

Avis de Soutenance

Madame Juliette PROTHON

SCIENCES DU VIVANT Biotechnologie

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés
Développement de conjugués modulaires ADN-nanobodies pour explorer et comprendre les synapses immunologiques

Travaux dirigés par Monsieur Patrick CHAMES

Soutenance prévue le **vendredi 10 avril 2026** à 14h00

Lieu : 172 Av. de Luminy, Hexagone, 13009 Marseille

Salle : auditorium

Composition du jury proposé

M. Patrick CHAMES	Directrice de recherche	CRCM - Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Aix-Marseille Université	Directeur de thèse
Mme Laurence GUGLIELMI	Maître de conférences	IRCM - Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Université de Montpellier	Rapporteuse
M. Emmanuel SCOTET	Directeur de recherche	Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Intégrée, Université de Nantes	Rapporteur
M. Damien BAIGL	Professeur	Laboratoire de Chimie Physique et Chimie du Vivant, ENS - Université Paris Sciences et Lettres	Président
M. Laurent LIMOZIN	Laboratoire Adhésion Inflammation , Aix-Marseille Université	Invité	

Mots-clés : nanobodies, ADN origami, cancer, immunothérapie, TCE

Résumé :

La synapse immunologique, véritable interface de communication cellulaire, orchestre la régulation des réponses immunitaires. Pourtant, malgré son rôle central, les mécanismes biophysiques qui gouvernent l'activation des lymphocytes T restent encore incompris, en raison de la complexité de cette zone de contact. Un enjeu majeur consiste à décrypter comment la géométrie spatiale, la valence et la distance inter membranaire modulent l'efficacité de la réponse lymphocytaire T, en particulier l'équilibre délicat entre cytotoxicité et relargage de cytokines. Dans ce contexte, ce travail

de thèse exploite la précision de l'ADN et la spécificité des nanobodies pour concevoir des engageurs de lymphocytes T (TCE) permettant à la fois d'analyser et de moduler la synapse immunologique. L'objectif est de générer des conjugués ADN-nanobodies, nommé DNabs, dans lesquels des nanobodies assurent la reconnaissance spécifique d'antigènes associés aux tumeurs et le recrutement des lymphocytes T, tandis que l'échafaudage d'ADN agit comme bras espaceur contrôlant la distance entre paratopes. L'architecture de la synapse est ainsi ajustée à l'échelle nanométrique afin d'étudier de manière systématique l'impact de l'organisation spatiale sur l'activation des lymphocytes T. Trois formats distincts de DNabs ont été conçus et caractérisés, chacun répondant à des objectifs fonctionnels et expérimentaux spécifiques. Dans un premier temps, des molécules bispécifiques, composées de deux nanobodies anti HER2 et anti CD3 reliés par une double hélice d'ADN, ont été développées. Ce format exploite la modularité de l'ADN pour ajuster la distance inter paratopes entre 16 et 27 nm. L'étude de ces conjugués a révélé une corrélation inverse entre la taille moléculaire et l'efficacité cytotoxique : l'activité décroît progressivement à mesure que la longueur du TCE augmente, confirmant que la dimension du TCE constitue un déterminant majeur de l'activation T. Un résultat central de ce travail révèle un découplage fonctionnel : alors que les formats compacts (16–20 nm) induisent une forte production de cytokines, les formats de 24 et 27 nm maintiennent une activité lytique robuste tout en réduisant d'un facteur quatre le relargage cytokinique. Ce résultat met en évidence une fenêtre thérapeutique où efficacité et toxicité peuvent être découplées. Pour pallier à certaines limites rencontrées par les TCE conventionnels face à l'hétérogénéité tumorale ou à l'échappement immunitaire, une seconde architecture de conjugués trispécifiques a été conçue en intégrant un nanobody supplémentaire dirigé contre EGFR. Nous avons démontré la faisabilité d'une approche de type « OR gate ». Cette stratégie permet la reconnaissance de deux épitopes tumoraux distincts (HER2 et EGFR), élargissant le spectre d'action aux cellules exprimant l'un, l'autre ou les deux récepteurs, afin de prévenir les risques d'échappement immunitaire. Finalement, afin d'explorer l'influence de la multivalence sur la réponse immunitaire, des architectures plus complexes ont été développées en utilisant la technologie de l'ADN origami. Ces nanostructures ont permis de positionner les nanobodies avec une résolution nanométrique selon quatre configurations de valence HER2/CD3 (1/1, 2/1, 4/1 et 4/4). Les analyses de liaison ont démontré que l'avidité des nano-objets pour les cellules cibles est strictement dose-dépendante et corrélée positivement à l'augmentation de la valence. Sur le plan fonctionnel, les structures 2/1 et 4/4 ont révélé une efficacité cytotoxique optimale. Ces travaux démontrent que les DNabs offrent une combinaison unique pour réaliser une analyse structure-fonction, permettant de dissocier les mécanismes d'activation lymphocytaire, la puissance lytique et le relargage cytokinique. Ainsi ces travaux ouvrent la voie à des traitements plus sûrs et efficaces, capables de maximiser la lyse tumorale tout en minimisant les risques de syndrome de relargage cytokinique.

Summary:

The immunological synapse, a key interface for cellular communication, orchestrates the regulation of immune responses. Despite its central role, the biophysical mechanisms governing T-cell activation remain poorly understood due to the inherent complexity and dynamics of this contact zone. A major challenge lies in elucidating how spatial geometry, valence, and inter-membrane distance modulate the efficiency of the T-cell response, particularly the delicate balance between cytotoxicity and cytokine release. In this context, this thesis leverages the precision of DNA nanotechnology and the specificity of nanobodies to design T-cell engagers (TCEs) capable of both analyzing and modulating the immunological synapse. The objective is to generate DNA-nanobody conjugates, termed DNabs, in which nanobodies ensure the specific recognition of tumor-associated antigens and the recruitment of T cells, while the DNA scaffold serves as a rigid spacer controlling the distance between paratopes. This approach allows for the fine-tuning of synapse architecture at the nanometric scale to systematically study the impact of spatial organization on T-cell activation.

Three distinct DNab formats were designed and characterized, each addressing specific functional and experimental goals. Initially, bispecific molecules composed of anti-HER2 and anti-CD3 nanobodies linked by a DNA double helix were developed. This format exploits DNA modularity to adjust the inter-paratope distance between 16 and 27 nm. Study of these conjugates revealed an inverse correlation between molecular size and cytotoxic efficiency: activity progressively decreases as TCE length increases, confirming that TCE dimensions are a primary determinant of T-cell activation. A central finding of this work reveals a functional decoupling: while compact formats (16–20 nm) induce high cytokine production, the 24 and 27 nm formats maintain robust lytic activity while reducing cytokine release fourfold. This result highlights a therapeutic window where efficacy and toxicity can be decoupled. To address the limitations of conventional TCEs regarding tumor heterogeneity and immune escape, a second architecture of trispecific conjugates was designed by integrating an additional nanobody targeting EGFR. We demonstrated the feasibility of an “OR gate” approach. This strategy enables the recognition of two distinct tumor epitopes (HER2 and EGFR), broadening the targeting range to cells expressing either or both receptors, thereby preventing immune escape. Finally, to explore the influence of multivalency on the immune response, more complex architectures were developed using DNA origami technology. These nanostructures allowed for nanometric positioning of nanobodies in four HER2/CD3 valence configurations (1/1, 2/1, 4/1, and 4/4). Binding analyses showed that the avidity of these nanostructures for target cells is strictly dose-dependent and positively correlated with increased valence. Functionally, the 2/1 and 4/4 structures exhibited optimal cytotoxic efficiency. This work demonstrates that DNabs provide a unique platform for structure-function analysis, allowing for the dissociation of T-cell activation mechanisms, lytic potency, and cytokine release intensity. These findings pave the way for safer and more effective treatments, capable of maximizing tumor lysis while minimizing the risks of cytokine release syndrome.

LE DOWAN

Georges LEONETTI