



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par :  
Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :  
Cancérologie

---

Présentée et soutenue par :  
Chinestra Patrick

le : 28 juin 2012

Titre :  
Conception de biosenseurs des protéines RhoA, RhoB, RhoC.

---

Ecole doctorale :  
Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :  
UMR 1037, CRCT, équipe GTPases Rho dans la progression tumorale

Directeur(s) de Thèse :  
Faye Jean-Charles

Rapporteurs :  
Dr Fort Philippe  
Dr Teulon Isabelle

Membre(s) du jury :  
Dr Fort Philippe  
Dr Teulon Isabelle  
Dr Pérez Franck  
Dr Faye Jean-Charles  
Pr Favre Gilles









Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par :  
Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :  
Cancérologie

---

Présentée et soutenue par :  
Chinestra Patrick

le : 28 juin 2012

Titre :  
Conception de biosenseurs des protéines RhoA, RhoB, RhoC.

---

Ecole doctorale :  
Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :  
UMR 1037, CRCT, équipe GTPases Rho dans la progression tumorale

Directeur(s) de Thèse :  
Faye Jean-Charles

Rapporteurs :  
Dr Fort Philippe  
Dr Teulon Isabelle

Membre(s) du jury :  
Dr Fort Philippe  
Dr Teulon Isabelle  
Dr Pérez Franck  
Dr Faye Jean-Charles  
Pr Favre Gilles

*Toute société qui n'est pas éclairée par les philosophes*

*Est trompée par les charlatans.*

*Condorcet (1743-1794)*

*Je tiens à adresser mes remerciements aux membres du jury.*

*À Monsieur le Docteur Philippe Fort, je vous exprime toute ma gratitude pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.*

*À Madame le Docteur Isabelle Teulon, je vous remercie également d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail ainsi que pour m'avoir initié avec enthousiasme à la technique du phage display. Je garde un souvenir agréable du séjour dans votre laboratoire ainsi que de votre présence sympathique.*

*A Monsieur Franck Pérez, je vous remercie sincèrement d'avoir participé à l'examen de ma soutenance. Je n'oublie pas que vous avez contribué de manière décisive à l'initiation de ce travail.*

*À Monsieur le Professeur Gilles Favre, je vous remercie de m'avoir fait confiance en me confiant ce projet qui paraissait presque impossible.*

*À Monsieur le Docteur Jean-Charles Faye pour sa présence et ses qualités humaines qui m'ont été d'un grand secours dans les moments difficiles et qui m'a appris que tout est possible en biologie...*

*Enfin tout cela n'aurait pas été possible sans les compétences et le soutien des membres de l'équipe : merci à toutes et tous, c'est vraiment agréable de venir travailler tous les jours...*

*Et à Cathy merci.*

# Résumé

## **Conception de biosenseurs des protéines RhoA, RhoB, RhoC.**

Notre équipe s'intéresse à la compréhension des mécanismes de dérégulation des voies de signalisation cellulaire dans la survenue et la maintenance des processus tumoraux, ainsi que leurs conséquences dans la réponse aux thérapies antitumorales. Nous nous intéressons particulièrement aux protéines Rho et à leurs régulateurs. Ils interviennent dans les voies de signalisation des récepteurs cellulaires conduisant à des modifications de l'adhérence, de la prolifération, de la motilité et de la balance survie/mort cellulaire.

Les protéines RhoA, RhoB et RhoC sont des petites GTPases passant d'un état actif (liées au GTP) à un état inactif (liées au GDP) et dont l'homologie est proche de 85%. La surexpression des protéines RhoA et RhoC a été décrite dans un grand nombre de tumeurs; à l'inverse, on observe une diminution de l'expression de RhoB dans le mélanome et dans le cancer du poumon.

La conception de fragments d'anticorps sélectifs de la conformation active des Rho, appelés biosenseurs, permettant d'évaluer l'activation de ces protéines *in situ* dans des coupes de tissus sains et cancéreux, pourrait aboutir à un usage pronostique de ces outils voire à la définition de nouveaux marqueurs thérapeutiques et permettrait de répondre à des questions plus fondamentales comme leurs localisations cellulaires, leur rôle dans la migration cellulaire, leur activation spatio-temporelle.

A partir du scFvC1 sélectif de la conformation active des trois protéines RhoA, RhoB et RhoC et isolé précédemment dans l'équipe, nous avons créé une banque secondaire par mutagenèse aléatoire et opéré une sélection par phage display avec un objectif double :

1°) augmenter l'affinité du scFvC1 pour améliorer ses capacités d'interaction avec les protéines Rho actives natives en vue d'améliorer ses performances en immunohistologie ainsi que pour une utilisation intracellulaire.

2°) sélectionner des variants spécifiques de chaque Rho malgré leur très forte homologie.

Nous montrons que la stratégie mise en œuvre permet d'augmenter l'affinité des scFv et de modifier leur sélectivité puisqu'un variant se lie préférentiellement à RhoA et RhoC. De plus, contrairement au svFvC1, ces scFv sont immunoprécipitants pour les Rho actives produites dans des cellules eucaryotes.

En parallèle, nous avons mis au point une méthodologie permettant le marquage d'un scFv anti-RhoB obtenu au laboratoire, par l'action d'un dérivé fluorescent de la biotine sur une intéine exprimée en fusion C-terminale du scFv. Ceci permettra d'améliorer les techniques immunohistologiques avec des biosenseurs fluorescents.



## Summary

### **Engineering Biosensors for RhoA, RhoB and RhoC proteins.**

Our team is interested in understanding the mechanisms of deregulation of cell signaling pathways in the development and maintenance of tumor processes and their consequences in response to anti-tumor therapies. We focus on Rho proteins as well as on their regulators. They are involved in signaling pathways of cell receptors leading to changes in adhesion, proliferation, motility and balance survival / cellular death.

RhoA, RhoB and RhoC are small GTPases switching from an active state (GTP-bound) to an inactive state (GDP-bound) and the homology of which is close to 85%. Overexpression of RhoA and RhoC protein has been described in many tumors; in contrast, there was a decreased expression of RhoB in melanoma and lung cancer.

Engineering antibody fragment specific of Rho active conformations, namely biosensors, would allow *in situ* assessment of these proteins activation in healthy or tumour samples. These tools could be further developed towards diagnosis or prognosis usage, or could even define novel therapeutics markers and be used to answer more fundamental question as their cellular localization, their role in cell migration, or their spatio-temporal activation.

Starting from the scFvC1 previously isolated in the group and which is selective for RhoA, RhoB and RhoC active conformations, we have created by random mutagenesis a second library and performed a phage display selection with two aims:

1°) increase the scFvC1 affinity to enhance its interaction potential with active native Rho proteins in order to improve its performance in immuno-histology or to use it as an intracellular antibody.

2°) select variants with a selectivity towards strictly only one of the three Rho excluding the others despite their strong homology.

We show that our strategy allowed an affinity increase of scFv and also a selectivity modulation as one variant preferentially binds RhoA and C. Moreover, in contrast to scFvC1 these scFvs immuno-precipitate active endogenous Rho Proteins in eukaryotic cells.

In parallel, we have established a method allowing the labelling of an anti-RhoB scFv from the lab, by fusing it to an intein that induce covalent binding of a biotin fluorescent analogue. This approach will improve immuno-histological techniques using fluorescent biosensors.

# SOMMAIRE

Abréviations :.....	5
Objectifs et situation du sujet.....	8
Conception de biosenseurs des protéines Rho .....	8
Marquage fluorescent d'un scFv en utilisant une biotine bi-fonctionnelle et une intéine.....	9
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>10</b>
I- Généralités sur les protéines Rho .....	13
I.1. Localisation cellulaire des GTPases Rho.....	15
II- GTPases Rho et oncogénèse .....	23
III- Structure et fonction des GTPases Rho et interactions moléculaires avec leurs partenaires.....	27
III.2. Liaison des nucléotides.....	29
III.3. Activité GTPasique .....	31
III.4. Différences structurales : l'état actif et inactif des petites GTPases .....	31
III.5. Le cycle d'activation des petites GTPases et sa régulation.....	33
IV- Méthodes d'études des GTPases Rho.....	51
IV.1. Stimulation des voies de signalisation.....	51
IV.2. Modification de l'expression des protéines.....	52
IV.3. Méthodes d'activation et d'inhibition des GTPases Rho .....	55
IV.4. Méthodes d'étude de la localisation des GTPases Rho .....	57
IV.6. Etude dynamique des GTPases Rho dans la cellule .....	60
V- Stratégie de sélection .....	65
V.1. Sélection de ligands peptidiques à la surface de bactériophages ou « phage display »..	66
V.2. Les fragments d'anticorps monoclonaux recombinants. ....	69
VI- choix de l'antigène.....	71
VII- La maturation d'affinité .....	74
VII.1. Création de banques secondaires : .....	74
VII.2. Sélection de fragments d'anticorps selon l'affinité : .....	76
<b>RESULTATS .....</b>	<b>77</b>
<b>1ere PARTIE.....</b>	<b>77</b>
I- Maturation d'affinité .....	78
I.1. Construction d'une banque secondaire par mutagenèse aléatoire à partir du scFv C1 ..	78
I.2. Stratégie de sélection.....	79
I.3. Résultat de la sélection : .....	83
I.4. Évaluation des affinités relatives des phages sélectionnés par rapport au phage C1:....	88
I.5. Propriétés des scFv sélectionnés sous forme soluble: .....	89
I.6. Evaluation de la spécificité et de l'affinité des scFv solubles par rapport au scFvC1 :....	91
I.7. Mesure de l'affinité des scFvF7 et D10 pour RhoA <sub>Q63L</sub> et RhoB <sub>Q63L</sub> par ELISA indirect. ..	92
I.8. Sélectivité des scFvF7 et D10 pour les conformations actives de RhoA et RhoB recombinantes procaryotes: .....	98
I.9. Sélectivité des scFvF7 et D10 pour les conformations actives de RhoA, RhoB et RhoC obtenues à partir de cellules eucaryotes:.....	100
I.10. Commentaires : .....	102
II- Sélection d'un scFv spécifique de la protéine RhoB en conformation active. ....	104
II.1. Stratégie de sélection : .....	104
II.2. Résultat de la sélection : .....	105
II.3. Analyse clonale sur le tour n°3 : .....	106
II.4. Spécificité des clones sélectionnés pour la forme active de RhoB : .....	107
II.5. Séquençage des clones sélectionnés : .....	109

II.6. Spécificité des scFv sous forme soluble : .....	111
II.7. Purification et propriétés des scFv E3, A5 et E10.....	113
II.8. Mesure du différentiel d'affinité des scFvE3 et A5 pour 6xHis-RhoB <sub>Q63L</sub> et 6xHis-RhoA <sub>Q63L</sub> .....	114
II.9. Commentaires.....	115
III. PERSPECTIVES .....	116
III.1. Détermination de l'épitope par modélisation .....	116
III.2. Evolution moléculaire aléatoire.....	119
III.3. Utilisation des biosenseurs .....	122
<b>2<sup>ème</sup> PARTIE.....</b>	<b>125</b>
Marquage d'un scFv à l'aide d'une biotine fluorescente bi-fonctionnelle.....	<b>126</b>
Les intéines.....	<b>127</b>
Description du scFv C5 .....	<b>132</b>
<i>Sélection du scFv C5</i> .....	132
Caractérisation de l'épitope du scFv C5 :.....	133
<i>Affinité du scFv C5</i> .....	136
Commentaires.....	<b>137</b>
ARTICLE .....	<b>140</b>
<b>MATERIELS &amp; METHODES.....</b>	<b>141</b>
<b>I. MATERIELS.....</b>	<b>142</b>
I.2. Production et purification des protéines recombinantes.....	142
I.3. Phage display.....	143
<b>II. METHODES.....</b>	<b>144</b>
II.1. Construction du plasmide scFv-N-CBD.....	144
II.2. Construction de la banque secondaire de scFv.....	145
II.3. Production et purification des protéines Rho recombinantes .....	149
II.4. Sélection de scFv par "phage display" .....	153
II.5. Dosages par ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) .....	157
II.6. Méthode IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) .....	162
II.7. Immuno-précipitation des GTPases Rho recombinantes procaryotes.....	164
Cartes des plasmides.....	165
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>170</b>

# Abréviations

Acides aminés : Code international des acides aminés.

G - Glycine (Gly)

P - Proline (Pro)

A - Alanine (Ala)

V - Valine (Val)

L - Leucine (Leu)

I - Isoleucine (Ile)

M - Methionine (Met)

C - Cysteine (Cys)

F - Phenylalanine (Phe)

Y - Tyrosine (Tyr)

W - Tryptophan (Trp)

H - Histidine (His)

K - Lysine (Lys)

R - Arginine (Arg)

Q - Glutamine (Gln)

N - Asparagine (Asn)

E - Glutamic Acid (Glu)

D - Aspartic Acid (Asp)

S - Serine (Ser)

T - Threonine (Thr)

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

ARNm : Acide Ribo-Nucléique messenger

CBD : Chitin Binding Domain

CFP : Cyan Fluorescent Protein

DTT : dithiothréitol (Sigma Aldrich)

EC50 : concentration efficace 50

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique  
EGF : Epidermal Growth Factor  
ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  
Fab : Fragment antigen binding  
FCS : Fetal Calf Serum  
FRET : Förster Resonance Energy Transfer  
GDP-CP : 5'-guanosyl-methylene-triphosphate  
GppNHp : guanylyl-5'-imidodiphosphate  
GST : glutathione-S-transferase  
GDP : Guanosine DiPhosphate  
GTP : Guanosine TriPhosphate  
GTP $\gamma$ S : Guanosine 5'-O-[gamma-thio]TriPhosphate  
HA : étiquette Hémagglutinine  
HRP : Horse Radish Peroxidase  
IMAC : Immobilized Metal Affinity Chromatography  
IPTG : isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside  
LPA : Lyso Phosphatidic acid  
MgCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O: Chlorure de Magnésium hexa-hydraté  
M.O.I : Multiplicity Of Infection  
NGF : Nerve Growth Factor  
P3 : protéine minoritaire de la capside M13  
Pb : paires de bases  
PDGF : Platelet Derived Growth Factor  
PEG : Poly Ethylène Glycol  
PM : Poids Moléculaire  
Qsp : quantité suffisante pour  
RBD : Rho Binding Domain  
RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G  
scFv : Single Chain Fragment Variable  
SDS : sodium dodécyl sulfate  
SiRNA : small interfering RNA  
SPR : Surface Plasmonic Resonance  
TA : Température Ambiante  
TEA : triéthylamine.

TU : Transforming Unit

YFP : Yellow Fluorescent Protein



# Objectifs et situation du sujet

Le travail de cette thèse se décompose en deux parties : la première est consacrée à l'obtention de biosenseurs des GTPases RhoA, RhoB et RhoC, la seconde consiste à décrire les caractéristiques d'un scFv anti-RhoB utilisé pour la mise au point d'une méthode de marquage fluorescent en utilisant une biotine bi-fonctionnelle et une intéine.

## Conception de biosenseurs des protéines Rho

Nous suivons un objectif double :

- mieux comprendre l'implication des protéines Rho dans l'oncogénèse, en mesurant l'activation de ces protéines *in situ* dans des coupes de tissus sains et cancéreux. Cela pourrait aboutir à un usage pronostique de ces outils voire à une utilisation des profils d'activation de ces protéines comme nouveaux marqueurs thérapeutiques.
- répondre à des questions plus fondamentales comme leurs localisations cellulaires, le rôle de ces protéines dans la migration cellulaire, leur activation spatio-temporelle. Ceci pourra être réalisé par l'expression intracellulaire des biosenseurs pour une utilisation sous forme d'intracorporels fluorescents. Ces biosenseurs pourraient être utilisés pour inhiber spécifiquement la transmission du signal d'une de ces trois GTPases.

Ces biosenseurs devront posséder plusieurs propriétés :

- être sélectifs de chaque protéine Rho indépendamment des autres,
- être capables de discriminer les protéines Rho dans leur conformation active,
- être fonctionnalisables par la greffe d'un radical fluorescent par exemple ou pour une utilisation intracellulaire.

Nous avons obtenu au laboratoire un fragment d'anticorps, le scFvC1, spécifique de la conformation active des trois protéines RhoA, RhoB et RhoC (thèse Goffinet marine, Université P. Sabatier 2007). Son utilité a été confirmée en immuno-cytochimie ce qui permet d'envisager l'utilisation de scFv pour une comparaison immuno-histochimique du profil d'activation des GTPases Rho dans des coupes de tissus sains et cancéreux. Par contre, sa capacité à interagir avec les protéines Rho actives dans le contexte cellulaire n'a pas été mise



en évidence par immuno-précipitation ce qui n'autorise pas pour l'instant l'utilisation des scFv comme biosenseurs intracellulaires.

Nous posons comme hypothèse que sa faible affinité ne permet pas le déplacement des partenaires naturels qui masquent l'épitope de ces GTPases reconnu par ce fragment d'anticorps.

A partir de là, il nous paraît intéressant de créer de la diversité en mutant de manière aléatoire le scFvC1 pour construire une banque secondaire qui sera soumise à deux pressions de sélection pour aboutir à:

1. une maturation d'affinité qui sélectionnera des scFv d'affinité plus forte pour rendre possible l'immuno-précipitation des protéines Rho actives dans le contexte cellulaire et ainsi valider le concept de leur utilisation comme biosenseurs intracellulaires,
2. une sélection différentielle favorisant l'enrichissement de scFv spécifiques de chacune des protéines Rho en conformation active indépendamment des autres par élimination des clones se liant indifféremment aux trois GTPases Rho.

La sélection par phage display de fragments d'anticorps monoclonaux recombinants nous paraît particulièrement bien adaptée à cette problématique.

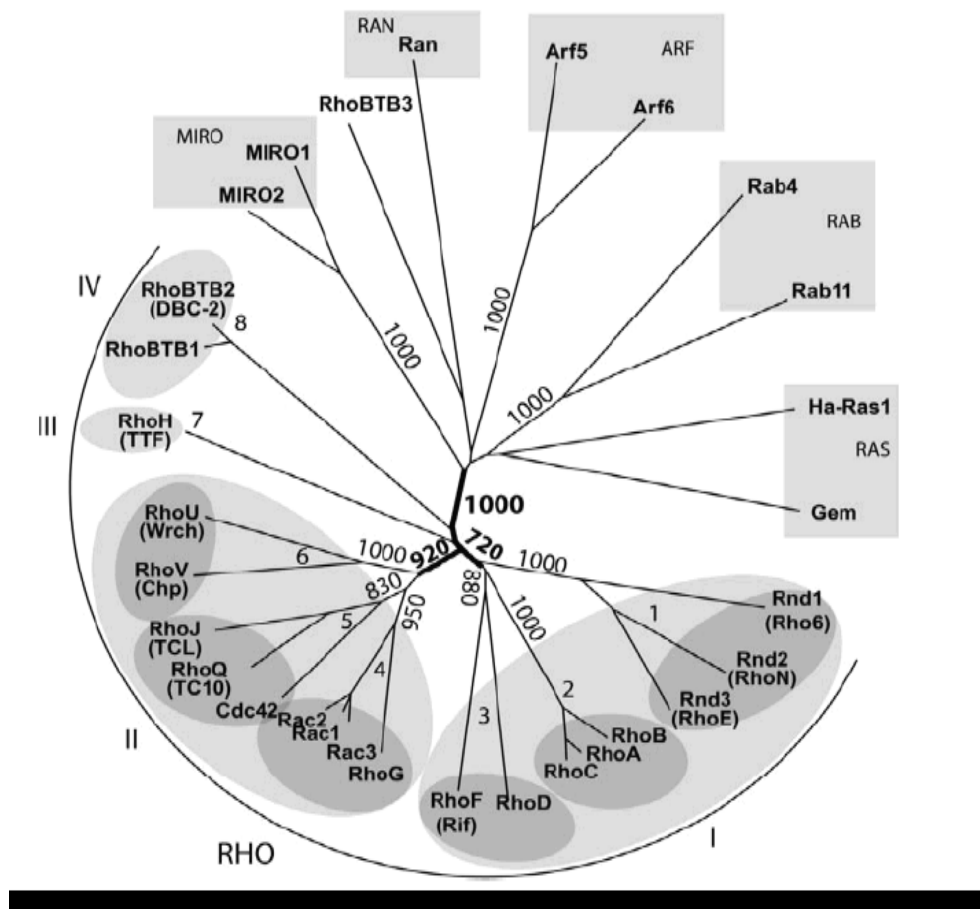
En effet, cette technique permet d'effectuer une maturation d'affinité de fragments d'anticorps préalablement sélectionnés. Elle permet également d'orienter de manière fine la spécificité des ligands peptidiques. Dans notre cas, cela se traduira par l'élimination des fragments d'anticorps se liant indifféremment aux trois protéines Rho au profit de candidats sélectifs de l'une des trois à l'exclusion des autres.

### **Marquage fluorescent d'un scFv en utilisant une biotine bi-fonctionnelle et une intéine.**

L'objectif de la méthode est de greffer une fluorescéine en C-terminal d'un scFv. Ceci a été réalisé par l'emploi d'une biotine bi-fonctionnelle possédant une fluorescéine sur l'azote N-1' et un groupement thiol à l'extrémité de la chaîne valérique (Inard et al., 2006). Cette biotine permet également de purifier ce scFv, ainsi marqué, par affinité sur un support fonctionnalisé à la streptavidine. Le fragment d'anticorps est exprimé avec l'intéine Mxe modifiée en fusion avec sa partie C-terminale de telle sorte que l'épissage est rendu possible par la réaction de la fonction thiol de la biotine bi-fonctionnelle. Cette méthode permet d'obtenir des préparations de scFv fluorescents avec une haute activité spécifique.

Ce travail mené en commun avec Laurent Chaisemartin a fait l'objet de la publication insérée en fin d'ouvrage (Chaisemartin et al., 2009).

# **INTRODUCTION**



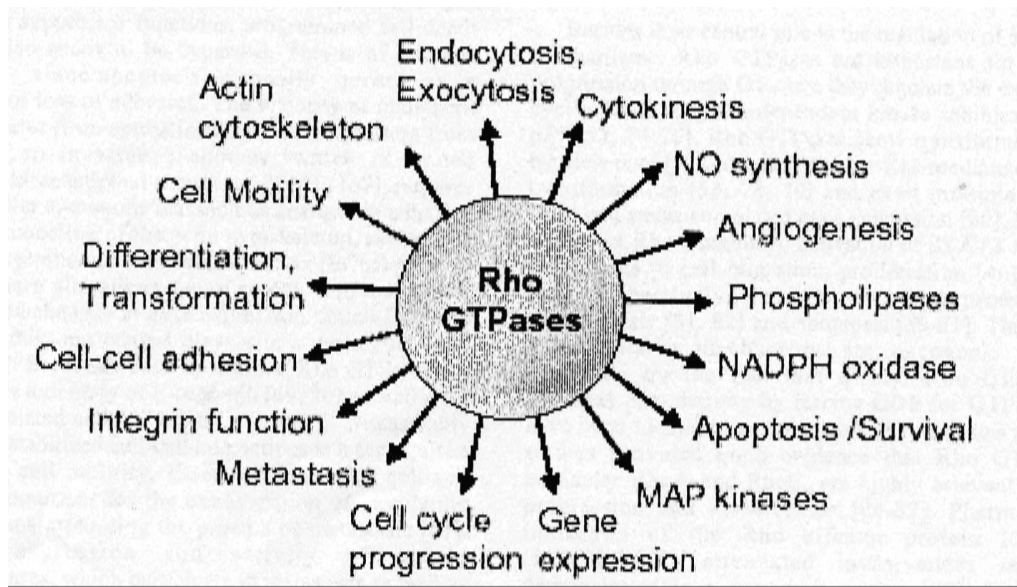
**Figure 1 : arbre phylogénétique de la superfamille Ras humaine.** Les protéines jusqu' alors considérées comme des GTPases Rho ont été alignées avec d'autres protéines apparentées aux GTPases Ras. Le domaine de chaque protéine correspondant à la partie comprise entre les résidus 5 à 173 de Rac1 a été considéré. L'organisation de la famille Rho est représentée en quatre groupes numérotés de I à IV (ellipses gris clair) et huit familles (ellipses gris foncé). Il apparaît que les protéines MIRO et RhoBTB3 appartiennent à des familles Ras distinctes des Rho. (Boureux et al., 2007)

## **I- Généralités sur les protéines Rho**

Les protéines Rho appartiennent à la superfamille Ras des petites protéines G monomériques (liant le GTP), de faible masse moléculaire (20 à 30 kDa). Ces protéines ont une expression ubiquitaire et sont représentées dans les cellules eucaryotes depuis la levure jusqu'aux mammifères (Boureaux et al., 2007). Ce motif protéique est également retrouvé dans les organismes procaryotes tels que les bactéries qui possèdent plusieurs type de GTPases et notamment des petites GTPases homologues de Ras. Elles interviennent dans la polarité de la cellule, dans la motilité ainsi que la transcription (Bulyha et al., 2011).

En 1985, Madaule et Axel rapportent, à partir d'une banque de cDNA de ganglion abdominal d'aplysie, la découverte d'un cDNA codant pour une protéine comportant 35% d'homologie avec H-ras (Bulyha et al., 2011). Ils nomment ce gène *rho* pour ras homology. Cette découverte est le fruit du hasard puisqu'ils avaient appliqué à cette banque un protocole peu drastique pour rechercher des clones homologues de peptides hormonaux. Depuis, la famille des GTPases Rho s'est agrandie et est constituée de vingt membres chez les mammifères. Une importante étude portant sur l'analyse des protéines Rho dans une vingtaine d'espèces, allant des organismes unicellulaires eucaryotes aux mammifères, a permis de les classer en huit sous-familles réparties en quatre groupes: le groupe I est constitué des sous-familles Rnd(1-3), Rho(A-C) et RhoF/RhoD ; le groupe II, des sous-familles Rac/RhoG, Cdc42/RhoQ/RhoJ et RhoU/RhoV ; le groupe III, de la protéine RhoH et le groupe IV, des protéines RhoBTB1 et RhoBTB2 (figure 1). On note que les protéines RhoBTB3 et MIRO (MIRO1 et 2) sont exclues de la famille Rho (Boureaux et al., 2007).

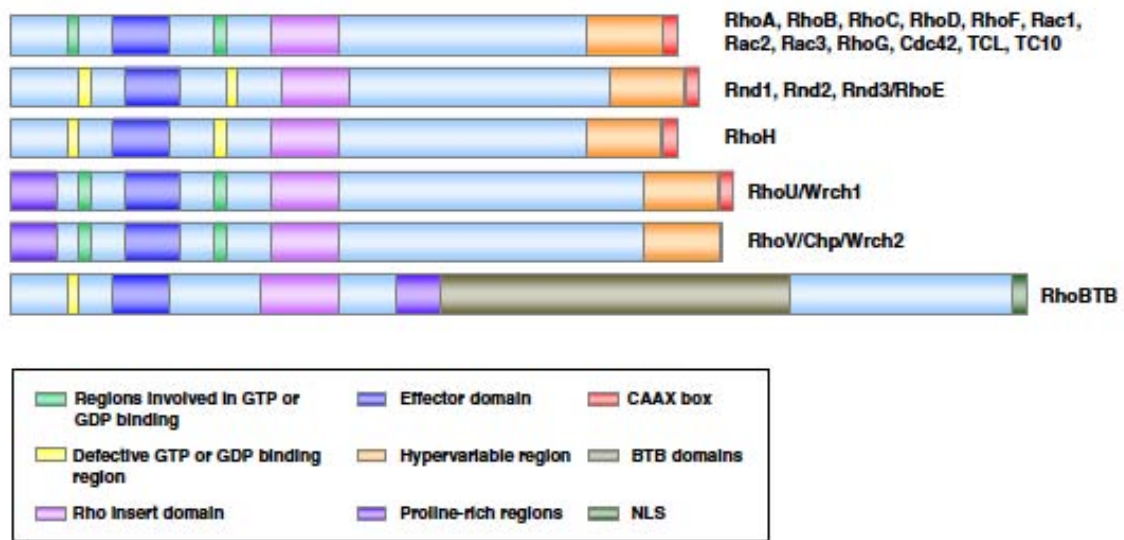
Les GTPases Rho alternent entre une forme active liée au GTP et inactive liée au GDP et jouent ainsi le rôle de commutateurs cellulaires. Elles contrôlent de nombreuses fonctions cellulaires et sont surtout connues pour leur implication dans le réarrangement du cytosquelette d'actine. Cette fonction majeure a des conséquences multiples comme la régulation de la morphologie, de la polarité et de l'adhésion de la cellule, ou encore le trafic membranaire. Rho, Rac et Cdc42 interviennent aussi dans la régulation de l'expression génique, de la prolifération et du cycle cellulaire, ainsi que dans le contrôle des voies apoptose/survie (figure 2) (Jaffe and Hall, 2005).



*Figure 2: les fonctions pleiotropiques attribuées aux GTPases Rho (Rho, Rac, Cdc42).*

*(Fritz and Kaina, 2006)*

Les GTPases Rho sont des protéines de petite taille (190 à 250 acides aminés) qui partagent environ 30% d'identité avec les GTPases de la famille Ras et entre 40 à 95% entre elles (Wennerberg and Der, 2004). La principale différence structurale qui sépare la famille de Rho de celle des Ras est due à la présence d'une hélice  $\alpha$  supplémentaire que possèdent les GTPases Rho (la structure de ces dernières sera détaillée dans le chapitre III). Elles sont composées de plusieurs domaines : la partie N-terminale, la plus conservée, comprend les résidus impliqués dans la liaison au GTP, ainsi que les domaines appelés switch I et switch II qui subissent un changement de conformation selon le nucléotide lié (GTP ou GDP) et jouent un rôle important dans la liaison aux effecteurs et aux régulateurs (Wheeler and Ridley, 2004). L'essentiel des différences de séquence primaire entre les protéines Rho se situe principalement dans la partie C-terminale appelée pour cette raison, région hypervariable (figure 3).



**Figure 3: organisation en domaines des GTPases Rho.** *RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoF, Rac1, Rac2, Rac3, RhoG, Cdc42, TCL et TC10 partagent une structuration en domaines similaire. Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE et RhoH sont considérées comme des GTPases atypiques dans le sens où les modifications qu'elles possèdent dans la région liant les nucléotides leur confèrent une incapacité d'hydrolyse du GTP. Wrch1 et Wrch2 sont caractérisées par la présence d'une région riche en proline à l'extrémité N-terminale. RhoBTB1 et RhoBTB2 ont l'organisation la plus divergente puisqu'elles possèdent deux séquences de nucléarisation (NLS).*

*(Vega and Ridley, 2008)*

### **1.1. Localisation cellulaire des GTPases Rho.**

Les fonctions physiologiques pleiotropiques des GTPases Rho sont couplées à des localisations cellulaires variées : cytoplasme, membrane plasmique, appareil de Golgi, endosomes ainsi que dans le noyau.

En ce qui concerne les trois membres de la sous-famille RhoA (*RhoA, RhoB et RhoC*), on note des disparités dans leurs localisations cellulaires : *RhoA* et *RhoC* sont essentiellement retrouvées dans le cytoplasme et la membrane plasmique, mais aussi, dans le cas de *RhoA*, dans l'espace péri-nucléaire lorsqu'elle est activée (Solski et al., 2002); *RhoB* est principalement associée aux membranes des endosomes et du compartiment pré-lysosomal (Adamson et al., 1992) et faiblement dans les structures péri-nucléaires (Michaelson et al., 2001).

### **1.2. Modifications post-traductionnelles des GTPases Rho.**

Ces localisations sont en partie déterminées par le domaine polybasique C-terminal que possèdent certaines d'entre elles (Rac1, Rac2, Rac3, RhoA, RhoC, Cdc42, RhoE, RhoQ). Ceci a été mis en évidence pour Rac1, mais n'est pas aussi déterminant dans le cas de RhoA (Michaelson et al., 2001). Les fonctions et les régulations des protéines Rho sont liées à leurs localisations cellulaires qui sont dépendantes de modifications post-traductionnelles consistant en une étape de prénylation, mais aussi de palmitoylation pour certaines d'entre elles. Leurs activités dépendent aussi de modifications post-traductionnelles par phosphorylation/ déphosphorylation.

### *1.2.1. La prénylation*

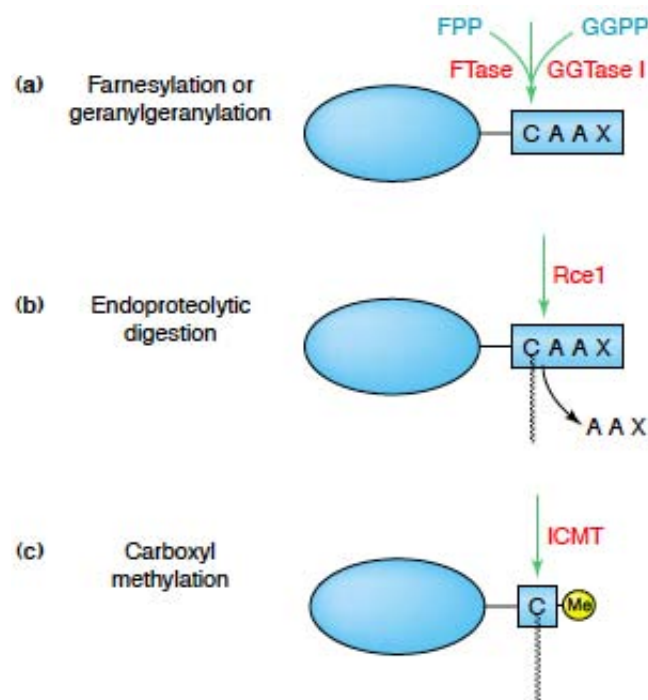
La prénylation est une modification post-traductionnelle qui consiste au greffage covalent d'un lipide isoprénique, lui-même issu du métabolisme du cholestérol, sur une cystéine au niveau d'une séquence consensus de l'extrémité C-terminale des protéines de la famille Rho appelée séquence « -CAAX » (où C est une cystéine, A, un acide aminé aliphatique et X, un acide aminé quelconque). La liaison thioéther entre la fonction thiol de la cystéine et le lipide est catalysée par la FTase (Farnésyl Transférase) pour la fixation d'un groupement farnésyl à 15 atomes de carbone ou par la GGTase I (Géranylgéranyl Transférase) pour la fixation d'un groupement géranylgéranyl à 20 atomes de carbone. Cette première étape est suivie de la protéolyse des 3 derniers acides aminés (-AAX) par une endoprotéase (Rce1), puis de la carboxyméthylation de la fonction acide carboxylique de la cystéine par l'enzyme ICMT (figure 4) (Walker and Olson, 2005).

La nature de l'isoprène transféré dépend généralement de la nature de l'acide aminé X. La Farnésyl-transférase réagit avec la séquence -CAAX lorsque X est par exemple une sérine ou une méthionine. Inversement quand X est une leucine, une isoleucine ou une phénylalanine, la protéine est géranylgéranylée. Cependant cette règle a des exceptions puisque RhoB peut être farnésylée et géranylgéranylée bien qu'elle possède une leucine en position carboxy-terminale du motif CAAX (Baron et al., 2000).

L'importance de la prénylation est illustrée par le fait que la mutation de la séquence CAAX de Ras telle qu'elle entraîne une absence de prénylation, empêche son association à la membrane et provoque la perte de son activité oncogénique (Solski et al., 2002). Cette modification post-traductionnelle des GTPases Rho est indispensable à leur localisation



membranaire, à leurs interactions avec leurs partenaires et par conséquent à leurs fonctions cellulaires.



**Figure 4: prénylation des GTPases Rho à leur extrémité C-terminale.** (a) Addition d'un groupement farnésyl à quinze carbones par la FTase en utilisant le farnésyl pyrophosphate comme donneur ou d'un groupement géranylgeranyl à vingt carbones par la GGTase I en utilisant le géranylgeranyl pyrophosphate comme donneur. (b) Digestion endoprotéolytique des trois derniers acides amines par l'endopeptidase RceI. (c) Méthylation de la cystéine modifiée par la carboxy-méthyl-transférase (ICMT).

(Walker and Olson, 2005)

Des travaux menés au laboratoire ont montré que la prénylation de la forme activée de RhoA est nécessaire pour sa localisation membranaire ainsi que pour sa liaison à la protéine régulatrice RhoGDI (Allal et al., 2000).

D'autres travaux suggèrent que la localisation de RhoB est dépendante du type de prénylation. L'action d'un FTI (Inhibiteur des Farnésyl-transférases) délocalise le pool de RhoB de la membrane plasmique vers les endosomes (Wherlock et al., 2004). Inversement, dans des cellules murines NIH-3T3, un mutant de RhoB exclusivement géranylgeranylable présente une localisation préférentiellement vésiculaire tandis que le mutant exclusivement

farnésylable est localisé principalement à la membrane plasmique (Milia et al., 2005). Tout cela suggère que la forme farnésylée de RhoB est préférentiellement localisée à la membrane plasmique et la forme géranylgeranylée majoritairement endosomale. Ceci peut avoir des conséquences fonctionnelles puisque le mutant de RhoB exclusivement géranylgeranylable est capable de réverser le phénotype transformé des cellules NIH-3T3/H-Ras (fibroblastes murins NIH-3T3 transformés par l'oncogène H-RasL61). En revanche, le mutant de RhoB exclusivement farnésylable potentialise la transformation induite par H-Ras dans ces cellules (Mazières et al., 2005). Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle la protéine RhoB aurait un rôle différent dans la transformation cellulaire selon la nature de sa prénylation. D'autre part, seule la forme RhoB-farnésylée augmente la survie des cellules NIH-3T3 après irradiation (Milia et al., 2005).

### *1.2.2. La palmitoylation*

Certaines protéines Rho peuvent également être palmitoylées par une palmitoyltransférase sur une cystéine en amont de la cystéine prénylée.

RhoB est palmitoylé sur deux résidus cystéine (Cys189 et Cys192) en amont de la cystéine prénylée (Cys193). Cette modification post-traductionnelle est nécessaire pour les activités anti-tumorales et pro-apoptotiques de RhoB (Wang and Sebti, 2005), ainsi que pour sa localisation cellulaire puisque l'inhibition de la palmitoylation par le 2-bromopalmitate provoque une localisation incorrecte de RhoB sur l'enveloppe nucléaire, le réticulum endoplasmique et une absence de sa localisation à la membrane plasmique (Michaelson et al., 2001).

### *1.2.3. La phosphorylation*

Cette modification post-traductionnelle a un effet sur l'activation des GTPases. Dans le cas de RhoA, la phosphorylation de la sérine 188 par les kinases PKA et PKG provoque son extraction de la membrane par la protéine régulatrice RhoGDI, avec pour conséquence une inactivation de cette GTPase (Lang et al., 1996).

Dans le cas de RhoB, la phosphorylation de la sérine 185 par la kinase CK1 aboutit elle aussi à une inactivation de RhoB, mais cela serait dû à une diminution de la fraction liée

au GTP avec pour conséquence une baisse d'interaction avec ses effecteurs (Tillement et al., 2008).

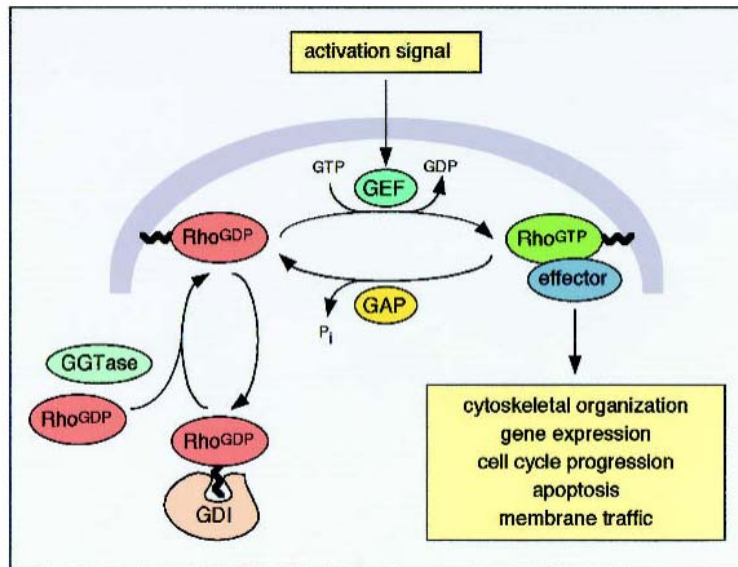
#### *I.2.4. La polyamination*

La dermonecrotizing toxin (DNT) de *Bordetella* modifie l'activité de Rho, Rac et cdc42 en greffant une polyamine sur la glutamine en position 63 impliquée dans l'hydrolyse du GTP. Cela a pour conséquence une activation des GTPases concernées par inhibition de leur activité GTPasique (Masuda et al., 2000). L'ornithine décarboxylase, dont l'activité est élevée dans les cellules cancéreuses, a été décrite comme régulant l'activité de RhoA ainsi que sa localisation au cours du cycle cellulaire par polyamination. Cette modification a pour conséquence une activation de RhoA, sans que l'acide aminé subissant la modification ne soit précisé (Mäkitie et al., 2009).

### **I.3. Le cycle d'activation et sa régulation**

Les petites GTPases ont la propriété d'alterner entre un état actif (lié au GTP) et un état inactif (lié au GDP), ce qui en fait des interrupteurs moléculaires. Le rôle central de ces protéines dans des fonctions cellulaires essentielles justifie une régulation très précise du passage de l'un à l'autre de ces deux états. Cette régulation est assurée par trois familles de protéines : les **GEFs** (Guanine nucleotide Exchange Factor), les **GAPs** (GTPase Activating Proteins) et les **GDI**s (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors). Les GEFs sont responsables de l'échange du GDP par du GTP, générant ainsi la forme active de la GTPase qui va alors interagir avec ses effecteurs pour transmettre le signal dans la cellule. Les GAPs activent la fonction GTPasique des protéines Rho qui aboutit à une désactivation de celle-ci. Les GDI quant à eux ont un rôle de séquestration cytoplasmique des protéines Rho liées au GDP (figure 5).

Ces différents partenaires avec lesquels interagissent les GTPases Rho, ainsi que leurs modes d'interaction seront décrits dans le chapitre III.



**Figure 5: le cycle d'activation des GTPases et leurs régulations.** Les GTPases Rho sont ancrées dans les membranes par l'intermédiaire de leurs groupements prényls. Le passage de la forme inactive (GDP) à la forme active (GTP) est régulé par les Guanine nucleotide Exchange Factors (GEFs). Le retour à l'état inactif est favorisé par l'action des GTPases Activating Proteins (GAPs). Les Guanine-nucleotides Dissociation Inhibitors (GDIs) inhibent la dissociation du GDP et contrôle la balance des fractions membranaires et cytoplasmique des GTPases. La forme active des GTPases interagit avec des effecteurs protéiques pour transmettre les signaux à la cellule. L'activation des GTPases est la conséquence de l'activation des GEFs en amont des GTPases.

(Schmidt and Hall, 2002)

#### **I.4. Les fonctions générales des GTPases Rho**

Les protéines Rho étaient à l'origine connues pour leur rôle dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Depuis, de nombreuses autres fonctions ont été révélées qu'elles soient dépendantes ou indépendantes de ce rôle premier. Les voies de signalisation dans lesquelles les GTPases Rho interviennent sont complexes et caractérisées par des interconnexions entre elles : l'activation de Cdc42 induit l'activation de Rac puis de Rho dans les fibroblastes 3T3 (Nobes and Hall, 1995).

##### **I.4.1 Cytosquelette et fonctions associées**

Les protéines de la sous-famille RhoA régulent l'assemblage des filaments myosine-actine qui contribuent à la contractilité, à la formation des fibres de stress et des points focaux

d'adhésion. L'activation des RhoA par l'acide lysophosphatidique, ainsi que le PDGF et l'EGF entraîne la formation de fibres de stress d'actine et de points focaux d'adhésion, responsables de la forme de la cellule et de son ancrage à la matrice extracellulaire (Ridley and Hall, 1992). D'autres GTPases interviennent dans le remodelage du cytosquelette. Rac est impliqué dans la formation de zones d'extension cellulaire appelés lamellipodes via l'activation des protéines formin, tandis que Cdc42 induit la formation de fins prolongements, les filopodes, en activant le complexe Arp2/3 (Ladwein and Rottner, 2008).

Ces fonctions sont liées à la migration cellulaire. Cdc42 serait principalement impliqué dans l'établissement de la polarité (chimiotactisme) et Rac jouerait le rôle moteur de polymérisation de l'actine à l'avant des cellules, tandis que RhoA participerait à la migration cellulaire en provoquant une contraction de l'arrière de la cellule (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

Les GTPases Rho interviennent également dans la régulation du réseau des microtubules qui possède une polarité avec une partie ancrée dans le centrosome et une dynamique d'assemblage et de désassemblage permanente (Jaffe and Hall, 2005).

L'action des GTPases Rho sur les fibres d'actines et les microtubules leur confère de multiples rôles dans le trafic cellulaire. On pourrait citer comme exemple le rôle de RhoB dans le trafic des endosomes tardifs/lysosomes qui ralentit la dégradation du récepteur de l'EGF (Gampel et al., 1999).

#### *1.4.2. Transcription, cycle cellulaire et réponse au stress*

Les GTPases Rho sont impliquées dans des fonctions cellulaires en rapport avec leur capacité à moduler la transcription de nombreux gènes. Ceci peut être illustré par le fait que les GTPases Rho régulent l'activité du facteur de transcription SRF (Serum Response Factor) dont les gènes cibles codent des éléments du cytosquelette et notamment l'actine. L'activité du SRF nécessite l'activation et la translocation nucléaire du co-activateur MAL. Ceci serait assuré par les GTPases Rho notamment par leur action sur le cytosquelette (Jaffe and Hall, 2005).

La progression G1 du cycle cellulaire est contrôlé par deux types de kinases cycline-dépendantes (Cdk) Cdk4/Cdk6 et Cdk2 qui sont régulées par l'expression des cyclines et des inhibiteurs de Cdks. Cette expression est contrôlée par la voie Ras/ERK et par des signaux d'adhésion à la matrice extra-cellulaire qui impliquent essentiellement Rac et Cdc42. RhoA

serait également impliqué puisque son expression dans les fibroblastes NIH 3T3 est nécessaire à l'expression normale de cycline D (Jaffe and Hall, 2005).

Ces différentes fonctions transcriptionnelles ont des répercussions sur l'implication des GTPases Rho dans certaines réponses aux stress génotoxiques. La GTPase RhoB illustre bien cet aspect des choses. RhoB joue un rôle dans la radio-résistance cellulaire des cellules NIH 3T3 (Milia et al., 2005), des cellules de gliome humain (U87) (Delmas et al., 2002) et des cellules Hela (Ader et al., 2002). Ce rôle serait plutôt lié à la forme farnésylée de RhoB (Milia et al., 2005).

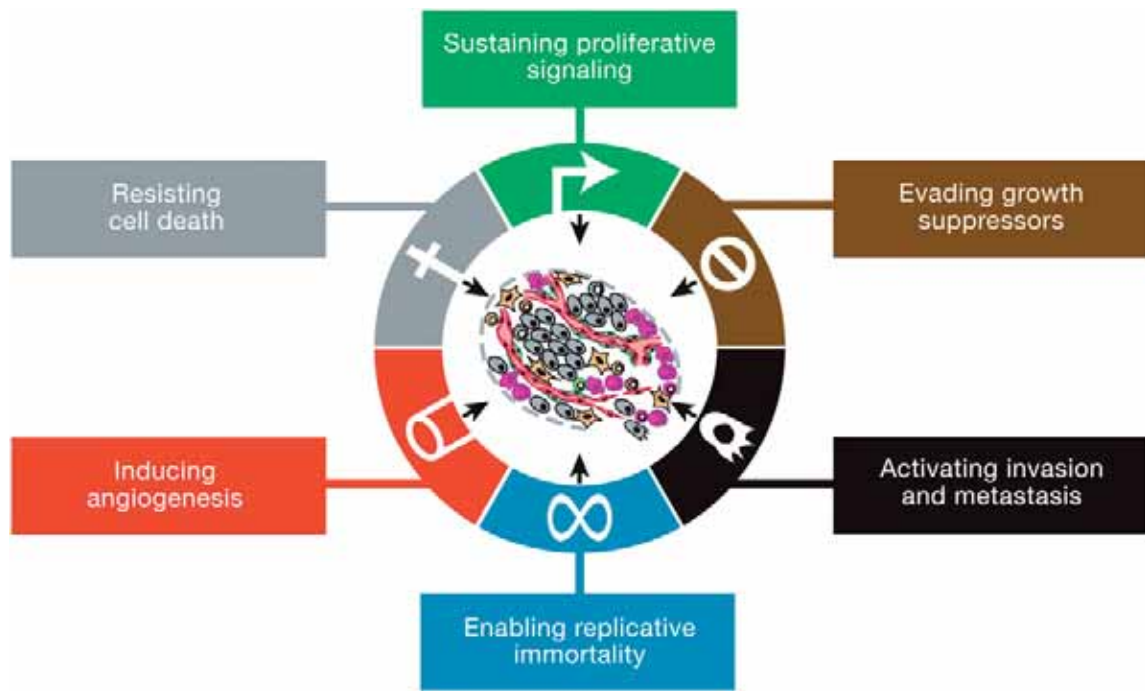
Certaines GTPases Rho (Rac1 et RhoA) sont également décrites comme étant sensibles au stress oxydatif. Aghajanian et ses collaborateurs décrivent un motif, dans la boucle de RhoA liant le phosphate du nucléotide, sensible à l'oxydation par le peroxyde. Il s'agit des cystéines 16 et 20. Ce stress provoque une activation réversible de RhoA par un échange accru de nucléotide. Ce mécanisme pourrait intervenir dans l'asthme et la réoxygénation des tissus greffés (Aghajanian et al., 2009).

Nous verrons dans le chapitre suivant que ces multiples fonctions impliquent les GTPases Rho dans des différentes pathologies et notamment la cancérisation.

## II- GTPases Rho et oncogénèse

Les observations selon lesquelles les cellules tumorales héritent de façon stable d'un phénotype transformé ont suggéré que l'oncogénèse résultait d'une altération génique (Cooper, 1982). Il y a une trentaine d'années que l'on a identifié les premiers oncogènes, qu'ils soient ou pas d'origine virale. Ces éléments géniques provoquaient des phénomènes de transformation par transfection de cellules NIH 3T3 soit par une expression anormalement élevée résultant d'une modification de la régulation de la transcription de ce gène dans le cas de la protéine pp60<sup>SRC</sup> du virus sarcome Rous (Cooper, 1982), soit d'une mutation ponctuelle conférant à l'oncogène *H-ras* des propriétés transformantes sans rapport avec sa régulation (Reddy et al., 1982).

Depuis, les progrès de la connaissance des mécanismes de la cancérisation montre à quel point le cancer est une maladie complexe, où le développement de la tumeur suit probablement un schéma d'évolution de type Darwinien en procédant par l'acquisition successive de dérèglements génétiques conférant des avantages de croissance, jusqu'à la conversion complète de cellules normales en cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2000). Aux six fonctions premières acquises par les cellules cancéreuses initialement proposées par Hanahan et Weinberg (figure 6), ces auteurs y ajoutent le dérèglement du métabolisme énergétique, l'échappement à la vigilance du système immunitaire, l'inflammation et l'instabilité génomique (Hanahan and Weinberg, 2011). De plus, ils insistent sur le rôle primordial de l'influence du microenvironnement tumoral conduisant à l'établissement du phénotype cancéreux et la formation de métastases. l'angiogénèse, et les capacités d'invasion et de formation de métastases (Hanahan and Weinberg, 2000).



**Figure 6: fonctions acquises nécessaires à l'oncogenèse.** Hypothèse selon laquelle la majorité sinon tous les cancers acquièrent les fonctions mentionnées durant leurs développements, bien que ces acquisitions puissent se produire selon des scénarii variés.

(Hanahan and Weinberg, 2011)

Les fonctions pleiotropiques des GTPases Rho énoncées précédemment en font des candidats potentiels intervenant dans plusieurs de ces processus.

L'expression de mutants dominants actifs et inactifs de Rac1 et de RhoA dans des cellules NIH 3T3 et de fibroblaste de rat ont montré que ces GTPases sont capables d'induire ou de potentialiser l'activité transformante de l'oncogène Ras (Qiu, Chen, McCormick, et al., 1995) ; (Qiu, Chen, Kim, et al., 1995). De plus, les GTPases RhoA, RhoC, Rac1, Rac2, Rac3, Cdc42, Wrch2/RhoV et RhoF sont surexprimées dans certaines tumeurs (Vega and Ridley, 2008). Pourtant, contrairement à Ras, aucune mutation ponctuelle de ces GTPases Rho n'a été identifiée résultant en une liaison constitutive au GTP et une augmentation de la voie de signalisation à laquelle elles participent (Gómez del Pulgar et al., 2005). L'implication des GTPases Rho dans l'oncogenèse semble être la résultante de l'effet de régulateurs en amont et en aval de ces dernières. Plusieurs protéines GEFs ont été identifiées comme oncogènes, et leur pouvoir transformant serait la conséquence de l'activation des GTPases Rho. La mutation de la GEF Tiam1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis) dans des tumeurs rénales a comme conséquence d'être constitutivement active et de provoquer une hyper-activation de Rac1. Ceci semble être également le cas pour le pouvoir métastasiant de cancers épithéliaux



comme les carcinomes du sein et du colon (Gómez del Pulgar et al., 2005). Le gène LARG (Leukemia Associated Rho Guanine nucleotide exchange factor), résultant de la fusion d'une GEF spécifique des Rho avec le gène *MLL* codant une histone méthyl-transférase, a été retrouvé chez des patients atteints d'une leucémie myéloïde aigue. LARG active RhoA *in vivo*, ce qui suggère un rôle de LARG/RhoA dans la progression des leucémies (Gómez del Pulgar et al., 2005). Inversement, DLC-1 (Deleted in Liver Cancer-1) est une protéine GAP, considérée comme suppresseur de tumeur, qui inactive RhoA, RhoB, RhoC et Cdc42. Sa fréquence de délétion hétérozygote dans certains cancers approche celle de p53. Sa réintroduction dans des lignées cellulaires de cancer du foie, du poumon et de sein résulte en une diminution de leur croissance tumorigène (Kim et al., 2009).

La GTPase RhoA est impliquée dans plusieurs étapes de la cancérisation, notamment dans la désorganisation des cellules épithéliales, l'inhibition des cadhérines qui confère aux cellules une motilité augmentée (Vega and Ridley, 2008). De plus, RhoA est impliquée dans la migration amiboïde des cellules sur le pourtour du mélanome, alors que la migration mésenchymateuse au cœur de la tumeur est sous la dépendance de Rac1 (Symons and Segall, 2009).

On ne connaît pas de pouvoir transformant de la GTPase RhoC. Son expression est augmentée dans les métastases du mélanome et est considérée comme un marqueur de mauvais pronostic dans différents cancers. RhoC interviendrait dans la formation des métastases en favorisant la sécrétion de facteurs angiogéniques (Vega and Ridley, 2008).

Contrairement à RhoA et RhoC, RhoB est considéré comme un suppresseur de tumeur. Cette GTPase est souvent sous-exprimée dans les tumeurs humaines et son expression est inversement proportionnelle à l'agressivité des tumeurs. Cette propriété de RhoB serait la conséquence de son activation en réponse à des stress comme les dommages à l'ADN ou l'hypoxie et à ses actions d'inhibition de croissance tumorale, de migration et d'invasion cellulaire, ainsi qu'à ses effets pro-apoptotiques (Vega and Ridley, 2008). Les études de l'expression de RhoB dans des tissus cancéreux de poumons à différents stades d'évolution menées au laboratoire montrent que cette GTPase n'est plus détectable dans 96% des tumeurs invasives (Mazieres et al., 2004). Les mêmes observations ont été rapportées dans des prélèvements de tissus issus de tumeurs gastriques : RhoA et RhoC sont significativement sur-exprimées tandis que RhoB est sous-exprimée voire non détectable dans les cellules cancéreuses. Les auteurs suggèrent que cette GTPase inhibe la croissance et la migration des cellules tumorales et les sensibilise à la chimiothérapie (Zhou et al., 2011). De plus, la déplétion de RhoB par l'action de siRNA dans des cellules bronchiques non-tumorales et dans

ces mêmes cellules transformées par l'oncogène K-Ras G12V met en évidence une corrélation inverse entre l'expression de RhoB et l'acquisition du pouvoir invasif (Bousquet et al., 2009).

Si la mesure de l'expression des GTPases Rho dans diverses situations cellulaires normales ou pathologiques est importante pour préciser leurs rôles physiologiques et leurs participations dans l'oncogénèse, la mesure de leur activation semble être un paramètre également important. En effet, les travaux de Mira et ses collaborateurs montrent que la GTPase Rac 3 est présente sous forme hyperactive dans trois lignées cellulaires fortement prolifératives de tumeurs de sein (Mira et al., 2000). De la même manière, les activités et les expressions des GTPases RhoA et Rac1 augmentent dans les tumeurs colorectales (Takami et al., 2008). Au laboratoire, l'exposition de kératinocytes humains immortalisés (HaCat) aux UVB provoque une activation de RhoB dans les cinq premières minutes suivie de l'augmentation de son expression concomitante à l'activation de l'EGFR, mettant en évidence un rôle anti-apoptotique et pro-carcinogène de cette GTPase, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle RhoB est suppresseur de tumeur (Canguilhem et al., 2005). Skuli et ses collaborateurs ont montré que l'inhibition de la voie intégrine  $\alpha_v\beta_3$ /FAK/RhoB dans des glioblastomes, aboutit *in vivo* à une vascularisation des tumeurs rendant la radiothérapie plus efficace (Skuli et al., 2009). Les mesures d'activité globales de ces GTPases ont été réalisées par des méthodes de « GST pull down » avec les effecteurs correspondants (voir chapitre IV.5.). L'utilisation de biosenseurs spécifiques de chacune de ces GTPases nous renseignerait sur leur taux d'activation *in situ* en tenant compte de leurs localisations tissulaire et cellulaire : ces mesures enrichiraient nos connaissances des mécanismes intimes sur les voies de signalisation impliquées.

D'autre part, des résultats récents montrent que la surexpression de RhoB diminue la sensibilité à l'erlotinib (Tarceva®) des cellules cancéreuses pulmonaires porteuses de mutations de l'EGFR (données non publiées). L'utilisation de biosenseurs capables de mesurer le taux d'activation de cette GTPase par immunohistologie sur des coupes de tumeurs pourrait s'avérer utile comme marqueur thérapeutique.

### **III- Structure et fonction des GTPases Rho et interactions moléculaires avec leurs partenaires.**

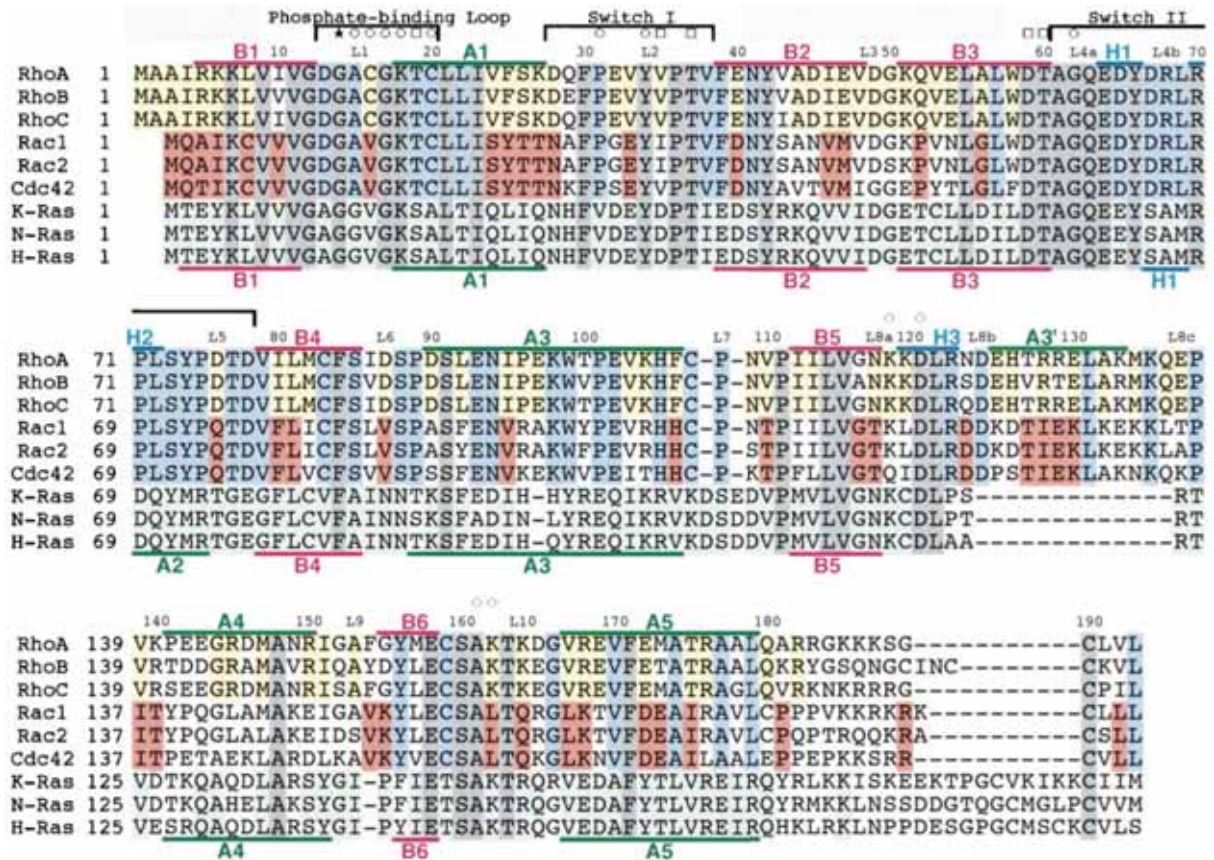
Comment le signal est transmis par ces protéines aux effecteurs cellulaires ? Autrement dit, comment les GTPases orientent-elles la réponse cellulaire au stimulus reçu ? Existe-t-il autant de GTPases que de stimuli possibles ? chacune d'entre elles interagit-elle avec un seul effecteur, un seul régulateur ? Si tel était le cas, il serait envisageable d'utiliser ces partenaires spécifiques de chaque GTPase comme biosenseur naturel. Si tel n'est pas le cas, la connaissance des mécanismes par lesquels leurs conformations actives et inactives sont reconnues par les effecteurs et les régulateurs nous aidera dans la conception de biosenseurs artificiels.

Les données cristallographiques couplées aux études de mutagenèse ont permis d'obtenir des informations permettant d'expliquer les différences structurales qui déterminent le « choix » du partenaire en fonction de l'état actif ou inactif de la GTPase.

#### **III.1. Données structurales des petites GTPases**

Les protéines de la famille Rho appartiennent à la super-famille des protéines Ras et partagent avec elles de nombreuses similarités tant du point de vue de la séquence primaire que des structures tridimensionnelles. Elles ont en commun d'être organisées en sous-domaines fonctionnels. La partie N-terminale contient la majorité des résidus impliqués dans la liaison du GTP et son hydrolyse, ainsi que dans la liaison du magnésium, et comprend également les deux domaines switch (I et II) déterminants pour les liaisons aux effecteurs et aux régulateurs. La partie C-terminale, contenant les sites de modifications post-traductionnelles, détermine quant à elle la localisation intracellulaire de ces protéines (figure 3) (Wheeler and Ridley, 2004). Seule l'hélice A3' appelée « insert loop » est présente uniquement dans les protéines de la famille Rho et constitue une particularité qui les distingue des protéines de la sous-famille Ras.

En ce qui concerne les structures secondaires, les petites GTPases de la super-famille Ras sont composées de six feuillets  $\beta$  dont un est anti-parallèle et cinq parallèles reliés par dix boucles. Quatre hélices  $\alpha$  pour la sous-famille Ras et cinq hélices  $\alpha$  (dont l'insert loop) pour la sous-famille Rho complètent les structures secondaires (figure 7) (Wittinghofer and Pai, 1991) ; (Ihara et al., 1998).

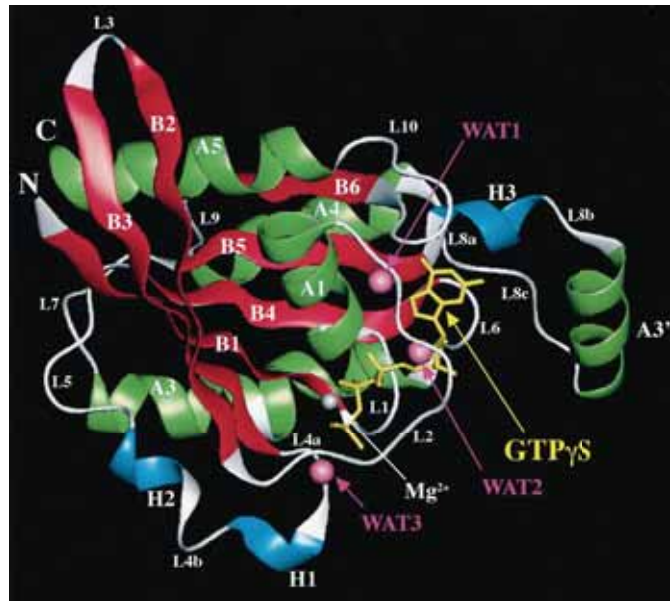


**Figure 7: alignement des séquences primaires des petites GTPases les plus étudiées de la superfamille Ras.** Les résidus conservés sont surlignés en jaune pour la sous-famille RhoA (RhoA, RhoB et RhoC), en rouge pour la sous-famille Rac1 (Rac1, Rac2 et cdc42) en bleu pour la famille Rho, en gris clair pour la sous-famille Ras (K-Ras, N-Ras et H-Ras) et en gris foncé pour tous les membres. Les structures secondaires des sous-familles Rho et Ras sont indiquées en haut et en bas respectivement. Les hélices a (A1 – A5) sont indiquées en vert, les brins b en rouge (B1-B6) et les hélices 3<sub>10</sub> en bleu (H1-H3). Trois régions fonctionnelles de RhoA sont indiquées de la manière suivante : les résidus impliqués dans la liaison du GTPγS par des ronds et ceux impliqués dans la liaison du Mg<sup>2+</sup> par des carrés. Les sites de mutation des dominants actifs sont indiqués par des étoiles.

(Ihara et al., 1998)

**Figure 8: représentation de la protéine RhoA<sup>V14</sup> complexée au GTP $\gamma$ S (en jaune).** Le magnésium est symbolisé par une boule grise et les trois molécules d'eau par des boules roses. Les feuillettes  $\beta$  sont représentés en rouge, les hélices  $\alpha$  en vert et les hélices  $3_{10}$  en bleu.

(Ihara et al., 1998)



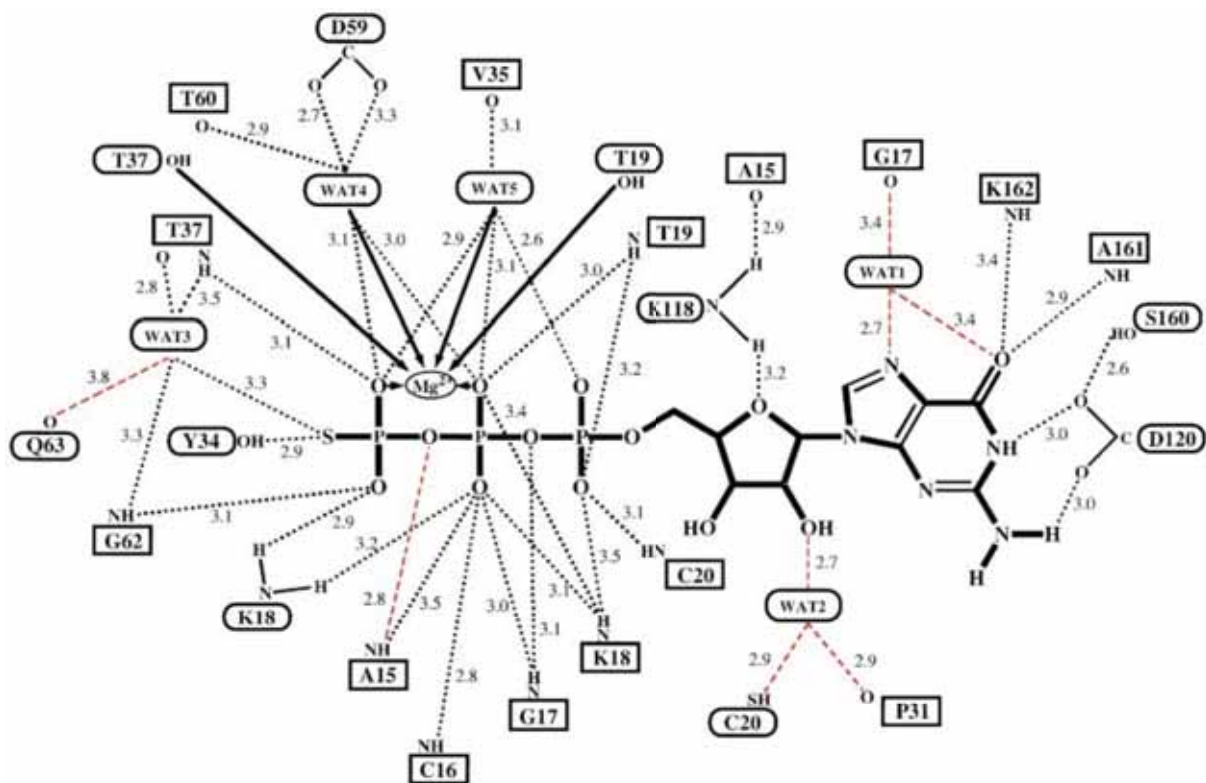
Les repliements de ces structures secondaires aboutissant à la structure tertiaire des GTPases (figure 8), apportent un éclairage sur les relations structures-fonctions de ces protéines en complément des observations réalisées sur les mutants dominants positifs et négatifs, ainsi que les études de mutagenèse. En particulier, la connaissance des structures tertiaires apporte des informations qui permettent de comprendre la spécificité pour les nucléotides à guanine, le rôle du magnésium dans l'affinité pour les nucléotides, le mécanisme de l'hydrolyse du GTP, les mécanismes d'action des toxines procaryotes, ainsi que les changements conformationnels associés au type de nucléotide lié (di-phosphate ou tri-phosphate) qui permettront aux différents effecteurs et régulateurs de reconnaître leur état actif ou inactif.

Les résolutions aux rayons X s'effectuent sur des cristaux de protéines dépourvues de la partie C-terminale à partir de l'acide aminé en position 171 pour Ras et 181 pour Rho, ce domaine étant trop flexible pour permettre une résolution aux rayons X. Cependant, ces protéines tronquées conservent leurs propriétés de liaison au nucléotide et d'hydrolyse du GTP (John et al., 1989).

### III.2. Liaison des nucléotides

On remarque de fortes similitudes des données cristallographiques de H-Ras (GppNHp) (Wittinghofer and Pai, 1991) et du mutant dominant actif RhoA<sub>G14V</sub> (GTP $\gamma$ S)

(Ihara et al., 1998) mettant en évidence les liaisons entre les acides aminés des GTPases et le nucléotide. La guanine est enfouie dans une poche hydrophobe et la spécificité de la GTPase pour ce nucléotide est déterminée par les interactions des résidus conservés <sup>116</sup>GXXDL<sup>121</sup> et <sup>160</sup>SAK<sup>162</sup>, ainsi que par le positionnement de la molécule d'eau WAT1 qui est absente dans la protéine Ras (figure 9).



**Figure 9: schéma représentant la liaison du GTP $\gamma$ S par RhoAG14V en présence de magnésium :** les lignes en pointillé symbolisent les liaisons hydrogène (distance inférieure à 3,5 Å) et les distances sont indiquées (Å). Les résidus participant aux liaisons hydrogènes par leurs chaînes principales sont représentés par des rectangles tandis que ceux qui participent par leurs chaînes latérales sont représentés par des ovales. Les liens de coordination du magnésium sont indiqués par des flèches. Les liaisons hydrogènes observées dans RhoAG14V (GTP $\gamma$ S) et qui ne sont pas présentes dans H-Ras sont en rouge.

(Ihara et al., 1998)

Le groupement tri-phosphate est lié à la protéine par des liaisons hydrogènes directes avec certains résidus de la protéine (motif <sup>12</sup>GXXGXXGKT/S<sup>19</sup>, Y<sup>34</sup> et D<sup>59</sup>), des liaisons hydrogènes par l'intermédiaire de molécules d'eau et par deux liaisons de coordination avec l'ion Mg<sup>2+</sup>. Ce cation participe activement au rapprochement des régions de liaison du groupement tri-phosphate avec les switch I et II et sa présence est indispensable à l'activité enzymatique. Ces nombreuses liaisons expliquent la forte affinité, de l'ordre du nanomolaire, des GTPases pour leur nucléotide.

### III.3. Activité GTPasique

L'explication du pouvoir transformant des oncogènes Ras a été mise en évidence par une étude portant sur la mesure comparative des capacités de liaison et d'hydrolyse du GTP du mutant Ras<sub>G12V</sub> et de la protéine Ras native (McGrath et al., 1984). Il apparaît que la mutation n'altère pas la liaison du nucléotide mais diminue sensiblement l'activité GTPasique, ce qui a pour conséquence de perturber la balance des conformations inactive *vs* active en faveur de cette dernière. L'explication du mécanisme de l'hydrolyse du GTP a été avancée à partir des résolutions cristallographiques de l'oncogène Ras<sub>G12V</sub> et de la protéine native liée au GDP et aux analogues non hydrolysables du GTP (GDP - CP et GppNHp). Le mécanisme proposé se base sur l'interaction conjointe du groupement carbonyle de la Thr<sup>35</sup> et du groupement carboxamide de la Gln<sup>61</sup> qui a pour conséquence d'activer une molécule d'eau située au voisinage du phosphate  $\gamma$  du GTP transformant celle-ci en réactif nucléophile. La présence de la Lys<sup>16</sup> et du Mg<sup>2+</sup> au voisinage des phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  participerait à la diminution de l'énergie d'activation de la réaction en augmentant le caractère électrophile et l'acidité du phosphate  $\gamma$  (Wittinghofer and Pai, 1991). Les mesures d'hydrolyse du GTP par RhoB en absence de Mg<sup>2+</sup> sont dix fois inférieures à celle mesurées en sa présence, confirmant son rôle dans l'activité GTPasique (Soundararajan et al., 2008). Il est à noter que toutes les GTPases possèdent une lysine à une position équivalente. Bien que ce mécanisme ne soit pas encore complètement élucidé, il pourrait permettre d'expliquer la diminution de l'activité GTPasique des mutants G12V et Q61L de la protéine. En effet, dans le premier cas, la gêne stérique créée par la chaîne latérale de la valine protégerait le phosphate  $\gamma$  de l'attaque nucléophile (Milburn et al., 1990), et dans le deuxième cas la suppression du groupement carboxamide de la Gln<sup>61</sup> réduirait sensiblement l'activation de la molécule d'eau intervenant dans la réaction catalytique. Ce modèle réactionnel élaboré à partir de Ras s'applique également à la protéine RhoA puisque les positions du nucléotide, du magnésium, des résidus et de la molécule d'eau impliqués dans l'hydrolyse sont conservées. Ajoutons que les mutants G14V et Q63L de RhoA analogues aux mutants G12V et Q61L de Ras ont une activité GTPasique fortement diminuée.

### III.4. Différences structurales : l'état actif et inactif des petites GTPases

La superposition des structures de H-Ras liée au GDP et au GDP-CP met en évidence des différences de positionnement des deux domaines switch I et switch II exposés à la surface de la protéine et impliqués dans les interactions avec les effecteurs et les régulateurs de la GTPase (Milburn et al., 1990). Le changement de conformation du switch I entre l'état activé et inactivé s'explique par la disparition de la liaison hydrogène entre la Thr<sup>35</sup> et le phosphate  $\gamma$  du GTP, et la perte de la coordination du groupement hydroxyle de ce résidu avec le magnésium. Ces changements provoquent des déplacements des acides aminés adjacents appartenant au switch I. Le changement de positionnement du switch II, de moindre ampleur, est principalement dû à la disparition de la liaison hydrogène unissant la Gly<sup>60</sup> et le phosphate  $\gamma$  du GTP (Wittinghofer and Pai, 1991). Ces modifications de structures ont été confirmées par des résolutions cristallographiques de H-Ras avec un analogue photo-activable du GTP (Schlichting et al., 1990).



**Figure 10:** comparaison des structures de RhoA<sub>G14V</sub> (GTP $\gamma$ S) et RhoA (GDP). Superposition des squelettes carbonés de RhoA<sub>G14V</sub> (GTP $\gamma$ S) et de RhoA (GDP) montrant les différences de positionnement des switch I et II en rouge et en jaune, respectivement.

(Ihara et al., 1998)

Les mêmes changements conformationnels ont été observés pour la protéine RhoA en superposant les structures de RhoA (GDP) (Wei et al., 1997) et RhoA<sub>G14V</sub> (GTP $\gamma$ S) (Ihara et al., 1998). Il est important de remarquer que les autres domaines de la GTPase sont parfaitement superposables (figure 10). Dans les cas où on dispose des données structurales des protéines Rho en conformation active, on observe que la position des switchs est conservée. C'est le cas pour RhoA(GTP $\gamma$ S et GppNHp), RhoE(GTP), Rac1(GppNHp), et



Rnd1(GTP). La GTPase RhoC semble être un cas particulier puisque Diaz et Cerione ont mis en évidence une conformation active partielle lorsque RhoC est lié au GppNHp, qui diffère par la position du switch-I de la conformation active totale lorsqu'il est lié au GTPγS (Dias and Cerione, 2007). De même, Araki et ses collaborateurs décrivent par une étude RMN deux états de la GTPase H-Ras liée au GppNHp : l'un apparenté à la conformation de H-Ras(GDP) par la position du switch-I, l'autre, plus rigide, superposable à la conformation active généralement décrite. La pertinence physiologique de ces deux conformations est sujette à débat puisqu'il s'agit d'observations effectuées *in vitro* à 5°C alors qu'elles ne sont pas discernables à 25°C (Araki et al., 2011).

Nous ne disposons pas pour l'instant de résolution cristallographique de RhoB active.

### **III.5. Le cycle d'activation des petites GTPases et sa régulation**

Les séquences primaires des protéines RhoA, RhoB et RhoC présentent une identité proche de 85%, allant jusqu'à 95% dans les domaines très conservés des switches I et II qui sont les sites de liaison des différents effecteurs et régulateurs. Ces GTPases ont pourtant des rôles différents dans la physiologie cellulaire. Comme nous allons le voir, ces différences trouvent leurs origines dans la spécificité de liaison avec leurs partenaires, mais aussi dans la compartimentation cellulaire et sub-cellulaire ou par d'autres voies en tirant partie des différences d'affinité de leurs partenaires.

Le lecteur trouvera un tableau récapitulatif des spécificités des partenaires décrits ici en fin de chapitre.

#### **III.5.1. Les GEFs.**

L'échange de nucléotides (GDP/GTP) des petites GTPases s'effectue par l'intervention de Guanine nucleotide Exchange Factors (GEFs). Ces protéines transmettent les stimuli extracellulaires en activant les RhoGTPases. Ces stimuli sont très variés : récepteurs à tyrosine kinase, récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), intégrines (Arthur et al., 2002). Par exemple, PDZRhoGEF réalise le couplage entre RhoA et le RCPG PAR qui est activé par le LPA (acide lysophosphatidique) dans les cellules PC3 de cancer de la prostate. De la même manière, l'activation de RhoA par la thrombine est réalisée par l'interaction de cette dernière avec un récepteur à la thrombine suivie de l'activation de la GEF LARG dans les cellules HEK293 (Wang et al., 2004).

Deux familles distinctes de GEFs ont été répertoriées : les GEFs à domaines DH (Dbl Homology) qui comptent environ 70 membres (Chen et al., 2010) et les protéines DOCK au nombre de onze. Ces dernières activent exclusivement les GTPases de la famille Rac et Cdc42 (Yang et al., 2009). Nous nous intéresserons aux GEFs à domaine DH, que nous nommerons GEF, car elles ont la propriété d'activer les GTPases Rac et Cdc42, ainsi que les GTPases Rho qui sont l'objet de ce travail.

Les GEFs sont constituées de plusieurs domaines dont un, le DH, est responsable de l'échange de nucléotides en interagissant directement avec les GTPases (la Dbl, pour Diffuse B-cell lymphoma, étant la première GEF identifiée (Schmidt and Hall, 2002)). Le domaine DH est composé d'hélices  $\alpha$  dont deux (CR1 et CR3) sont exposées à la surface de la GEF et participent à la liaison avec la GTPase. La majorité des GEFs possèdent un domaine PH (Pleckstrin Homologue) C-terminal adjacent au DH. Plusieurs rôles ont été suggérés pour ce domaine. D'une part, il participe directement en complément du domaine DH à la liaison aux protéines Rho et facilite l'échange de nucléotides (Rossman et al., 2002). D'autre part, il permettrait la localisation membranaire de la GEF (Schmidt and Hall, 2002) grâce à des liaisons avec des phospholipides ou à d'autres protéines (García-Mata and Burridge, 2007). En complément au module DH-PH, d'autres domaines situés en partie N-terminale ou/et C-terminale des GEFs sont responsables de fonctions diverses dont l'activation, la localisation subcellulaire, le couplage aux récepteurs en amont (Rossman et al., 2005).

### ***III.5.1.1. Mécanisme d'échange de nucléotides***

Dans le cas des protéines RhoA et RhoB, le mécanisme d'échange de nucléotides tirerait partie du fait que ces GTPases ont une affinité moindre pour le magnésium lorsqu'elles sont liées au GDP par rapport au GTP. Après hydrolyse du GTP, le magnésium se dissocie plus facilement de la GTPase entraînant un changement de conformation qui favorise la liaison des GEFs. Ces dernières stabilisent alors les GTPases favorisant la dissociation du GDP qui n'est plus chélaté par le magnésium et son remplacement par du GTP, la concentration intracellulaire de ce dernier étant supérieure au GDP. Ce mécanisme a été déduit de la comparaison des structures de RhoA (Shimizu et al., 2000) et de RhoB (Soundararajan et al., 2008) liées au GDP en absence de magnésium avec celle de RhoA co-cristallisé avec PDZRhoGEF et Ras-SosGEF. Cependant, des mesures de dissociation du GDP de Rac-1 en présence de concentrations variables de magnésium, montrent que la GEF

Trio agit en déstabilisant le GDP lié par déplacement du magnésium (Pan and Wessling-Resnick, 1998).

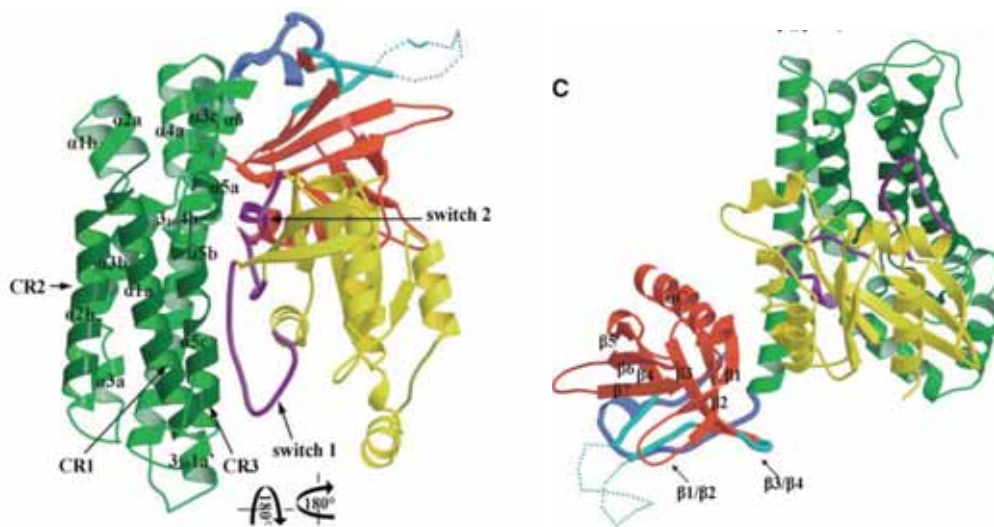
De plus, des données de la littérature décrivent des disparités dans le mode de liaison des GEFs à RhoA. Des études de liaison *in vitro* montrent que certaines d'entre elles se lient à RhoA lorsqu'elle est dépourvue de nucléotide ou chargée avec du GTP $\gamma$ S, et non lorsqu'elle est chargée avec du GDP. Ceci est le cas pour p114RhoGEF (Blomquist et al., 2000), XPLN (Arthur et al., 2002), KIAA0380 (Rümenapp et al., 1999). A l'inverse, d'autres GEF, Lbc, Lsc et Lfc, ne se lient à RhoA que lorsqu'elle est dépourvue de nucléotides (Glaven et al., 1996). Le fait que certaines GEFs se lient à la conformation active de RhoA(GTP $\gamma$ S) est interprété comme le résultat de fonctions de domaines supplémentaires à ceux responsables de l'échange de nucléotides conférant des comportements d'effecteur ou de « protéine-carrier » pour la localisation des GTPases actives (Blomquist et al., 2000). Une autre interprétation est avancée par Chen qui décrit des expériences mettant en évidence deux domaines de liaison de PDZ-RhoGEF à RhoA : le domaine DH se liant à RhoA sans nucléotide et le domaine PH se liant à RhoA(GTP $\gamma$ S). Les auteurs interprètent cette observation comme étant un mode de régulation de l'activité de la GEF lui permettant de se localiser à la membrane plasmique par sa liaison à RhoA activé (Chen et al., 2010).

### **III.5.1.2. Spécificité des GEF.**

La connaissance des spécificités des GEFs vis-à-vis des différents membres des GTPases Rho est encore incomplète. Certaines possèdent une activité spécifique pour une seule sous famille de GTPase comme KIAA0380 (Rümenapp et al., 1999), p114RhoGEF pour RhoA (Blomquist et al., 2000), Tiam-1, Sos1 et Sos2 pour Rac ou Fgd1 et Intersectin 1 pour Cdc42. D'autres peuvent activer plusieurs types de GTPases Rho comme Vav1 (pour Cdc42, Rac et Rho), Dbl (pour Rho et Cdc42) ou Trio DH1 (pour Rac et RhoG) (pour revue (Schmidt and Hall, 2002)). Il est important de noter des disparités de spécificité selon le contexte. Par exemple, Tiam-1 active Rac, Cdc42 et Rho *in vitro*, alors que des expériences de surexpression de cette GEF dans des fibroblastes montrent que les effets observés sont la conséquence d'une activation sélective de Rac-1 par Tiam-1. Ce résultat est corrélé à une co-localisation de la GEF et de sa cible à l'endroit où a lieu l'effet biologique c'est-à-dire dans les « ruffles » membranaires (Michiels et al., 1995).

D'une manière générale, les GEFs possédant un module DH-PH interagissent avec les domaines switch I et II des GTPases Rho. Ceci est bien décrit par la résolution

cristallographique du couple PDZRhoGEF – RhoA (Derewenda et al., 2004). Les principales interactions se situent entre les domaines CR1 et CR3 du domaine DH de la GEF et les résidus Tyr<sup>34</sup>, Thr<sup>37</sup> et Val<sup>38</sup> du switch I de RhoA, ainsi que les résidus Trp<sup>58</sup> et Arg<sup>68</sup> du switch II de RhoA (figure 11). Ces interactions expliquent comment les GEFs distinguent la conformation inactive des GTPases puisqu'elles se lient sur les domaines dont la position est dépendante de la nature du nucléotide lié. Cette GEF est spécifique de la sous-famille RhoA et l'étude réalisée *in vitro* par Chen montre que cette protéine se lie à RhoA et RhoB (Chen et al., 2010).



**Figure 11: structure du complexe RhoA – domaines DH-PH de PDZRhoGEF.** RhoA est indiqué en jaune avec ses deux domaines switch en violet. Le domaine DH est indiqué en vert avec ses régions CR en vert foncé. Le domaine PH est indiqué en rouge. Les deux images montrent le même complexe après deux rotations de 180°.

(Derewenda et al., 2004)

La plupart des GEFs n'ont été testées que sur les GTPases Rho les plus étudiées, à savoir RhoA, Rac1 et Cdc42 et on dispose de peu de données quant à des spécificités particulières à l'intérieur d'une sous-famille.

Pourtant, des expériences de sur-expression de la GEF XPLN dans des cellules HeLa et NIH3T3 montrent que cette protéine se lie à et active RhoA et RhoB mais pas RhoC (Arthur et al., 2002). Cette GEF contient un module DH-PH et par conséquent doit distinguer la conformation inactive des deux Rho en se liant par l'intermédiaire de leurs switches. L'alignement des séquences primaires de ces trois protéines Rho montre qu'elles diffèrent par un seul acide aminé en position 29 (switch-I) : RhoB se distinguant de RhoA et RhoC par un acide glutamique. Cette différence ne peut pas rendre compte de la spécificité de XPLN.

Une autre GEF possède une spécificité à l'intérieur de la sous-famille RhoA. Contrairement à XPLN, GEF720 est capable d'activer uniquement RhoA sans aucun effet sur RhoB et RhoC dans des expériences de double hybride de levure. Cette GEF est capable d'activer RhoA comme le montre l'apparition de fibres de stress dans des expériences de sur-expression dans des cellules de fibroblaste de rat (De Toledo et al., 2001). Cette protéine possède un module DH-PH et l'expression de son ARNm est uniquement cérébrale. Nous n'avons pas d'explication sur cette spécificité. Enfin, la smgGDS se révèle être sélective de RhoA et RhoC dans des expériences réalisées *in vitro* : cette sélectivité fait intervenir les régions polybasiques C-terminales de ces dernières alors que RhoB en est dépourvue (Hamel et al., 2011).

Les protéines GEFs sont finement régulées et chaque membre possède probablement un mécanisme unique d'activation. Néanmoins, il existe des principes généraux communs de régulation entre les différentes GEFs. L'activation des GEFs pourrait impliquer l'ouverture d'une boucle auto-inhibitrice de la protéine grâce à des étapes de phosphorylation ou de liaisons à d'autres protéines mais ces mécanismes ne sont pas encore bien élucidés. Les étapes de phosphorylation ou de liaison avec des protéines pourraient activer les GEFs sans impliquer de boucle auto-inhibitrice ou conduire à la réversion de l'activation (Schmidt and Hall, 2002).

La sub-localisation des GEFs est très probablement un aspect clé de leurs régulations et dans certains cas, l'activation des GEFs semble intimement liée à un mécanisme de relocalisation. L'activation de Rac-1 par Tiam-1 est dépendante de la relocalisation de cette GEF du cytoplasme vers la membrane plasmique après stimulation des cellules par du sérum ou du platelet derived growth factor (PDGF). GEF-H1 interagit directement avec les microtubules entraînant une inhibition de sa capacité à activer RhoA localisé à la membrane plasmique. La dépolymérisation de la tubuline suite à un stimulus a pour conséquence une augmentation de l'activation de RhoA par GEF-H1 (Rossman et al., 2005).

### *III.5.2. Les RhoGAPs*

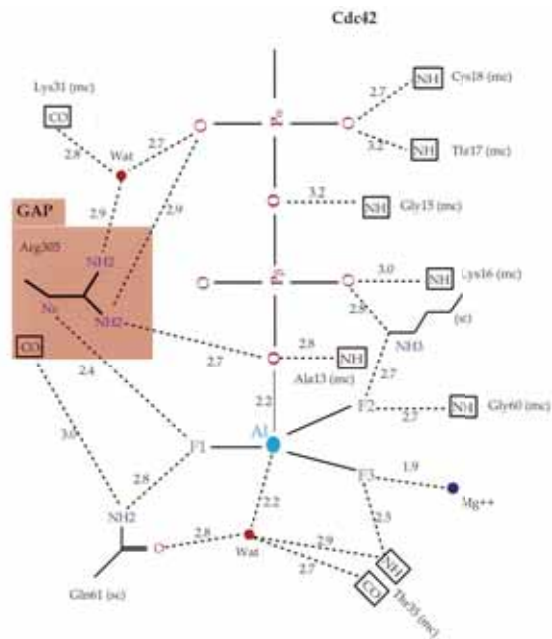
Le passage de l'état actif (GTP) à l'état inactif (GDP) des protéines Rho s'effectue par l'hydrolyse du GTP. Nous avons vu que ces protéines possèdent une activité GTPasique intrinsèque. Cependant, cette activité est fortement augmentée par l'action des RhoGAPs

(Rho GTPases Activating Proteins) qui sont un élément négatif de la régulation du cycle des petites GTPases. La famille des RhoGAPs est définie par la présence dans la séquence primaire d'un domaine conservé « RhoGAP » responsable de leur activité facilitant l'hydrolyse du GTP. Ce domaine est constitué d'environ 150 acides aminés et partage 20% d'homologie avec les autres membres de la famille. Il existe plus de 70 GAPs codées dans le génome humain (Kandpal, 2006).

La régulation des protéines GAP n'est pas bien connue et est probablement due à la présence de domaines supplémentaires au domaine RhoGAP tels que SH2, SH3, DH, PH, des domaines de liaison à l'actine, à la calmoduline, domaines PDZ, SAM, START entre autres. Plusieurs modalités de régulation sont possibles comme notamment la phosphorylation par Src dans le cas de p190RhoGAP, ou des interactions avec des phospholipides et des protéines (Moon and Zheng, 2003).

#### *III.5.2.1. Mécanisme d'hydrolyse*

Le mécanisme par lequel les GAPs activent l'hydrolyse du GTP a été particulièrement bien décrit à partir de la résolution aux rayons X des interactions entre Cdc42GAP et Cdc42-GDP co-cristallisées en présence de fluorure d'aluminium (AlF<sub>3</sub>), la présence de ce composé permettant de mimer l'intermédiaire réactionnel d'hydrolyse du GTP (Nassar et al., 1998). La GAP interagit principalement avec les switch I et II de Cdc42 ce qui permet de comprendre sa spécificité pour la conformation active de la GTPase. Notons également l'implication des résidus Glu<sup>91</sup> et Asn<sup>92</sup> appartenant à l'hélice A3 qui n'est pas concernée par le changement de conformation de la GTPase. Le résidu arginine 305 du domaine GAP vient se positionner sur le site actif de Cdc42 au moyen d'une liaison hydrogène avec le résidu glutamine 61 qui pointe vers le phosphate  $\gamma$  du GTP. Cette interaction aboutit à une stabilisation du switch II accélérant ainsi la réaction catalytique (**figure 12**).



**Figure 12:** vue de la région impliquée dans l'hydrolyse du GTP dans le complexe Cdc42GAP-Cdc42 en présence de GDP et de AIF3 mimant l'intermédiaire réactionnel. Cdc42GAP est en orange, l'atome d'aluminium en bleu, les atomes de fluor en vert, les molécules d'eau en rouge, l'atome de magnésium en bleu foncé. Les liaisons hydrogènes sont indiquées en pointillé, accompagnées des distances interatomiques. Le carbonyle de la chaîne peptidique de l'Arg305 de Cdc42GAP interagit avec la Gln61 de Cdc42 et stabilise le switch-II de la GTPase.

(Nassar et al., 1998)

### III.5.2.2. Spécificité des GAP

De la même manière que les RhoGEFs, le spectre d'activité des RhoGAP est large *in vitro*. Certaines reconnaissent plusieurs RhoGTPases avec une affinité préférentielle : citons comme exemple PARG1 qui se lie préférentiellement à RhoA puis à Rac et cdc42, ou bien Graf pour cdc42 et RhoA. D'autres sont spécifiques d'une sous-famille comme Myr5/myr7 pour RhoA, ou SrGAP1-3 pour cdc42 (Moon and Zheng, 2003).

Peu d'études décrivent une spécificité différentielle de GAPs vis-à-vis des différents membres d'une sous-famille. P190 est une GAP qui possède une spécificité pour RhoA observée par micro-injection dans des fibroblastes (Haskell et al., 2001). Une étude par mutagenèse des résidus de RhoA impliqués dans la liaison avec p190 met en évidence l'importance des acides aminés Tyr<sup>34</sup>, Thr<sup>37</sup> et Phe<sup>39</sup> qui appartiennent au switch I. Comme dans l'interaction Cdc42-Cdc42GAP, cette étude montre également l'implication de l'hélice A3 par l'intermédiaire de l'Asp<sup>90</sup> dans cette liaison (Li, 1997). L'alignement des séquences primaires de RhoA, RhoB et RhoC (figure 7) indique que tous ces résidus sont conservés pour ces trois membres, laissant supposer l'absence de spécificité de P190 à l'intérieur de cette sous-famille (ce que rapporte Healy (Healy et al., 2008)).

DLC-1 est une GAP qui se lie préférentiellement à RhoA mais aussi à cdc42. La comparaison des mesures *in vitro* d'hydrolyse du GTP de RhoA, RhoB et RhoC en présence de DLC-1,

montre l'absence de spécificité de cette GAP pour les membres de cette sous-famille (Healy et al., 2008). GRAF a été décrite comme inactivant RhoA et Cdc42 *in vitro*. Des micro-injections de cette GAP dans des fibroblastes mettent en évidence une sélectivité d'inactivation pour RhoA ayant pour conséquence la disparition des fibres de stress. Par contre, la sur-expression de GRAF dans des cellules PC12 différenciées par le NGF a pour effet d'augmenter l'activité de RhoA qui se traduit par une rétraction des neurites (Taylor et al., 1999). Il semble donc que les paramètres d'interaction moléculaire et de contexte cellulaire interviennent dans la définition d'une spécificité d'action.

### *III.5.3. Les RhoGDI*

À la différence des RhoGEFs et des RhoGAPs, il y a peu de RhoGDIs connus. Trois protéines présentant une forte homologie de séquences ont été décrites à ce jour : RhoGDI-1(a), RhoGDI-2 (aussi appelé LyGDI ou D4GDI) et RhoGDI-3(g). RhoGDI-1 est le plus abondant chez les mammifères ; son expression est ubiquitaire. Il est capable de former des complexes cytoplasmiques avec la plupart des membres de la famille des Rho (Dovas and Couchman, 2005). A l'inverse, RhoGDI-2 est retrouvé de façon prédominante dans les cellules hématopoïétiques, sa spécificité n'est pas bien connue. Le 3<sup>ème</sup> membre, RhoGDI-3 est une protéine faiblement exprimée qui interagit *in vitro* avec plusieurs Rho GTPases comme les autres RhoGDIs mais semble être spécifique de RhoB et de RhoG (Closson, 1996). Son expression est cérébrale, pulmonaire, pancréatique, rénale et testiculaire. Il diffère des autres RhoGDIs par une extension peptidique dans la partie N-terminale responsable de sa localisation unique au niveau de l'appareil de Golgi (Dransart et al., 2005).

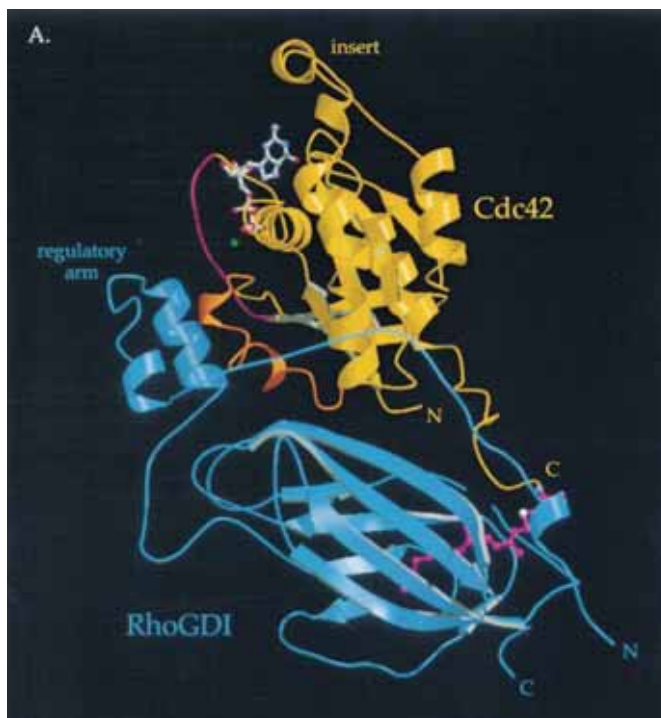
Les protéines RhoGDIs interviennent dans la régulation du cycle des GTPases sur trois étapes : (1) elles inhibent la dissociation du nucléotide des GTPases (en général du GDP), (2) elles extraient les protéines Rho des membranes et les séquestrent dans le cytoplasme en masquant l'isoprényl de telle sorte que ces dernières ne puissent pas s'ancrer dans la membrane, (3) elles contrôlent la liaison des GTPases à leurs régulateurs (GEFs et GAPs). Elles auraient également un rôle dans l'adressage de la protéine Rho au compartiment membranaire adapté : ceci a été décrit pour RhoGDI-3 qui inactive RhoG et l'adresse à l'appareil de Golgi (Brunet et al., 2002).



### III.5.3.1. Mécanisme d'inhibition des GTPases par RhoGDI

Des résolutions aux rayons X de co-cristallisations entre les GTPases Rho isoprénylées et RhoGDI-1 et 2 ont été réalisées RhoGDI-1-RhoA(GDP) (Longenecker et al., 1999), RhoGDI-1-cdc42(GDP) (Hoffman et al., 2000), RhoGDI-1-Rac1(GDP) (Grizot et al., 2001), RhoGDI-2-Rac-2(GDP) (Scheffzek et al., 2000). Elles ont permis de comprendre comment ces derniers exercent leur rôle inhibiteur.

Les deux domaines de RhoGDI sont bien définis : le domaine C-terminal constitue la poche hydrophobe dans laquelle se loge l'extension isoprényle, le domaine N-terminal interagit principalement avec les switches I et II de la GTPase (figure 13). Le switch I participe à la liaison essentiellement par le résidu Thr<sup>37</sup> de RhoA (Longenecker et al., 1999). Cet acide aminé joue un rôle majeur dans l'échange de nucléotide puisqu'il établit une liaison avec le magnésium et explique ainsi l'inhibition de l'activation des Rho par les GEFs lorsqu'elles sont liées au RhoGDI. D'autre part, la liaison du domaine N-terminal de RhoGDI-1 avec RhoA s'effectue également par les résidus Leu<sup>69</sup>, Pro<sup>71</sup>, Leu<sup>72</sup> et Pro<sup>75</sup> appartenant au switch II, ainsi que His<sup>105</sup>, Phe<sup>106</sup> et Pro<sup>108</sup> de l'hélice  $\alpha$  adjacente. La résolution de la structure de dix résidus de la partie C-terminale n'est pas apparente dans ce cristal. Ceux-ci sont visibles dans une étude de co-cristallisation de Cdc42 et RhoGDI-1 où deux résidus (Lys<sup>184</sup> et arg<sup>186</sup>) de la GTPase forment des liaisons hydrogènes avec le partenaire (Longenecker et al., 1999).



**Figure 13: structure du complexe Cdc42-GDI.** Représentation ruban de GDI en bleu et Cdc42 en jaune. Les domaines switch-I et switch-II de Cdc42 sont indiqués en rouge et en orange respectivement. La cystéine carboxyméthylée et géranylgeranylée est représentée en rose, le GDP en bleu et l'atome de magnésium vert. On distingue les domaines N-terminal (regulatory arm) et C-terminal, dans lequel est enfoui l'isoprényle, du GDI.

(Hoffman, 2000)

### III.5.3.2. Spécificité de liaison des RhoGDIs aux GTPases

Bien qu'un des rôles majeurs des RhoGDIs est d'inhiber l'activité des GTPases, les RhoGDIs ne sont pas pour autant strictement spécifiques de la conformation inactive (liée au GDP) de ces protéines. La précipitation de complexes GDI-1-Rho surexprimés dans les levures indiquent que les protéines Rho sont liées au GDP (Hoffman et al., 2000), (Longenecker et al., 1999), ou dépourvues de nucléotide (Read et al., 2000). La protéine RhoGDI-3 se lie à RhoB(GDP) et RhoB(GTP) dans le modèle double hybride de levure, mais extrait uniquement la fraction RhoB(GDP) de la membrane dans les cellules Hela (Closson, 1996). Les données cristallographiques indiquent que la position du switch I de la conformation active de Cdc42 est incompatible avec la position de ce même switch dans les complexes RhoGDI-1-Cdc42(GDP) (Hoffman et al., 2000). La même observation a été faite à propos de RhoA pour laquelle l'affinité de RhoGDI-1 pour la forme liée au GDP est supérieure à celle liée au GTP (Longenecker et al., 2003).

Pourtant, des complexes cytoplasmiques tri-partites RhoGDI-1-Rac(GTP)-PAK ont été mis en évidence dans les cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney) révélant un rôle de RhoGDI-1 dans la translocation du complexe Rac1-effecteur et sa capacité à se lier à la forme active de Rac (Hansen and Nelson, 2001). La phosphorylation de RhoA(GTP) sur la Ser<sup>188</sup> a pour conséquence une augmentation de l'extraction de cette GTPase des membranes de lymphocytes, traduisant vraisemblablement un accroissement de l'association de cette dernière avec RhoGDI-1, bien que les comparaisons d'affinité pour les deux formes active et inactive soient réalisées *in vitro*. Ce mécanisme permettrait aux cellules d'interrompre prématurément l'activation des GTPases (Lang et al., 1996).

#### Spécificité de RhoGDI-1 :

Une étude d'expression de protéines de fusion GFP-Rho dans des cellules MDCK, montre que RhoGDI-1 se lie aux deux isoformes de Cdc42, Rac1, Rac2 et RhoA, ce qui n'est pas le cas pour RhoB et TC10. Ceci semble être dû d'une part à la palmitoylation de RhoB et de TC10 et d'autre part à la présence de deux résidus non polaires (Gln<sup>186</sup> et Gly<sup>188</sup> pour RhoB) qui ne peuvent pas établir de liaisons hydrogènes avec RhoGDI comme c'est le cas pour les autres GTPases citées (Michaelson et al., 2001).

Hormis la Phe<sup>106</sup>, on remarque que tous les résidus des Rho impliqués dans la liaison avec RhoGDI-1 sont conservés dans cette famille et donnent une explication à l'absence de spécificité de liaison de RhoGDI-1 aux différents membres de la famille des GTPases Rho.

Spécificité de RhoGDI-3 :

La forme murine de cette protéine a été décrite comme étant spécifique de RhoB et RhoG dans le système double hybride de levure et capable d'extraire RhoB sur-exprimé des membranes de cellules Hela (Closson, 1996). Une étude de Brunet et ses collaborateurs rapporte que, dans ces mêmes cellules, RhoGDI-3 n'interagit pas avec RhoB mais uniquement avec RhoG lorsque celles-ci ne sont pas sur-exprimées (Brunet et al., 2002). Il semblerait donc que la spécificité de RhoGDI-3 ne concerne que RhoG.

#### *III.5.4. Les effecteurs*

Une fois activées, ancrées et localisées dans leurs compartiments membranaires cibles, les protéines Rho interagissent avec les effecteurs pour entraîner les cascades de signalisation. A ce jour, plus de 70 effecteurs potentiels ont été identifiés.

La modification de la boucle intra-moléculaire d'auto-inhibition des effecteurs est le mécanisme le plus commun de leur activation par les RhoGTPases. Cette modification permet l'exposition de domaines fonctionnels des effecteurs pour leurs substrats (Bishop and Hall, 2000). D'autres mécanismes d'activation ont été décrits nécessitant la conjonction de plusieurs événements comme la phosphorylation de PKN, son association à des phospholipides et à RhoA. Dans d'autres cas, la liaison à la GTPase provoque la libération de l'effecteur d'un complexe inhibiteur (Wasf/Wave/Scar) (Bustelo et al., 2007).

Les effecteurs transmettent alors le signal par le biais de domaines fonctionnels comme les domaines Serine/thréonine kinase (Rhopilin, Rhotekin, diaphanous), lipides kinase (PI3K), phosphatase (MBS) ou de liaison à des protéines en aval (citron).

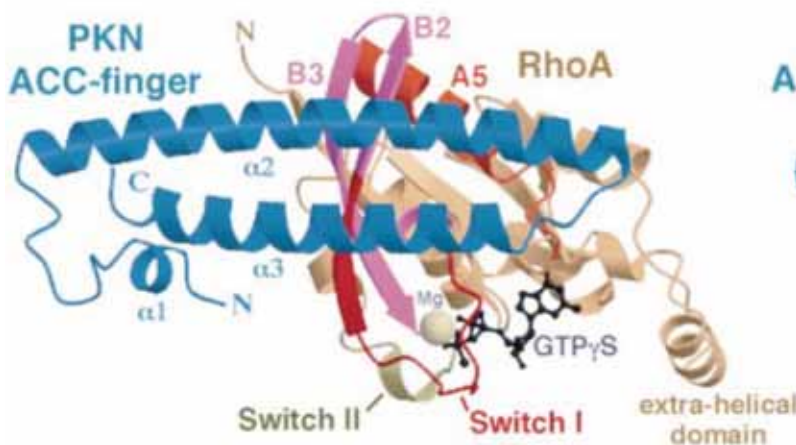
##### *III.5.4.1. Liaison des effecteurs aux GTPases Rho*

Les effecteurs possèdent des domaines de liaison aux GTPases Rho qui diffèrent selon le type de sous-famille auquel ils se lient. La majorité des effecteurs spécifiques des GTPases Rac et Cdc42 ont un domaine appelé CRIB (Cdc42/Rac-interactive binding). C'est le cas pour les effecteurs PAK1 (p21 Activated Kinase), ACK (Activated Cdc42-associated tyrosine Kinase) et WASP (Wiskott-Aldrich-Syndrome Protein) par exemple. Les effecteurs qui se lient à la sous-famille RhoA, PKN, rhotekin, rhophilin, citron, ROCKs par exemple, possèdent pour la plupart un domaine REM (Rho effector homology) composé de structures

ACC (anti-parallel coiled-coil finger), ou bien d'un domaine de type « armadillo repeat » dans le cas de mDia (mammalian Diaphanous). Tous ces effecteurs ont en commun d'interagir avec les GTPases Rho par l'intermédiaire des switchs I et II qui sont très homologues. Les résultats des études de mutagenèse ont permis d'identifier un acide aminé en position 40, occupé par un acide glutamique pour la sous-famille RhoA et un acide aspartique pour la sous-famille Rac/Cdc42, qui permet aux effecteurs de type CRIB de distinguer les deux groupes de GTPases Rho (figure 7) (Bishop and Hall, 2000).

Ces données ont été confirmées par les résolutions cristallographiques de complexes Rho-effecteur bien que des disparités existent dans la liaison des GTPases de la sous-famille RhoA avec les différents effecteurs.

La protéine effectrice PKN, ou PRK-1, possède trois domaines en N-terminal et un domaine kinase en C-terminal. Elle interagit fortement avec le switch-I et l'hélice A5 des GTPases Rho par l'intermédiaire de domaine ACC-1, et faiblement avec le switch-II et le feuillet  $\beta 3$  par l'intermédiaire du domaine ACC-2 (figure 14).



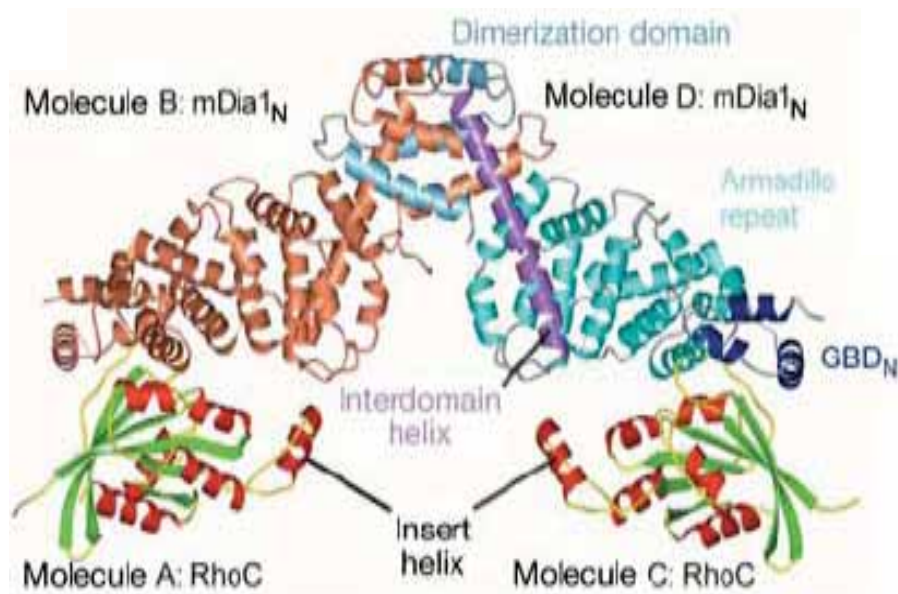
**Figure 14: structure du complexe RhoA-PKN.** Représentation ruban du domaine effecteur de PKN (bleu) lié à RhoA (brun). Le  $GTP\gamma S$  (noir) et le magnésium (beige) sont symbolisés par des boules et des bâtons. Les domaines de RhoA interagissant avec PKN sont indiqués en rouge (switch-I),  $\beta 1$  et  $\beta 3$  en violet et l'hélice  $\alpha 5$  en orange. Le switch-II est indiqué en vert. (Maesaki, 1999)

La sélectivité de PKN pour la conformation active de Rho trouve son explication dans le fait que la Tyr<sup>42</sup> de Rho(GDP) est exposée au solvant et provoque une gêne stérique pour la liaison de PKN, alors que cette tyrosine est cachée dans la partie hydrophobe de Rho(GTP) et permet l'établissement d'une liaison hydrogène entre l'effecteur et la Lys<sup>27</sup> de Rho. L'interaction de PKN avec le switch-II rend compte de l'inhibition de l'action des GAPs par compétition. Les résidus de RhoA impliqués dans l'interaction avec PKN sont différents de

ceux occupés aux mêmes positions dans Rac et Cdc42, ce qui rend compte de la sélectivité de PKN pour la sous-famille RhoA, (Maesaki et al., 1999). Par contre, PKN interagit avec RhoA, RhoB et RhoC bien que RhoB diffère des deux autres membres par la présence d'un acide glutamique à la place de la glutamine en position 29 qui est impliquée dans l'interaction avec l'effecteur.

On retrouve le même motif de liaison aux GTPases Rho dans l'effecteur ROCK-I. Pourtant les résidus de RhoA impliqués dans l'interaction avec l'effecteur sont différents de ceux concernés dans la liaison avec PKN. Dans ce cas, la spécificité de liaison de ROCK avec les GTPases de la sous-famille RhoA est conférée par le Glu<sup>40</sup> qui interagit avec la Lys<sup>1005</sup> de ROCK et permet l'établissement de liaisons hydrophobes avec les résidus Val<sup>38</sup> et Phe<sup>39</sup> en stabilisant l'orientation de l'effecteur (Dvorsky, 2003). Ceci confirme les observations obtenues par mutagenèse citées plus haut. Les acides aminés interagissant avec ROCK sont conservés pour les trois GTPases RhoA, RhoB et RhoC, ce qui explique son absence de spécificité pour l'une ou l'autre de ces protéines.

L'effecteur mDia (mammalian Diaphanous) possède un domaine de liaison aux protéines Rho de type « armadillo repeat » (domaine GBD pour G-proteins Binding Domain), trois domaines FH1, FH2 et FH3 (Formin Homology) qui interviennent dans l'assemblage des fibres d'actine, ainsi qu'un domaine DAD (Diaphanous Auto-inhibitory Domain) en position C-terminale. La détermination structurale du complexe RhoC-mDia a été effectuée sur des co-cristaux obtenus avec RhoC(GppNHp) et le domaine N-terminal de mDia contenant le GBD et le domaine de dimérisation (Rose et al., 2005). La partie N-terminale de mDia est exclusivement composée d'hélices  $\alpha$  et le complexe RhoC-mDia se présente sous forme de dimères (figure 15). Dans ce cas aussi les interactions entre les deux partenaires se font au niveau des switch I et II déterminant une spécificité pour la conformation active des protéines RhoA, RhoB et RhoC comme pour les effecteurs de type PKN.



**Figure 15:** vue générale du complexe *RhoC(GppNHp)-mDia<sub>N</sub>*. Représentation ruban du dimère *RhoC(GppNHp)-mDia<sub>N</sub>*. Le code couleur est indiqué pour une molécule *mDia<sub>N</sub>*, l'autre molécule est représentée en marron. L'armadillo repeat est en bleu-vert, l'hélice inter-domaine en violet, le domaine de dimérisation en bleu. Les feuillets  $\beta$  de *RhoC(GppNHp)* sont en vert et les hélices en rouge.

(Rose, 2005)

### III.5.4.2. Spécificité des effecteurs à l'intérieur de la sous-famille RhoA

Les données disponibles sur la spécificité de liaison des effecteurs vis à vis des membres de la sous-famille RhoA proviennent essentiellement d'études d'interaction révélées par le système double hybride de levure, complétées par des expériences de liaison effectuées *in vitro* sur des protéines recombinantes ainsi que des résolutions cristallographiques. Tous les effecteurs n'ont pas encore été étudiés de ce point de vue.

L'effecteur rhotekin interagit préférentiellement avec RhoA et RhoC dans le système double hybride de levure et est capable de se lier à RhoA et RhoB actives recombinantes *in vitro* (Reid et al., 1996). L'effecteur rhophilin est spécifique de RhoA par rapport à RhoB et RhoC dans le système double hybride de levure et nous n'avons pas de données confirmant cette spécificité par des expériences d'interaction *in vitro* (Watanabe et al., 1996). L'effecteur citron interagit avec RhoA et RhoC mais pas avec RhoB dans le système double hybride de levure et se lie également à Rac mais pas à Cdc42 dans des expériences d'interaction *in vitro*

sur des protéines recombinantes (Madaule et al., 1995). Des études d'interaction suggèrent que ROCK-1 interagit plus fortement avec RhoC que RhoA dans les cellules de carcinome de colon HCT116, bien que ce différentiel d'interaction serait davantage la conséquence du taux d'expression de ces deux protéines que d'une différence d'affinité (Sahai and Marshall, 2002).

Peu d'exemples de spécificité de liaison d'effecteurs à un seul membre de la sous-famille RhoA ont été décrits.

L'effecteur p76<sup>RBE</sup> est similaire à la Rhophilin et possède un domaine PDZ. Il est impliqué dans la voie de signalisation de l'AMP cyclique. p76<sup>RBE</sup> se lie spécifiquement à RhoB(GTP) à l'exclusion de RhoA et RhoC dans le système double hybride de levure. De plus, des études de sur-expression des deux partenaires dans les cellules COS montrent que p76<sup>RBD</sup> interagit sélectivement avec le dominant actif RhoB<sub>Q63L</sub>, sans qu'il soit spécifié si la vérification a été effectuée dans cette expérience avec les dominants actifs de RhoA et RhoC (Mircescu et al., 2002).

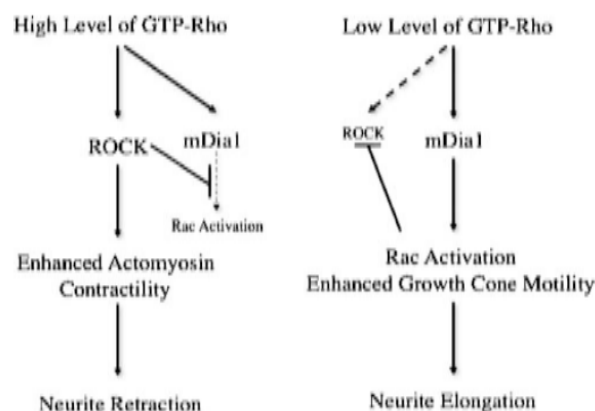
La protéine LC-2 (MAP1A Light Chain-2) interagit spécifiquement avec le mutant actif RhoB<sub>G14V</sub> mais pas avec RhoA<sub>G14V</sub> ni avec RhoC<sub>G14V</sub> dans le système double hybride de levure. Des expériences de « GST pull down » dans des cellules Hela montre que LC-2 se lie préférentiellement à GST-RhoB<sub>G14V</sub> recombinante, la liaison avec GST-RhoA<sub>G14V</sub> recombinante étant plus faible mais pas nulle (Lajoie-Mazenc et al., 2008). Il semble que la liaison de cet effecteur avec RhoB se fasse sur deux sites : un domaine impliqué dans le changement de conformation en fonction du nucléotide lié (probablement les switches I ou/et II) et le domaine C-terminal composé des 18 derniers résidus. MAP1A-LC2 est proposé comme un effecteur participant à la médiation des effets de RhoB sur le recyclage de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor).

#### **III.5.4.3. Spécificité des effecteurs conférée par la compartimentalisation ou une différence d'affinité**

La localisation sub-cellulaire des GTPases permet dans certains cas de rendre compte de leur spécificité d'action, ce qui est le cas pour les membres de la sous-famille Rac (Rac1, Rac2 et Rac3). Rac1 et Rac3 sont exprimés de manière ubiquitaire tandis que Rac2 n'est présent que dans les cellules hématopoïétiques. Les protéines Rac1 et Rac2 présentent une homologie de 98% dans les domaines impliqués dans la liaison aux effecteurs et aux régulateurs. Elles diffèrent entre elles par la partie C-terminale qui est polybasique pour Rac1

et neutre pour Rac2. Leurs fonctions biologiques sont différentes dans les neutrophiles : contrairement à Rac1, Rac2 intervient dans la production d'ion superoxyde et dans le chimiotactisme. Cette différence de fonction paraît être la conséquence d'une différence de localisation sub-cellulaire des deux protéines : Rac2 se situe dans la périphérie de la cellule alors que Rac1 est distribuée de façon plus diffuse. L'inversion des parties C-terminales entre les deux protéines provoque une inversion de localisation et de fonction, montrant ainsi que le « choix » des partenaires de signalisation (probablement p67<sup>PHOX</sup> dans ce cas) dépend ici de la localisation de la GTPase plutôt que d'une différence de spécificité de liaison (Filippi et al., 2004).

Il existe dans la cellule un moyen de créer de la spécificité en jouant sur la différence d'affinité des partenaires. La chemokine SDF1a agit par un effet biphasique sur la croissance des neurites de neurones granulaires cérébelleux. Arakawa et ses collaborateurs montrent que cet effet passe par une augmentation de l'activité de Rho. SDF1a provoque une extension des neurites à faible concentration et une rétraction à forte concentration. Les effecteurs de Rho impliqués dans cet effet biologique sont ROCK pour la rétraction des neurites et mDia pour leur élongation. Les auteurs montrent que la forte concentration de SDF1a active ROCK et mDia avec pour conséquence une rétraction des neurites alors que la faible concentration stimule uniquement mDia et aboutit à une élongation des neurites (Arakawa et al., 2003) (figure 16). Ceci peut-être expliqué par la comparaison des affinités de ces deux effecteurs pour la forme active de Rho : 130 nM pour ROCK et 6 nM pour mDia (Narumiya et al., 2009).



**Figure 16: la signalisation dépend du taux local de Rho(GTP).** Arakawa et ses collaborateurs (Arakawa et al., 2003) montrent que, dans des neurones, un fort taux de Rho(GTP) induit une activation de ROCK et une contraction de l'actomyosine résultant en un retraction des neurites, tandis qu'un taux de Rho(GTP) faible active préférentiellement mDia et induit une activation de Rac qui provoque une élongation des neurites. (Narumiya 2009)



Les trois GTPases RhoA, RhoB et RhoC, bien que très homologues, ont des rôles différents dans la physiologie cellulaire. Les fonctions auxquelles elles participent se font par l'interaction avec de très nombreux partenaires (effecteurs et régulateurs) qui se situent en amont et en aval des cascades de signalisation. Nous avons vu qu'en règle générale chaque GTPase peut se lier à plusieurs partenaires et réciproquement chaque partenaire à plusieurs GTPases. Rares sont les cas décrits de liaison exclusive d'une GTPase pour un seul partenaire. La spécificité de transmission d'un signal donné requiert donc l'intervention de paramètres autres que la spécificité de liaison. Ceci est réalisé par l'intervention d'une organisation spatiale et temporelle de telle sorte que les différents éléments intervenant dans une cascade de signalisation soient présents au même endroit et en même temps pour que cet événement soit possible, en jouant sur des différences d'expression tissulaire, des différences de localisations cellulaires, des différences d'expression temporelle selon le stade de développement de l'individu.

Les études de spécificité des partenaires des GTPases de la sous-famille RhoA sont peu nombreuses. On est en droit de se poser la question de savoir si, au cours du temps, l'évolution s'est orientée vers l'introduction d'une organisation spatio-temporelle des acteurs d'une cascade de signalisation par économie du nombre de ceux-ci, ou si la très forte homologie de ces GTPases ne permet pas la sélection d'un biosenseur aux caractères de spécificité de liaison requis. Pourtant nous avons vu que certains effecteurs et régulateurs sont capables de se lier à RhoA actif à l'exclusion des deux autres membres de la sous-famille (GEF720), à RhoA et RhoC (smgGDS), ou bien sélectivement à RhoA et RhoB (GEF XPLN), ou encore à RhoB actif (LC-2) même si les interactions directes n'ont été mises en évidence que dans le système double hybride de levure c'est à dire hors du contexte naturel, ou bien sur des mutants actifs. Ajoutons à cela que la comparaison des données structurales des formes actives de RhoA et RhoC (nous ne disposons pas de celle de RhoB), suggère qu'il pourrait exister des différences entre ces deux protéines puisque contrairement à RhoA, RhoC peut adopter une conformation active partielle qui diffère de la conformation active totale par la position du switch-I (Dias and Cerione, 2007). Toutefois, ces observations ont été faites *in vitro* sur des protéines recombinantes, et on ne sait pas si cette conformation active partielle est pertinente *in vivo*.

Quoiqu'il en soit, tout cela suggère qu'il existe des différences dans les conformations actives de ces protéines, et nous en engage à concevoir des biosenseurs sélectifs de chacune d'entre elles.

*Tableau récapitulatif des spécificités de partenaires des GTPases Rho décrits dans le texte.*

<b>partenaires</b>	<b>nature</b>	<b>Domaine de liaison</b>	<b>spécificité</b>	<b>détermination</b>	<b>références</b>
<b>KIAA0380</b>	GEF	DH	RhoA <sup>(1)</sup>	<i>In vitro</i>	Rümenap et al., 1999
<b>p114RhoGEF</b>	GEF	DH	RhoA <sup>(1)</sup>	<i>In vitro</i>	Blomquist et al., 2000
<b>FGD1</b>	GEF	DH	Cdc42	<i>In vitro</i>	Zheng et al., 1996
<b>Tiam-1</b>	GEF	DH	Rac	<i>In vitro</i>	Michiels et al., 1995
<b>Vav-1</b>	GEF	DH	Cdc42, Rac, Rho	<i>In cellulo</i>	Olson et al., 1996
<b>Dbl</b>	GEF	DH	Rho, Cdc42	<i>In vitro</i>	Hart et al., 1994
<b>XPLN</b>	GEF	DH	RhoA, RhoB	<i>In vitro</i>	Arthur et al., 2002
<b>GEF720</b>	GEF	DH	RhoA	<i>In cellulo</i>	De Toledo et al., 2001
<b>smgGDS</b>	GEF	ARM	RhoA, RhoC	<i>In vitro</i>	Hamel et al., 2011
<b>P190</b>	GAP	RhoGAP	RhoA, RhoB, RhoC	<i>In cellulo</i>	Haskell et al., 2001
<b>DLC-1</b>	GAP	RhoGAP	RhoA, RhoB, RhoC	<i>In vitro</i>	Healy et al., 2008
<b>GRAF</b>	GAP	RhoGAP	RhoA, Cdc42	<i>In vitro</i>	Taylor et al., 1999
<b>RhoGDI-1</b>	GDI		Cdc42, Rac, RhoA	<i>In cellulo</i>	Michaelson et al., 2001
<b>Rhotekin</b>	Effecteur	REM	RhoA, RhoB, RhoC	<i>In vitro</i>	Reid et al., 1996
<b>Rhopilin</b>	Effecteur	REM	RhoA	<i>Double hybride</i>	Watanbe et al., 1996
<b>citron</b>	Effecteur	REM	Mal défini	<i>Double hybride In vitro</i>	Madaule et al., 1995
<b>ROCK-1</b>	Effecteur	REM	RhoA, RhoC	<i>In cellulo</i>	Sahai and Marshall, 2002
<b>P76<sup>RBE</sup></b>	Effecteur	HR1-RBD	RhoB	<i>Double hybride</i>	Mirescu et al., 2002
<b>MAP1A-LC2</b>	Effecteur	ND <sup>(2)</sup>	RhoB	<i>Pull down</i>	Lajoie-Mazenc et al., 2008

<sup>(1)</sup> pas de données pour RhoB et RhoC, <sup>(2)</sup> non déterminé.

## *IV- Méthodes d'études des GTPases Rho*

La dissection des voies de signalisation nécessite la mise au point d'outils spécifiques de telle sorte qu'ils atteignent le cœur de la cible sans modifier les autres éléments, afin que l'effet observé puisse être attribué à la conséquence de la modification de la cible et non à celle d'interactions non désirées.

La suite de ce chapitre consiste à dresser un panorama des outils utilisés dans l'étude des GTPases Rho.

Les différentes méthodes d'étude sont regroupées selon qu'elles provoquent une modification de l'expression de la protéine étudiée (une diminution ou une augmentation), son activation ou son inhibition (ceci sans affecter la concentration de cette protéine). Nous examinerons également les techniques permettant de mesurer leurs activations et visualiser la localisation des GTPases Rho dans les différents compartiments cellulaires. Enfin, nous aborderons les méthodes permettant d'apprécier la dynamique de leur activation spatio-temporelle.

### ***IV.1. Stimulation des voies de signalisation***

Ici nous nous intéresserons aux méthodes d'activation des cascades de signalisation par l'utilisation d'agonistes naturels.

Suivant le type de stress exercé sur les cellules, celles-ci répondent par l'activation de voies différentes qui pour certaines impliquent les protéines GTPases Rho. Les agents génotoxiques, les cytokines inflammatoires, les mitogènes (EGF, PDGF), l'acide lysophosphatidique (LPA), la bradykinine ainsi que les agents physiques comme les UVB sur les kératinocytes (Canguilhem et al., 2005), sont connus pour activer des voies impliquant les protéines Rho (Fritz and Kaina, 2006).

Des facteurs de croissance comme le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou l'insuline induisent la formation des lamellipodes et des repliements membranaires riches en actine via l'activation de Rac (Fritz and Kaina, 2006).

Le LPA agit par l'intermédiaire de quatre RCPGs et active plusieurs voies de signalisation cellulaire via les GTPases RhoA et RhoB (Gampel and Mellor, 2002), Rac et

Cdc42, ainsi que la phospho-lipase C, l'adénylate cyclase et la cascade des Ras-MAP kinases (Moolenaar et al., 2004).

L'EGF active, via son récepteur, les protéines RhoA et RhoB suivant une cinétique bien déterminée (Gampel and Mellor, 2002).

L'action des UVB sur les kératinocytes provoque dans un premier temps une augmentation du taux de RhoB active suivie, dans un deuxième temps, d'un accroissement de son expression qui sont respectivement indépendant et dépendant de l'activation du récepteur de l'EGF (Canguilhem et al., 2005).

L'utilisation de ces agents permet d'étudier l'implication des GTPases Rho dans les voies de signalisation en relation avec l'environnement extra-cellulaire. Cependant l'interprétation des effets est dépendante de la multiplicité des voies activées.

## **IV.2. Modification de l'expression des protéines**

### *IV.2.1. Déplétion des protéines*

Il s'agit de diminuer considérablement la protéine étudiée jusqu'à ce que celle-ci ne soit plus détectable en agissant sur la transcription du gène (knockout ou KO de gène) ou sur la dégradation de l'ARNm par l'introduction de siRNA (small interfering RNA) dans la cellule. Il existe également des cellules cancéreuses qui possèdent une délétion d'un locus du génome contenant le gène d'intérêt.

### *IV.2.2. Inactivation du gène d'intérêt en agissant sur sa transcription*

Il existe plusieurs modèles de souris dans lesquelles les gènes codant des GTPases Rho ont été inactivés de manière constitutive ou inductible (*rac1, rac2, rac3, rhoG, rhoB et rhoC*) (Bustelo et al., 2007) ; (Heasman and Ridley, 2008). L'étude des animaux KO pour *rhoB* a permis de proposer un rôle de suppresseur de tumeur pour cette GTPase. La mise en culture de fibroblastes issus de ces animaux a permis de mettre en évidence le rôle de RhoB dans la motilité de ces cellules et le trafic des vésicules endocytaires (Bustelo et al., 2007) ; (Heasman and Ridley, 2008).

Cependant, l'obtention de tels animaux est conditionnée à leur survie lorsque le gène a été inactivé.

Des accidents génétiques peuvent résulter dans la délétion de loci du génome contenant des gènes d'intérêt. C'est le cas des cellules NCI-H2882 de cancer de poumon qui

ont un génotype  $\rho\text{hB}^{-/-}$  qui en font un outil d'étude des rôles de cette GTPase dans la signalisation cellulaire (Sato et al., 2007). Cependant, la délétion couvre une séquence d'ADN de 3,7 Mb comprenant onze gènes connus dont *rhoB*. L'interprétation des résultats obtenus avec cette lignée devra donc tenir compte de ce fait.

#### *IV.2.3. Inactivation post-transcriptionnelle du gène*

Il est possible d'utiliser des petits ARN interférents (siRNA) pour diminuer l'expression de gènes cibles dans des cellules de mammifères en culture (Elbashir et al., 2001). L'introduction de ces siRNA dans la cellule provoque une dégradation de l'ARNm auquel ils se lient de manière spécifique. Au laboratoire, la déplétion de RhoB dans des cellules bronchiques non-cancéreuses a permis de proposer un rôle de cette GTPase dans le pouvoir invasif plutôt que dans la prolifération des tumeurs du cancer du poumon (Bousquet et al., 2009).

Il est à noter que si le siRNA éteint exclusivement l'expression de la protéine étudiée, la cellule peut mettre en place, en réponse à cette inhibition, des voies adaptées de signalisation impliquant d'autres protéines ayant des fonctions proches et permettant une réponse de la cellule aux stimuli exercés.

#### *IV.2.4. Surexpression*

Cette méthode est utilisée pour connaître les effets biologiques de la protéine étudiée, par l'utilisation de mutants dominants positifs ou négatifs. Elle est aussi utilisée pour comprendre les conséquences des modifications post-traductionnelles.

##### *IV.2.4.1. Surexpression de dominants positifs*

Les mutants des GTPases RhoA, RhoB et RhoC possédant une substitution de la Gly<sup>14</sup> en Val<sup>14</sup> ou d'une Gln<sup>63</sup> en Leu<sup>63</sup> perdent leur capacité d'hydrolyse du GTP et leur sensibilité à la régulation par les GAPs (Longenecker et al., 2003). Ces 2 types de mutants conservent l'état biologiquement activé de la protéine et sont communément utilisés pour la recherche des fonctions cellulaires des protéines associées aux GTPases Rho. Ces protéines mutantes provoquent une stimulation persistante des cascades de signalisation lorsqu'elles sont

introduites dans les cellules. L'expression du mutant RhoB<sub>Q63L</sub> a par exemple permis de visualiser la localisation endosomale de l'effecteur PKN suite à son interaction avec cette GTPase activée (Mellor et al., 1998).

#### ***IV.2.4.2. Surexpression de dominants négatifs***

Les dominants négatifs des Rho sont utilisés pour définir les voies de signalisation qui régulent l'activité des Rho. Le mutant RhoA<sub>T19N</sub>, résultant de la substitution de la thréonine en position 19 par une asparagine, est supposé induire des fonctions de dominants négatifs grâce à son association augmentée avec les GEFs, avec pour conséquence l'inhibition de leurs interactions avec RhoA endogène (Strassheim et al., 2000). Cet événement perturbe les voies de transduction du signal empruntées normalement par la GEF. L'expression de ce mutant dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) permet de mettre en évidence, par des expériences de co-immunoprécipitation, son interaction préférentielle avec la GEF smgGDS (Strassheim et al., 2000).

Cependant, la GEF smgGDS interagit avec RhoA et RhoC (Hamel et al., 2011). Les effets biologiques observés en utilisant le mutant RhoA<sub>T19N</sub> pourraient donc être la conséquence de la perturbation de plusieurs voies de signalisation.

#### ***IV.2.4.3. Surexpression de mutants hypercyclants***

Ces mutants ont été sélectionnés pour leur capacité d'échange accéléré du GDP en GTP en conservant leur activité GTPasique, tout comme ils se comporteraient en présence d'une GEF active de manière constitutive.

La GEF Dbl active Rac, Cdc42 et RhoA. En surexprimant les mutants hypercyclants de chacune de ces GTPases dans une cellule (Rac<sub>F28L</sub>, cdc42<sub>F28L</sub>, RhoA<sub>F30L</sub>), Lin et ses collaborateurs ont pu étudier l'effet oncogénique de cette GEF sur chaque GTPase individuellement (Lin et al., 1999). Ils ont ainsi conféré une certaine spécificité à la protéine étudiée en modifiant ses substrats.

#### ***IV.2.4.4. Surexpression de mutants des séquences de prénylation***

La modification des séquences CAAX des GTPases permet de modifier le type de prénylation que subiront ces protéines (géranylgeranyl ou farnésyl). La surexpression de ces mutants permet de mesurer l'importance du type de prénylation sur l'activité biologique de ces derniers.

Au laboratoire, Allal et ses collaborateurs ont montré que les fonctions de transformation et d'organisation du cytosquelette par la protéine RhoA nécessitent sa prénylation mais que le type de prényl n'est pas important (Allal et al., 2000).

D'autres études ont montré que le mutant RhoB-CAIM (boîte -CAAX codant pour la farnésylation) est capable d'augmenter la survie des cellules NIH-3T3 après irradiation par rapport aux mutants RhoB-CLLL (boîte -CAAX codant pour la géranylgeranylation) ou RhoB délété de la boîte CAAX (non prénylable) (Milia et al., 2005).

L'expression de protéines exogènes pose la question du contrôle de leur expression. Michaelson et Philips observent des localisations aberrantes des protéines chimères GFP-Rac1 et GFP-Cdc42 lorsqu'elles sont surexprimées. Ils concluent que cela est la conséquence d'une saturation des capacités de séquestration dans le cytoplasme par RhoGDI1, puisque la surexpression concomitante de ce dernier rétablit une localisation normale des GTPases (Michaelson and Philips, 2006) (Garcia-Mata et al., 2011).

Ces observations obligent à interpréter avec prudence les résultats obtenus par surexpression de protéines exogènes.

### **IV.3. Méthodes d'activation et d'inhibition des GTPases Rho**

Il s'agit ici d'activer ou d'inactiver la protéine d'intérêt sans modifier son expression cellulaire.

#### *IV.3.1. Inactivation par suppression de modifications post-traductionnelles*

Les effets anti-cholestérolémiants des statines ont une action anti-prénylation sur les protéines Rho en inhibant la néo-synthèse du groupement prényl. Un traitement par la lovastatine est capable d'empêcher la localisation membranaire de la protéine RhoA (Allal et al., 2000).

Il est possible d'inhiber spécifiquement le type de prénylation en utilisant des inhibiteurs des enzymes responsables de cette modification post-traductionnelle des

GTPases : les farnésyl transférase (FTase) sont inhibées par les FTI (inhibiteurs de FTase), tandis que les géranylgeranyl transférase (GGTases) le sont par les GGTI (inhibiteurs de GGTase). L'action de ces agents pharmacologiques a pour conséquence d'altérer les capacités d'ancrage aux membranes des GTPases, inactivant ainsi ces dernières (Walker and Olson, 2005). Des travaux du laboratoire ont montré que le GGTI-298 inhibe l'activité de RhoB et perturbe la formation des fibres de stress et des points focaux d'adhésion dans les cellules NIH-3T3 (Allal et al., 2000).

Cependant, l'inhibition de la prénylation par ces agents pharmacologiques influence l'activité de toutes les protéines normalement prénylées (Rho, Ras...). Ils manquent de spécificité d'action. La différence entre les temps de demi-vie des protéines prénylées peut conférer à la méthode une certaine spécificité : l'inhibition de la prénylation affectera dans un premier temps l'activité d'une protéine à demi-vie courte, et peu celle dont le « turn over » est plus long.

#### *IV.3.2. Activation et inactivation par les régulateurs*

Il est possible d'étudier les GTPases Rho en surexprimant leurs régulateurs.

La surexpression de la GEF XPLN dans des cellules NIH3T3 active RhoA et RhoB et provoque une augmentation des fibres de stress et des points focaux d'adhésion. Cependant, cette méthode ne permet pas l'étude d'une GTPase unique par manque de spécificité du régulateur.

Cet inconvénient a été en partie contourné en surexprimant la p190GAP, qui inactive RhoA, RhoB et RhoC, en fusion avec le domaine C-terminal de chacune de ces GTPases. Le régulateur est alors co-localisé avec la Rho correspondante, ce qui permet de palier son manque de spécificité (Wang et al., 2003). Cependant, les auteurs soulignent l'importance du contrôle du taux d'expression de ces chimères qui peut nuire à la spécificité et à l'efficacité de l'outil.

#### *IV.3.3. Inhibition des effecteurs*

Les protéines Rho transmettent le signal en interagissant avec différents types d'effecteurs. En bloquant l'action des effecteurs, il est possible de bloquer l'effet induit par les protéines Rho. Le composé Y-27632 est capable d'inhiber la famille des ROCKs qui sont



des protéines serine-thréonine kinases, effecteurs spécifiques de la sous-famille des protéines RhoA, B et C (Fritz and Kaina, 2006).

#### *IV.3.4. Modulation de l'activité des Rho par les toxines bactériennes*

Les GTPases Rho sont les cibles de toxines bactériennes dont les effets activent ou inactivent ces protéines (Lerm et al., 2000), (Cui and Shao, 2011).

La C3 exoenzyme isolée à partir de *Clostridium botulinum* inhibe spécifiquement les protéines RhoA, RhoB et RhoC par ADP-ribosylation de l'asparagine en position 41. Les effets bloquants qui en découlent ne seraient pas dûs à la perturbation des interactions des Rho avec les effecteurs et les régulateurs GEFs et GAPs, mais à la séquestration des Rho dans les complexes Rho/RhoGDI (Lerm et al., 2000). Beaucoup d'études de l'implication des Rho dans la motilité ont été faites en utilisant la C3 exoenzyme (Wheeler and Ridley, 2004).

Il existe aussi des toxines bactériennes activatrices : les CNFs (Cytotoxique Necrotic Factors). Les CNFs agissent par déamidation de la glutamine en position 63 de RhoA et en position 61 de Rac et Cdc42. Le CNF1 d'*E.coli* et CNF<sub>Y</sub> de *Yersinia pseudotuberculosis* sont des activateurs de RhoA, Rac et Cdc42 *in vitro*, mais leurs spécificités divergent dans le contexte cellulaire. Contrairement à CNF1, CNF<sub>Y</sub> active spécifiquement RhoA dans les cellules Hela et les neurones de l'hippocampe de rat. Ceci est confirmé par des études d'immunoprécipitation (Hoffmann et al., 2004). Par contre, il n'y a pas de données concernant la spécificité du CNF<sub>Y</sub> vis à vis des membres de la sous-famille RhoA.

### **IV.4. Méthodes d'étude de la localisation des GTPases Rho**

#### *IV.4.1. Localisation des GTPases endogènes par des anticorps*

L'activité physiologique et pathologique des protéines Rho dépend de leur localisation tissulaire et sub-cellulaire. Une gamme d'anticorps polyclonaux et monoclonaux spécifiques des GTPases RhoA, RhoB et RhoC commercialisés permettent la visualisation de ces différentes localisations.

Mazières et ses collaborateurs ont montré que l'expression de RhoB diminue au cours de la progression du cancer du poumon en comparant des marquages par immunofluorescence

avec un anticorps monoclonal anti-RhoB sur des coupes de tissus sain et cancéreux (Mazieres et al., 2004).

La même technique d'immunofluorescence appliquée à des cellules en culture a permis de visualiser la colocalisation de RhoB et de MAP1A/LC2 sur des endosomes (Lajoie-Mazenc et al., 2008).

Cette technique permet de visualiser l'expression des protéines Rho, mais ne tient pas compte de leur état d'activation.

#### *IV.4.2. Localisation des GTPases par utilisation de protéines étiquetées*

Le défaut d'anticorps spécifiques ou d'affinité suffisante pour marquer les protéines endogènes peut être contourné en surexprimant des GTPases étiquetées qui seront ensuite repérées en utilisant des anticorps spécifiques de l'étiquette.

La micro-injection d'ADN codant les trois protéines RhoA, RhoB et RhoC en fusion avec le peptide c-myc dans des cellules MDCK et des cellules de fibroblaste de rat, couplée à l'utilisation d'un anticorps anti-c-myc, a permis de visualiser les différentes localisations de ces GTPases (Adamson et al., 1992). Cette étude a confirmé les données obtenues par fractionnement cellulaire : RhoA et RhoC sont majoritairement cytoplasmiques et en partie localisés à la membrane plasmique, tandis que RhoB est essentiellement situé sur les endosomes et faiblement à la membrane plasmique.

L'étiquette mise en fusion avec la GTPase à étudier peut être fluorescente dans le cas de la GFP. Ce fluorophore émet une fluorescence directement visible, sans fixation des cellules, et permet ainsi de suivre la localisation de cette protéine en temps réel dans des cellules vivantes. Cette technique permet des études fiables de co-localisation sans les artefacts de fixation. Les « bruits de fond » sont diminués et la résolution est meilleure (Michaelson and Philips, 2006).

Les limites de ces méthodes sont les mêmes que celles mentionnées pour la surexpression des différentes GTPases Rho.

#### *IV.4.3. Localisation par fractionnement sub-cellulaire*

Cette technique permet de déterminer les proportions de protéines liées aux membranes ou « libres » dans le cytosol. Selon le type d'extraction, on peut aussi localiser

précisément la sous-partie de membrane dans laquelle la protéine se trouve ainsi qu'une éventuelle translocation après stimulation (Michaely et al., 1999) ; (Michaelson et al., 2001). La révélation de la GTPase se fait par électro-immuno-empreinte avec un anticorps spécifique. Cette technique est lourde à mettre en œuvre mais présente l'avantage de localiser les protéines endogènes.

#### **IV.5. Quantification et localisation des GTPases Rho actives dans les cellules**

La connaissance de l'expression des GTPases Rho ne renseigne que partiellement sur les effets biologiques de ces dernières. La mesure et la localisation de la fraction active de ces protéines sont des paramètres importants pour la compréhension de leurs implications dans les voies de signalisation et suscitent beaucoup d'intérêt pour la mise au point de nouveaux outils.

##### *IV.5.1. Quantification des GTPases Rho actives*

Dans le but de pouvoir étudier l'activation des protéines Rho endogènes, Ren et ses collaborateurs ont mis au point un système de mesure de la quantité des protéines Rho activées dans un lysat cellulaire (Ren et al., 1999) ; (Ren and Schwartz, 2000). Ce système, nommé TRBD, permet de précipiter spécifiquement les formes liées au GTP des protéines Rho endogènes. Il est basé sur l'utilisation du Rho Binding Domain (RBD) de la Rhotekin, un des effecteurs des protéines Rho. Ce domaine se lie de façon spécifique aux protéines Rho(GTP). Le lysat cellulaire est incubé avec ce RBD, immobilisé sur des billes grâce à une étiquette GST, qui va précipiter par affinité les protéines Rho actives. Cette incubation se fait en présence d'une forte concentration en NaCl (500 mM) pour limiter les interactions polaires avec les GAPs qui inactivent les GTPases Rho. Les protéines Rho liées au RBD sont identifiées et quantifiées par immuno-électro-empreinte à l'aide d'anticorps spécifiques de chacune des trois protéines RhoA, RhoB et RhoC.

Cette technique nécessite des conditions strictes de température, de concentration en sel et de temps d'incubation pour être reproductible.

##### **IV.5.1. Localisation des GTPases actives**

Les domaines de liaison des effecteurs des GTPases Rho peuvent être exprimés en fusion avec la GFP et être utilisés comme biosenseurs pour visualiser la localisation cellulaire des GTPases actives. Ces biosenseurs ont été utilisés dans des expériences de blessure sur des MEFs (cellules embryonnaires de fibroblastes de souris) où des marquages *in situ* sur des cellules fixées et perméabilisées révèlent une localisation de RhoA activée à l'avant et à l'arrière des cellules en migration (Goulimari et al., 2005). Le même type d'expérience a mis en évidence une co-localisation de RhoA et Cdc42 au front de migration d'oocytes de xénope par micro-injection de sondes constituées des domaines de liaison aux GTPases de la rhotekin et de N-WASP respectivement (Benink and Bement, 2005).

L'inconvénient de ces biosenseurs réside dans leur manque de spécificité pour les membres de chaque sous-famille.

## **IV.6. Etude dynamique des GTPases Rho dans la cellule**

### *IV.6.1. La méthode FLIP*

La méthode FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching) consiste à inactiver la fluorescence de la protéine d'intérêt exprimée en fusion avec la GFP par un faisceau laser dans toute la cellule excepté le compartiment à étudier qui est masqué. On mesure ensuite la diffusion de la fluorescence à partir de ce compartiment qui correspond à la mobilité de la protéine d'intérêt. Moissoglu et ses collaborateurs ont appliqué cette technique à la mesure de la dissociation Rac-GFP de la membrane plasmique (Moissoglu et al., 2006). En comparant les constantes de dissociation apparentes de Rac-GFP de la membrane dans différentes conditions (RacG12V-GFP, coexpression de Rac-GFP avec la GEF Tiam constitutivement active, surexpression ou déplétion de RhoGDI), ces auteurs proposent des mécanismes d'activation et d'adressage à la membrane impliquant les GEFs, les complexes RhoGDI/Rac, avec la possibilité de l'implication d'autres facteurs.

Cette technique est cependant soumise aux limites inhérentes aux méthodes d'étude de GTPases par expression de protéines exogènes.

### *IV.6.2. Les sondes « Raichu »*

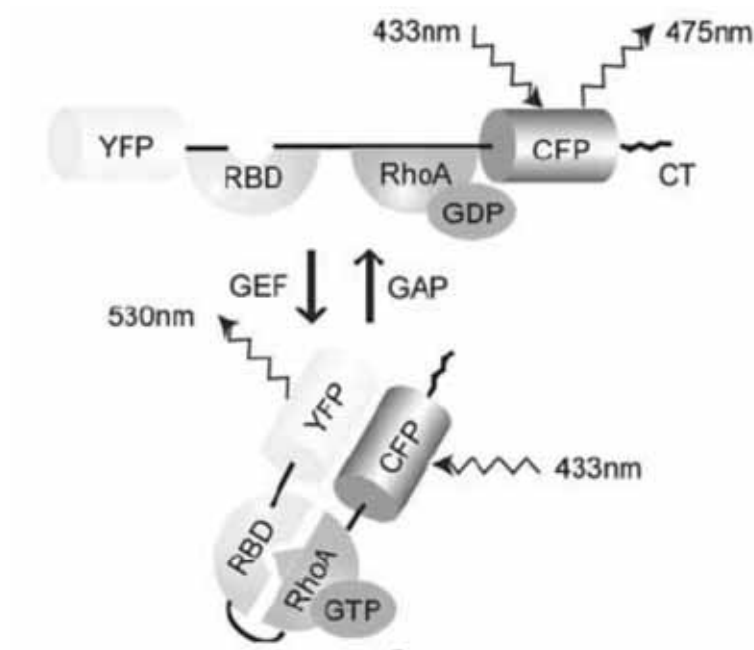
Les sondes « Raichu » (Ras and interacting protein chimeric unit) sont des sondes fluorescentes dont le principe est basée sur le transfert d'énergie de fluorescence par

résonance (FRET) entre un fluorophore D (donneur) et un fluorophore A (accepteur). Le choix des fluorophores doit satisfaire deux conditions pour que le phénomène de FRET soit possible : (1) les deux fluorophores possèdent des longueurs d'onde d'excitation et d'émission distinctes, (2) la longueur d'onde d'émission du fluorophore D correspond à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore A de telle sorte que l'excitation du fluorophore D provoquera une émission de photons de longueur d'onde correspondant à celle du fluorophore A. Cet événement ne sera possible que dans le cas où les deux fluorophores sont à une distance inférieure à 5nm l'un de l'autre, c'est-à-dire quasiment en contact. Les sondes « Raichu » sont constituées d'une GTPase en fusion avec le fluorophore D et du domaine de liaison de l'effecteur (GBD) correspondant avec le fluorophore A. Le GBD se liant spécifiquement avec la GTPase (GTP) provoquera un rapprochement des deux fluorophores qui aura pour conséquence le phénomène de FRET, révélant ainsi l'activation de la GTPase (Nakamura et al., 2006).

Yoshizaki et ses collaborateurs décrivent la construction de deux types de sonde Raichu-RhoA, l'une mesurant l'échange de nucléotides de RhoA par les GAPs et les GEFs, l'autre mesurant le taux de RhoA activée (Yoshizaki et al., 2003). La première consiste à exprimer une protéine chimère constituée de deux fluorophores en fusion avec le GBD de l'effecteur PKN et RhoA (figure 17). L'activité des GEFs et des GAPs provoquant l'activation ou l'inactivation de RhoA sera révélée par les mesures de FRET.

La seconde sonde est constituée de deux fluorophores exprimés en fusion avec le GBD de l'effecteur rhotekin sans la GTPase. Dans ce cas, la GTPase RhoA endogène liée au GTP viendra interagir avec la sonde et provoquera une diminution du signal FRET proportionnel à la quantité de GTPase active (Yoshizaki et al., 2003). Ces deux sondes sont exprimées en fusion avec le domaine C-terminal de RhoA ou de K-Ras afin d'obtenir leur ancrage membranaire.

L'utilisation de ces sondes permet de mieux comprendre la dynamique d'activation spatio-temporelle des GTPases. La sonde Raichu-RhoA (YFP-RBD-RhoA-CFP) révèle une activation de RhoA non seulement à l'arrière des cellules mais aussi au front de migration des cellules HeLa, MDCK et MEF, ainsi que dans les extensions cellulaires (lamellipodes, zones de repliement membranaire (« ruffles ») et filopodes) (Kurokawa and Matsuda, 2005) ; (Pertz et al., 2006).



**Figure 17: représentation schématique de la sonde Raichu-RhoA.** YFP et CFP sont les deux fluorophores, RBD est le domaine de liaison aux GTPases de PKN. Lorsque RhoA est liée au GDP, les deux fluorophores sont éloignés l'un de l'autre avec comme conséquence une absence de signal de FRET. L'activation de RhoA va rendre possible sa liaison avec le RBD ce qui aboutit à un rapprochement des deux fluorophores et l'apparition d'un signal FRET mesurable, c'est à dire que l'excitation de la CFP à 433 nm provoquera une émission de lumière à 530 nm et non plus à 475 nm.

(Yoshizaki, 2003)

Les inconvénients de la technique des sondes Raichu viennent du fait que leurs mises en œuvre nécessitent un matériel performant pour mesurer les variations d'émission des fluorophores, ainsi que de leur manque de spécificité puisque les effecteurs peuvent se lier à plusieurs GTPases d'une même sous-famille. De plus, la technique FRET est peu sensible. Enfin, les sondes Raichu doivent être exprimées après transfection des cellules et on s'expose alors aux problèmes de contrôles d'expression mentionnés plus haut.

#### **IV.6.3. Activation localisée des GTPases**

L'activation des GTPases est dépendante de leur co-localisation avec leurs régulateurs et leurs effecteurs. De récentes avancées dans la connaissance des mécanismes de translocations réversibles de protéines végétales induites par leur exposition à des longueurs

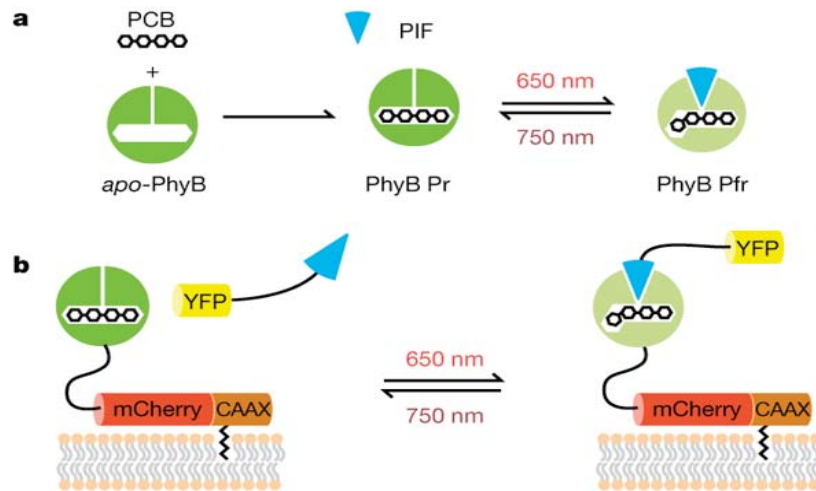
d'onde de lumière différentes a rendu possible l'activation de Cdc42 dans un endroit d'une cellule unique avec une résolution de l'ordre du micromètre. Le principe de la technique utilise la capacité de la protéine PhyB (*Arabidopsis thaliana* phytochrome B) à subir une photo-isomérisation réversible, après avoir lié un composé organique (phycocyanobiline ou PCB). Son exposition à la longueur d'onde de 650 nm lui permet de se lier à une protéine transactivatrice (PIF). Ce complexe subit alors une translocation nucléaire et régule la transcription de gènes cibles. L'exposition de ce complexe à 750 nm provoque l'inactivation de ce dernier par dissociation des deux protéines (figure 18) (Levskaya et al., 2009). La co-expression de PhyB en fusion avec un signal d'ancrage à la membrane et du domaine DH-PH de la GEF Tiam en fusion avec PIF permet une translocation membranaire de cette dernière sous l'effet d'un éclairage à 650 nm. La conséquence en est une activation localisée de Cdc42 qui aboutit à la formation d'un lamellipode à l'endroit de la stimulation lumineuse.

Cette technique recèle de nombreuses applications dans le guidage et l'établissement de connexions entre cellules. Elle nécessite un appareillage sophistiqué, l'expression de protéines chimères exogènes et l'utilisation d'une GEF ne confère pas de spécificité d'activation d'une GTPase Rho particulière. Par contre, ce manque de spécificité est en partie comblé par le choix du lieu de l'activation à l'intérieur de la cellule.

On pourrait envisager de l'appliquer à l'étude des effets de RhoB selon sa localisation, en activant cette GTPase dans différents compartiments cellulaires selon que le faisceau lumineux sera dirigé sur les endosomes ou la membrane plasmique.

Toutes ces méthodes ont permis de grands progrès dans la compréhension de l'implication des GTPases dans les différentes voies de signalisation. Cependant, elles n'autorisent pas, dans la plupart des cas, l'analyse d'une seule GTPase appartenant à une sous-famille Rho. Par exemple, quelle technique pourrait nous renseigner sur la localisation et le taux d'activation de RhoB endogène, et d'elle seule, dans une cellule présentant tel état physiologique ou pathologique ? Les méthodes actuellement disponibles renseignent « en creux » de manière spécifique par déplétion de la protéine d'intérêt, ou pèchent par leur manque de spécificité si elles ont recours à l'expression de partenaires exogènes ou à des agents pharmacologiques.

Notre projet est d'obtenir des outils (à priori des anticorps) capables de différencier chacune des GTPases RhoA, RhoB et RhoC sous forme active, afin de pouvoir quantifier leurs concentrations *in situ* dans des tissus tumoraux et/ou dans des cellules soumises à différents stimuli.



**Figure 18: utilisation de l'interaction phytochrome-PIF pour la translocation membranaire réversible de protéines.** (a) l'apo-PhyB lie de manière covalente le chromophore phycocyanobiline (PCB) et devient une holoprotéine sensible à la lumière (PhyB). PhyB subit des changements conformationnels réversibles sous l'influence de deux longueurs de lumière, aboutissant à une association avec la protéine PIF à 650 nm et une dissociation à 750 nm. (b) Cette hétéro-dimérisation peut être utilisée pour localiser à la membrane la protéine PIF étiquetée avec la YFP lorsqu'elle se lie à PhyB étiquetée avec la mCherry et ancrée à la membrane par l'intermédiaire du motif C-terminal CAAX de K-Ras.

(Levskaia, 2009)



## V- Stratégie de sélection

Les anticorps sont des molécules naturelles douées de propriétés de spécificité et d'affinité pour un antigène qui en font des outils de choix pour suivre et mesurer les concentrations des molécules biologiques que l'on souhaite étudier.

Jusqu'à un passé récent, ces anticorps étaient obtenus par immunisation d'un animal et récupération de l'antisérum contenant un mélange de plusieurs anticorps dirigés contre autant d'épitopes de l'antigène d'intérêt : on parle d'anticorps polyclonal. Il est possible d'enrichir l'antisérum en anticorps spécifiques de l'antigène par colonne d'affinité. Cependant, la quantité d'antisérum est par nature limitée au volume sanguin de l'animal utilisé. Cela implique d'immuniser un autre animal afin de renouveler la ressource au risque d'obtenir un antisérum aux caractéristiques différentes.

Un progrès considérable fut réalisé en 1975 quand Georges Köhler et César Milstein rapportèrent une technique de fusion cellulaire entre des myélomes et des lymphocytes B sains de souris préalablement immunisées avec des globules rouges de mouton. Ils obtenaient ainsi des clones de cellules hybrides, ou hybridomes, ayant conservé la propriété de la cellule cancéreuse à se multiplier indéfiniment et celle du lymphocyte B à produire un anticorps, dit monoclonal, capable de se lier aux globules rouges de mouton (Köhler and Milstein, 1975). L'avantage était double : l'obtention d'un anticorps unique dans des conditions quasi inépuisables alliée à la possibilité de sélectionner les anticorps dirigés contre un épitope d'intérêt. Ces deux approches font appel à l'immunisation d'un animal et ainsi aux limitations de cette voie : la molécule injectée doit être immunogène et non toxique ; de plus, si l'on veut obtenir un anticorps sélectif d'une conformation, l'intégrité du déterminant antigénique utile doit être assurée.

En effet, lors de l'immunisation, l'antigène est fixé par un lymphocyte B possédant à sa surface un anticorps capable de se lier spécifiquement à cet antigène. Le complexe anticorps-antigène est alors internalisé et l'antigène dégradé. Des fragments peptidiques de ce dernier sont ensuite présentés sur des molécules CMH de classe II. Des lymphocytes T sensibilisés par ce même antigène activent ce lymphocyte B déclenchant son expansion clonale (Janeway, C. A. and Travers, P., 1997). La conséquence de ce processus est que la conservation de la structure tridimensionnelle des déterminants antigéniques peut ne pas être conservée ce qui, dans notre cas, serait rédhibitoire. A ce propos, les anticorps monoclonaux anti-ras obtenus après immunisation, que ce soit au moyen de cellules exprimant un oncogène Ras (Furth et

al., 1982), au moyen de la protéine Ha-ras recombinante ou bien de peptides synthétiques portant les mutations de ras responsables de son effet oncogénique (Carney, W. P. et al., 1988), ne sont pas décrits comme étant sélectifs de la conformation active de ras. De plus, l'immunisation d'un lama par un mutant actif recombinant de la GTPase Ran n'a pas abouti à la sélection d'un anticorps sélectif de la conformation active de cette protéine (communication personnelle d'Aurélien Olichon). En dépit des limitations décrites plus haut, la technique par immunisation peut aboutir à la sélection d'anticorps sélectifs de la conformation d'une protéine. En effet, Haque et ses collaborateurs rapportent l'obtention d'un scFv sélectif de la forme activée de la protéine tyrosine phosphatase 1B par phage display à partir d'un répertoire immun de poulet (Haque et al., 2011). De plus, la société New East Biosciences a récemment mis sur le marché des anticorps anti-RhoA actif et anti-Rac1 actif qui semblent avoir été obtenus par immunisation puisqu'il s'agit d'anticorps monoclonaux de souris (catalogue New East Biosciences n°26904). Nous n'avons pas d'informations sur la spécificité de l'anticorps anti-RhoA vis à vis des protéines RhoB et RhoC. À ce jour, aucune publication ne décrit la méthode employée.

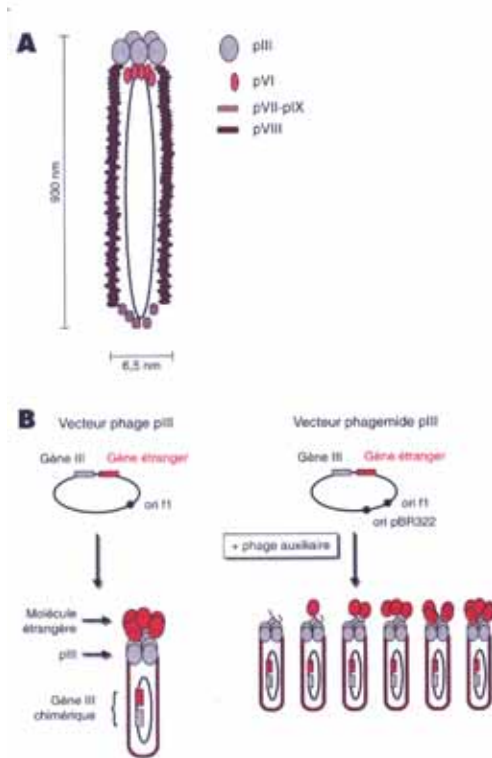
Cependant, l'essor de l'utilisation de biosenseurs suscite un intérêt croissant pour les techniques de sélection *in vitro* (Horn et al., 1999), (Tanaka and Rabbitts, 2003), (Nizak et al., 2003), (Goffinet et al., 2008), (Gao et al., 2009), (Rizk et al., 2011).

Nous avons choisi de mettre en œuvre une technique de sélection *in vitro* qui permet de mieux contrôler la conformation de l'antigène, d'effectuer une maturation d'affinité *in vitro* analogue à celle du système immunitaire et d'opérer une sélection différentielle afin d'obtenir des fragments d'anticorps spécifiques pour chacune des trois protéines Rho.

Le phage display nous apparaît comme une méthode de choix pour faire aboutir notre projet.

### **V.1. Sélection de ligands peptidiques à la surface de bactériophages ou « phage display »**

En 1985, Smith a décrit une méthode de sélection élégante basée sur l'expression de peptides en fusion avec la protéine P3 du bactériophage filamentueux M13 (figure 19), un virus bactérien qui infecte les bactéries *Escherichia coli* munies de l'épisome F' responsable de la présence des pili. Grâce à un anticorps fixé sur un support solide, il démontre qu'il est possible d'enrichir considérablement des phages exprimant à leur surface le peptide reconnu par l'anticorps à partir d'un mélange de phages exprimant ou pas cet épitope. De plus,

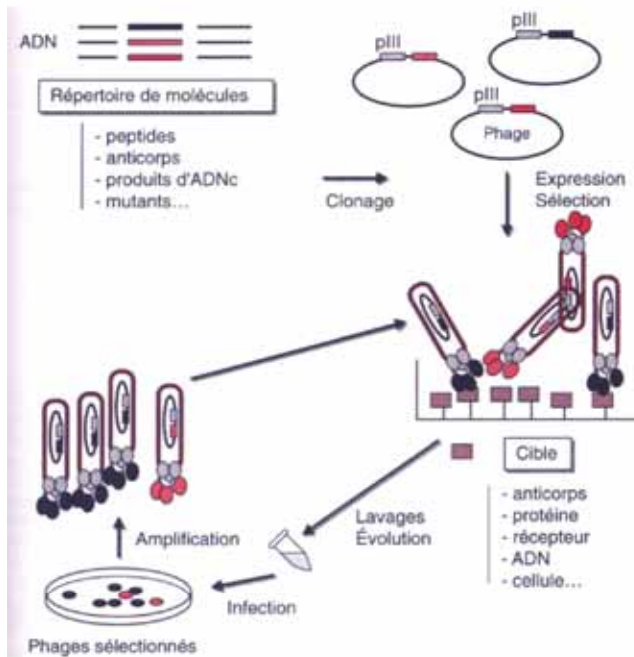


**Figure 19 : bacteriophage M13 et expression de peptides à sa surface.** A: schéma du bactériophage filamenteux M13 avec ses différentes protéines de capsides et son chromosome circulaire simple brin encapsidé. B: les deux stratégies d'expression de peptides à la surface du phage (vecteur phage et vecteur phagemide). Noter qu'il s'agit dans les deux cas d'exprimer le peptide en fusion N-terminale de la protéine minoritaire PIII.

Christelle Souriau et al. médecine/sciences 1998; 14: 300-9

L'avantage majeur de la technique réside dans le lien physique existant entre le peptide exposé sur la surface du phage et l'ADN codant correspondant qui est encapsidé (Smith, 1985).

La mise œuvre de cette technique nécessite le clonage d'un répertoire de ligands peptidiques en fusion 5' du gène codant la protéine apicale P3 du bactériophage. Deux modes d'expression des ligands peptidiques sont possibles : soit le clonage est réalisé dans le génome du phage, soit dans un phagemide. Pour des raisons d'efficacité de transformation bactérienne, la majorité des répertoires disponibles sont construits dans des phagemides. Ce sont des vecteurs possédant deux origines de réplication : une origine de réplication bactérienne et une origine de réplication phagique qui permet au vecteur d'être encapsidé par le phage. Les bactéries transformées vont produire la protéine chimère constituée du ligand en fusion avec la P3. L'infection des bactéries par un phage auxiliaire apportant les protéines nécessaires à la constitution de nouveaux phages aboutira à la constitution de phages exprimant les ligands peptidiques à leur surface qui de plus ont encapsidé le phagemide possédant la séquence d'ADN correspondante.



**Figure 20: principe du phage display.**

Le répertoire de molécules est cloné dans un phage (ou un phagemide). Après expression des peptides à la surface des phages, ceux-ci sont mis en présence de la cible fixée sur un support solide. La sélection des ligands d'intérêt consiste à éliminer les phages non liés à la cible par lavages successifs. Les phages sélectionnés sont alors amplifiés par infection de bactéries et purifiés pour subir un autre tour de sélection.

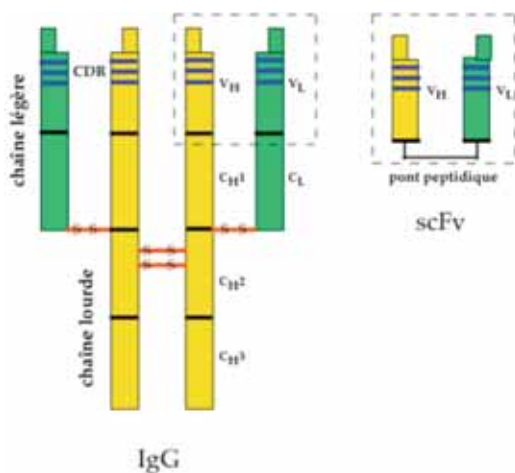
Christelle Souriau et al.  
médecine/sciences 1998; 14: 300-9

Le principe de sélection des clones spécifiques consiste à enchaîner des tours de sélection conduisant à l'enrichissement d'une suspension de phages en clones spécifiques qui seront ensuite testés par criblage (figure 20). Les phages présentant un ligand spécifique sont retenus sur une surface préparée avec la molécule cible alors que les phages non adhérents sur l'antigène sont éliminés par les lavages. Les phages liés spécifiquement sont élués et réintroduits dans des bactéries pour l'étape d'amplification. Cette nouvelle production de phages sera de nouveau sélectionnée sur la cible. Des pressions de sélection peuvent être introduites à chaque tour de sélection. Cette stratégie fondée sur la sélection est nettement plus puissante qu'une stratégie de criblage classique qui ne peut pas être appliquée à des banques de tailles supérieures à  $10^6$  clones indépendants. Le criblage final est effectué à partir des clones préalablement sélectionnés. L'opportunité de sélectionner un clone spécifique lors de ce criblage final est donc largement augmentée (Weisser and Hall, 2009).

Par ses avantages de simplicité, de robustesse et de stabilité, ce puissant outil de sélection sera à la base de nombreuses applications aboutissant à la sélection d'une multitude de ligands peptidiques dans les deux décennies suivantes et sera déterminant dans l'avènement des fragments d'anticorps monoclonaux recombinants.

## V.2. Les fragments d'anticorps monoclonaux recombinants.

Concomitamment à l'invention du phage display, des équipes travaillaient sur l'expression de fragments d'anticorps recombinants dans *E.coli* dans le but d'améliorer la biodisponibilité des anticorps et leur utilisation en imagerie. Les immunoglobulines IgM et IgG sont constituées de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères, comprenant chacune des parties variables et constantes. Les domaines variables contenant les sites de liaison à l'antigène, les CDR ou Complementary Determining Regions, peuvent être exprimées séparément sans la perte des propriétés de liaison à l'antigène. Ces fragments d'anticorps sont fonctionnels lorsqu'ils sont sécrétés dans le périplasma de la bactérie (Skerra and Plückthun, 1988). De plus, un fragment variable formé d'une chaîne peptidique unique est obtenu en reliant les domaines variables des chaînes lourdes ( $V_H$ ) et légères ( $V_L$ ) par un lien flexible. On parle alors de scFv pour single chain Fragment variable dont la stabilité est augmentée (Bird et al., 1988) (**figure 21**).



**Figure 21: schéma comparatif des scFv et des IgG.** Les chaînes lourdes des immunoglobulines G sont représentées en jaune et les chaînes légères en vert. Les différents domaines constants et variables sont notés  $CH1$ ,  $CH2$ ,  $CH3$  et  $VH$ ,  $CL$  et  $VL$  pour les chaînes lourdes et légères respectivement. Les ponts di-sulfures unissant les différentes chaînes de l'IgG sont représentés par des traits rouges tandis que le pont peptidique reliant les parties variables ( $VH$  et  $VL$ ) du scFv est en noir. Les complémentaires déterminantes ( $CDR$ ) sont symbolisés par des traits bleus.

L'expression d'un scFv fonctionnel à la surface du phage M13 et son enrichissement sur colonne d'affinité à partir d'un mélange de phages exprimant ou pas ce scFv ouvrit la voie à la sélection de fragments d'anticorps par phage display (McCafferty et al., 1990).

Ce principe a tout d'abord été appliqué à la sélection de scFv par phage display à partir d'une banque de fragments d'anticorps de souris préalablement immunisée. L'assemblage des  $V_H$  et des  $V_L$  a été réalisé par PCR sur les lymphocytes B contenus dans la rate de l'animal : il s'agit d'une banque immune (Clackson et al., 1991).

Dès lors, les efforts vont être concentrés sur la sélection de fragments d'anticorps humains par la construction de banques combinatoires naïves et synthétiques permettant de contourner l'étape d'immunisation. Les banques combinatoires naïves dites naturelles sont construites par PCR à partir des gènes réarrangés  $V_H$  (V-D-J) et  $V_L$  (V-J). Les banques combinatoires naïves dites synthétiques sont obtenues par réarrangement des différents gènes V, D, J *in vitro* par PCR. De plus, l'utilisation d'oligonucléotides aléatoires complémentaires des CDR permet d'augmenter la diversité de la banque. Ce type de banque a permis de sélectionner des fragments d'anticorps humains contre de nombreux antigènes et dont l'affinité est proportionnelle à la taille de la banque (Griffiths et al., 1994).

Par analogie avec le système immunitaire, on peut considérer le phage comme un lymphocyte B dont l'expansion clonale est déterminée par ses propriétés de liaison à un antigène donné. Il est de surcroît possible d'effectuer une maturation d'affinité en introduisant des mutations dans le scFv sélectionné afin d'obtenir une banque secondaire qui sera soumise à une pression de sélection orientée vers l'obtention de fragments d'anticorps de meilleure affinité.

Nous avons sélectionné le scFvC1 par phage display à partir de la banque Griffin I que nous nous sommes procuré auprès de Medical Research Council (Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Cette banque naïve synthétique humaine de scFv, dont la taille est de l'ordre de  $10^{10}$  clones indépendants, a été obtenue par sous-clonage, dans le phagemide pHEN II, des parties variables des chaînes lourdes et légères de Fab (Fragment antigen binding) contenus dans la banque 2lox (Griffiths et al., 1994). Les scFv possèdent deux étiquettes en fusion C-terminale : l'étiquette c-myc permettant leur détection par un anticorps anti-c-myc secondaire, et une étiquette hexahistidine pour une purification par chromatographie d'affinité sur métal immobilisé (IMAC).

## VI- choix de l'antigène

Notre projet consiste à sélectionner des fragments d'anticorps sélectifs des protéines RhoA, RhoB et RhoC en conformation active. Il est important de s'assurer que le choix des antigènes respecte les trois critères suivants tout au long du processus de sélection:

### *Accessibilité des déterminants antigéniques*

Nous avons vu que les GTPases Rho interagissent dans la cellule eucaryote avec de multiples protéines qui peuvent être régulatrices (GEF, GAP, GDI) ou effectrices (PKN, Rhotekin, Rhophilin entre autres). Ces partenaires se lient pour la plupart essentiellement sur les domaines switch I et II des protéines Rho discriminant ainsi leur état actif ou inactif. Les exemples de fragments d'anticorps sélectifs de la conformation active de GTPases ont leur épitope situé dans ces domaines mobiles (Tanaka et al., 2007), (Horn et al., 1999). Il est donc indispensable que ces domaines soient dépourvus des partenaires naturels qui les masquent. Ce qui est le cas pour les GTPases recombinantes puisque ces partenaires sont absents chez les procaryotes.

### *Conformation active stable*

Nous avons choisi d'utiliser les mutants des protéines Rho déficients en activité GTPasiques qui possèdent une substitution de la glutamine en position 63 par une leucine. Cette mutation confère aux protéines la propriété d'adopter une conformation active constitutive et stable.

### *Fonctionnalité de l'antigène*

Comme nous l'avons vu, les différences entre les conformations GTP vs GDP résident dans les positions relatives des domaines switch I et switch II. Il serait donc envisageable de sélectionner des fragments d'anticorps non pas sur la protéine entière mais plutôt sur un des

deux switch afin d'augmenter nos chances d'obtenir un ligand dirigé contre ces épitopes. Cependant, on observe que les changements de positions des domaines switch s'accompagnent d'une modification des acides aminés exposés à la surface de la protéine. Par exemple, lorsque RhoA est lié au GDP, la tyrosine 42 du switch I est exposée au solvant et empêche l'effecteur PKN de se lier. Dans la forme GTP, cette tyrosine est enfouie dans la protéine ce qui a pour conséquence un déplacement de la lysine 27 qui interagit alors avec l'aspartate 85 du PKN (Maesaki et al., 1999). On a donc peu de chances de reproduire ces changements en utilisant un domaine peptidique isolé du contexte moléculaire. De plus, afin de bloquer l'activité de ras, Persic et ses collaborateurs ont sélectionné un fragment d'anticorps par phage display en utilisant comme cible le peptide 57-76 de ras correspondant au switch II. Le scFv obtenu possède la propriété de bloquer l'activité de ras mais sans pour autant discriminer les conformations actives et inactives de cette protéine (Persic et al., 1999). Ces observations nous conduiront à utiliser les protéines recombinantes Rho dans leur intégrité.

On peut ajouter que les co-cristallisations des protéines Rho avec leurs effecteurs et leurs régulateurs montrent que les GTPases recombinantes chargées avec des analogues non-hydrolysables du GTP et produites par *E.coli* adoptent des conformations actives fonctionnelles en se liant spécifiquement à leurs partenaires (Dvorsky, 2003), (Derewenda et al., 2004), (Maesaki et al., 1999), (Rose et al., 2005). Enfin, les micro-injections du mutant recombinant RhoA<sub>G14V</sub> dans des cellules Swiss 3T3 provoquent des modifications caractéristiques dues à l'action des Rho sur le cytosquelette. Ces modifications sont équivalentes à celles produites par la protéine synthétisée par la cellule suite à la micro-injection du cDNA correspondant, montrant ainsi la fonctionnalité de la protéine produite dans *E.coli* (Paterson et al., 1990), (Ridley and Hall, 1992). Des observations similaires avaient déjà été faites avec la GTPase Ras (Stacey and Kung, 1984).

Par contre, les protéines recombinantes sont dépourvues des modifications post-traductionnelles qui ont lieu dans la cellule eucaryote. Cependant, un argument supplémentaire à l'utilisation de protéines recombinantes est que deux études rapportent la sélection de fragments d'anticorps sélectifs de la forme activée de deux GTPases (HRas et Rab6A) en utilisant comme antigènes des protéines recombinantes porteuses d'une mutation les figeant en conformation active : HRas<sub>G12V</sub> (Tanaka and Rabbitts, 2003) et Rab6A<sub>Q72L</sub> (Nizak et al., 2003). Des expériences d'immunofluorescence, d'immunoprécipitation ainsi



que d'inhibition de transformation cellulaire, montrent que ces biosenseurs se lient de manière spécifique à ces GTPases dans le contexte cellulaire.

Toutes ces données nous confortent dans le choix d'utiliser comme antigènes les formes recombinantes portant la mutation Q63L des GTPases Rho.

## VII- La maturation d'affinité

Le phage display présente des analogies avec le système immunitaire et notamment celle de permettre d'effectuer une maturation d'affinité.

La maturation d'affinité de la réponse immune fait appel à la variabilité des cellules B exprimant un récepteur spécifique de l'antigène sélectionné lors de la primo-infection. Cette variabilité correspond à l'hyper-mutation somatique qui a lieu dans les domaines variables des immunoglobulines. La sélection des lymphocytes B s'effectue selon un mode darwinien : ceux qui possèdent les récepteurs les plus affins poursuivent une expansion clonale tandis que ceux qui ont peu de capacité de liaison à l'antigène disparaissent. Les mutations sélectionnées sont essentiellement concentrées dans les CDR et concernent des acides aminés directement en contact avec l'antigène ou environnant le paratope (Tomlinson et al., 1996). L'affinité moyenne des anticorps lors de la réponse immune primaire est de l'ordre de  $10^{-6}$  M et atteint  $10^{-9}$  à  $10^{-10}$  M après maturation d'affinité.

Les techniques de maturation d'affinité *in vitro* de fragments d'anticorps, notamment le phage display, permettent d'égaliser les performances du système immunitaire voire de les dépasser dans certains cas (Schier et al., 1996). Il s'agit de recréer de la diversité à partir son ADN en constituant des banques secondaires par mutation et d'opérer une pression de sélection favorisant l'amplification des scFv les plus affins.

### VII.1. Création de banques secondaires :

Deux cas de figure sont possibles :

1°) on dispose de données ultra-structurales sur le complexe antigène-anticorps qui permettent d'identifier les acides aminés impliqués dans la liaison (Clark et al., 2006) et opérer les substitutions. En l'absence de telles informations, il est tout de même possible de construire par le calcul la structure tri-dimensionnelle du paratope de l'anticorps à partir des données cristallographiques disponibles d'autres scFv. La combinaison de ces données et de la connaissance précise de l'épitope de liaison permet de déterminer les positions probables des acides aminés à substituer par arrimage moléculaire (Barderas et al., 2008). L'avantage de ces approches réside dans la délimitation des domaines qui rendent compte de l'affinité de l'anticorps et de limiter ainsi la taille de la banque nécessaire pour tester toutes les substitutions possibles aux positions déterminées.

2°) la connaissance de ces données structurales n'est pas indispensable. En effet, les études les plus nombreuses illustrent la maturation d'affinité de fragments d'anticorps à partir de banques secondaires obtenues par mutagenèse au hasard dirigées sur les CDR, ou bien sur toute la longueur de l'ADN du scFv.

La stratégie de mutagenèse au hasard dirigée sur les CDR est réalisée par PCR au moyen d'oligonucléotides dégénérés. Les CDR3 de la  $V_H$  et de la  $V_L$  sont les plus concernés en première intention (Schier et al., 1996), (Pavoni et al., 2007), mais peuvent être combinés avec des mutagenèses sur les autres CDR ; par exemple, la combinaison de mutagenèses sur les CDR2 et CDR3 de la  $V_H$  (Hong et al., 2007), sur les CDR1  $V_H$ , CDR2  $V_H$  et CDR3  $V_L$  (Dong et al., 2003), ainsi que la combinaison de mutagenèses sur les CDR1 et 3 de la  $V_H$  et les CDR1 et 3 de la  $V_L$  (Yang et al., 1995). Ces résultats sont corroborés par l'étude de Thom et ses collaborateurs qui consiste à comparer les gains d'affinité obtenus par deux méthodes, l'une en mutant exclusivement le CDR3  $V_H$  et l'autre en opérant une mutagenèse au hasard sur la longueur du scFv (Thom et al., 2006). Les résultats montrent qu'une seule substitution dans le CDR3  $V_H$  apporte un gain d'affinité. Par contre, ce gain peut être encore amélioré par l'addition de mutations situées dans d'autres CDR qui ne participent pas directement à la liaison avec l'antigène, mais participent au repliement efficace du paratope.

Plusieurs études montrent qu'il est possible d'améliorer sensiblement l'affinité de fragments d'anticorps en opérant des mutations au hasard sur toute la longueur du scFv par PCR sujette à erreur ou error prone PCR (Gram et al., 1992), (Hawkins et al., 1992) (Juárez-González et al., 2005), (Suzuki et al., 2005), (Persson et al., 2008). Ces stratégies de mutagenèse non dirigée se heurtent cependant à une limite qui est celle de la taille de la banque. En effet, s'il est possible de représenter dans une banque de phage toutes les substitutions possibles d'un CDR constitué de six acides aminés, cela est hors de portée lorsqu'il s'agit de combiner les mutations effectuées sur plusieurs CDR et à fortiori des innombrables possibilités qu'autorise un scFv entier. Malgré cela, il est envisageable d'augmenter la complexité des substitutions testées en opérant plusieurs cycles de maturation d'affinité où de nouvelles mutations sont introduites à chaque cycle sur les scFv sélectionnés (Pavoni et al., 2006). Il est intéressant à noter que dans ces deux cas la distribution des mutations est comparable à celle obtenue par maturation d'affinité *in vivo* (Thom et al., 2006).

## **VII.2. Sélection de fragments d'anticorps selon l'affinité**

L'affinité d'un anticorps pour un antigène est la résultante du rapport de deux vitesses : la vitesse d'association ( $k_{on}$ ) et la vitesse de dissociation ( $k_{off}$ ). Plusieurs études ont décrit la maturation d'affinité de fragments d'anticorps en utilisant une pression de sélection en fonction de la vitesse de dissociation. Il s'agit de pré-incuber les phages avec l'antigène fixé sur un support solide et de rajouter un excès d'antigène libre pendant des temps d'incubation variables (Hawkins et al., 1993), (Lu et al., 2003). Les scFv les plus affins, c'est-à-dire ceux dont la vitesse de dissociation est la plus lente, auront tendance à rester liés à l'antigène immobilisé tandis que les moins affins seront éliminés par lavage avec l'antigène soluble. Cependant pour mettre en œuvre cette stratégie, il faut disposer de l'antigène sous deux formes : l'une possédant une étiquette par laquelle l'antigène est immobilisé, l'autre dépourvu de cette étiquette pour que l'antigène reste en solution. On obtient le même résultat en remplaçant l'antigène libre par un excès de ligand de basse affinité (Yang et al., 1995). La sélection sur le  $k_{off}$  est également réalisée en augmentant les lavages en durée ou en nombre ce qui est défavorable aux ligands les moins affins (Lu et al., 2003).

Une autre méthode plus communément utilisée consiste à diminuer progressivement la concentration d'antigène immobilisée afin d'augmenter la compétition entre les phages au cours des tours de sélection (Hawkins et al., 1992), (Schier et al., 1996), (Juárez-González et al., 2005), (Suzuki et al., 2005). Cette stratégie, que nous avons choisie, présente les avantages d'être moins consommatrice d'antigène et d'utiliser l'antigène sous une seule forme.

# **RESULTATS**

## **1ere PARTIE**

# I- Maturation d'affinité

## I.1. Construction d'une banque secondaire par mutagenèse aléatoire à partir du scFv C1

### I.1.1. Mutagenèse aléatoire

Nous avons construit une banque secondaire de mutants par « PCR sujette à erreur » (error-prone PCR ou epPCR) sur toute la longueur de l'ADN codant le scFvC1. Pour ce faire, nous avons utilisé le kit GeneMorph II EZClone Domain Mutagenesis de Stratagene. Il s'agit d'un mélange d'une DNA polymérase et d'une Taq DNA polymérase toutes deux mutées de telle sorte que leurs fidélités soient altérées. Les avantages de ce kit sont les suivants : toutes les substitutions de nucléotides sont rendues possibles, aussi bien les transitions correspondant à une inversion de purine (A en G ou G en A) ou de pyrimidine (C en T ou T en C) que les transversions (changement d'une purine en pyrimidine et inversement). On contrôle la fréquence de mutation en jouant sur la quantité de matrice et le nombre de cycles de PCR (la fréquence de mutation est inversement proportionnelle à la quantité de matrice et proportionnelle au nombre de cycles de PCR). Trois fréquences de mutation sont possibles : de 0 à 0,45% (faible), de 0,45 à 0,9% (moyen) et de 0,9 à 1,6% (fort).

De nombreuses publications décrivent la maturation d'affinité de scFv à partir de banques secondaires obtenues par epPCR. Les fréquences de mutations des banques secondaires utilisées se situent généralement entre 0,4 et 0,8% (Hawkins et al., 1992), (Persson et al., 2008). D'autres auteurs ont fait des études de comparaison de banques secondaires mutées avec des fréquences variables. Citons les travaux de l'équipe de Georgiou, G. qui a comparé trois banques (0,22%, 0,5% et 3%) et a obtenu les scFv les plus affins avec les fréquences de mutation de 0,5 et 3% (Daugherty et al., 2000). Par contre, Juárez-González et ses collaborateurs obtiennent les meilleurs résultats avec des fréquences de mutation de 0,1% et 0,8% sans parvenir à isoler de scFv intéressant pour la fréquence de 4,7% (Juárez-González et al., 2005). Compte tenu de ces données bibliographiques, nous avons dans un premier temps adopté les conditions du taux moyen de mutations (de 0,45 à 0,9%). Les résultats de séquences de 10 clones choisis au hasard montrent qu'un tiers d'entre eux sont exempts de mutations, la moitié ne possédant qu'une seule mutation. Malgré le petit nombre de clones testés, nous pouvons estimer la fréquence moyenne de mutation à 0,07%. Ce résultat étant décevant par rapport au score de mutations décrit par le fournisseur du kit, nous avons refait

la mutagenèse dans les conditions de réaction correspondant au taux de mutations maximal. Les résultats de séquences de 10 clones choisis au hasard montrent une fréquence de mutations accrue (0,24%) qui paraît suffisante pour obtenir des scFv d'intérêt d'après les études citées plus haut. Nous avons donc choisi de construire la banque avec les fragments de PCR obtenus dans cette condition.

### *1.1.2. Clonage des fragments PCR mutés*

Nous avons cloné les fragments mutés par PCR dans le phagemide pHEN2 (voir matériels et méthodes) à l'aide des enzymes de restriction NcoI et NotI. Nous avons pris soin d'utiliser un phagemide d'accueil contenant un scFv anti-thyroglobuline qui ne gênerait pas l'étape de sélection par « phage display » au cas où quelques clones intacts subsisteraient après clonage. Après électroperméation des bactéries XL1 blue avec les produits de ligation, nous avons évalué le nombre de transformants. Plusieurs tentatives ont été effectuées de manière à obtenir une banque présentant une diversité de mutants maximale. Les optimisations de clonage effectuées nous ont permis d'obtenir une banque contenant 8 millions de clones indépendants.

## **1.2. Stratégie de sélection**

### *1.2.1. Choix de l'antigène*

Le scFvC1 a été initialement sélectionné par phage display sur la protéine RhoB<sub>Q63L</sub>. Il est capable de se lier sélectivement aux trois protéines RhoA, RhoB et RhoC dans leurs conformations actives (Goffinet et al., 2008). Il s'agit ici d'augmenter son affinité sans pour l'instant changer sa spécificité. Au laboratoire, nous avons l'expérience montrant qu'il est plus aisé de produire et de purifier dans *E.coli* la protéine RhoA recombinante que RhoB. Nous avons donc choisi de mener les expériences de sélection avec le mutant RhoA<sub>Q63L</sub> en fusion C-terminale de la glutathion-S-transférase (GST-RhoA<sub>Q63L</sub>) de manière à immobiliser l'antigène sur un support solide fonctionnalisé au glutathion ; nous réduirons ainsi les éventuelles déformations de la protéine qui auraient pu être occasionnées par une adsorption directe sur plastique. Horn avait pris cette précaution en immobilisant GST-Ras actif sur un anticorps anti-GST pour sélectionner un fragment d'anticorps anti-conformationnel (Horn et

al., 1999). La protéine recombinante GST-RhoA<sub>Q63L</sub> a été produite et purifiée au laboratoire (Chinestra et al., 2012).

### *I.2.2. Sélection par « phage display »*

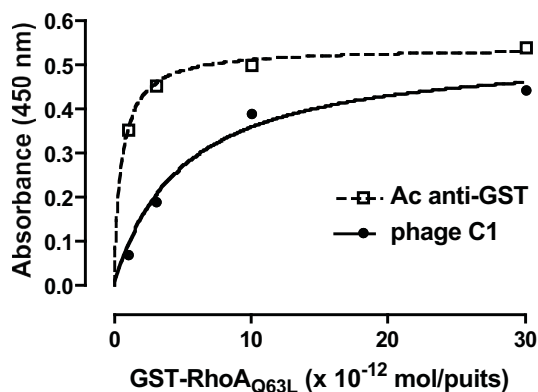
Compte tenu d'une possible instabilité de la conformation active de RhoA<sub>Q63L</sub>, nous avons écarté la sélection basée sur le  $k_{off}$  faisant appel à des temps d'incubation longs, au profit d'une stratégie combinant des conditions limitantes d'antigène avec une augmentation du nombre des lavages.

Les concentrations décroissantes d'antigène seront fixées par ELISA sur les phages amplifiés du tour de sélection précédent (Wright and Deonarain, 2007). Contrairement à la sélection du scFvC1 où l'antigène était immobilisé sur des billes glutathion, nous travaillerons en plaques de 96 puits fonctionnalisées au glutathion de telle sorte que nous pourrions mieux contrôler les basses concentrations en antigène.

#### *Tour de sélection n°1*

Il s'agit dans un premier temps d'éliminer les clones ayant perdu toute capacité de liaison (mutations délétères, codon stop, décalage de phase de lecture, délétions), tout en conservant tous les clones capables de se lier indépendamment de leur affinité. Nous travaillerons donc avec un excès d'antigène que nous avons déterminé par ELISA (figure 22) avec le phage C1. Nous avons cherché la concentration saturante de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> pour un nombre de phages C1 donné (le nombre de phage C1 par puits étant égal au nombre de phages qui sera utilisé lors de la sélection avec la banque secondaire). On observe que l'on atteint le plateau pour une concentration d'antigène de  $30 \cdot 10^{-12}$  mole par puits (soit  $30 \cdot 10^{-8}M$ ), concentration qui sera utilisée pour la sélection.





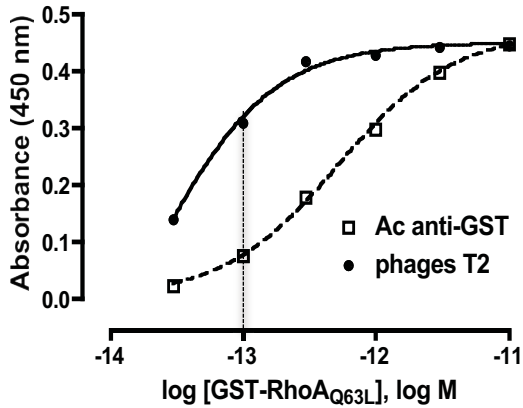
*Figure 22: détermination de la concentration d'antigène pour le tour de sélection n°1. Des concentrations croissantes de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> purifié sont immobilisées dans des puits tapissés de glutathion. La présence d'antigène est contrôlée par un anticorps anti-GST au 1/1000. Le phage C1 est ajouté à la concentration de  $5.10^9$  TU par puits et révélé par l'anti-M13-HRP selon le protocole ELISA (voir matériel & méthodes). Les bruits de fond mesurés en absence d'antigène ont été soustraits.*

### *Tour de sélection n°2*

La concentration d'antigène est égale à celle utilisée pour le tour n°1 ; nous augmentons le nombre de lavages afin d'éliminer les phages les moins affins. Nous avons vérifié que l'antigène ne se désorbe pas dans ces conditions (résultats non montrés).

### *Tours de sélection n°3*

À partir de ce tour, nous nous placerons en concentration d'antigène limitante dans le but de créer une compétition entre les phages pour éliminer les moins affins. Nous déterminons cette concentration par ELISA avec les phages du tour n°2 amplifiés (figure 23). Les études décrivant cette stratégie de concentration limitante en antigène ont été réalisées avec des pas de décroissance variables allant de 5 à 50 fois moins d'antigène à chaque tour de sélection (Schier et al., 1996), (Suzuki et al., 2005), (Juárez-González et al., 2005), (Thom et al., 2006), le plus grand saut de concentration décrit étant de 100 fois moins d'antigène (Wright and Deonarain, 2007). Au regard de ces données bibliographiques et de notre choix de diminuer de manière progressive la concentration en antigène, nous nous placerons à  $0,1 \cdot 10^{-12}$  mole de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> par puits qui correspond à un saut de concentration de 30 par rapport au tour précédent ; cela correspond à 70% du signal maximum pour un nombre de phages de  $10^{10}$  TU par puits.

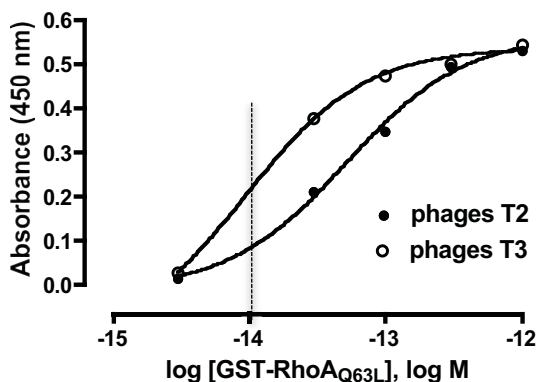


**Figure 23: détermination de la concentration d'antigène limitante par ELISA (tour n°3).**

Des concentrations décroissantes de GST-RhoAQ63L purifié sont immobilisées dans des puits tapissés de glutathion. La présence d'antigène est contrôlée par un anticorps anti-GST au 1/1000. Les phages amplifiés du tour de sélection n°2 sont ajoutés à la concentration de  $10^{10}$  TU par puits et révélés par l'anti-M13-HRP selon le protocole ELISA (voir matériel & méthodes). Les bruits de fond mesurés en absence d'antigène ont été soustraits. La ligne en pointillés indique la concentration d'antigène choisie.

#### Tours de sélection n°4

Afin d'augmenter la pression de sélection, nous avons choisi la concentration en antigène de  $0,01 \cdot 10^{-12}$  mole par puits, concentration pour laquelle le signal ELISA est de 30% du maximum (figure 24). De plus, si on compare les phages des tours de sélection n°2 et n°3, on remarque un signal supérieur des phages du tour n°3 pour les concentrations de 0,1 et  $0,03 \cdot 10^{-12}$  mole d'antigène : ceci peut refléter une amélioration de l'affinité.

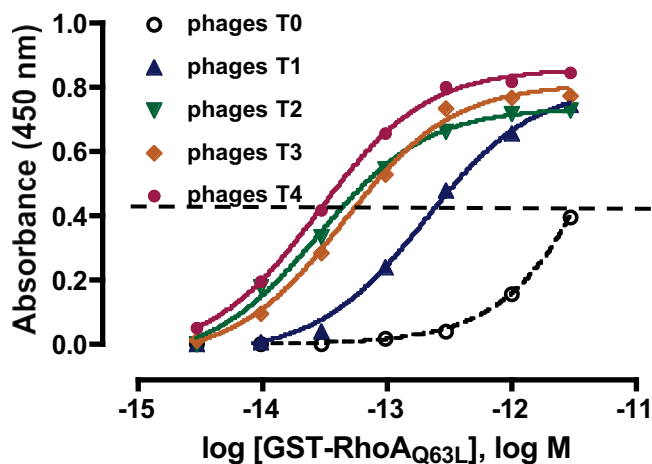


**Figure 24: détermination de la concentration d'antigène limitante par ELISA (tour n°4).**

Des concentrations décroissantes de GST-RhoAQ63L purifié sont immobilisées dans des puits tapissés de glutathion. Les phages amplifiés des tours de sélection n°3 et 4 sont ajoutés à la concentration de  $2 \cdot 10^{10}$  TU par puits et révélés par l'anti-M13-HRP selon le protocole ELISA (voir matériel & méthodes). Les bruits de fond mesurés en absence d'antigène ont été soustraits. La ligne en pointillés indique la concentration d'antigène choisie.

### I.3. Résultat de la sélection :

À l'issue des quatre tours de sélection, nous avons comparé les signaux ELISA que donnent les phages amplifiés des différents tours de sélection en fonction de concentrations croissantes d'antigène (figure 25). Il s'agit d'un ELISA polyclonal puisqu'à ce stade les clones sélectionnés ne sont pas encore séparés. Cette expérience permet de mesurer l'EC50 c'est à dire la concentration d'antigène pour laquelle on obtient 50% de la liaison maximale, afin de déterminer si nous avons enrichi la population en phages plus affins. Au fil des tours de sélection, on observe un déplacement de l'EC50 vers les basses concentrations en antigène qui peut être interprétée comme un enrichissement en phages affins. Concernant le processus de sélection, on observe une nette amélioration de l'EC50 entre le T0 et le T1 (de 3 à 0,3  $10^{12}$  mole d'antigène par puits) : cela correspond à l'élimination des clones ayant perdu toute capacité de liaison conséquemment à la mutagenèse. On observe le même effet entre le T1 et le T2, où le nombre de lavages a été doublé pour une même concentration en antigène, favorisant ainsi l'élimination des clones les moins affins. Par contre, cet effet est amoindri entre le T3 et le T4, et très faible entre le T2 et le T3 : il semblerait que la sélection par



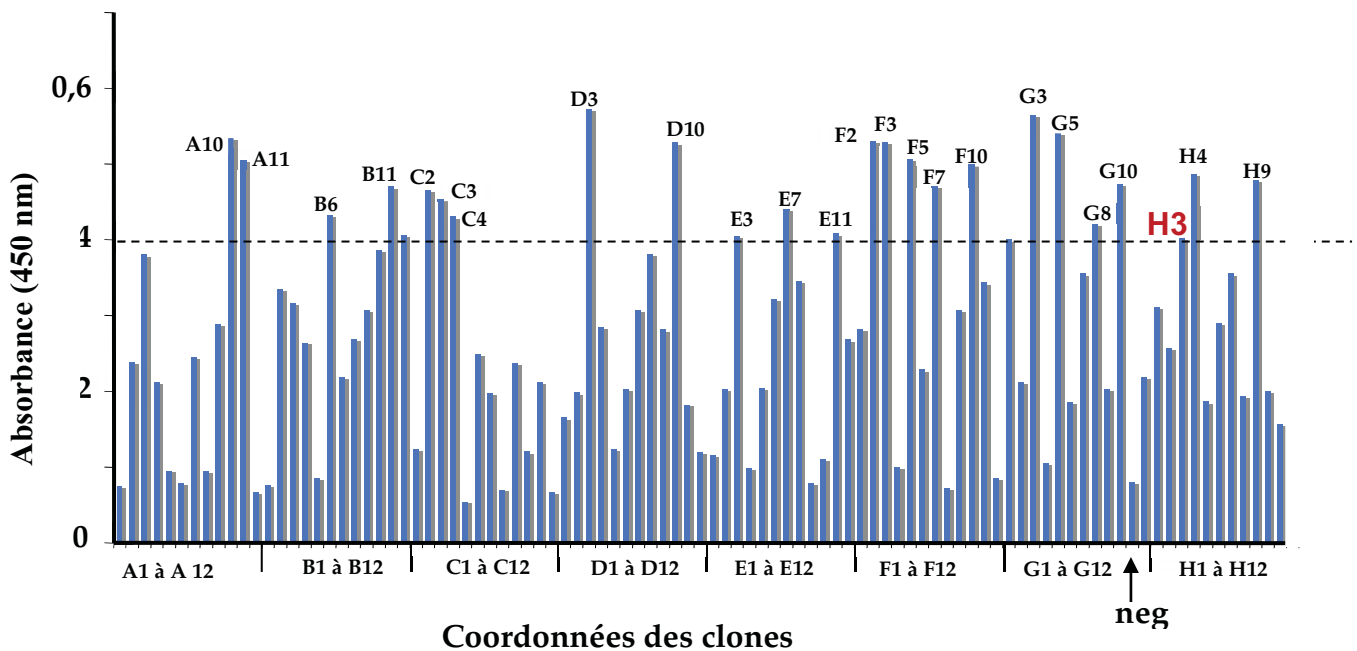
**Figure 25: ELISA polyclonal après quatre tours de sélection.**

Des concentrations croissantes de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> purifié sont immobilisées dans des puits tapissés de glutathion. Les phages amplifiés avant sélection (T0) et après les différents tours de sélection (T1, T2, T3 et T4) sont ajoutés à la concentration de  $10^{10}$  TU par puits et révélés par l'anti-M13-HRP selon le protocole ELISA (voir matériel & méthodes). Les bruits de fond mesurés en absence d'antigène ont été soustraits. La ligne en pointillé indique la valeur de l'absorbance égale à environ 50% de l'absorbance maximale.

concentration limitante en antigène n'ait pas été aussi efficace que prévue. Nous pourrions l'améliorer en diminuant beaucoup plus la concentration d'antigène, de manière à créer des conditions de compétition plus drastiques entre les phages.

### *1.3.1. Analyse clonale du tour 4*

Considérant que nous avons enrichi la population initiale de phages en clones plus affins, nous avons effectué un criblage clonal par ELISA. 94 clones du tour n°4 ont été testés. Le signal mesuré en ELISA est la composante de trois paramètres: l'affinité du ligand, son expression à la surface du phage qui est fonction de sa solubilité et de sa toxicité, et enfin le nombre de phages présents. Dans cette expérience, nous avons cherché à tester le plus grand nombre de clones et il serait trop laborieux de les comparer à nombre de phages contrôlé pour éviter les biais énoncés plus haut. En première approximation, nous avons considéré que les phages les plus affins donneraient l'absorbance la plus forte. Nous avons donc mesuré l'absorbance sur des surnageants de culture et avons pris le parti de nous intéresser aux clones présentant la plus forte absorbance. Nous avons fixé arbitrairement le seuil à la densité optique de 0,4 (figure 26). A ce stade, il est bien évidemment possible de tester des clones de plus faible signal pour tenir compte d'un faible taux d'expression au cas où les phages testés ne rempliraient pas les critères recherchés.



**Figure 26: test ELISA clonal sur le tour de sélection T4.**

Des clones isolés en culture sont infectés par le phage auxiliaire M13KO7. Après expression des scFv correspondants à la surface des phages, les surnageants contenant les phages sont testés en ELISA sur une plaque de 96 puits tapissée au glutathion où une concentration fixe de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> a été immobilisée. Après lavages, les phages fixés spécifiquement à l'antigène sont révélés par l'anti-M13-HRP selon le protocole ELISA (voir matériel & méthodes). Le seuil au delà duquel les clones seront retenus est fixé à 0,4 (trait en pointillé). Le bruit de fond est déterminé par un surnageant dépourvu de phages (neg). Après séquençage des clones d'intérêt, il est apparu que les clones B11 et H3 correspondent au scFvC1.

### I.3.2. Séquençage des clones choisis

Nous avons séquencé 24 clones donnant une absorbance supérieure à 0,4 dans l'ELISA polyclonal. Seuls 21 d'entre eux ont pu être exploités (figure 27). Parmi ces clones, deux ne possèdent pas de mutation (B11 et H3). La proportion de ces clones dépourvus de mutation est passée de 2 sur 9 dans la banque initiale à 2 sur 21 après sélection. De plus, la banque ayant été obtenue par epPCR aléatoire sur toute la longueur de la séquence du scFvC1, on observe qu'avant sélection la grande majorité des mutations est contenue dans la charpente du peptide qui représente 82% de la longueur totale du scFvC1. Cependant, les mutations ne sont pas réparties de manière totalement aléatoire : la fréquence de la mutation

E23Q (5 clones/9) ainsi que de celles se situant dans la VH (11 mutations/14 au total) nous incitent à penser qu'il existe des biais dans la réalisation de la mutagenèse. Pour autant, après quatre tours de sélections tous les clones retenus ont des mutations situées dans les CDR (23 mutations sur 32 au total), avec une forte représentation du CDR3 de la chaîne lourde (15 mutations sur 32 au total) ; ce CDR détermine de manière prépondérante l'affinité et la spécificité d'un anticorps (Hoogenboom, 1997).

TOUR 0			TOUR 4					
scFv	mutation	site	scFv	mutation	site	scFv	mutation	site
1	E23Q	FR VH	A10	G188S	CDR2 VL	F5	N104S	CDR3 VH
	R174R	FR VH						
2	E23Q	FR VH	A11	Q82R	FR VH	F7	S31N	CDR1 VH
	G32S	FR VH		R107G	CDR3 VH		S222T	CDR3 VL
3	non	non	B6	N104S	CDR3 VH	F10	N104S	CDR3 VH
4	A119A	FR VH	B11	non	non	G5	N104S	CDR3 VH
	Q170E	FR VL						
5	non	non	C2	N104S	CDR3 VH	G8	N104S	CDR3 VH
				E215D	FR VL			
6	E23Q	FR VH	C4	R107G	CDR3 VH	G10	K76R	FR VH
	W58 stop	FR VH		D158G	CDR1 VL		N104S	CDR3 VH
7	E23Q	FR VH	D3	N104S	CDR3 VH	H3	non	non
	I73I	CDR2 VH						
8	G141D	LK	D10	S54G	CDR2 VH	H4	T28A	CDR1 VH
	E158E	FR VL		R107G	CDR3 VH		A97T	FR VH
9	L108P	FR VH	E3	N185Y	CDR2 VL	H9	S128P	LK
	E23Q	FR VH					V177A	FR VL
			E7	R107G	CDR3 VH		S57R	CDR2 VH
			F2	N104S	CDR3 VH		N104S	CDR3 VH
			F3	T28S	CDR1 VH			
				A146V	FR VL			

**Figure 27: comparaison des mutations avant (tour 0) et après sélection (tour 4) :**

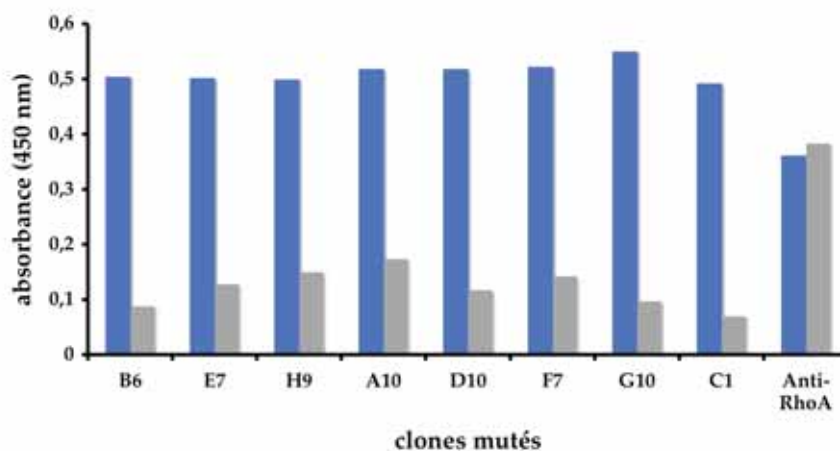
Les séquences des clones retenus ont été alignées avec la séquence du scFvC1. La numérotation des acides aminés est indiquée pour la chaîne lourde (VH) comme référencée sur le site IMGT (<http://imgt.cines.fr>). Par commodité, la numérotation des acides aminés de la chaîne légère (VL) a été incrémentée à partir de ceux de la chaîne lourde. Les localisations des mutations des acides aminés sont indiquées dans la colonne « site » (FR pour frame ou charpente du scFv, CDR pour Complementary Determining Region).

On remarque que dix clones possèdent la mutation N104S dans le CDR3 de la chaîne lourde. Parmi ceux-ci, on retrouve 7 fois le même clone (mutation unique) tandis que trois

autres la possèdent accompagnée d'une ou de deux autres mutations. On remarque également que quatre clones différents possèdent la mutation R107G dans le CDR3 de la chaîne lourde. Il est légitime de penser que ces modifications permettent une meilleure expression des scFv à la surface du phage ou/et améliore l'affinité des scFv. Tout ceci conforte notre stratégie de sélection ainsi que sa réalisation, et nous incite à engager une analyse clonale.

### *1.3.3. Analyse clonale de la sélection*

Nous avons tout d'abord caractérisé une première série de clones possédant en priorité des mutations dans le CDR3 de la VH. Il fallait dans un premier temps s'assurer que ces mutations n'avaient pas altéré la propriété principale du scFvC1, c'est-à-dire sa capacité à discriminer la conformation active des protéines Rho. Nous avons réalisé des expériences d'ELISA sur phage où l'on compare la liaison de ces clones sur RhoA<sub>Q63L</sub> et RhoA<sub>wt</sub> (figure 28).



**Figure 28: ELISA de spécificité des clones mutés sélectionnés.**

Des clones isolés en culture sont infectés par le phage auxiliaire M13KO7. Les phages purifiés, exprimant à leur surface les différents scFv, sont testés en ELISA à la concentration de  $10^{10}$  TU/puits sur une plaque fonctionnalisée au glutathion où une concentration fixe de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> (en bleu) et de GST-RhoA<sub>wt</sub> (en gris) a été immobilisée. Après lavages, les phages liés à l'antigène sont révélés par l'anti-M13-HRP selon le protocole ELISA (voir matériel & méthodes). On vérifie la présence des antigènes avec un anticorps anti-RhoA commercial au 1/500.

Nous avons inclus le phage C1 comme contrôle positif et un anticorps anti-RhoA commercial pour vérifier la présence des deux protéines RhoA<sub>Q63L</sub> et RhoA<sub>wt</sub>. On observe que tous les clones se lient préférentiellement à la forme active de RhoA. Il est à noter que les conditions de cette expérience ne permettent pas de mettre en évidence des différences d'affinité entre les clones, les concentrations d'antigènes et des phages étant saturantes.

#### 1.4. Évaluation des affinités relatives des phages sélectionnés par rapport au phage C1

Nous avons comparé en ELISA la liaison spécifique des phages sélectionnés par rapport au phage C1 contre les trois protéines RhoA, RhoB et RhoC sous forme active. Nous nous sommes d'abord assuré que l'expression des différents scFv à la surface des différents phages était du même ordre par une expérience d'ELISA sandwich afin de s'affranchir de cette variabilité. Il s'agit d'immobiliser les phages à la même concentration dans des puits tapissés d'anticorps anti-M13 et de mesurer le signal à l'aide d'un anticorps anti-myc-HRP qui se lie à l'étiquette myc du scFv et qui sera proportionnelle à la quantité de scFv présente.

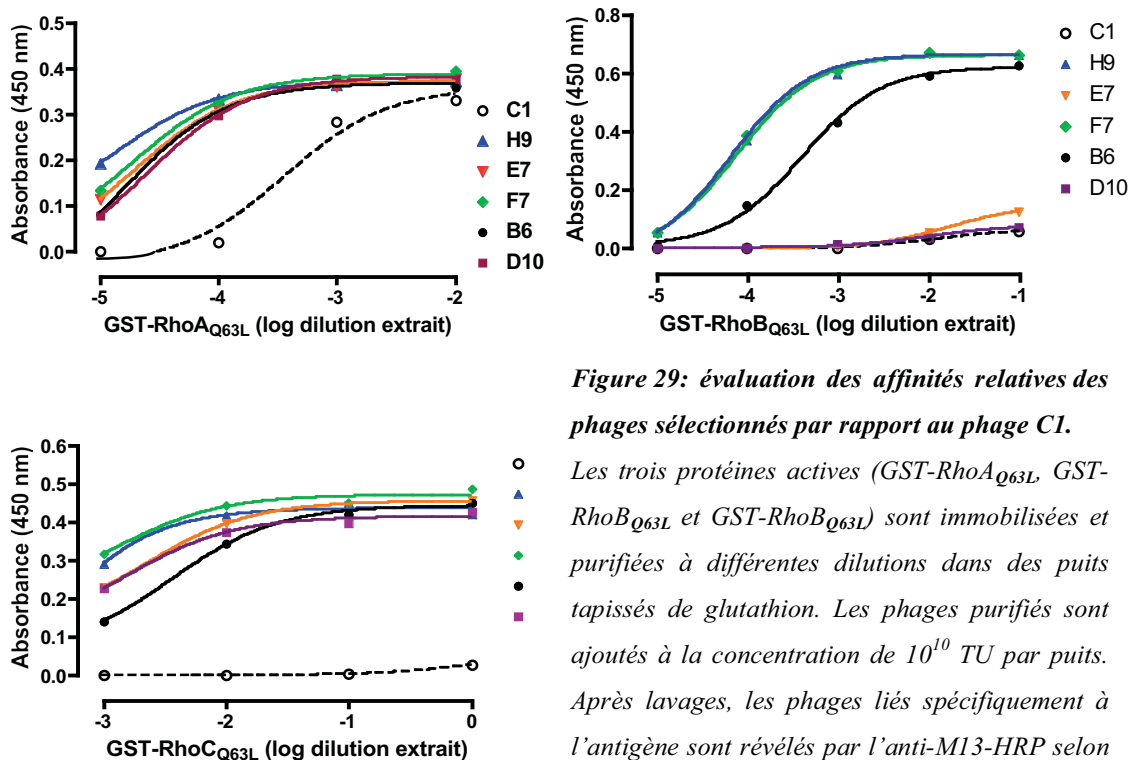


Figure 29: évaluation des affinités relatives des phages sélectionnés par rapport au phage C1.

Les trois protéines actives (GST-RhoA<sub>Q63L</sub>, GST-RhoB<sub>Q63L</sub> et GST-RhoC<sub>Q63L</sub>) sont immobilisées et purifiées à différentes dilutions dans des puits tapissés de glutathion. Les phages purifiés sont ajoutés à la concentration de  $10^{10}$  TU par puits. Après lavages, les phages liés spécifiquement à l'antigène sont révélés par l'anti-M13-HRP selon le protocole ELISA (voir matériel & méthodes). Le signal des phages en présence de chaque protéine sous forme inactive a été soustrait.



Nous n'avons pas mis en évidence de variation (résultats non montrés). Seuls deux clones (C2 et C4) n'ont pas été testés à ce jour. Pour la commodité de lecture des graphes, cinq clones sont représentés (figure 29). Pour tous les clones testés on observe une nette augmentation de la liaison spécifique des phages pour les faibles concentrations de RhoA<sub>Q63L</sub> et RhoC<sub>Q63L</sub>, traduisant une augmentation de l'affinité apparente. De manière surprenante, la protéine RhoB permet de distinguer trois groupes de phages : le groupe majoritaire des phages qui ont une affinité apparente très supérieure au phageC1 (H9 et F7 par exemple), celui dont l'unique membre est le B6 dont la liaison est intermédiaire, et enfin celui constitué des clones D10 et E7 qui ont une affinité apparente très basse pour cette protéine. Cette observation est capitale pour notre projet car elle met en évidence la possibilité de développer des biosenseurs capables de discerner chaque protéine sous sa forme active indépendamment des autres. De plus, on note la très faible liaison spécifique du phageC1 pour RhoB et RhoC. Cette observation peut s'expliquer par le fait que la caractérisation de la sélectivité du scFvC1 pour les trois Rho en conformation active avait été effectuée selon des critères qualitatifs en concentrations saturantes (Goffinet et al., 2008). De plus, nous avons remarqué une liaison plus faible du scFvC1 pour RhoB que pour RhoA sans pouvoir conclure s'il s'agissait de la conséquence d'une instabilité de la conformation de RhoB ou bien d'un différentiel d'affinité. Comme nous le verrons plus loin, les mesures d'affinité des scFvF7 et D10 permettent de conclure que le scFvC1 a probablement une meilleure affinité pour RhoA que pour RhoB, ce qui est étonnant pour un fragment d'anticorps sélectionné contre GST-RhoB<sub>Q63L</sub>.

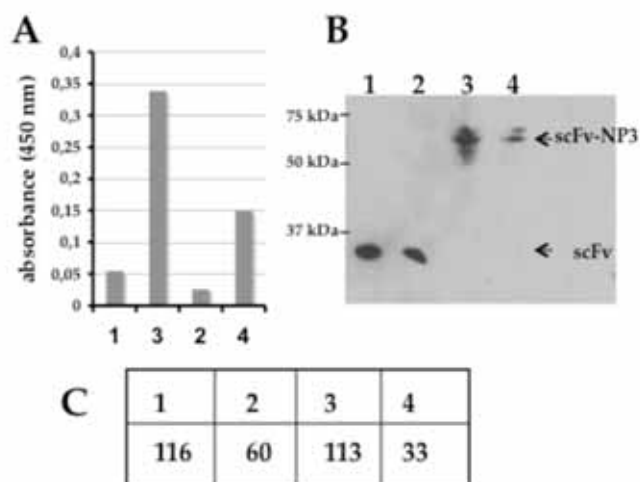
## **I.5. Propriétés des scFv sélectionnés sous forme soluble**

### *I.5.1. Choix des clones*

Il s'agit maintenant de vérifier les spécificités et affinités apparentes des scFv sélectionnés sous forme soluble c'est-à-dire dans la condition de leur utilisation future. Nous avons choisi dans un premier temps de nous intéresser à deux types de scFv : d'une part, les scFv F7 et H9 qui se lient aux trois protéines Rho avec la meilleure affinité lorsqu'ils sont exprimés sur phage ; d'autre part au scFv D10 qui possède la propriété particulière de se lier avec beaucoup moins d'affinité sur RhoB<sub>Q63L</sub> que sur RhoA<sub>Q63L</sub> et RhoC<sub>Q63L</sub>, propriété qui pourrait ouvrir la perspective à la sélection de scFv spécifiques de chacune des trois protéines Rho sous forme active.

### *1.5.2. Expression et purification des scFv sous forme soluble*

Au laboratoire, Marine Goffinet a montré que le scFvC1 perd son activité lorsqu'il est exprimé sous forme soluble c'est à dire désolidarisé de la protéine P3 du phage M13. Jensen a observé ce phénomène pour trois scFv et décrit la restitution de leurs capacités de liaison lorsqu'ils sont exprimés en fusion avec les domaines N-terminaux de la P3 (Jensen et al., 2002). De plus, la partie C-terminale de la P3 a été supprimée pour que la protéine chimère scFv-P3 soit sécrétée. La protéine P3 est constituée de trois domaines : deux domaines N-terminaux (N1-N2) responsables de la liaison du phage aux récepteurs bactériens F-pilus et TolA et de l'infection, tandis que le domaine C-terminal ancre la P3 dans la capside (Rakonjac et al., 2011). Bien que des données cristallographiques de scFv en fusion avec les domaines N-terminaux de la P3 ne soient pas disponibles, ces auteurs concluent à la probable intervention de la P3 dans le repliement (folding) correct du scFv. Étant donné que les scFv sélectionnés dérivent tous du scFvC1, nous avons vérifié s'ils nécessitaient eux aussi la fusion avec le domaine N-terminal de la P3 pour conserver leurs propriétés de liaison. Nous avons constaté par ELISA une perte de signal spécifique des scFv sélectionnés sous forme soluble vis-à-vis de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> et GST-RhoB<sub>Q63L</sub> (résultats non montrés). Afin de savoir si la raison était un défaut de sécrétion ou une modification de conformation des scFv détachés du phage, les clones F7 et D10 ont été comparés en ELISA sous forme soluble avec et sans la fusion avec la P3 (figure 30A). Les résultats montrent que l'absence de la fusion avec la P3 a pour conséquence une perte de la liaison spécifique avec GST-RhoA<sub>Q63L</sub>. Le contrôle de la présence des scFv par immuno-empreinte (figure 30B) montre qu'il ne s'agit pas d'un défaut de sécrétion de la forme dépourvue de la fusion avec la P3 puisque les concentrations des scFv F7 et D10 sont égales ou supérieures à celles des formes fusionnées (figure 30C). Si nous ne pouvons que constater ce phénomène sans pouvoir l'expliquer, il est clair que ces scFv ont besoin d'être exprimés en fusion avec la P3 pour garder leurs propriétés et c'est sous cette forme qu'ils seront utilisés dans les prochaines expériences.



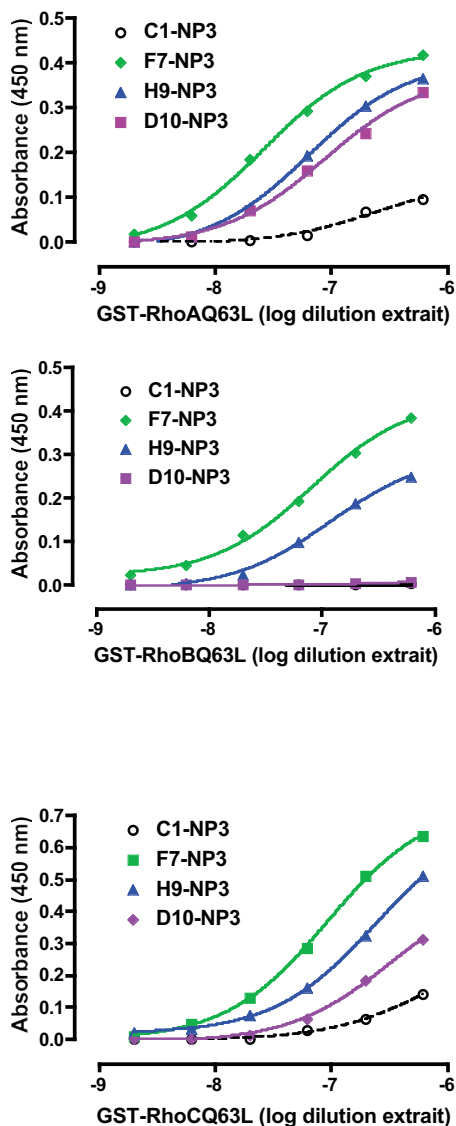
**Figure 30: étude de la liaison sur GST-RhoA<sub>Q63L</sub> des scFv F7 et D10 exprimés avec ou sans la fusion avec les domaines NP3 de la PIH.**

Les surnageants de culture d'*E.coli* XL1 Blue exprimant les scFvF7 (1) et D10 (2) ainsi que les scFvF7-NP3 (3) et D10-NP3 (4) sont testés (A) en ELISA dans des puits tapissés au glutathion où une concentration fixe de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> a été immobilisée. (B) Le contenu en scFv de ces mêmes surnageants est révélé par immuno-électro-empreinte avec un anticorps anti-myc-HRP et (C) quantifié avec le logiciel « IMAGEQUANT TL» (les valeurs sont des

### I.6. Evaluation de la spécificité et de l'affinité des scFv solubles par rapport au scFvC1

Les scFv C1, F7, H9 et D10 ont été produits en fusion avec la partie N-terminale de la P3 et purifiés par l'intermédiaire de l'étiquette 6-histidine (6xHis) sur billes surfacées au nickel (IMAC) à partir de la fraction périplasmique. Nous avons testé ces scFv par ELISA en présence de concentrations croissantes des mutants actifs des protéines RhoA, RhoB et RhoC (figure 31). Les scFvF7 et H9 ont une affinité apparente supérieure au scFvC1 pour les trois antigènes, avec un avantage pour le scFvF7 par rapport au H9. Le scFvD10 se lie préférentiellement aux protéines RhoA et RhoC, sa liaison à RhoB étant inférieure au seuil de détection dans cette expérience. Nous remarquons que ceci est également vrai pour le scFvC1, mais avec une affinité apparente moindre.

Par la suite, nous nous consacrerons à la caractérisation des clones F7 et D10 qui nous paraissent être les meilleurs candidats compte tenu de leur affinité apparente mais aussi de leurs sélectivités différentes.



*Figure 31: évaluation de l'affinité des scFv sélectionnés par rapport au scFvC1.*

*Les trois protéines actives (GST-RhoA<sub>Q63L</sub>, GST-RhoB<sub>Q63L</sub> et GST-RhoC<sub>Q63L</sub>) sont immobilisées et purifiées à différentes dilutions dans des puits tapissés de glutathion. Les scFv purifiés sont ajoutés à la même concentration. Après lavages, les scFv liés spécifiquement à l'antigène sont révélés par l'anti-myc-HRP selon le protocole ELISA (voir matériel & méthodes). Le signal des scFv en présence de chaque protéine sous forme inactive a été soustrait.*

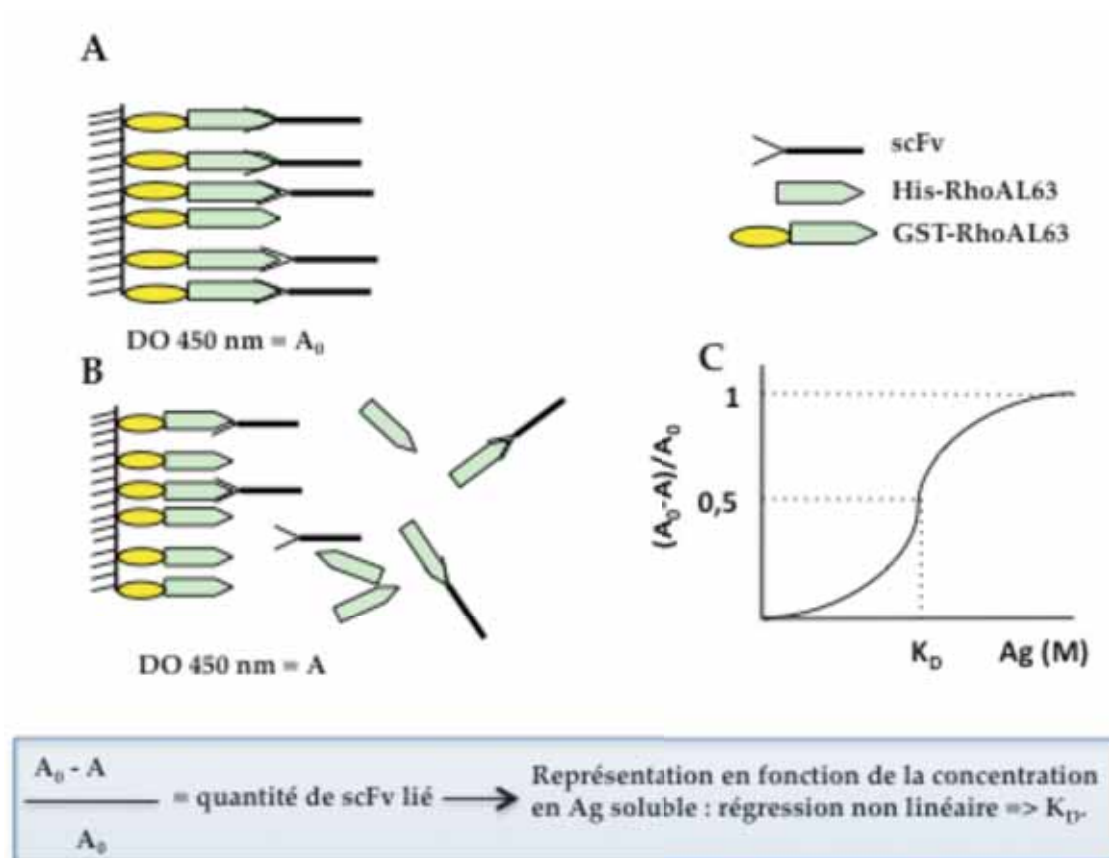
### **I.7. Mesure de l'affinité des scFvF7 et D10 pour RhoA<sub>Q63L</sub> et RhoB<sub>Q63L</sub> par ELISA indirect.**

Le scFvC1 précédemment sélectionné au laboratoire se caractérise par une bonne sélectivité et une basse affinité (aux environs de 3  $\mu$ M) (Goffinet et al., 2008) pour la conformation active des GTPases Rho recombinantes procaryotes. L'absence de mise en évidence d'interaction spécifique de ce scFv pour les protéines Rho d'origine eucaryote nous a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle sa basse affinité pouvait représenter une entrave au déplacement des partenaires des Rho masquant ainsi leurs épitopes.

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer l'affinité de liaison de deux partenaires : la résonance plasmonique de surface, la microbalance à cristal de quartz, la calorimétrie, le dosage radio-immunologique par exemple. Les trois premières nécessitent un appareillage

absent au laboratoire, tandis que la quatrième fait appel à l'emploi de composés radioactifs. On peut s'affranchir de ces contraintes en mettant en œuvre la technique de mesure d'affinité par ELISA indirect.

Cette méthode décrite, par Friguet et ses collaborateurs (Friguet et al., 1985), consiste à incuber en solution une quantité fixe d'anticorps avec des concentrations d'antigène croissantes et à déterminer pour chacune d'elle la proportion d'anticorps engagée dans le complexe antigène/anticorps à l'équilibre par un dosage ELISA indirect. En effet, après une brève incubation de ces mélanges dans des puits tapissés d'antigène, on mesure la quantité d'anticorps libre proportionnelle à la DO mesurée. On déduit la constante d'affinité ( $K_D$ ) par régression non linéaire de la courbe représentant le rapport  $A_0 - A/A_0$  en fonction des concentrations d'antigène ( $A_0$ : valeur de la DO lue en absence d'antigène soluble et  $A$ : celle de la DO lue en présence de quantités croissantes d'antigène soluble) (**figure 32**). La mise en œuvre de cette méthode nécessite de respecter quatre conditions préalables : (1) on doit disposer de l'antigène sous deux formes : l'une liée au puits (ici GST-Rho<sub>Q63L</sub>) et l'autre sous forme soluble (ici 6xHis-Rho<sub>Q63L</sub>), (2) la mesure de la quantité du complexe antigène/anticorps doit se faire à l'équilibre, (3) la concentration d'anticorps doit être fixée de telle sorte que le dosage de la fraction libre se situe dans la partie linéaire de la courbe de liaison de l'anticorps au puits, (4) le temps de mise en présence du mélange antigène/anticorps dans le puits doit être le plus court possible de manière à ne pas perturber l'équilibre du complexe.

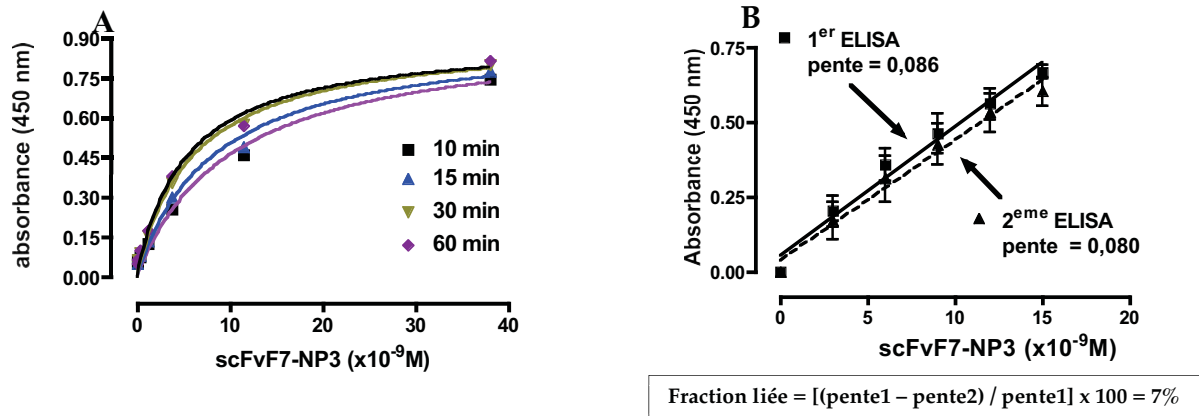


**Figure 32 : Principe de la méthode de mesure d'affinité par ELISA indirect.** *A* : mesure de l'absorbance  $A_0$  en absence d'antigène, *B* : mesure de l'absorbance  $A$  en présence d'antigène soluble, *C* : construction de la courbe dont la régression non linéaire permet de déduire le  $K_D$ .

### 1.7.1. Détermination de la fraction liée

Nous allons tout d'abord choisir le temps durant lequel on effectuera la mesure de la proportion d'anticorps qui n'est pas engagé dans le complexe antigène/anticorps. Cette proportion doit être la plus petite possible, tout en étant mesurable, de telle sorte que l'équilibre du complexe ne soit pas ou très peu perturbé par déplacement. Ceci a été réalisé selon la méthode publiée par Martineau (Martineau, 2010). La **figure 33A** représente une expérience ELISA consistant à faire varier le temps d'incubation d'une gamme de concentration du scFvF7-NP3. Le temps le plus court (10 minutes à  $23^\circ\text{C} < T < 25^\circ\text{C}$ ) est choisi ainsi que les concentrations de scFv pour lesquelles la gamme est linéaire. L'expérience suivante consiste à incuber la gamme de scFv pendant 10 minutes dans des puits tapissés de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> et de transvaser chaque point dans une autre série de puits identiques pendant le même temps. Les quantités de scFv liées aux puits sont révélées par

ELISA (**figure 33B**). Le rapport entre les pentes des droites des deux ELISA consécutifs ne doit pas excéder 10%, seuil en deçà duquel on considère la fraction de scFv se liant au puits comme négligeable. Nos conditions d'expérience respectent donc cette exigence puisque ce rapport est égal à 7%.

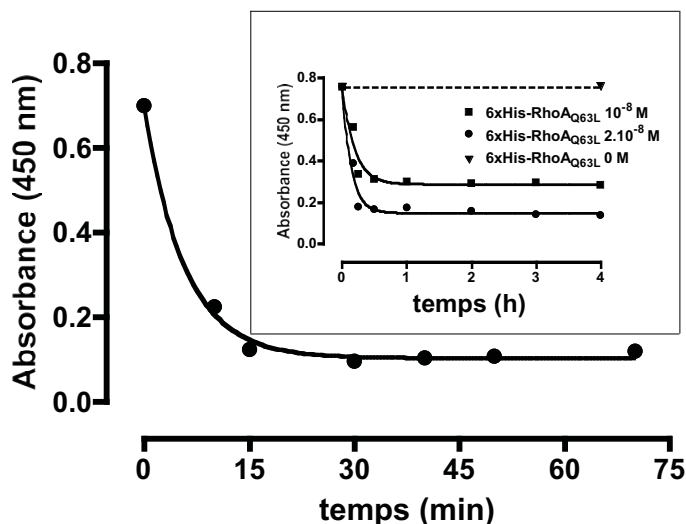


**Figure 33 : détermination de la linéarité et de la fraction de scFv liée dans les puits.**

*A* : une gamme de concentration de scFvF7-NP3 est incubée dans des puits tapissés de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> pendant des temps variables et révélée par ELISA. *B* : les concentrations de scFv les plus faibles sont incubées pendant 10 min (1<sup>er</sup> ELISA), puis sont transférées dans d'autres puits identiques pour une incubation de 10 min (2<sup>eme</sup> ELISA). Les fractions de scFv liées sont mesurées par ELISA. Le rapport des pentes des deux droites obtenues indique la fraction de scFv liée au puits. Les résultats de deux expériences indépendantes est représenté.

### I.7.2. Détermination du temps d'équilibre

Il s'agit maintenant de déterminer le temps d'équilibre de formation du complexe antigène/anticorps à température ambiante (23-25°C), afin de pouvoir mesurer des affinités selon la loi d'action de masse. Le mélange du scFvF7 et de 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> sont mis en présence et incubés à température ambiante et on mesure la décroissance du scFv libre au cours du temps par ELISA, conséquence de la formation du complexe scFv/6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub>. Après une diminution rapide de l'absorbance pendant les 15 premières minutes, celle-ci atteint un plateau stable correspondant à l'équilibre à partir de 30 minutes d'incubation : ce temps sera retenu pour les expériences de mesure d'affinité (**figure 34**).

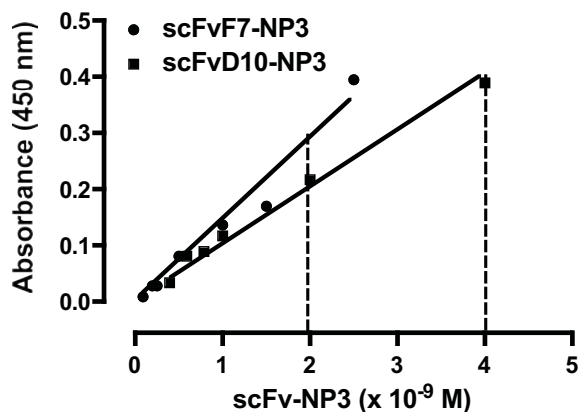


**Figure 34: Détermination du temps d'équilibre.**

Le scFvF7-NP3 ( $1.10^{-8}M$ ) et la 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> ( $2.10^{-8}M$ ) sont incubés à température ambiante pendant les temps indiqués. On suit la formation du complexe antigène/anticorps au cours du temps par un dosage ELISA indirect. L'inserte représente une expérience réalisée sur une échelle de temps plus grande en absence (contrôle de la stabilité du scFv) et en présence de deux concentrations de 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> ( $2.10^{-8}M$  et  $10^{-8}M$ ).

### I.7.3. Détermination des concentrations de scFv et vérification de la linéarité du dosage ELISA

La mesure d'affinité par ELISA nécessite de travailler avec des concentrations d'anticorps inférieures ou égales au  $K_D$  pour obtenir une bonne évaluation de l'affinité. Dans la mesure où nous ne connaissons pas ces valeurs, nous avons optimisé les conditions d'expérience avec des concentrations les plus faibles possibles de scFv compte tenu de la sensibilité du dosage, notamment en augmentant le temps de réaction de la peroxydase jusqu'à 30 minutes. Nous obtenons des conditions de linéarité et d'absorbance compatibles avec les besoins du dosage pour des concentrations de scfvF7-NP3 et D10-NP3 de 2 nM et 4 nM respectivement (figure 35).



**Figure 35: détermination des concentrations des scFvF7-NP3 et D10-NP3.**

Les scFv sont incubés dans des puits tapissés de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> pendant 10 min. Leur quantification est réalisée par l'ajout d'anticorps anti-c-myc-HRP et révélée par l'ajout de TMB pendant 30 min à TA. Les coefficients de régression linéaires sont de 0,97 pour le scFvF7-NP3 et de 0,99 pour le scFvD10-NP3.

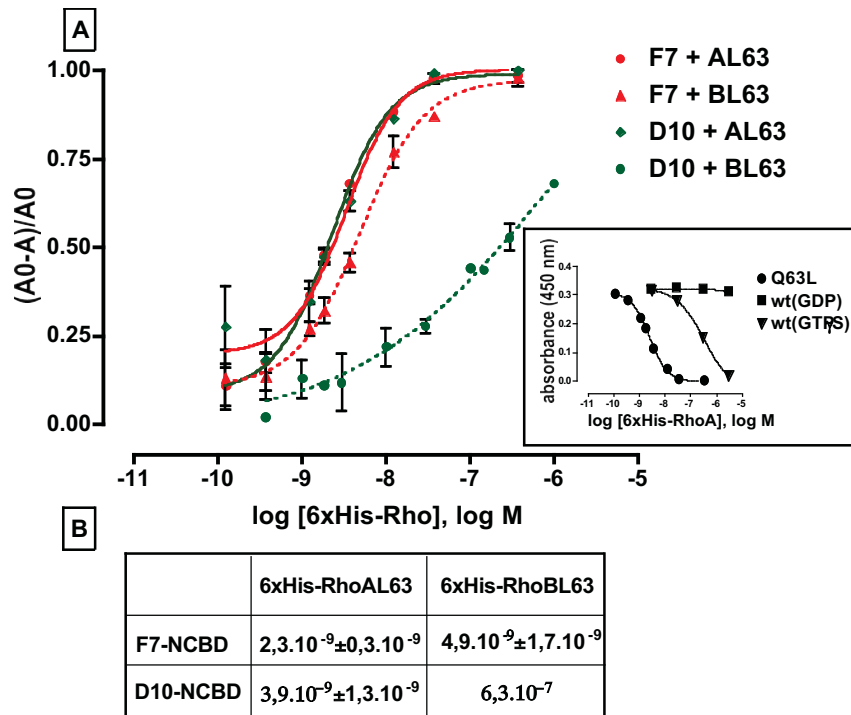


#### I.7.4. Détermination de l'affinité des scFvF7-NP3 et D10-NP3 pour 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> et 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub>

Les paramètres de l'ELISA étant fixés, nous avons réalisé les expériences dans le but de mesurer les constantes d'affinité des scFvF7-NP3 et D10-NP3 pour 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> et 6xHis-RhoB<sub>Q63L</sub>. La figure 36A montre les courbes de régression non linéaires résultantes de trois expériences indépendantes. L'insert illustre une expérience où l'on contrôle la spécificité du complexe antigène/anticorps considéré dans le dosage par comparaison des courbes obtenues en présence de 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub>, 6xHis-RhoA(GDP) et 6xHis-RhoA(GTPγS). Il apparaît qu'il n'y a pas de liaison mesurable du scFvF7-NP3 avec RhoA inactive (*i.e.* chargée avec du GDP) jusqu'à une concentration de  $3.10^{-6}$  M, alors que tout le scFv est consommé dans cette liaison avec RhoA(GTPγS) : ces conditions d'ELISA conservent donc la sélectivité des scFv pour la conformation active des Rho. Cependant, on remarque un déficit de liaison du scFv d'environ deux logarithmes avec 6xHis-RhoA (GTPγS) par rapport à 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub>. Nous pouvons émettre deux hypothèses pour interpréter ce résultat : (1) le scFvF7-NP3 a une affinité plus faible pour RhoA (GTPγS) que pour RhoA<sub>Q63L</sub>, (2) une proportion marginale (aux environs de 1%) de RhoA a effectivement incorporé le nucléotide ce qui pourrait rendre compte d'une sous-évaluation de l'affinité du scFv. On ne peut également écarter une combinaison des deux hypothèses pour expliquer ce résultat.

Quoiqu'il en soit, les droites de régressions non linéaires montrent clairement que si l'affinité du scFvF7-NP3 pour 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> et 6xHis-RhoB<sub>Q63L</sub> est sensiblement du même ordre ( $2,3.10^{-9}$  et  $4,9.10^{-9}$  M respectivement), il n'en va pas de même pour le scFvD10-NP3 ( $3,9.10^{-9}$  et  $6,3.10^{-7}$  M respectivement) (figure 36B). On peut tirer une conclusion en deux points à partir de ces données :

- (1) la maturation d'affinité a permis la sélection de scFv de meilleure affinité que le scFvC1 pour lequel ce paramètre avait été évalué par technique de SPR à environ  $3.10^{-6}$  M pour GST- RhoA<sub>Q63L</sub> (notons que l'affinité trop faible du scFvC1 empêche sa mesure par ELISA indirect). Ceci correspond à un saut quantitatif de trois logarithmes, pour autant que les deux méthodes de mesure peuvent être comparées (Heinrich et al., 2010).
- (2) La sélectivité du scFvD10-NP3 pour la conformation active de RhoA vs RhoB est confirmée puisque la mesure des affinités de ce scFv pour les mutants actifs donne un différentiel de 200 fois en faveur de RhoA<sub>Q63L</sub>.



**Figure 36 : mesure des affinités des scFvF7-NP3 et D10-NP3 pour 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> et 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub>.**  
*A* : les concentrations des scFvF7-NP3 (F7) et D10-NP3 (D10) sont fixées à  $2 \cdot 10^{-9} M$  et  $4 \cdot 10^{-9} M$  respectivement. Les concentrations de 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> (AL63) et de 6xHis-RhoB<sub>Q63L</sub> (BL63) varient de  $10^{-10}$  à  $10^6 M$ . Le graphe représente les régressions non linéaires de trois expériences indépendantes. L'insert montre le détail d'une expérience où l'on compare la liaison du scFvF7-NP3 avec 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> (Q63L), 6xHis-RhoA chargé au GTPγS (wt GTPγS) et 6xHis-RhoA chargé au GDP (wtGDP). *B* : valeurs des affinités obtenues à partir des régressions non linéaires, compte tenu de l'intervalle de confiance à 95%.

### I.8. Sélectivité des scFvF7 et D10 pour les conformations actives de RhoA et RhoB recombinantes procaryotes

Il est maintenant nécessaire de s'assurer que les scFv reconnaissent la conformation tridimensionnelle active de la protéine Rho et non pas l'épitope défini par l'enchaînement d'acides aminés dont un est muté. De plus, il faut s'assurer que le différentiel de sélectivité du scFvD10 est conservé pour les conformations actives des protéines RhoA et RhoB non mutées.

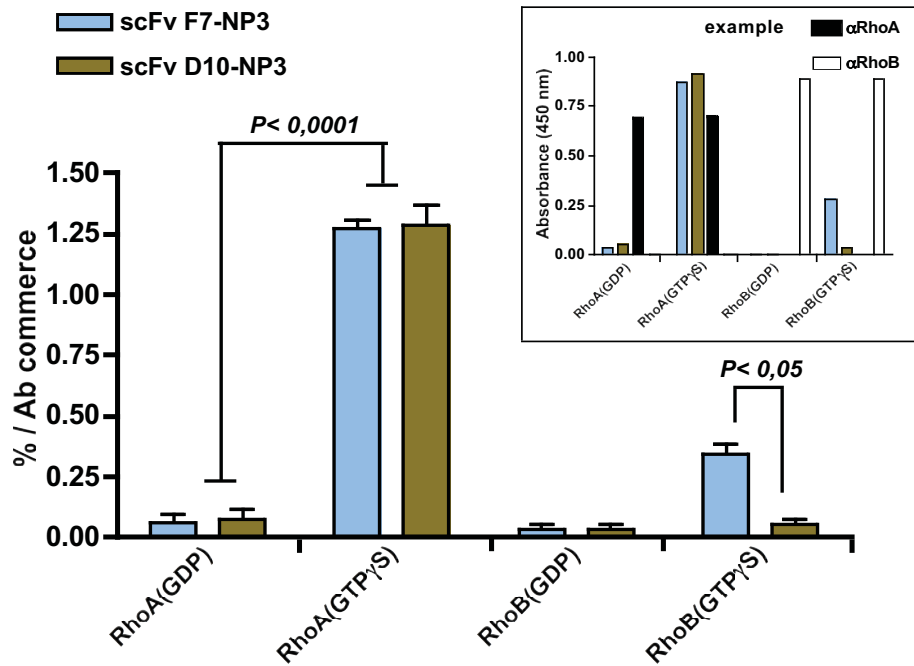
L'expérience consiste à réaliser le chargement des protéines GST-RhoA et GST-RhoB recombinantes sauvages avec les nucléotides GTPγS et GDP et à mesurer par ELISA la liaison des fragments d'anticorps sur ces protéines chargées.

Les protéines Rho présentent une forte homologie pour les acides aminés du site de liaison des nucléotides GDP et GTP. Les « switch 1 et 2 » (décrits dans la partie « Structure des Rho » de l'introduction) qui entourent cette zone de liaison du nucléotide sont aussi impliqués dans le maintien de la conformation tridimensionnelle de la protéine Rho. La forte liaison aux nucléotides et l'activité GTPasique sont dépendantes de la présence d'ions divalents. L'ion magnésium représenté dans la structure de RhoA<sub>G14V</sub> (figure 8) est positionné de façon similaire dans H-RasV12 ainsi que dans RhoA-GDP (déplacement de l'ion de l'ordre de 1,04 Å) (Ihara et al., 1998). Cet ion Mg<sup>2+</sup> joue un rôle clé en rapprochant les régions fonctionnelles de liaison au phosphate, les « switch 1 » et « switch 2 » comme pour H-Ras.

Pour réaliser les expériences de chargement, nous nous sommes appuyés sur des publications décrivant les conditions de chargement et de cinétique de dissociation du GTP de la protéine RhoA (Self and Hall, 1995). Le principe de chargement consiste à utiliser l'EDTA qui complexe le magnésium et permet l'échange des nucléotides de la même façon que les RhoGEFs le font *in vivo*. En effet, pour la réaction d'échange du nucléotide, les RhoGEFs joueraient 2 rôles : déplacement du Mg<sup>2+</sup> fixé et déstabilisation du nucléotide lié (Zhang et al., 2000). Les nucléotides libres contenus dans la solution vont prendre alors la place vacante dans la poche de liaison du nucléotide de la protéine Rho. Nous utilisons l'analogue GTPγS non hydrolysable du GTP, afin d'obtenir la conformation active stable.

On observe que les scFvF7 et D10 se lient préférentiellement à GST-RhoA chargé au GTPγS mettant ainsi en évidence leur sélectivité pour la conformation active de la protéine RhoA (figure 37). En revanche, leurs liaisons à GST-RhoB(GTPγS) sont significativement différentes et permettent de confirmer la sélectivité du scFvD10 pour la conformation active de RhoA.

Remarque : le signal du scFvF7 pour GST-RhoB(GTPγS) est beaucoup plus faible que pour GST-RhoA(GTPγS). Ceci est probablement dû à une faible production de GST-RhoB ou à un chargement en nucléotide plus difficile de cette protéine.

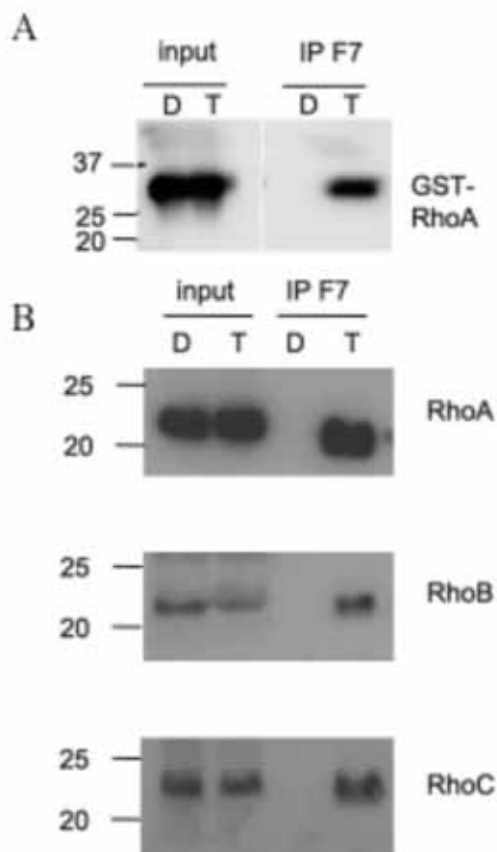


**Figure 37: liaison des scFvF7 et D10 à RhoA et RhoB chargées au GDP ou au GTP $\gamma$ S mesurée en ELISA.** Les scFvF7 (en bleu) et D10 (en ocre) purifiés (C°) sont incubés en présence des protéines recombinantes bactériennes GST-RhoA et GST-RhoB chargées au GDP ou au GTP $\gamma$ S et immobilisées dans des puits tapissés au glutathion. Les valeurs en pourcentage correspondent à la normalisation des absorbances lues à 450 nm des scFv par rapport à celles des anticorps du commerce non conformationnels (anti-RhoA monoclonal et anti-RhoB polyclonal). Le graphe représente la moyenne de 4 expériences indépendantes (significativité des comparaisons par test ANOVA). On révèle la liaison des anticorps anti-RhoA et anti-RhoB commerciaux par l'ajout d'un anticorps secondaire anti-IgG-HRP de souris et anti-IgG-HRP de lapin, respectivement. La liaison des scFv est réalisée par l'ajout d'un anticorps anti-myc-HRP. L'insert représente le détail d'une expérience où l'anticorps anti-RhoA figure en bâton noir et l'anticorps anti-RhoB en bâton blanc.

### **I.9. Sélectivité des scFvF7 et D10 pour les conformations actives de RhoA, RhoB et RhoC obtenues à partir de cellules eucaryotes**

Afin d'envisager la poursuite du projet d'obtention de scFv sélectifs de chaque Rho en conformation active et d'espérer pouvoir les utiliser comme biosenseurs dans un contexte physiologique, il nous a parut nécessaire de vérifier, dans un premier temps, que les scFv interagissent de manière sélective avec les protéines Rho actives endogènes eucaryotes. Pour ce faire, nous avons choisi de mettre en œuvre la technique d'immuno-précipitation, que nous avons mis au point avec le scFvF7-NP3. Ce fragment d'anticorps est exprimé dans

*E. coli* en fusion N-terminale de l'étiquette chitin binding domain (CBD). Le CBD est la partie C-terminale de la chitinase A1 de *b. circulans* qui est responsable de la liaison à haute affinité à la chitine (polymère de N-acetylglucosamine) (Watanabe et al., 1994). Le scFvF7-NP3-CBD est fixé sur des billes de sépharose fonctionnalisées à la chitine et incubé avec des extraits de cellules LB1319-MEL, une lignée de mélanome humain exprimant des antigènes tumoraux dont l'expression est étudiée au laboratoire (Sarrabayrouse et al., 2010). Il a été montré que les GTPases Rho, en particulier RhoA, régulent l'expression des molécules de CMH capables de présenter ces antigènes de tumeurs (Tilkin-Mariamé et al., 2005). Ces extraits cellulaires ont préalablement subi un traitement à l'EDTA en présence de GDP ou de GTPγS de telle sorte que les GTPases incorporent les nucléotides. Les billes sont ensuite dénaturées par un traitement au SDS et révélées par immuno-empreinte avec des anticorps anti-RhoA, anti-RhoB et anti-RhoC. Les billes scFvF7-NP3-CBD sont d'abord validées par incubation avec un extrait bactérien exprimant GST-RhoA(GDP) et GST-RhoA(GTPγS) (**figure 38A**). Le scF7-NP3-CBD interagit sélectivement avec les formes actives de RhoA, RhoB et RhoC endogènes eucaryotes puisque ces GTPases sont immuno-précipitées uniquement dans le cas où elles ont incorporé du GTPγS (**figure 38B**).



**Figure 38 : immuno-précipitation de RhoA, RhoB et RhoC par le scFvF7-NP3-CBD sur des extraits de cellules LB1319-MEL.** Des extraits bactériens exprimant GST-RhoA (A) et de cellules LB1319-MEL (B) sont traités à l'EDTA en présence de GDP (D) ou de GTPγS (T) et incubés avec du scFvF7-NP3-CBD fixé sur des billes sépharose-chitine (IP F7). Après lavages, les protéines RhoA, RhoB et RhoC accrochées sur les billes sont séparées par électrophorèse et révélées sur membranes de nitrocellulose par les anticorps anti-Rho correspondants. Avant incubation, des aliquotes d'extraits sont déposées pour vérifier la présence de protéines Rho (input).

## ***I.10. Commentaires***

Dans le but d'obtenir des biosenseurs des GTPases Rho et d'améliorer l'affinité du scFvC1, nous avons construit une banque secondaire par epPCR sur toute la séquence de ce fragment d'anticorps. Nous avons mis en œuvre la technique de phage display pour sélectionner des scFv plus affins pour RhoA à partir de cette banque en utilisant la protéine recombinante procaryote GST-RhoA<sub>Q63L</sub> comme antigène. Les pressions de sélections appliquées (augmentation du nombre de lavages et baisse progressive de la quantité d'antigène) ont abouti à l'isolement de scFv sélectifs de la conformation active des GTPases Rho (GST-Rho<sub>Q63L</sub>) avec une affinité considérablement augmentée (entre 10<sup>-9</sup> et 10<sup>-8</sup> M).

De manière inattendue, les scFv sélectionnés se répartissent en deux groupes:

- Le groupe F7 possédant une haute affinité pour les trois GTPases Rho<sub>Q63L</sub>,
- Le groupe D10 se liant à GST-RhoA<sub>Q63L</sub> et RhoC<sub>Q63L</sub> avec une haute affinité et à RhoB<sub>Q63L</sub> avec une affinité 100 fois plus faible. Nous avons également mis en évidence que le scFvC1 appartient à ce groupe.

De plus, le scFvF7 possède la propriété d'immuno-précipiter sélectivement RhoA, RhoB et RhoC endogènes eucaryotes liées au GTPγS. Les expériences visant à mettre en évidence la différence de sélectivité du scFvD10 pour RhoA et RhoB actives endogènes eucaryotes sont en cours et les premiers résultats, bien qu'incomplets, semblent prometteurs. Ce résultat valide notre hypothèse de départ selon laquelle l'absence d'immuno-précipitation des Rho eucaryotes actives par le scFvC1 était due à sa trop faible affinité (3μM) inférieure à celles mesurées des partenaires connus des Rho (autour de 0,1μM) (figure 39), voire 6 nM pour mDia (Narumiya et al., 2009). En effet, cette vérification nous a paru indispensable à la poursuite du projet dans la mesure où l'interprétation fine des images d'immunofluorescence des scFvF7 et D10 dans le détail de leurs sélectivités respectives en sortira renforcée.

**A**

Syringe (400 $\mu\text{M}$ )	Sample cell (50 $\mu\text{M}$ )	<i>N</i>	<i>K<sub>d</sub></i>	$\Delta H$
			<i>nM</i>	<i>kcal mol<sup>-1</sup></i>
RhoA·GTP $\gamma$ S	DH-PH	0.8	140 $\pm$ 11	-9.4 $\pm$ 1.3
RhoA·GTP $\gamma$ S	PH	0.8	80 $\pm$ 6	-13.6 $\pm$ 0.9
RhoA·GTP $\gamma$ S	DH-PH-RhoA·()	0.9	110 $\pm$ 15	-10.6 $\pm$ 0.9
RhoA·()	DH-PH	0.8	110 $\pm$ 11	3.4 $\pm$ 0.3
RhoA·()	DH-PH-RhoA·GTP $\gamma$ S	0.8	110 $\pm$ 12	3.2 $\pm$ 0.3

**B**

	<i>K<sub>d</sub></i> <sup>a</sup>	
	mantGpp(NH)p	mantGDP
	$\mu\text{M}$	
Rhotekin-HR1	0.009	1.00
GST-Rhotekin-HR1	0.147	ND <sup>b</sup>
PRK1-HR1a	0.15	0.64
PRK1-HR1b	1.80	13.20
ROCKI-RBD	0.13	1.20
ROCKI-HR1	0.75	0.53
ROCKI-RID	0.26	1.10
PAK1 <sub>57-141</sub>	>90 <sup>c</sup>	>90

<sup>a</sup> The observed error is 10–15%.<sup>b</sup> ND, not determined.<sup>c</sup> No inhibition of the nucleotide dissociation was observed at concentrations of 90  $\mu\text{M}$  of the effector domain.

**Figure 39 : affinités des partenaires des GTPases Rho. A :** constantes de dissociation (*K<sub>d</sub>*) des domaines PH et DH-PH de PDZ-RhoGEF pour RhoA lié au GTP $\gamma$ S et vide de nucléotide mesurées par calorimétrie (Chen et al. 2010), **B :** constantes de dissociation (*K<sub>d</sub>*) des interactions d'effecteurs variés pour RhoA liée au mant-Gpp(NH)p et au mant-GDP mesurées par fluorimétrie (Blumenstein and Ahmadian, 2004).

Il sera également nécessaire de s'assurer que ces scFv ont hérité de la propriété du scFvC1 de se lier aux GTPases Rho actives à l'exclusion des autres membres de la famille (Rac et cdc42 pour les plus connues). Nous envisageons par la suite de vérifier que les scFv sont capables de révéler une activation de RhoA par la stimulation de cellules eucaryotes par des molécules agonistes telles que l'acide lysophosphatidique (LPA) et l'epidermal growth factor (EGF) par exemple ou bien par un traitement au sérum (Ren et al., 1999) (Ren and Schwartz, 2000) (Pellegrin and Mellor, 2008). De la même manière, la sélectivité du scFvD10 sera vérifiée dans ces conditions.

L'ensemble de ces résultats validera la stratégie de sélection de fragments d'anticorps par phage display sur des antigènes d'origine procaryote. De plus, la maturation d'affinité s'avère efficace pour obtenir des ligands capables d'immuno-précipiter les GTPases Rho endogènes eucaryotes, ainsi que pour révéler les potentialités de sélectivité des scFv.

## II- Selection d'un scFv spécifique de la protéine RhoB en conformation active.

Nous avons sélectionné des fragments d'anticorps présentant des spécificités différentes : le scFvC1 reconnaît mieux la forme RhoA activée, le scFvF7 se lie aux trois Rho actives et le scFvD10 est sélectif de RhoA et RhoC actives. Il apparaît donc possible de concevoir des outils permettant de distinguer chacune de ces trois protéines Rho sous forme active indépendamment des autres.

Nous nous sommes donc proposés de sélectionner un fragment d'anticorps spécifique de la protéine RhoB active à partir de la banque de mutants obtenue à partir du scFvC1.

Les données montrent qu'à partir d'une séquence primaire d'acides aminés on peut obtenir des variants en affinité et en spécificité à condition d'être capable de sélectionner les mutations aboutissant au résultat désiré.

Il s'agit ici de provoquer une pression de sélection sur la banque en faveur de ligands spécifiques de RhoB active. Cette pression de sélection consistera donc à favoriser les fragments d'anticorps se liant préférentiellement à RhoB active tout en éliminant les candidats interagissant avec RhoA et/ou de RhoC actives, et ceux n'ayant pas de spécificité pour l'une ou l'autre des trois Rho.

### **II.1. Stratégie de sélection**

La stratégie consiste en trois tours de sélection :

Le premier tour a pour but d'éliminer les clones mutés ayant perdu toute capacité à se lier à RhoB active. Pour ce faire, la banque secondaire exprimée sur phage est mise en présence de la protéine recombinante purifiée GST-RhoB<sub>Q63L</sub> préalablement immobilisée dans un puits tapissé de glutathion. Après lavages des clones non liés à l'antigène, les phages sont élués et amplifiés pour subir un deuxième tour de sélection.

Les deuxième et troisième tours ont pour but d'éliminer les ligands capables de se lier à RhoA active. Les phages sont pré-incubés avec un excès de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> en solution, suivi de l'ajout de billes magnétiques tapissées de glutathion qui capteront la protéine. Les phages liés à RhoA<sub>Q63L</sub> seront éliminés par précipitation des billes grâce à l'emploi d'un aimant. Le surnageant est ensuite mis en présence de GST-RhoB<sub>Q63L</sub> dans les conditions du tour n°1.

Remarque : des tentatives de sélectionner des scFv anti-RhoC conformation-indépendants que nous avons entrepris au laboratoire ont toutes échoué. Il semblerait que

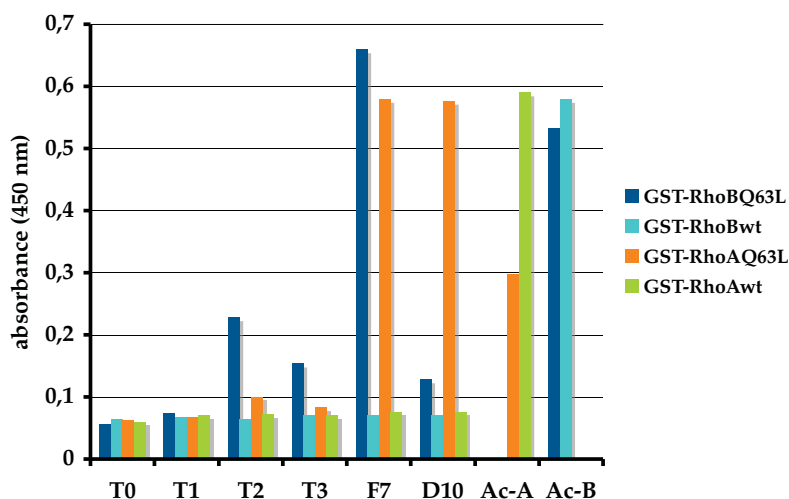


l'homologie entre RhoC et RhoA soit supérieure à celle de RhoB avec ces deux isoformes. C'est la raison pour laquelle nous avons fait le choix de préincuber les phages en présence de GST-RhoA<sub>Q63L</sub>. Nous testerons par la suite la spécificité des scFv anti-RhoB active vis à vis de RhoC active.

## **II.2. Résultat de la sélection**

À l'issue de la sélection nous avons comparé les signaux ELISA des phages amplifiés des différents tours vis à vis des protéines GST-RhoB<sub>Q63L</sub> et GST-RhoA<sub>Q63L</sub>. Des contrôles de spécificité pour la forme active de ces deux protéines ont été réalisés en incluant les formes sauvages GST-RhoB<sub>wt</sub> et GST-RhoA<sub>wt</sub> majoritairement liées au GDP (figure 40). La présence de ces différentes protéines est révélée par deux anticorps monoclonaux anti-RhoA et anti-RhoB commerciaux. Les conformations actives sont mises en évidence par le phageF7 reconnaissant les trois Rho actives qui se lie, dans ce cas, préférentiellement sur les mutants Q63L de RhoB et de RhoA. De plus, le phageD10 que nous avons caractérisé comme étant sélectif des formes actives de RhoA et de RhoC nous permet de nous assurer que, dans cette expérience, les formes actives de RhoB et de RhoA sont différenciables.

Concernant les phages issus de la sélection, on observe l'apparition d'un signal pour RhoB<sub>Q63L</sub> à partir du deuxième tour, signal qui s'atténue au troisième tour. On note également une augmentation moindre mais non négligeable du signal pour RhoA<sub>Q63L</sub> qui suit le même profil au cours des tours de sélection. Le calcul des rapports des absorbances RhoB<sub>Q63L</sub>/RhoA<sub>Q63L</sub>, nous renseigne sur la sélectivité des phages obtenus : on constate que les phages F7 et D10, nos références, ont un rapport égal à 1,13 et 0,22 respectivement, tandis que l'on obtient des valeurs supérieures après sélection (2,28 pour le T2 et 1,86 pour le T3). Bien que nous n'ayons pas d'explication sur la baisse de ce rapport au tour n°3, ces résultats nous encouragent à isoler des clones et à caractériser leurs spécificités.

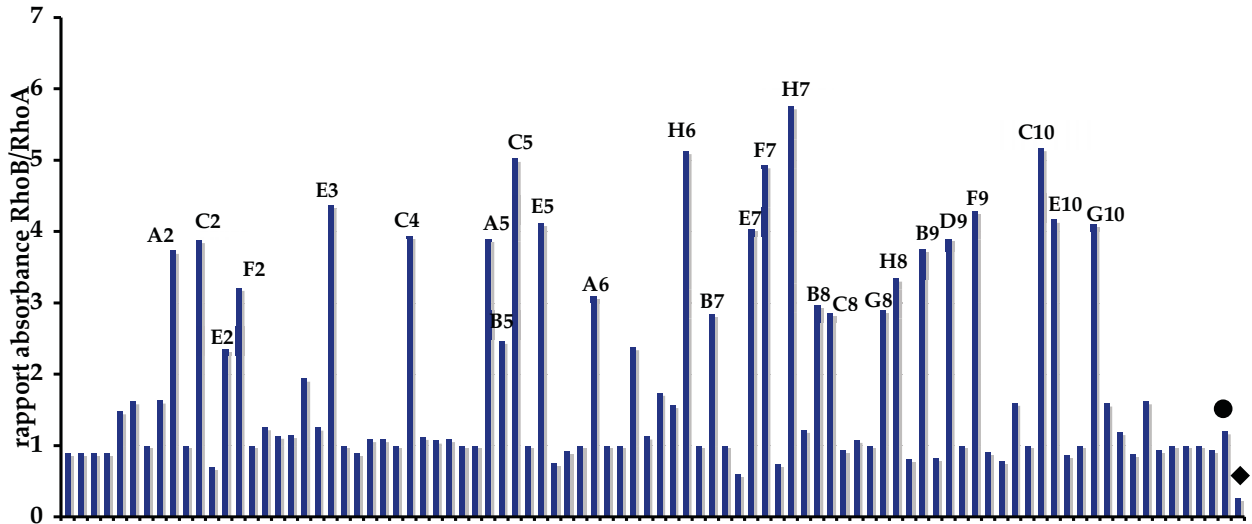


**Figure 40: ELISA polyclonal après trois tours de sélection:**

les protéines GST-RhoAwt et GST-RhoBwt (protéines recombinantes sauvages) et leurs mutants actifs correspondants (GST-RhoA<sub>Q63L</sub> et GST-RhoB<sub>Q63L</sub>) sont immobilisées dans des puits tapissés de glutathion. Des suspensions de phages issues de la banque initiale (**T0**), des différents tours de sélection (**T1**, **T2**, et **T3**), ainsi que les phages **F7** et **D10** sont incubés à la concentration de  $10^8$  TU par puits. La présence des différents antigènes est contrôlée par des anticorps anti-RhoA (**Ac-A**) et anti-RhoB (**Ac-B**) monoclonaux commerciaux. Les phages sont révélés par un anticorps anti-M13-HRP et les anticorps monoclonaux par un anticorps secondaire anti-souris, tous deux couplés à la peroxydase. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

### II.3. Analyse clonale sur le tour n°3

Nous avons analysé 88 clones choisis au hasard sur le tour n°3. Nous avons comparé leurs signaux ELISA en présence de GST-RhoB<sub>Q63L</sub> et de GST-RhoA<sub>Q63L</sub>. Les rapports de ces valeurs sont indiqués dans le graphe de la figure 41. Le phage F7, utilisé comme référence, donne un rapport de 1,2. Les conditions de cette expérience permettent de différencier les deux protéines sous forme active puisque ce rapport est 0,23 pour le phage D10. Nous avons choisi de nous intéresser aux clones dont la valeur est supérieure à 2 : cela représente 26 candidats.

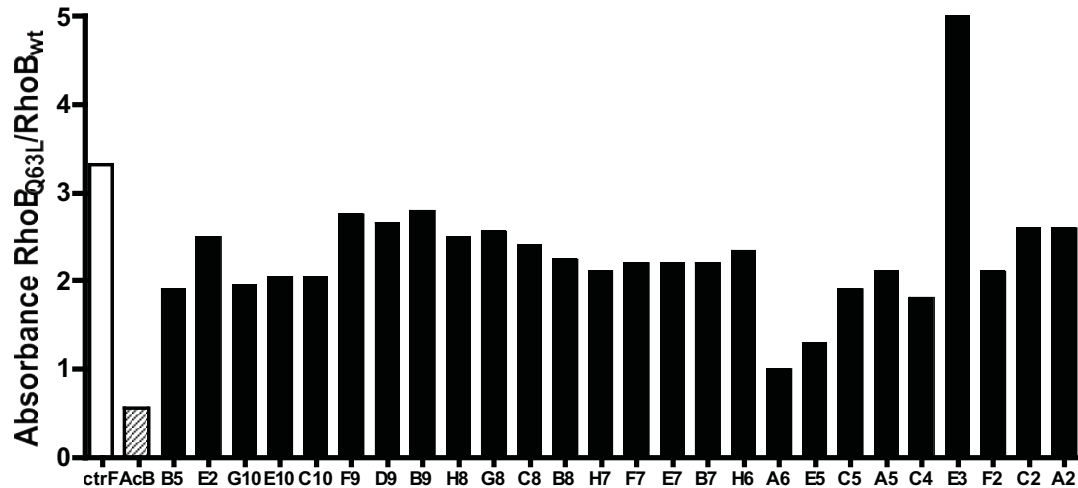


**Figure 41: ELISA clonal sur le tour de selection T3: spécificité pour RhoB<sub>Q63L</sub>.**

Des clones isolés en culture sont infectés par le phage auxiliaire M13KO7. Après expression des scFv correspondants à la surface des phages, les surnageants contenant les phages sont testés en ELISA sur deux plaques de 96 puits tapissées au glutathion où une concentration fixe de GST-RhoB<sub>Q63L</sub> (plaque n°1) et de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> (plaque n°2) a été immobilisée. Après lavages, les phages fixés spécifiquement à l'antigène sont révélés par l'anti-M13-HRP selon le protocole ELISA (voir matériel & méthodes). Les valeurs indiquées en ordonnée représentent les rapports des valeurs d'absorbance (450 nm) mesurées sur GST-RhoB<sub>Q63L</sub> et sur GST-RhoA<sub>Q63L</sub> pour chaque clone. Les clones retenus sont identifiés par leurs coordonnées. Deux contrôles ont été inclus: le phage F7 symbolisé par un rond et le phage D10 symbolisé par un losange.

#### II.4. Spécificité des clones sélectionnés pour la forme active de RhoB

Si les clones testés sont capables de discriminer RhoB<sub>Q63L</sub> de RhoA<sub>Q63L</sub>, il faut vérifier qu'ils sont également spécifiques de la forme active de RhoB. C'est dans ce but que nous avons comparé en ELISA leur liaison sur le mutant actif RhoB<sub>Q63L</sub> et sur la forme sauvage de cette protéine RhoBwt chargée au GDP (figure 42).



**Figure 42: spécificité des clones sélectionnés pour la forme activée (Q63L) de RhoB par rapport à RhoB sauvage.**

Les protéines recombinantes purifiées de la forme activée de RhoB (GST-RhoB<sub>Q63L</sub>) et de la forme sauvage (GST-RhoB<sub>wt</sub>) sont immobilisées dans des puits tapissés au glutathion. Les clones sélectionnés sont infectés par le phage auxiliaire M13KO7. Après expression des scFv correspondants à la surface des phages, les surnageants contenant les phages sont testés en ELISA. Les valeurs indiquées en ordonnée représentent les rapports des valeurs d'absorbance (450 nm) mesurées sur GST-RhoB<sub>Q63L</sub> et sur GST-RhoB<sub>wt</sub> pour chaque clone. Deux contrôles ont été inclus: le phageF7 (ctrF, baton blanc) et un anticorps monoclonal anti-RhoB commercial (AcB, baton rayé).

L'anticorps monoclonal anti-RhoB commercial a été inclus dans l'expérience pour vérifier la présence des deux protéines et nous indique que la quantité de GST-RhoB<sub>wt</sub> est supérieure à celle de la forme active. Cependant, le phageF7 pris comme référence nous confirme que ces conditions permettent de mettre en évidence une spécificité pour RhoB<sub>Q63L</sub> puisque ce rapport est de 3,33 dans ces conditions. Seul le clone A6 n'affiche pas de spécificité pour la forme active de RhoB avec un rapport égal à 0,99. La majorité des clones testés se lient préférentiellement à RhoB<sub>Q63L</sub>. On remarque que le clone E3 possède le meilleur score de spécificité avec un rapport égal à 5.

## **II.5. Séquençage des clones sélectionnés**

Parallèlement aux études de sélectivité, les 26 clones sélectionnés ont été séquencés. Deux d'entre eux n'ont pas pu être exploités (figure 43). On observe que 23 clones possèdent la mutation D108N correspondant à la substitution de l'acide aspartique en position 108 par une asparagine dans le CDR3 de la VH. Parmi ceux-ci, on retrouve 5 fois le même clone où cette mutation est unique (A5, B8, G8, H8 et E2) et un clone en double exemplaire où cette mutation est accompagnée de trois autres dont une est muette (D10 et G10). Les seize autres clones possèdent la mutation D108N accompagnée d'autres mutations et sont représentées soit à un seul exemplaire, soit en double exemplaire (F9 et C10, D10 et G10). Seul le clone E3 a la particularité d'être dépourvu de cette mutation et possède quatre mutations dont aucune n'est située dans les CDR. Nous n'écartons pas ce clone dans la mesure où des modifications de la charpente (partie constante) des anticorps peuvent avoir des conséquences sur la flexibilité ou/et l'orientation des CDR de telle sorte que l'affinité soit modifiée (Hoogenboom, 2005). On peut supposer que ce genre de mutations pourrait affecter la sélectivité de ce clone. Nous remarquons également qu'aucun de ces clones n'est commun avec ceux sélectionnés par la stratégie de maturation d'affinité (figure 43) et que tous les clones n'ayant pas été mutés ont été éliminés (aucun phageC1 ne subsiste). Toutes ces observations nous conduisent à conclure que la mutation D108N est probablement déterminante pour la spécificité recherchée.

Clone	mutation	site	Clone	mutation	site
A2:	<b>D108N</b> <b>I56I</b>	<b>CDR3 VH</b>	B8:	<b>D108N</b>	<b>CDR3 VH</b>
C2:	<b>D108N</b> <b>I54M</b>	<b>CDR3 VH</b> <b>FR VL</b>	C8:	<b>D108N</b> <b>V125V</b> <b>D26H</b>	<b>CDR3 VH</b> <b>FR VL</b>
F2:	<b>Q90R</b> <b>D108N</b>	<b>FR VH</b> <b>CDR3 VH</b>	G8:	<b>D108N</b>	<b>CDR3 VH</b>
E3:	<b>K48M</b> <b>A39T</b> <b>L52R</b> <b>I71V</b>	<b>FR VH</b> <b>FR VL</b> <b>FR VL</b> <b>FR VL</b>	H8:	<b>D108N</b>	<b>CDR3 VH</b>
C4:	<b>T77A</b> <b>D108N</b>	<b>FR VH</b> <b>CDR3 VH</b>	B9:	<b>K84R</b> <b>N92E</b> <b>D108N</b> <b>A109A</b> <b>T18T</b> <b>Q24R</b>	<b>FR VH</b> <b>FR VH</b> <b>CDR3 VH</b> <b>FR VL</b>
A5:	<b>D108N</b>	<b>CDR3 VH</b>	D9:	<b>Q90Q</b> <b>D108N</b>	<b>CDR3 VH</b>
C5:	<b>V101E</b> <b>D108N</b>	<b>FR VH</b> <b>CDR3 VH</b>	F9:	<b>V13E</b> <b>S26S</b> <b>F76Y</b> <b>L89L</b> <b>D108N</b> <b>E99V</b>	<b>FR VH</b> <b>FR VH</b> <b>CDR3 VH</b> <b>FR VL</b>
E5:	<b>T64K</b> <b>D108N</b> <b>S114S</b> <b>L115L</b>	<b>CDR2 VH</b> <b>CDR3 VH</b>	C10:	<b>V13E</b> <b>S26S</b> <b>F76Y</b> <b>L89L</b> <b>D108N</b> <b>E99V</b>	<b>FR VH</b> <b>FR VH</b> <b>CDR3 VH</b> <b>FR VL</b>
H6:	<b>D108N</b> <b>A109A</b>	<b>CDR3 VH</b>	E10:	<b>V2V</b> <b>D108N</b> <b>S40N</b> <b>G93R</b>	<b>CDR3 VH</b> <b>FR VL</b> <b>FR VL</b>
B7:	<b>I56V</b> <b>D108N</b> <b>T120S</b> <b>A132T</b> <b>S134S</b> <b>S80T</b>	<b>CDR2 VH</b> <b>CDR3 VH</b> <b>FR VH</b> <b>Lk</b> <b>FR VL</b>	G10:	<b>V2V</b> <b>D108N</b> <b>S40N</b> <b>G93R</b>	<b>CDR3 VH</b> <b>FR VL</b> <b>FR VL</b>
E7:	<b>V5A</b> <b>D108N</b> <b>L121Q</b> <b>P72P</b>	<b>FR VH</b> <b>CDR3 VH</b> <b>FR VH</b>	E2:	<b>D108N</b>	<b>CDR3 VH</b>
F7:	<b>D108N</b> <b>D7G</b>	<b>CDR3 VH</b> <b>FR VL</b>			
H7:	<b>V101E</b> <b>D108N</b>	<b>FR VH</b> <b>CDR3 VH</b>			

**Figure 43: mutations des clones sélectionnés contre RhoB sous forme active.**

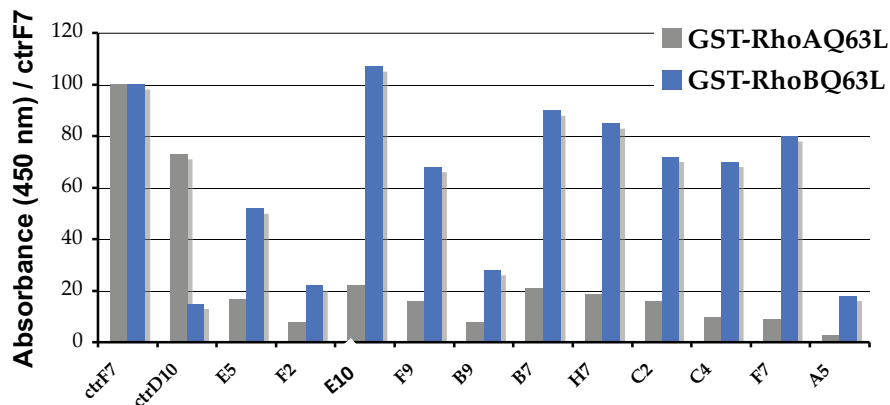
Les mutations situées dans les CDR sont en rouge, les mutations situées dans la charpente (FR) en bleu, les mutations muettes ou situées dans le linker (Lk) en noir. La numérotation des acides aminés est indiquée comme référencée sur le site IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

## II.6. Spécificité des scFv sous forme soluble

Il s'agit maintenant de vérifier que les scFv sous forme soluble conservent leurs propriétés. Ces fragments d'anticorps dérivent du scFvC1 qui, comme nous l'avons vu plus haut, nécessite d'être exprimé en fusion avec le domaine N-terminal de la P3 pour conserver ses propriétés. Comme pour les clones sélectionnés par maturation d'affinité, l'expression des clones sélectionnés en fusion avec la P3 est ici aussi indispensable : aucun signal n'est détectable en ELISA hors de ce contexte (résultats non montrés).

Le résultat des séquences montre que 16 clones sur 24 sont différents d'un point de vue de la séquence primaire en acides aminés. Nous avons dans un premier temps sous-cloné avec succès 11 de ces clones dans le plasmide pHEN2scFv-NP3. Après avoir été exprimés dans le surnageant de culture *E.Coli*, les scFv ont été testés en ELISA. Deux types d'expériences ont été réalisés pour déterminer leur sélectivité pour RhoB<sub>Q63L</sub> par rapport à RhoA<sub>Q63L</sub> d'une part (figure 44), ainsi que RhoB<sub>Q63L</sub> par rapport à RhoBwt chargée au GDP d'autre part (figure 45).

A



B

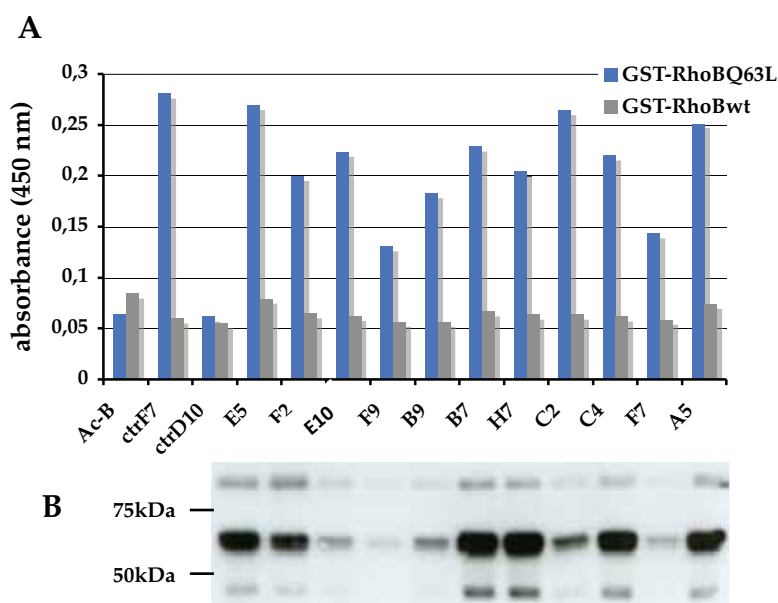


**Figure 44: spécificité des scFv sélectionnés pour la forme activée RhoB<sub>Q63L</sub> par rapport à RhoA<sub>Q63L</sub>.**

**A :** les formes activées (Q63L) de GST-RhoA et GST-RhoB sont immobilisées dans des puits tapissés de glutathion. Des surnageants de culture de *E.Coli* exprimant les scFv en fusion avec le domaine N-terminal de la PIII sont testés en ELISA. Les valeurs indiquées en ordonnée représentent la normalisation des absorbances (450 nm) par rapport au scFvF7 spécifique des trois Rho (ctrF7). Le scFvD10 déjà décrit est inclus dans l'expérience (ctrD10). **B :** immuno-empreinte des surnageants afin d'évaluer les concentrations relatives de scFv.

On observe que le scFvD10 contrôle, sélectif de RhoA et RhoC activées, affiche une absorbance supérieure pour RhoA que pour RhoB : les conditions de cette expérience permettent de différencier les deux protéines RhoA et RhoB. La comparaison des absorbances des scFv contre GST-RhoB<sub>Q63L</sub> et GST-RhoA<sub>Q63L</sub> normalisées par rapport au scFvF7 spécifique des trois Rho activées montre que leur spécificité pour RhoB activée est conservée, tous les clones se lient préférentiellement à RhoB<sub>Q63L</sub>.

On observe sur la figure 45 que la spécificité des fragments d'anticorps sélectionnés pour la forme activée de RhoB par rapport à la conformation inactive (RhoBwt majoritairement liée au GDP) est conservée, les scFv se lient préférentiellement sur le mutant Q63L.



**Figure 45: spécificité des scFv sélectionnés pour la forme activée RhoB<sub>Q63L</sub> par rapport à la forme sauvage RhoBwt.**

**A** : les formes activée (Q63L) et sauvage (wt) de GST-RhoB sont immobilisées dans des puits tapissés de glutathion. Des surnageants de culture de *E.Coli* exprimant les scFv en fusion avec le domaine N-terminal de la P3 sont testés en ELISA. Les contrôles scFvF7 spécifique des trois Rho activées (ctrF7), le scFvD10 spécifique de RhoA et RhoC activées (ctrD10) et un anticorps anti-RhoB monoclonal commercial (Ac-B) sont inclus dans l'expérience. **B** : immuno-empreinte des surnageants correspondants afin d'évaluer les concentrations relatives de scFv révélés avec un anticorps anti-myc-HRP.

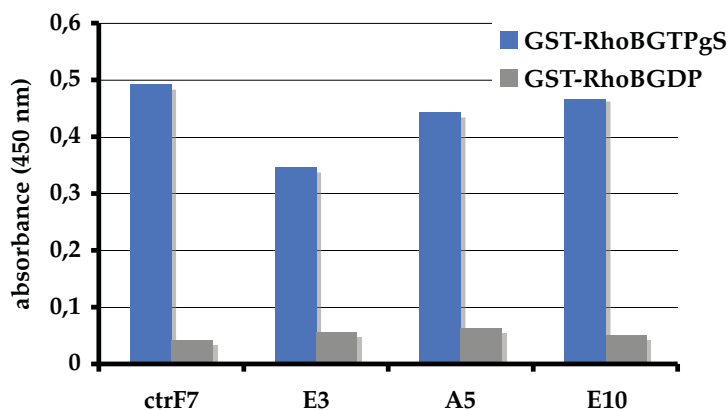
Remarque : l'évaluation des concentrations des surnageants en scFv montre de fortes disparités selon les clones, mais aussi pour un même clone d'une expérience à l'autre. Ce



biais s'annule ici puisque l'on s'intéresse à la différence de liaison de chaque scFv vis à vis de deux antigènes.

## II.7. Purification et propriétés des scFv E3, A5 et E10

Il est maintenant nécessaire de vérifier que les scFv sélectionnés sont spécifiques de la conformation active de RhoB et que la liaison observée sur le mutant Q63L est transférable à RhoB lié au GTP. Nous avons choisi de nous intéresser en priorité aux clones A5 qui possède la mutation D100N unique, E3 seul clone dépourvu de cette mutation, et E10 dont les substitutions accompagnant la D100N sont situées dans la VL. Nous avons comparé la liaison de ces scFv sur la protéine sauvage chargée avec du GTPγS ou au GDP (figure 46).



**Figure 46: spécificité des scFvE3, A5 et D10 pour RhoB chargé au GTPγS mesurée en ELISA.**

La protéine recombinante GST-RhoB est chargée au GDP(en gris) ou au GTPγS (en bleu) dans un extrait bactérien puis immobilisée et purifiée dans des puits tapissés au glutathion. Les scFv purifiés par IMAC sont ajoutés à la concentration de 1 pmole par puits et révélés par un anticorps anti-myc couplé à la peroxydase. Le scFvF7 spécifique des protéines RhoA, RhoB et RhoC sous forme active est utilisé comme contrôle (ctrF7). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

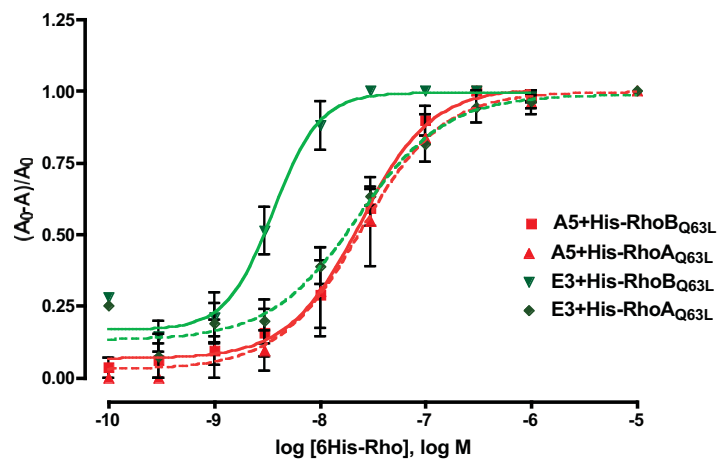
Les résultats montrent que les scFv E3, A5 et E10 se lient préférentiellement à RhoB(GTPγS) tout comme le scFvF7 utilisé ici comme contrôle de chargement de RhoB.

Ces trois scFv apparaissent comme sélectifs de la conformation active de la protéine RhoB.

### II.8. Mesure du différentiel d'affinité des scFvE3 et A5 pour 6xHis-RhoB<sub>Q63L</sub> et 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub>.

Contrairement au scFvF7 qui reconnaît les trois Rho actives, la sélectivité des scFvE3 et A5 pour la conformation active de RhoB doit se traduire par une liaison différentielle la plus grande possible entre les deux protéines; c'est sur ce critère que nous choisirons le clone le plus intéressant pour une utilisation sur des extraits de cellules eucaryotes.

Nous avons mesuré et comparé les affinités de ces scFv pour 6xHis-RhoB<sub>Q63L</sub> et 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> par la méthode de Friguet. Par rapport à la méthode déjà décrite, nous avons apporté une seule modification puisque l'antigène fixé dans les puits, c'est à dire GST-RhoA<sub>Q63L</sub>, a été remplacé par GST-RhoB<sub>Q63L</sub>.



	6His-RhoB <sub>Q63L</sub>	6His-RhoA <sub>Q63L</sub>
A5-NP3	$2,4 \cdot 10^{-8} \pm 1,3 \cdot 10^{-8}$	$2,5 \cdot 10^{-8} \pm 1,7 \cdot 10^{-8}$
E3-NP3	$3,6 \cdot 10^{-9} \pm 1,2 \cdot 10^{-9}$	$2,3 \cdot 10^{-8} \pm 1,0 \cdot 10^{-8}$

**Figure 47:** mesure des affinités des scFvA5-NP3 et E3-NP3 pour 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> et 6xHis-RhoB<sub>Q63L</sub>. Les concentrations des scfvA5-NP3 (A5) et E3-NP3 (E3) sont fixées à  $2 \cdot 10^{-8} M$  et  $6 \cdot 10^{-9} M$  respectivement. Les concentrations de 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> et de 6xHis-RhoB<sub>Q63L</sub> varient de  $10^{-10}$  à  $10^{-5} M$ . Le graphe représente les régressions non linéaires de trois expériences indépendantes. Les valeurs des affinités obtenues à partir des régressions non linéaires, compte tenu de l'intervalle de confiance à 95% sont données dans le tableau.

Les mesures d'affinités du scFvA5-NP3 ne mettent pas en évidence de différence entre les deux antigènes ( $2,4$  et  $2,5 \cdot 10^{-8}$  M pour 6xHis-RhoB<sub>Q63L</sub> et 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> respectivement). Par contre, on observe un différentiel d'affinité d'un facteur 6 en faveur de RhoB pour le scFvE3-NP3 ( $3,6 \cdot 10^{-9}$  et  $2,3 \cdot 10^{-8}$  M pour 6xHis-RhoB<sub>Q63L</sub> et 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> respectivement) (figure 47).

## **II.9. Commentaires**

Ces résultats sont surprenants au regard des différents criblages effectués pour choisir les deux clones. En effet, la comparaison de la liaison du scFvA5 mesurée par ELISA sandwich a toujours été supérieure pour GST-RhoB<sub>Q63L</sub> que pour GST-RhoA<sub>Q63L</sub> (figures 44 et 45). Nous sommes donc confrontés à des résultats contradictoires issus de deux types de techniques. Les références choisies dans les expériences de criblage des clones en ELISA sandwich étaient les scFvF7 et D10 grâce auxquelles nous pouvions vérifier la qualité des antigènes utilisés. Bien que les mesures d'affinités par la méthode de Friguet aient été réalisées en respectant tous les critères énoncés dans le chapitre précédent et avec les mêmes lots de protéines purifiées, nous ne pouvons écarter un problème de qualité des antigènes, en particulier au sujet de la conservation de 6xHis-RhoB<sub>Q63L</sub>. Un défaut de conformation de cette dernière pourrait aboutir à une sous-évaluation de l'affinité des scFv pour RhoB et ainsi rendre compte de ces résultats contradictoires. Pour éviter cela, il faudra veiller à systématiquement inclure les scFvF7 et D10 comme références pour la validation des mesures. Dans cet objectif, on pourrait également penser que l'utilisation du GST-RBD serait utile, mais les différentes tentatives que nous avons faites ne sont pas concluantes, probablement à cause d'un défaut de stabilité de cette protéine lorsqu'elle est purifiée. Même si les résultats présentés sont à confirmer, le différentiel d'affinité, quoique modeste, du scFvE3 en faveur de la conformation active de RhoB nous incite à penser qu'il sera possible d'obtenir un biosenseur sélectif de cette protéine.

### III. PERSPECTIVES

Pour pousser plus avant notre projet d'obtenir des biosenseurs sélectifs de chaque Rho en conformation active, deux stratégies s'offrent à nous :

- La méthode rationnelle consistant, à partir de la connaissance précise des épitopes des scFv et des résidus de leurs paratopes impliqués dans la liaison, à opérer des mutations ponctuelles pour orienter leurs propriétés dans le sens souhaité,
- La méthode aléatoire utilisée jusqu'ici en affinant les paramètres de sélection de telle sorte d'augmenter nos chances de sélectionner de nouveaux scFv.

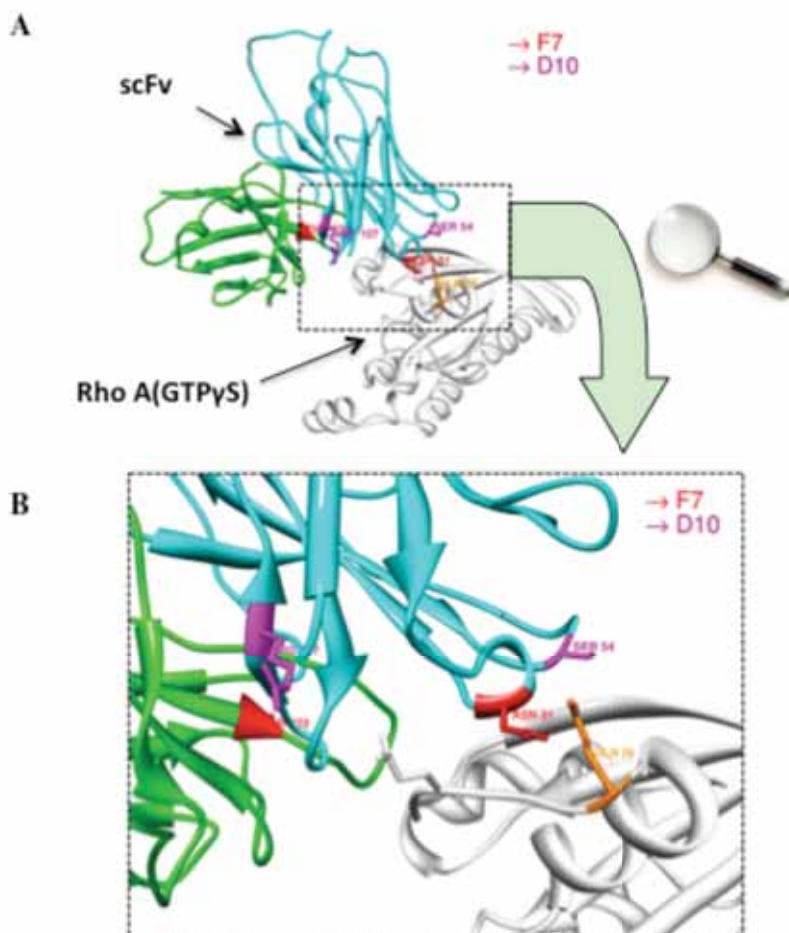
#### III.1. Détermination de l'épitope par modélisation

Nous avons vu que les études structurales par diffraction aux rayons X ont révélé que les seules différences entre les conformations actives et inactives des petites GTPases résident dans la position des domaines switch 1 et switch 2 selon la nature du nucléotide lié. De plus, leurs partenaires connus qui distinguent les deux états de ces protéines interagissent avec elles par l'intermédiaire de ces domaines switch.



**Figure 48: comparaison des sequences primaires des scFvC1, F7 et D10.** Les CDR sont indiqués en rouge, le lien peptidique en vert et les différentes mutations en bleu. La numérotation des acides aminés est indiquée pour la chaîne lourde (VH) comme référencée sur le site IMGT (<http://imgt.cines.fr>). Par commodité, la numérotation des acides aminés de la chaîne légère (VL) a été incrémentée à partir de ceux de la chaîne lourde.

Si on ajoute à cela que la co-cristallisation du scFv anti-Ras active / Ras<sub>G12V</sub> fait apparaître l'épitope du scFv principalement sur le switch 1 (Dong et al., 2003), on est amené à émettre l'hypothèse que les scFv sélectionnés doués de sélectivité pour les formes actives des GTPases Rho ont probablement des épitopes localisés dans ces domaines mobiles. Ces observations ont permis à un membre de l'équipe de proposer une modélisation de l'interaction entre le scFvF7 et RhoA en conformation active (figure 49). La comparaison des séquences des scFv anti-Rho et anti-ras permet de mettre en évidence une appartenance commune de leur chaîne lourde à la famille VH3 des immuno-globulines. Bien que leurs VL n'ait pas de point commun, il fut dès lors possible de modéliser la structure des scFvF7 et D10 à l'aide du logiciel Chimera. En utilisant les données structurales de la conformation de RhoA<sub>Q63L</sub> et de l'interaction scFv anti-Ras / Ras<sub>G12V</sub> (Tanaka et al., 2007), Cyril Inard a exécuté sur le logiciel Monte Carlo des calculs aboutissant à un modèle d'interaction scFvF7 et D10 / RhoA<sub>Q63L</sub> (figure 49). Ce logiciel est basé sur le principe de l'arrimage moléculaire (protein « docking ») par minimisation des énergies d'interaction.



**Figure 49 : modélisation de l'interaction des scFvF7 et D10 avec RhoA(GTPγS) obtenue par arrimage moléculaire et représentée sous le logiciel Chimera. A : vue d'ensemble des partenaires RhoA(GTPγS) en blanc et le scFvF7 en couleur (VH bleu et VL vert) en représentation ruban. Les acides aminés différent du scFvC1 sont indiqués en orange pour le scFvF7 et en rose pour le scFvD10. B : vue grossie de l'encadré en pointillé montrant la proximité des résidus ASN31 du scFv et GLN29 de RhoA. Communication de Cyril Inard.**

Nous avons vu que le scFvD10 possède la même sélectivité que le scFvC1 pour RhoA et RhoC avec une meilleure affinité et que le scFvF7 a acquis la propriété nouvelle de se lier à RhoB avec la même affinité que pour RhoA et RhoC. Il est intéressant de noter, sur la figure 49, que le résidu en position 31 du CDR1 VH des scFv fait face à la glutamine 29 de RhoA où, de manière remarquable, se trouve un acide glutamique pour RhoB, différenciant celui-ci de RhoA et RhoC dans le switch 1. Or, on peut émettre l'hypothèse que la substitution de la sérine en position 31 du scFvC1 par une asparagine pour le scFvF7 pourrait rendre compte, du moins en partie, de cette différence de sélectivité. Dans le but de tester cette hypothèse, nous avons substitué l'asparagine 31 (acide aminé polaire) du scFvF7 par un acide aminé basique (lysine, arginine, histidine) afin d'augmenter les forces d'interaction avec l'acide glutamique de RhoB. Ceci devrait avoir pour conséquence une augmentation d'affinité du scFvF7 pour RhoB. Les résultats préliminaires de liaison par ELISA des mutants F7<sub>N31R</sub> et F7<sub>N31H</sub> ne montrent pas de modification notable de la liaison. De plus, la substitution de l'asparagine par une alanine (résidu hydrophobe) ne semble pas perturber les propriétés de sélectivité du scFv. Notons qu'à ce jour nous n'avons pas encore les résultats de la substitution asparagine/lysine pour des raisons techniques.

Ces résultats partiels sont basés sur une modélisation de la liaison c'est à dire sur un calcul dont le résultat dépend de la puissance et du temps de calcul alloué, mais aussi des données de départ et de la complexité des multiples possibilités de conformations possibles des partenaires. A ce sujet, les exemples de maturation de spécificité et d'affinité basés sur des modélisations sont peu nombreuses et sont appliquées principalement à des liaisons scFv / haptène (Bettsworth et al., 2001), (Coulon et al., 2002). Notre modèle s'avère beaucoup plus complexe puisque les antigènes sont ici des protéines : RhoA(GTPγS) de structure résolue et RhoB(GTPγS) dont nous ne connaissons pas la structure de la conformation active ajoutant ainsi un surplus d'incertitude. Ajoutons à cela que, dans le modèle, la conformation du scFvF7 ne comporte pas le domaine NP3 phagique indispensable à sa validité et qu'elle a été déduite du scFv anti-Ras dont seule la chaîne lourde possède une charpente analogue au scFvF7.

Pour être efficace et compte tenu des limites de la modélisation par analogie telle que nous l'avons réalisée, la méthode rationnelle suppose une connaissance précise des interactions du complexe antigène-anticorps que seule la diffraction aux rayons X est capable de résoudre. Ceci est illustré par un article de Clark décrivant la maturation d'affinité d'un anticorps anti-intégrine VLA1 par modélisation des mutations introduites à partir de données

cristallographiques du complexe antigène-anticorps (Clark et al., 2006). Cet auteur souligne que cette voie est peu explorée dans la mesure où les stratégies d'évolution moléculaire aléatoires sont très efficaces.

En l'absence de ces données, nous sommes réduits à des suppositions telles que les domaines switch 1 et switch 2 des GTPases constituent tout ou partie de l'épitope des scFv, mais nous n'avons pas encore accès à l'intimité des acides aminés responsables des interactions.

### **III.2. Evolution moléculaire aléatoire**

Le phage display présente l'avantage d'opérer par une première étape de sélection, suivi par un criblage : ceci ouvre la possibilité d'une part d'appréhender des répertoires de très grande diversité par sélection et d'autre part de choisir le ou les clones d'intérêt par criblage selon les qualités recherchées. On voit dès lors que l'on a la possibilité d'agir sur ces deux étapes pour exploiter les possibilités offertes par la diversité du répertoire. Il existe un autre paramètre d'importance en amont de ceux déjà cités et qui conditionne la réussite du projet : la taille et la diversité du répertoire.

#### *III.2.1. La taille et la diversité du répertoire*

Le phage display permet de sélectionner des ligands uniquement s'ils sont présents dans la banque. La taille des répertoires utilisés détermine donc dès le départ les chances d'obtenir des scFv aux caractéristiques recherchées en augmentant le domaine du possible aussi bien en terme d'affinité que de spécificité. On aura donc intérêt à travailler à partir de banques les plus grandes et diverses possible pour augmenter nos chances d'obtenir des scFv aux propriétés rares. Pour un peptide contenant  $n$  acides aminés, la diversité théorique possible est de  $n^{20}$  molécules différentes, ce qui équivaut dans le cas des scFv au nombre astronomique de  $230^{20}$  possibilités. Même si les contraintes de conformation limitent probablement le nombre de molécules fonctionnelles, il n'en reste pas moins que la banque secondaire utilisée ici ( $\approx 10^7$  clones indépendants) n'en représente qu'une infime partie. On pourrait envisager de faire appel aux techniques de sélection *in vitro* telles que le « ribosome display », le « mRNA display » ou le « cis display » qui permettent de manipuler des répertoires de  $10^{13}$  à  $10^{14}$  ligands (Leemhuis et al., 2005). Cependant, ces techniques sont délicates à mettre en œuvre et nous n'avons pas encore épuisé toutes les potentialités du phage display.

La taille des répertoires utilisés en phage display est principalement limitée par les rendements d'électroperméation des bactéries. Ces rendements permettent d'espérer atteindre  $10^8$  clones indépendants en répétant 10 fois le travail de construction réalisé ici, mais dépasser cette limite implique un travail énorme qui n'est fourni que dans le cas des banques naïves à vocation universelle.

L'autre stratégie consiste à opérer par étapes en recréant de la diversité à partir d'un ligand sélectionné pour s'approcher par évolution progressive du but recherché. C'est le chemin que nous avons choisi pour obtenir les scFv décrits ici en introduisant des mutations aléatoires dans la séquence primaire du scFvC1 et en augmentant progressivement la pression de sélection. On peut donc imaginer continuer dans cette voie à partir des scFv déjà sélectionnés. Nous avons deux possibilités :

- Créer un répertoire par mutation aléatoire sur toute la séquence du scFv
- Diriger la mutagenèse aléatoire sur un domaine supposé déterminant pour l'acquisition des propriétés de sélectivité recherchée.

Les données résultant de ce travail et de la littérature sont les suivantes :

- 1) Nous avons vu dans l'introduction que les conformations active et inactive des GTPases Rho se différencient par la position de leurs domaines switch 1 et switch 2, les partenaires des rho capables de reconnaître ces conformations se lient à leur endroit, la résolution aux rayons X d'un scFv en complexe avec Ras<sub>G12V</sub> révèle que l'épitope du fragment d'anticorps est contenu dans le switch 1 pour l'essentiel (Tanaka et al., 2007).
- 2) Les parties du paratope d'un anticorps les plus déterminantes pour son affinité et sa spécificité sont les CDR (Hoogenboom, 2005), ceci étant confirmé par l'exemple cité plus haut puisque le scFv interagit avec Ras<sub>G12V</sub> par les CDR de la VH, enfin la grande majorité des scFv sélectionnés dans ce travail possèdent des mutations dans les CDR et notamment dans les CDR de la VH.

On peut donc, en première intention, proposer pour la suite d'introduire de la variabilité dans ces domaines à partir des scFv déjà sélectionnés en utilisant des oligonucléotides conçus pour apporter des mutations multiples sur certaines positions (Yang et al., 1995), (Dong et al., 2003), (Pavoni et al., 2006). Il est bien sûr possible dans un deuxième temps d'ajouter de la complexité en opérant une mutagenèse aléatoire dirigée sur les CDR de la VL, sachant que la reconnaissance d'une seule Rho en conformation active doit faire appel à des résidus différenciant les trois Rho et spatialement proches des switch. Il sera également possible



d'introduire davantage de variabilité en recombinaison les mutations sélectionnées *in vitro* par « DNA shuffling » (Stemmer, 1994).

### *III.2.2. Le criblage*

Le phage display consiste à amplifier les ligands potentiellement intéressants au détriment de la très grande majorité des membres du répertoire qui ne présentent aucun intérêt. A l'issue de ce processus de sélection, il faut reconnaître et identifier les clones présentant les caractéristiques requises parmi tous ceux qui sont passés au travers du tamis de la sélection. Pour situer le problème, à l'issue d'un tour de sélection le nombre de colonies étalées sur une boîte est généralement compris entre  $10^4$  et  $10^6$ . On comprend bien que tous les clones ne seront pas analysés un par un. Il faut concevoir un crible qui soit le résultat d'un compromis permettant l'analyse du plus grand nombre de clones possibles tout en garantissant une bonne acuité à distinguer les candidats respectant les critères choisis.

La question des critères va orienter le choix de la méthode de criblage. Jusqu'ici, le critère avancé était de discriminer les conformations actives de RhoA et RhoB : cela a justifié notre démarche de travailler *in vitro* depuis la sélection jusqu'au criblage pour des raisons de simplification. Or, même si cela reste à confirmer, cette étude suggère qu'il sera possible de concevoir des biosenseurs sélectifs de chaque Rho active. Les biosenseurs sont des outils conçus et utilisés pour répondre à des questions de physiologie ou de physiopathologie. Cela implique une utilisation *in situ*, c'est à dire par des techniques d'immuno-histologie et d'immuno-cytologie, mais aussi intracellulaire. Cela implique de rajouter d'autres critères pour le choix de la méthode de criblage.

Si l'on privilégie l'utilisation en immuno-fluorescence sur des coupes de tissus ou sur des cellules en culture fixées, on a peut-être intérêt à cribler les clones après le processus de sélection pour leurs capacités de sélectivité pour une des trois GTPases Rho en conformation active, mais aussi sur leurs capacités à se lier à leur cible sur les préparations sur lesquelles ils seront utilisées (Nizak et al., 2003), (Dimitrov et al., 2008).

Si l'on privilégie l'utilisation intracellulaire des scFv, il sera peut-être préférable de rajouter le critère de solubilité et d'activité lorsqu'ils sont exprimés sous forme d'intrabody. En effet, les scFv sont souvent fonctionnels lorsque des ponts disulfures se forment entre des cystéines favorisant ainsi leur conformation active. C'est dans ce but qu'un fragment d'anticorps a été sélectionné en deux étapes : la première étape de sélection *in vitro* par phage display contre le mutant actif de la GTPase HRas (Ras<sub>G12V</sub>) a été suivie par un deuxième processus de

criblage dans un système double hybride de levure (Tanaka and Rabbitts, 2003). On peut également sélectionner les clones à partir d'un répertoire conçu dans ce but à partir d'un échafaudage utilisable dans le milieu intracellulaire qui aura subi une mutagenèse sur les CDR pour créer de la diversité (Guglielmi et al., 2011).

En ce qui nous concerne, nous allons dans un premier temps tester les capacités de sélectivité des scFvF7 et D10 sur des cellules fixées surexprimant les mutants actifs des GTPases Rho. Ces scFv seront également exprimés dans des cellules en culture pour vérifier leurs propriétés de solubilité et d'activité pour un usage intrabody. A l'issue de ces tests, nous déciderons s'il est nécessaire d'avoir recours aux stratégies mentionnées plus haut.

### **III.3. Utilisation des biosenseurs**

Nous avons engagé cette étude dans le but de concevoir des biosenseurs sélectifs de chaque GTPase Rho en conformation active. En effet, si l'expression de ces protéines est largement documentée (Vega and Ridley, 2007), il n'en reste pas moins des zones d'ombre quant à leur rôle physiologique et physiopathologique qui pourraient être levées par la connaissance fine de leur régulation. C'est en ce sens que nous proposons l'utilisation des biosenseurs des GTPases Rho.

L'implication des Rho GTPases dans de nombreuses étapes de la progression des cancers (acquisition de la motilité, résistance à la mort cellulaire, invasion tissulaire, modifications des interactions avec les cellules de l'environnement tumoral) a été rapportée (Vega and Ridley, 2008). Parmi ces marqueurs potentiels des mélanomes, la GTPase RhoA est tout particulièrement impliquée dans la régulation de différentes étapes de l'oncogenèse, ainsi que dans les processus migratoires et invasifs conduisant à la dissémination métastatique. Bien qu'aucune mutation du gène *rhoA* n'ait été rapportée, une augmentation de son expression a été mise en évidence dans différents cancers (Vega and Ridley, 2008) et son inhibition a été corrélée avec une régression du phénotype migratoire ou invasif *ex vivo* (Klein and Higgins, 2011). RhoA est par conséquent une cible de choix pour le diagnostic et le pronostic de l'évolution pathologique de certaines tumeurs. Toutefois, il a été montré que son rôle dans les processus cellulaires migratoires ou invasifs est conséquent à une modulation fine de son niveau d'activité (représenté par sa conformation active liée au GTP), plutôt que par son expression globale (Pertz et al., 2006). Il est donc crucial de pouvoir détecter l'état actif de cette protéine *in situ* afin d'établir et d'affiner le lien entre l'activité de cette protéine et la progression tumorale, notamment l'apparition de métastases.

L'hypothèse d'une activité anti-transformante de RhoB a été confortée par des études sur des souris invalidées pour le gène *rhoB* qui présentent une augmentation de la tumorigénèse induite par des carcinogènes (Liu et al., 2001). Par ailleurs, alors que RhoA et RhoC sont surexprimées dans les tumeurs, l'expression de RhoB est diminuée notamment dans le cancer pulmonaire et la perte d'expression de RhoB est corrélée à la progression du cancer bronchique (Mazieres et al., 2004), avec une perte d'expression dans les cancers invasifs. Des données récentes du laboratoire semblent suggérer que le rôle de RhoB dans l'oncogénèse pulmonaire serait dépendant du contexte cellulaire et en particulier de la présence de mutations des 2 oncogènes majeurs impliqués dans les cancers bronchiques que sont EGFR et K-Ras. Ainsi la surexpression de RhoB dans des modèles cellulaires avec mutations de K-Ras semble présenter un effet protecteur tandis que RhoB confère une résistance aux lignées cellulaires mutées pour l'EGFR et traitées par inhibiteurs de l'EGFR. En effet, il a été montré au laboratoire qu'il existait des relations entre RhoB et l'EGFR ainsi qu'avec KRAS. D'une part l'EGF stimule l'expression de RhoB total et son activation (Lajoie-Mazenc et al., 2008), d'autre part RhoB module le transport de l'EGFR vers les lysosomes et prolonge son activité cellulaire (Gampel and Mellor, 2002), (Lajoie-Mazenc et al., 2008). De plus, des résultats récents montrent que la surexpression de RhoB diminue la sensibilité à l'erlotinib (Tarceva) des cellules cancéreuses pulmonaires porteuses de mutation de l'EGFR (données non publiées). L'utilisation de biosenseurs de RhoB mesurant son activation pourrait permettre d'anticiper sur la résistance à l'erlotinib d'une partie des patients ne présentant pas de surexpression de RhoB et servirait ainsi de marqueur thérapeutique (communication de Julien Mazières).

Les biosenseurs pourraient également être utilisés dans un but de recherche plus fondamental pour mieux appréhender les rôles de ces GTPases dans la physiologie.

La plupart des GTPases Rho se lie au moins à un RhoGDI parmi les trois qui sont exprimés dans les cellules de mammifères. De plus, il a été montré que le RhoGDI le plus abondant est en concentration à peu près équivalente à la somme des concentrations des trois Rho principales, Rac1, cdc42 et RhoA. Le taux cellulaire de RhoGDI détermine donc l'équilibre des concentrations des Rho par l'établissement d'une compétition. En effet, les Rho qui ne sont pas liées aux membranes ou à RhoGDI sont vouées à la dégradation (Garcia-Mata et al., 2011). En pratique cela signifie que l'étude d'une Rho par surexpression peut avoir des répercussions indirectes sur les autres protéines Rho, de telle sorte que la conclusion tirée de l'expérience quant au rôle attribué à la Rho surexprimée soit biaisé. On peut supposer qu'à l'inverse, les études des Rho par extinction protéique (utilisation de siRNA par exemple) peut

aboutir à la même confusion. Les biosenseurs pourraient être utilisés avantageusement dans ces situations de manière à perturber le moins possible l'équilibre des concentrations des différentes Rho. En effet, le fragment d'anticorps anti-Ras bloque l'activité de cette dernière en déplaçant ses partenaires RAF et RALGDS en se liant sur le switch 1 (Tanaka et al., 2007). Il faudrait vérifier l'activité bloquante des scFv vis à vis des différentes Rho, qui si elle existe permettra de toucher la cible en perturbant le moins possible le modèle étudié. En outre, si l'hypothèse des scFv bloquants est invalidée, on pourra adapter le système nommé deGradFP par Caussinus (Caussinus et al., 2011). Il s'agira de coupler le biosenseur au domaine Fbox du complexe d'ubiquitylation de telle sorte que la cible, dans notre cas la GTPase Rho active, sera dégradée dans le protéasome. Dans la mesure où la proportion des Rho activées est de 5 à 10% du total (Garcia-Mata et al., 2011), cette dégradation ne devrait affecter l'équilibre des GTPases que de manière marginale.

Ces outils pourraient être utilisés dans de nombreux domaines de la biologie puisque, de par leurs fonctions pleiotropiques, les GTPases Rho sont étudiées aussi bien dans la neurobiologie (Antoine-Bertrand et al., 2011), que dans la biologie du développement (Johndrow et al., 2004) ou la physiopathologie cardio-vasculaire (Spindler et al., 2010).

## 2<sup>eme</sup> PARTIE

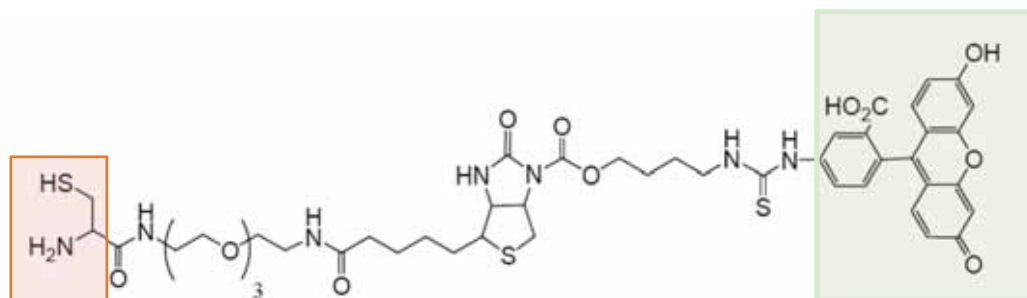
## Marquage d'un scFv à l'aide d'une biotine fluorescente bi-fonctionnelle

Les techniques immunohistologique et immunocytochimique nécessitent de révéler la liaison spécifique des anticorps primaires par l'utilisation d'anticorps secondaires couplés à un révélateur enzymatique (Horse Radish Peroxidase, Phosphatase alcaline etc...) dirigés contre la partie constante des immunoglobulines ou contre une étiquette généralement peptidique (épitope c-myc, épitope HA etc...) exprimée en fusion avec l'anticorps primaire quand celui-ci est un scFv.

La révélation par les anticorps secondaires peut être la source de certains inconvénients comme un bruit de fond non spécifique, l'addition d'étapes de lavages et d'incubations qui peuvent nuire au marquage de l'anticorps primaire lorsque celui-ci est de basse affinité. De plus, ces étapes additionnelles augmentent le nombre de manipulations qui peuvent se révéler gênantes lorsqu'il s'agit d'étudier l'expression d'une protéine dans un grand nombre d'échantillons.

Nous proposons ici une méthode permettant de rendre un scFv fluorescent en greffant un fluorophore de manière covalente en C-terminal de sa séquence peptidique afin d'éviter l'utilisation d'anticorps secondaires pour sa révélation.

Le principe de la méthode est basé sur l'utilisation d'une intéine en fusion C-terminale du scFv, elle-même en fusion avec le domaine de liaison à la chitine (CBD) et d'une biotine bi-fonctionnelle (BF). Cette biotine a la caractéristique de posséder une cystéine couplée à la chaîne valérique et une fluorescéine en position N-1' (figure 50) (Inard et al., 2006).



**Figure 50: biotine bi-fonctionnelle.** Cette biotine modifiée comporte deux groupements fonctionnels : le thiol d'une cystéine couplée à la chaîne valérique (encadré orange) et une fluorescéine en position N-1' (encadré vert).

(Chaisemartin, 2009)

Après production, à partir d'*E.coli*, et extraction du scFv ainsi modifié, celui-ci est purifié par affinité sur des billes fonctionnalisées par de la chitine (le scFv étant exprimé en fusion N-terminale de l'étiquette Chitine Binding Domain, CBD). L'incubation avec la fonction thiol de la biotine bi-fonctionnelle provoque l'élution du scFv par épissage de l'intéine et sa liaison covalente concomitante sur le scFv. Le scFv-BF rendu ainsi fluorescent est alors purifié par affinité sur des billes fonctionnalisées par de la streptavidine et élué par compétition avec de la biotine ajoutée en excès.

L'avantage de l'utilisation de la biotine bi-fonctionnelle réside dans le couplage du marquage fluorescent du scFv en C-terminal qui permet de conserver ses propriétés de spécificité et d'affinité, et de la purification du scFv ainsi marqué permettant d'obtenir des préparations de fragments d'anticorps de haute activité spécifique.

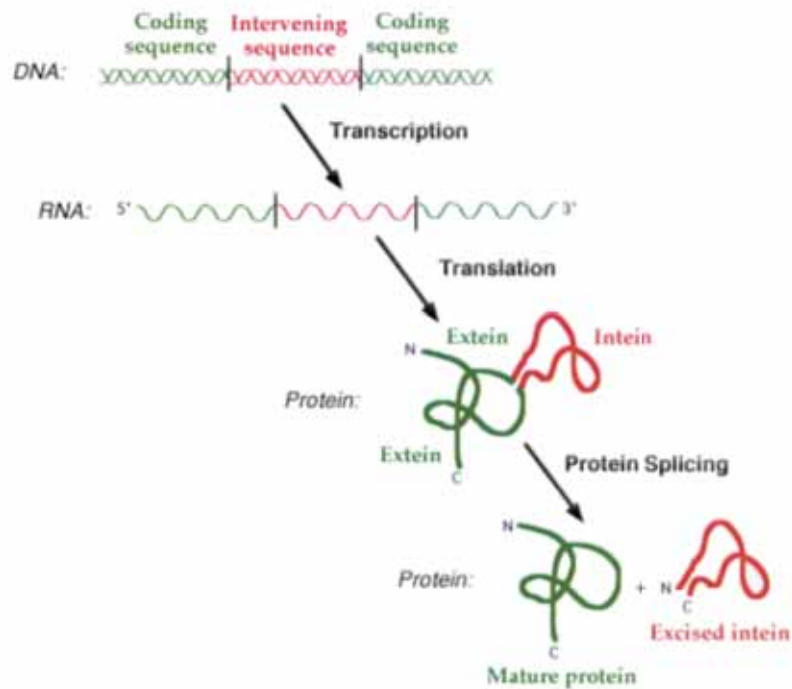
Ce travail ayant fait l'objet de la publication insérée en fin du manuscrit, je limiterai cette partie à un bref exposé sur le fonctionnement des intéines et à la description de scFv C5 utilisé comme modèle.

## **Les intéines**

Il y a une vingtaine d'années, un réarrangement post-traductionnel était décrit dans l'ATPase vacuolaire de *saccharomyces cerevisiae* (Sce VMA) où un fragment de 400 acides aminés était excisé de la protéine hôte VMA (extéine) avec une ligature des deux parties adjacentes pour former une sous-unité A fonctionnelle de la VMA (figure 51) (Hirata et al., 1990), (Kane et al., 1990). La partie centrale excisée lors de ce processus est nommée intéine par analogie à l'épissage des ARN (intron). Les intéines ont été décrites chez les bactéries, les archaebactéries et les eucaryotes inférieurs comme les levures mais pas chez les eucaryotes supérieurs (Paulus, 2000). Les fonctions des différentes protéines hôtes d'intéines sont diverses : enzymes, polymérase à ADN ou ARN, protéases, ribonucléotides réductases, ATPases de type vacuolaire. Toutefois, les enzymes impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN dominent le tableau (Liu, 2000).

Il existe plus de 200 intéines répertoriées constituées de 128 à 1650 acides aminés qui se divisent en deux catégories : les grandes intéines et les mini-intéines qui représentent 20% de cette famille de protéines (Xu and Evans, 2005). Contrairement aux mini-intéines, les grandes intéines possèdent en général un domaine appelé « homing endonuclease » qui serait

responsable de leur dissémination par leur activité endonucléase, même si leur origine reste à ce jour inconnue (Perler, 1998).

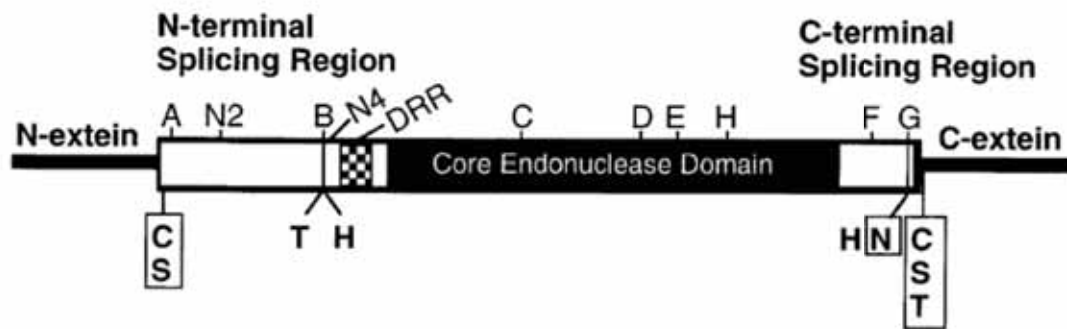


**Figure 51: schéma de l'épissage protéique.** Un gène contenant une séquence intéine est transcrit en ARN lui-même traduit en une protéine précurseur contenant un domaine intéine (rouge) encadré par deux domaines extéine (verts). Le processus d'épissage aboutit à la libération de l'intéine et à la formation de la protéine mature constituée des deux extéines ligaturées.

(Paulus, 2000)

Une intéine classique du type SceVMA est composée de trois domaines : la partie centrale correspondant à l'endonucléase, les parties N-terminale et C-terminale composées de sous-domaines responsables de la fonction d'épissage protéique (figure 52).



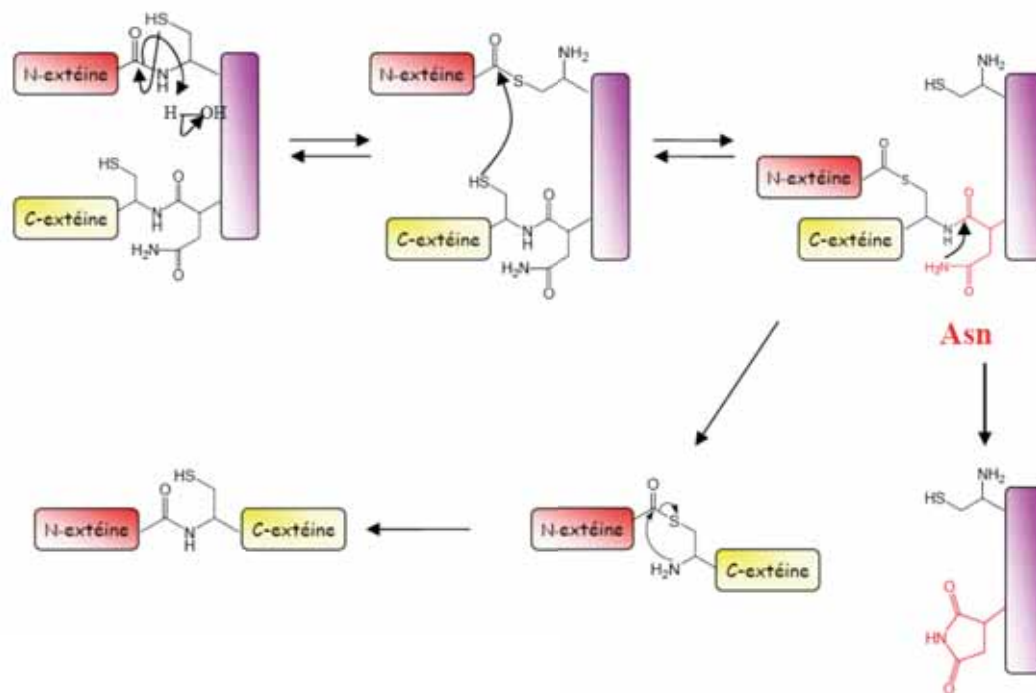


**Figure 52: les différents domaines d'une intréine et les motifs conservés.** Le rectangle noir symbolise le domaine endonucléase ou un « linker » selon l'intréine, les deux rectangles blancs en N et C-terminal représentent les domaines impliqués dans l'épissage. Les lettres au-dessus du schéma correspondent aux motifs conservés tandis que celles au-dessous correspondent aux résidus conservés. Les acides aminés encadrés sont nucléophiles.

(Perler, 1998)

Les intréines possèdent peu de séquences consensus entre elles, mais les acides aminés présents aux extrémités N et C-terminales sont très conservés. On note la présence d'une cystéine ou d'une sérine à l'extrémité N-terminale et d'une histidine suivie d'une asparagine et d'une cystéine (qui peut aussi être une sérine ou une thréonine) à l'extrémité C-terminale. De plus, deux acides aminés (thréonine et histidine) dans le domaine D sont conservés.

Après de nombreuses hypothèses, un mécanisme d'épissage des intréines a été déterminé par mutagenèse (Chong et al., 1996), (Xu and Perler, 1996). L'épissage de l'intréine est catalysé entièrement par des acides aminés contenus dans l'intréine lors d'un processus intramoléculaire. Il ne nécessite pas d'apport de coenzymes ni de source d'énergie, mais il agit par des réarrangements de liaisons plutôt que par coupure puis par re-synthèse (figure 53).



**Figure 53 : schéma réactionnel de l'épissage protéique.** L'intéine est symbolisée par un rectangle mauve, la N-extéine par un rectangle rouge et la C-extéine par un rectangle jaune. La première étape est un réarrangement acyle entre la fonction amide et le thiol de la cystéine en N-terminal de l'intéine. Puis la cystéine en C-terminal de l'intéine attaque le thioester permettant la liaison entre la N-extéine et la C-extéine dans un intermédiaire branché. Enfin, une cyclisation de l'asparagine aboutit à la libération de l'intéine et de la protéine mature composée des deux extéines.

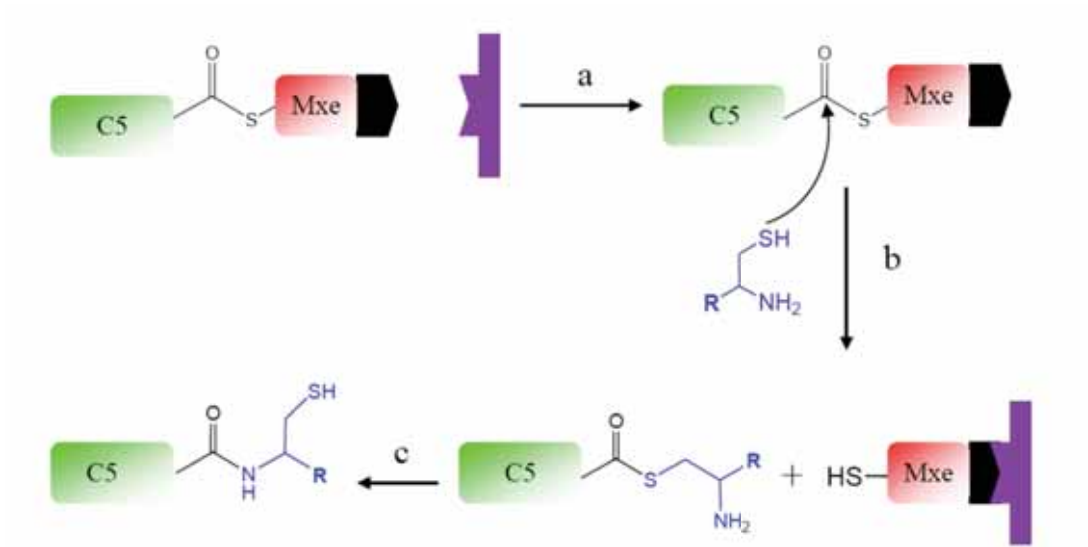
(Chaisemartin, thèse Université P. Sabatier 2007)

Etant donné que l'intéine catalyse l'épissage, dans le sens où elle réalise la réaction qui n'aurait pas lieu spontanément, elle peut être considérée comme une enzyme ayant comme substrats les résidus présents aux jonctions de la C-extéine et de la N-extéine (Paulus, 2000).

L'élucidation du mécanisme d'épissage des intéines a mis en évidence l'indépendance de chaque étape du processus. Grâce à cette propriété, l'utilisation des intéines a permis de nombreuses applications biotechnologiques comme la purification de protéines recombinantes sans étiquette, le marquage isotopique de certains domaines de protéines, la synthèse de conjugués ADN-protéine, la cyclisation de peptides entre autres (Xu and Evans, 2005).

Le principe de notre marquage met à profit le blocage de l'épissage des intéines par l'introduction d'une substitution de l'asparagine en alanine en position C-terminale. Nous avons utilisé l'intéine Mxe mutée de cette manière en fusion avec le CBD. Dans cette

configuration, la Mxe mutée ne sera épissée que par l'adjonction d'un composé jouant le rôle de la cystéine C-terminale de l'intéine dans le mécanisme d'épissage. Dans notre cas, ce composé sera la biotine fluorescéine bi-fonctionnelle qui provoquera l'épissage de la Mxe tout en se liant de manière covalente à l'extéine libérée, ici le scFv C5 (figure 54) (Chaisemartin et al., 2009). Cette méthode est généralisable à toutes les protéines de séquence connue.



**Figure 54: principe du marquage du scFv C5.** Le scFv C5 est symbolisé par un rectangle vert, l'intéine Mxe par un rectangle rouge, le domaine CBD est en noir et la matrice fonctionnalisée par de la chitine en violet. La biotine bi-fonctionnelle est représentée en bleu avec la fonction thiol de la cystéine apparente et le reste de la molécule (biotine-fluorescéine) est symbolisé par la lettre « R ». Après expression dans *E.coli*, la protéine recombinante scFv C5-Mxe-CBD est immobilisée sur une colonne fonctionnalisée à la chitine. L'ajout de la biotine bi-fonctionnelle provoque l'épissage de l'intéine par action de la fonction thiol de la cystéine. Ce processus est couplé à la liaison covalente de la biotine bi-fonctionnelle sur le scFv C5 qui est dès lors fluorescent et purifiable sur matrice fonctionnalisée à la streptavidine.

(Chaisemartin, thèse Université P. Sabatier 2007)

Ma part dans la réalisation de ce travail fût de sélectionner et caractériser le scFv C5 et d'apporter une aide et un conseil techniques à Laurent Chaisemartin pour les expériences de la partie biologie.

## Description du scFv C5

Le scFvC5 est un fragment d'anticorps spécifique de RhoB. Nous l'avons sélectionné par phage display à partir de la banque Griffin I déjà mentionnée dans le but d'obtenir un scFv conformation-indépendant.

La séquence du scFv C5 révèle que la VH appartient à la IGHV4, tandis que la VL est du type IGLV1 (figure 55).



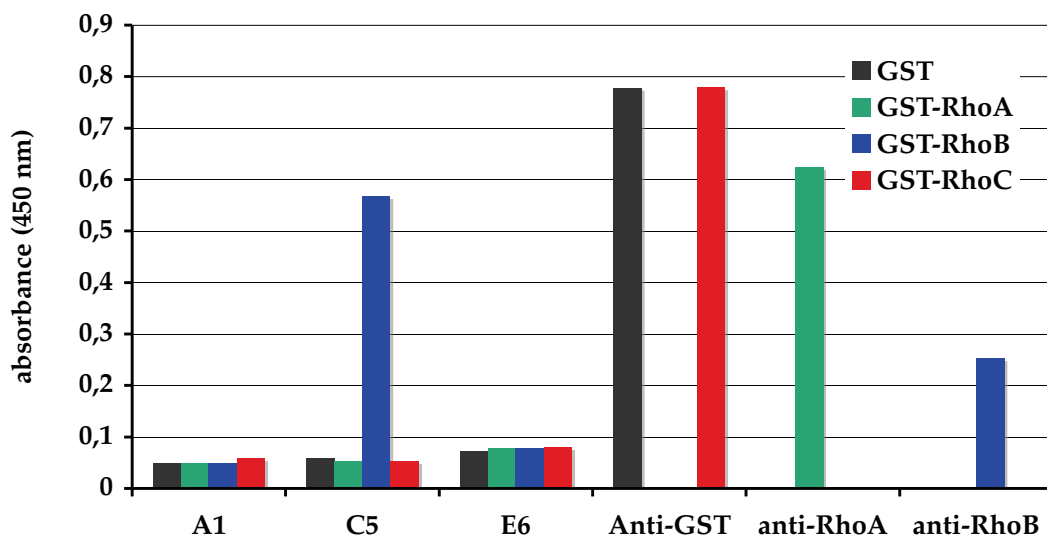
**Figure 55: Séquence du scFv C5.** Alignement des séquences des chaînes lourde ( $V_H$ ) et légère ( $V_L$ ) du scFv C5 avec les immunoglobulines humaines référencées sur le site de l'IGMT (<http://imgt.cines.fr>). Les résidus constituant les CDR (Complementing Determining Region) sont encadrés. Les astérisques indiquent les acides aminés manquants pour former des CDR complets.

### Sélection du scFv C5

Nous avons utilisé la protéine recombinante RhoB sauvage en fusion N-terminale avec l'étiquette GST (GST-RhoB). Après induction de la production de cette protéine par *E.coli*, GST-RhoB est purifiée par affinité sur des billes fonctionnalisées par du glutathion. Ces billes sont ensuite mises en présence d'une suspension de phages exprimant à leur surface les scFv contenus dans la banque Griffin I. Après incubation, les phages non liés à la cible sont éliminés par lavages, puis élués et amplifiés. Pour les trois tours de sélection suivants, les phages ont été préalablement incubés avec un excès de protéine recombinante GST-RhoA immobilisée sur des billes fonctionnalisées au glutathion avant d'être mis en présence de GST-RhoB pour éliminer les phages exprimant des scFv capables de faire une réaction croisée sur les deux antigènes.

À l'issue de ces quatre tours de sélections, les clones sont étalés et choisis au hasard pour une analyse clonale en ELISA contre de la GST-RhoB immobilisée sur des puits

fonctionnalisés au glutathion. Sur les 88 clones testés, seuls sept se sont avérés positifs (résultat non montré). Après séquençage de ces clones, cinq d'entre eux dont le scFv C5 possédaient la même séquence peptidique. Après purification, un test de spécificité sur les trois GTPases RhoA, RhoB et RhoC a été réalisé par ELISA avec le scFv C5 et les deux autres clones de séquences différentes (figure 56). Le résultat de ce test révèle que les clones A1 et E6 sont des faux positifs dans la mesure où ils ne donnent aucun signal spécifique face aux trois GTPases. Seul le scFv C5 s'avère être spécifique de la protéine RhoB.

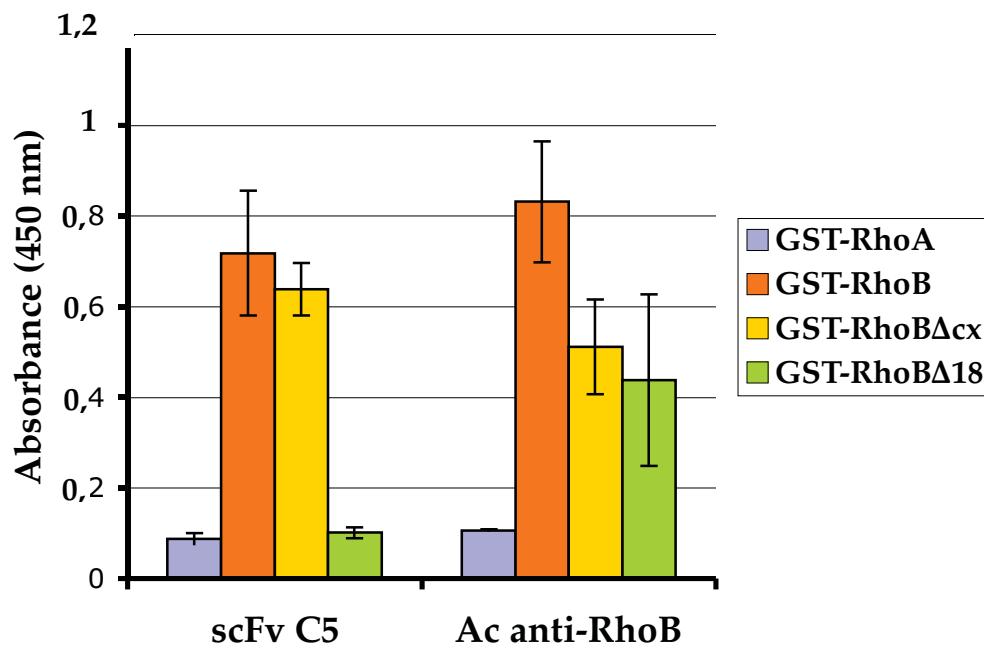


**Figure 56: détermination de la spécificité des scFv sélectionnés.** Les scFv C5, A1 et E6 purifiés sont testés en ELISA sur une plaque tapissée au glutathion où des protéines recombinantes sauvages (GST-RhoA, GST-RhoB et GST-RhoC) ont été immobilisées. Après lavages, les scFv spécifiquement liés aux antigènes sont révélés par un anticorps anti-myc-HRP. La présence des différents antigènes est vérifiée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux commerciaux (anti-RhoB et anti-RhoA) révélée par un anticorps anti-IgG-HRP de souris, ainsi qu'un anticorps polyclonal anti-GST de chèvre révélé par un anticorps anti-IgG-HRP de chèvre pour vérifier la présence de RhoC.

## Caractérisation de l'épitope du scFv C5

Nous nous sommes alors consacrés à la détermination de l'épitope de ce scFv en posant l'hypothèse que sa spécificité de liaison à RhoB par rapport à RhoA et RhoC faisait intervenir la région hypervariable flexible située en C-terminal de ces GTPases. Dans ce but, nous avons construit des protéines chimères composées d'une part de RhoB délétée de la séquence CAAX et d'autre part de RhoB délétée des 18 résidus de la partie C-terminale (domaine hypervariable), les deux constructions étant exprimées en fusion avec la GST pour

permettre leurs purifications et leurs immobilisations sur plaques glutathion. Les comparaisons de liaison du scFv C5 avec ces constructions montrent que si la délétion de la séquence CAAX ne modifie pas la reconnaissance de RhoB par le scFv C5, la délétion de la partie hypervariable de RhoB provoque une perte de liaison suggérant ainsi que l'épitope de ce fragment d'anticorps se situe dans ce domaine (figure 57).

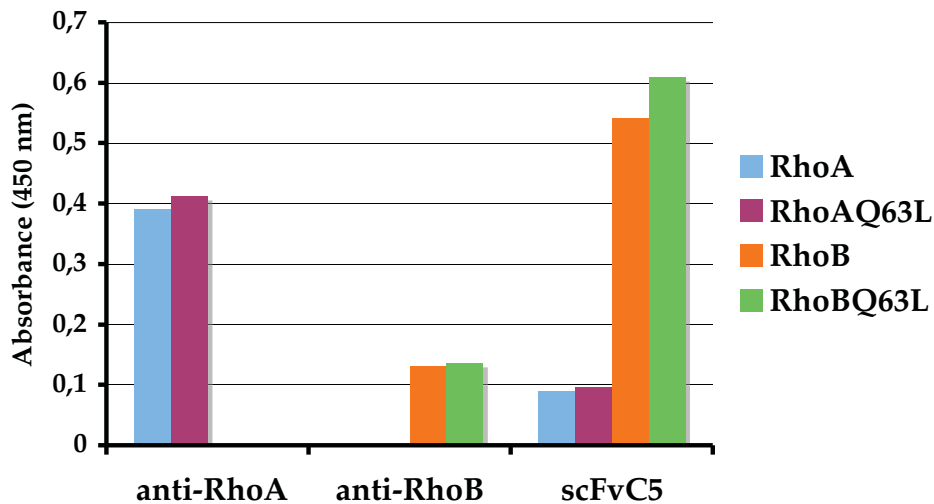


**Figure 57: détermination de l'épitope du scFv C5.** Le scFv C5 purifié est testé en ELISA sur une plaque tapissée au glutathion où des protéines recombinantes sauvages (GST-RhoA et GST-RhoB), ainsi que des mutants de RhoB délétés de la séquence CAAX (GST-RhoB $\Delta$ cx) ou de la séquence hypervariable constituée des 18 derniers résidus (GST-RhoB $\Delta$ 18) ont été immobilisés. Après lavages, le scFvC5 spécifiquement lié aux antigènes est révélé par un anticorps anti-myc-HRP. La présence des différents antigènes est vérifiée par l'utilisation d'un anticorps anti-RhoB monoclonal commercial révélé par un anticorps anti-IgG-HRP de souris.

Cependant, des expériences parallèles de détection de la GTPase RhoB recombinante par immuno-électro-empreinte montrent que le scFv C5 ne reconnaît pas cette protéine lorsque celle-ci est dénaturée par un traitement au SDS. Cette observation nous a orienté vers la recherche d'une possible reconnaissance d'une conformation de RhoB de la part de ce fragment d'anticorps.

Dans la mesure où ce scFv a été sélectionné sur la GTPase RhoB sauvage qui est majoritairement liée au GDP, nous avons supposé que le scFv C5 pouvait être spécifique de la conformation inactive de cette GTPase. Nous avons comparé la liaison du scFv C5 avec

RhoB sauvage et RhoB<sub>Q63L</sub> (mutant dominant actif lié au GTP). On observe sur la figure 58 qu'il n'y a pas de différence de reconnaissance vis à vis de ces deux conformations, suggérant que ce fragment d'anticorps n'est pas spécifique de la conformation inactive de RhoB.



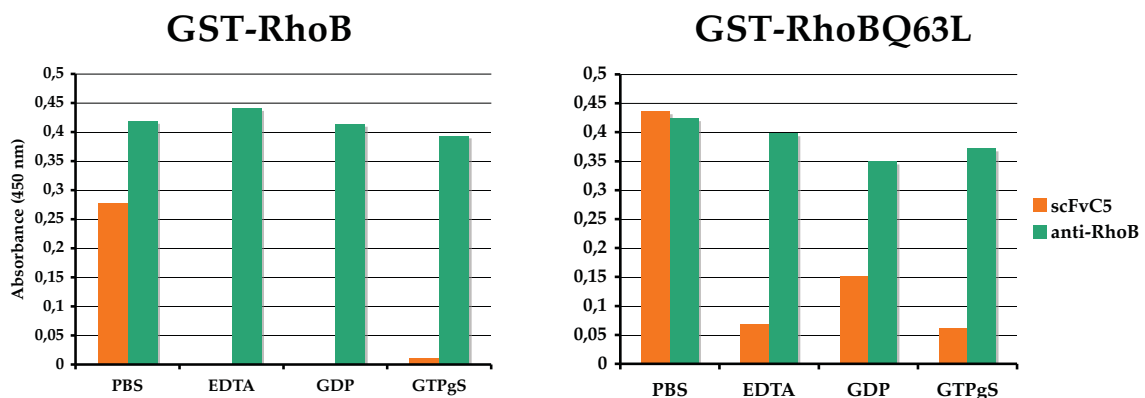
**Figure 58 : détermination de l'épitope du scFv C5.** Le scFv C5 purifié est testé en ELISA sur une plaque tapissée au glutathion où des protéines recombinantes sauvages (GST-RhoA et GST-RhoB) et mutées (GST-RhoA<sub>Q63L</sub> et GST-RhoB<sub>Q63L</sub>) ont été immobilisées. Après lavages, le scFvC5 spécifiquement lié aux antigènes est révélé par un anticorps anti-myc-HRP. La présence des différents antigènes est vérifiée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux commerciaux (anti-RhoA et anti-RhoB) révélés par un anticorps anti-IgG-HRP de souris.

La sélection par phage display de scFv anti-Ras (GDP) aboutit également à l'obtention de fragments d'anticorps spécifiques de cette GTPase mais incapables de distinguer les changements de conformation dépendants de la nature du nucléotide (Horn et al., 1999). Les auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle cela résulterait de la grande flexibilité des domaines de liaisons aux effecteurs de la conformation inactive.

Nous avons alors émis l'hypothèse que le scFv C5 pouvait être spécifique de la GTPase RhoB lorsqu'elle est liée à un nucléotide indépendamment de la nature de ce dernier. Nous avons testé cette hypothèse en comparant la liaison du scFv C5 dans différentes conditions : (1) lorsque RhoB a subi un traitement à l'EDTA qui est un agent chélatant le magnésium, (2) lorsque RhoB est lié au GDP ou au GTPγS. Les résultats de ces expériences

montrent que le scFv C5 perd sa capacité de liaison à RhoB lorsque cette GTPase a subi un traitement à l'EDTA, c'est à dire lorsqu'elle n'est plus liée au magnésium favorisant ainsi la dissociation du nucléotide. Par contre, cette capacité de liaison est partiellement récupérée lorsque RhoB est chargée avec du GDP et du GTPγS (figure 59). Cet effet est plus évident dans le cas du mutant RhoB<sub>Q63L</sub> pour cette expérience, et nous avons constaté une grande variabilité dans nos résultats. Ceci confirme par ailleurs nos observations selon lesquelles, contrairement à RhoA, RhoB sauvage devient instable et difficile à charger en nucléotides lorsqu'elle est purifiée.

Ces résultats suggèrent que le scFv C5 reconnaît RhoB uniquement lorsqu'elle est liée à un nucléotide, sans rapport avec la nature de ce dernier. On peut le qualifier de scFv conformationnel G-nucléotide indépendant.



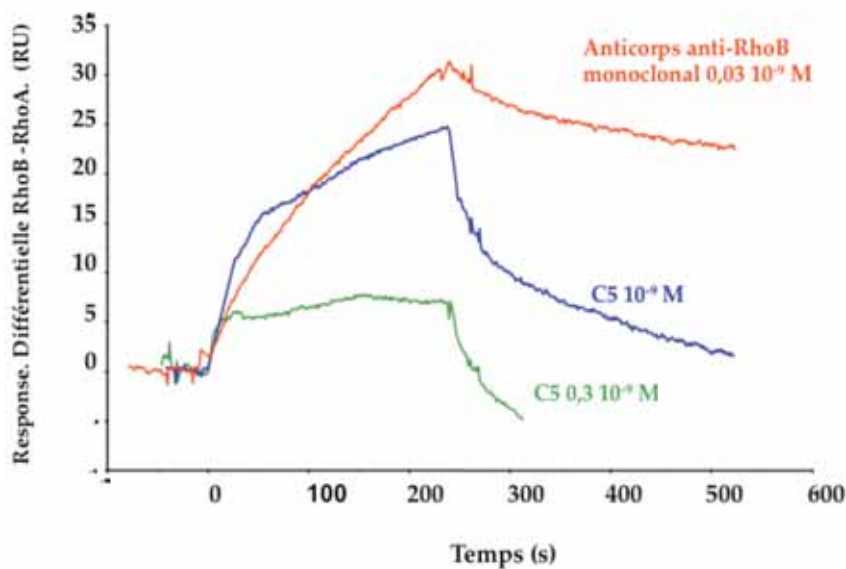
**Figure 59: le scFv C5 reconnaît la conformation de RhoB liée à un nucléotide indépendamment de la nature de ce dernier.** Le scFv C5 purifié est testé en ELISA sur des billes tapissées au glutathion où des protéines recombinantes (GST-RhoB et GST-RhoB<sub>Q63L</sub>) ont été immobilisées. Ces protéines sont incubées dans différents milieux pendant 1 heure à 37°C (PBS, PBS/EDTA 10 mM, PBS/EDTA 10mM/GDP 100μM, PBS/EDTA 10mM/GTPγS 100μM). Le scFvC5 et l'anticorps anti-RhoB monoclonal commercial sont ensuite incubés avec les billes en présence de 40 mM de MgCl<sub>2</sub> à température ambiante. Après lavages, le scFvC5 spécifiquement lié aux antigènes est révélé par un anticorps anti-myc-HRP et l'anti-RhoB commercial avec un anticorps anti-IgG-HRP de souris.

### Affinité du scFv C5

Nous avons tenté de mesurer l'affinité du scFv C5 par la technique de résonance plasmonique de surface (SPR). Ce fragment d'anticorps a été injecté à deux concentrations et l'interaction a été mesurée sur GST-RhoB et GST-RhoA chargées avec du GDP. Le sensogramme de la figure 60 est le résultat de la différence de ces deux tracés et correspond



ainsi à la liaison spécifique sur GST-RhoB. Le sensogramme montre une dissociation rapide du scFv C5 comparée à celle de l'anticorps monoclonal anti-RhoB commercial utilisé comme référence. Il n'a pas été possible de déterminer précisément l'affinité du scFv C5 dans cette expérience car sa purification en trop faible quantité n'a pas permis l'établissement d'une gamme de concentration suffisante. Néanmoins, ce scFv paraît être de basse affinité, avec une constante de dissociation au-delà du micromolaire, probablement autour de 5  $\mu$ M.



**Figure 60: mesure de l'affinité de scFv C5 pour RhoB(GDP) par SPR.** Les protéines recombinantes GST-RhoB et GST-RhoA chargées avec du GDP sont immobilisées sur une puce fonctionnalisée par un anticorps anti-GST. Le scFv C5 est injecté à deux concentrations à un débit de 20  $\mu$ l/min. Le sensogramme représente la liaison spécifique de GST-RhoB, la liaison sur GST-RhoA ayant été soustraite. L'anticorps monoclonal anti-RhoB commercial a été utilisé comme référence. L'unité de mesure RU signifie Resonance Unit.

## Commentaires

Nous avons sélectionné, par phage display, un scFv (scFv C5) de basse affinité spécifique de RhoB. Ce fragment d'anticorps n'est pas capable de distinguer les conformations actives et inactives de RhoB mais semble se lier à cette GTPase uniquement lorsqu'elle est en présence de magnésium (la nature du nucléotide présent n'ayant pas d'influence sur la liaison). De plus, le scFv C5 ne donne pas de signal spécifique avec RhoB dans des expériences d'immuno-électro-empreinte lorsque cette GTPase a subi un traitement dénaturant au SDS.

### *Affinité du scFv C5 pour RhoB*

Nous avons utilisé la banque Griffin I qui est une banque naïve synthétique de scFv humains. Lors de la validation de la banque, Griffiths et ses collaborateurs ont isolé des scFv d'affinités allant du micromolaire au nanomolaire (Griffiths et al., 1994). L'affinité du scFv C5 pour RhoB a été évaluée autour de 5  $\mu$ M par SPR. Il se situe donc dans la fourchette basse des possibilités de cette banque.

La comparaison des localisations de RhoB révélées en immunocytologie par ce scFv et par un anticorps monoclonal anti-RhoB commercial n'a pas mis en évidence de différences notables, suggérant que le scFv C5 est capable de visualiser la localisation de la GTPase RhoB endogène dans les vésicules endosomales de cellules Hela fixées et perméabilisée (Chaisemartin et al., 2009).

### *Spécificité du scFv C5 pour RhoB*

La question qui se pose est de comprendre comment le scFv C5 peut se lier spécifiquement à RhoB indépendamment de RhoA et de RhoC. L'épitope de ce fragment d'anticorps se situe probablement dans la partie hypervariable C-terminale puisque sa suppression provoque une perte de liaison du scFv C5. Pourtant, cela ne peut rendre compte du fait que le fragment d'anticorps perd toute capacité de liaison lorsque RhoB subit est dénaturée par un traitement au SDS (cas de l'électrophorèse des protéines) ou bien à l'EDTA, suggérant que sa liaison est dépendante de la conformation de l'antigène (Soundararajan et al., 2008). La délétion de ce domaine C-terminal ne semble pas influencer la conformation des GTPases. En effet, cette délétion des 18 derniers acides aminés est couramment utilisée dans les études structurales des GTPases par diffraction aux rayons X, car cette région est trop flexible pour être résolue (John et al., 1989). Cependant, les GTPases Ras et Rho ne possédant pas ce domaine conservent leurs propriétés de liaison au nucléotide et d'hydrolyse du GTP et ont montré leurs capacités à se lier à leurs partenaires, qu'ils soient régulateurs ou effecteurs (John et al., 1989). Or ces propriétés de liaison sont dépendantes des conformations des GTPases. Bien que nous n'ayons pas à ce jour de résolution aux rayons X de RhoB liée au GTP ou au GDP en présence de magnésium, on est en droit de supposer, par analogie, que la partie hypervariable n'intervient probablement pas dans la conformation de cette GTPase. Tout cela laisse supposer que l'épitope reconnu par le scFv C5 n'est pas entièrement contenu dans la partie C-terminale de RhoB. La liaison de ce scFv fait probablement intervenir une autre région de cette GTPase dont la conformation est en relation avec la présence ou

l'absence de nucléotide. Nous avons vu que seules les positions des domaines switch I et II des GTPases dont nous connaissons les structures, changent en fonction de la nature du nucléotide. Il est dès lors possible que l'absence de nucléotide affecte en priorité ces deux domaines.

Au cas où cette hypothèse serait vérifiée, on pourrait tenter d'obtenir, par évolution moléculaire de ce scFv, un biosenseur spécifique de la GTPase RhoB active, ce qui fournirait un autre point de départ pour l'obtention de ce biosenseur.

Article

## Synthesis and Application of a N-1# Fluorescent Biotinyl Derivative Inducing the Specific Carboxy-Terminal Dual Labeling of a Novel RhoB-Selective scFv

L. Chaisemartin, P. Chinestra, G. Favre, C. Blonski, and J. C. Faye

*Bioconjugate Chem.*, **Article ASAP** • DOI: 10.1021/bc800272r • Publication Date (Web): 06 April 2009

Downloaded from <http://pubs.acs.org> on April 24, 2009

### More About This Article

---

Additional resources and features associated with this article are available within the HTML version:

- Supporting Information
- Access to high resolution figures
- Links to articles and content related to this article
- Copyright permission to reproduce figures and/or text from this article

[View the Full Text HTML](#)

# Synthesis and Application of a N-1' Fluorescent Biotinyl Derivative Inducing the Specific Carboxy-Terminal Dual Labeling of a Novel RhoB-Selective scFv

L. Chaisemartin,<sup>†,§</sup> P. Chinestra,<sup>†,§</sup> G. Favre,<sup>†</sup> C. Blonski,<sup>‡</sup> and J. C. Faye<sup>\*,†</sup>

INSERM U563, Département Oncogénèse, Signalisation et Innovation Thérapeutique, Institut Claudius Regaud, 31052 Toulouse, France, and Groupe de Chimie Organique Biologique, Laboratoire LSPCMIB - UMR 5068 CNRS, Université Paul Sabatier, Toulouse cedex 9, France. Received July 3, 2008; Revised Manuscript Received March 3, 2009

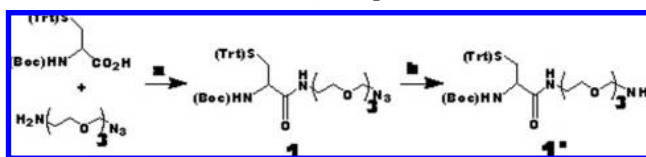
The fluorescent site-specific labeling of protein would provide a new, easy-to-use alternative to biochemical and immunochemical methods. We used an intein-mediated strategy for covalent labeling of the carboxy-terminal amino acid of a RhoB-selective scFv previously isolated from a phage display library (a human synthetic V<sub>H</sub> + V<sub>L</sub> scFv phage library). The scFv fused to the Mxe intein was produced in *E. coli* and purified and was then labeled with a newly synthesized fluorescent biotinyl cysteine derivative capable of inducing scFv-Mxe intein splicing. In this study, we investigated the splicing and labeling properties of various amino acids in the hinge domain between scFv and Mxe under thiol activation. In this dual labeling system, the fluorescein is used for antibody detection and biotin is used for purification, resulting in a high specific activity for fluorescence. We then checked that the purified biotinylated fluorescent scFv retained its selectivity for RhoB without modification of its affinity.

## INTRODUCTION

In the postgenomic era and beyond, the generation of monoclonal antibodies for proteome research and of recombinant antibody fragments will be essential for research, diagnosis, and treatment. These molecules can be selected from huge antibody gene libraries against any target, by an in vitro panning procedure (1–5). After phage display, scFv peptides are selected and produced in *E. coli*. Their recognition and purification are facilitated by the addition of various tags, such as the 6x histidine stretch and/or cmc domains. Whatever the tag used, secondary antibodies carrying the detection system (enzymatic activity or fluorescence) are required to visualize the scFv. However, two methodologies described the direct selection and obtention of fluorescent antibodies (6, 7). In the present study, we aimed to overcome the need for a secondary antibody, by generating dual-labeled scFv by chemical site-specific modification.

Various techniques have been used for chemical protein labeling to date, but most are inapplicable due to limitations to the reactivity of the amino acid in aqueous buffers. Other organic solvent-based methods frequently induce protein denaturation and do not provide specific single-site modification. Antos et al. (8) recently showed that an oxidative deamination reaction could be used to strip the N-terminal amino group from various proteins. This technique is of limited scope, being restricted to proteins meeting the requirements of N-terminal solvent accessibility. Moreover, the reaction is not quantitative and generates a pool containing singly labeled and unlabeled proteins. Biotechnology has led to the development of enzyme-mediated labeling (which would be used in vitro) for the same purpose, for the analysis of protein activities in vivo (9) (10–16) while others have developed Halo Tag (17–19). Various small

**Scheme 1. Synthesis of 1-(N- $\alpha$ -t-Boc-S-Trityl-L-cysteinamido)-11-amino-3,6,9-trioxaundecane, Compound 1<sup>a</sup>**



<sup>a</sup> (a) BOP + DIEA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, one day at room temperature, 89%; (b) P(Ph)<sub>3</sub> in THF 12 h, then H<sub>2</sub>O, with stirring for a further 12 h, 95%.

peptides able to permit visualization have been fused to the protein of interest inducing fluorescence in the presence of biarsenical ligands (16, 20–22), lanthanide binding tag (23–28), and protein domains (29). The labeling strategy described here makes use of the properties of intein splicing (30–34) and the previously described N-1' functionalization of biotin (35). This strategy should be applicable to any protein of known amino acid sequence but was used here with a previously isolated scFv against the native RhoB GTPase, selected by phage display in our laboratory. As part of this study, we synthesized a new N-1' biotin derivative able to induce intein splicing (Schemes 1; 2).

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

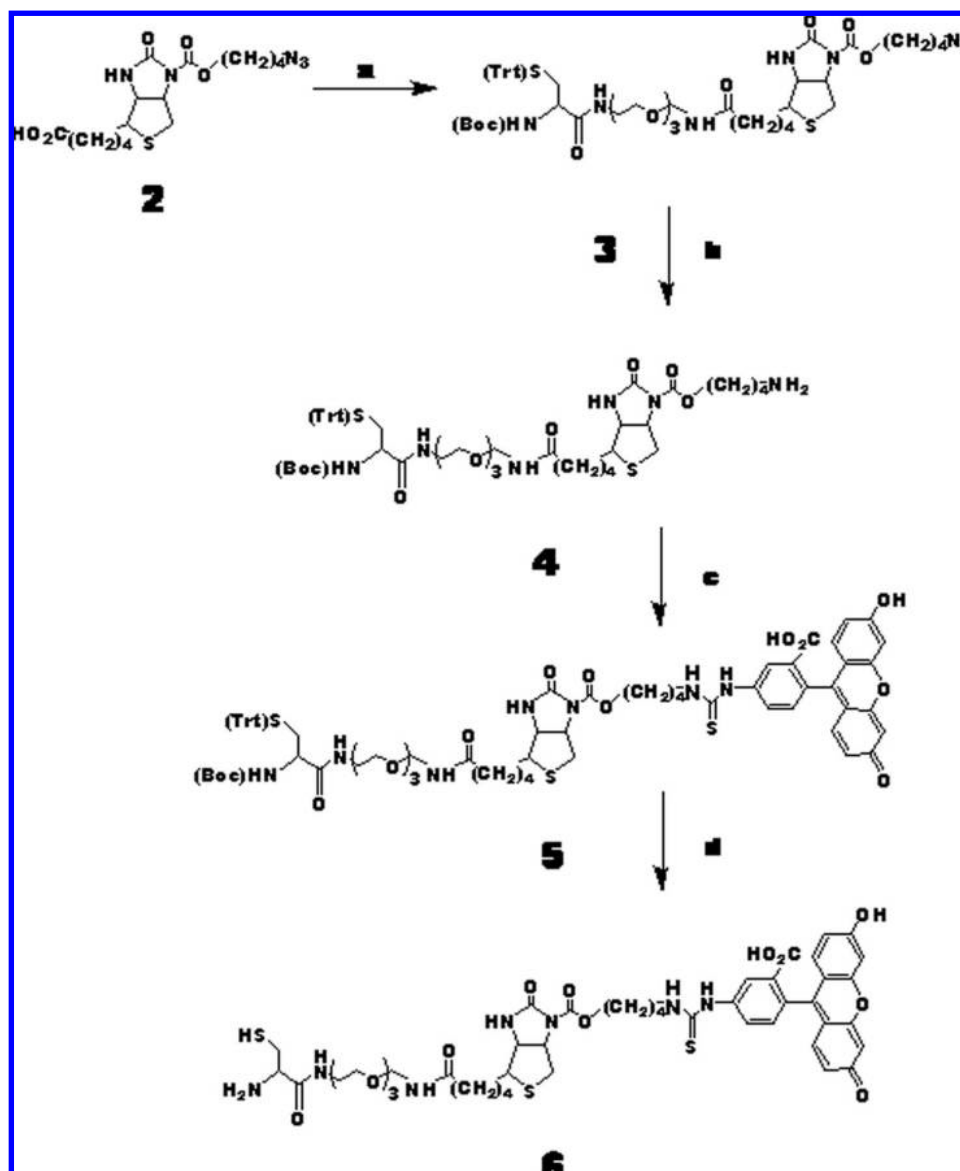
**Materials and Methods.** All chemical and biochemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich, except for biotin (Lancaster Synthesis), FITC (Molecular Probes), and amino acids and BOP (Novabiochem). All reactions involving non-aqueous solvents were carried out under a dry argon atmosphere. The progress of the reaction was monitored by analytical thin-layer chromatography (TLC) on silica gel Merck 60F<sub>254</sub>. Bands were visualized under UV (254 nm), with Pancaldi reagent (cerium IV, 5%), iodine, ninhydrin, or KMnO<sub>4</sub>. Products were purified by flash chromatography on silica gel (Merck, 30–70  $\mu$ m) or preparative reverse-phase HPLC (C18 Hyperprep, 250  $\times$  21.2 mm, 8  $\mu$ m). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: jcfaye@hotmail.fr.

<sup>†</sup> Institut Claudius Regaud.

<sup>‡</sup> Université Paul Sabatier.

<sup>§</sup> L.C. and P.C. contributed equally to this work.

Scheme 2. Synthesis of 1-(L-Cysteinamido)-11-[1'-N-(4-(thiourea fluorescein)-1-butoxycarbonyl)-D-biotinamido]-3,6,9-trioxaundecane, Compound 6<sup>a</sup>

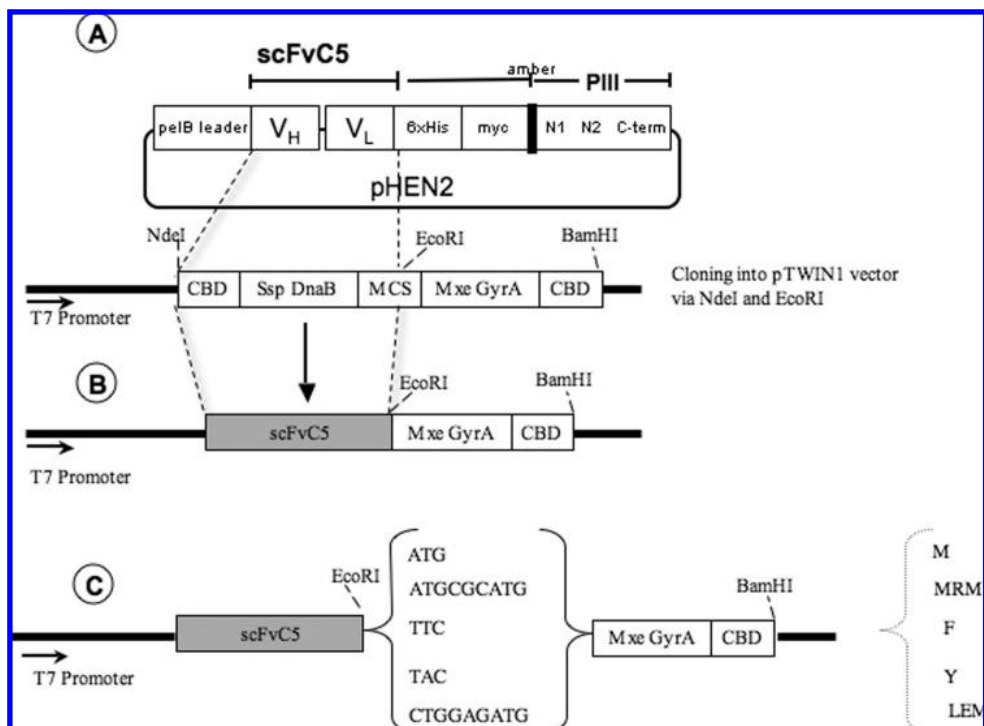
<sup>a</sup> (a) Under argon atmosphere, BOP + DIEA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF (3/2) at 0°C for 30 min, then **1'** added + DIEA, stirring for 24 h at room temperature, 93%; (b) P(Ph)<sub>3</sub> in THF with stirring for 12 h, then H<sub>2</sub>O with stirring for a further 12 h, 68%; (c) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (Et)<sub>3</sub>N at 0°C, then 12 h at room temperature; (d) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> TIS at room temperature for 5 h, 60%.

a Brücker AC 300 instrument, and chemical shift values ( $\delta$ ) are expressed in parts per million (ppm) with respect to the corresponding deuterated solvent. ESI mass spectra were recorded on a Nemaq R10-10 machine. High-resolution FAB mass spectra were obtained from the Mass Spectrometry Service, CESAMO, Bordeaux.

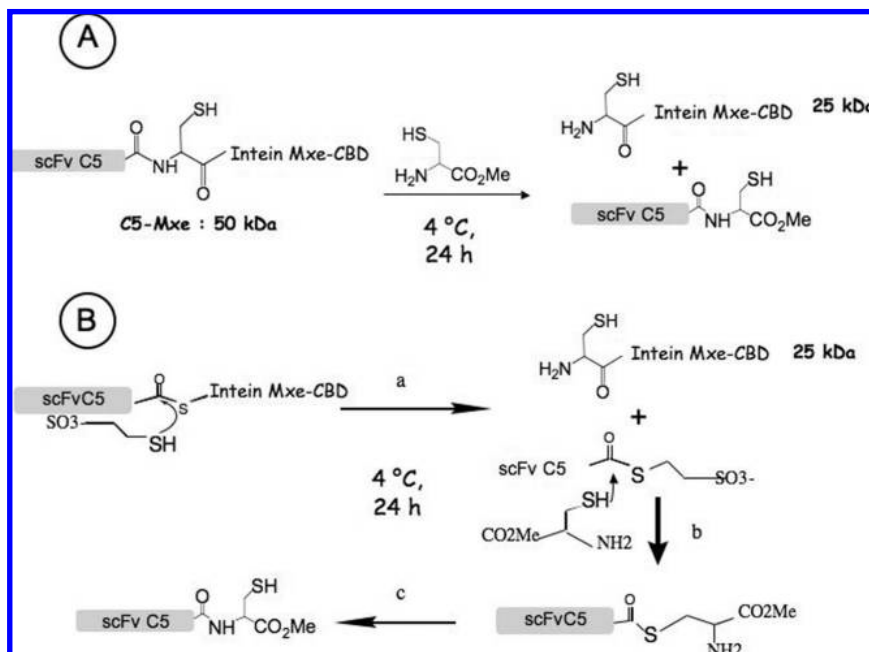
**Chemicals.** 1-(N- $\alpha$ -t-Boc-S-Trityl-L-cysteinamido)-11-azido-3,6,9-trioxaundecane, *Compound 1*. We synthesized 1-amino-11-azido-3,6,9-trioxaundecane as described by Schwabacher et al. (36, 37). To a stirred solution of N- $\alpha$ -t-Boc-S-trityl-L-cysteine (1 g, 2.2 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) were added BOP (954 mg, 2.2 mmol) and DIEA (420  $\mu$ L, 2.4 mmol). Stirring was continued for 30 min at 0 °C. We added 1-amino-11-azido-3,6,9-trioxaundecane (520 mg, 2.4 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) and DIEA (420  $\mu$ L, 2.4 mmol) to the mixture, which was stirred for 1 day at room temperature. The reaction mixture was washed successively with 1 M HCl (150 mL), 1 M NaHCO<sub>3</sub> (150 mL), and a sodium chloride saturated solution (brine) (150 mL). The organic layer was dried (MgSO<sub>4</sub>) and the solvent evaporated under reduced pressure. The resulting crude product was purified

by flash chromatography, using a gradient of 95/5 to 80/20 dichloromethane/ethyl acetate, to give **1** (1.31 g, 89%) as a slightly yellow oil:  $R_f = 0.27$  CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (8/2); MS (ESI)  $m/z$ : [M + H]<sup>+</sup> = 664.7; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm): 7.37–7.31 (m, 6H, CH), 7.25–7.10 (m, 9H, CH), 6.37 (t,  $J = 6$  Hz, 1H, NH), 4.83 (d,  $J = 6$  Hz, 1H, NH), 3.89–3.78 (m, 1H, CH), 3.61–3.48 (m, 10H, CH<sub>2</sub>), 3.46–3.40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.36–3.26 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.69–2.57 (m, 1H, CH), 2.50–2.38 (m, 1H, CH), 1.35 (s, 9H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm): 2  $\times$  170.38, 3  $\times$  144.47, 6  $\times$  129.60, 6  $\times$  128.06, 3  $\times$  126.90, 80.12, 70.64, 70.61, 70.38, 70.12, 70.07, 69.73, 67.10, 53.53, 50.69, 39.38, 34.31, 3  $\times$  28.32.

1-(N- $\alpha$ -t-Boc-S-Trityl-L-cysteinamido)-11-amino-3,6,9-trioxaundecane, *Compound 1'*. One equivalent of compound **1** (1 g, 1.5 mmol) was dissolved in anhydrous THF (15 mL); 4 equiv of triphenylphosphine, P(Ph)<sub>3</sub> (1.58 g), was added and activation was allowed to occur for 12 h at room temperature. We then added water (4 mL) and maintained stirring for a further 12 h. The mixture was concentrated under reduced pressure, diluted with 50 mL of water, and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10  $\times$  50 mL).

Scheme 3. pHEN2 Vector and scFvC5-(X)-Mxe Constructs<sup>a</sup>

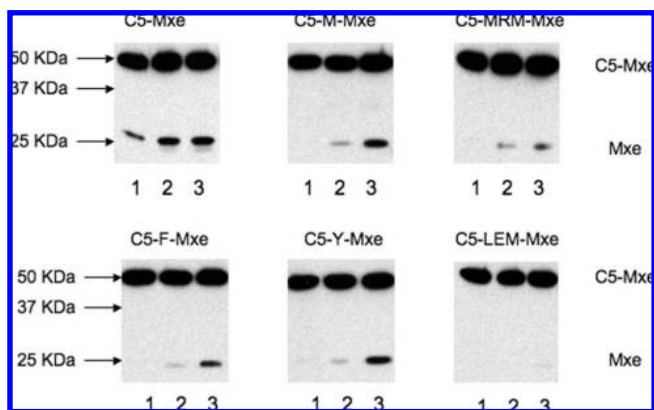
<sup>a</sup> A: Schematic representation of the pHEN2 phagemid vector (Griffin 1. library). pelB leader: signal peptide sequence of bacterial pectate lyase mediating secretion into the periplasmic space; V<sub>H</sub>: variable fragment of the heavy chain; V<sub>L</sub>: light chain; 6xHis: 6 histidine-tag; myc: myc-tag; amber: amber stop codon; N1, N2, C-term: portions of the N- and C-termini of phage capsid protein pIII. ScFvC5 (V<sub>H</sub> V<sub>L</sub>) amplified by PCR and inserted into the pTWIN 1 vector. B: Schematic representation of scFvC5 fused to the Mxe intein. C: Schematic representation of the various scFvC5-(X)-Mxe, constructed and checked for splicing efficiency.

Scheme 4. Splicing of scFvC5-(X)-Mxe<sup>a</sup>

<sup>a</sup> A: Cysteine carboxymethyl ester induces the formation of two products with a molecular mass of 25 kDa. Only the product containing the chitin binding domain (CBD) is detected by the anti-CBD antibody on western blots. B: Mesna catalyzes the activity of the carboxymethyl ester of cysteine, generating an intermediate in addition to the two initial products. As in A, only the product containing the chitin binding domain (CBD) was detected with an anti-CBD antibody on western blots. (a) Mesna reacts with intein, producing mxeCBD plus scFvC5 linked to mesna. (b) Binding of cysteine carboxymethyl ester to scFvC5.

The resulting product was concentrated and purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol, gradient 95/5 to 1/1), giving a pale yellow oil (0.91 g, 95%), **1**:  $R_f = 0.15$  CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (6/4); MS (ESI)  $m/z$ : [M + H]<sup>+</sup> = 638.6; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm): 7.41–7.28 (m, 6H, CH),

7.28–7.01 (m, 10H, CH + NH), 5.19 (d,  $J = 9$  Hz, 1H, NH), 4.01–3.86 (m, 1H, CH), 3.61–3.21 (m, 14H, CH<sub>2</sub>), 2.75 (t,  $J = 6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.61–2.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.80 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 1.35 (s, 9H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm): 2 × 170.43, 3 × 144.50, 6 × 129.57, 6 × 127.98, 3 × 126.79, 79.86,

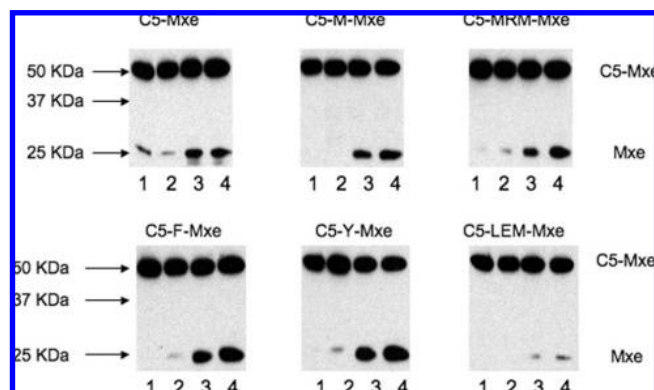


**Figure 1.** Western blot analyses, with anti-CBD antibody of the splicing induced by cysteine carboxymethyl ester alone. scFvC5-(X)-Mxe was generated and adsorbed onto chitin-coated plates, which were incubated with various concentrations of cysteine carboxymethyl ester: buffer alone (lane 1), 1 mM (lane 2), 10 mM (lane 3).

73.14, 2 × 70.51, 70.31, 70.09, 69.87, 66.85, 53.35, 41.52, 39.36, 34.62, 3 × 28.33).

*1-(N- $\alpha$ -t-Boc-S-Trityl-L-cysteinamido)-11-[1'-N-(4-azido-1-butoxycarbonyl)-D-biotinamido]-3,6,9-trioxaundecane, Compound 3.* To a stirred solution of *N*-1'-(4-azido-1-butoxycarbonyl)-D-biotin 2 (**35**) (380 mg, 0.99 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF (3/2, 15 mL) at 0 °C were added BOP (436 mg, 0.99 mmol) and DIEA (190  $\mu$ L, 1.1 equiv). After 30 min, a solution of **1'** (692 mg, 1.1 mmol) and DIEA (190  $\mu$ L, 1.1 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9 mL) was added dropwise, and the resulting mixture was stirred for 24 h at room temperature. The reaction mixture was concentrated under a vacuum and the residue dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL). The resulting solution was washed successively with HCl (1 M, 150 mL), NaHCO<sub>3</sub> (1 M, 150 mL), and brine (150 mL) and then dried (MgSO<sub>4</sub>) and the solvent evaporated off under a vacuum. The resulting crude product was purified by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, gradient 98/2 to 90/10) to give **3** as a pale yellow oil (0.93 g, 93%): *R*<sub>f</sub> 0.2 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95/5); *R*<sub>f</sub> = 0.2 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95/5); MS (ESI) *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> = 1005.65 [M + Na]<sup>+</sup> = 1027.65; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 7.38–7.29 (m, 6H, CH), 7.29–7.10 (m, 9H, CH), 6.81 (s, 1H, NH), 6.66 (t, *J* = 6 Hz, 1H, NH), 6.55 (s, 1H) NHC<sub>1</sub>O, 5.19 (s, 1H, NH), 4.76–4.68 (m, 1H, CH), 4.24–4.15 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.15–4.04 (m, 1H, CH), 3.92–3.80 (m, 1H, CH), 3.60–3.20 (m, 18H, CH<sub>2</sub>), 3.14–3.04 (m, 1H, CH), 3.04–2.87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.54–2.40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.10 (t, *J* = 6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.80–1.45 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 1.45–1.24 (m, 11H, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 1173.10, 2 × 170.78, 155.60, 151.85, 3 × 144.45, 6 × 129.58, 6 × 128.04, 3 × 126.87, 80.03, 70.48, 70.38, 70.34, 70.11, 69.83, 69.64, 67.03, 65.80, 62.65, 57.61, 55.21, 53.48, 50.95, 39.47, 39.18, 38.73, 35.51, 34.29, 3 × 28.34, 27.94, 27.87, 25.98, 25.48, 25.28.

*1-(N- $\alpha$ -t-Boc-S-Trityl-L-cysteinamido)-11-[1'-N-(4-amino-1-butoxycarbonyl)-D-biotinamido]-3,6,9-trioxaundecane, Compound 4.* To a solution of compound **3** (115 mg, 0.11 mmol) in dry THF (2 mL) was added triphenylphosphine (240 mg, 0.88 mmol). The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. Water (2 mL) was then added, and the resulting mixture was stirred for a further 12 h. The solution was concentrated under reduced pressure, diluted with water (8 mL), and extracted 10 times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). The combined organic layers were dried (MgSO<sub>4</sub>) and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N, 8/2/0.1). The resulting product was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) and successively washed with HCl (1 N, 50 mL), NaHCO<sub>3</sub> (1 N, 50 mL), and brine (50 mL). The organic solution was dried



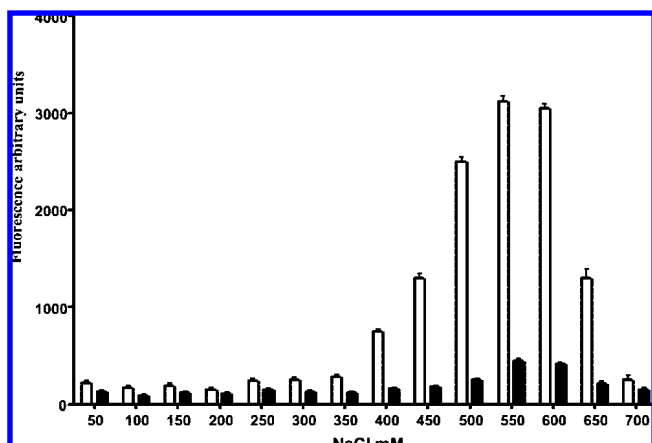
**Figure 2.** Western blot analyses, with anti-CBD antibody of the splicing induced by cysteine carboxymethyl ester in the presence of mesna (3 mM). scFvC5-(X)-Mxe was produced, adsorbed onto chitin-coated plates, and incubated with various concentrations of cysteine carboxymethyl ester in the presence of 3 mM mesna: buffer alone (lane 1), mesna (lane 2), mesna + 1 mM (lane 3), mesna + 10 mM (lane 4).

(MgSO<sub>4</sub>) and evaporated under reduced pressure to give **4** as a brown powder (73 mg, 68%): *R*<sub>f</sub> = 0.17 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (8/2 in the presence of 1% Et<sub>3</sub>N); MS (ESI) *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> = 979.65 [M + Na]<sup>+</sup> = 1001.75; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 7.40–7.27 (m, 6H, CH), 7.27–7.09 (m, 9H, CH), 7.09–6.90 (m, 3H, NH, NH<sub>2</sub>), 6.80–6.65 (m, 2H, NH × 2), 5.15–5.02 (m, 1H, NH), 4.77–4.60 (m, 1H, CH), 4.25–4.07 (m, 3H, CH, CH<sub>2</sub>), 3.96–3.80 (m, 1H, CH), 3.60–3.25 (m, 16H, CH<sub>2</sub>), 3.13–3.05 (m, 1H, CH), 3.01–2.80 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.63–2.51 (m, 1H, CH), 2.51–2.40 (m, 1H, CH), 2.09 (t, *J* = 6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.80–1.45 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 1.45–1.25 (m, 11H, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 173.25, 2 × 170.63, 156.31, 151.89, 3 × 144.44, 6 × 129.56, 6 × 128.03, 3 × 126.86, 80.04, 70.43, 70.36, 70.28, 70.08, 69.86, 69.67, 66.99, 66.24, 62.65, 58.06, 55.54, 53.45, 2 × 39.39, 39.13, 38.70, 35.72, 34.37, 28.54, 3 × 28.33 28.00, 3 × 25.42.

*1-(N- $\alpha$ -t-Boc-S-Trityl-L-cysteinamido)-11-[1'-N-(4-(thiourea fluorescein)-1-butoxycarbonyl)-D-biotinamido]-3,6,9-trioxaundecane, Compound 5.* To a stirred mixture of compound **4** (220 mg, 0.23 mmol) and Et<sub>3</sub>N (32  $\mu$ L, 0.23 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL) at 0 °C was added dropwise a solution of FITC (87.4 mg, 0.23 mmol) in dry DMF (3 mL). The mixture was allowed to come up to room temperature, with stirring, over a period of 4 h and was then stirred for a further 20 h at room temperature. The reaction mixture was placed under low pressure to evaporate off the solvent, and the resulting crude residue was purified by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt/MeOH, 4/4/2), to give **5** as a yellow powder (240 mg, 78%): *R*<sub>f</sub> = 0.32 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt/MeOH (4/4/2); MS (ESI) *m/z*: [M + Na]<sup>+</sup> = 1390.50; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 8.38–8.30 (m, 1H, CH), 7.96–7.68 (m, 4H, CH, NH × 3), 7.48–7.14 (m, 15H, CH, CH<sub>2</sub>), 7.05–6.96 (m, 1H, CH), 6.77–6.61 (m, 6H, CH), 4.85–4.75 (m, 1H, CH), 4.31–4.15 (m, 3H, CH, CH<sub>2</sub>), 3.60–2.90 (m, 22H, CH, CH<sub>2</sub>), 2.53 (m, 2H); 2.07 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.70–1.20 (m, 10H, CH<sub>2</sub>).

*1-(L-Cysteinamido)-11-[1'-N-(4-(thiourea fluorescein)-1-butoxycarbonyl)-D-biotinamido]-3,6,9-trioxaundecane, Compound 6.* To a stirred solution of compound **5** (44 mg, 0.032 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) at room temperature was added dropwise a solution of TIS (7  $\mu$ L, 0.032 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA (2 mL, 75/25). After 5 h of stirring at room temperature, the reaction mixture was placed under low pressure conditions to evaporate off the solvent, and the resulting crude residue was purified by flash chromatography (CH<sub>3</sub>CN/MeOH/H<sub>2</sub>O; gradient 90/5/5 to 80/15/5) to yield **6** as an orange powder (20 mg, 60%): *R*<sub>f</sub> = 0.18 CH<sub>3</sub>CN/MeOH/H<sub>2</sub>O (6/3/1); MS (ESI) *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> =





**Figure 3.** Fluorescence-linked immunosorbent assay of DEAE chromatography desorbed fractions. Labeled scFv C5 was loaded onto DEAE trisacryl and eluted with increasing concentrations of NaCl. Each fraction was then checked for binding to RhoA (white bars) and RhoB (black bars). The results shown are representative of a single experiment carried out in triplicate.

1026.3446 (theoretical mass: HRMS calculated for  $(C_{47}H_{59}N_7O_{13}S_3)$  ( $[M + H]^+$ ),  $m/z$  1026.3411);  $^1H$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$ (ppm): 8.28–8.19 (m, 1H, CH), 8.10–8.05 (m, 1H, NH), 7.90–7.82 (m, 1H, CH), 7.75–7.60 (m, 2H, NH), 7.15–7.05 (m, 1H, CH), 6.75–6.40 (m, 6H, CH), 4.80–4.70 (m, 1H, CH), 4.20–4.02 (m, 3H, CH, CH<sub>2</sub>), 3.60–2.90 (m, 22H, CH, CH<sub>2</sub>), 2.53 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.07 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.70–1.20 (m, 10H, CH<sub>2</sub>).

**Biological Agents. Strains.** The bacterial strains used were *E. coli* DH5 $\alpha$  for subcloning, BL 21 for Rho protein production, and ER 2566 (NEB) for scFvC5-intein chimeras.

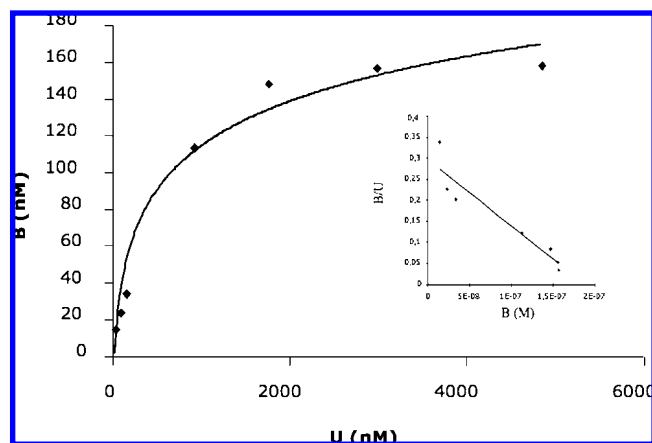
**ScFvC5 Selection and Production.** The Griffin.1 library, a human synthetic V<sub>H</sub>+V<sub>L</sub> scFv phage library in a phagemid vector, and the positive control *E. coli* TG1 (TG1 containing an antityroglobulin clone) were generously provided by Fiona Sait of The Medical Research Council (Cambridge, England). We followed the protocol provided for the Griffin.1 library at <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk> (38), as previously described (39). Briefly, in the presence of GST-RhoA (to remove unspecific phages), phages were selected using recombinant GST-RhoB, coated on glutathione wells. After four rounds of selection/amplification, this led to the isolation of an scFv fragment subsequently referred to as C5. This fragment was then produced as a recombinant protein, from the PHEN plasmid (Scheme 3: A). This scFvC5 has not yet been completely characterized. Initial analyses have shown that it is selective for the native structure of RhoB, with a dissociation constant at equilibrium ( $K_D$ ) of  $5 \pm 3 \times 10^{-6}$  M.

**Construction of ScFvC5-Mxe.** This construction process was based on the prior work of L.-P. Tan et al. (30, 31) and C. Cui et al. (40) We used the pTWIN1 plasmid of the NEB IMPACT system as a vector and amplified the scFvC5 sequence by PCR with primers containing a 5' *Nde*I site and a 3' *Eco*RI site:

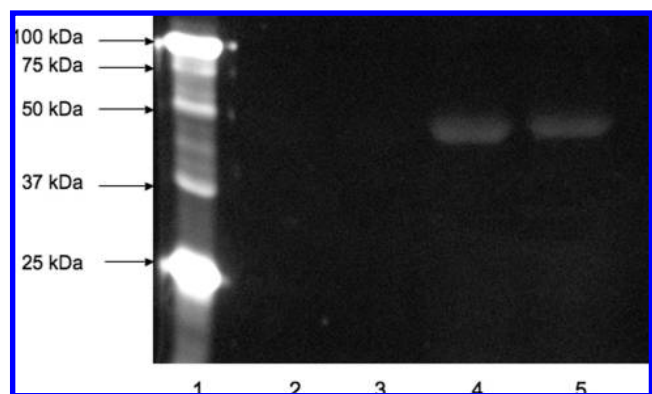
5'-GGAATTCATATGCAGGTGCAGCTGCAGGAG-3' sense  
3'-CGGAATTCTGCGGCCGCACCTAGGAC-5' antisense

The amplified and digested DNA fragment was inserted (in place of the *Ssp* intein), between the *Nde*I and *Eco*RI sites of the pTWIN1 plasmid (Scheme 3B).

**Construction of Mutated ScFvC5(-X)Mxe.** Given the importance of the nature of the amino acids of the hinge domain between scFvC5 and intein for the induction of splicing, we generated five mutations in this hinge domain: methionine (scFvC5-MMxe), phenylalanine (scFvC5-Fmxe), tyrosine (scFvC5-YMxe), methionine-arginine-methionine (scFvC5-MRMMxe), and leucine-glutamic acid-methionine (scFvC5-LEMMxe). The



**Figure 4.** Binding study for compound 6. Various concentrations of compound 6 (up to 6  $\mu$ M) were loaded onto an avidin-coated plate, in the absence (total binding) or presence (nonspecific binding) of a large excess of biotin (1 mM). B was representative of the specific fluorescence (compound 6) bound on avidin and U unbound. Representative data from one experiment of three performed in duplicate are shown. A Scatchard plot analysis is shown in the inset.

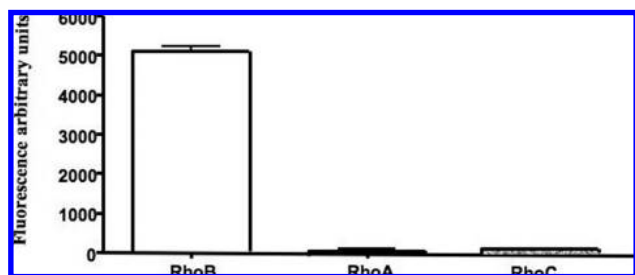


**Figure 5.** SDS-PAGE analysis of the eluate from streptavidin columns. The 500, 550, and 600 mM NaCl fractions from the DEAE column were pooled and loaded onto streptavidin beads. The beads were washed, and increasing concentrations were used for elution: 0.01 mM (lane 2), 0.1 mM (lane 3), 1 mM (lane 4), 10 mM (lane 5). The gel was illuminated under UV light (380 nm) for the detection of fluorescence.

various mutations were achieved by means of PCR using as the 3' primer a common oligonucleotide, 5'-ACGATTGTTTCGGGCTTT-3', annealing the 3' sequence of the *Bam*HI restriction site of pTWIN1, and, as the 5' primer, sequences carrying the *Eco*RI site were used.

Amplified and digested DNA fragments were inserted between the *Eco*RI and *Bam*HI sites of the previously constructed scFvC5-pTWIN 1 plasmid (Scheme 3C). These plasmids were constructed for the production in bacteria of an scFvC5 fragment fused to the mutated Mxe and tagged with a chitin-binding domain (CBD) from the pTWIN1 vector. This CBD was subsequently used to purify the protein of interest.

**Production of scFvC5-X-Mxe Protein Chimeras.** Transformed ER 2566 bacteria were grown at 37  $^{\circ}$ C in 50 mL of LB medium containing 100  $\mu$ g/mL ampicillin to an OD<sub>600</sub> of 0.6. Synthesis of the scFvC5-X-Mxe protein was then induced by incubation with IPTG (1 mM) for 18 h at 20  $^{\circ}$ C. Bacteria were harvested, centrifuged for 10 min at 4000g, resuspended in 5 mL of buffer A (HEPES (10 mM), NaCl (250 mM) pH 7.4), and subjected to six 10 s pulses of sonication on ice. The resulting lysate was centrifuged at 8500g for 30 min at 4  $^{\circ}$ C, and the supernatant was retained for subsequent experiments.



**Figure 6.** Fluorescence-linked immunosorbent assays of selectivity for RhoB. The streptavidin eluted with 1 mM biotin was diluted 1/20 and loaded onto Rho B (white bar), Rho A (black), or Rho C (gray)-coated plates.

**Induction of Splicing by the Carboxymethyl Ester of Cysteine.** Supernatants were loaded on chitin-coated 96-well plates and incubated at 4 °C for 4 h. They were then washed three times with buffer A, and increasing concentrations of the carboxy methyl ester of cysteine were added. The mixture was then incubated at 4 °C for a further 24 h, or at 20 °C for 4 h. The plates were washed with buffer A, and 5  $\mu$ L of 5% SDS at 80 °C was added to each well. Western blot analysis was then carried out with an antibody directed against the chitin binding domain (NEB Biolabs).

**Induction of Splicing and Labeling with 1-(L-Cysteinamido)-11-[1'-N-(4-(thiourea fluorescein)-1-butoxycarbonyl)-D(+)-biotinamido]-3,6,9-trioxaundecane.** We labeled only scFvC5-Y-Mxe using 100 mL of transformed bacteria. The bacteria were collected by centrifugation, and the pellet was resuspended in 10 mL of buffer A. The bacteria were lysed by sonication, and the 8500g supernatant was loaded at 4 °C onto 1 mL of chitin beads. The beads were washed with 4  $\times$  5 mL of buffer A. We then added 2.5 mM of compound **6** in the presence of mesna (3 mM) in 300  $\mu$ L of buffer A and incubated the beads at 4 °C for 24 h. The flow-through was salvaged and used in subsequent experiments.

**Partition of the Biotinylated Fluorescent scFvC5-Y (Biot-Fluo-scFvC5) from Unreacted Compound 6 and Unlabeled scFvC5-Y.** Anion exchange chromatography was carried out with 1 mL of DEAE Trisacryl resin from Pharmacia. The sample was diluted 1:5 in buffer B (HEPES 20 mM, pH 7.7) to adjust the NaCl concentration to 50 mM before loading. The column was then washed with 40 mL of buffer B supplemented with DTT (1 mM) and subjected to elution with buffer B plus DTT supplemented with increasing concentrations of NaCl (50 to 600 mM). Desorbed fractions were loaded, in the presence of BSA (10 mg/ml), onto 500  $\mu$ L of streptavidin resin (Amersham). The resin was washed with 15 mL of buffer B supplemented with DTT and BSA and 15 mL of the same buffer without BSA. Elution was carried out with increasing concentrations of biotin (0–10 mM) in buffer B. The fraction eluted with 1 mM biotin (purified) was used in subsequent experiments.

**Fluorescence-Linked Immunosorbent Assay (FLISA).** The chimeric GST-RhoA, GST-RhoB, GST-RhoC proteins were produced in *E. coli*, as previously described (41). They were absorbed onto glutathione-coated 96-well plates (Reacti-Bind Coated Black from Pierce). The plates were washed three times, with 200  $\mu$ L of PBS each, and were then incubated with 100  $\mu$ L of purified Biot-Fluo-scFvC5 (the 1 mM biotin fraction from streptavidin chromatography) for 1 h. The plates were washed twice with 1 mM DTT in PBS, and the fluorescence of each well was determined with a spectrofluorimeter (Flite 2001 Fluorescence Reader from Perkin-Elmer).

**Immunofluorescence.** HeLa cells (ATCC, CCL-2) were grown on coverslips in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Cambrex) supplemented with 5% fetal calf serum. They were fixed by incubation in paraformaldehyde (Cytofix) and perme-

abilized by incubation with Cytoperm (BD Biosciences). They were then incubated with 200  $\mu$ L of Biot-Fluo-scFvC5 in the presence or absence of GST-RhoA (about 10  $\mu$ g) or GST-RhoB (about 10  $\mu$ g) for 1 h and washed twice with 500  $\mu$ L of a 98/1/1 mixture of PBS/acetone/methanol. Control images were obtained with monoclonal anti-RhoB (sc8048) from Santa Cruz. Cell fluorescence was visualized with a Nikon Eclipse 90i microscope equipped with FITC fluorescence filters (Semrock) and a CoolsnapHQ<sup>2</sup> camera (Roper). Images were acquired with NIS-Element Ar.

## RESULTS

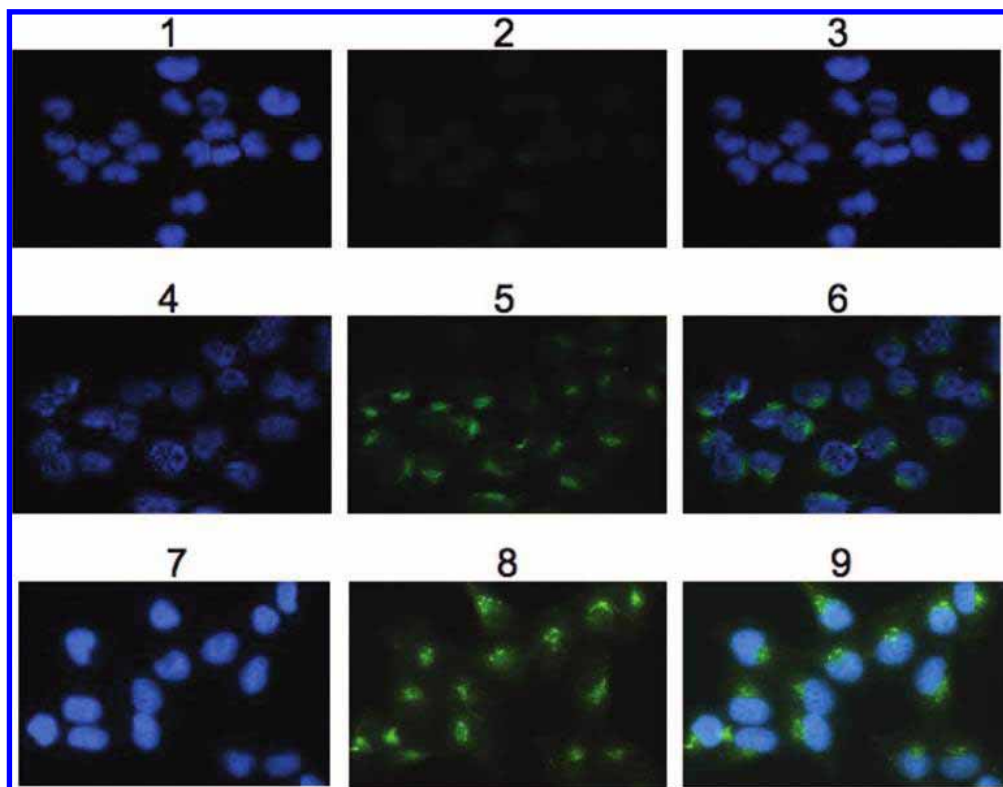
**Synthesis of 1-(N- $\alpha$ -t-Boc-S-Trityl-L-cysteinamido)-11-amino-3,6,9-trioxaundecane 1' (Scheme 1).** With the aim of increasing the spacing between the biotin motif and the reacting cysteine and the scFv, we generated a poly(ethylene glycol) arm with a cysteine-reactive thiol at one end. This linker has been chosen in relation to Bucourt's work (42). Compound **1** was obtained with an 89% yield and was reduced in the presence of triphenylphosphine to obtain compound **1'** (95% yield). Boc and trityl protective groups were retained for subsequent experiments.

**Synthesis of 1-(N- $\alpha$ -t-Boc-S-Trityl-L-cysteinamido)-11-[1'-N-(4-azido-1-butoxycarbonyl)-D-biotinamido]-3,6,9-trioxaundecane 3 (Scheme 2).** The peptide bond between compounds **1'** and **2** generated in a previous study (35) was reproduced here by classical methods, yielding 93% purified product **3**.

**Synthesis of 1-(L-Cysteinamido)-11-[1'-N-(4-(thiourea fluorescein)-1-butoxycarbonyl)-D-biotinamido]-3,6,9-trioxaundecane 6 (Scheme 2).** A Staudinger reduction was used to generate **4**, the amino group of which was then reacted with FITC to give **5**.

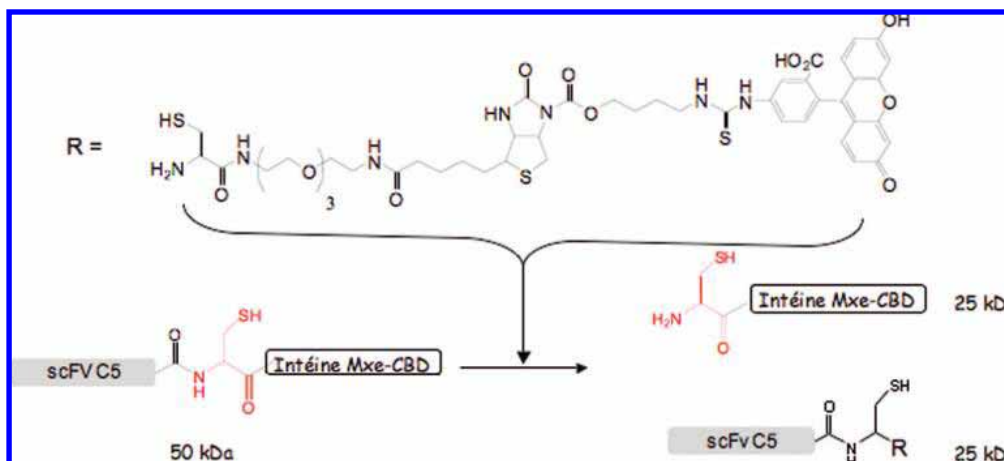
Classical deprotection methods yielded 20 mg of an orange powder **6** with a final recovery rate of 29.6%. This final deprotection step was carried out three times to obtain the desired product with a good recovery rate. Given the small amount of compound **6** obtained, we checked product purity by a combination of NMR and high-resolution mass spectrometry, as elementary analysis would have consumed too much of the product.

**Induction of Splicing by the Carboxymethyl Ester of Cysteine.** Given the small amount of compound **6** available, we initiated the labeling study and defined the optimal conditions for splicing and labeling using a commercially available carboxymethyl ester of cysteine as the thiol reagent. Chimeric scFv-X-Mxe was produced and adsorbed onto a chitin plate. Splicing efficiency was assessed by Western blotting with an anti-CBD (fused to the Mxe intein) antibody (Scheme 4A). We aimed to select the sequence giving the lowest level of splicing in the absence of inducer and the highest level of splicing in the presence of inducer. As shown in Figure 1, the initial construct gave splicing in the absence of inducer (a; lane 1), and splicing levels increased with increasing concentrations of cysteine carboxymethyl ester. The other five constructs gave no detectable splicing in the presence of buffer alone (c, b, d, e, f, lanes 1) and higher levels of splicing with the thiol, with the exception of scFvC5-LEM-Mxe, for which no splicing was observed with these treatments (f, lanes 1, 2, 3). We tried to increase the low splicing efficiency of the cysteine derivative by adding TCEP up to a concentration of 20 mM to maintain the thiol group of the cysteine derivative in its reactive form: no increase in the splicing efficiency of cysteine carboxymethyl ester was observed (data not shown). We also used mesna, another widely used catalyst (31, 33, 43, 44), for this reaction. The addition of mesna (3 mM) to the splicing buffer increased the effect of the cysteine derivative but had no effect alone, in the absence of the cysteine derivative (Figure 2a–f, lane 1). The largest increase was obtained with scFvC5-F-Mxe and



**Figure 7.** Immunofluorescence of RhoB in HeLa cells. The  $1 \mu\text{M}$  biotin eluted fraction was diluted 1/10 and loaded onto HeLa cells in the presence of purified GST-RhoB (1, 2, 3) or in the presence of purified GST-RhoA (4, 5, 6). Nuclear DAPI labeling (1, 4) and (2, 5) fluorescence imaging. Merged image (3, 6). Control with commercial anti-RhoB (7, 8, 9).

#### Scheme 5. Labeling of scFvC5 with Biotin–Fluorescein



scFvC5-Y-Mxe (Figure 2d,e), but, given the mechanism of action of mesna (Scheme 4B), splicing may occur without labeling of the desired protein. The effect of buffer pH was then assessed. Each construct had its own pattern of response to buffers of different pH (from 6.5 to 9), but for scFv–C5-Y-Mxe in the presence of 3 mM mesna, the best splicing effect was obtained at pH 7.4 (data not shown).

At this stage using GST-RhoB as ligand, we have not found a difference in  $K_D$  between the original scFv–C5-His6-c.myc with the new scFv–C5-Y-Mxe:  $K_D = 5 \pm 3 \times 10^{-6}$  M.

Experiments performed at  $20^\circ\text{C}$  for 4 h showed an increase in the splicing in response to the thiol inducer as compared to  $4^\circ\text{C}$ . However, at  $20^\circ\text{C}$ , the splicing occurred even in the absence of the thiol inducer (data not shown). Because this methodology will be also used to label *in vivo* (on viable cells) membrane receptors, cellular labeling must be performed at  $4^\circ\text{C}$

previously to follow the spatiotemporal changes of receptor in living cells at  $37^\circ\text{C}$ .

**ScFvC5 Labeling.** *In vitro* labeling was carried out with scFvC5-Y-Mxe, which gave the highest splicing efficiency in the presence of the cysteine derivative. Compound **6** was used in the presence of mesna (3 mM), and temperature ( $4^\circ\text{C}$ ) and pH (7.4) conditions were selected to minimize protease activity and the structural deformation of the scFv and to make it possible to extrapolate the system to *in vivo* studies, for membranous protein labeling. Bacterial culture (100 mL of ER 2566 transformed with scFvC5-Y-Mxe plasmid) was lysed as described in the Materials and Methods, and the lysate was loaded onto a 1 mL chitin bead column. The column was washed three times with 20 mL of buffer A, and 300  $\mu\text{L}$  of compound **6** (2.5 mM), dissolved in buffer A (pH adjusted to 7.4), was mixed with the beads in the presence of mesna (3 mM). After

24 h of contact with the beads, the flow-through containing the labeled scFvC5 was collected.

**Purification of Labeled scFvC5.** Capture on chitin beads gave a high level of purification of scFvC5-Y-Mxe from protein lysate, but the splicing induced by compound **6** and mesna essentially gave three products in the flow-through: unreacted compound **6**, unlabeled scFvC5 (which had reacted with mesna only), and labeled scFvC5. The calculated pI of scFvC5-Y given by the EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service site was 5.4. We therefore used an anionic purification step to separate the proteins from the unreacted compound **6**. The NaCl concentration of the flow-through was adjusted to 50 mM, and the flow-through was loaded onto a DEAE trisacryl column. We added dithiothreitol (1 mM) to each buffer to inhibit the formation of disulfide bridges (between compound **6** and other compounds with SH groups). Increasing concentrations of NaCl were used to elute the labeled scFv, which was obtained at NaCl concentrations of 400 to 600 mM (Figure 3). We have shown that N<sup>1</sup> modifications of D-biotin result in a major loss of affinity for avidin (35). We made use of this property in the purification of labeled scFv on streptavidin, by adding biotin to the elution buffer. Scatchard plot analysis of the affinity between streptavidin and compound **6** (Figure 4) showed a  $K_D$  of  $0.6 \times 10^{-6}$  M, suggesting competitive desorption with biotin ( $K_D = 10^{-13}$  M).

We mixed the three fractions (500–550–600 mM) from the DEAE trisacryl column and loaded the resulting mixture onto streptavidin magnetic beads, to remove unlabeled scFv and increase the specific fluorescence activity of the labeled product. The beads were washed, and the labeled scFvC5 was eluted with increasing concentrations of biotin. Labeled scFvC5-Y(BF-scFvC5) was eluted with 1 and 10 mM biotin, with the dimeric form of scFv the principal form obtained (Figure 5). Because this technology would be useful for in vivo labeling of membranous protein and to involve the cell capture of the biotin derivate at 37 °C, we have opted to induce Mxe intein splicing at low temperature (4 °C). If this temperature has lowered the scFv labeling efficiency it has maintained a good stability of the scFv. Assuming that the fluorescence quantum yield of the labeled protein was similar to that for compound **6**, the labeling yield (in relation to the quantity of compound **6** used) of the purified scFvC5 was about 2%, since recovery of labeled scFvC5 was around 5%.

**Fluorescence-Linked Immunoassay.** Small Rho (ABC) GTPases fused with the glutathione-sulfonyl-transferase (GST) were produced in *E. coli* and adsorbed onto a glutathione-coated 96-well plate. BF-scFvC5-Y retained specificity for RhoB (Figure 6).

We used the same technique to determine the dissociation constant at equilibrium of the BF-scFvC5-Y. Using GST-RhoB in the presence of increasing concentrations of BF-scFvC5-Y, the bound fraction was determined on glutathione beads, we found a  $K_D = 1 \pm 1 \times 10^{-6}$  M on the same order of value as for the original scFvC5.

**Immunofluorescence.** Fixed and permeabilized HeLa cells were incubated with BF-scFvC5-Y in the presence and absence of RhoA (4, 5, 6) or RhoB (1, 2, 3). A single wash with PBS supplemented with DTT plus acetone (1%) and methanol (1%) did not result in the clear visualization of specific binding (data not shown). However, two washes gave the results shown in Figure 7. The time required for the accumulation of fluorescence was identical for the three treatments. RhoB detection with BF-scFvC5-Y (5,6) in cells was essentially in endosomal vesicles

and was consistent with published results and with our own observations obtained with a commercial antibody (7, 8, 9) (41).

## CONCLUSION

Given the need for methods for selective protein labeling in biology and biochemistry, we aimed to design a strategy for the labeling and purification of scFv directed against the small GTPase RhoB selected by phage display techniques. It was essential for this labeling to be selective and to have no effect on antigen-scFv recognition. On the basis of previous work on the synthesis of functionalized biotin N-1' derivatives (35), we synthesized a biotin N-1' fluorescein derivative carrying a thiol inducer of intein splicing on its valeric chain. This molecule double-labeled the scFv, its biotin moiety facilitating purification of the labeled protein and its fluorescein moiety opening up opportunities for the use of fluorescence-based technology. This study demonstrated the dual activity of the cysteine-biotin N-1' fluorescein, which selectively labeled a new scFv targeting RhoB by intein splicing, and made it possible to use this molecule for immunofluorescence studies.

## LITERATURE CITED

- (1) Griffiths, A. D. (1993) Production of human antibodies using bacteriophage. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 263–7.
- (2) Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., Jones, P. T., Low, N. M., Allison, T. J., et al. (1994) Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* 13, 3245–60.
- (3) Hayden, M. S., Gilliland, L. K., and Ledbetter, J. A. (1997) Antibody engineering. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 201–12.
- (4) Santamaria, H. (2003) [Phage display applications in clinical diagnosis]. *Rev. Invest. Clin.* 55, 711–8.
- (5) Paschke, M. (2006) Phage display systems and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 2–11.
- (6) Olichon, A., and Surrey, T. (2007) Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 282, 36314–20.
- (7) Ayriss, J., Woods, T., Bradbury, A., and Pavlik, P. (2007) High-throughput screening of single-chain antibodies using multiplexed flow cytometry. *J. Proteome Res.* 6, 1072–82.
- (8) Antos, J. M., and Francis, M. B. (2006) Transition metal catalyzed methods for site-selective protein modification. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 253–62.
- (9) Agard, N. J., Prescher, J. A., and Bertozzi, C. R. (2004) A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 15046–7.
- (10) Bader, B., Kuhn, K., Owen, D. J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., and Kuhlmann, J. (2000) Bioorganic synthesis of lipid-modified proteins for the study of signal transduction. *Nature (London)* 403, 223–6.
- (11) Hofmann, R. M., and Muir, T. W. (2002) Recent advances in the application of expressed protein ligation to protein engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 297–303.
- (12) Guignet, E. G., Segura, J. M., Hovius, R., and Vogel, H. (2007) Repetitive reversible labeling of proteins at polyhistidine sequences for single-molecule imaging in live cells. *ChemPhys-Chem* 8, 1221–7.
- (13) Hauser, C. T., and Tsien, R. Y. (2007) A hexahistidine-Zn<sup>2+</sup>-dye label reveals STIM1 surface exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3693–7.
- (14) Juillerat, A., Heinis, C., Sielaff, I., Barnikow, J., Jaccard, H., Kunz, B., Terskikh, A., and Johnsson, K. (2005) Engineering substrate specificity of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase for specific protein labeling in living cells. *Chembiochem* 6, 1263–9.

- (15) Yin, J., Lin, A. J., Golan, D. E., and Walsh, C. T. (2006) Site-specific protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase. *Nat. Protoc.* 1, 280–5.
- (16) Machleidt, T., Robers, M., and Hanson, G. T. (2007) Protein labeling with FAsH and ReAsH. *Methods Mol. Biol.* 356, 209–20.
- (17) Los, G. V., Encell, L. P., McDougall, M. G., Hartzell, D. D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M. G., Learish, R., Ohana, R. F., Urh, M., Simpson, D., Mendez, J., Zimmerman, K., Otto, P., Vidugiris, G., Zhu, J., Darzins, A., Klaubert, D. H., Bulleit, R. F., and Wood, K. V. (2008) HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem. Biol.* 3, 373–82.
- (18) Los, G. V., and Wood, K. (2007) The HaloTag: a novel technology for cell imaging and protein analysis. *Methods Mol. Biol.* 356, 195–208.
- (19) Zhang, Y., So, M. K., Loening, A. M., Yao, H., Gambhir, S. S., and Rao, J. (2006) HaloTag protein-mediated site-specific conjugation of bioluminescent proteins to quantum dots. *Angew. Chem., Int. Ed.* 45, 4936–40.
- (20) Adams, S. R., Campbell, R. E., Gross, L. A., Martin, B. R., Walkup, G. K., Yao, Y., Llopis, J., and Tsien, R. Y. (2002) New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 6063–76.
- (21) Adams, S. R., and Tsien, R. Y. (2008) Preparation of the membrane-permeant biarsenicals FAsH-EDT2 and ReAsH-EDT2 for fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins. *Nat. Protoc.* 3, 1527–34.
- (22) Chen, B., Cao, H., Yan, P., Mayer, M. U., and Squier, T. C. (2007) Identification of an orthogonal peptide binding motif for biarsenical multiuse affinity probes. *Bioconjugate Chem.* 18, 1259–65.
- (23) Martin, L. J., Hahnke, M. J., Nitz, M., Wohnert, J., Silvaggi, N. R., Allen, K. N., Schwalbe, H., and Imperiali, B. (2007) Double-lanthanide-binding tags: design, photophysical properties, and NMR applications. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 7106–13.
- (24) Nitz, M., Franz, K. J., Maglathlin, R. L., and Imperiali, B. (2003) A powerful combinatorial screen to identify high-affinity terbium(III)-binding peptides. *Chembiochem* 4, 272–6.
- (25) Reynolds, A. M., Sculimbrene, B. R., and Imperiali, B. (2008) Lanthanide-binding tags with unnatural amino acids: sensitizing Tb<sup>3+</sup> and Eu<sup>3+</sup> luminescence at longer wavelengths. *Bioconjugate Chem.* 19, 588–91.
- (26) Sculimbrene, B. R., and Imperiali, B. (2006) Lanthanide-binding tags as luminescent probes for studying protein interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 7346–52.
- (27) So, M. K., Yao, H., and Rao, J. (2008) HaloTag protein-mediated specific labeling of living cells with quantum dots. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 419–23.
- (28) Wohnert, J., Franz, K. J., Nitz, M., Imperiali, B., and Schwalbe, H. (2003) Protein alignment by a coexpressed lanthanide-binding tag for the measurement of residual dipolar couplings. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 13338–9.
- (29) Lin, M. Z., Glenn, J. S., and Tsien, R. Y. (2008) A drug-controllable tag for visualizing newly synthesized proteins in cells and whole animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 7744–9.
- (30) Tan, L. P., Chen, G. Y., and Yao, S. Q. (2004) Expanding the scope of site-specific protein biotinylation strategies using small molecules. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 5735–8.
- (31) Tan, L. P., Lue, R. Y., Chen, G. Y., and Yao, S. Q. (2004) Improving the intein-mediated, site-specific protein biotinylation strategies both in vitro and in vivo. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 6067–70.
- (32) Wood, R. J., Pascoe, D. D., Brown, Z. K., Medicott, E. M., Kriek, M., Neylon, C., and Roach, P. L. (2004) Optimized conjugation of a fluorescent label to proteins via intein-mediated activation and ligation. *Bioconjugate Chem.* 15, 366–72.
- (33) Lue, R. Y., Chen, G. Y., Hu, Y., Zhu, Q., and Yao, S. Q. (2004) Versatile protein biotinylation strategies for potential high-throughput proteomics. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 1055–62.
- (34) Lesaichere, M. L., Lue, R. Y., Chen, G. Y., Zhu, Q., and Yao, S. Q. (2002) Intein-mediated biotinylation of proteins and its application in a protein microarray. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 8768–9.
- (35) Inard, C., Fourcade, E., Baron, R., Tovar, D., Chaisemartin, L., Blonski, C., and Faye, J. C. (2006) Syntheses of functionalized biotin N-1' derivatives: new tools for the control of gene expression with small molecules. *Bioconjugate Chem.* 17, 1030–5.
- (36) Lee, J. W., and L. Fuchs, P. L. (1999) Reduction of Azides to Primary Amines in Substrates Bearing Labile Ester Functionality. Synthesis of a PEG-Solubilized, “Y”-Shaped Iminodiacetic Acid Reagent for Preparation of Folate-Tethered Drugs. *Org. Lett.* 1, 179–182.
- (37) Schwabacher, A. W., Lane, J. W., Schiesher, M. W., Leigh, K. M., and Johnson, C. W. (1998) Desymmetrization Reactions: Efficient Preparation of Unsymmetrically Substituted Linker Molecules. *J. Org. Chem.* 63, 1727–1729.
- (38) MRC Centre for Protein Engineering, [http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/]. Accessed April 1999.
- (39) Goffinet, M., Chinea, P., Lajoie-Mazenc, I., Medale-Giamarchi, C., Favre, G., and Faye, J. C. (2008) Identification of a GTP-bound Rho specific scFv molecular sensor by phage display selection. *BMC Biotechnol.* 8, 34.
- (40) Cui, C., Zhao, W., Chen, J., Wang, J., and Li, Q. (2006) Elimination of in vivo cleavage between target protein and intein in the intein-mediated protein purification systems. *Protein Expr. Purif.* 50, 74–81.
- (41) Lajoie-Mazenc, I., Tovar, D., Penary, M., Lortal, B., Allart, S., Favard, C., Brihoum, M., Pradines, A., and Favre, G. (2007) MAP1A light chain-2 interacts with GTP-RHOB to control EGF-dependent EGF-R signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 4155–64.
- (42) Bucourt, R., Vignau, M., and Torelli, V. (1978) New biospecific adsorbents for the purification of estradiol receptor. *J. Biol. Chem.* 253, 8221–8.
- (43) Xu, M. Q., and Evans, T. C., Jr. (2001) Intein-mediated ligation and cyclization of expressed proteins. *Methods* 24, 257–77.
- (44) Tolbert, T., and Wong, C. H. (2000) Intein-Mediated Synthesis of Proteins Containing Carbohydrates and Other Molecular Probes. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 5421–5428.



# MATERIELS & METHODES

# I. MATERIELS

## I.1. Souches de bactéries.

*E.coli* DH5 $\alpha$  (New England Biolabs), génotype : *fhuA2*  $\Delta$ (*argF-lacZ*)*U169 phoA glnV44*  $\Phi$ 80 $\Delta$  (*lacZ*)*M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*.

*E.coli* XL1 blue (Stratagene), génotype: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'* *proAB lacIqZ* $\Delta$ *M15 Tn10 (Tet)<sup>R</sup>*].

*E.coli* BL21 (Promega), génotype : *F*<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS*  $\beta$  (*r* $\beta$ - *m* $\beta$ -), *dcm*,*gal*.

## I.2. Production et purification des protéines recombinantes.

Billes Ni-NTA : Ni-NTA agarose beads (Qiagen).

Billes de chitine-sepharose : chitin beads (New England Biolabs).

Billes fonctionnalisées au p-aminobenzimidine : p-aminobenzimidine agarose beads (Sigma).

Imidazole (Sigma-Aldrich).

GDP : Guanosine DiPhosphate (Sigma-Aldrich).

GTP $\gamma$ S : Guanosine 5'-O-[gamma-thio]TriPhosphate (Sigma-Aldrich).

IPTG : Isopropyl-  $\beta$ - D -thiogalactopyranoside.

LB-A : LB contenant 100  $\mu$ g/mL d'ampicilline.

LB-GA : LB contenant 1% de glucose et 100  $\mu$ g/mL d'ampicilline.

Imidazole (Sigma-Aldrich).

PBS 10X : 10.5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30.0 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.54 M de NaCl, pH 7.4.

Tampon A : 50mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1% (v/v) Triton X-100, 1 mM DTT, 10  $\mu$ M GDP, proteases inhibitors cocktail (Sigma Aldrich).

Tampon B : 50mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1% (v/v) Triton X-100, lysosyme 1 mg/mL final.

Tampon C : 50mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM d'imidazole.

Tampon D : 50mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM d'imidazole.

Tampon E : 50mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>.

Tampon F: 50mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% (v/v) Triton X-100, 1 mM DTT.

Tampon TSE : 50 mM Tris-HCl pH8,0, 1mM EDTA, 0,5 M sucrose.

Tampon G : 50mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 10 mM d'imidazole.

Tampon H: 50mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 250 mM d'imidazole.



Tampon I: 50mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl.

Tampon J : Tris/HCl 50mM pH7,5, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, triton X100 1%, inhibiteur de protéases 1/100 (Roche), DTT 1 mM.

Tampon K : Tris/HCl 50mM pH8, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, triton X100 0,1%.

Tampon TSE : 50mM Tris-HCl pH 8,0, sucrose 0,5M, EDTA 1mM.

Thrombine: 1 unité/μL (Amersham).

Colonne filtre: Econo-pac column (Bio-Rad).

NAP 5 et PD10 desalting columns (GE Healthcare).

Membrane de nitrocellulose : Protran (Whatman).

Spectrophotomètre : NanoVue (GE Healthcare).

Expasy ProtParam tool : <http://web.expasy.org/protparam/>.

### **I.3. Phage display**

LB broth medium: 10 g of tryptone, 5 g d'extraits de levure, 10 g de NaCl.

2x YT broth medium: 16 g de Tryptone-B, 10 g d'extraits de levure B, 5 g de NaCl.

2xYT-GA : 2xYT contenant 1% de glucose et 100 μg/mL d'ampicilline.

2xYT-T : 2xYT contenant 10μg/mL de tétracycline.

2xYT-AK : 2xYT contenant 100μg/mL d'ampicilline et 50μg/mL de kanamycine.

Milieu minimal M9 agar: 7.5 g of bacto-agar pour 384 mL d'eau désionisée. Steriliser à l'autoclave pendant 15 min à 121°C et refroidir à 50°C. Ajouter 100mL de solution de sels M9, 1 mL d'une solution de MgSO<sub>4</sub> 1 M, 10 mL d'une solution de glucose 20% et 5 mL d'une solution de bacto casamino acides 20% (Difco). Ajouter 100 mg/mL Ampicillin et couler dans les boîtes de pétri.

Phage auxiliaire M13KO7 (New England Biolabs).

TE: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA.

Kanamycine (Sigma-Aldrich).

MPBS : tampon PBS contenant 3% de lait écrémé.

TEA : triéthylamine.

Anticorps anti-M13-HRP (GE Healthcare).

Plaque stérile 96 puits (NUNC).

## II. METHODES

### II.1. Construction du plasmide scFv-N-CBD.

Il s'agit d'insérer l'étiquette Chitin Binding Domain (CBD) précédé d'un site de clivage à la thrombine en 3' du scFv-NP3 au moyen de deux PCR :

- le fragment scFv en fusion avec la partie N-terminale de la P3 (fragment A) est amplifié avec les amorces *LMB3* et *P3 CBD as* qui apporte un site BglII et le site de clivage à la thrombine, en utilisant comme matrice le plasmide scFv F7-NP3.
- le CBD (fragment B) est amplifié à partir du plasmide pTYB1 (New England Biolabs) avec les amorces *CBD Age s* apportant un site BglII et *CBD Eco as* apportant un site EcoRI.

Le pHEN2 scFv F7-NP3 est digéré par les enzymes NcoI et EcoRI et le remplacement du fragment scFv F7-NP3 par les fragments A et B est effectué par une ligation tri-moléculaire. Le produit de la ligation est transformé dans des bactéries *E.coli* DH5 $\alpha$  compétentes selon les spécifications du fournisseur. Les bactéries sont alors étalées dans des boîtes de pétri contenant du milieu 2xYT-GA sélectif pour la résistance à l'ampicilline apportée par le plasmide. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 16 à 24h et des colonies sont piquées au hasard pour êtreensemencées dans 3 ml de LB-GA et incubées à 37°C pendant 16 à 24h sous agitation (250 à 300 rpm) en vue d'une analyse du contenu plasmidique par restriction. Le lendemain, on réalise des mini-préparations de plasmides à l'aide du kit Nucleo-Spin Plasmid (Macherey-Nagel) selon les spécifications du fournisseur. L'analyse plasmidique est réalisée en digérant les plasmides par les enzymes NotI et EcoRI (New England Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. Après électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, on révèle les fragments de restriction par un colorant d'ADN (GRGreen, Dark Reader). Les clones possédant l'étiquette CBD ont une taille de 1023 bp.

*LMB3* : 5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'

*P3 CBD as*: 5'TAGATCAGATCTGGATCCACGCGGAACCAGAGAGCCGCCG

CCAGCATTGACAGG 3'

*CBD Age s*: 5' TAGCTAAGATCTGGGATTACTTTATCTGATGATTCTGATC 3'

*CBD Eco as*: 5' TCAGTAGAATTCTTATCATTGAAGCTGCCACAAGGCAGG 3'

## **II.2. Construction de la banque secondaire de scFv.**

### **II.2.1. Mutagénèse au hasard.**

Nous avons utilisé le kit GeneMorph II EZClone Domain Mutagenesis (Stratagene) dans plusieurs conditions de fréquence de mutation selon les spécifications du fournisseur. Nous avons construit la banque avec la condition de taux de mutation maximal : la quantité de matrice est comprise entre 0,1 et 100 ng d'insert à amplifier avec 30 cycles d'amplification. La taille de la matrice utilisée (pHENC1-NP3) étant de 4683 pb et celle du scFv à muter de 737 pb, la réaction est réalisée sur 500 ng de matrice correspondant à 80 ng d'insert. Les amorces *mut bis S* et *mut AS* sont choisies pour s'hybrider à l'endroit des sites restriction NcoI et NotI délimitant le scFvC1. Ces sites seront ensuite utilisés pour insérer les scFv mutés dans le phagemide pHEN II contenant le scFv E3 anti-thyroglobuline humaine.

Conditions de PCR de mutagénèse (epPCR) :

Matrice : 500ng  
Mutazyme buffer 10X : 5 µl  
*mut bis S* (5'-TTATTACTCGCGGCCAGCCGG -3') : 125 ng  
*mut AS* (5'-CCATGGCCCAGGTGCAGC-3') : 125 ng  
dNTP : 200 µM final  
mutazyme : 2,5 U  
H<sub>2</sub>O : qsp 50 µl

Cycles d'amplification :

1- 95°C : 2 min

2- 95°C : 30 s

3- 63°C : 30 s

4- 72°C : 1 min

5- 72°C : 10 min

Les pas 2 à 4 sont répétés 30 fois.

Le produit de la réaction est ensuite vérifié.

La totalité de la réaction est ensuite traitée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% de façon à séparer la matrice contenant le scFvC1 des fragments d'ADN mutés qui sont extraits du gel et purifiés au moyen du kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel) selon les spécifications du fournisseur.

### **II.2.2. Clonage des scFv mutés.**

Nous nous sommes largement inspirés des conditions décrites dans (Kay et al., 1996).

### Digestion et purification du pHEN II scFvE3

pHEN II scFvE3 : 1 µg

Tampon 3 10X (New England Biolabs): 30 µl

Nco I (New England Biolabs): 50 U

Not I (New England Biolabs): 50 U

H<sub>2</sub>O : qsp 300 µl

Incuber à 37°C pendant 16 h.

Le phagemide est ensuite séparé du scFvE3 par électrophorèse sur gel d'agarose 1% pour être extrait du gel et purifié au moyen du kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel) selon les spécifications du fournisseur.

Remarque : les multiples essais d'optimisation de taux de mutation et de taille de banque sont très consommateurs de réactifs. Sachant qu'en moyenne, une réaction de mutagenèse permet d'obtenir une concentration d'ADN purifié d'environ 250 ng/µl, cela correspond à  $6 \cdot 10^{17}$  scFv clonables. Compte tenu des rendements limitants de la transformation des bactéries, ce nombre dépasse largement le nombre de clones contenus dans une banque de taille conséquente (jusqu'à  $10^{10}$  clones indépendants). Nous avons ainsi réalisé une PCR d'amplification sur un petit volume de la réaction de mutagenèse de façon à augmenter nos possibilités de clonage sans risquer de multiplier des clones redondants.

### PCR d'amplification

epPCR diluée au 1/50 : 1 µl

Thermo-buffer 10X (New England Biolabs): 5 µl

*mut bis S* (5'-TTATTACTCGCGGCCAGCCGG-3') :  $50 \cdot 10^{-12}$  moles

*mut AS* (5'-CCATGGCCCAGGTGCAGC-3') :  $50 \cdot 10^{-12}$  moles

dNTP : 200 µM final

*Taq* DNA polymérase : 2,5 U

H<sub>2</sub>O : qsp 50 µl

### Cycles d'amplification :

1- 95°C : 2 min

2- 95°C : 30 s

3- 55°C : 30 s

4- 72°C : 1 min

5- 72°C : 10 min

Les pas 2 à 4 sont répétés 30 fois.

#### Digestion des scFv mutés

Produit de mutagenèse : 300 ng

Tampon 3 10X (New England Biolabs): 30 µl

Nco I : 50 U

Not I : 50 U

H<sub>2</sub>O : qsp 300 µl

Incuber à 37°C pendant 16 h.

L'ADN est ensuite purifié au moyen du kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel) selon les spécifications du fournisseur.

#### Réaction de ligation

Les concentrations relatives de phagemide et d'insert sont évaluées après électrophorèse sur gel d'agarose 1% et coloration de l'ADN (GRGreen, Dark Reader).

Nous avons obtenu le plus grand nombre de clones avec la proportion de 3 molécules d'insert pour une molécule de phagemide.

pHEN II: environ 100 ng

insert : environ 50 ng

tampon T4 DNA Ligase 10X (New England Biolabs): 15 µl

T4 DNA Ligase (New England Biolabs): 2400 U

H<sub>2</sub>O : qsp 150 µl

Incubation : 17°C pendant 18 h.

Remarque : un contrôle négatif est réalisé dans les mêmes conditions mais dans lequel l'insert a été omis.

Le produit de ligation est ensuite purifié au moyen du kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel) et l'ADN est élué dans 50 µl d'eau de façon à éliminer les sels qui pourraient provoquer des arcs électriques lors de l'électroporation.

On évapore l'eau jusqu'à un volume d'environ 10 µl au moyen d'une pompe à vide (speed-vack) pour concentrer l'ADN dans le but d'augmenter le rendement d'électroperméation.

## Electroperméation

Préparation des bactéries (Chuang et al., 1995).

5 ml de 2xYT-T sontensemencés à partir d'une colonie d'E.coli XL1 blue et incubés sous agitation à 37°C pendant 8h. Cette préculture est ensuite diluée dans 500 ml de 2xYT-T et incubée sous agitation à 18°C pendant 16h.

Remarque : la tétracycline permet de sélectionner les bactéries possédant l'épisme F' nécessaire à l'infection par les phages filamenteux.

La culture est refroidie à 4°C. Les bactéries sont ensuite lavées dans l'eau stérile pour éliminer les sels selon le protocole suivant :

- Centrifuger à 2800 x g pendant 10 min à 4°C
- Reprendre le culot de bactéries par 500 ml H<sub>2</sub>O stérile

Répéter l'opération 4 fois et reprendre le culot dans 1 ml H<sub>2</sub>O stérile.

Remarque : toutes ces opérations doivent se dérouler à 4°C.

On incube ensuite dans la glace 5 µl de ligation avec 40 µl de bactéries pendant 15 minutes dans des tubes Eppendorf préalablement refroidis. Parallèlement, on réalise dans les mêmes conditions d'une part un contrôle positif avec 100 ng de pHEN-E3 afin de vérifier l'efficacité de l'électroperméation, d'autre part un contrôle négatif dans le but d'évaluer l'efficacité de la réaction de ligation ; en effet, le nombre de colonies obtenues avec insert doit être très supérieur à celui du contrôle négatif, signant ainsi des conditions de clonage correctes.

Le contenu des tubes est ensuite transféré dans des cuves d'électroperméation de 0,1 cm préalablement refroidies. Un pulse électrique de 1,8 kV est alors appliqué avec un appareil MicroPulser™ (BIO-RAD) préprogrammé. Le contenu des cuves est immédiatement repris par 1 ml de milieu SOC préchauffé à 37°C et incubé dans un bain-marie à 37°C pendant 1 h. Les bactéries sont ensuite étalées sur deux boîtes (dimensions : 20 cm x 20 cm) contenant du milieu 2xYT-GA agar à l'aide d'un râteau stérile et incubées à 30°C jusqu'à ce que les colonies soient visibles (en général 18 à 20 h).

On dénombre les colonies en prélevant préalablement 5 µl de bactéries et en opérant des dilutions sériées au 1/100° qui sont étalées sur des boîtes de pétri contenant du 2xYT-GA agar

et incubées à 37°C pendant 16 à 24 h. On multiplie le nombre de colonies résistantes par le facteur de dilution pour obtenir le nombre de clones indépendants.

Récupérer les colonies en répartissant 5 mL de milieu 2xTY contenant 15% de glycérol sur les grandes boîtes à l'aide d'un râteau stérile.

Les bactéries sont conservées à -70 °C par fractions contenant  $5.10^8$  bactéries (chaque fraction doit représenter au minimum 10 fois la taille de la banque).

### *II.2.3. Séquençage des clones*

On contrôle la diversité et la fréquence des mutations obtenues sur des colonies piquées au hasard pour être ensemencées dans 3 ml de LB-GA et incubées à 37°C pendant 16 à 24h sous agitation (250 à 300 rpm). Le lendemain, on réalise des mini-préparations de plasmides à l'aide du kit Nucleo-Spin Plasmid (Macherey-Nagel) selon les spécifications du fournisseur. Le séquençage de l'ADN est réalisé par le service de séquençage de l'IFR 150 Inserm Purpan-Toulouse. Les amorces utilisées sont LMB3 et pHENseq.

## **II.3. Production et purification des protéines Rho recombinantes**

Les protéines Rho recombinantes GST-RhoA<sub>Q63L</sub>, GST-RhoB<sub>Q63L</sub>, 6xHis-RhoA<sub>wt</sub> et 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> ont été produites et purifiées au laboratoire par Isabelle Lajoie-Mazenc et Rémi Gence, tandis que la protéine 6xHis-RhoB<sub>Q63L</sub> l'a été par mes soins.

### *II.3.1. Production et purification des protéines recombinantes étiquetées à la GST*

Les ADNc humains de RhoA et RhoB ont été clonés en fusion C-terminale de l'étiquette GST dans le vecteur d'expression procaryote pGSTparallel (Sheffield et al., 1999). Les mutants actifs GST-RhoA<sub>Q63L</sub> et GST-RhoB<sub>Q63L</sub> ont été obtenus par mutagenèse. Après culture des bactéries *E.coli* BL21(DE3) transformées avec les plasmides et induction de la synthèse des protéines recombinantes, les lysats bactériens sont chargés sur des colonnes de billes fonctionnalisées au glutathion. Après plusieurs lavages, les protéines Rho recombinantes sont éluées au glutathion.

## Culture des bactéries

Inoculer 100 mL de LB-A avec 50  $\mu$ L d'un stock glycérol de bactéries conservé à -80 °C (préculture).

Incuber sur la nuit à 37 °C sous agitation.

Inoculer 1 L de LB-A avec les 100 mL de préculture dans un erlenmeyer de 3 L.

Incuber à 37 °C sous agitation jusqu'à  $DO_{600\text{ nm}} = 0,8$ .

Ajouter de l'IPTG à une concentration finale de 0,1 mM.

Incuber 4 h à 30 °C sous agitation.

Centrifuger à 2500 x g à 4°C pendant 15 min.

Eliminer le surnageant.

Reprendre le culot par 50 mL de PBS et centrifuger à 2500 x g à 4°C pendant 15 min.

Le culot sec peut être conservé à -20 °C.

## Purification des protéines Rho recombinantes

Reprendre le culot bactérien par 20 mL de tampon A. Travailler dans la glace.

Sonifier 10 fois 10 s.

Centrifuger à 17000 x g pendant 30 min à 4 °C.

Pendant ce temps, prélever 500  $\mu$ L de billes glutathione-sepharose 4B et les laver 3 fois avec du tampon A pour éliminer l'éthanol.

Ajouter les billes sur le lysat clair obtenu.

Incuber pendant 2 h à 4 °C sous agitation douce.

Centrifuger à 500 x g pendant 1 min à 4 °C.

Eliminer le surnageant et laver les billes 3 fois avec 5 mL de tampon A froid.

Reprendre les billes dans 2 mL de tampon A additionné 10 mM de glutathion et incuber pendant 15 min à 4 °C sous agitation douce.

Centrifuger à 500 x g pendant 5 min à 4 °C et récupérer le surnageant contenant les protéines purifiées.

Répéter l'opération 3 fois et rassembler les 3 éluats.

Le glutathion est éliminé à l'aide de cassettes de dialyse (Pierce) contre du tampon E.

Ajuster les éluats à 10 % de glycérol et conserver à -80 °C.



### *II.3.2. Production et purification des protéines recombinantes étiquetées 6xHis*

Les ADNc des mutants actifs RhoA<sub>Q63L</sub> et RhoB<sub>Q63L</sub> ont été sous-clonés dans le vecteur d'expression procaryote pHIS parallèle (Sheffield et al., 1999) en fusion C-terminale de l'étiquette 6xHis. Après culture des bactéries *E.coli* BL21(DE3) transformées avec les plasmides et induction de la synthèse des protéines recombinantes, les lysats bactériens sont chargés sur des colonnes de billes fonctionnalisées au Ni-NTA. Après plusieurs lavages, les protéines Rho recombinantes sont éluées à l'imidazole. Ce protocole a été adapté à partir des spécifications du fournisseur.

#### Culture des bactéries

Inoculer 10 mL de LB-AG à partir d'un stock glycérol, conservé à -80 °C, de bactéries possédant le plasmide correspondant (préculture).

Incuber sur la nuit à 37 °C sous agitation.

Inoculer 600 mL de LB-AG avec les 6 mL de préculture dans un erlenmeyer de 2 L.

Incuber à 37 °C sous agitation jusqu'à  $DO_{600\text{ nm}} = 0,8$ .

Centrifuger à 3300 x g pendant 10 min à TA.

Reprendre le culot dans 600 mL de LB-A additionné d'IPTG à une concentration finale de 0,1 mM.

Incuber 16 h à 20 °C sous agitation.

Centrifuger à 3300 x g à 4°C pendant 10 min.

Eliminer le surnageant.

Les culots secs peuvent être conservés à -20 °C.

#### Purification des protéines Rho recombinantes

Reprendre le culot par 20 mL de tampon B et incuber 30 min dans la glace.

Sonifier 30 fois 5 s dans la glace.

Centrifuger à 12500 x g pendant 15 min à 4 °C.

Centrifuger le surnageant à 12500 x g pendant 1 h à 4 °C.

Ajuster le surnageant avec de l'imidazole à 10 mM final.

Ajouter 1 mL de billes Ni-NTA préalablement lavées avec du tampon B.

Incuber 1 h à 4 °C sous agitation douce.

Verser le mélange dans une colonne filtre et laisser le liquide s'écouler.

Laver les billes Ni-NTA avec 20 mL de tampon C.

Boucher l'évacuation de la colonne et ajouter 1 mL de tampon D. Incuber 15 min à 4 °C en agitant de manière à ce que les billes restent en suspension.

Récupérer l'éluat.

Echange de tampon

Equilibrer deux colonnes NAP 5 avec du tampon E.

Verser 500 µL d'éluat dans chacune et laisser pénétrer.

Ajouter 1 mL de tampon E par colonne et récupérer l'effluent.

Ajuster à 10% de glycérol et conserver à -20 °C.

### *II.3.3. Analyse de la purification des protéines Rho*

La qualité de la purification est analysée par électrophorèse des protéines sur des gels 12% SDS-PAGE. Les protéines sont révélées par coloration au bleu de coomassié.

Les concentrations en protéine des purifications sont calculées à partir des valeurs d'absorbance mesurées au spectrophotomètre à 280 nm.

Les coefficients d'extinction moléculaire théoriques ( $\epsilon_{280}$ ) sont donnés par le logiciel Expasy ProtParam tool à partir des séquences primaires que l'on fournit.

GST-RhoA<sub>Q63L</sub> :  $\epsilon_{280}$ = 63425, PM= 48602,2

GST-RhoB<sub>Q63L</sub> :  $\epsilon_{280}$ = 66530, PM= 48942,5

6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> :  $\epsilon_{280}$ = 24785, PM= 24864,4

6xHis-RhoB<sub>Q63L</sub> :  $\epsilon_{280}$ = 27890, PM= 25219,6

### *II.3.4. Préparation d'extraits bruts de protéines Rho étiquetées à la GST*

Ensemencer 10 mL de milieu LB-GA avec des bactéries BL21 transformées avec les plasmides pGST//RhoAwt ou pGST//RhoBwt et incuber toute la nuit à 37 °C sous agitation. Diluer cette culture dans 300 mL de LB-GA et incuber à 37 °C sous agitation jusqu'à  $DO_{600nm} = 0,8$ .

Centrifuger à 3300 xg pendant 10 min à température ambiante (TA).

Reprendre le culot dans 300 mL de milieu LB-A additionné d'IPTG 0,1 mM et incuber 16 h à 20 °C.

Centrifuger la culture à 5000 xg pendant 10 min à 4 °C dans 6 tubes à centrifuger de 50 mL.  
Éliminer le surnageant et conserver les culots secs à -20 °C.  
Décongeler un culot et le reprendre dans 5 mL de tampon F.  
Sonifier 30 x 5 s dans la glace en évitant de faire de la mousse.  
Centrifuger à 12500 x g pendant 15 min à 4°C.  
Récupérer le surnageant et le partager dans 2 tubes.  
Ajouter dans un tube du GDP 1 mM final et dans l'autre du GTPγS 0,1 mM final, ainsi que de l'EDTA 10 mM final dans les deux.  
Incuber 1 h à 37 °C et arrêter la réaction en ajustant à 60 mM de MgCL<sub>2</sub>.

## **II.4. Sélection de scFv par “phage display”**

### *II.4.1. Production de phages auxiliaires*

Inoculer 5 mL de milieu 2xYT avec une colonie de TG1 cultivée sur milieu minimal M9 et incuber toute la nuit à 37 °C sous agitation.  
Diluer la préculture au 1/100<sup>e</sup> et incuber jusqu'à DO<sub>600</sub> ~ 0.2. Infecter 200 µL de la culture par 10 µL de dilutions sériées de phage auxiliaire M13KO7 (ceci dans le but d'obtenir des plages de lyse séparées). Incuber au bain Marie à 37 °C sans agiter pendant 30 min.  
Ajouter 3 mL de H-top agar maintenu liquide à 42 °C et verser dans une boîte contenant du 2xYT agar. Incuber toute la nuit à 37 °C.  
Inoculer 3 à 4 mL d'une culture de TG1 en phase exponentielle avec une plage de lyse isolée. Incuber à 37 °C sous agitation pendant 2 h.  
Ensemencer 500 mL de 2xYT contenu dans un erlenmeyer de 3 L et incuber 1 h à 37 °C sous agitation.  
Ajouter de la kanamycine à la concentration finale de 50 µg/mL et incuber à 37 °C sous agitation pendant 16 h.  
Centrifuger la culture à 10800 x g pendant 15 min à 4 °C.  
Transférer le surnageant contenant les phages dans un autre pot à centrifuger et ajouter 100 mL d'une solution de PEG/NaCl (1/5 du volume). Agiter et incuber 30 min au minimum dans la glace.  
Centrifuger à 10800 x g pendant 15 min à 4 °C.  
Reprendre le culot de phages dans 20 mL de TE, filtrer sur un filtre de 0,45 µm.

Titrer la préparation de phages auxiliaires en infectant 200  $\mu$ L d'une culture de bactéries avec 10  $\mu$ L de dilutions sériées. Etaler les bactéries sur des boîtes contenant du milieu 2xTY agar contenant de la 25  $\mu$ g/mL de kanamycine.

Les phages peuvent être conservés à la concentration de  $10^{12}$  cfu (colony-forming units) à 4 °C sur du court terme (quelques semaines) et à -20 °C pour le long terme.

Nous avons remarqué que dans ce dernier cas les phages pouvaient perdre de leur pouvoir infectieux : il est donc préférable de titrer à nouveau la préparation après décongélation.

#### *II.4.2. Expression de la banque de scFv à la surface des phages*

Décongeler une fraction de la banque secondaire de scFv pour inoculer 250 mL de 2xYT-GA dans un erlenmeyer de 2 L.

Incuber à 37 °C sous agitation jusqu'à  $DO_{600} \sim 0.5$ .

Infecter 25 mL de cette culture avec des phages auxiliaires ( $2 \cdot 10^{11}$  cfu soit une M.O.I.= 20) et incubé sans agiter à 37 °C pendant 30 min.

Centrifuger les bactéries à 3300 x g pendant 10 min. éliminer le surnageant contenant l'excès de phages auxiliaires et le glucose. Reprendre le culot avec 30 mL de milieu 2xYT-AK et transférer dans un erlenmeyer de 3 L contenant 470 mL de milieu 2xYT-AK. Incuber à 30 °C sous agitation toute la nuit.

Centrifuger la culture à 10800 x g pendant 10 min et transférer le surnageant contenant les phages dans des pots à centrifuger de 500 mL. Ajouter 100 mL d'une solution de PEG/NaCl, mélanger et incubé 1 h à 4 °C.

Centrifuger à 10800 x g pendant 30 min à 4 °C.

Reprendre le culot dans 40 mL d'eau stérile et transférer dans un tube à centrifuger de 50 mL. Ajouter 8 mL d'une solution de PEG/NaCl, agiter et incubé au minimum 20 min à 4°C.

Centrifuger à 10800 x g pendant 10 min à 4 °C et éliminer le surnageant.

Centrifuger brièvement pour éliminer les traces de PEG/NaCl.

Reprendre le culot de phages dans 5 mL de PBS et centrifuger à 11600 x g pendant 10 min à 4 °C pour éliminer les débris bactériens.

Titrer la préparation de phages en infectant 1 mL de bactéries XL1 bleue ( $DO_{600} \sim 0.5$ ) avec 10  $\mu$ L d'une dilution des phages au 1/10000.

Étaler les bactéries infectées après avoir opéré des dilutions sériées au 1/100 sur des boîtes de pétri contenant du milieu 2xYT-GA agar et incubé à 37 °C toute la nuit.

Compter le nombre de colonies et calculer le titre en tenant compte de la dilution.

### *II.4.3. Sélection par maturation d'affinité*

#### *1<sup>er</sup> tour de sélection*

Incuber 100 µL d'une solution contenant 1 µg de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> dans un puits d'une plaque surfacée au glutathion pendant 1 h à température ambiante.

Laver 3 fois au PBST 0,05%.

Incuber 100 µL d'une solution de MPBS contenant 10<sup>9</sup> phages (> 10 fois la taille de la banque) exprimant la banque de scFv pendant 30 min sous agitation puis 90 min au repos à température ambiante.

Éliminer les phages non liés et laver 10 fois avec 200 µL de TBST 0,1% puis 3 fois au PBS.

Élué les phages liés avec 200 µL de TEA 100 mM en agitant pendant 10 min à température ambiante.

Transférer l'élution dans un tube contenant 100 µL de Tris-HCl 1M pH 7.

Infecter 9,25 mL d'une culture d'*E.coli* XL1 blue avec 150 µL des phages élués et ajouter 200 µL de cette culture dans le puits.

Rassembler les bactéries infectées et prélever 100 µL qui seront étalés en dilutions sériées au 1/100 sur des boîtes de pétri contenant du milieu 2xYT-GA agar afin de dénombrer les phages élués.

Centrifuger les bactéries restantes à 3300 x g. Reprendre le culot dans 1 mL de milieu 2xYT et étaler sur une grande boîte contenant du milieu 2xYT-GA agar.

Incuber à 30 °C toute la nuit.

Collecter les colonies dans 5 mL de 2xYT contenant 15% de glycérol à l'aide d'un râteau stérile.

Ensemencer 100 mL de milieu 2xYT-GA avec 50 µL de bactéries récoltées et incubé à 37 °C sous agitation jusqu'à DO<sub>600</sub> ~ 0.5. Conserver les bactéries non utilisées à -70 °C.

Infecter 10 mL de la culture avec 2 x 10<sup>11</sup> cfu de phages auxiliaires M13KO7 et incubé au bain-marie sans agiter pendant 30 min.

Centrifuger les bactéries à 3300 x g pendant 10 min et reprendre le culot dans 50 mL de milieu 2xYT-AK et incuber toute la nuit à 30 °C sous agitation.

Centrifuger 40 mL de la culture de nuit à 10800 x g pendant 10 min.

Récupérer le surnageant et précipiter les phages en ajoutant 8 mL d'une solution de PEG/NaCl. Mélanger et incuber pendant 1 h à 4 °C.

Centrifuger à 10800 x g pendant 10 min à 4 °C et éliminer le surnageant.

Éliminer les traces de PEG/NaCl en centrifugeant brièvement le culot de phages.

Reprendre le culot de phages dans 2 mL de PBS et centrifuger à 11600 x g pendant 10 min pour éliminer les débris bactériens.

Titrer la solution de phages comme précédemment décrit.

#### *2<sup>ème</sup> tour de sélection*

Les conditions sont identiques à celles du 1<sup>er</sup> tour exceptés la quantité de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> utilisée (300 ng), ainsi que le nombre de lavages effectué après l'incubation des phages (20 lavages au PBST 0,1% suivis de 5 lavages au PBS).

#### *3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> tours de sélection*

Seule la quantité de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> présentée dans le puits diminue, passant de 3 ng à 0,3 ng respectivement.

### ***II.4.4. Sélection d'un scFv anti-RhoB actif***

Nous avons suivi le même protocole que celui décrit précédemment pour la sélection par maturation d'affinité et en utilisant la même banque secondaire de scFv. Les modifications suivantes ont été apportées :

#### *1<sup>er</sup> tour de sélection*

L'antigène est présenté comme suit :

0,5 µg de GST-RhoB<sub>Q63L</sub> sont incubés dans un puits d'une plaque surfacée au glutathion pendant 1 h à TA.

## *2<sup>ème</sup> tour et 3<sup>ème</sup> tour de sélection*

Incuber  $10^9$  phages issus du tour précédent avec 10  $\mu\text{g}$  de GST-RhoA<sub>Q63L</sub> pendant 1h à TA.

Ajouter 20  $\mu\text{L}$  de billes fonctionnalisées au glutathion préalablement lavées au PBS et incubé 1 h à TA sous agitation.

Centrifuger à 500 x g pendant 15 s pour éliminer les phages se liant à GST-RhoA<sub>Q63L</sub>.

Transférer le surnageant dans le puits contenant GST-RhoB<sub>Q63L</sub>.

## **II.5. Dosages par ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)**

Deux types d'ELISA ont été employés dans cette étude :

L'ELISA de type compétitif a été mis en œuvre pour les mesures d'affinité des scFv purifiés, tandis que l'ELISA de type sandwich l'a été pour toutes les autres expériences aussi bien sur des phages en condition polyclonale comme monoclonale, sur des scFv purifiés et non purifiés contenus dans des surnageants de culture bactérienne.

### *II.5.1. ELISA sandwich*

Anti-M13-HRP au 1/5000

Incuber 100  $\mu\text{L}$  d'antigène (**note 1**) étiqueté à la GST dans les puits d'une plaque surfacée au glutathion pendant 1 h à température ambiante.

Laver 3 fois au PBST 0,05%.

Incuber 100 $\mu\text{L}$  d'une solution de MPBS contenant les phages ou les anticorps primaires (**note 2**) pendant 1 h à température ambiante.

Laver 3 fois au PBST 0,05%.

Incuber 100  $\mu\text{L}$  d'anticorps secondaire couplé à l'HRP (**note 3**) dans du MPBS pendant 30 min à TA.

Laver 3 fois au PBST 0,05%.

Révéler la présence de phages par l'ajout de 100  $\mu\text{L}$  de TMB et incubé à TA jusqu'à obtention d'une coloration bleue.

Arrêter la réaction par l'ajout de 50  $\mu\text{L}$  d'une solution d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N et lire la DO à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque de 96 puits (Multiskan).

**Note 1 :**

Les protéines Rho étiquetées à la GST ont été purifiées comme décrit selon §II.3.1.. Les gammes de concentration pour les ELISA ont été réalisées dans du tampon E.

Les ELISA sandwich avec les protéines Rho étiquetées à la GST chargées avec du GDP et/ou du GTP $\gamma$ S ont été préparées comme décrit selon § II.3.4..

**Note 2 :**

L'anticorps monoclonal anti-RhoA 26C4 (SantaCruz) a été utilisé à la dilution 1/1000.

L'anticorps polyclonal anti-RhoB 119 (SantaCruz) a été utilisé à la dilution 1/2500.

Les ELISA polyclonaux ont été réalisés avec  $10^{10}$  cfu/puits sur des préparations de phages obtenus selon §II.4.2..

Les ELISA sandwichs monoclonaux sur phage ont été réalisés à partir de préparations selon le protocole suivant :

Ensemencer 10 mL de milieu 2xYT-GA avec les clones d'intérêts et incuber à 37 °C sous agitation jusqu'à  $DO_{600} \sim 0.5$ .

Infecter les bactéries avec  $2 \cdot 10^{11}$  cfu de phage auxiliaire M13KO7 et incuber sans agiter à 37°C pendant 30 min. Continuer comme décrit ci-dessous.

L'identification des clones positifs a été réalisée sur 100  $\mu$ L de surnageants contenant des phages obtenus de la manière suivante :

Ensemencer 100  $\mu$ L de milieu 2xYT-GA dans les puits d'une plaque stérile 96 puits des colonies individuelles à partir des boîtes de titration du tour de sélection voulu et incuber toute la nuit à 37 °C sous agitation.

Ensemencer chaque puits d'une seconde plaque contenant 200  $\mu$ L de milieu 2xYT-GA par puits à partir de la première (environ 10  $\mu$ L). Incuber à 37 °C sous agitation pendant 1 h.

Ajouter à chaque puits 25  $\mu$ L de milieu 2xYT-GA contenant  $10^9$  cfu de phage auxiliaire. Incuber 30 min à 37 °C sans agiter suivi d'une heure avec agitation.

Centrifuger la plaque 96 puits à 1800 x g pendant 10 min.

Reprendre les culots de bactéries infectées avec 200  $\mu$ L de milieu 2xYT-AK par puits et incuber toute la nuit à 30 °C sous agitation.

Centrifuger la plaque 96 puits à 1800 x g pendant 10 min et utiliser les surnageants contenant les phages pour des expériences d'ELISA sandwich.



**Note 3 :**

Les anticorps secondaires anti-IgG de souris (BioRad) et anti-IgG (BioRad) de lapin couplés à l'HRP ont été utilisés à la dilution 1/10000.

L'anticorps secondaire anti-M13 couplé à l'HRP (Amersham) a été utilisé à la dilution de 1/5000.

L'anticorps secondaire anti-c-Myc couplé à l'HRP (Novus Biologicals) a été utilisé à la dilution de 1/5000.

**II.5.2. ELISA compétitif**

scFv F7-NP3 :  $\epsilon_{280} = 84855$ , PM = 51939,5

scFv D10-NP3 :  $\epsilon_{280} = 84855$ , PM = 51769,3

scFv A5-NP3 :  $\epsilon_{280} = 84855$ , PM = 51897,4

scFv E3-NP3 :  $\epsilon_{280} = 84855$ , PM = 51960,5

Cette technique nécessite l'usage d'une pipette 8 canaux afin de transférer puits par puits et dans le même temps des mélanges antigène/anticorps depuis une plaque 96 puits réactionnelle vers une plaque 96 puits fonctionnalisée au glutathion.

Linéarité de la gamme de scFv

Incuber 100  $\mu$ L d'antigène (GST-RhoA<sub>Q63L</sub> ou GST-RhoB<sub>Q63L</sub>) dans les puits d'une plaque 96 puits surfacée au glutathion (**note 4**).

Bloquer le même nombre de puits d'une plaque maxisorp (NUNC) avec 200  $\mu$ L par puits de MPBS pendant au minimum 1 h à TA, puis éliminer le MPBS.

Réaliser dans cette même plaque la gamme de dilution du scFv dans du MPBS dans un volume minimum de 150  $\mu$ L par puits.

Laver 3 fois la plaque surfacée au glutathion avec du PBST 0,05%.

Transférer puits à puits 100  $\mu$ L de la gamme de scFv dans la plaque surfacée au glutathion.

Une fois le temps d'incubation écoulé, éliminer le contenu des puits et laver 3 fois au PBST 0,05%.

Incuber 100  $\mu$ L d'anticorps anti-cMyc-HRP dilué au 1/3000 dans du MPBS pendant 30 min à TA.

Laver 3 fois au PBST 0,05%.

Révéler la présence de phages par l'ajout de 100 µL de TMB et incuber à TA jusqu'à obtention d'une coloration bleue.

Arrêter la réaction par l'ajout de 50 µL d'une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N et lire la DO à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque.

#### Détermination de la fraction liée

Incuber 100 µL d'antigène (GST-RhoA<sub>Q63L</sub> ou GST-RhoB<sub>Q63L</sub>) dans les puits de 2 plaques 96 puits surfacées au glutathion (**note 4**).

Bloquer le même nombre de puits de 2 plaques maxisorp avec 200 µL par puits de MPBS pendant au minimum 1 h à TA, puis éliminer le MPBS (figure 61).

Réaliser dans la plaque n°1 maxisorp la gamme de dilution du scFv dans du MPBS dans un volume minimum de 150 µL par puits en 3 exemplaires.

Laver 3 fois la plaque n°2 glutathion avec du PBST 0,05%.

Transférer puits à puits 100 µL de la gamme de scFv dans la plaque surfacée au glutathion.

Incuber 10 min et transférer le contenu des puits dans la plaque n°3 maxisorp. Rassembler 3 rangées de puits en 2 rangées de telle sorte qu'il y ait un volume supérieur à 100 µL dans chaque puits (ceci afin de compenser les pertes de liquide lors des transferts).

Laver 3 fois au PBST 0,05% la plaque n°2 et incuber 100 µL d'anticorps anti-cMyc-HRP dilué au 1/3000 dans du MPBS pendant 30 min à TA.

Pendant cette incubation, transférer 100 µL de chaque puits de la plaque n°3 dans la plaque n°4 et incuber 10 min à TA.

Laver 3 fois au PBST 0,05% la plaque n°4 et incuber 100 µL d'anticorps anti-cMyc-HRP dilué au 1/3000 dans du MPBS pendant 30 min à TA.

Pendant cette incubation, laver la plaque n°2 3 fois au PBST 0,05% et révéler la présence de scFv par l'ajout de 100 µL de TMB et incuber à TA jusqu'à obtention d'une coloration bleue.

Arrêter les réactions par l'ajout de 50 µL d'une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N.

Opérer de même pour la plaque n°4 et veiller à ce que le temps d'incubation du TMB soit identique pour les 2 plaques.

Lire la DO à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque.

#### Détermination du temps d'équilibre

Opérer selon « Linéarité de la gamme de scFv » § II.5.2. à ceci près :

Réaliser dans la plaque maxisorp le mélange du scFv et de 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> en opérant une retro cinétique et incubé à TA (23-25°C) (**note 5**). Transférer tous les puits dans la plaque glutathion au temps 0.

Incuber 10 min à TA (23-25°C) et reprendre au pas 6 du § **II.5.2.**

Mesure de la constante de dissociation à l'équilibre

Incuber 100 µL d'antigène (GST-RhoA<sub>Q63L</sub> ou GST-RhoB<sub>Q63L</sub>) dans les puits d'une plaque 96 puits surfacée au glutathion (**note 4**).

Bloquer le même nombre de puits d'une plaque maxisorp avec 200 µL par puits de MPBS pendant au minimum 1 h à TA, puis éliminer le MPBS.

Réaliser dans la plaque maxisorp le mélange du scFv et de la gamme de concentration de 6xHis-RhoA<sub>Q63L</sub> ou 6xHis-RhoB<sub>Q63L</sub> et incubé à 30 min à TA (**note 5**).

Laver 3 fois la plaque surfacée au glutathion avec du PBST 0,05%.

Transférer puits à puits 100 µL dans la plaque surfacée au glutathion.

Incuber 10 min à TA, éliminer le contenu des puits et laver 3 fois au PBST 0,05%.

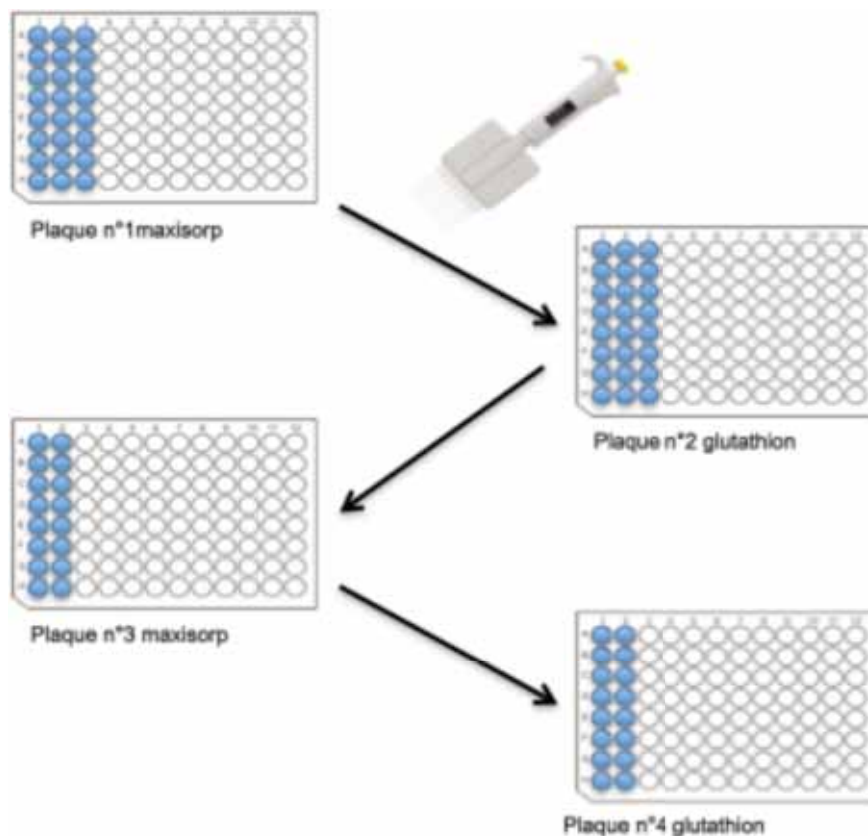
Incuber 100 µL d'anticorps anti-cMyc-HRP dilué au 1/3000 dans du MPBS pendant 30 min à TA.

Laver 3 fois au PBST 0,05%.

Révéler la présence de scFv par l'ajout de 100 µL de TMB et incubé à TA jusqu'à obtention d'une coloration bleue.

Arrêter la réaction par l'ajout de 50 µL d'une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N et lire la DO à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque.

Calculer la constante de dissociation à l'équilibre par régression non linéaire à l'aide du logiciel Prism 4 (GraphPad Software).



**Figure 61:** illustration de la réalisation de la mesure du temps d'équilibre.

**Note 4 :**

Les protéines Rho étiquetées à la GST ont été purifiées comme décrit en § **II.3.1.** et diluées dans du tampon E. Nous avons travaillé en condition saturante avec 55 ng de protéine par puits et une incubation de 2 h à température ambiante.

**Note 5 :**

Chaque réactant est apporté dans un volume de 75  $\mu$ L à la concentration double de celle voulue puisqu'il y aura dilution au  $\frac{1}{2}$  avec l'autre réactant. Toutes les dilutions sont réalisées dans du MPBS.

Purification des scFv

Les scFv sont purifiés à partir d'un extrait périplasmique préparé selon la méthode décrite par Dübel (Dübel et al., 1995).

**II.6. Méthode IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography)**

(1) Inoculer 10 mL de LB-GA à partir d'un stock glycérol, conservé à -80 °C, de bactéries DH5 $\alpha$  pHEN scFv.

Incuber sur la nuit à 37 °C sous agitation.

Ensemencer 600 mL de milieu LB-GA avec 6 mL de cette pré-culture.

A DO<sub>600 nm</sub>  $\approx$  0,8, centrifuger à 3300 x g pendant 10 min à 20°C.

Reprendre le culot dans 600 mL de LB-A additionné d'IPTG 1 mM final.

(2) Incuber à 25°C pendant 16h.

Centrifuger à 6200 x g pendant 10 min à 4°C.

Reprendre le culot dans 40 ml de tampon TSE froid.

Incuber 20 à 30 min dans la glace.

Centrifuger à 6200 x g pendant 10 min à 4 °C: le surnageant est appelé l'extrait périplasmique.

Sonifier 2 x 10s pour disloquer les filaments de chromosome bactérien.

Centrifuger à 12500 x g pendant 60 min à 4 °C.

Ramener la concentration de NaCl à 250 mM, de MgCl<sub>2</sub> à 5 mM et d'imidazole à 10 mM.

Rajouter 1 mL de billes Ni-NTA préalablement lavées avec du Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

Incuber 1h à 4°C sous agitation.

Verser dans 1 colonne filtre et laisser couler.

Laver par 20 mL de tampon G.

Eluer en ajoutant 2,5 mL de tampon H et en incubant pendant 15 min à 4 °C sous agitation.

Echanger le tampon sur 1 colonne PD10 contre 3,5 mL de tampon I.

Ajuster l'éluat à 10 % de glycérol et conserver à -80 °C.

Méthode sur billes de chitine et préparation des billes pour immuno-précipitation

Opérer comme décrit du pas (1) à (2).

Centrifuger à 6200 x g pendant 10 min à 4°C.

(3) Récupérer le surnageant et le centrifuger à 15000 x g pendant 30 min.

Pendant ce temps, reprendre le culot de bactéries dans 40 ml de tampon TSE froid.

Incuber 20 à 30 min dans la glace.

Centrifuger à 6200 x g pendant 10 min à 4 °C: le surnageant est appelé l'extrait périplasmique.

Rassembler le surnageant de (3) et l'extrait périplasmique et sonifier 2 x 10s afin de disloquer les filaments de chromosomes bactériens présents.

Centrifuger à 15000 x g pendant 2 h à 4 °C.

Déposer 1 mL de billes de chitine-sépharose sur une colonne filtre de capacité 20 mL (Biorad) et les laver avec 20 mL de tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0.

Récupérer le surnageant de centrifugation dans un erlenmeyer et faire passer le surnageant sur les billes de chitine-sépharose pendant la nuit à 4°C grâce à une pompe péristaltique fonctionnant en circuit fermé.

Laver les billes 3 fois au PBST 0,1% suivis de 3 lavages au PBS.

A ce stade, il est possible de conserver les billes recouvertes de scFv à 4 °C pour faire des expériences d'immuno-précipitation.

Il est également possible d'éluer les scFv par l'action de la thrombine qui va cliver le lien peptidique reliant l'étiquette CBD et le scFv, en opérant comme suit :

Reprendre les billes dans 2 mL de PBS.

Ajouter 100 unités de thrombine et incuber toute la nuit à TA sous agitation.

Récupérer le surnageant contenant les scFv et ajouter 10 µL de billes fonctionnalisées au p-aminobenzimidine pour éliminer la thrombine.

Incuber 1 h à 4 °C et récupérer le surnageant contenant les scFv purifiés.

Ajuster à 10 % de glycérol et conserver à -80 °C.

#### Concentration des scFv purifiés

Les scFv ont été concentrés après purification sur colonne d'échange d'ions. Nous avons utilisé le kit ProteoSpin CBED (Norgen) selon les spécifications du fournisseur. Les points isoélectriques théoriques (pI) ont été obtenus à partir des séquences primaires des scFv que nous avons fourni au logiciel ExPASy ProtParam tool.

### **II.7. Immuno-précipitation des GTPases Rho recombinantes procaryotes**

Préparer des extraits bactériens exprimant des GTPases Rho recombinantes et les charger avec des nucléotides comme décrit en (1).

Rajouter des billes chitines tapissées de scFv (3).

Incuber 1h à TA ou 4 h à 4 °C sous agitation.

Laver les billes 3 fois au PBST 0,1%, puis 3 fois au PBS.

Conserver les billes sèches à -20 °C et les analyser par immuno-empreinte.

Mise en évidence d'une interaction spécifique des GTPases Rho recombinantes eucaryotes et les scFv

### *II.7.1. Préparation des extraits cellulaires et interactions*

1°) culture des cellules LB1319-MEL:

Ensemencer des boîtes de pétri de 145 cm<sup>2</sup> avec 2,5.10<sup>6</sup> cellules dans 20 ml de milieu DMEM/10% FCS par boîte.

Attendre que la confluence atteigne 80%.

2°) CBD pull-down des Rho endogènes :

Éliminer le milieu des boîtes et gratter dans 10 ml de PBS

Centrifuger 1000g, 5 min, 4°C

Reprendre les culots dans le vol adéquat de tampon de lyse.

Sonification 5 x 1s

Centrifuger 16000g/15 min/4°C

En parallèle, répartir l'équivalent d'au moins 50µl de billes chitine/sépharose-scFv-CBD et laver 2 fois au tampon de lyse (centrifuger <500xg, 15 s)

*Remarque : aspirer les surnageants avec une aiguille fine*

Récupérer le surnageant (SNG) des cellules

Rassembler et/ou séparer les SNG en fonction des traitements (**note 6**).

Mélanger les extraits avec les quantités de billes sépharose-chitine-scFv nécessaires.

Incuber à 4 °C pendant 4 h

Laver 3x500µl de tampon de lavage

Bien éliminer le tampon après spin

Révéler les protéines retenues sur les billes par immuno-électrophorèse.

#### **Note 6 :**

Procéder comme suit pour charger les GTPases en nucléotides :

Ajouter du GDP (Sigma-Aldrich) 1mM final ou GTPγS (Sigma-Aldrich) 100µM final et de l'EDTA 10mM final.

Incuber 30 min à 30°C.

Arrêter la réaction en ajoutant du MgCl<sub>2</sub> 60mM final.

Prélever 50 µl d'extrait pour vérifier la surexpression des GTPases étiquetées au CBD.

### *II.7.2. Immuno-empreinte*

L'électrophorèse des protéines est réalisée sur gel de polyacrylamide de 12,5%.

Les protéines sont ensuite électro-transférées sur membrane de nitrocellulose 0,45 µm.

Les immuno-empreintes sont réalisées avec les anticorps suivants :

L'anticorps monoclonal anti-RhoA 26C4 (SantaCruz) a été utilisé à la dilution 1/1000.

L'anticorps polyclonal anti-RhoB 119 (SantaCruz) a été utilisé à la dilution 1/2500.

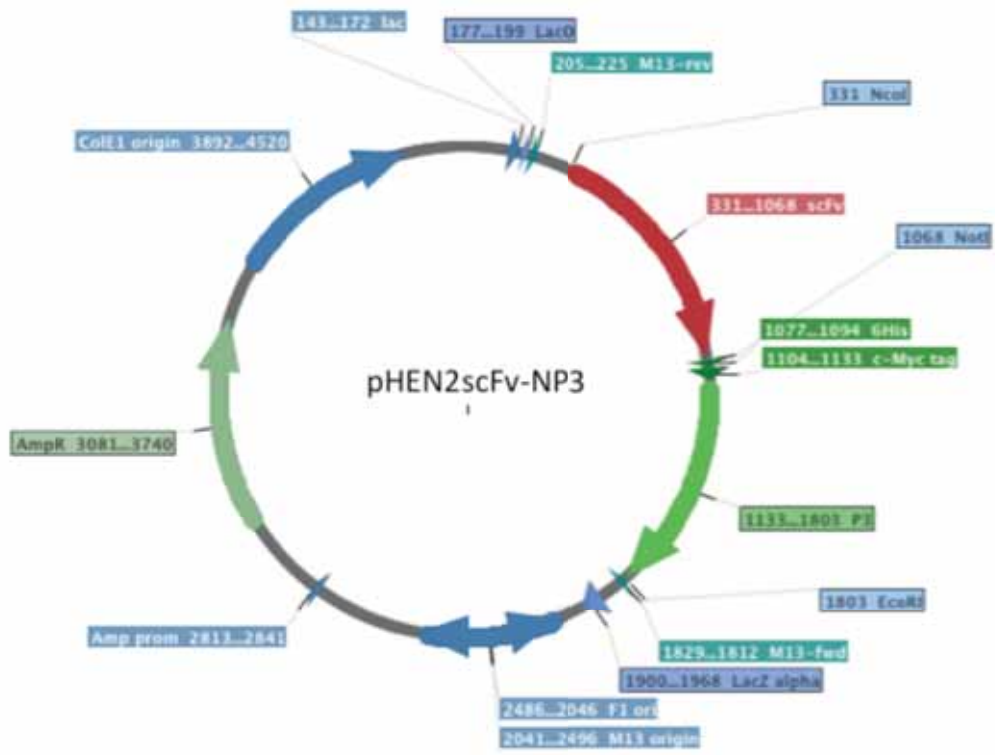
L'anticorps monoclonal anti-CBD (New England Biolabs) a été utilisé à la dilution 1/1000.

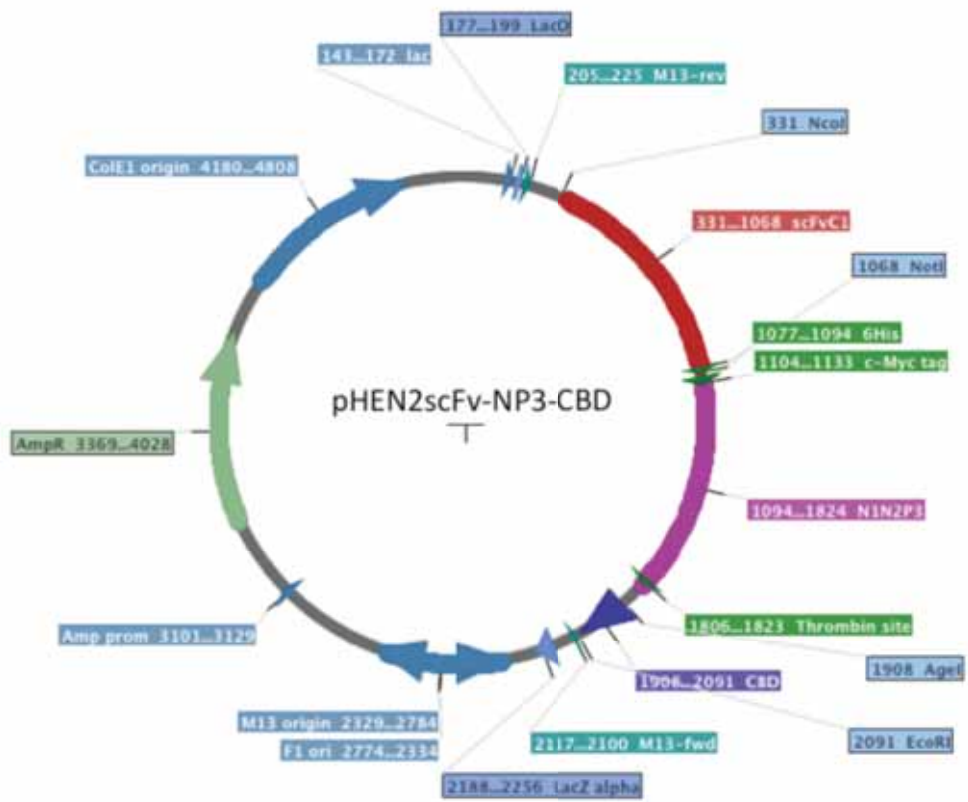
Les anticorps secondaires anti-IgG de souris (BioRad) et anti-IgG (BioRad) de lapin couplés à l'HRP ont été utilisés à la dilution 1/10000.

L'anticorps secondaire anti-c-Myc couplé à l'HRP (Novus Biologicals) a été utilisé à la dilution de 1/10000.











# BIBLIOGRAPHIE

- Adamson, P., Paterson, H.F., Hall, A., 1992. Intracellular localization of the P21rho proteins. *J. Cell Biol.* 119, 617–627.
- Ader, I., Muller, C., Bonnet, J., Favre, G., Cohen-Jonathan, E., Salles, B., Toulas, C., 2002. The radioprotective effect of the 24 kDa FGF-2 isoform in HeLa cells is related to an increased expression and activity of the DNA dependent protein kinase (DNA-PK) catalytic subunit. *Oncogene* 21, 6471–6479.
- Aghajanian, A., Wittchen, E.S., Campbell, S.L., Burridge, K., 2009. Direct Activation of RhoA by Reactive Oxygen Species Requires a Redox-Sensitive Motif. *PLoS ONE* 4, e8045.
- Allal, C., Favre, G., Couderc, B., Salicio, S., Sixou, S., Hamilton, A.D., Sebti, S.M., Lajoie-Mazenc, I., Pradines, A., 2000. RhoA prenylation is required for promotion of cell growth and transformation and cytoskeleton organization but not for induction of serum response element transcription. *J. Biol. Chem.* 275, 31001–31008.
- Antoine-Bertrand, J., Villemure, J.-F., Lamarche-Vane, N., 2011. Implication of rho GTPases in neurodegenerative diseases. *Curr Drug Targets* 12, 1202–1215.
- Arakawa, Y., Bito, H., Furuyashiki, T., Tsuji, T., Takemoto-Kimura, S., Kimura, K., Nozaki, K., Hashimoto, N., Narumiya, S., 2003. Control of axon elongation via an SDF-1alpha/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. *J. Cell Biol.* 161, 381–391.
- Araki, M., Shima, F., Yoshikawa, Y., Muraoka, S., Ijiri, Y., Nagahara, Y., Shirono, T., Kataoka, T., Tamura, A., 2011. Solution Structure of the State 1 Conformer of GTP-bound H-Ras Protein and Distinct Dynamic Properties between the State 1 and State 2 Conformers. *Journal of Biological Chemistry* 286, 39644–39653.
- Arthur, W.T., Ellerbroek, S.M., Der, C.J., Burridge, K., Wennerberg, K., 2002. XPLN, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and RhoB, but not RhoC. *J. Biol. Chem.* 277, 42964–42972.
- Barderas, R., Desmet, J., Timmerman, P., Meloen, R., Casal, J.I., 2008. Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 9029–9034.
- Baron, R., Fourcade, E., Lajoie-Mazenc, I., Allal, C., Couderc, B., Barbaras, R., Favre, G., Faye, J.C., Pradines, A., 2000. RhoB prenylation is driven by the three carboxyl-terminal amino acids of the protein: evidenced in vivo by an anti-farnesyl cysteine antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 11626–11631.
- Benink, H.A., Bement, W.M., 2005. Concentric zones of active RhoA and Cdc42 around single cell wounds. *J. Cell Biol.* 168, 429–439.
- Bettsworth, F., Monnet, C., Watelet, B., Battail-Poirot, N., Gilquin, B., Jolivet, M., Menez, A., Arnaud, M., Ducancel, F., 2001. Functional characterization of two anti-estradiol antibodies as deduced from modelling and site-directed mutagenesis experiments. *Journal of Molecular Recognition* 14, 99–109.
- Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S., Whitlow, M., 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423–426.
- Bishop, A.L., Hall, A., 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348 Pt 2, 241–255.
- Blomquist, A., Schwörer, G., Schablowski, H., Psoma, A., Lehnen, M., Jakobs, K.H., Rügenapp, U., 2000. Identification and characterization of a novel Rho-specific guanine nucleotide exchange factor. *Biochem. J.* 352 Pt 2, 319–325.
- Boureaux, A., Vignal, E., Faure, S., Fort, P., 2007. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 24, 203–216.

- Bousquet, E., Mazières, J., Privat, M., Rizzati, V., Casanova, A., Ledoux, A., Mery, E., Couderc, B., Favre, G., Pradines, A., 2009. Loss of RhoB expression promotes migration and invasion of human bronchial cells via activation of AKT1. *Cancer Res.* 69, 6092–6099.
- Brunet, N., Morin, A., Olofsson, B., 2002. RhoGDI-3 regulates RhoG and targets this protein to the Golgi complex through its unique N-terminal domain. *Traffic* 3, 342–357.
- Bulyha, I., Hot, E., Huntley, S., Sogaard-Andersen, L., 2011. GTPases in bacterial cell polarity and signalling. *Current Opinion in Microbiology* 14, 726–733.
- Bustelo, X.R., Sauzeau, V., Berenjano, I.M., 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays* 29, 356–370.
- Canguilhem, B., Pradines, A., Baudouin, C., Boby, C., Lajoie-Mazenc, I., Charveron, M., Favre, G., 2005. RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 43257–43263.
- Carney, W. P., Petit, D., Hamer, P., Pullano, G. T., 1988. Monoclonal antibodies for detecting oncogenic Ras proteins in cancer cells. *Clinical chemistry* 1696–99.
- Caussinus, E., Kanca, O., Affolter, M., 2011. Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 117–121.
- Chaisemartin, L., Chinestra, P., Favre, G., Blonski, C., Faye, J.C., 2009. Synthesis and application of a N-1' fluorescent biotinyl derivative inducing the specific carboxy-terminal dual labeling of a novel RhoB-selective scFv. *Bioconjug. Chem.* 20, 847–855.
- Chen, Z., Medina, F., Liu, M. -y., Thomas, C., Sprang, S.R., Sternweis, P.C., 2010. Activated RhoA Binds to the Pleckstrin Homology (PH) Domain of PDZ-RhoGEF, a Potential Site for Autoregulation. *Journal of Biological Chemistry* 285, 21070–21081.
- Chinestra, P., Lajoie-Mazenc, I., Faye, J.-C., Favre, G., 2012. Use of phage display for the identification of molecular sensors specific for activated Rho. *Methods Mol. Biol.* 827, 283–303.
- Chong, S., Shao, Y., Paulus, H., Benner, J., Perler, F.B., Xu, M.Q., 1996. Protein splicing involving the *Saccharomyces cerevisiae* VMA intein. The steps in the splicing pathway, side reactions leading to protein cleavage, and establishment of an in vitro splicing system. *J. Biol. Chem.* 271, 22159–22168.
- Chuang, S.E., Chen, A.L., Chao, C.C., 1995. Growth of *E. coli* at low temperature dramatically increases the transformation frequency by electroporation. *Nucleic Acids Res.* 23, 1641.
- Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Winter, G., 1991. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, 624–628.
- Clark, L.A., Boriack-Sjodin, P.A., Eldredge, J., Fitch, C., Friedman, B., Hanf, K.J.M., Jarpe, M., Liparoto, S.F., Li, Y., Lugovskoy, A., Miller, S., Rushe, M., Sherman, W., Simon, K., Van Vlijmen, H., 2006. Affinity enhancement of an in vivo matured therapeutic antibody using structure-based computational design. *Protein Sci.* 15, 949–960.
- Closson, V., 1996. RhoGDI-3 Is a New GDP Dissociation Inhibitor (GDI). IDENTIFICATION OF A NON-CYTOSOLIC GDI PROTEIN INTERACTING WITH THE SMALL GTP-BINDING PROTEINS RhoB AND RhoG. *Journal of Biological Chemistry* 271, 30366–30374.
- Cooper, G.M., 1982. Cellular transforming genes. *Science* 217, 801–806.
- Coulon, S., Pellequer, J.-L., Blachère, T., Chartier, M., Mappus, E., Chen, S.W., Cuilleron, C.Y., Baty, D., 2002. Functional characterization of an anti-estradiol antibody by

- site-directed mutagenesis and molecular modelling: modulation of binding properties and prominent role of the VL domain in estradiol recognition. *Journal of Molecular Recognition* 15, 6–18.
- Cui, J., Shao, F., 2011. Biochemistry and cell signaling taught by bacterial effectors. *Trends in Biochemical Sciences* 36, 532–540.
- Daugherty, P.S., Chen, G., Iverson, B.L., Georgiou, G., 2000. Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 2029–2034.
- De Toledo, M., Coulon, V., Schmidt, S., Fort, P., Blangy, A., 2001. The gene for a new brain specific RhoA exchange factor maps to the highly unstable chromosomal region 1p36.2-1p36.3. *Oncogene* 20, 7307–7317.
- Delmas, C., Heliez, C., Cohen-Jonathan, E., End, D., Bonnet, J., Favre, G., Toulas, C., 2002. Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation. *Int. J. Cancer* 100, 43–48.
- Derewenda, U., Oleksy, A., Stevenson, A.S., Korczynska, J., Dauter, Z., Somlyo, A.P., Otlewski, J., Somlyo, A.V., Derewenda, Z.S., 2004. The crystal structure of RhoA in complex with the DH/PH fragment of PDZRhoGEF, an activator of the Ca(2+) sensitization pathway in smooth muscle. *Structure* 12, 1955–1965.
- Dias, S.M.G., Cerione, R.A., 2007. X-ray crystal structures reveal two activated states for RhoC. *Biochemistry* 46, 6547–6558.
- Dimitrov, A., Quesnoit, M., Moutel, S., Cantaloube, I., Poüs, C., Perez, F., 2008. Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science* 322, 1353–1356.
- Dong, L., Chen, S., Bartsch, U., Schachner, M., 2003. Generation of affinity matured scFv antibodies against mouse neural cell adhesion molecule L1 by phage display. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 60–70.
- Dovas, A., Couchman, J.R., 2005. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochemical Journal* 390, 1.
- Dransart, E., Morin, A., Cherfils, J., Olofsson, B., 2005. RhoGDI-3, a promising system to investigate the regulatory function of rhoGDIs: uncoupling of inhibitory and shuttling functions of rhoGDIs. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 623–626.
- Dübel, S., Breitling, F., Kontermann, R., Schmidt, T., Skerra, A., Little, M., 1995. Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv). *J. Immunol. Methods* 178, 201–209.
- Dvorsky, R., 2003. Structural Insights into the Interaction of ROCKI with the Switch Regions of RhoA. *Journal of Biological Chemistry* 279, 7098–7104.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494–498.
- Etienne-Manneville, S., Hall, A., 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629–635.
- Filippi, M.-D., Harris, C.E., Meller, J., Gu, Y., Zheng, Y., Williams, D.A., 2004. Localization of Rac2 via the C terminus and aspartic acid 150 specifies superoxide generation, actin polarity and chemotaxis in neutrophils. *Nat. Immunol.* 5, 744–751.
- Friguet, B., Chaffotte, A.F., Djavadi-Ohanian, L., Goldberg, M.E., 1985. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* 77, 305–319.
- Fritz, G., Kaina, B., 2006. Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 6, 1–14.
- Furth, M.E., Davis, L.J., Fleurdelys, B., Scolnick, E.M., 1982. Monoclonal antibodies to the p21 products of the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus and of the



- cellular ras gene family. *J. Virol.* 43, 294–304.
- Gampel, A., Mellor, H., 2002. Small interfering RNAs as a tool to assign Rho GTPase exchange-factor function in vivo. *Biochem. J.* 366, 393–398.
- Gampel, A., Parker, P.J., Mellor, H., 1999. Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Curr. Biol.* 9, 955–958.
- Gao, J., Sidhu, S.S., Wells, J.A., 2009. Two-state selection of conformation-specific antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 3071–3076.
- García-Mata, R., Boulter, E., Burridge, K., 2011. The “invisible hand”: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, 493–504.
- García-Mata, R., Burridge, K., 2007. Catching a GEF by its tail. *Trends Cell Biol.* 17, 36–43.
- Glaven, J.A., Whitehead, I.P., Nomanbhoy, T., Kay, R., Cerione, R.A., 1996. Lfc and Lsc oncoproteins represent two new guanine nucleotide exchange factors for the Rho GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* 271, 27374–27381.
- Goffinet, M., Chinestra, P., Lajoie-Mazenc, I., Medale-Giamarchi, C., Favre, G., Faye, J.-C., 2008. Identification of a GTP-bound Rho specific scFv molecular sensor by phage display selection. *BMC Biotechnol.* 8, 34.
- Gómez del Pulgar, T., Benitah, S.A., Valerón, P.F., Espina, C., Lacal, J.C., 2005. Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *Bioessays* 27, 602–613.
- Goulimari, P., Kitzing, T.M., Knieling, H., Brandt, D.T., Offermanns, S., Grosse, R., 2005. Galpha12/13 is essential for directed cell migration and localized Rho-Dial1 function. *J. Biol. Chem.* 280, 42242–42251.
- Gram, H., Marconi, L.A., Barbas, C.F., 3rd, Collet, T.A., Lerner, R.A., Kang, A.S., 1992. In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3576–3580.
- Griffiths, A.D., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Crosby, W.L., Kontermann, R.E., Jones, P.T., Low, N.M., Allison, T.J., 1994. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* 13, 3245–3260.
- Grizot, S., Fauré, J., Fieschi, F., Vignais, P.V., Dagher, M.-C., Pebay-Peyroula, E., 2001. Crystal Structure of the Rac1–RhoGDI Complex Involved in NADPH Oxidase Activation †, ‡. *Biochemistry* 40, 10007–10013.
- Guglielmi, L., Denis, V., Vezzio-Vie, N., Bec, N., Dariavach, P., Larroque, C., Martineau, P., 2011. Selection for intrabody solubility in mammalian cells using GFP fusions. *Protein Engineering Design and Selection* 24, 873–881.
- Hamel, B., Monaghan-Benson, E., Rojas, R.J., Temple, B.R.S., Marston, D.J., Burridge, K., Sondek, J., 2011. SmgGDS Is a Guanine Nucleotide Exchange Factor That Specifically Activates RhoA and RhoC. *Journal of Biological Chemistry* 286, 12141–12148.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hansen, M.D., Nelson, W.J., 2001. Serum-activated assembly and membrane translocation of an endogenous Rac1:effector complex. *Curr. Biol.* 11, 356–360.
- Haque, A., Andersen, J.N., Salmeen, A., Barford, D., Tonks, N.K., 2011. Conformation-Sensing Antibodies Stabilize the Oxidized Form of PTP1B and Inhibit Its Phosphatase Activity. *Cell* 147, 185–198.
- Hart, M.J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S.A., Evans, T., Cerione, R.A., and Zheng, Y. 1994. Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *J. Biol. Chem.* 269:

- Haskell, M.D., Nickles, A.L., Agati, J.M., Su, L., Dukes, B.D., Parsons, S.J., 2001. Phosphorylation of p190 on Tyr1105 by c-Src is necessary but not sufficient for EGF-induced actin disassembly in C3H10T1/2 fibroblasts. *J. Cell. Sci.* 114, 1699–1708.
- Hawkins, R.E., Russell, S.J., Baier, M., Winter, G., 1993. The contribution of contact and non-contact residues of antibody in the affinity of binding to antigen. The interaction of mutant D1.3 antibodies with lysozyme. *J. Mol. Biol.* 234, 958–964.
- Hawkins, R.E., Russell, S.J., Winter, G., 1992. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J. Mol. Biol.* 226, 889–896.
- Healy, K.D., Hodgson, L., Kim, T.-Y., Shutes, A., Maddileti, S., Juliano, R.L., Hahn, K.M., Harden, T.K., Bang, Y.-J., Der, C.J., 2008. DLC-1 suppresses non-small cell lung cancer growth and invasion by RhoGAP-dependent and independent mechanisms. *Molecular Carcinogenesis* 47, 326–337.
- Heasman, S.J., Ridley, A.J., 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 690–701.
- Heinrich, L., Tissot, N., Hartmann, D.J., Cohen, R., 2010. Comparison of the results obtained by ELISA and surface plasmon resonance for the determination of antibody affinity. *Journal of Immunological Methods* 352, 13–22.
- Hirata, R., Ohsumk, Y., Nakano, A., Kawasaki, H., Suzuki, K., Anraku, Y., 1990. Molecular structure of a gene, VMA1, encoding the catalytic subunit of H(+)-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 265, 6726–6733.
- Hoffman, G.R., Nassar, N., Cerione, R.A., 2000. Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell* 100, 345–356.
- Hoffmann, C., Pop, M., Leemhuis, J., Schirmer, J., Aktories, K., Schmidt, G., 2004. The *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxic necrotizing factor (CNFY) selectively activates RhoA. *J. Biol. Chem.* 279, 16026–16032.
- Hong, W.W.L., Yen, Y.-H., Wu, S.-C., 2007. Enhanced antibody affinity to Japanese encephalitis virus E protein by phage display. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 124–128.
- Hoogenboom, H.R., 1997. Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol.* 15, 62–70.
- Hoogenboom, H.R., 2005. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnology* 23, 1105–1116.
- Horn, I.R., Wittinghofer, A., de Bruïne, A.P., Hoogenboom, H.R., 1999. Selection of phage-displayed fab antibodies on the active conformation of ras yields a high affinity conformation-specific antibody preventing the binding of c-Raf kinase to Ras. *FEBS Lett.* 463, 115–120.
- Ihara, K., Muraguchi, S., Kato, M., Shimizu, T., Shirakawa, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Hakoshima, T., 1998. Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J. Biol. Chem.* 273, 9656–9666.
- Inard, C., Fourcade, E., Baron, R., Tovar, D., Chaisemartin, L., Blonski, C., Faye, J.-C., 2006. Syntheses of functionalized biotin N-1' derivatives: new tools for the control of gene expression with small molecules. *Bioconjug. Chem.* 17, 1030–1035.
- Jaffe, A.B., Hall, A., 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 247–269.
- Janeway, C. A., Travers, P., 1997. La réponse immune humorale., in: *Immunobiologie*. De Boeck & Larcier s.a., pp. 309–24.

- Jensen, K.B., Larsen, M., Pedersen, J.S., Christensen, P.A., Alvarez-Vallina, L., Goletz, S., Clark, B.F.C., Kristensen, P., 2002. Functional improvement of antibody fragments using a novel phage coat protein III fusion system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 566–573.
- John, J., Schlichting, I., Schiltz, E., Rösch, P., Wittinghofer, A., 1989. C-terminal truncation of p21H preserves crucial kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* 264, 13086–13092.
- Johndrow, J.E., Magie, C.R., Parkhurst, S.M., 2004. Rho GTPase function in flies: insights from a developmental and organismal perspective. *Biochemistry and Cell Biology* 82, 643–657.
- Juárez-González, V.R., Riaño-Umbarila, L., Quintero-Hernández, V., Olamendi-Portugal, T., Ortiz-León, M., Ortíz, E., Possani, L.D., Becerril, B., 2005. Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: a strategy to recover the neutralization properties of the scFv version of BCF2 a neutralizing monoclonal antibody specific to scorpion toxin Cn2. *J. Mol. Biol.* 346, 1287–1297.
- Kandpal, R.P., 2006. Rho GTPase activating proteins in cancer phenotypes. *Curr. Protein Pept. Sci.* 7, 355–365.
- Kane, P.M., Yamashiro, C.T., Wolczyk, D.F., Neff, N., Goebel, M., Stevens, T.H., 1990. Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase. *Science* 250, 651–657.
- Kay, B.K., Winter, J., Mc Cafferty, J., 1996. *Phage Display of Peptides and Proteins. A laboratory Manual.*, Academic Press. ed. San Diego, California. U.S.A.
- Kim, T.Y., Vigil, D., Der, C.J., Juliano, R.L., 2009. Role of DLC-1, a tumor suppressor protein with RhoGAP activity, in regulation of the cytoskeleton and cell motility. *Cancer Metastasis Rev.* 28, 77–83.
- Klein, R.M., Higgins, P.J., 2011. A switch in RND3-RHOA signaling is critical for melanoma cell invasion following mutant-BRAF inhibition. *Mol. Cancer* 10, 114.
- Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497.
- Kurokawa, K., Matsuda, M., 2005. Localized RhoA activation as a requirement for the induction of membrane ruffling. *Mol. Biol. Cell* 16, 4294–4303.
- Ladwein, M., Rottner, K., 2008. On the Rho'd: the regulation of membrane protrusions by Rho-GTPases. *FEBS Lett.* 582, 2066–2074.
- Lajoie-Mazenc, I., Tovar, D., Penary, M., Lortal, B., Allart, S., Favard, C., Brihoum, M., Pradines, A., Favre, G., 2008. MAP1A light chain-2 interacts with GTP-RhoB to control epidermal growth factor (EGF)-dependent EGF receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 4155–4164.
- Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M., Bertoglio, J., 1996. Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.* 15, 510–519.
- Leemhuis, H., Stein, V., Griffiths, A., Hollfelder, F., 2005. New genotype–phenotype linkages for directed evolution of functional proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 15, 472–478.
- Lerm, M., Schmidt, G., Aktories, K., 2000. Bacterial protein toxins targeting rho GTPases. *FEMS Microbiol. Lett.* 188, 1–6.
- Levskaia, A., Weiner, O.D., Lim, W.A., Voigt, C.A., 2009. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature* 461, 997–1001.
- Li, R., 1997. Structural Determinants Required for the Interaction between Rho GTPase and the GTPase-activating Domain of p190. *Journal of Biological Chemistry* 272, 32830–32835.

- Lin, R., Cerione, R.A., Manor, D., 1999. Specific contributions of the small GTPases Rho, Rac, and Cdc42 to Dbl transformation. *J. Biol. Chem.* 274, 23633–23641.
- Liu, A.X., Rane, N., Liu, J.P., Prendergast, G.C., 2001. RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6906–6912.
- Liu, X.Q., 2000. Protein-splicing intein: Genetic mobility, origin, and evolution. *Annu. Rev. Genet.* 34, 61–76.
- Longenecker, K., Read, P., Derewenda, U., Dauter, Z., Liu, X., Garrard, S., Walker, L., Somlyo, A.V., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.P., Derewenda, Z.S., 1999. How RhoGDI binds Rho. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 55, 1503–1515.
- Longenecker, K., Read, P., Lin, S.-K., Somlyo, A.P., Nakamoto, R.K., Derewenda, Z.S., 2003. Structure of a constitutively activated RhoA mutant (Q63L) at 1.55 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59, 876–880.
- Lu, D., Shen, J., Vil, M.D., Zhang, H., Jimenez, X., Bohlen, P., Witte, L., Zhu, Z., 2003. Tailoring in vitro selection for a picomolar affinity human antibody directed against vascular endothelial growth factor receptor 2 for enhanced neutralizing activity. *J. Biol. Chem.* 278, 43496–43507.
- Madaule, P., Furuyashiki, T., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Morii, N., Narumiya, S., 1995. A novel partner for the GTP-bound forms of rho and rac. *FEBS Lett.* 377, 243–248.
- Maesaki, R., Ihara, K., Shimizu, T., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Hakoshima, T., 1999. The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1. *Mol. Cell* 4, 793–803.
- Mäkitie, L.T., Kanerva, K., Andersson, L.C., 2009. Ornithine decarboxylase regulates the activity and localization of rhoA via polyamination. *Experimental Cell Research* 315, 1008–1014.
- Martineau, P., 2010. Affinity Measurements by Competition ELISA, in: Kontermann, R., Dübel, S. (Eds.), *Antibody Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 657–665.
- Masuda, M., Betancourt, L., Matsuzawa, T., Kashimoto, T., Takao, T., Shimonishi, Y., Horiguchi, Y., 2000. Activation of rho through a cross-link with polyamines catalyzed by Bordetella dermonecrotizing toxin. *EMBO J.* 19, 521–530.
- Mazieres, J., Antonia, T., Daste, G., Muro-Cacho, C., Berchery, D., Tillement, V., Pradines, A., Sebti, S., Favre, G., 2004. Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin. Cancer Res.* 10, 2742–2750.
- Mazières, J., Tillement, V., Allal, C., Clanet, C., Bobin, L., Chen, Z., Sebti, S.M., Favre, G., Pradines, A., 2005. Geranylgeranylated, but not farnesylated, RhoB suppresses Ras transformation of NIH-3T3 cells. *Exp. Cell Res.* 304, 354–364.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., Chiswell, D.J., 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552–554.
- McGrath, J.P., Capon, D.J., Goeddel, D.V., Levinson, A.D., 1984. Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein. *Nature* 310, 644–649.
- Mellor, H., Flynn, P., Nobes, C.D., Hall, A., Parker, P.J., 1998. PRK1 is targeted to endosomes by the small GTPase, RhoB. *J. Biol. Chem.* 273, 4811–4814.
- Michaelson, D., Philips, M., 2006. The use of GFP to localize Rho GTPases in living cells. *Meth. Enzymol.* 406, 296–315.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M., Philips, M.R., 2001. Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable

- regions and RhoGDI binding. *J. Cell Biol.* 152, 111–126.
- Michaely, P.A., Mineo, C., Ying, Y.S., Anderson, R.G., 1999. Polarized distribution of endogenous Rac1 and RhoA at the cell surface. *J. Biol. Chem.* 274, 21430–21436.
- Michiels, F., Habets, G.G., Stam, J.C., van der Kammen, R.A., Collard, J.G., 1995. A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature* 375, 338–340.
- Milburn, M.V., Tong, L., deVos, A.M., Brünger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Kim, S.H., 1990. Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 247, 939–945.
- Milia, J., Teyssier, F., Dalenc, F., Ader, I., Delmas, C., Pradines, A., Lajoie-Mazenc, I., Baron, R., Bonnet, J., Cohen-Jonathan, E., Favre, G., Toulas, C., 2005. Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication. *Cell Death Differ.* 12, 492–501.
- Mira, J.P., Benard, V., Groffen, J., Sanders, L.C., Knaus, U.G., 2000. Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 185–189.
- Mircescu, H., Steuve, S., Savonet, V., Degraef, C., Mellor, H., Dumont, J.E., Maenhaut, C., Pirson, I., 2002. Identification and characterization of a novel activated RhoB binding protein containing a PDZ domain whose expression is specifically modulated in thyroid cells by cAMP. *Eur. J. Biochem.* 269, 6241–6249.
- Moissoglu, K., Slepchenko, B.M., Meller, N., Horwitz, A.F., Schwartz, M.A., 2006. In vivo dynamics of Rac-membrane interactions. *Mol. Biol. Cell* 17, 2770–2779.
- Moolenaar, W.H., van Meeteren, L.A., Giepmans, B.N.G., 2004. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays* 26, 870–881.
- Moon, S.Y., Zheng, Y., 2003. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol.* 13, 13–22.
- Nakamura, T., Kurokawa, K., Kiyokawa, E., Matsuda, M., 2006. Analysis of the spatiotemporal activation of rho GTPases using Raichu probes. *Meth. Enzymol.* 406, 315–332.
- Narumiya, S., Tanji, M., Ishizaki, T., 2009. Rho signaling, ROCK and mDial1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 28, 65–76.
- Nassar, N., Hoffman, G.R., Manor, D., Clardy, J.C., Cerione, R.A., 1998. Structures of Cdc42 bound to the active and catalytically compromised forms of Cdc42GAP. *Nat. Struct. Biol.* 5, 1047–1052.
- Nizak, C., Monier, S., del Nery, E., Moutel, S., Goud, B., Perez, F., 2003. Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors. *Science* 300, 984–987.
- Nobes, C.D., Hall, A., 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53–62.
- Olson, M.F., Pasteris, N.G., Gorski, J.L., and Hall, A. 1996. Faciogenital dysplasia protein (FGD1) and Vav, two related proteins required for normal embryonic development, are upstream regulators of Rho GTPases. *Curr. Biol.* 6: 1628–1633.
- Pan, J.Y., Wessling-Resnick, M., 1998. GEF-mediated GDP/GTP exchange by monomeric GTPases: a regulatory role for Mg<sup>2+</sup>? *Bioessays* 20, 516–521.
- Paterson, H.F., Self, A.J., Garrett, M.D., Just, I., Aktories, K., Hall, A., 1990. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J. Cell Biol.* 111, 1001–1007.
- Paulus, H., 2000. Protein splicing and related forms of protein autoprocessing. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 447–496.
- Pavoni, E., Flego, M., Dupuis, M.L., Barca, S., Petronzelli, F., Anastasi, A.M., D'Alessio, V.,

- Pelliccia, A., Vaccaro, P., Moneriù, G., Ascione, A., De Santis, R., Felici, F., Cianfriglia, M., Minenkova, O., 2006. Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein. *BMC Cancer* 6, 41.
- Pavoni, E., Moneriù, G., Cianfriglia, M., Minenkova, O., 2007. New display vector reduces biological bias for expression of antibodies in *E. coli*. *Gene* 391, 120–129.
- Pellegrin, S., Mellor, H., 2008. Rho GTPase Activation Assays, in: Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J., Yamada, K.M. (Eds.), *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Perler, F.B., 1998. Protein splicing of inteins and hedgehog autoproteolysis: structure, function, and evolution. *Cell* 92, 1–4.
- Persic, L., Horn, I.R., Rybak, S., Cattaneo, A., Hoogenboom, H.R., Bradbury, A., 1999. Single-chain variable fragments selected on the 57-76 p21Ras neutralising epitope from phage antibody libraries recognise the parental protein. *FEBS Lett.* 443, 112–116.
- Persson, H., Wallmark, H., Ljungars, A., Hallborn, J., Ohlin, M., 2008. In vitro evolution of an antibody fragment population to find high-affinity hapten binders. *Protein Eng. Des. Sel.* 21, 485–493.
- Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R.L., Hahn, K.M., 2006. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 440, 1069–1072.
- Qiu, R.G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F., Symons, M., 1995. An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* 374, 457–459.
- Qiu, R.G., Chen, J., McCormick, F., Symons, M., 1995. A role for Rho in Ras transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11781–11785.
- Rakonjac, J., Bennett, N.J., Spagnuolo, J., Gagic, D., Russel, M., 2011. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr Issues Mol Biol* 13, 51–76.
- Read, P.W., Liu, X., Longenecker, K., Dipierro, C.G., Walker, L.A., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P., Nakamoto, R.K., 2000. Human RhoA/RhoGDI complex expressed in yeast: GTP exchange is sufficient for translocation of RhoA to liposomes. *Protein Sci.* 9, 376–386.
- Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E., Barbacid, M., 1982. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300, 149–152.
- Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P., Narumiya, S., 1996. Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhotekin in the rho-binding domain. *J. Biol. Chem.* 271, 13556–13560.
- Ren, X.D., Kiosses, W.B., Schwartz, M.A., 1999. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* 18, 578–585.
- Ren, X.D., Schwartz, M.A., 2000. Determination of GTP loading on Rho. *Meth. Enzymol.* 325, 264–272.
- Ridley, A.J., Hall, A., 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389–399.
- Rizk, S.S., Paduch, M., Heithaus, J.H., Duguid, E.M., Sandstrom, A., Kossiakoff, A.A., 2011. Allosteric control of ligand-binding affinity using engineered conformation-specific effector proteins. *Nature Structural & Molecular Biology* 18, 437–442.
- Rose, R., Weyand, M., Lammers, M., Ishizaki, T., Ahmadian, M.R., Wittinghofer, A., 2005. Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and

- mammalian Dia. *Nature* 435, 513–518.
- Rossmann, K.L., Der, C.J., Sondek, J., 2005. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 167–180.
- Rossmann, K.L., WorthyLake, D.K., Snyder, J.T., Siderovski, D.P., Campbell, S.L., Sondek, J., 2002. A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domain-assisted guanine nucleotide exchange. *EMBO J.* 21, 1315–1326.
- Rümenapp, U., Blomquist, A., Schwörer, G., Schabrowski, H., Psoma, A., Jakobs, K.H., 1999. Rho-specific binding and guanine nucleotide exchange catalysis by KIAA0380, a dbl family member. *FEBS Lett.* 459, 313–318.
- Sahai, E., Marshall, C.J., 2002. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat. Cell Biol.* 4, 408–415.
- Sarrabayrouse, G., Pich, C., Moriez, R., Armand-Labit, V., Rochaix, P., Favre, G., Tilkin-Mariamé, A.-F., 2010. Melanoma Cells Treated with GGTI and IFN- $\gamma$  Allow Murine Vaccination and Enhance Cytotoxic Response against Human Melanoma Cells. *PLoS ONE* 5, e9043.
- Sato, N., Fukui, T., Taniguchi, T., Yokoyama, T., Kondo, M., Nagasaka, T., Goto, Y., Gao, W., Ueda, Y., Yokoi, K., Minna, J.D., Osada, H., Kondo, Y., Sekido, Y., 2007. RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. *Int. J. Cancer* 120, 543–551.
- Scheffzek, K., Stephan, I., Jensen, O.N., Illenberger, D., Gierschik, P., 2000. The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nat. Struct. Biol.* 7, 122–126.
- Schier, R., McCall, A., Adams, G.P., Marshall, K.W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R.S., Weiner, L.M., Marks, C., Marks, J.D., 1996. Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J. Mol. Biol.* 263, 551–567.
- Schlichting, I., Almo, S.C., Rapp, G., Wilson, K., Petratos, K., Lentfer, A., Wittinghofer, A., Kabsch, W., Pai, E.F., Petsko, G.A., 1990. Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis. *Nature* 345, 309–315.
- Schmidt, A., Hall, A., 2002. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* 16, 1587–1609.
- Self, A.J., Hall, A., 1995. Measurement of intrinsic nucleotide exchange and GTP hydrolysis rates. *Meth. Enzymol.* 256, 67–76.
- Sheffield, P., Garrard, S., Derewenda, Z., 1999. Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of “parallel” expression vectors. *Protein Expr. Purif.* 15, 34–39.
- Shimizu, T., Ihara, K., Maesaki, R., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Hakoshima, T., 2000. An open conformation of switch I revealed by the crystal structure of a Mg<sup>2+</sup>-free form of RHOA complexed with GDP. Implications for the GDP/GTP exchange mechanism. *J. Biol. Chem.* 275, 18311–18317.
- Skerra, A., Plückthun, A., 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038–1041.
- Skuli, N., Monferran, S., Delmas, C., Favre, G., Bonnet, J., Toulas, C., Cohen-Jonathan Moyal, E., 2009. Alphavbeta3/alphavbeta5 integrins-FAK-RhoB: a novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. *Cancer Res.* 69, 3308–3316.
- Smith, G.P., 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315–1317.
- Solski, P.A., Helms, W., Keely, P.J., Su, L., Der, C.J., 2002. RhoA biological activity is

- dependent on prenylation but independent of specific isoprenoid modification. *Cell Growth Differ.* 13, 363–373.
- Soundararajan, M., Turnbull, A., Fedorov, O., Johansson, C., Doyle, D.A., 2008. RhoB can adopt a Mg<sup>2+</sup> free conformation prior to GEF binding. *Proteins* 72, 498–505.
- Spindler, V., Schlegel, N., Waschke, J., 2010. Role of GTPases in control of microvascular permeability. *Cardiovascular Research* 87, 243–253.
- Stacey, D.W., Kung, H.F., 1984. Transformation of NIH 3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein. *Nature* 310, 508–511.
- Stemmer, W.P., 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10747–10751.
- Strassheim, D., Porter, R.A., Phelps, S.H., Williams, C.L., 2000. Unique in vivo associations with SmgGDS and RhoGDI and different guanine nucleotide exchange activities exhibited by RhoA, dominant negative RhoA(Asn-19), and activated RhoA(Val-14). *J. Biol. Chem.* 275, 6699–6702.
- Suzuki, Y., Ito, S., Otsuka, K., Iwasawa, E., Nakajima, M., Yamaguchi, I., 2005. Preparation of functional single-chain antibodies against bioactive gibberellins by utilizing randomly mutagenized phage-display libraries. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 610–619.
- Symons, M., Segall, J.E., 2009. Rac and Rho driving tumor invasion: who's at the wheel? *Genome Biol.* 10, 213.
- Takami, Y., Higashi, M., Kumagai, S., Kuo, P.C., Kawana, H., Koda, K., Miyazaki, M., Harigaya, K., 2008. The activity of RhoA is correlated with lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Dig. Dis. Sci.* 53, 467–473.
- Tanaka, T., Rabbitts, T.H., 2003. Intrabodies based on intracellular capture frameworks that bind the RAS protein with high affinity and impair oncogenic transformation. *EMBO J.* 22, 1025–1035.
- Tanaka, T., Williams, R.L., Rabbitts, T.H., 2007. Tumour prevention by a single antibody domain targeting the interaction of signal transduction proteins with RAS. *EMBO J.* 26, 3250–3259.
- Taylor, J.M., Macklem, M.M., Parsons, J.T., 1999. Cytoskeletal changes induced by GRAF, the GTPase regulator associated with focal adhesion kinase, are mediated by Rho. *J. Cell. Sci.* 112 ( Pt 2), 231–242.
- Thom, G., Cockroft, A.C., Buchanan, A.G., Candotti, C.J., Cohen, E.S., Lowne, D., Monk, P., Shorrocks-Hart, C.P., Jermutus, L., Minter, R.R., 2006. Probing a protein-protein interaction by in vitro evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7619–7624.
- Tilkin-Mariamé, A.-F., Cormary, C., Ferro, N., Sarabayrouse, G., Lajoie-Mazenc, I., Faye, J.-C., Favre, G., 2005. Geranylgeranyl transferase inhibition stimulates anti-melanoma immune response through MHC Class I and costimulatory molecule expression. *FASEB J.* 19, 1513–1515.
- Tillement, V., Lajoie-Mazenc, I., Casanova, A., Froment, C., Penary, M., Tovar, D., Marquez, R., Monsarrat, B., Favre, G., Pradines, A., 2008. Phosphorylation of RhoB by CK1 impedes actin stress fiber organization and epidermal growth factor receptor stabilization. *Exp. Cell Res.* 314, 2811–2821.
- Tomlinson, I.M., Walter, G., Jones, P.T., Dear, P.H., Sonnhammer, E.L., Winter, G., 1996. The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J. Mol. Biol.* 256, 813–817.
- Vega, F.M., Ridley, A.J., 2007. SnapShot: Rho Family GTPases. *Cell* 129, 1430.e1–1430.e2.
- Vega, F.M., Ridley, A.J., 2008. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett.* 582, 2093–2101.



- Walker, K., Olson, M.F., 2005. Targeting Ras and Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 62–68.
- Wang, D.-A., Sebti, S.M., 2005. Palmitoylated cysteine 192 is required for RhoB tumor-suppressive and apoptotic activities. *J. Biol. Chem.* 280, 19243–19249.
- Wang, L., Yang, L., Luo, Y., Zheng, Y., 2003. A novel strategy for specifically down-regulating individual Rho GTPase activity in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 278, 44617–44625.
- Wang, Q., Liu, M., Kozasa, T., Rothstein, J.D., Sternweis, P.C., Neubig, R.R., 2004. Thrombin and lysophosphatidic acid receptors utilize distinct rhoGEFs in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* 279, 28831–28834.
- Watanabe, G., Saito, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Fujisawa, K., Morii, N., Mukai, H., Ono, Y., Kakizuka, A., Narumiya, S., 1996. Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhotillin as targets of small GTPase Rho. *Science* 271, 645–648.
- Watanabe, T., Ito, Y., Yamada, T., Hashimoto, M., Sekine, S., Tanaka, H., 1994. The roles of the C-terminal domain and type III domains of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in chitin degradation. *Journal of Bacteriology* 176, 4465.
- Wei, Y., Zhang, Y., Derewenda, U., Liu, X., Minor, W., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P., Derewenda, Z.S., 1997. Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nat. Struct. Biol.* 4, 699–703.
- Weisser, N.E., Hall, J.C., 2009. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnol. Adv.* 27, 502–520.
- Wennerberg, K., Der, C.J., 2004. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J. Cell. Sci.* 117, 1301–1312.
- Wheeler, A.P., Ridley, A.J., 2004. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp. Cell Res.* 301, 43–49.
- Wherlock, M., Gampel, A., Futter, C., Mellor, H., 2004. Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase. *J. Cell. Sci.* 117, 3221–3231.
- Wittinghofer, A., Pai, E.F., 1991. The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* 16, 382–387.
- Wright, M.J., Deonarain, M.P., 2007. Phage display of chelating recombinant antibody libraries. *Mol. Immunol.* 44, 2860–2869.
- Xu, M.-Q., Evans, T.C., Jr, 2005. Recent advances in protein splicing: manipulating proteins in vitro and in vivo. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 440–446.
- Xu, M.Q., Perler, F.B., 1996. The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation. *EMBO J.* 15, 5146–5153.
- Yang, J., Zhang, Z., Roe, S.M., Marshall, C.J., Barford, D., 2009. Activation of Rho GTPases by DOCK exchange factors is mediated by a nucleotide sensor. *Science* 325, 1398–1402.
- Yang, W.P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A.T., Burton, D.R., Barbas, C.F., 3rd, 1995. CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J. Mol. Biol.* 254, 392–403.
- Yoshizaki, H., Ohba, Y., Kurokawa, K., Itoh, R.E., Nakamura, T., Mochizuki, N., Nagashima, K., Matsuda, M., 2003. Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J. Cell Biol.* 162, 223–232.
- Zhang, B., Zhang, Y., Wang, Z., Zheng, Y., 2000. The role of Mg<sup>2+</sup> cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 25299–25307.
- Zheng, Y., Fischer, D.J., Santos, M.F., Tigyi, G., Pasteris, N.G., Gorski, J.L., and Xu, Y. 1996. The faciogenital dysplasia gene product FGD1 functions as a Cdc42Hs- specific

guanine-nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 271: 33169–33172.

Zhou, J., Zhu, Y., Zhang, G., Liu, N., Sun, L., Liu, M., Qiu, M., Luo, D., Tang, Q., Liao, Z., Zheng, Y., Bi, F., 2011. A distinct role of RhoB in gastric cancer suppression. *International Journal of Cancer* 128, 1057–1068.







**Patrick CHINESTRA**

## **Conception de biosenseurs des protéines RhoA, RhoB, RhoC.**

### **Résumé :**

Notre équipe s'intéresse à la compréhension des mécanismes de dérégulation des voies de signalisation cellulaire dans la survenue et la maintenance des processus tumoraux, ainsi que leurs conséquences dans la réponse aux thérapies antitumorales. Nous nous intéressons particulièrement aux protéines Rho et à leurs régulateurs. Ils interviennent dans les voies de signalisation des récepteurs cellulaires conduisant à des modifications de l'adhérence, de la prolifération, de la motilité et de la balance survie/mort cellulaire.

Les protéines RhoA, RhoB et RhoC sont des petites GTPases passant d'un état actif (liées au GTP) à un état inactif (liées au GDP) et dont l'homologie est proche de 85%. La surexpression des protéines RhoA et RhoC a été décrite dans un grand nombre de tumeurs; à l'inverse, on observe une diminution de l'expression de RhoB dans le mélanome et dans le cancer du poumon.

La conception de fragments d'anticorps sélectifs de la conformation active des Rho, appelés biosenseurs, permettant d'évaluer l'activation de ces protéines *in situ* dans des coupes de tissus sains et cancéreux, pourrait aboutir à un usage pronostique de ces outils voire à la définition de nouveaux marqueurs thérapeutiques et permettrait de répondre à des questions plus fondamentales comme leurs localisations cellulaires, leur rôle dans la migration cellulaire, leur activation spatio-temporelle.

A partir du scFvC1 sélectif de la conformation active des trois protéines RhoA, RhoB et RhoC et isolé précédemment dans l'équipe, nous avons créé une banque secondaire par mutagenèse aléatoire et opéré une sélection par phage display avec un objectif double :

1°) augmenter l'affinité du scFvC1 pour améliorer ses capacités d'interaction avec les protéines Rho actives natives en vue d'améliorer ses performances en immunohistologie ainsi que pour une utilisation intracellulaire.

2°) sélectionner des variants spécifiques de chaque Rho malgré leur très forte homologie.

Nous montrons que la stratégie mise en œuvre permet d'augmenter l'affinité des scFv et de modifier leur sélectivité puisqu'un variant se lie préférentiellement à RhoA et RhoC. De plus, contrairement au svFvC1, ces scFv sont immunoprécipitants pour les Rho actives produites dans des cellules eucaryotes.

En parallèle, nous avons mis au point une méthodologie permettant le marquage d'un scFv anti-RhoB obtenu au laboratoire, par l'action d'un dérivé fluorescent de la biotine sur une intéine exprimée en fusion C-terminale du scFv. Ceci permettra d'améliorer les techniques immunohistologiques avec des biosenseurs fluorescents.

### **Mots clés :**

Rho GTPases, anticorps recombinants monoclonaux, phage display, biosenseurs, biotine bifonctionnelle, immunofluorescence.