

Les peptides de venins pour l'imagerie du cancer pulmonaire

Résumé De nombreux cancers, et le cancer pulmonaire non à petites cellules en particulier, sont associés à une perturbation des mécanismes contrôlant l'homéostasie ionique. Ceci est dû notamment à un dysfonctionnement et/ou une surexpression de nombreux canaux ioniques tels que certains sous-types de canaux sodiques, calciques et potassiques, de canaux sensibles au pH (ASIC) ou encore de récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine. L'activation de ces canaux ioniques joue un rôle important dans l'agressivité des cellules cancéreuses et l'invasion tumorale, leur surexpression semblant être corrélée avec l'apparition de métastases. Bien que des techniques d'imagerie médicale telles que la radiographie, la tomodensitométrie (TDM), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou la tomographie par émission de positons (TEP) soient couramment utilisées dans la caractérisation anatomique et métabolique du cancer pulmonaire, certaines de leurs limitations nécessitent le développement de nouvelles sondes d'imagerie plus spécifiques des cibles moléculaires surexprimées au sein des adénocarcinomes pulmonaires. Certains de ces canaux ioniques sembleraient être d'excellents biomarqueurs du cancer du poumon, à condition de pouvoir les détecter et les quantifier le plus précocement possible. Présentes dans les venins d'animaux, les toxines peptidiques, qui ont des propriétés pharmacologiques uniques, sont bien connues pour cibler sélectivement et avec une forte affinité ces canaux ioniques. L'évaluation de ces biomarqueurs du cancer pulmonaire serait possible grâce à une synthèse chimique et un marquage maîtrisé par chimie « click » de ces peptides avec des sondes fluorescentes ou radioactives.

Mots-clés Biomarqueurs, cancer pulmonaire, diagnostic, toxines, canaux ioniques, synthèse peptidique, imagerie médicale.

Abstract **Venom peptides for lung cancer imaging**

Many cancers, and the non-small cell lung cancer in particular, are associated with a disturbance of the mechanisms controlling ion homeostasis due especially to dysfunction and/or overexpression of many ion channels such as certain subtypes of sodium, calcium and potassium channels, pH-sensitive channels (ASICs) or nicotinic acetylcholine receptors. The activation of these ion channels plays an important role in cancer cell aggressiveness and tumor invasion, their overexpression seeming to be correlated with the appearance of metastases. While imaging techniques such as chest X-ray, computed tomography (CT) scan, magnetic resonance imaging (MRI) and positron emission tomography (PET) scan are commonly employed for the anatomical characterization of lung cancer, certain limitations necessitate the development of new imaging probes that are more specific to overexpressed molecular targets in lung adenocarcinomas. Some of these ionic channels can be potent biomarker of interest for lung cancer if some specific ligand associated with medical imaging can be explored. Present in animal venoms, peptide toxins, which have unique pharmacological properties, are well known to act selectively and with high affinity on these ion channels. Therefore, a promising solution towards the development of new lung cancer biomarkers appears to be the chemical synthesis of these toxins allowing them to be labeled by "click" chemistry using various fluorescent or radioactive probes.

Keywords Biomarker, lung cancer, diagnosis, toxins, ion channels, peptide synthesis, imaging.

Le diagnostic précoce, un premier pas décisif vers un traitement efficace

Un cancer non diagnostiqué ou non détecté ne peut être un cancer soigné. D'après l'Organisation mondiale de la santé [1] et l'Institut national du cancer [2], le cancer est actuellement la deuxième cause de mortalité dans le monde (près de 10 millions de décès en 2020), après les maladies cardiaques. Le cancer du poumon, en particulier, touche plus de 2 millions de personnes et est responsable du décès de près de 1,8 million de personnes, ce qui en fait le cancer le plus mortel au niveau mondial. La cause principale est liée au tabagisme (80 à 90 % des cas). Il touche majoritairement les hommes (65 %), mais l'augmentation de la consommation de tabac chez les femmes, au cours des vingt dernières années, accroît leur nombre de cas de 5 % par an (*figure 1*). D'un point de vue général, l'incidence ne cesse d'augmenter pour atteindre 25,0 et 22,4 % de cas en plus à l'horizon 2040, respectivement en France et en Europe (*figure 1B*). Le cancer du poumon

se distingue selon deux types : le premier (85 % des cas) est le cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC) et le second (15 % des cas) est le cancer pulmonaire à petites cellules (CPPC).

La forte mortalité des patients atteints d'un cancer du poumon est due à l'agressivité de ce type de cancer. Effectivement, plus de la moitié de ces personnes meurent dans l'année suivant le diagnostic car seulement 16 % des cancers pulmonaires sont diagnostiqués à un stade précoce. Cela représente un taux moyen de survie à cinq ans qui n'est que de 18,6 %. Actuellement, les principales méthodes de diagnostic sont non invasives et consistent en un examen clinique, suivi d'une radiographie du thorax complétée généralement par un scanner thoracique et d'une imagerie TEP (tomographie par émission de positons) (*figure 1C*). D'autres méthodes plus invasives, comme une fibroscopie bronchique ou une biopsie, existent également mais ne sont prescrites qu'en cas de forte suspicion, notamment pour déterminer le sous-type de tumeur et ainsi choisir le traitement le plus adapté. Même si le

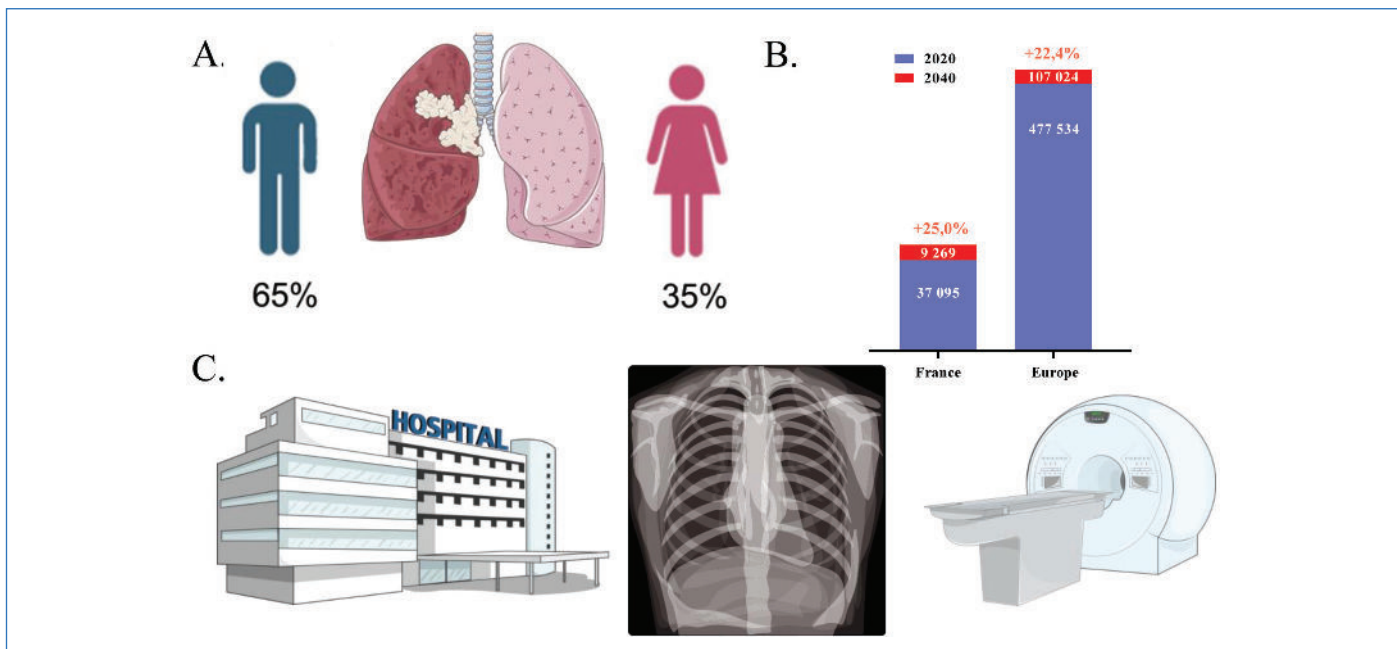


Figure 1 - Prévalence et techniques de diagnostic du cancer pulmonaire : A) pourcentage d'hommes et de femmes touchés par un cancer pulmonaire ; B) nombre estimé de nouveaux cas de cancer du poumon de 2020 à 2040 en Europe et en France ; C) techniques de diagnostic employées pour détecter un cancer pulmonaire. De gauche à droite : examen clinique, radiographie et TEP-scan. (D'après [1-2]).

TEP-scan permet de repérer la localisation et la taille de la tumeur, il n'indique néanmoins ni le type cellulaire touché, ni l'atteinte potentielle des ganglions par les cellules cancéreuses (métastases).

À l'heure actuelle, la technique de référence de diagnostic en oncologie clinique repose sur un couplage entre une tomodensitométrie (TDM) et une imagerie TEP [3]. Elle intervient à tous les stades du diagnostic, de la localisation pré-chirurgicale jusqu'aux bilans, qu'ils soient post-chirurgicaux ou au cours de la chimiothérapie pour identifier une récurrence éventuelle. Cette technique (TDM-TEP) consiste en l'administration du 18-fluoro-2-désoxy-D-glucose ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$), un dérivé du glucose marqué par un atome radioactif émetteur de positons, le fluor-18 (^{18}F). Le ^{18}F est l'élément radioactif le plus souvent employé car il possède plusieurs avantages dont une demi-vie de 109,8 minutes, une forte décroissance en positon (96,9 %), un parcours moyen dans l'eau de 2,3 mm, et surtout il peut être produit facilement en routine. Le $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ est un radioligand métabolique reposant sur sa consommation en excès par les cellules cancéreuses due à l'augmentation de leur activité glycolytique (effet Warburg). À l'heure actuelle, la combinaison de la TDM avec une imagerie TEP, qui apporte l'information anatomique, possède la plus grande sensibilité et la plus haute spécificité de détection d'un cancer.

Cependant, la TEP-FDG présente certaines limitations, notamment en induisant des faux positifs ou des faux négatifs. Les faux positifs sont majoritairement liés à des lésions infectieuses ou à des processus inflammatoires, qui pour répondre aux besoins énergétiques de la phagocytose et de la sécrétion de cytokines conduisent à un métabolisme exacerbé fortement révélé par le $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$. Les faux négatifs peuvent être dus à certains types de CPNPC (broncho-alvéolaire), caractérisés par une faible capture de glucose, ou encore à la faible taille des lésions conduisant à une sous-estimation de la fixation de $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ [3]. C'est dans ce cadre que la découverte de nouveaux outils plus spécifiques et plus performants est nécessaire afin de permettre une détection précoce et précise du cancer pulmonaire, en particulier du CPNPC.

Les canaux ioniques comme biomarqueurs tumoraux

De nouvelles données génétiques émergent depuis quelques années, notamment avec la caractérisation du profil génétique particulier des cellules cancéreuses. En effet, les cellules cancéreuses effectuent un remodelage génétique important pour permettre leur survie. Ce remodelage conduit entre autres à une résistance à la mort cellulaire, à une activation de l'angiogenèse, à l'invasion cellulaire, à des métastases et à la promotion de l'inflammation. Tous ces mécanismes évitent la dégradation des cellules cancéreuses par le système immunitaire [4]. Ils impliquent également la sous-expression et/ou la surexpression de certaines protéines, dont les canaux ioniques. Ce sont des protéines transmembranaires qui, en permettant l'échange d'ions au travers de la membrane cellulaire, sont essentielles à l'homéostasie ionique et, de ce fait, sont impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques.

Il existe une grande diversité de canaux ioniques ayant une conductance hautement sélective pour une, voire quelques espèce(s) ionique(s) donnée(s) (notamment Na^+ , Ca^{2+} , K^+ et Cl^-) et classés principalement selon leurs mécanismes d'activation (changement conformationnel de la protéine suite à l'action de différents types d'effecteurs) et leurs homologies structurales. En particulier, il est possible de distinguer les canaux activés par le potentiel de membrane (principalement Na_v , K_v et Ca_v), les canaux K activés par le calcium intracellulaire (K_{Ca}), les canaux activés par les protons (ASIC, « acid sensitive ion channels ») et les canaux activés par des ligands (LGIC, « ligand-gated ion channels »). Les canaux activés par le potentiel de membrane, tout comme les canaux K_{Ca} , sont composés de six segments hydrophobes transmembranaires regroupés en domaines et reliés entre eux par des boucles intra- et extracellulaires. Ils sont essentiels à la communication de la plupart des cellules excitables de vertébrés et d'invertébrés, de par leur rôle important dans la genèse et la propagation des potentiels d'action et dans le maintien du potentiel de

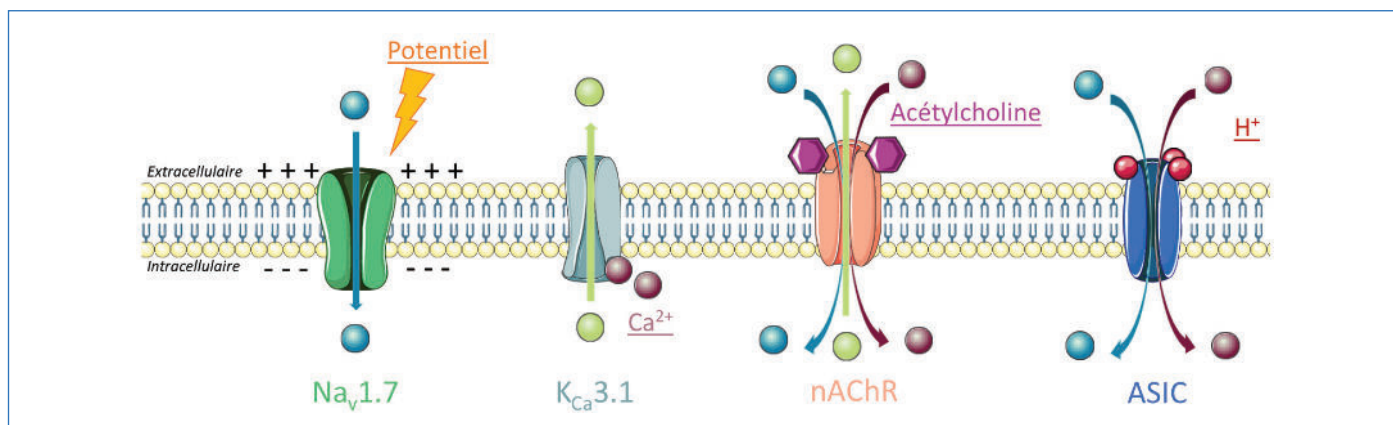


Figure 2 - Représentation schématique de certains canaux ioniques transmembranaires surexprimés dans les CPNPC. Les ronds de couleur bleue, verte, marron et rouge représentent respectivement les ions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et H^+ . Les hexagones violets représentent l'acétylcholine. Les activateurs de ces canaux sont soulignés.

repos [5]. Les ASIC, sélectifs des ions Na^+ et Ca^{2+} , ont une structure trimérique (homomères ou hétéromères) incluant deux segments transmembranaires par sous-unité. Ils sont exprimés au niveau de tissus neuronaux et non neuronaux, dans de nombreuses conditions physiopathologiques où le pH est perturbé [6]. Les LGIC comprennent les récepteurs excitateurs, sélectifs des cations (principalement Na^+ et Ca^{2+} , mais également K^+), tels que ceux nicotiques de l'acétylcholine (nAChR, « nicotinic acetylcholine receptors »), de la sérotonine (5HT₃), ionotropique du glutamate (NMDA, AMPA, kaïnate) et ionotropique de l'ATP (P2X), et les récepteurs inhibiteurs, sélectifs des anions (Cl^-), tels que ceux de l'acide γ -aminobutyrique (GABA_A et GABA_C) et de la glycine. Les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, de la sérotonine, du GABA et de la glycine ont des structures pentamériques constituées de quatre segments transmembranaires. Ils interviennent principalement dans la transmission synaptique au niveau du système nerveux et à la jonction neuromusculaire, mais l'expression de certains LGIC dans des cellules non excitables est évocatrice de fonctions supplémentaires [7]. Une surexpression importante de divers canaux ioniques a été mise en évidence dans de nombreux cancers [4]. Dans les CPNPC, il est possible de noter une surexpression du sous-type 1.7 de canaux sodium dépendant du potentiel ($\text{Na}_v1.7$), du sous-type 3.1 de canaux K_Ca ($\text{K}_{Ca3.1}$), des sous-types $\alpha 7$ et $\alpha 9/\alpha 10$ de nAChR et des ASIC (figure 2).

Le sous-type $\text{Na}_v1.7$ a été décrit comme étant spécifiquement exprimé dans les cellules H460, une lignée cancéreuse pulmonaire très agressive [8]. Ce sous-type serait associé à l'invasion tumorale, ce qui en fait une cible de choix pour une stratégie de diagnostic [9]. Une autre cible prometteuse dans le cadre de la détection du cancer pulmonaire est le sous-type $\text{K}_{Ca3.1}$ dont l'expression a été montrée comme étant augmentée dans les CPNPC et qui serait impliqué dans la perte de l'adhésion cellulaire, et donc dans le processus de métastase [10]. Il convient de souligner que ce sous-type a récemment été considéré comme un biomarqueur des cellules cancéreuses pulmonaires grâce à l'utilisation de petites molécules synthétiques fluorescentes ou radioactives [11]. L'acidité du micro-environnement tumoral explique la surexpression et l'activation des ASIC. Ainsi, ces canaux ont été montrés comme étant impliqués dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules de divers types de cancers [12]. Finalement, une surexpression des sous-types $\alpha 7$ (homopentamères) et $\alpha 9/\alpha 10$ (hétéropentamères) de nAChR a été décrite dans les cellules cancéreuses. Ces récepteurs interviendraient

dans certains mécanismes comme la prolifération et la migration des cellules, l'inhibition de l'apoptose, ou encore l'angiogenèse, leur surexpression étant corrélée avec un changement d'activité cellulaire [13].

Il apparaît donc que la surexpression et l'activation de certains canaux ioniques jouent un rôle important dans l'agressivité des cellules cancéreuses, l'invasion tumorale et l'apparition de métastases [10]. Les propriétés biophysiques de ces canaux, associées à leur implication dans les mécanismes cancéreux et à leur accessibilité au niveau membranaire, en font de véritables candidats comme biomarqueurs tumoraux potentiels, en particulier dans les CPNPC. Ils représentent donc des cibles attractives pour de nouveaux agents sélectifs ayant une propension limitée aux effets hors cible.

Les toxines peptidiques, des outils de ciblage originaux

Les toxines peptidiques, présentes dans les venins d'animaux, constituent une librairie naturelle de millions de molécules, sélectionnées au cours de l'évolution pour leur capacité à se fixer, avec une forte affinité et une grande sélectivité, sur leurs cibles moléculaires et, en particulier, sur les différents sous-types de canaux ioniques. Plusieurs milliers de ces toxines ont été décrites dans la littérature depuis les quarante dernières années. Les toxines peptidiques présentent plusieurs avantages. Tout d'abord, leur taille est relativement modeste (quelques dizaines de résidus d'acides aminés), ce qui permet de les synthétiser et de les modifier chimiquement de façon contrôlée. De plus, leurs propriétés pharmacocinétiques sont idéales pour des agents d'imagerie comme une clairance rapide, une forte affinité, et leur grande sélectivité exempte toute toxicité [14]. Ces particularités en font des candidats particulièrement prometteurs pour l'imagerie de biomarqueurs tumoraux. Les toxines peptidiques peuvent être catégorisées par leur structure, l'un des critères étant le repliement de la molécule par la création de ponts disulfure. En effet, la présence de cystéine dans les séquences des toxines permet leur repliement. Cette combinaison de ponts disulfure est spécifique de chaque structure peptidique avec un nombre de ponts disulfure pouvant aller de 1 à 5. Il est important de souligner que leur activité pharmacologique est corrélée à l'acquisition de leur structure tridimensionnelle.

De nombreuses toxines, hautement spécifiques et affines de certains canaux ioniques identifiés comme biomarqueurs tumoraux potentiels, ont été mises en évidence et étudiées











| Toxine | Organisme | Séquence | Structure 3D | Cible | IC ₅₀ (nM) |
|-----------------|---|-----------------------------|--|------------------------|---|
| Huwentoxine-IV | <i>Cyriopagopus schmidti</i>  | C-C-CC-C-C 35 AA |  | hNa _v 1.7 | 9,9 ¹ |
| Charybdotoxine | <i>Leiurus quinquestriatus</i>  | C-C-C-C-C-C-C 37 AA |  | hK _{Ca} 3.1 | 5,0 ² |
| Mambalgine-1 | <i>Dendroaspis polylepis</i>  | C-C-C-C-C-CC-C 56 AA |  | hASIC1b hASIC1a+1b | 192,0 ³ 72,0 ³ |
| α-IMI | <i>Conus imperialis</i>  | CC-C-C 11 AA |  | hnAChR α7 | 191,0 ⁴ |
| α-Bungarotoxine | <i>Bungarus multicinctus</i>  | C-C-C-C-C-C-C-CC-C 74 AA |  | hnAChR α7 α9/α10 | 0,8 ⁵ 32,0 ⁶ |

Tableau - Caractéristiques des toxines peptidiques spécifiques de certains canaux ioniques identifiés comme biomarqueurs tumoraux potentiels. AA : acide aminé. IC₅₀ : concentration bloquant 50 % des canaux. H : humain. ¹[15], ²[16], ³[17], ⁴[20], ⁵[21], ⁶[22].

(voir tableau). Ces toxines ont été sélectionnées pour leurs profils pharmacologiques pertinents sur leur cible respective, mais aussi pour leur facilité de synthèse et de modification ; elles apparaissent comme les meilleurs candidats d'outil d'imagerie. Il est possible de citer plusieurs d'entre elles présentant un fort potentiel translationnel au niveau clinique :

- La première toxine, l'huwentoxine-IV (HwtX-IV), est issue du venin de *Cyriopagopus schmidti*, une araignée du sud de la Chine. Cette toxine ICK (« inhibitor cystine knot ») possède trois ponts disulfure et est décrite comme un bloqueur spécifique du sous-type Na_v1.7 humain avec une concentration bloquant 50 % des canaux (IC₅₀) de l'ordre de 10 nM. Elle se fixe au niveau de la boucle extracellulaire qui relie les segments transmembranaires 3 et 4 du domaine II du canal sodium [15].

- La charybdotoxine est une toxine provenant du venin du scorpion *Leiurus quinquestriatus*. Cet animal se rencontre principalement en Égypte et au Soudan et possède le venin le plus toxique qui soit pour un scorpion. Ce venin est composé principalement de neurotoxines dont la charybdotoxine. Cette toxine contient trois ponts disulfure, formant une structure alpha/beta, et possède une affinité de l'ordre du nanomolaire vis-à-vis du canal K_{Ca} [16]. Elle se fixe au niveau du pore du canal, empêchant les ions K⁺ de sortir de la cellule.

- La mambalgine est une toxine à trois doigts comportant quatre ponts disulfure et qui est présente dans le venin de *Dendroaspis polylepis*, un serpent habitant dans les pays d'Afrique subsaharienne. Son venin contient des neurotoxines puissantes, ce qui en fait un venin léthal pour un adulte humain environ 6 heures après la morsure. La mambalgine est spécifique des ASIC avec une IC₅₀ de 70 à 200 nM pour les différents sous-types [17]. La structure 3D de cette toxine a été résolue par cristallographie et ses propriétés ont été caractérisées [18]. Cependant, c'est grâce à la psalmotoxin-1, une toxine de scorpion, que les ASIC ont été montrés comme étant impliqués dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses du sein [12]. Plus récemment, il a été montré que le ciblage par la mambalgine-2 d'hétérotrimères incluant

ASIC-1a, marqueur d'oncogénicité cellulaire, est prometteur pour la conception de nouvelles oncothérapies [19]. La mambalgine bloque la charnière entre les hélices α4 et α5 du canal afin d'inhiber son fonctionnement [19].

- L'α-conotoxine IMI est produite par le cône marin *Conus imperialis* localisé dans les récifs de coraux au niveau du sud et de l'est de l'Afrique et de la Polynésie. C'est un peptide de onze acides aminés incluant deux ponts disulfure, ce qui lui confère une forme globulaire. Il possède une grande spécificité et une IC₅₀ de l'ordre d'une centaine de nanomolaires pour le sous-type α7 nAChR [20]. L'α-conotoxine IMI est un antagoniste compétitif qui se fixe sur le site de fixation de l'acétylcholine, inhibant le fonctionnement du nAChR α7.

- L'α-bungarotoxine fait partie d'un des nombreux peptides contenus dans le venin du serpent *Bungarus multicinctus*. Ce serpent rayé se retrouve dans une grande partie de la Chine centrale mais aussi en Asie du Sud-Est. L'α-bungarotoxine est composé de 74 acides aminés, avec cinq ponts disulfure, et son repliement s'organise sous la forme d'une structure en trois doigts. Elle possède une très forte affinité pour les nAChR musculaires et neuronaux (α7 et α9/α10) avec une IC₅₀ de 0,8 nM pour α7 [21] et 32,0 nM pour α9/α10 [22]. L'α-bungarotoxine se fixe elle aussi au niveau du site de liaison de l'acétylcholine.

Depuis quelques années, de plus en plus d'études décrivent l'utilisation de toxines peptidiques comme agents originaux de ciblage de biomarqueurs tumoraux, que ce soit dans le développement de systèmes de détection, d'outils de diagnostic ou encore la découverte de nouveaux médicaments. En particulier, les applications potentielles des toxines de scorpion dans le traitement du cancer ont été rapportées [23]. Un exemple remarquable est celui de la chlorotoxine (ClTx). Ce peptide, issu du venin du scorpion jaune israélien *Leiurus quinquestriatus*, est actuellement en phase II d'essais cliniques pour des applications d'imagerie du glioblastome [24-25]. La ClTx est un peptide de 36 acides aminés comportant huit cystéines qui forment quatre ponts disulfure. La ClTx exerce une double action : la première est sa fixation sur les

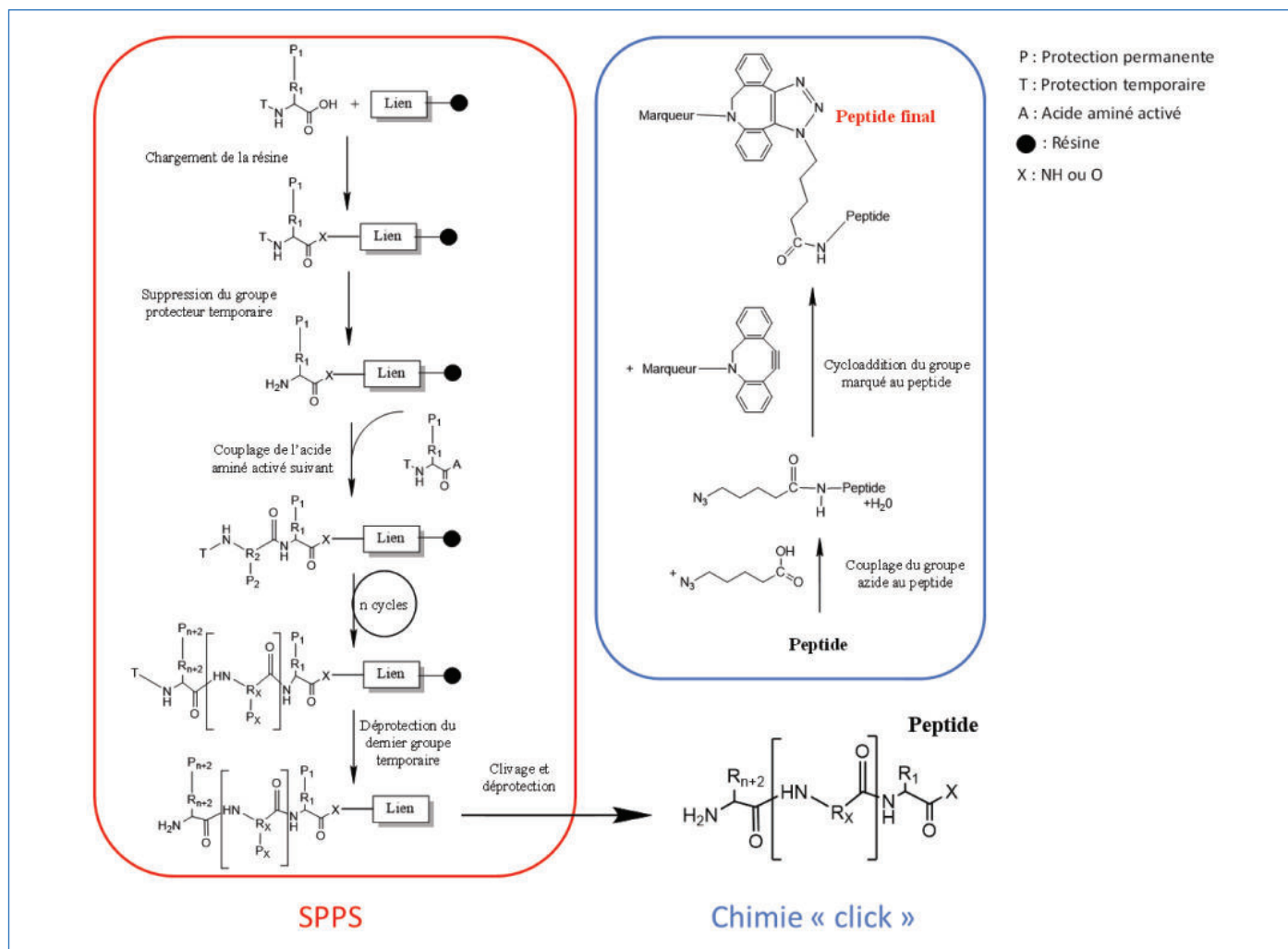


Figure 3 - Étapes de la SPPS couplée à la chimie « click » pour l'obtention d'une toxine peptidique marquée.

tumeurs en interagissant avec, et en bloquant, les canaux chlore présents sur les cellules cancéreuses, et la seconde est une activité anti-angiogénique en fixant une métalloprotéase (MMP2) et/ou la protéine annexine A2, facteurs impliqués dans la migration cellulaire. La CITx, sous une forme fluorescente ou radioactive, a déjà été utilisée avec succès comme outil d'imagerie des glioblastomes, permettant une résection chirurgicale contrôlée [26].

La synthèse peptidique de toxines marquées

Une des étapes primordiales pour l'utilisation de toxines peptidiques comme agents d'imagerie de biomarqueurs tumoraux est leur synthèse chimique. Pour obtenir des quantités relativement importantes, la synthèse peptidique sur phase solide (SPPS) est classiquement utilisée. Cette technique a été découverte en 1963 par Merrifield qui a été récompensé en 1984 par un prix Nobel [27]. Elle présente de nombreux avantages dont celui de pouvoir utiliser de larges excès de réactifs dans chaque réaction, puis de les éliminer par simple filtration.

Les différentes étapes de la SPPS sont la protection des fonctions non engagées dans la liaison peptidique, l'activation de la fonction acide pour former la liaison peptidique, et le contrôle de l'épimérisation. L'élongation de la synthèse s'effectue ici « pas à pas », de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale, et non pas par l'assemblage de plusieurs fragments au cours duquel le risque d'épimérisation

est plus important. L'accroissement de la chaîne peptidique se fait donc par la création d'une liaison amide entre l'acide carboxylique d'un acide aminé (AA) et la fonction amine de l'AA précédent fixé sur la résine. Afin d'éviter une simple réaction acido-basique, la fonction acide est activée pour qu'elle puisse réagir avec la fonction amine. La figure 3 illustre les différentes étapes d'un cycle de synthèse.

Le choix de la résine pour l'étape de fixation du premier AA est important car celle-ci doit avoir une bonne solvatisation dans les milieux organiques utilisés [N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP)/pipéridine]. L'extrémité C-terminale du premier AA va former une liaison qui ne subira une solvolysse qu'à la fin de la synthèse. Cette liaison est soit acide, soit amide, en fonction de la résine employée.

Pour l'étape de protection, il existe deux stratégies de SPPS qui se différencient par le groupement protecteur de la fonction amine terminale : l'utilisation de tertibutyloxycarbonyle (Boc) comme protection acido-labile, éliminé par de l'acide trifluoroacétique (TFA), ou l'utilisation de fluorèneméthoxycarbonyle (Fmoc), déprotégé en conditions basiques en présence de pipéridine. C'est la seconde stratégie qui est la plus couramment employée. La fonction NH_2 de l'AA à greffer est protégée, n'autorisant ainsi que la réaction entre l'amine terminal de l'AA « i » et l'acide carboxylique terminal actif de l'AA « i+1 ». Les fonctions réactives des chaînes latérales sont aussi protégées et ce, pendant toute la synthèse, avec des groupements dits « orthogonaux ». Ces protections doivent répondre à plusieurs critères dont la stabilité, leur ajout et une

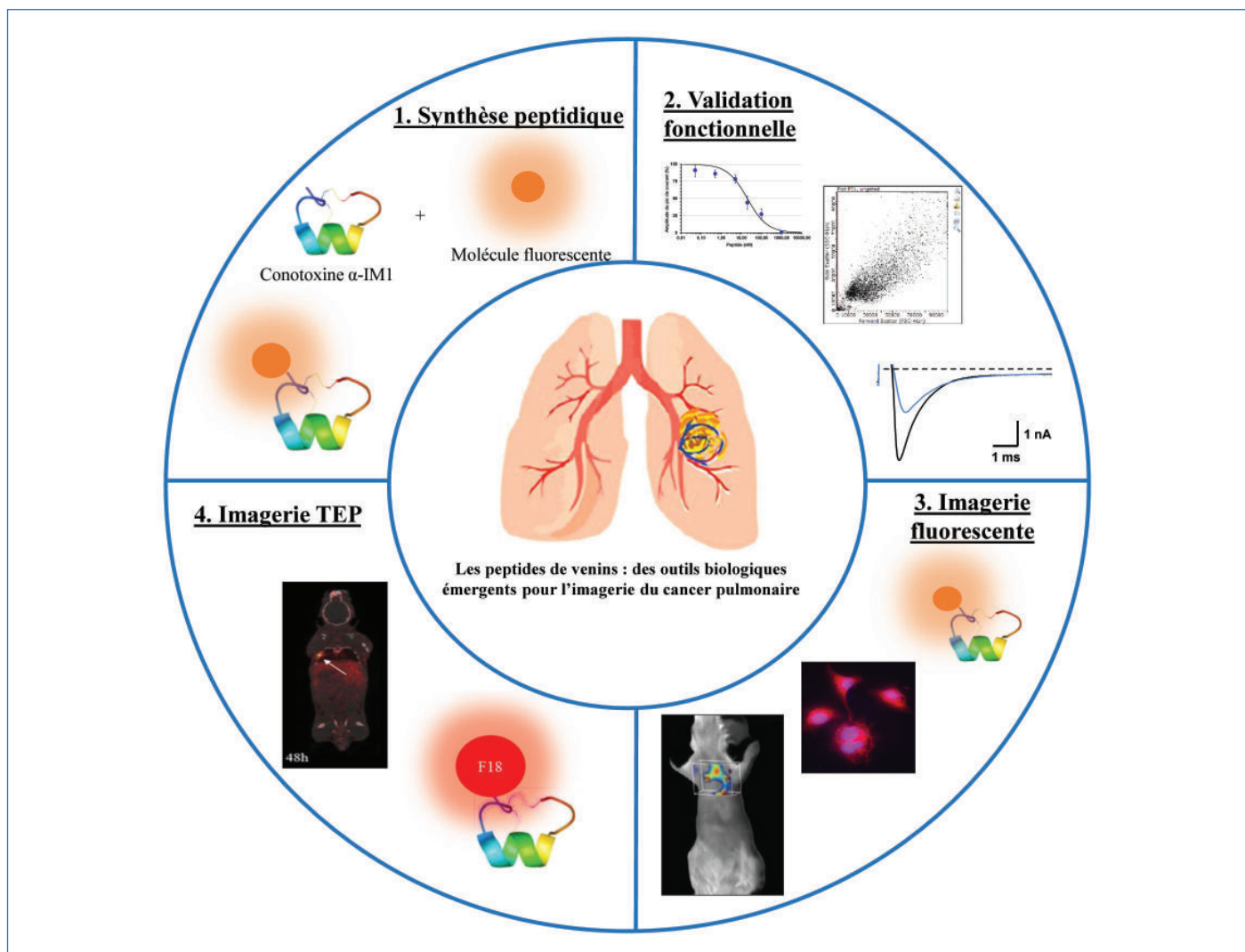


Figure 4 - Démarche expérimentale du projet développé pour concevoir de nouveaux outils d'imagerie de biomarqueurs tumoraux.

élimination facile qui ne doit pas entraîner de réaction secondaire. Il existe plusieurs groupements orthogonaux spécifiques de certains AA dont les plus utilisés sont le tertibutyle (tBu), le triphénylméthyle (Trt), le 2,2,4,6,7-pentaméthylidihydrobenzofuran-5-sulfonyle (Pbf) ou encore le tertibutyloxy-carbonyl (tBoc). Certains AA ne nécessitent pas de protection grâce à leurs chaînes latérales carbonées.

Pour l'étape d'activation de l'acide carboxylique pour le couplage peptidique, la fonction carboxyle de l'AA à coupler doit être transformée en une espèce plus réactive et plus électrophile. De nombreux réactifs de couplage existent dont le N-N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) qui a souvent été utilisé, mais le tétraméthyluronium hexafluorophosphate (HCTU), qui piège la O-acylurée, est plus souvent employé. Dans un premier temps, une base déprotège l'acide carboxylique, permettant au carboxylate d'attaquer le carbone de l'HCTU. La fonction amine de l'AA à coupler réagit avec cet ester activé pour former la liaison amide.

L'étape suivante consiste à déprotéger le groupement Fmoc en milieu basique (pipéridine à 20 % dans du NMP) par β -élimination. L'orthogonalité est le principal avantage de la stratégie Fmoc/tBu, concept permettant une plus grande flexibilité pour les stratégies complexes de synthèse.

Finalement, la dernière étape consiste à décrocher le peptide synthétisé de la résine. En effet, les résines sont sensibles aux conditions acides. Cette dernière étape de clivage du peptide au niveau de la résine se fait donc par l'intermédiaire de TFA

qui contient des composés capables de piéger les carbocations très réactifs générés lors de la déprotection des chaînes latérales (groupements orthogonaux). Une fois le peptide linéaire obtenu, il est purifié par HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance). Cette méthode consiste à séparer les produits sur une colonne en fonction d'un gradient d'un mélange d'éluant. Les molécules sont séparées selon leur affinité pour le ligand greffé à la silice de la colonne.

Le produit purifié est ensuite replié. En effet, comme mentionné précédemment, le repliement des toxines peptidiques est indispensable à l'acquisition de leur structure tridimensionnelle et de leur fonction biologique. La formation des ponts disulfure résulte d'une oxydation contrôlée entre les résidus cystéine. Elle peut être générée par différents facteurs comme l'oxygène, le diméthylsulfoxyde (DMSO), ou encore des couples oxydo-réducteurs tels que le glutathion réduit et oxydé. Le peptide est purifié une seconde fois pour ne garder que le peptide replié.

Le marqueur peut être alors « cliqué » par la dibenzylcyclooctyne amine (DBCO). Pour cela, il est nécessaire de coupler le peptide portant un groupement azoture pour ensuite ajouter le marqueur par une cyclo-addition. Ces réactions sont rapides et possèdent un haut taux de succès, ce qui facilite le marquage des peptides. Le brut de synthèse est ensuite obtenu après une précipitation dans l'éther, une solubilisation puis une lyophilisation. La toxine finale synthétique, obtenue sous forme de poudre, est ensuite analysée par spectrométrie

de masse, mais aussi fonctionnellement par des expériences d'électrophysiologie, de pharmacologie par tri cellulaire et d'imagerie.

Vers la conception de nouveaux biomarqueurs tumoraux

L'originalité du projet développé au sein de notre équipe consiste à exploiter les propriétés pharmacologiques uniques de toxines peptidiques vis-à-vis de canaux ioniques exprimés au niveau des CPNPC et de développer des agents d'imagerie utiles dans le suivi de ces pathologies (figure 4). Il est à noter que ces peptides seront utilisés à de très faibles concentrations, compte tenu de la forte sensibilité de l'imagerie TEP-scan, et n'exerceront donc pas de toxicité *in vivo*. Ce projet pluridisciplinaire permettra d'avoir un contrôle sur toutes les étapes, en commençant par la synthèse peptidique et l'avantage de la chimie « click » qui facilite l'utilisation d'un large panel de marqueurs fluorescents ou radioactifs. Différents marqueurs fluorescents seront étudiés dans un premier temps, avant d'explorer ensuite les marqueurs radioactifs comme le ^{18}F et valider le marquage des toxines étudiées en TEP-scan.

Après avoir évalué l'expression des cibles dans des lignées tumorales et des biopsies par la quantification des gènes exprimés par RT-qPCR (« quantitative reverse transcription polymerase chain reaction »), leur validation fonctionnelle sera effectuée. Cette validation fonctionnelle des cibles, qui sont des canaux ioniques, se fera par la technique d'électrophysiologie qui permet d'accéder spécifiquement aux courants ioniques transitant par ces canaux. Les effets des toxines peptidiques synthétisées avec et sans marqueurs seront étudiés sur ces courants pour estimer leur affinité (IC_{50}) vis-à-vis des canaux ioniques et s'assurer que les propriétés biologiques de ces toxines ne sont pas notablement affectées par les marquages fluorescents ou radioactifs. L'affinité des toxines peptidiques vis-à-vis des canaux ioniques sera également estimée par tri cellulaire, une technique permettant de distinguer les populations de cellules en fonction de l'intensité de leur fluorescence due à la fixation des toxines fluorescentes sur leurs cibles membranaires. Des expériences de compétition entre les toxines fluorescentes et celles non marquées permettront de déterminer les pourcentages de population cellulaire fixant spécifiquement les toxines et les taux de fixation. Cette fluorescence sera également mise en évidence par des techniques d'imagerie, comme en particulier la microscopie confocale qui permettra en outre de valider la localisation des toxines peptidiques au niveau membranaire. Finalement, la preuve de concept de ce projet sera validée par de l'imagerie *in vivo* de souris immunocompétentes ou immunodéficientes xénotreffées avec, dans un premier temps, des lignées cellulaires, et dans un second temps des modèles PDX (xénotrefe dérivée de patient). La finalité du projet est d'élaborer les meilleurs outils possibles d'imagerie pour détecter de façon précoce et sélective les cellules cancéreuses.

[1] <https://gco.iarc.fr>

[2] www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequents/Cancer-du-poumon

[3] F. Soumia, A. Leila, R. Mohamed, H. Laila, E., Mustapha, Intérêt de la TEP-TDM dans le cancer broncho-pulmonaire primitif non à petite cellule, *Pan. Afr. Med. J.*, **2017**, 28, 289.

[4] N. Prevarskaya, R. Skryma, Y. Shuba, Ion channels in cancer: are cancer hallmarks oncochannelopathies?, *Physiol. Rev.*, **2018**, 982, p. 559-621.

[5] F.H. Yu, W.A. Catterall, The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis, *Sci. STKE*, **2004**, 253, re15.

[6] B. Cristofori-Armstrong, L.D. Rash, Acid-sensing ion channel (ASIC) structure and function: insights from spider, snake and sea anemone venoms, *Neuropharmacology*, **2017**, 127, p. 173-184.

[7] S.P. Alexander *et al.*, The concise guide to pharmacology 2017/18: ligand-gated ion channels, *Br. J. Pharmacol.*, **2017**, 174, p. S130-159.

[8] S. Roger *et al.*, Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2007**, 394, p. 774-786.

[9] S.P. Fraser *et al.*, Regulation of voltage-gated sodium channel expression in cancer: hormones, growth factors and auto-regulation, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **2014**, 369, 20130105.

[10] E. Bulk, L.M. Todesca, A. Schwab, Ion channels in lung cancer, In *Transporter Malfunction in the Cancer Spectrum*, vol. 181, C. Stock, L.A. Pardo (eds), Springer, **2020**, p. 57-79.

[11] I. Thale *et al.*, Imaging of KCa3.1 channels in tumor cells with PET and small-molecule fluorescent probes, *ChemMedChem*, **2023**, 18(2), e202200551.

[12] C. Yang *et al.*, Overexpression of acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a) promotes breast cancer cell proliferation, migration and invasion, *Transl. Cancer Res.*, **2020**, 9(12), p. 7519-30.

[13] S. Wang, Y. Hu, $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in lung cancer (review), *Oncol. Lett.*, **2018**, 16(2), p. 1375-82.

[14] L. Droctová *et al.*, A snake toxin as a theranostic agent for the type 2 vasopressin receptor, *Theranostics*, **2020**, 1025, p. 11580-594.

[15] L. Lopez *et al.*, Synthetic analogues of huwentoxin-IV spider peptide with altered human NaV1.7/NaV1.6 selectivity ratios, *Front. Cell Dev. Biol.*, **2021**, 9, 798588.

[16] R. Chen, S.-H. Chung, Molecular dynamics simulations of scorpion toxin recognition by the Ca^{2+} -activated potassium channel KCa3.1, *Biophys. J.*, **2013**, 1058, p. 1829-37.

[17] S. Diochot *et al.*, Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain, *Nature*, **2012**, 490, p. 552-555.

[18] G. Mourier *et al.*, Mambalgin-1 pain-relieving peptide, stepwise solid-phase synthesis, crystal structure, and functional domain for acid-sensing ion channel 1a inhibition, *J. Biol. Chem.*, **2016**, 2916, p. 2616-29.

[19] A.V. Sudarikova *et al.*, Mambalgin-2 inhibits lung adenocarcinoma growth and migration by selective interaction with ASIC1 α -ENaC/ γ -ENaC heterotrimer, *Front. Oncol.*, **2022**, 12, 904742.

[20] M. Ellison, J.M. McIntosh, B.M. Olivera, α -conotoxins Iml and Iml1, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 2782, p. 757-764.

[21] X. Peng, M. Katz, V. Gerzanich, R. Anand, J. Lindstrom, Human alpha 7 acetylcholine receptor: cloning of the alpha 7 subunit from the SH-SY5Y cell line and determination of pharmacological properties of native receptors and functional alpha 7 homomers expressed in xenopus oocytes, *Mol. Pharmacol.*, **1994**, 453, p. 546-554.

[22] V. Tsetlin *et al.*, Interaction of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic receptors with peptides and proteins from animal venoms, *Front. Cell. Neurosci.*, **2021**, 15, 765541.

[23] R.A. Dueñas-Cuellar *et al.*, Scorpion toxins and ion channels: potential applications in cancer therapy, *Toxins*, **2020**, 12, 326.

[24] L. Dardevet *et al.*, Chlorotoxin: a helpful natural scorpion peptide to diagnose glioma and fight tumor invasion, *Toxins*, **2015**, 74, p. 1079-101.

[25] R. Patil *et al.*, Polymalic acid chlorotoxin nanoconjugate for near-infrared fluorescence guided resection of glioblastoma multiforme, *Biomaterials*, **2019**, 206, p. 146-159.

[26] O. Cohen-Inbar, M. Zaaroor, Glioblastoma multiforme targeted therapy: the chlorotoxin story, *J. Clin. Neurosci.*, **2016**, 33, p. 52-58.

[27] R.B. Merrifield, Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 8514, p. 2149-54.

Romain BAUDAT^{*1}, doctorant, **Evelyne BENOIT**¹, chercheur CNRS, **Mathilde KECK**¹, chercheur CEA, **Pascal KESSLER**¹, chercheur CEA, **Charles TRUILLET**², chercheur CEA, et **Denis SERVENT**¹, chercheur CEA.

¹Université Paris-Saclay, CEA, Institut des sciences du vivant Frédéric Joliot, Département Médicaments et technologies pour la santé (DMTS), Service d'Ingénierie moléculaire pour la santé (SIMoS), EMR CNRS/CEA 9004, Gif-sur-Yvette.

²Université Paris-Saclay, CEA, Institut des sciences du vivant Frédéric Joliot, Service hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ), Laboratoire d'imagerie biomédicale multimodale Paris Saclay (BioMaps), Orsay.

* romain.baudat@cea.fr