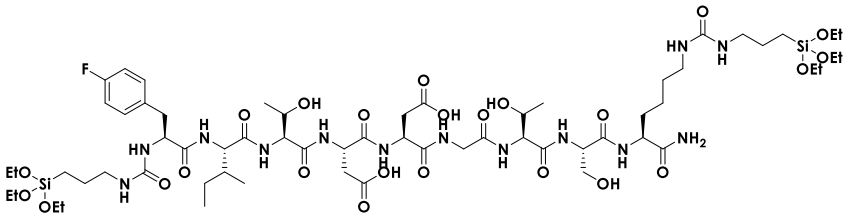
Le peptide A45 (66 mg, 0,063 mmol, 1 équivalent) a été solubilisé dans du DMF anhydre (2 mL). La DIEA (4 équivalents) et l'ICPTES (1,2 équivalents) ont été ajoutés sous agitation et sous atmosphère inerte (argon). La solution a été agitée à température ambiante pendant 2h30. Le produit a été précipité par addition d'Et_2O, le solide blanc obtenu a été lavé trois fois à l'Et_2O et le produit brut a été analysé par LC/MS. Après traitement, 95 mg de peptide silylé A57 ont été obtenus, soit un rendement de 99% et un taux de silylation de 100%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,82 min, m/z 1187,5 $[M_{hydrolysé}\text{-}OH]^+$; m/z 594,3 $[M_{hydrolysé}+H\text{-}OH]^{2+}$

$M_{hydrolysé}$ correspond à la masse du composé hydrolysé sous forme de silanol

MW^{th} = 1289,5 g/mol ; $MW^{th}_{hydrolysé}$ = 1205,3 g/mol

Synthèse du composé A58



Si-Phe(F)-Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser-Lys(**Si**)-NH_2

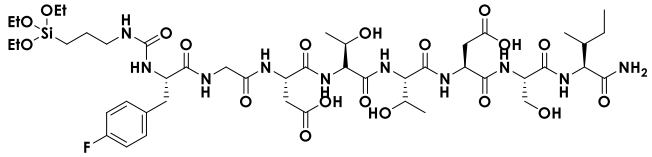
Le peptide A46 (77 mg, 0,077 mmol, 1 équivalent) a été solubilisé dans du DMF anhydre (2 mL). La DIEA (4 équivalents) et l'ICPTES (2,4 équivalents) ont été ajoutés sous agitation et sous atmosphère inerte (argon). La solution a été agitée à température ambiante pendant 2h30. Le produit a été précipité par addition d'Et_2O, le solide blanc obtenu a été lavé trois fois à l'Et_2O et le produit brut a été analysé par LC/MS. Après traitement, 75 mg de peptide silylé A58 ont été obtenus, soit un rendement de 66% et un taux de silylation de 100%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,72 et 1,87 min, m/z 1290,6 $[M_{hydrolysé}\text{-OH-}H_2O]^+$; m/z 645,9 $[M_{hydrolysé}\text{+H-OH-}H_2O]^{2+}$ (la perte d'H_2O est due à la condensation)

$M_{hydrolysé}$ correspond à la masse du composé hydrolysé sous forme de silanol

MW^{th} = 1494,8 g/mol ; $MW^{th}_{hydrolysé}$ = 1326,5 g/mol

Synthèse du composé A59



Si-Phe(F)-Gly-Asp-Thr-Thr-Asp-Ser-Ile-NH_2

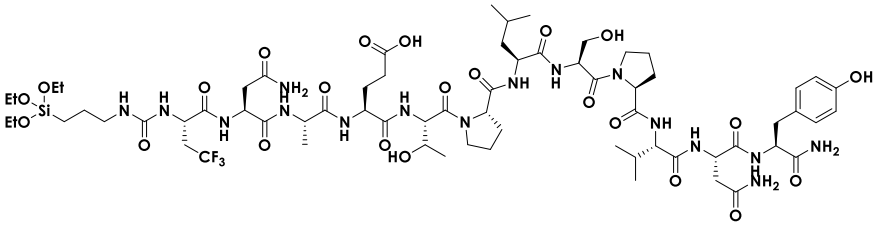
Le peptide A47 (63 mg, 0,072 mmol, 1 équivalent) a été solubilisé dans du DMF anhydre (2 mL). La DIEA (4 équivalents) et l'ICPTES (1,2 équivalents) ont été ajoutés sous agitation et sous atmosphère inerte (argon). La solution a été agitée à température ambiante pendant 2h30. Le produit a été précipité par addition d'Et_2O, le solide blanc obtenu a été lavé trois fois à l'Et_2O et le produit brut a été analysé par LC/MS. Après traitement, 66 mg de peptide silylé A59 ont été obtenus, soit un rendement de 82% et un taux de silylation de 100%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,74 min, m/z 1017,4 $[M_{hydrolysé}\text{-OH}]^+$

$M_{hydrolysé}$ correspond à la masse du composé hydrolysé sous forme de silanol

MW^{th} = 1119,3 g/mol ; $MW^{th}_{hydrolysé}$ = 1035,1 g/mol

Synthèse du composé A60



Si-Ala(CF_3)-Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr-NH_2

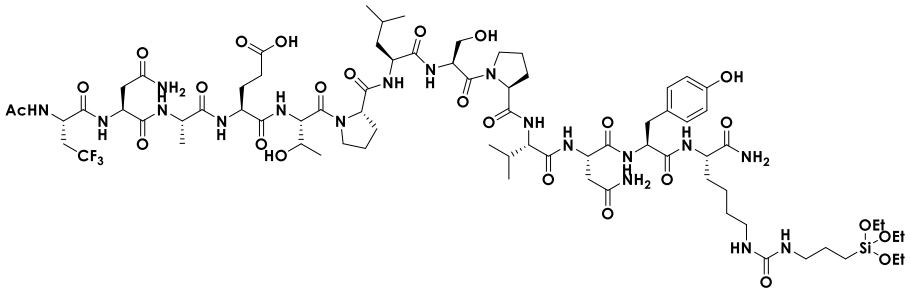
Le peptide A48 (77 mg, 0,057 mmol, 1 équivalent) a été solubilisé dans du DMF anhydre (2 mL). La DIEA (4 équivalents) et l'ICPTES (1,2 équivalents) ont été ajoutés sous agitation et sous atmosphère inerte (argon). La solution a été agitée à température ambiante pendant 2h30. Le produit a été précipité par addition d'Et_2O, le solide blanc obtenu a été lavé trois fois à l'Et_2O et le produit brut a été analysé par LC/MS. Après traitement, 110 mg de peptide silylé A60 ont été obtenus, soit un rendement de 99% et un taux de silylation de 100%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,90 min, m/z 1488,7 $[M_{hydrolysé}\text{-}OH]^+$

$M_{hydrolysé}$ correspond à la masse du composé hydrolysé sous forme de silanol

MW^{th} = 1589,8 g/mol ; $MW^{th}_{hydrolysé}$ = 1505,6 g/mol

Synthèse du composé A61



Ac-Ala(CF_3)-Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr-Lys(**Si**)-NH_2

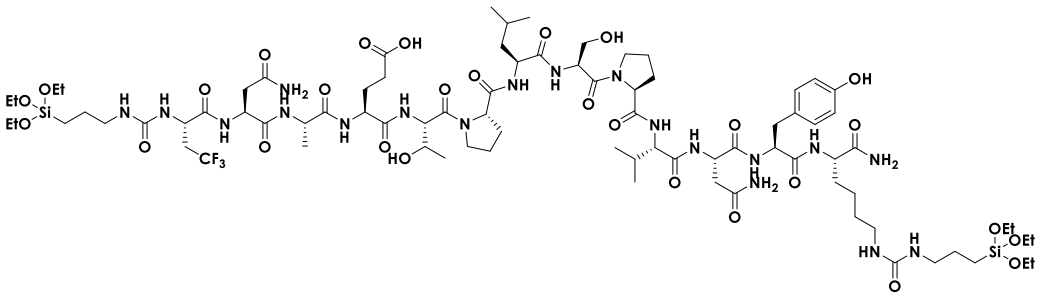
Le peptide A49 (83 mg, 0,055 mmol, 1 équivalent) a été solubilisé dans du DMF anhydre (2 mL). La DIEA (4 équivalents) et l'ICPTES (1,2 équivalents) ont été ajoutés sous agitation et sous atmosphère inerte (argon). La solution a été agitée à température ambiante pendant 2h30. Le produit a été précipité par addition d'Et_2O, le solide blanc obtenu a été lavé trois fois à l'Et_2O et le produit brut a été analysé par LC/MS. Après traitement, 112 mg de peptide silylé A61 ont été obtenus, soit un rendement de 98% et un taux de silylation de 100%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,93 min, m/z 829,8 $[M_{hydrolysé}+H\text{-}OH]^{2+}$

$M_{hydrolysé}$ correspond à la masse du composé hydrolysé sous forme de silanol

MW^{th} = 1760,0 g/mol ; $MW^{th}_{hydrolysé}$ = 1675,8 g/mol

Synthèse du composé A62



Si-Ala(CF_3)-Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr-Lys(**Si**)-NH_2

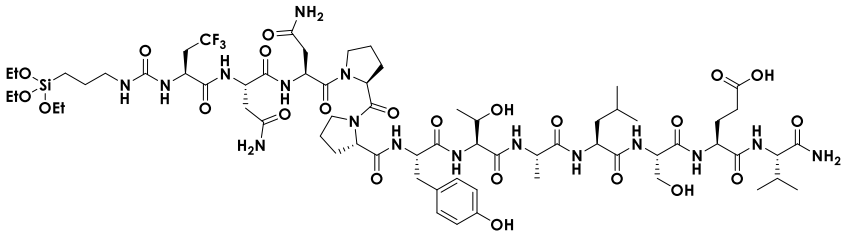
Le peptide A50 (93 mg, 0,063 mmol, 1 équivalent) a été solubilisé dans du DMF anhydre (2 mL). La DIEA (4 équivalents) et l'ICPTES (2,4 équivalents) ont été ajoutés sous agitation et sous atmosphère inerte (argon). La solution a été agitée à température ambiante pendant 2h30. Le produit a été précipité par addition d'Et_2O, le solide blanc obtenu a été lavé trois fois à l'Et_2O et le produit brut a été analysé par LC/MS. Après traitement, 100 mg de peptide silylé A62 ont été obtenus, soit un rendement de 81% et un taux de silylation de 100%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,84 et 2,03 min, m/z 881,4 $[M_{hydrolysé}+H\text{-}OH\text{-}H_2O]^{2+}$ (la perte d'H_2O est due à la condensation)

$M_{hydrolysé}$ correspond à la masse du composé hydrolysé sous forme de silanol

MW^{th} = 1965,3 g/mol ; $MW^{th}{}_{hydrolysé}$ = 1797,0 g/mol

Synthèse du composé A63



Si-Ala(CF_3)-Asn-Asn-Pro-Pro-Tyr-Thr-Ala-Leu-Ser-Glu-Val-NH_2

Le peptide A51 (77 mg, 0,057 mmol, 1 équivalent) a été solubilisé dans du DMF anhydre (2 mL). La DIEA (4 équivalents) et l'ICPTES (1,2 équivalents) ont été ajoutés sous agitation et sous atmosphère inerte (argon). La solution a été agitée à température ambiante pendant 2h30. Le produit a été précipité par addition d'Et_2O, le solide blanc obtenu a été lavé trois fois à l'Et_2O et le produit brut a été analysé par LC/MS. Après traitement, 80 mg de peptide silylé A62 ont été obtenus, soit un rendement de 88% et un taux de silylation de 100%.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,97 min, m/z 1488,0 $[M_{hydrolysé}\text{-}OH]^+$; 744,4 $[M_{hydrolysé}+H\text{-}OH]^{2+}$

$M_{hydrolysé}$ correspond à la masse du composé hydrolysé sous forme de silanol

MW^{th} = 1589,8 g/mol ; $MW^{th}{}_{hydrolysé}$ = 1505,6 g/mol

2.4 Greffage des peptides silylés

Un volume de suspension stock de NP@SiO_2-fluo est prélevé pour avoir 25 mg de nanoparticules (1,43 mL pour le lot 1 et 1,30 mL pour le lot 2). Les nanoparticules ont d'abord été centrifugées (15 min à 14000 rpm) pour éliminer l'eau dans laquelle elles étaient stockées. Les peptides silylés ont été solubilisés dans 700 µL de DMF/AcOH (99/1, v/v) à une concentration de 20 mmol/L et les nanoparticules ont été suspendues (2 min d'agitation par vortex et 5 min de sonication) dans cette solution de peptides silylés. Les nanoparticules ont été agitées dans cette solution pendant 18h à 65°C pour réaliser le greffage.

Une fois le greffage terminé, les nanoparticules ont été centrifugées (15 min à 14000 rpm) pour enlever le milieu réactionnel. Elles ont ensuite été lavées plusieurs fois pour retirer les peptides n'ayant pas réagi (trois fois avec 1,5 mL de DMF et trois fois avec 1,5 mL d'eau, centrifugation 15 min à 14000 rpm, 2 min de vortex et 5 min de sonication entre chaque centrifugation). Les nanoparticules étaient fortement agrégées dans l'eau. Elles ont donc été resuspendues dans 1,5 mL de DMSO (5 min de vortex et 15 min de sonication) et lavées deux fois avec 1,5 mL de DMSO (centrifugation 15 min à 14000 rpm, 2 min de vortex et 5 min de sonication entre chaque centrifugation) et conservées dans 1,5 mL de DMSO. Un aliquote de 200 µL de chaque suspension a été prélevé pour estimer sa concentration. Les nanoparticules ont été lavées deux fois à l'eau (500 µL, 2 min de vortex, 5 min de sonication, centrifugation 10 min à 14000 rpm) pour éliminer le DMSO. Ces nanoparticules ont été resuspendues dans 200 µL d'eau avant d'être lyophilisées et pesées pour obtenir la concentration de chaque suspension comprise entre 4,30 et 17,09 mg/mL.

Des échantillons de chaque lot de nanoparticules ont été préparés dans un mélange eau/DMSO (95/5, v/v) à 0,05 mg/mL pour être analysées par DLS et ainsi obtenir leur rayon hydrodynamique, ainsi que l'indice de polydispersité.

Enfin, les nanoparticules lyophilisées (entre 3 et 5 mg) ayant servi à déterminer la concentration ont été dissoutes dans 1 mL de NaOD à 1,5 mol/L pour quantifier le nombre de peptides greffés en RMN ^{19}F. Après dissolution, du TFA a été ajouté comme étalon interne pour obtenir une concentration de 0,05 mmol/L dans le tube RMN (δ = -75,5 ppm). La concentration de TFA étant connue, la concentration en acide aminé fluoré, et donc de peptides, a pu être déterminée à partir des intégrations des signaux du TFA et de l'acide aminé fluoré. La masse de nanoparticules dissoutes dans le tube RMN étant connue, ainsi que son diamètre et donc sa surface, il a été possible d'estimer le nombre de peptides/nm² greffés à la surface des nanoparticules.

2.5 ELISA

La mésothéline recombinante est immobilisée dans les puits à 0,1 µg/mL pendant une nuit à 4°C. Les puits sont lavés trois fois avec du PBS pour éliminer la mésothéline non liée. Une solution de PBS-BSA 1% est incubée pendant 1h à température ambiante pour saturer les sites aspécifiques puis les puits sont lavés trois fois avec du PBS pour éliminer la BSA non liée. Les nanoparticules sont incubées à 0,1 mg/mL (PBS/DMSO, 99/1, v/v) et 1 mg/mL (PBS/DMSO, 90/10, v/v). Après trois lavages au PBS pour éliminer les particules non liées, les plaques sont révélées par lecture de la fluorescence entre 485 et 520 nm.

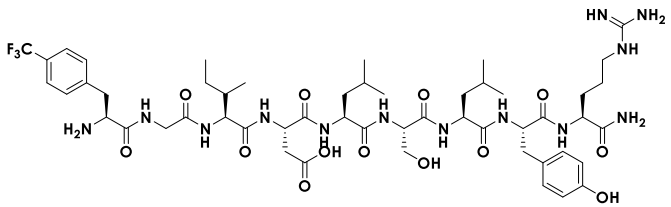
2.6 Synthèse des NP@SiO2

Les nanoparticules de silice non fluorescente ont été préparées en ajoutant 15 mL de TEOS dans 385 mL d'un mélange NH_4OH(30%)/EtOH absolu (90/10, v/v) pendant 22h à 30°C. La suspension de nanoparticules a été répartie dans 6 tubes de centrifugation et a été centrifugée 5 min à 20000 rpm pour retirer le milieu réactionnel. Les 6 lots ont été lavés deux fois à l'éthanol, trois fois à l'eau milliQ, une fois au PBS, puis sept fois à l'eau milliQ pour obtenir un pH neutre (chaque lavage avec 30 mL de solvant, 2 min de vortex et 5 min de sonication entre chaque centrifugation, centrifugation 10 min à 20000 rpm). Les 6 lots ont été rassemblés pour être stockés dans 90 mL d'eau milliQ. Un aliquote de 5 mL a été prélevé et lyophilisé pour déterminer la concentration de la suspension stock à 39,4 mg/mL. Les mesures de DLS à 0,05 mg/mL dans de l'eau milliQ a montré un diamètre moyen de 227 nm avec un indice de polydispersité de 0,036, et un potentiel zêta de -49,8 dans l'eau milliQ à pH 7.

2.7 Synthèse des PEG-ligands silylés (1)

2.7.1 Synthèse des peptides

Synthèse du composé A64



H-Phe(CF_3)-Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg-NH_2

Le composé A64 a été synthétisé sur 1 g de résine ChemMatrix RinkAmide (0,47 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Phe(CF_3)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après clivage et lavages à l'Et_2O,

300 mg de produit brut ont été obtenus, soit un rendement de 55% avec une pureté de 81%. Le produit brut a été utilisé sans purification pour la suite de la synthèse.

LC/MS (ESI+) : t_R = 2,13 min, m/z 1151,0 $[M+H]^+$; m/z 576,1 $[M+2H]^{2+}$

MW^{th} = 1150,3 g/mol

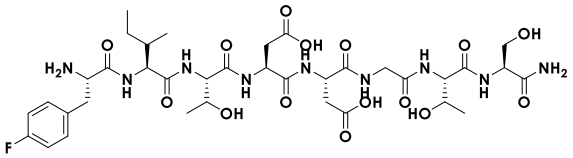
Tableau 29 - Attributions des déplacements chimiques des protons du composé A64

	Hα	Hβ1	Hβ2	Hγ1	Hγ2	Hδ1	Hδ2	Hε
Phe(CF_3)	4,35	3,34	-	-	-	7,52	-	7,76
Gly	3,99	-	-	-	-	-	-	-
Ile	4,20	1,86	-	0,92	1,19	0,89	-	-
Asp	4,78	3,04	2,88	-	-	-	-	-
Leu	4,32	1,51	1,43	1,67	-	0,84	0,89	-
Ser	4,39	3,89	-	-	-	-	-	-
Leu	4,32	1,69	1,66	1,51	-	0,92	0,96	-
Tyr	4,55	3,11	2,97	-	-	7,17	-	6,86
Arg	4,28	1,86	1,71	1,61	-	3,21	-	-

Tableau 30 - Attributions des déplacements chimiques des carbones du composé A64

	CO	CHα	CHβ	CHγ1	CHγ2	CHδ1	CHδ2	CHε	CHζ	CF_3
Phe(CF_3)	170	55,1	37,7	131,1	-	131,1	-	127	139,3	124,6
Gly	171,5	43,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	173,9	59,3	37,6	15,9	25,5	11,6	-	-	-	-
Asp	173,6	50,7	35,9	175,2	-	-	-	-	-	-
Leu	176,7	54,1	40,7	25,4	-	21,9	21,7	-	-	-
Ser	173,1	57,3	61,6	-	-	-	-	-	-	-
Leu	176,7	54,1	40,6	25,2	-	23,3	23,6	-	-	-
Tyr	173,9	56	37	129	-	131,7	-	116,5	156	-
Arg	176,9	53,8	29,3	25,6	-	41,6	-	-	-	-

Synthèse du composé A65



H-Phe(F)-Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser-NH_2

Le composé A65 a été synthétisé sur 1 g de résine ChemMatrix RinkAmide (0,47 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Phe(4-F)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après clivage et lavages à l'Et_2O, 284 mg de produit brut ont été obtenus, soit un rendement de 69% avec une pureté de 95%. Le produit brut a été utilisé sans purification pour la suite de la synthèse.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,35 min, m/z 872,7 $[M+H]^+$; m/z 436,9 $[M+2H]^{2+}$

MW^{th} = 871,9 g/mol

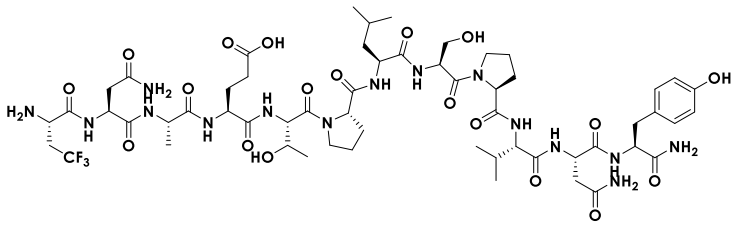
Tableau 31 - Attributions des déplacements chimiques des protons du composé A65

	Hα	Hβ1	Hβ2	Hγ1	Hγ2	Hδ1	Hδ2	Hε	Hζ
Phe(4-F)	4,33	3,22	-	-	-	7,28	-	7,15	-
Ile	4,31	1,84	-	0,92	1,20-1,51	0,89	-	-	-
Thr	4,31	4,34	-	1,26	-	-	-	-	-
Asp	4,81	3,03	2,96	-	-	-	-	-	-
Asp	4,81	3,0	2,96	-	-	-	-	-	-
Gly	4,06	-	-	-	-	-	-	-	-
Thr	4,37	4,23	-	1,26	-	-	-	-	-
Ser	4,5	3,93	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 32 - Attributions des déplacements chimiques des carbones du composé A65

	CO	CHα	CHβ1	CHβ2	CHγ1	CHγ2	CHδ1	CHδ2	CHε	CHζ
Phe(4-F)	169	54,4	36,4	-	162,6	-	131,6	-	115,4	130,9
Ile	173,1	58,5	36,8	-	14,9	24,9	10,4	-	-	-
Thr	172,1	59	67	-	18,7	-	-	-	-	-
Asp	172,9	50,5	35,6	35,6	-	-	-	-	-	-
Asp	172,9	50,5	35,6	35,6	-	-	-	-	-	-
Gly	172,3	42,8	-	-	-	-	-	-	-	-
Thr	171,6	59	67	-	18,7	-	-	-	-	-
Ser	174,2	55,5	61,1	-	-	-	-	-	-	-

Synthèse du composé A66



H-Ala(CF_3)-Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr-NH_2

Le composé A66 a été synthétisé sur 1 g de résine ChemMatrix RinkAmide (0,47 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Ala(CF_3)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après clivage et lavages à l'Et_2O, 388 mg de produit brut ont été obtenus, soit un rendement de 61% avec une pureté de 90%. Le produit brut a été utilisé sans purification pour la suite de la synthèse.

LC/MS (ESI+) : t_R = 1,72 min, m/z 1342,9 $[M+H]^+$; m/z 672,1 $[M+2H]^{2+}$

MW^{th} = 1342,4 g/mol

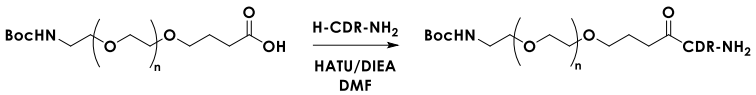
Tableau 33 - Attributions des déplacements chimiques des protons du composé A66

	Hα	Hβ1	Hβ2	Hγ	Hδ1	Hδ2	Hε
Ala(CF_3)	4,43	2,96	3,03	-	-	-	-
Asn	4,82	2,93	2,81	-	-	-	-
Ala	4,35	1,43	-	-	-	-	-
Glu	4,45	2,16	2,02	2,51	-	-	-
Thr	4,63	4,19	-	1,28	-	-	-
Pro	4,47	1,95	2,32	2,04	3,88	3,75	-
Leu	4,37	1,68	1,61	1,7	0,91	0,97	-
Ser	4,8	3,89	3,85	-	-	-	-
Pro	4,47	1,95	2,32	2,04	3,84	3,75	-
Val	4,01	1,96	0,91	0,79	-	-	-
Asn	4,72	2,82	2,72	-	-	-	-
Tyr	4,54	3,16	2,93	-	7,19	-	6,87

Tableau 34 - Attributions des déplacements chimiques des carbones du composé A66

	CO	CHα	CHβ1	CHβ2	CHγ	CHδ1	CHδ2	CHε	CHζ	CF_3
Ala(CF_3)	167,3	47,7	34,5	-	-	-	-	-	-	125
Asn	171,5	50,6	36,1	-	174,2	-	-	-	-	-
Ala	175	45,9	16,5	-	-	-	-	-	-	-
Glu	173,2	52,9	26	-	30	177,1	-	-	-	-
Thr	170,3	57,1	67	-	18,7	-	-	-	-	-
Pro	174,2	60,6	29,4	-	24,5	48,4	-	-	-	-
Leu	174,6	52,5	36,9	-	24,5	20,7	22,3	-	-	-
Ser	170,3	53,5	60,6	-	-	-	-	-	-	-
Pro	174,2	60,6	29,4	-	24,5	48,4	-	-	-	-
Val	172,9	59,6	30	-	18,4	-	-	-	-	-
Asn	172	50	36,1	-	174,2	-	-	-	-	-
Tyr	175,8	55,1	36,1	-	128,3	130,5	-	115,5	154,6	-

2.7.2 PEGylation



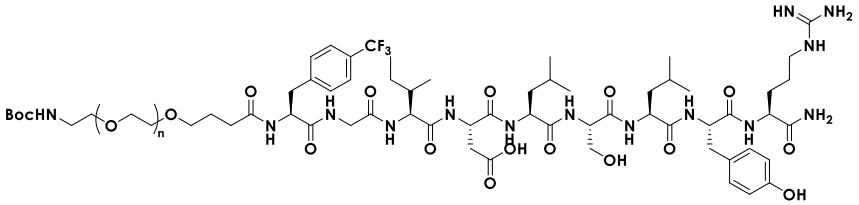
Le BocHN-PEG(2000)-CO_2H (1) (1 équivalent, 50 mg, 0,025 mmol) a été solubilisé dans 2 mL de DMF. La DIEA (25 équivalents) et l'HATU (1,1 équivalents) ont été ajoutés et le mélange a été agité 5 min à température ambiante. Le peptide A64 ou A65 ou A66 (1,5 équivalents), dissout dans 3 mL de DMF, a été ajouté en goutte à goutte sur la solution de BocHN-PEG(2000)-CO_2H activé. Le mélange a été agité à température ambiante pendant 4h. Le volume de DMF a été réduit de moitié par évaporation sous pression réduite puis le produit a été précipité par addition d'Et_2O et le solide blanc obtenu a été lavé deux fois à l'Et_2O et le produit brut purifié par HPLC préparative.

Le BocHN-PEG(2000)-CO_2H de départ a été analysé par RMN ^1H et ^{13}C (HSCQ et HMBQ) pour identifier les déplacements chimiques de référence nécessaire à montrer le taux de PEGylation. Les signaux d'intérêts sont le carbone quaternaire de l'acide ($C^{IV}CO_2H$) et le CH_2 en α de l'acide ($CH_2\alpha CO_2H$).

Tableau 35 - Attributions des déplacements chimiques des protons et des carbones du BocHN-PEG(2000)-CO_2H (1)

	CH_3(Boc)	C^{IV}Boc	$CH_2\alpha NH$	$CH_2\beta NH$	CH_2 PEG	$CH_2\gamma CO_2H$	$CH_2\beta CO_2H$	$CH_2\alpha CO_2H$	$C^{IV}CO_2H$
^1H	1,48	-	3,31	3,64	3,74	3,61	1,92	**2,47**	-
^{13}C	27,8	80,9	39,8	69,4	69,6	69,4	24,3	30,9	**178,7**

Synthèse des composés A67a et A67b



BocHN-PEG(2000)-Phe(CF_3)-Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg-NH_2

Le composé A67a a été obtenu avec un rendement de 50% (39,5 mg) et le composé A67b a été obtenu avec un rendement de 42% (33,7 mg). Le taux de PEGylation a été déterminé par RMN à 100%. Les lots a et b ont été rassemblés pour la suite de la synthèse.

Tableau 36 - Attributions des déplacements chimiques des protons du composé A67 côté peptide

	Hα	Hβ1	Hβ2	Hγ1	Hγ2	Hδ1	Hδ2	Hε
Phe(CF_3)	4,73	3,33	3,07	-	-	7,48	-	7,72
Gly	3,99	-	-	-	-	-	-	-
Ile	4,2	1,86	-	0,92	1,19	0,89	-	-
Asp	4,78	3,04	2,88	-	-	-	-	-
Leu	4,32	1,51	1,43	1,67	-	0,84	0,89	-
Ser	4,39	3,89	-	-	-	-	-	-
Leu	4,32	1,69	1,66	1,51	-	0,92	0,96	-
Tyr	4,57	3,12	2,98	-	-	7,17	-	6,87
Arg	4,28	1,86	1,71	1,71	-	3,21	-	-

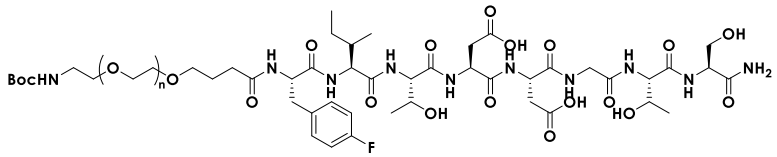
Tableau 37 - Attributions des déplacements chimiques des carbones du composé A67 côté peptide

	CO	CHα	CHβ	CHγ1	CHγ2	CHδ1	CHδ2	CHε	CHζ	CF_3
Phe(CF_3)	175,9	54,6	36,8	-	-	129,7	-	125,4	140,9	124,6
Gly	171,5	43,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	173,9	59,3	37,6	15,9	25,5	10,3	-	-	-	-
Asp	173,6	50,7	35,9	175,2	-	-	-	-	-	-
Leu	176,7	54,1	40,7	25,4	-	21,9	21,7	-	-	-
Ser	173,1	57,3	61,6	-	-	-	-	-	-	-
Leu	176,7	54,1	40,6	25,2	-	23,3	23,6	-	-	-
Tyr	173,1	55,4	35,8	127,7	-	130,5	-	115,7	154,6	-
Arg	176,9	53,8	29,3	25,6	-	41,6	-	-	-	-

Tableau 38 - Attributions des déplacements chimiques des protons et des carbones du composé A67 côté PEG

	CH_3(Boc)	C^{IV}Boc	CH_2αNH	CH_2βNH	CH_2 PEG	CH_2γCO_2H	CH_2βCO_2H	CH_2αCO_2H	$C^{IV}CO_2H$
^{1}H	1,47	-	3,31	3,63	3,74	3,66	1,73	2,30	-
^{13}C	27,8	81	39,7	69,4	69,6	69,6	24,8	31,9	176,1

Synthèse des composés A68a et A68b



BocHN-PEG(2000)-Phe(F)-Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser-NH_2

Le composé A68a a été obtenu avec un rendement de 53% (38,4 mg) et le composé A67b a été obtenu avec un rendement de 50% (36 mg). Le taux de PEGylation a été déterminé par RMN à 100%. Les lots a et b ont été rassemblés pour la suite de la synthèse.

Tableau 39 - Attributions des déplacements chimiques des protons du composé A68 côté peptide

	Hα	Hβ1	Hβ2	Hγ1	Hγ2	Hδ	Hε
Phe(4-F)	4,68	3,14	2,99	0,93	-	7,3	7,12
Ile	4,27	1,87	-	1,25	1,22-1,50	0,89	-
Thr	4,46	4,34	-	-	-	-	-
Asp	4,79	3,01	2,98	-	-	-	-
Asp	4,79	2,91	2,88	-	-	-	-
Gly	4,04-4,07	-	-	-	-	-	-
Thr	4,36	4,23	-	1,28	-	-	-
Ser	4,5	3,93	-	-	-	-	-

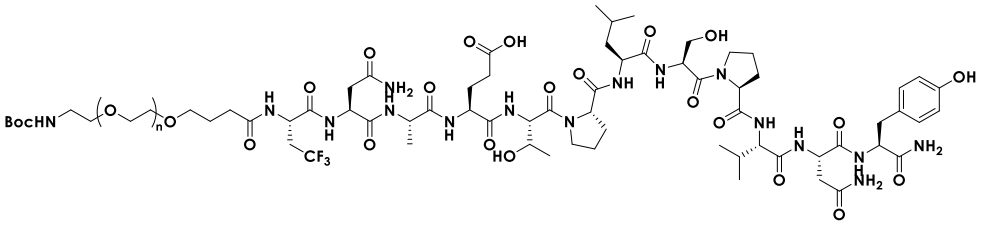
Tableau 40 - Attributions des déplacements chimiques des carbones du composé A68 côté peptide

	CO	CHα	CHβ	CHγ1	CHγ2	CHδ	CHε	CHζ
Phe(4-F)	173,	54,8	36,2	132,2	-	130,7	115,4	130,9
Ile	173,1	58	36,4	14,9	24,5	10,2	-	-
Thr	172	59,3	67	18,8	-	-	-	-
Asp	172,3	50,3	35,8	174,4	-	-	-	-
Asp	172,3	50,3	35,8	174,4	-	-	-	-
Gly	172,3	42,9	-	-	-	-	-	-
Thr	171,4	59	67,1	18,8	-	-	-	-
Ser	174	55,5	61,2	-	-	-	-	-

Tableau 41 - Attributions des déplacements chimiques des protons et des carbones du composé A68 côté PEG

	CH_3(Boc)	C^{IV}Boc	CH_2αNH	CH_2βNH	CH_2 PEG	CH_2γCO_2H	CH_2βCO_2H	CH_2αCO_2H	$C^{IV}CO_2H$
^{1}H	1,48	-	3,31	3,61	3,74	3,69	1,79	2,31	-
^{13}C	27,6	81	39,7	69,3	69,6	69,6	25	31,9	175,9

Synthèse des composés A69a et A69b



BocHN-PEG(2000)-Ala(CF_3)-Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr-NH_2

Le composé A69a a été obtenu avec un rendement de 38% (32 mg) et le composé A69b a été obtenu avec un rendement de 17% (15 mg). Le taux de PEGylation a été déterminé par RMN à 100%. Les lots a et b ont été rassemblés pour la suite de la synthèse.

Tableau 42 - Attributions des déplacements chimiques des protons du composé A69 côté peptide

	Hα	Hβ1	Hβ2	Hγ1	Hγ2	Hδ	Hε	Hζ
Ala(CF_3)	4,75	2,86	2,71	-	-	-	-	-
Asn	4,72	2,9	2,75	-	-	-	-	-
Ala	4,35	1,43	-	-	-	-	-	-
Glu	4,45	2,18	2,04	2,52	-	-	-	-
Thr	4,63	4,19	-	1,43	-	-	-	-
Pro	4,47	2,32	1,95	2,04	3,88	3,75	-	-
Leu	4,37	1,68	1,63	1,7	-	0,92-0,97	-	-
Ser	4,8	3,89	3,86	-	3,85	-	-	-
Pro	4,47	2,32	1,95	2,04	0,8	3,75	-	-
Val	4,02	1,96	-	0,92	-	-	-	-
Asn	4,72	2,81	2,72	-	-	-	-	-
Tyr	4,54	3,16	2,96	-	-	7,19	6,87	-

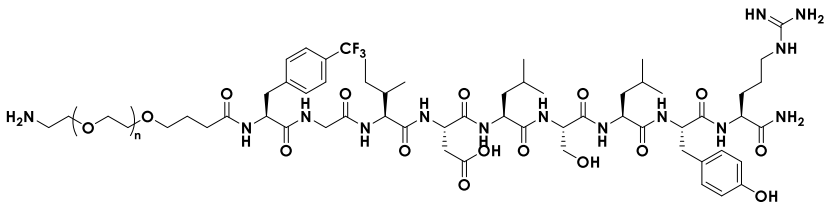
Tableau 43 - Attributions des déplacements chimiques des carbones du composé A69 côté peptide

	CO	CHα	CHβ	CHγ	CHδ1	CHδ2	CHε	CHζ	CF_3
Ala(CF_3)	176,1	48,4	34	-	-	-	-	-	125,7
Asn	171,8	50,5	36,1	174,3	-	-	-	-	-
Ala	174,8	50	16,5	-	-	-	-	-	-
Glu	173,5	52,9	26,1	30	176,9	-	-	-	-
Thr	170,1	57,1	67	16,5	-	-	-	-	-
Pro	174	60,6	29,4	24,6	20,7	22,3	-	-	-
Leu	174,4	52,6	39,7	24,5	-	-	-	-	-
Ser	170,1	53,5	60,6	-	-	-	-	-	-
Pro	174	60,6	29,4	24,6	-	-	-	-	-
Val	172,7	59,6	30	17,8	-	-	-	-	-
Asn	171,8	50	36,1	174,3	-	-	-	-	-
Tyr	175,6	55,1	36,1	128,5	130,5	-	115,5	154,3	-

Tableau 44 - Attributions des déplacements chimiques des protons et des carbones du composé A69 côté PEG

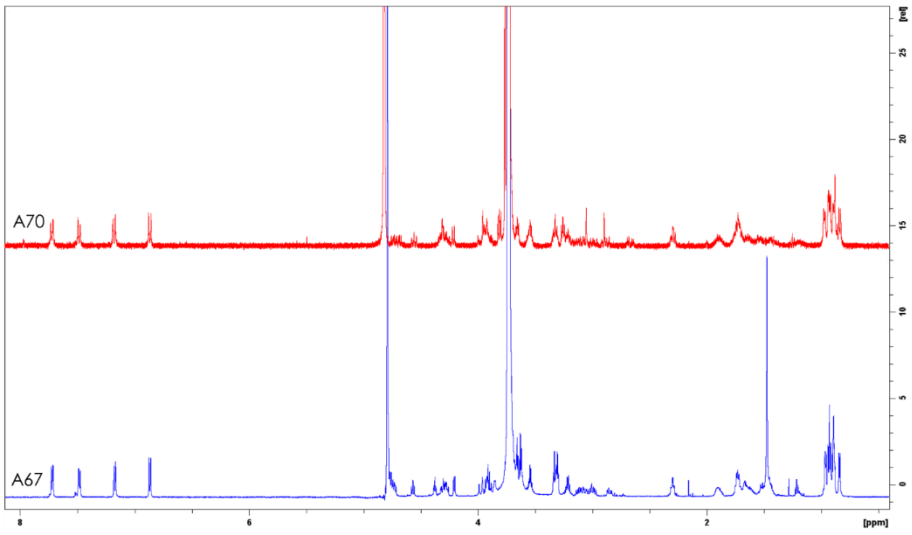
	CH_3(Boc)	C^{IV}Boc	CH_2αNH	CH_2βNH	CH_2 PEG	CH_2γCO_2H	CH_2βCO_2H	CH_2αCO_2H	$C^{IV}CO_2H$
^{1}H	1,48	-	3,31	3,63	3,74	3,58	1,91	2,42	-
^{13}C	27,8	81	39,7	69,6	69,6	69,9	24,9	31,9	176

Synthèse du composé A70

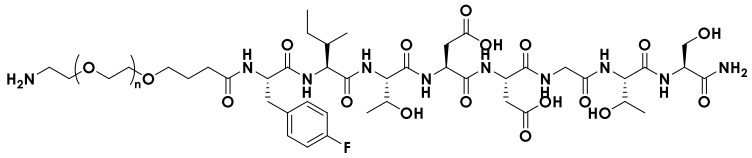


H_2N-PEG(2000)-Phe(CF_3)-Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg-NH_2

L'amine N-Boc du composé A67a-b (1 équivalent, 63 mg, 0,020 mmol) a été déprotégée par agitation à température ambiante dans 14 mL d'un mélange TFA/DCM (50/50, v/v) avec 2 équivalents de TIS pendant 1h. Le solvant a été évaporé et le produit a été récupéré par précipitation dans de l'Et_2O et lavé trois fois à l'Et_2O avant d'être séché sous vide pour obtenir 61 mg de produit brut, soit un rendement de 100%. La déprotection a été vérifiée par l'absence du signal des protons tert-butyliques (δ = 1,47-1,48 ppm, singulet) par RMN ^{1}H.

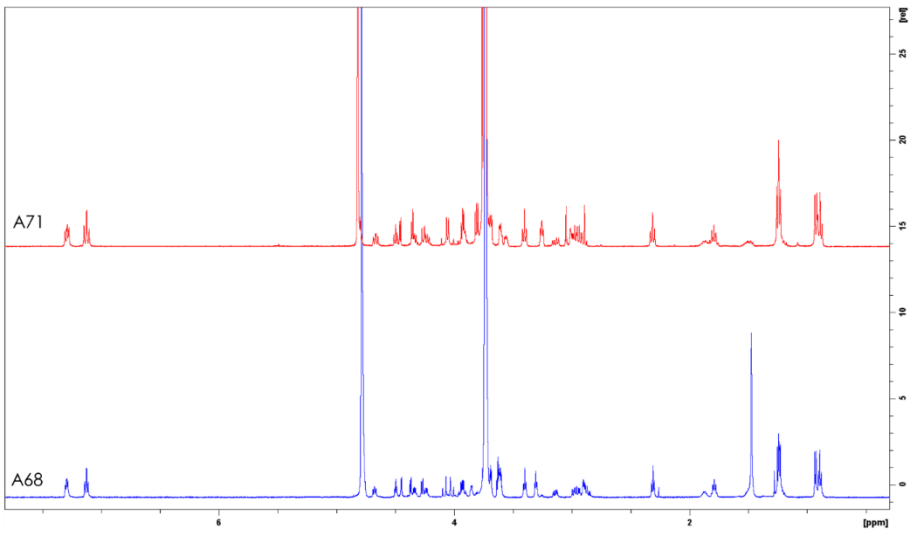


Synthèse du composé A71

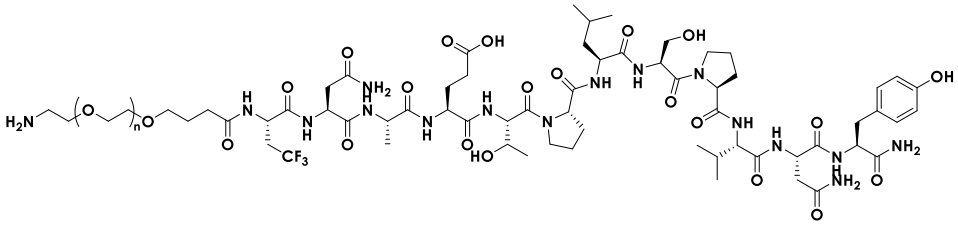


H_2N-PEG(2000)-Phe(F)-Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser-NH_2

L'amine N-Boc du composé A68a-b (1 équivalent, 63 mg, 0,022 mmol) a été déprotégée par agitation à température ambiante dans 10 mL d'un mélange TFA/DCM (50/50, v/v) avec 2 équivalents de TIS pendant 1h. Le solvant a été évaporé et le produit a été récupéré par précipitation dans de l'Et_2O et lavé trois fois à l'Et_2O avant d'être séché sous vide pour obtenir 52 mg de produit brut, soit un rendement de 86%. La déprotection a été vérifiée par l'absence du signal des protons tert-butyliques (δ = 1,47-1,48 ppm, singulet) par RMN ^1H.

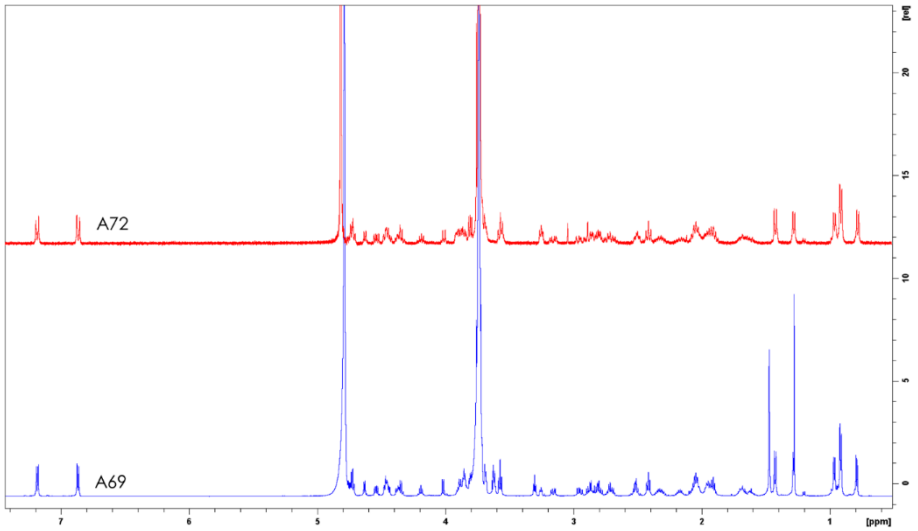


Synthèse du composé A72



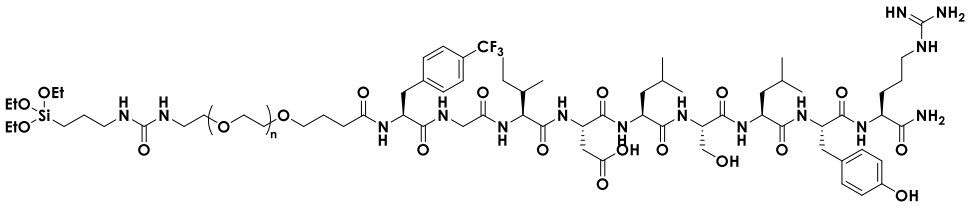
H_2N-PEG(2000)-Ala(CF_3)-Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr-NH_2

L'amine N-Boc du composé A69a-b (1 équivalent, 37 mg, 0,011 mmol) a été déprotégée par agitation à température ambiante dans 10 mL d'un mélange TFA/DCM (50/50, v/v) avec 2 équivalents de TIS pendant 1h. Le solvant a été évaporé et le produit a été récupéré par précipitation dans de l'Et_2O et lavé trois fois à l'Et_2O avant d'être séché sous vide pour obtenir 34 mg de produit brut, soit un rendement de 97%. La déprotection a été vérifiée par l'absence du signal des protons tert-butyliques (δ = 1,47-1,48 ppm, singulet) par RMN ^1H.



2.7.3 Silylation

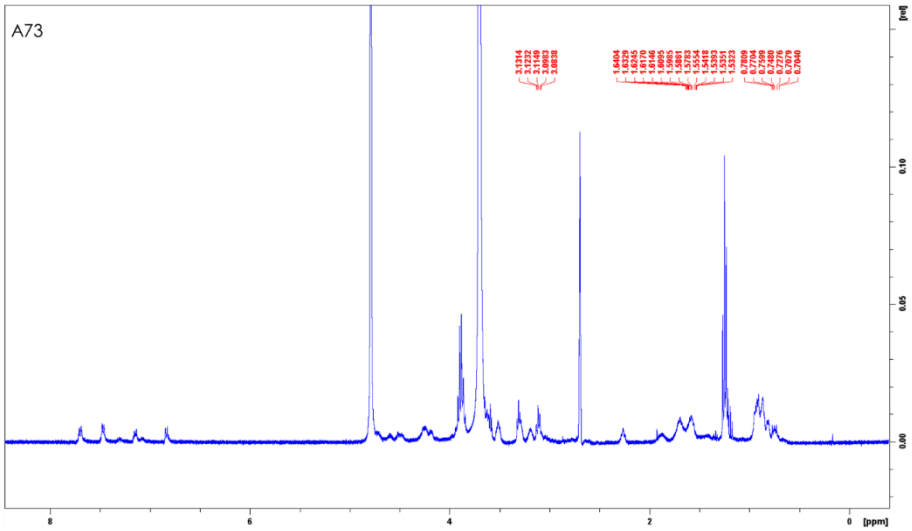
Synthèse du composé A73



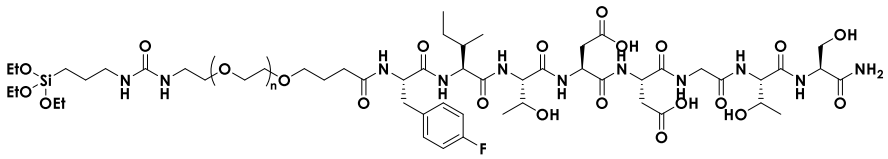
Si-PEG(2000)-Phe(CF_3)-Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg-NH_2

Le PEG-peptide A70 (1 équivalent, 61 mg, 0,020 mmol) a été dissout dans 3 mL de DMF anhydre sous argon. Le mélange a été basifié par ajout de DIEA (4 équivalents) puis l'ICPTES a été ajouté au mélange (2 équivalents). Après 3h30 d'agitation à température ambiante sous argon, le produit a été précipité par ajout d'Et_2O et a été lavé trois fois à l'Et_2O avant d'être séché sous vide pour obtenir 56 mg de composé A73 avec un rendement de 85%. La silylation a été

vérifiée par RMN ^{1}H grâce à la présence des CH_2 en α (δ = 0,75 ppm), β (δ = 1,58 ppm) et γ (δ = 3,11 ppm) du silicium.

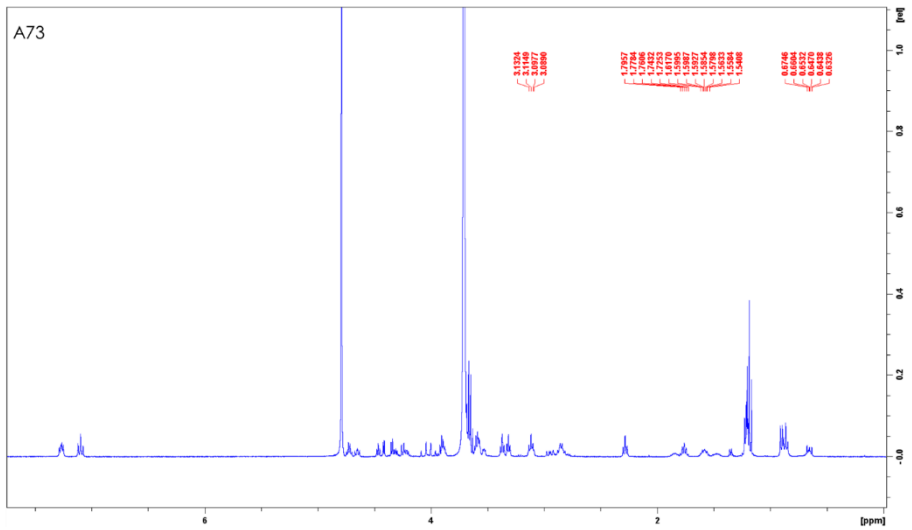


Synthèse du composé A74

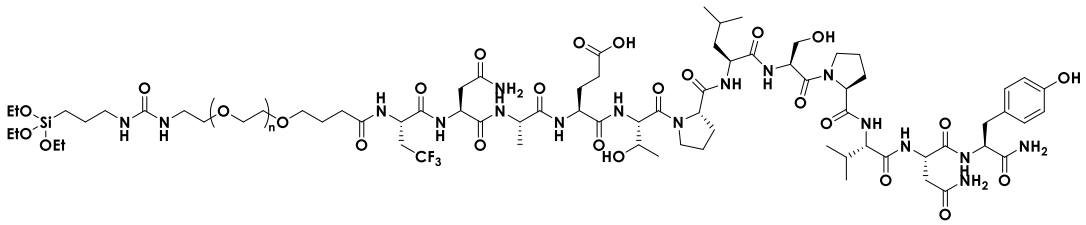


Si-PEG(2000)-Phe(F)-Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser-NH_2

Le PEG-peptide A71 (1 équivalent, 52 mg, 0,019 mmol) a été dissout dans 3 mL de DMF anhydre sous argon. Le mélange a été basifié par ajout de DIEA (4 équivalents) puis l'ICPTES a été ajouté au mélange (2 équivalents). Après 3h30 d'agitation à température ambiante sous argon, le produit a été précipité par ajout d'Et_2O et a été lavé trois fois à l'Et_2O avant d'être séché sous vide pour obtenir 55 mg de composé A74 avec un rendement de 97%. La silylation a été vérifiée par RMN ^{1}H grâce à la présence des CH_2 en α (δ = 0,75 ppm), β (δ = 1,58 ppm) et γ (δ = 3,11 ppm) du silicium.

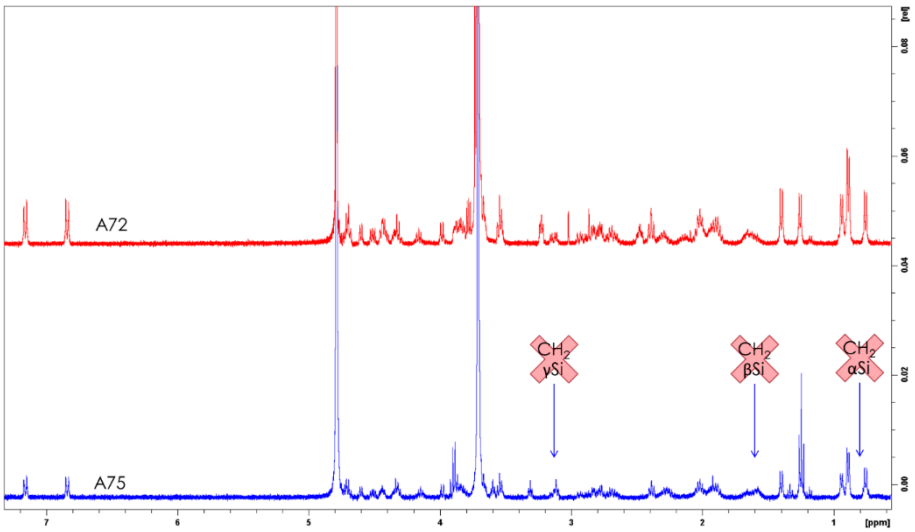


Synthèse du composé A75



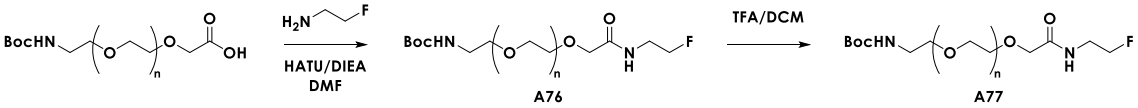
Si-PEG(2000)-Ala(CF_3)-Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr-NH_2

Le PEG-peptide A72 (1 équivalent, 34 mg, 0,010 mmol) a été dissout dans 3 mL de DMF anhydre sous argon. Le mélange a été basifié par ajout de DIEA (4 équivalents) puis l'ICPTES a été ajouté au mélange (2 équivalents). Après 3h30 d'agitation à température ambiante sous argon, le produit a été précipité par ajout d'Et_2O et a été lavé trois fois à l'Et_2O avant d'être séché sous vide. La RMN ^1H ne présentait pas les signaux caractéristiques des CH_2 en α (δ = 0,75 ppm), β (δ = 1,58 ppm) et γ (δ = 3,11 ppm) du silicium, mais une dégradation du composé A72.



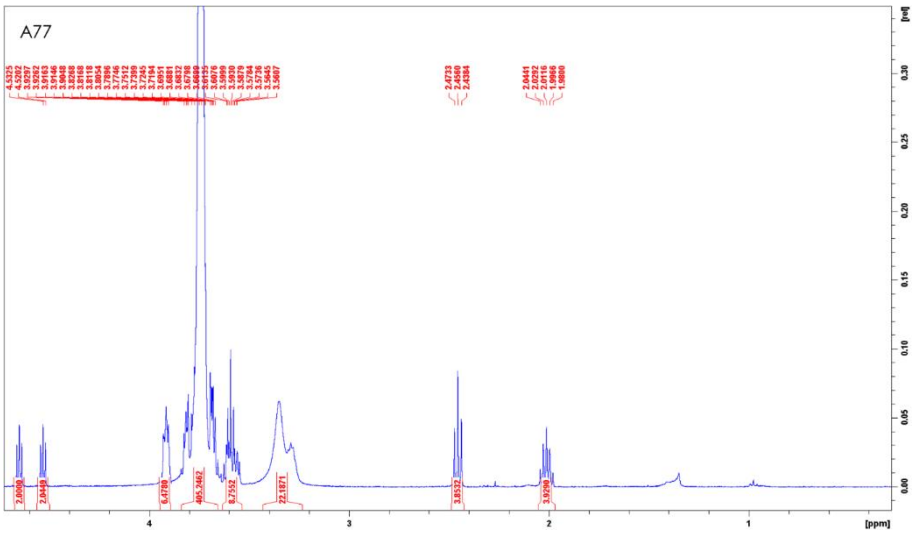
2.7.4 Synthèse du PEG fluoré silylé

Synthèse des composés A76 et A77

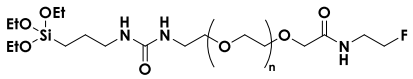


Le BocHN-PEG(2000)-CO_2H (1 équivalent, 450 mg, 0,225 mmol) a été dissout dans 20 mL de DMF. La DIEA (4 équivalents) et l'HATU (2 équivalents) ont été ajoutés et le mélange a été agité 5 min à température ambiante. L'hydrochlorate de 2-fluoroéthylamine (2 équivalents) a été ajouté et le mélange a été agité 1h à température ambiante. Après évaporation du DMF sous pression réduite, le produit a été précipité dans de l'Et_2O puis séché au sous vide avant d'être purifier par HPLC préparative pour 348 mg le composé A76 avec un rendement de 73%.

Le composé A76 a été dissout dans 20 mL d'un mélange TFA/DCM (50/50, v/v) pour obtenir 348 mg de composé A77 avec un rendement de 100%.

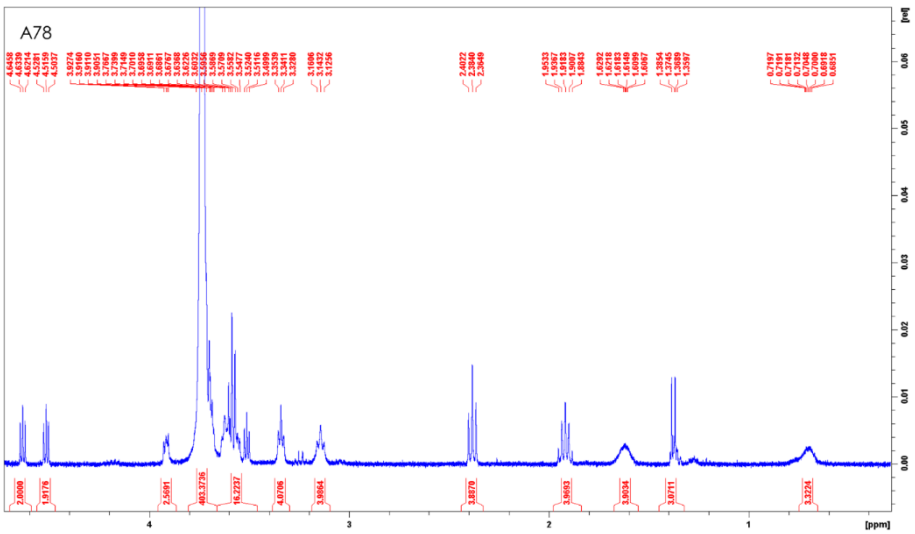


Synthèse du composé A78



Si-PEG(2000)-F

Le produit A77 (1 équivalent, 57 mg, 0,027 mmol) a été dissout dans 1 mL de DMF anhydre sous argon. Le mélange a été basifié par ajout de DIEA (4 équivalents) puis l'ICPTES a été ajouté au mélange (4 équivalents). Après 4h d'agitation à température ambiante sous argon, le produit a été précipité par ajout d'Et_2O et a été lavé trois fois à l'Et_2O avant d'être séché sous vide pour obtenir 49 mg de composé A78 avec un rendement de 77%. La silylation a été vérifiée par RMN ^1H grâce à la présence des CH_2 en α (δ = 0,70 ppm), β (δ = 1,61 ppm) et γ (δ = 3,14 ppm) du silicium.



2.8 Greffage des PEG-ligands silylés

0,682 mL de suspension stock de NP@SiO_2 est prélevé pour avoir 30 mg de nanoparticules. Les nanoparticules ont d'abord été centrifugées (15 min à 14000 rpm) pour éliminer l'eau dans laquelle elles étaient stockées. Les PEG-ligands silylés ont été solubilisés dans 700 µL de DMF/AcOH (99/1, v/v) à une concentration d'environ 25 mmol/L et les nanoparticules ont été suspendues (2 min d'agitation par vortex et 5 min de sonication) dans cette solution de PEG-ligands silylés. Les nanoparticules ont été agitées dans cette solution pendant 18h à 65°C pour réaliser le greffage.

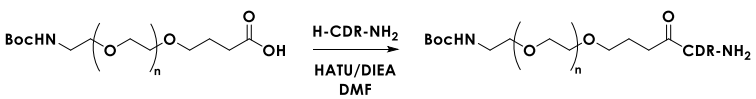
Une fois le greffage terminé, les nanoparticules ont été centrifugées (15 min à 14000 rpm) pour enlever le milieu réactionnel. Elles ont ensuite été lavées plusieurs fois pour retirer les peptides n'ayant pas réagi (trois fois avec 1,5 mL de DMF et trois fois avec 1,5 mL d'eau, centrifugation 15 min à 14000 rpm, 2 min de vortex et 5 min de sonication entre chaque centrifugation). Les nanoparticules ont été stockées dans 1 mL d'eau milliQ. Un aliquote de 150 µL de chaque suspension a été prélevé pour estimer leurs concentrations entre 21,4 et 26,3 mg/mL.

Des échantillons de chaque nanoparticule ont été préparés dans de l'eau milliQ à 0,05 mg/mL pour être analysés par DLS et ainsi obtenir le rayon hydrodynamique de chaque nanoparticule, l'indice de polydispersité et le potentiel zêta.

Enfin, les nanoparticules lyophilisées (entre 3 et 4 mg) ayant servi à déterminer la concentration ont été dissoutes dans 1 mL de NaOD à 1,5 mol/L pour quantifier le nombre de peptides greffés en RMN ^{19}F. Après dissolution, du TFE a été ajouté comme étalon interne pour obtenir une concentration de 0,05 mmol/L dans le tube RMN (δ = -76,2 ppm). La concentration de TFE étant connue, la concentration en acide aminé fluoré, et donc de peptides, a pu être déterminée à partir des intégrations des signaux du TFE et de l'acide aminé fluoré. La masse de nanoparticules dissoutes dans le tube RMN étant connue, ainsi que son diamètre et donc sa surface, il a été possible d'estimer le nombre de peptides/nm² greffés à la surface des nanoparticules.

2.9 Synthèse des PEG-ligands silylés (2)

PEGylation



Le BocHN-PEG(2000)-CO_2H (2) (1 équivalent, 100 mg, 0,050 mmol) a été solubilisé dans 2 mL de DMF. La DIEA (8 équivalents, et l'HATU (1 équivalent) ont été ajoutés et le mélange a été agité 5 min à température ambiante. Le peptide A64 ou A65 ou A66 (1 équivalent) ou

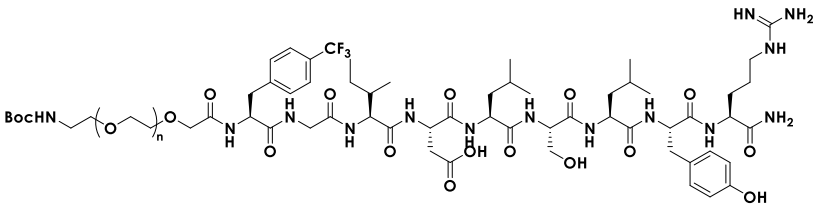
d'hydrochlorate de 2-fluoroéthylamine (1,2 équivalents), dissout dans 2 mL de DMF, a été ajouté en goutte à goutte sur la solution de BocHN-PEG(2000)-CO_2H activé. Le mélange a été agité à température ambiante pendant 4h. Le DMF a été évaporé et le produit, solubilisé dans 15 mL d'eau 0,1% TFA, a été filtré sur filtre 0,45 µm avant d'être lyophilisé. La poudre blanche obtenue après lyophilisation a été lavée deux fois à l'Et_2O avant d'être séchée sous vide.

Le nouveau BocHN-PEG(2000)-CO_2H a été analysé par RMN ^1H et ^{13}C (HSCQ et HMBQ) pour identifier les déplacements chimiques de référence nécessaire à montrer le taux de PEGylation. Le signal d'intérêt est le carbone quaternaire de l'acide ($C^{IV}CO_2H$).

Tableau 45 - Attributions des déplacements chimiques des protons et des carbones du BocHN-PEG(2000)-CO_2H (2)

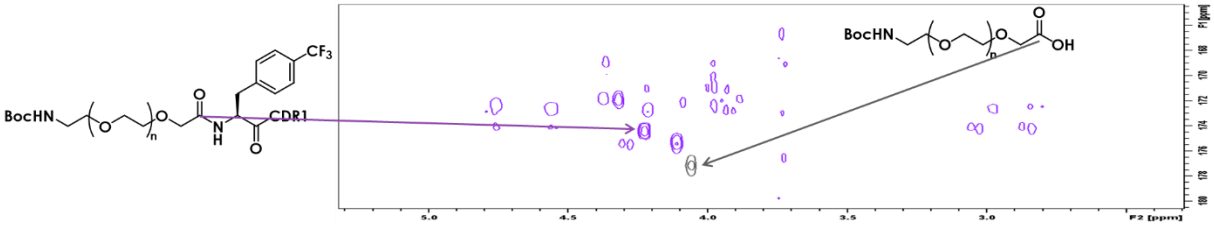
	CH_3(Boc)	C^{IV}Boc	$CH_2\alpha NH$	$CH_2\beta NH$	CH_2 PEG	$CH_2\alpha CO_2H$	$C^{IV}CO_2H$
^1H	1,47	-	3,31	3,63	3,74	4,06	-
^{13}C	27,8	81,3	39,6	69,3	69,6	69,3	**177,1**

Synthèse du composé A79

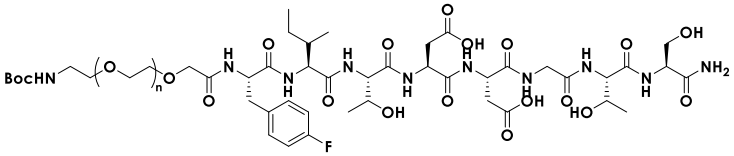


BocHN-PEG(2000)-Phe(CF_3)-Gly-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Tyr-Arg-NH_2

155 mg de composé A79 a été obtenu avec un rendement de 98%. Le taux de PEGylation a été déterminé par RMN à 100%. L'absence du signal du carbone quaternaire de l'acide (δ = 177,1 ppm) et l'apparition du signal du carbone quaternaire de l'amide (δ = 174,4 ppm) confirme le taux de PEGylation, permettant de continuer la synthèse sans purification.



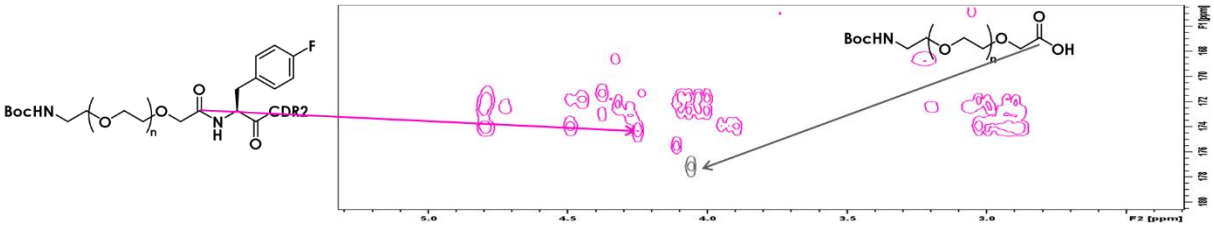
Synthèse du composé A80



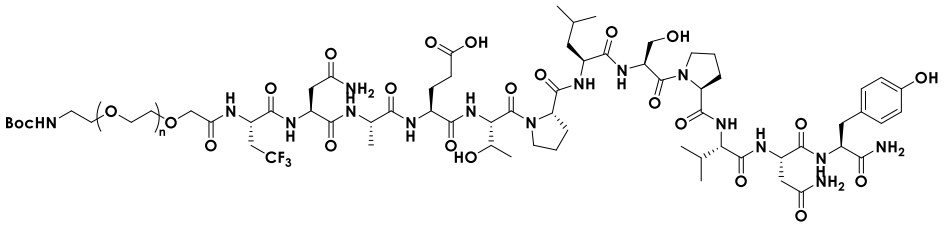
BocHN-PEG(2000)-Phe(F)-Ile-Thr-Asp-Asp-Gly-Thr-Ser-NH_2

139 mg de composé A80 a été obtenu avec un rendement de 97%. Le taux de PEGylation a été déterminé par RMN à 100%. L'absence du signal du carbone quaternaire de l'acide (δ =

177,1 ppm) et l'apparition du signal du carbone quaternaire de l'amide (δ = 174,4 ppm) confirme le taux de PEGylation, permettant de continuer la synthèse sans purification.

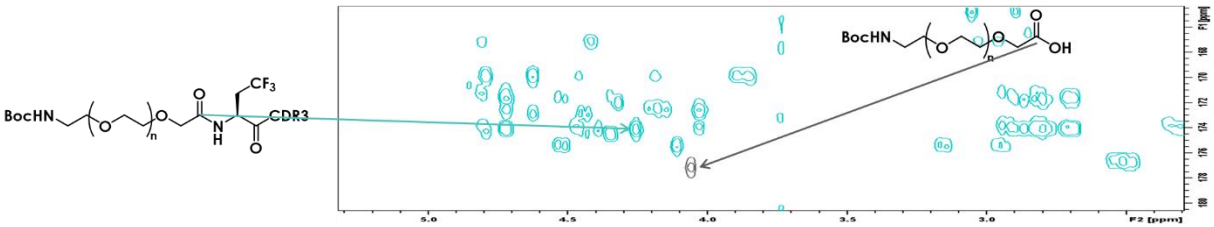


Synthèse du composé A81

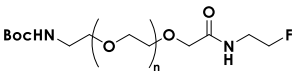


BocHN-PEG(2000)-Ala(CF_3)-Asn-Ala-Glu-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Val-Asn-Tyr-NH_2

163 mg de composé A81 a été obtenu avec un rendement de 98%. Le taux de PEGylation a été déterminé par RMN à 100%. L'absence du signal du carbone quaternaire de l'acide (δ = 177,1 ppm) et l'apparition du signal du carbone quaternaire de l'amide (δ = 174,2 ppm) confirme le taux de PEGylation, permettant de continuer la synthèse sans purification.

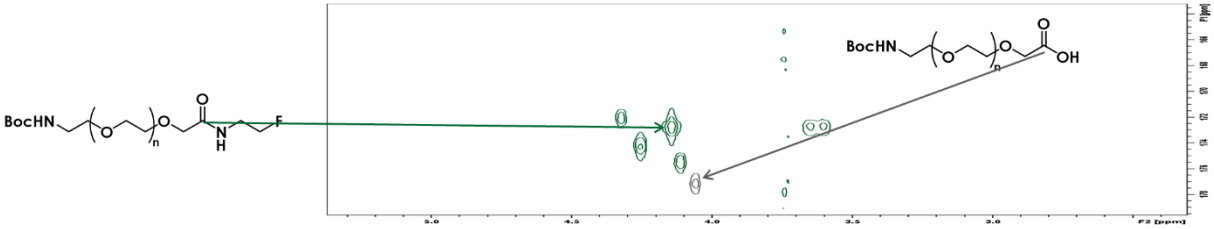


Synthèse du composé A82



BocHN-PEG(2000)-F

100 mg de composé A82 a été obtenu avec un rendement de 95%. Le taux de PEGylation a été déterminé par RMN à 100%. L'absence du signal du carbone quaternaire de l'acide (δ = 177,1 ppm) et l'apparition du signal du carbone quaternaire de l'amide (δ = 172,7 ppm) confirme le taux de PEGylation, permettant de continuer la synthèse sans purification.



3 Partie expérimentale - Anticorps artificiels : empreintes de protéines

3.1 Les monomères fonctionnels

3.1.1 DKP

Composé B1 : ancrage de l'acide bromoacétique

La résine HMBA NovaGel (0,7 mmol/g, 5 g) a été gonflée dans 50 mL de dichlorométhane pendant 30 min. Le solvant a été enlevé par filtration. L'acide bromoacétique (5 équivalents, 17,5 mmol, 2,4 g), dissout dans 40 mL de DCM anhydre, a été préactivé en ajoutant le DIC (2,5 équivalents) sous argon et à 0°C. 40 mL de DMF anhydre ont dû être ajoutés pour solubiliser le précipité qui s'était formé. Le mélange a été agité 10 min à 0°C sous argon. Une fois l'acide activé, celui-ci a été ajouté sur la résine à température ambiante sous argon, suivi par la DMAP (0,75 équivalents). Après 5h d'agitation sous argon à température ambiante, la résine a été filtrée, lavée (trois fois 20 mL de DMF et trois fois 20 mL de DCM) et séchée sous vide.

20 mg de résine ont été pesées pour réaliser un dosage Fmoc après substitution nucléophile du brome par la Fmoc-hydrazine. 10 équivalents de Fmoc-hydrazine, en solution dans du DMSO à 0,6 mol/L, ont été ajoutés sur la résine qui a été agité pendant 5h à température ambiante. Après filtration et lavages (trois fois 2 mL de DMF puis trois fois 2 mL de DCM), le dosage Fmoc a été réalisé par agitation de la résine dans 1 mL d'un mélange DMF/pipéridine (80/20, v/v) pendant 15 min. Après dilution au centième, l'absorbance a été mesurée à 301 nm ($\varepsilon_{dibenzofulvène}$ = 8021 L/mol.cm) pour obtenir une charge de 0,30 mmol/g.

Composé B2 : substitution avec l'amine silylée

La résine B1 a été agité pendant 5h avec une solution de (3-aminopropyl)tris-(trimethylsiloxy)silane (10 équivalents) dans 25 mL de DCM. La résine a ensuite été lavée trois fois avec 20 mL de DMF puis trois fois avec 20 mL de DCM avant d'être séchée sous vide.

Composés B3 à B7 : couplages avec les Boc-AA-OH

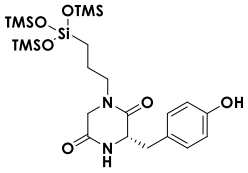
La résine B2 (1 équivalent) a été agitée pendant 1h30 à température ambiante avec le Boc-AA-OH (5 équivalents), l'HATU (5 équivalents) et la DIEA (10 équivalents) dans du DMF (10 mL/g de résine). Une fois le couplage terminé, la résine a été filtrée et lavées avec trois fois 10 mL de DMF puis trois fois 10 mL de DCM avant d'être séchée sous vide.

Composés B8 à B12 : clivages cyclisants

Les résines B3 à B7 ont été agitées dans un mélange DCM/TFA/TIS (47,5/47,5/5, v/v/v, 10 mL/g de résine) pendant 30 min pour déprotéger l'amine N-Boc. La résine a ensuite été filtrée et lavées (trois fois 10 mL de DMF et trois fois 10 mL de DCM). La résine a été resuspendue dans du DCM (10 mL/g de résine) et l'ammonium quaternaire a été déprotoné en ajoutant de la triéthylamine (2,5 équivalents), entraînant la formation des dicétopipérazines B8 à B12. Le solvant a été évaporé puis les produits ont été précipités dans l'Et_2O, lavés deux fois à l'Et_2O puis séchés sous vide pour obtenir les cinq dicétopipérazines sous forme d'huile avec des rendements globaux d'environ 25%.

DKP	m résine (g)	n (mmol)	Boc-AA(P)-OH	Quantité (mg)	Rendement (%)
DKP-Tyr (B8)	1.039	0,31	Boc-Tyr(tBu)-OH	45	26
DKP-Ser (B9)	0,868	0,26	Boc-Ser-OH	30	24
DKP-Leu (B10)	0,876	0,26	Boc-Leu-OH	38	27
DKP-Arg (B11)	0,869	0,26	Boc-Arg-OH	34	26
DKP-Glu (B12)	0,863	0,26	Boc-Glu(tBu)-OH	31	23

Composé B8

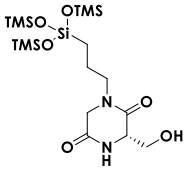


LC/MS (ESI+) : t_R = 2,33 min, m/z 951,1 $[M+M\text{-}TMS]^+$; 557,1 $[M+H]^+$; 467,1 $[M\text{-}OTMS]^+$

MW^{th} = 557,0 g/mol

RMN ^1H (DMSO-d6, 500MHz, 298K): δ = 0,05 (s, 14H) ; 0,031 (m, 2H) ; 1,35 (m, 2H) ; 2,46 (s, 2H) ; 2,69 (m, 2H) ; 2,93 (m, 2H) ; 3,99 (s, 1H) ; 6,60 (d, J = 8,6 Hz, 2H) ; 6,83 (d, J = 8,6 Hz, 2H) ; 8,14 (m, 1H) ; 9,27 (s, 1H)

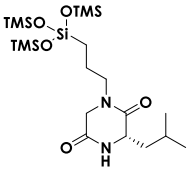
Composé B9



LC/MS (ESI+) : t_R = 1,59 min, 391,2 $[M\text{-}OTMS]^+$; 319,1 $[M\text{-}OTMS\text{-}TMS]^+$

MW^{th} = 480,7 g/mol

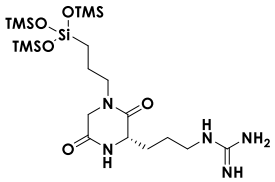
Composé B10



LC/MS (ESI+) : t_R = 1,90 min, 417,1 $[M\text{-}OTMS]^+$; 345,0 $[M\text{-}OTMS\text{-}TMS]^+$

MW^{th} = 506,9 g/mol

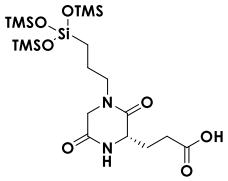
Composé B11



LC/MS (ESI+) : t_R = 1,39 min, 478,2 $[M\text{-}TMS]^+$

MW^{th} = 550,0 g/mol

Composé B12



LC/MS (ESI+) : t_R = 1,64 min, 451,2 $[M\text{-}TMS]^+$; 433,2 $[M\text{-}OTMS]^+$; 361,2 $[M\text{-}OTMS\text{-}TMS]^+$

MW^{th} = 522,9 g/mol

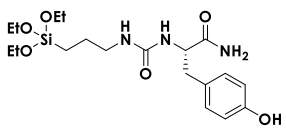
3.1.2 Si-AA-NH_2

Conditions a

Le H-AA-NH_2(.HCl) (1 équivalent, 2 mmol) a été solubilisé dans le DMF anhydre à une concentration d'environ 0,3 mol/L sous argon à température ambiante. La DIEA a été ajoutée (entre 3 et 6 équivalents selon le H-AA-NH_2), suivi de l'ICPTES (0,95 équivalents). Le mélange a été agité à température ambiante sous argon de 4 à 24h selon les H-AA-NH_2 pour former les Si-AA-NH_2. Le DMF a été évaporé sous pression réduite puis les Si-AA-NH_2 ont été précipités dans de l'Et_2O et lavés trois fois à l'Et_2O avant d'être séchés sous vide.

Composé B13a

La Si-Tyr-NH_2 B13a a été obtenue après 4h d'agitation sous forme de poudre blanche avec un rendement de 80%.

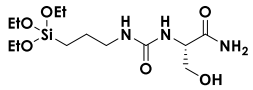


RMN ^1H (500MHz, DMSO-d6, 298K): δ(ppm) 0,49 (m, 2H) ; 1,13 (t, 9H, J = 7,0 Hz) ; 1,36 (m, 2H) ; 2,62 (dd, 1H, J = 7,5 Hz, 13,8 Hz) ; 2,78 (dd, 1H, J = 5,3 Hz, 13,8 Hz) ; 2,90 (q, 2H, J = 6,4 Hz) ; 3,73 (q, 6H, J = 7,0 Hz) ; 4,22 (m, 1H) ; 5,84 (d, 1H, J = 8,2 Hz) ; 6,09 (t, 1H, J = 5,4 Hz) ; 6,62 (d, 2H, J = 8,5 Hz) ; 6,94 (d, 2H, J = 8,4 Hz) ; 6,96 (s, 1H) ; 7,37 (s, 1H) ; 9,16 (s, 1H).

RMN ^{29}Si (99.4MHz, DMSO-d6, 298K): δ(ppm) -45,0.

Composé B14a

La Si-Ser-NH_2 B14a a été obtenue après 24h d'agitation sous forme d'huile avec un rendement de 60% et 25% de DIEA résiduelle.

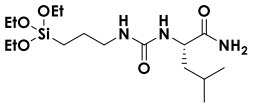


RMN ^1H (500MHz, DMSO-d6, 298K): δ(ppm) 0,52 (m, 2H) ; 1,14 (t, 9H, J = 7,0 Hz) ; 1,28 (m, 17H) ; 1,39 (m, 2H) ; 2,94 (q, 2H, J = 7,0 Hz) ; 3,10 (q, 3H, J = 7,5 Hz) ; 3,45 (m, 1H) ; 3,58 (m, 3H) ; 3,73 (q, 6H, J = 7,0 Hz) ; 4,04 (m, 1H) ; 4,86 (t, 1H, J = 5,3 Hz) ; 6,00 (d, 1H, J = 7,8 Hz) ; 6,27 (t, 1H, J = 5,5 Hz) ; 6,99 (s, 1H) ; 7,22 (s, 1H) ; 9,52 (s, 1H).

DIEA résiduelle: 25%

Composé B15a

La Si-Leu-NH_2 B15a a été obtenue après 24h d'agitation sous forme d'huile avec un rendement de 80% et 57% de DIEA résiduelle.

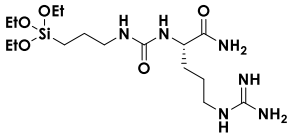


RMN ^1H (500MHz, DMSO-d6, 298K): δ(ppm) 0,50 (m, 2H) ; 0,86 (t, 6H, J = 6,5 Hz) ; 1,14 (t, 9H, J = 7,0 Hz) ; 1,28 (m, 20H) ; 1,38 (m, 2H) ; 1,57 (m, 1H) ; 2,93 (m, 2H) ; 3,11 (m, 3H) ; 3,59 (m, 3H) ; 3,73 (q, 6H, J = 7,0 Hz) ; 4,07 (m, 1H) ; 5,92 (d, 1H, J = 8,6 Hz) ; 6,04 (t, 1H, J = 5,8 Hz) ; 6,87 (s, 1H) ; 7,32 (s, 1H) ; 9,41 (s, 1H).

DIEA résiduelle : 57%

Composé B16a

La Si-Arg-NH_2 B16a a été obtenue après 24h d'agitation sous forme d'huile avec un rendement de 75% et 50% de DIEA résiduelle.



RMN ^1H (500MHz, DMSO-d6, 298K): δ(ppm) 0,52 (m, 2H) ; 1,14 (t, 9H, J = 7,0 Hz) ; 1,28 (m, 15H) ; 1,41 (m, 5H) ; 1,59 (m, 1H) ; 2,94 (m, 2H) ; 3,10 (m, 4H) ; 3,59 (m, 2H) ; 3,73 (q, 6H, J = 7,0 Hz) ; 4,10 (m, 1H) ; 6,10 (d, 1H, J = 7,8 Hz) ; 6,22 (t, 1H, J = 5,5 Hz) ; 7,01 (s, 1H) ; 7,45 (s, 1H) ; 7,78 (t, 1H, J = 5,8 Hz) ; 9,49 (s, 1H).

DIEA résiduelle: 50%

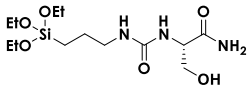
Conditions b

Le H-AA-NH_2(.HCl) (1 équivalent, 2 mmol) a été solubilisé dans le DMF anhydre à une concentration d'environ 0,3 mol/L sous argon à température ambiante. Le $NaHCO_3$ a été ajoutée (entre 5 et 10 équivalents selon le H-AA-NH_2), suivi de l'ICPTES (0,95 équivalents). Le mélange a été agité à température ambiante sous argon pendant 48h pour former les Si-AA-NH_2. Le mélange a été filtré pour éliminer le $NaHCO_3$ puis le DMF a été évaporé sous pression réduite. Enfin, les Si-AA-NH_2 ont été précipités dans de l'Et_2O (Si-Ser-NH_2, B14b ; Si-Arg-NH_2, B16b)

ou de l'éther de pétrole (Si-Leu-NH_2, B15b)et lavés trois fois à l'Et_2O avant d'être séchés sous vide.

Composé B14b

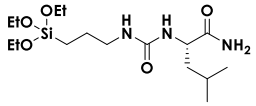
La Si-Ser-NH_2 B14b a été obtenue après 48h d'agitation sous forme de poudre blanche avec un rendement de 73%.



RMN ^{1}H (500MHz, DMSO-d6, 298K): δ(ppm) 0,52 (m, 2H) ; 1,14 (t, 9H, J = 7,0 Hz) ; 1,39 (m, 2H) ; 2,94 (q, 2H, J = 7,0 Hz) ; 3,45 (m, 1H) ; 3,58 (m, 3H) ; 3,73 (q, 6H, J = 7,0 Hz) ; 4,04 (m, 1H) ; 4,86 (s, 1H) ; 6,00 (d, 1H, J = 7,8 Hz) ; 6,27 (t, 1H, J = 5,5 Hz) ; 6,99 (s, 1H) ; 7.22 (s, 1H).

Composé B15b

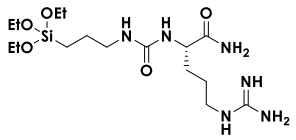
La Si-Leu-NH_2 B15b a été obtenue après 48h d'agitation sous forme de poudre blanche avec un rendement de 73%.



RMN ^{1}H (500MHz, DMSO-d6, 298K): δ(ppm) 0,50 (m, 2H) ; 0,86 (t, 6H, J = 6,5 Hz) ; 1,14 (t, 9H, J = 7,0 Hz) ; 1,28-1,42 (m, 4H) ; 1,57 (m, 1H) ; 2,93 (m, 2H) ; 3,73 (q, 6H, J = 7,0 Hz) ; 4,07 (m, 1H) ; 5,92 (d, 1H, J = 8,6 Hz) ; 6,04 (t, 1H, J = 5,8 Hz) ; 6,87 (s, 1H) ; 7,32 (s, 1H).

Composé B16b

La Si-Arg-NH_2 B14b a été obtenue après 48h d'agitation sous forme de poudre blanche avec un rendement de 85%.



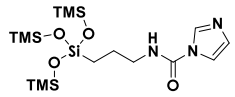
RMN ^{1}H (500MHz, DMSO-d6, 298K): δ(ppm) 0,52 (m, 2H) ; 1,14 (t, 9H, J = 7,0 Hz) ; 1,41 (m, 4H) ; 1,59 (m, 1H) ; 2,94 (m, 2H) ; 3,10 (m, 2H) ; 3,73 (q, 6H, J = 7,0 Hz) ; 4,10 (m, 1H) ; 6,10 (d, 1H, J = 7,8 Hz) ; 6,22 (t, 1H, J = 5,5 Hz) ; 7,01 (s, 1H) ; 7,45 (s, 1H).

Conditions c : le cas de l'acide glutamique

Composé B18

Le (3-aminopropyl)tris(trimethylsiloxy)silane (1 équivalent, 5 mmol) a été solubilisé dans 20 mL de DCM anhydre sous argon. De la DIEA a été ajoutée pour ajuste le pH à 9 (0,6 équivalents). Le CDI (1,1 équivalents), préalablement dissout dans 20 mL de DCM anhydre, a été ajouté à la solution de (3-aminopropyl)tris(trimethylsiloxy)silane. Le mélange a été agité pendant 2,5 jours (suivi LC/MS) à température ambiante sous argon. Une fois la réaction terminée, le DCM a été évaporé. L'huile obtenue a été précipitée dans de l'eau. Le précipité obtenu a été

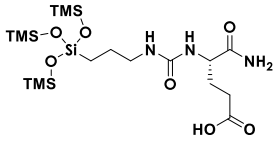
lyophilisé pour enlever les traces d'eau pour obtenir le composé B18 avec un rendement de 93%.



RMN ^{1}H (500MHz, DMSO-d6, 298K): δ(ppm) 0,08 (s, 27H) ; 0,46 (m, 2H) ; 1,55 (m, 2H) ; 3,20 (q, 2H, J = 5,8 Hz) ; 7,01 (m, 1H) ; 7,66 (t, 1H, J = 1,5 Hz) ; 8,21 (t, 1H, J = 1,1 Hz) ; 8,50 (t, 1H, J = 5,5 Hz).
RMN ^{29}Si (99.4MHz, DMSO-d6): δ(ppm) 7,81.

Composé B19

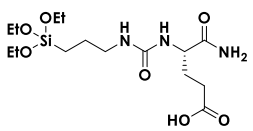
L'isoglutamine H-Glu-NH_2 (1 équivalent, 0,86 mmol) a été dissoute dans 25 mL d'un mélange eau/ACN (40/60, v/v). De la DIEA a été ajoutée pour ajuster le pH à 9 (5 équivalents) puis le composé B18 a été ajouté (1,1 équivalents). Le mélange a été agité 3h à 50°C (suivi LC/MS). Une fois la réaction terminée, 25 mL d'eau a été ajouté puis le mélange a été lyophilisé. La poudre blanche obtenue a été lavée deux fois avec 10 mL d'Et_2O avant d'être séchée sous vide. Le composé B19 a été obtenu avec un rendement de 52%.



RMN ^{1}H (500MHz, DMSO-d6, 298K): δ(ppm) 0,08 (m, 27H) ; 0,38 (m, 2H) ; 1,35 (m, 2H) ; 1,66 (m, 1H) ; 1,66 (m, 1H) ; 2,16 (t, 2H, J = 8,0 Hz) ; 2,93 (m, 2H) ; 4,09 (m, 1H) ; 5,98 (d, 1H, J = 8,0 Hz) ; 6,10 (t, 1H, J = 5,6 Hz) ; 7,00 (s, 2H) ; 7,37 (s, 1H).
RMN ^{29}Si (99.4MHz, DMSO-d6, 298K): δ(ppm) 7,63.

Composé B17c

L'isoglutamine H-Glu-NH_2 (1 équivalent, 1 mmol) a été dissoute dans 2 mL de TFA. Le TFA a ensuite été évaporé et la H-Glu-NH_2.TFA a été précipité dans de l'Et_2O puis séchée sous vide. La H-Glu-NH_2.TFA (1 équivalent, 1 mmol) a été dissoute dans 7 mL de DMF anhydre sous argon à température ambiante. La DIEA (3 équivalent) a été ajoutée, suivi de l'ICPTES (0,95 équivalents) et le mélange a été agité 2h sous argon à température ambiante puis le DMF a été évaporé sous pression réduite et le produit a été précipité dans de l'Et_2O et lavé trois fois à l'Et_2O pour obtenir le composé B17c sous forme de poudre blanche avec un rendement de 82%. La RMN a montré une hydrolyse partielle avec la présence de deux motifs éthoxy au lieu des trois attendus.



RMN ^{1}H (500MHz, DMSO-d6, 298K): δ(ppm) 0,51 (m, 2H) ; 1,14 (t, 6H, J = 7,0 Hz) ; 1,39 (m, 2H) ; 1,66 (m, 1H) ; 1,83 (m, 1H) ; 2,16 (t, 2H, J = 7,6 Hz) ; 2,94 (m, 2H) ; 3,73 (q, 6H, J = 7,0 Hz) ; 4,06 (m, 1H) ; 5,98 (d, 1H, J = 8,2 Hz) ; 6,10 (t, 1H, J = 5,8 Hz) ; 7,01 (s, 1H) ; 7,38 (s, 1H).

3.2 Fonctionnalisation des capillaires

3.2.1 Greffage des Si-AA-NH_2

Le capillaire de silice fondue (diamètre interne 30 µm) a été rincé avec une solution de NaOH (1 mol/L, 20 psi, 10 min), une solution de soude (0,1 mol/L, 20 psi, 10 min), de l'eau milliQ (20 psi, 5 min), une solution d'HCl (1 mol/L, 20 psi, 5 min) et de l'eau milliQ (20 psi, 5 min). Le capillaire a été recouvert d'une couche de silice uniforme (étape de silanisation) avec une solution de tétraéthyle orthosilicate hydrolysé (500 µL TEOS, 177µL d'EtOH et 60 µL de HCL 0,5 mol/L) injectée pendant 15 min à 20 psi, suivi d'un rinçage avec de l'EtOH (30 psi, 15 min) et séchée à l'air (30 psi, 30 min). Le greffage des différents Si-AA-NH_2 a été réalisée à l'aide d'une solution de greffage préparée avec 10 mg de Si-AA-NH_2 et 4,3 mg de NH_4F dans 267 µL de tampon phosphate (100 mmol/L, pH7) et 60 µL de MeOH (pour Si-Tyr-NH_2 et Si-Leu-NH_2, 60 min de sonication ont été nécessaire pour dissoudre le produit). La solution obtenue a été injectée pendant 15 min dans le capillaire à 20 psi suivie d'un temps de repos de 18 h avec les deux extrémités du capillaire plongées dans la solution, avant un rinçage à l'EtOH (30 psi, 15 min) et un séchage à l'air (30 psi, 30 min). Un capillaire contrôle a été réalisé en utilisant la même procédure en l'absence de Si-AA-NH_2.

3.2.2 Détermination du flux électroosmotique

Après rinçage du capillaire avec de l'eau milliQ puis avec le BGE correspondant au pH de mesure (5 min, 20 psi), le flux électroosmotique a été déterminé en injectant du DMF, détectable à 214 nm, à 0,1% dans le BGE en appliquant une pression de 0,5 psi pendant 10 secondes, suivi d'une injection de BGE seul dans les mêmes conditions (2,3 nL par injection, soit environ 1% du volume total du capillaire). Une séparation électrocinétique à +/- 10 kV a été réalisée pour détecter le DMF.

3.2.3 Adsorption des protéines

Les mesures d'adsorption des protéines ont été réalisées à pH 7, avec un rinçage en milieu acide pour désorber les protéines. Dans un premier temps, des mesures à pH 2 ont été réalisées pour obtenir le signal de référence (aire du pic) de chaque protéine en supposant que, dans ces conditions, aucune adsorption ne se produit. Le capillaire a été rincé à l'eau et au tampon pH 2 (5 min, 20 psi) puis chaque protéine a été injectée indépendamment (Lys à 1 mg/mL, RibA à 1 mg/mL, CytC à 0,5 mg/mL, 10 s, 0,5 psi) et poussé hydrodynamiquement à 1 psi pendant 10 min jusqu'à la sortie du capillaire. Le signal UV a été enregistré à 214 nm. Une fois le signal de référence enregistré, une mesure à pH 7 a été réalisée pour déterminer une éventuelle adsorption. Le capillaire a donc été rincé à l'eau, rempli avec la solution de

protéine préparée dans du tampon pH 7 et incubé pendant 5 min sans application de pression ou de courant électrique pour laisser le temps à la protéine de s'adsorber. Le capillaire a ensuite été lavé avec le tampon pH 7 pour éliminer les protéines non adsorbées (5 min, 20 psi). Enfin, le capillaire a été rempli de tampon pH 7 (10 min, 1 psi) pour désorber les protéines potentiellement adsorbées. Les EOF de chaque protéine à pH 2 et pH 7 ont également été déterminés lors de ces mesures, chaque variation d'EOF montrant une évolution de l'état de surface du capillaire. Chaque capillaire a été testé et les mêmes expériences ont été réalisées sur un capillaire en silice fondue comme contrôle.

3.3 Les MIP

3.3.1 Nanoparticules core-shell (Fe_3O_4@SiO_2)

2,16 g de $FeCl_3.6H_2O$ et 4 g d'acétate de sodium anhydre ont été dissous dans un mélange de diéthylène glycol (52 mL) et d'éthylène glycol (28 mL) par sonication pendant 30 min. Le mélange a été transféré dans un autoclave en acier inoxydable revêtu de téflon, scellé, et chauffé à 200 °C pendant 6 h. Après refroidissement, les nanoparticules ont été collectées à l'aide d'un aimant et lavées successivement avec des mélanges d'EtOH, EtOH/eau (50/50, v/v) et EtOH pour éliminer les réactifs n'ayant pas réagi (1 L d'EtOH et 0,5 L d'eau au total). Le produit noir (environ 600 mg) a été stocké à température ambiante dans 15 mL d'éthanol absolu.

Pour ajouter la couche de silice, 5 mL de la suspension de cœur magnétique Fe_3O_4 (environ 200 mg) ont été mis en suspension dans 155 mL d'EtOH absolu et 40 mL d'eau milliQ par sonication pendant 30 min dans un ballon bicol à fond rond qui a ensuite été placé dans un bain thermostaté à 25°C sous agitation mécanisme. 3 mL d'hydroxyde d'ammonium (30% massique) ont été ajoutés au mélange qui a été agité pendant 5 min à 250 rpm. 0,4 mL de TEOS ont ensuite été ajouté goutte à goutte au mélange qui a été agité à 25°C pendant 6 h sous une agitation mécanique à 250 rpm. Les nanoparticules Fe_3O_4@SiO_2 obtenues ont été collectées à l'aide d'un aimant et soigneusement lavées deux fois avec 250 mL d'un mélange EtOH/eau (50/50, v/v), trois fois avec 250 mL d'eau, une fois avec 250 mL d'un mélange EtOH/eau (50/50, v/v) et enfin une fois avec 250 mL d'EtOH. Les nanoparticules Fe_3O_4@SiO_2 ainsi obtenues (environ 240 mg) ont été conservées dans 10 mL d'EtOH absolu jusqu'à la synthèse des MIP/NIP.

3.3.2 Nanoparticules de silice (SiO_2)

Initialement, 40 mL de NH_4OH (30% massique) ont été ajoutés à 345 mL d'EtOH absolu. Après 10 min d'agitation magnétique à 600 rpm, 15 mL de TEOS ont été ajoutés et la réaction a été

laissée 20 h à température ambiante et sous agitation magnétique à 600 rpm. Les nanoparticules de silice obtenues ont été lavées deux fois avec 30 mL d'EtOH et plusieurs fois avec de l'eau milliQ jusqu'à ce que le pH du surnageant soit neutre (10 lavages, environ 300 mL au total). Les nanoparticules de silice ont été conservées dans 100 mL d'eau milliQ à 4°C.

3.3.3 Synthèse des MIP/NIP

200 mg de nanoparticules (Fe_3O_4@SiO_2 ou SiO_2) ont été mis en suspension dans 25 mL d'eau milliQ par sonication pendant 30 min puis divisés en deux lots (un pour le MIP et un pour le NIP). Dans le cas du NIP, 12,5 mL d'eau milliQ ont été ajoutés pour obtenir un volume total de 25 mL. Dans le cas du MIP, 2,5 mg de protéine modèle (CytC ou Lyz) ont été solubilisés dans 12,5 mL d'eau milliQ avant d'être ajoutés aux nanoparticules en suspension pour obtenir un volume total de 25 mL. Les deux suspensions ont été placées sous agitation mécanique à 25°C pendant 30 min.

Les monomères fonctionnels ont été solubilisés dans 5 mL d'un mélange EtOH/eau (40/60, v/v) et ont été ajoutés à la suspension de nanoparticules (deux préparations : une pour le MIP et une pour le NIP) suivis par l'addition de 400 µL d'une solution de triéthanolamine (94 mg/mL dans de l'eau milliQ) à la suspension de nanoparticules pour ajuster le pH à 8,5. La réaction a été laissée 24h (MIP/NIP-1) ou 72h (MIP/NIP-2 à 6) à 25°C sous agitation mécanique à 250 rpm.

Les nanoparticules obtenues ont été lavées à l'aide d'un aimant une fois avec 50 mL d'un mélange avec EtOH/eau (50/50 v/v), puis deux fois avec 50 mL d'EtOH et enfin une fois avec 50 mL d'eau milliQ. La protéine modèle a été extraite avec des lavages successifs de 10 mL d'HCl 0,1 mol/L (pH 1,5) jusqu'à ce qu'aucune protéine ne soit détectée dans le surnageant par spectroscopie UV-Vis. Enfin, les nanoparticules MIP/NIP ont été conservées dans 10 mL d'EtOH.

Les MIP/NIP synthétisés sur les nanoparticules de silice SiO_2 n'ont été utilisées que pour déterminer la composition chimique de la couche hybride formée après dissolution dans du NaOD à 1,5 mol/L, car la présence de Fe_3O_4 magnétique empêchait l'acquisition des spectres RMN ^{1}H. Pour cela, le protocole de synthèse des Fe_3O_4@MIP/NIP-5 et Fe_3O_4@MIP/NIP-6 a été reproduit sur les nanoparticules de silice SiO_2 pour obtenir les SiO_2@MIP/NIP-5 et SiO_2@MIP/NIP-6.

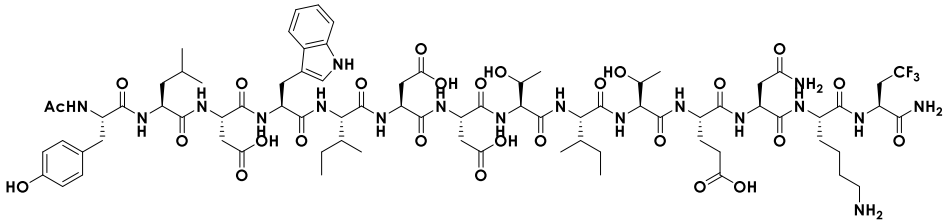
3.3.4 ELISA magnétique

Dans une plaque 96 puits avec un champ magnétique externe, 5 µg de nanoparticules Fe_3O_4@MIP-NIP ont été immobilisées (200 µL du stock de 25 µg/mL). Après 20 min, toutes les particules magnétiques ont été fixées au fond des puits grâce au support magnétique, puis le

surnageant a été retiré. Une solution de PBS-Tween 0,2% contenant 5% de BSA a été ajouté dans chaque puit et incubée pendant une nuit à 4°C pour saturer les sites aspécifiques. Le surnageant a été retiré et les puits ont été rincé trois fois avec le PBS-Tween 0,2%. Les mélanges de protéines ont été préparés en dissolvant la protéine modèle (de 0 à 2 µg/mL) avec une protéine compétitive (fixée à 0,5 µg/mL). Un volume de 100 µL de la protéine modèle seule ou en mélange avec la protéine compétitive a été ajouté dans chaque puits et incubé pendant 1h à température ambiante. Après retrait du surnageant, les puits ont été rincés six fois avec du PBS-Tween 0,2%. 100 µL d'une solution d'anticorps anti-protéine modèle (anti-CytC ou anti-Lyz) ont été ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 2h à température ambiante. Les puits ont ensuite été rincés six fois avec du PBS-Tween 0,2%. 100 µL d'une solution d'anticorps secondaire (anti-anti-CytC ou anti-anti-Lyz) ont été ajoutés et incubés pendant 1h à température ambiante. Après six lavages avec du PBS-Tween 0,2%, 100 µL de streptavidine marquée à la phosphatase alcaline ont été ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 1h à température ambiante. Après six rinçage avec du PBS-Tween 0,2%, 100µL de substrat pNPP (1 mg/mL) ont été ajoutés dans les puits et incubés pendant 30 min. La réaction a été arrêtées par addition de 50 µL de NaOH 1 mol/L et l'absorbance a été mesurée à 405 nm en utilisant un lecteur d'enzyme. La mesure a été réalisée trois fois en parallèle pour chaque échantillon.

3.4 Empreintes d'épitopes

Synthèse du composé B20



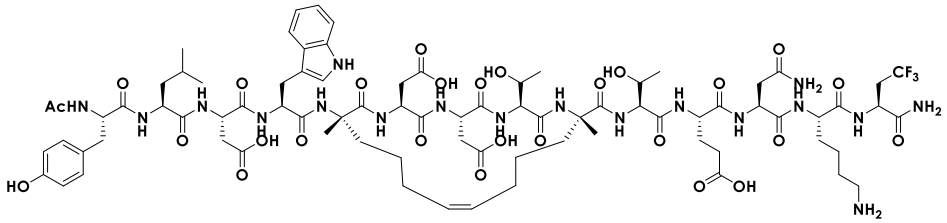
Ac-Tyr-Leu-Asp-Trp-Ile-Asp-Asp-Thr-Ile-Thr-Glu-Asn-Lys-Ala(CF_3)-NH_2

Le composé B20 a été synthétisé sur 500 mg de résine ChemMatrix RinkAmide (0,47 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Ala(CF_3)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 18h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après clivage et lavages à l'Et_2O, 249 mg de produit brut ont été obtenus, soit un rendement de 58% avec une pureté de 80%. Le produit brut sera utilisé sans purification pour la suite de la synthèse.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 2,57 min, m/z 903,7 $[M+2H]^{2+}$

MW^{th} = 1805,9 g/mol

Synthèse du composé B21

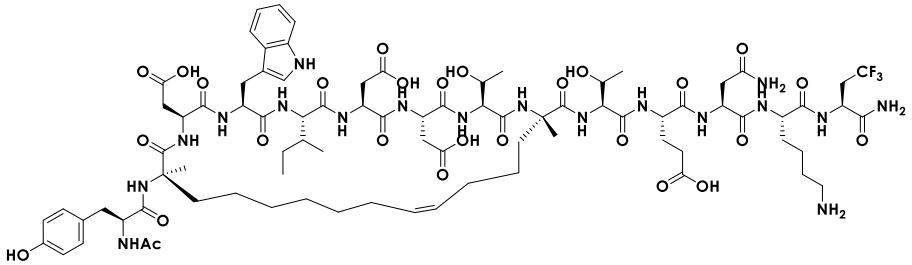


Ac-Tyr-Leu-Asp-Trp-(S5)-Asp-Asp-Thr-(S5)-Thr-Glu-Asn-Lys-Ala(CF_3)-NH_2

Le composé B21 a été synthétisé sur 500 mg de résine ChemMatrix RinkAmide (0,47 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Ala(CF_3)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 18h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA et les Fmoc-S5-OH (2 équivalents) ont été couplés une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après élongation, la métathèse a été réalisée pendant 15 min aux micro-ondes à 80°C dans 10 mL de DCE avec le catalyseur de Hoveyda-Grubbs (0,4 équivalents). Après clivage et lavages à l'Et_2O, le produit brut a été purifié sur HPLC préparative pour obtenir 73 mg de composé B21 avec un rendement de 17% et une pureté de 94%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 2,52 et 2,73 min, m/z 915,9 $[M+2H]^{2+}$
MW^{th} = 1829,9 g/mol

Synthèse du composé B22



Ac-Tyr-(R8)-Asp-Trp-Ile-Asp-Asp-Thr-(S5)-Thr-Glu-Asn-Lys-Ala(CF_3)-NH_2

Le composé B22 a été synthétisé sur 500 mg de résine ChemMatrix RinkAmide (0,47 mmol/g) en suivant le protocole 1, la Fmoc-Ala(CF_3)-OH (2 équivalents) a été couplée une fois pendant 18h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA et les Fmoc-S5-OH et Fmoc-R8-OH (2 équivalents) ont été couplés une fois pendant 2h en utilisant 2 équivalents d'HATU et 4 équivalents de DIEA. Après élongation, la métathèse a été réalisée pendant 15 min aux micro-ondes à 80°C dans 10 mL de DCE avec le catalyseur de Hoveyda-Grubbs (0,4 équivalents). Après clivage et lavages à l'Et_2O, le produit brut a été purifié sur HPLC préparative pour obtenir 22 mg de composé B21 avec un rendement de 5% et une pureté de 86%.

UPLC/MS (ESI+) : t_R = 2,92 min, m/z 936,6 $[M+2H]^{2+}$
MW^{th} = 1872,0 g/mol

3.5 MIP sur différents supports

3.5.1 Sur les puces QCM-d

Les expériences QCM-d ont été réalisées sur un instrument Q-sense explorer E1 (Biolin Scientific, Les Ulis, France), équipé d'une chambre d'écoulement QAFC 301. Les capteur en silice (SiO_2) a été monté dans la chambre QCM-d et de l'eau a été injecté sur le capteur avec un débit de 15 µL/min jusqu'à stabilisation du capteur (30 min). Une solution contenant 17 µmol de Si-Tyr-NH_2 et de Si-Leu-NH_2, 20 µmol de Si-Ser-NH_2, 4 µmol de Si-Arg-NH_2 et de Si-Glu-NH_2, 2,5 µmol de triéthanolamine et 0,2 µmol de CytC dans 1,8 mL d'un mélange eau/éthanol (88/22, v/v) a été préparée. Après 10 minutes d'incubation, le mélange a pu être injecté sur le capteur à 15 µL/min pendant 30 min. Le CytC a été éliminé du film par rinçage avec une solution de Glycine.HCl à 10 mmol/L (pH 1,7) pendant 20 min à 15 µL/min puis à l'eau milliQ. Le NIP a été préparé de la même façon sans le CytC. Les variations de fréquence et de dissipation à différentes harmoniques ont été utilisées pour appliquer le modèle viscoélastique afin d'estimer la masse surfacique de nanoparticules liées à la protéine immobilisée (ng/cm²). La fonction Smartfit du logiciel Dfind a permis d'utiliser ce modèle à partir des mesures réalisées.

3.5.2 Dans les capillaires

Les MIP en capillaires ont été synthétisés dans des capillaires de 20 cm de longueur effective et 30 cm de longueur totale avec un diamètre interne de 30 µm.

Synthèse du MIP – stratégie 2D

La protéine cible (en solution à 1 mg/mL dans le BGE) a été injectée dans le capillaire (10 min, 20 psi) pour être immobilisée. Une solution contenant 20 µmol de Si-Tyr-NH_2, 20 µmol de Si-Ser-NH_2 et de 20 µmol Si-Arg-NH_2 dans un mélange eau/EtOH/triéthylamine (87/11/2, v/v/v) a été préparée et injectée dans le capillaire (10 min, 20 psi), qui a été maintenu dans l'appareil pendant 18h à 25°C. Le capillaire a ensuite été lavé plusieurs fois (éthanol, éthanol/eau, eau) puis la protéine a été décrochée du capillaire avec une solution d'HCl 0,1 mol/L.

Préparation du monolithe

Une solution de MTMS (méthyltriméthoxysilane) a été pré-hydrolysée dans un mélange MeOH/HNO_3 1 mol/L (62/38, v/v) à 5°C pendant 2h avant d'être injectée dans le capillaire (50 psi, 10 min). Une fois l'injection terminée, le capillaire a été maintenu dans l'appareil pendant 18h à 37°C avant d'être lavé au méthanol. La porosité du capillaire a été vérifiée par microscopie et par circulation de solvant dans le capillaire.

Synthèse du MIP – stratégie 3D

La protéine cible (en solution à 1 mg/mL dans le BGE) a été injectée dans le capillaire (10 min, 50 psi) pour être immobilisée. Une solution contenant 20 µmol de Si-Tyr-NH_2, 20 µmol de Si-Ser-NH_2 et de 20 µmol Si-Arg-NH_2 dans un mélange eau/EtOH/triéthylamine (87/11/2, v/v/v) a été préparée et injectée dans le capillaire (10 min, 50 psi), qui a été maintenu dans l'appareil pendant 18h à 25°C. Le capillaire a ensuite été lavé plusieurs fois (éthanol, éthanol/eau, eau) puis la protéine est décrochée du capillaire avec une solution d'HCl 0,1 mol/L.