



CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

**IPBS/CNRS
UMR 5089
Biophysique Cellulaire**

205 Route de Narbonne, F-31077 Toulouse
France.

e-mail : Laurent.Paquereau@ipbs.fr
Tel : +33 (0) 5 61 17 58 59 / Fax : +33 (0) 5 61 17 58 94



**Proposition de Post-Doc.
Financement d'un an.
Début du contrat : octobre 2008**

Profil recherché : Biologie moléculaire - Biochimie

Sujet : Développement de nanocontainers protéiques comme vecteurs anticancéreux

Ce projet est la résultante de trois caractéristiques particulières issues des travaux réalisés précédemment par notre équipe sur une lectine clonée chez *Xerocomus Chrysenteron* (XCL). Ces caractéristiques permettent d'envisager le développement d'une nouvelle stratégie de vectorisation qui permettra de mieux cibler certaines cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines et ainsi de diminuer les effets secondaires des traitements.

La première de ces caractéristiques concerne la résolution de la structure tridimensionnelle d'XCL qui révèle une organisation très particulière. Cette protéine a une structure quaternaire homotétramérique qui génère en son centre une cavité (1000 \AA^3) dont les parois sont délimitées d'une part par le corps de chacun des monomères et d'autres part par quatre boucles symétriques qui ferment l'accès à cette cavité. La consultation des banques de données de structures montre qu'une cavité d'une telle taille au cœur d'un assemblage protéique n'a pas d'équivalent. La seconde caractéristique d'XCL concerne la nature du ligand qu'elle reconnaît au niveau membranaire. XCL possède un site d'affinité pour l'antigène Thomsen Friedenreich (β -D-Gal(1-3)-D-GalNac) que l'on retrouve sur des glycoprotéines à la surface de différents types de cellules cancéreuses. Enfin la dernière particularité concerne le mécanisme d'action d'XCL au niveau cellulaire puisque cette protéine est internalisée rapidement et très efficacement par un système d'endocytose clathrine dépendante et est adressée aux endosomes tardifs/lysosomes.

L'objectif de ce projet est de déterminer si ces structures protéiques peuvent être utilisées en tant que nanocontainer pour véhiculer des drogues anticancéreuses déjà utilisées en thérapie en ciblant spécifiquement des cellules tumorales. Les différentes étapes de ce travail consistent :

1- Différents mutants de la lectine (XCL) seront produits et testés pour ce projet. La première mutation prévue consiste à remplacer l'unique cystéine (C78) présente par monomère par une sérine. Cette cystéine interagit avec la boucle (résidus 104 à 119) qui la masque et maintient cette boucle sur le corps de la protéine. Mais dans des conditions d'augmentation de température cette cystéine devient accessible et on observe la formation de ponts disulfure entre tétramères.

Bien que cette protéine soit très stable, les quatre monomères n'interagissent entre eux que par des liaisons faibles. Un des moyens les plus simples et efficaces pour créer des liaisons covalentes entre ces monomères est d'introduire des ponts disulfures pouvant être réduits en milieu réducteur à l'intérieur des cellules. L'introduction de 2 cystéines permet de générer 4 ponts disulfures qui relient les quatre monomères ensemble.

2- L'équilibre tétramère/monomère dans des conditions standards est entièrement déplacé vers la forme tétramérique. Le déplacement de l'équilibre vers le monomère par l'augmentation de la température plutôt que par diminution du pH est imposé par le confinement qui suivra cette ouverture. En effet une variation du pH va modifier la protonation du ligand et des chaînes latérales des résidus tapissant la cavité et donc perturber ce confinement. La détermination de la température de fusion du tétramère sera déterminée approximativement par fluorescence. La RMN permettra d'accéder à la température de transition (Tm) précise en déterminant le coefficient de diffusion translationnel de la protéine en fonction d'une incrémentation de température ou des conditions de solvation. Des marquages uniformes à ¹⁵N de la lectine produite en milieu minimum permettront de définir la dynamique interne de la protéine et également de préciser les zones d'interaction avec les principes actifs utilisés.

3- Les différents principes actifs retenus comme candidats correspondent aux deux critères imposés pour le confinement : molécule thérapeutique et volume inférieur à 1000 Å³, en particulier la Doxorubicine, et le Bortezomib. La doxorubicine est largement utilisée comme agent anticancéreux et de nombreuses données sont accessibles pour cette molécule. Le bortezomib est un inhibiteur de l'activité chymotrypsine du protéasome et est actuellement testé en phase clinique dans les thérapies anticancéreuses. Une partie importante de ce travail va être de déterminer la manière dont ces molécules se lient dans la cavité et en quelle quantité. Ces interactions peuvent être déterminées par RMN de la protéine marquée ¹⁵N.

4- Le choix des systèmes cellulaires utilisés *ex vivo* permettra de tester d'une part la spécificité de la lectine et également le relargage et l'effet de la drogue sur les cellules. Les résultats que nous avons précédemment publiés sur cet aspect ont montré la fixation beaucoup plus spécifique sur les cellules d'origine épithéliales (HeLa) par rapport à des types cellulaires provenant d'autres lignées (3T3, sf9).

Références bibliographiques de l'équipe sur ce sujet :

DAMIAN L., FOURNIER D., WINTERHALTER M., PAQUEREAU L. (2005)

Determination of thermodynamic parameters of *Xerocomus Chrysenteron* Lectin interactions with N-acetylgalactosamine and Thomsen-Friedenreich antigen by Isothermal Titration Calorimetry *BMC Biochemistry*, 6:11

BIRCK C., DAMIAN L., MARTY-DETRAVES C., LOUGARRE A., SCHULZE-BRIESE C., KOEHL P., FOURNIER D., PAQUEREAU L., SAMAMA JP. (2004)

A new lectin family with structure similarity to actinoporins revealed by the crystal structure of *Xerocomus chrysenteron* lectin XCL. *J. Mol. Biol.*, 344 : 1409-20.

MARTY-DETRAVES C., FRANCIS F., BARICAULT L., FOURNIER D. and PAQUEREAU L. (2004)

Inhibitory action of a new lectin from *Xerocomus chrysenteron* on cell-substrate adhesion. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 258 (1-2): 49-55.

FRANCIS F., MARTY-DETRAVES C., POINCLOUX R., BARICAULT L., FOURNIER D., PAQUEREAU L. (2003)

Fungal lectin, XCL, is internalized via clathrin-dependent endocytosis and facilitates uptake of other molecules. *Eur. J. Cell Biol.*, 82 : 515-522.

TRIGUEROS V., LOUGARRE A., ALI-AHMED D., RABHE Y., GUILLOT J., CHAVANT L., FOURNIER D. and PAQUEREAU L. (2003)

Xerocomus chrysenteron lectin: identification of a new pesticidal protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1621 (3): 292-298.