



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Laura KELLER**

**le** 20 Janvier 2017

**Titre :**

Conception de nano-anticorps conformationnels comme nouveaux outils  
d'étude de l'activité des GTPases de la sous-famille RHOA

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Cancérologie

**Unité de recherche :**

UMR1037- Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

M. le Pr. Gilles FAVRE

M. le Dr. Aurélien OLICHON

**Jury :**

Mme le Dr. Sandrine ETIENNE-MANNEVILLE

M. le Dr. Pierre MARTINEAU

M. le Pr. Philippe GAULARD







Je tiens à adresser en premier lieu mes remerciements aux membres du jury.

**A Madame le Docteur Sandrine Etienne-Manneville,**

**A Monsieur le Professeur Pierre Martineau,**

**A Monsieur le Professeur Philippe Gaulard,**

Je suis extrêmement honorée de votre présence. Je vous exprime toute ma gratitude pour avoir accepté de consacrer de votre temps à la lecture de ce travail. Je considérerais avec beaucoup d'attention vos remarques. Celles-ci seront très précieuses pour enrichir ma réflexion autour de ce sujet.

**A Monsieur le Professeur Gilles Favre,**

Merci de m'avoir accueillie dans votre équipe. Je vous réitère ici tous mes remerciements quant à ma formation et mon avenir. Je vous suis extrêmement reconnaissante pour vos conseils, votre aide et votre disponibilité. J'espère aussi continuer à mériter votre confiance.

**A Monsieur le Docteur Aurélien Olichon,**

Je ne saurais vraiment pas par où commencer. Un simple « merci pour tout » peut sembler être une expression succincte et « fourre-tout » mais elle résume pourtant très bien la situation. J'ai le sentiment d'avoir énormément grandi pendant ces années à tes côtés et d'avoir appris bien d'autres choses au delà des RHO et des VHHs.

**Aux membres du laboratoire,**

**A Claudine,** pour ton aide précieuse et ton optimisme. Ton arrivée a été une bouffée d'air frais et travailler à tes côtés est très agréable. Avec toi, pour le prochain phage display !

**A Stephanie,** merci pour ton aide et tes conseils entre autres sur le split GFP.

**A Rémi et Isa,** pour leur aide sur le GST-RBD. Isa, pour ton sens de l'organisation du laboratoire, qui aide bien au quotidien. Rémi, pour ton humour.

**A Anne P,** pour ton soutien.

**A Claire,** pour nous faciliter les commandes.

**A Kenza et Gessichina,** pour nos bons moments passés au labo et en dehors.

D'une façon générale, merci à tous les membres de l'équipe, Julia, les deux Oliviers, Sylvie, Faten, Laetitia, Cathy, Aurore, Sarah et Magda pour l'ambiance dans le labo. C'est très agréable de travailler avec vous.

**Une mention très spéciale à Patoche.** C'est vrai qu'on se marre bien...

**Aux deux petites stagiaires, Mélissa et Margaux** qui ont courageusement appris à travailler à l'échelle semi industrielle... ! Je vous souhaite toute la réussite possible dans vos projets.

**Aux membres du plateau de Protéomique,** pour leur aide d'abord mais aussi leur bonne humeur, gentillesse, disponibilité, conseils et écoute. Laetitia, un grand merci. Descendre au premier étage est toujours sympa grâce à vous !

**Aux membres de l'équipe Cisbio Bioassays/SOS AMITIE.** Nos réunions sont toujours constructives et goûteuses (!). J'espère que nous aurons l'occasion de concrétiser tout ce travail prochainement.

**Aux membres du laboratoire de Routine,** merci de m'avoir soutenue pendant toutes ces années, pendant les astreintes où je m'éclipsais « de l'autre côté ».

Je profite également de cette thèse pour remercier mes parents et mes grands parents pour leur soutien inconditionnel qui m'a donné la force de me dépasser.

Merci enfin à toi aussi, David. Vivement la suite...

*Il faut allier le pessimisme de l'intelligence et l'optimisme de la volonté*

Romain Rolland





A Manou,



# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>19</b>
I. Présentation générale de la sous-famille RHO.....	20
A. Organisation structurale des petites protéines G.....	23
1. Le domaine G.....	23
2. Le switch conformationnel et sa régulation moléculaire .....	24
a. Les GEFS .....	27
b. Les GAPs.....	28
3. La partie C-terminale et l'interaction avec les GDIs .....	31
a. Ancrage membranaire des protéines de la sous-famille RHOA .....	31
b. Les GDI.....	32
B. Propriétés fonctionnelles de la sous-famille RHOA .....	34
1. Une diversité d'effecteurs .....	35
a. Structure des effecteurs .....	35
b. Affinité des interactions RHO / effecteurs .....	42
c. Mécanismes d'activation des effecteurs.....	44
d. Fonctions des effecteurs majeurs de la sous-famille RHOA.....	45
2. Une diversité de modifications post traductionnelles .....	49
3. Une activation spatiale et temporelle .....	50
a. Mise en évidence .....	50
b. Principaux déterminants moléculaire de cette activation.....	52
c. Étude de la migration cellulaire comme exemple d'activation spatiale et temporelle des RHO .....	53
4. Sélectivité au sein de la sous-famille RHOA et redondance fonctionnelle .....	54
C. Implications des RHO dans les tumeurs .....	57
1. Mécanismes moléculaires .....	57
a. Dans les “ hallmarks of cancer” .....	57
b. Détails à propos de la progression tumorale .....	59
2. Dérégulation de leur expression.....	63
3. Dérégulation de leur activité.....	65
4. Mise en évidence de mutations .....	67

II. Méthodes d'études des GTPases RHO.....	70
A. Méthodes basées sur la modification d'expression des protéines .....	70
B. Méthodes basées sur l'étude de leur localisation .....	71
C. Méthodes basées sur la modification de leur activité.....	71
1. Mutants activateurs ou inhibiteurs .....	71
2. Stimulation par des agonistes.....	73
3. Les toxines bactériennes .....	73
4. Les petites molécules pharmacologiques.....	78
5. Le GST-RBD pulldown .....	82
D. Méthodes abordant l'étude de la régulation spatiotemporelle .....	84
1. Les biosenseurs de FRET.....	84
2. Les biosenseurs de complémentation de fragments protéiques .....	90
a. Basés sur la complémentation de fluorescence .....	90
b. Basés sur la complémentation de luminescence .....	92
E. Difficultés inhérentes à l'étude des GTPases RHO .....	93
1. Présentation des limites des différentes études.....	94
2. Proposition de définition d'un outil idéal .....	96
3. Présentation de stratégies innovantes.....	97
III. Les anticorps intracellulaires.....	100
A. Présentation générale des anticorps recombinants .....	100
B. Les fragments variable d'anticorps à chaîne lourde de camélidés : VHH ou nanobodies.....	105
1. Caractéristiques générales.....	105
2. Les banques d'ADNc de VHH et leurs méthodes de screening .....	107
C. Les anticorps intracellulaires.....	110
1. Caractéristiques générales.....	110
2. Stratégies d'identification .....	111
a. Création de banques optimisées .....	113
b. Etude de l'interaction directement en milieu réducteur .....	114
3. Exemples d'applications des VHH .....	117
a. Applications <i>in vitro</i> .....	117
b. Applications <i>in cellulo</i> .....	118

<b>OBJECTIFS ET RESULTATS</b> .....	127
1. Article 1 .....	141
2. Article 2 .....	203
3. Article 3 .....	245
4. Article 4 .....	265
<b>DISCUSSION</b> .....	295
A. Etude du mode de liaison des anticorps à leur cible .....	296
1. Pour comprendre l'effet bloquant du RH28.....	296
2. Pour comprendre la sélectivité conformationnelle .....	297
3. Pour comprendre la sélectivité RHOA/RAC .....	298
4. Pour améliorer la sélectivité au sein de la sous-famille RHOA.....	298
B. Le RH12, nouvel outil de mesure de l'activité des protéines RHO ? .....	299
1. Mesure de l'affinité du RH12 .....	299
2. Mesure de la modification de l'activité GTPasique intrinsèque par le RH12 .....	301
C. Le RH28, nouvelle stratégie d'inhibition intracellulaire de l'activité des RHO ? .....	301
1. Proposition du mécanisme d'action intracellulaire du RH28 .....	302
2. Problématique du contexte intracellulaire .....	303
3. Enjeux de l'inhibition de l'activité des RHO dans le contexte du mélanome .....	304
D. Perspectives de développement à plus long terme .....	306
1. Applications <i>in vitro</i> .....	306
a. Criblage de petites molécules chimiques .....	306
b. Développement d'un kit de mesure de l'activité.....	306
2. Applications <i>in cellulo</i> .....	307
a. Développement d'un biosenseur d'activation intracellulaire.....	307
b. Développement d'un inhibiteur intracellulaire photo-activable.....	307
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	309
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	311
<b>ANNEXES</b> .....	333



# LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acides Aminés	GBD : GTPase Binding Domain
AD : Activator Domain	GDI : Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor
ARN : Acide RiboNucléique	GFP : Green Fluorescent Protein
Ag : Antigène	GDP : Guanosine DiPhosphate
CA : Constitutive Active	GST : Glutathion S Transférase
CAT : Chloramphenicol Acétyl Transférase	GTP : Guanosine TriPhosphate
CBD : Chitin Binding Domain	GTP $\gamma$ S : Guanosine 5'O-(gamma-thio)-TriPhosphate
BFP : Blue Fluorescent Protein	HA : etiquette HémAgglutinine
BiFC: Bimolecular Fluorescence Complementation	HER2 : Human Epithelial growth factor Receptor 2
CDR : Complementary Determinant Region	HR: Homology Region
CH : Constant Haevy (chain)	Hs2dAb : Humanized synthetic single domain Antibody
CL : Constant Light (chain)	IACT : Intracellular Antibody Capture Technology
CFP : Cyan Fluorescent Protein	Ig : Immunoglobuline
CNF : Cytotoxic Necrotizing Factor	IMAC : Immobilized metal Affinity Chromatography
CRD : Cystein Rich Domain	IPTG : Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
Da : Dalton	MAPK :Mitogen Activated Protein Kinase
DBD : DNA Binding Domain	MBP : Maltose Binding Protein
DN : Dominant Negative	MEC : Matrice Extra Cellulaire
EGF : Epidermal Growth Factor	MMP : Matrix Metallo Protéase
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay	mRFP : Red Fluorescent Protein
FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting	NAR : Novel Antigen Receptor
F2H : Fluorescent two Hybrid	NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor Kappa B
F3H : Fluorescent three Hybrid	PBS : Phosphate Buffer Saline
FR : Framework Region	PCR : Polymerase Chain Reaction
FRET : Forster Resonance Energy Transfer	
GAP : GTPase Activating Protein	

PEG : PolyEthylène Glycol

PEST : Proline (P), Acide Glutamique (E),  
Acide Aspartique (S), Thréonine (T)

PFA : ParaFormAldéhyde

PRK : Proteine kinase C – Related Kinase

RE : Réticulum Endoplasmique

RBD : Rho Binding Domain

RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RT : Room Temperature

RU : Resonance Unit

sdAb : Single Domain Antibody

scFv : single chain Fragment variable

SH2 : SRC Homology 2 (domaine)

SH3 : SRC Homology 3 (domaine)

SPR : Surface Plasmon Resonance

STED : Stimulated-Emission-Depletion

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TEA : TriEthylAmine

VH : Variable Heavy

VHH : Variable Heavy of Heavy Chain  
Antibody

VL : Variable Light

YFP : Yellow Fluorescent Protein



# **INTRODUCTION**



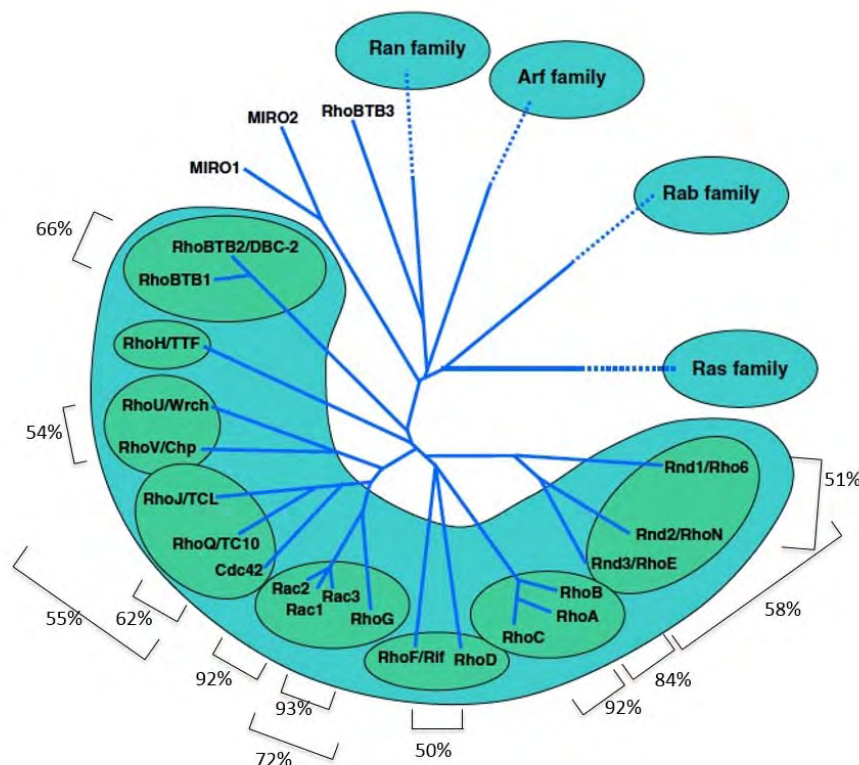
# INTRODUCTION

Depuis la découverte fortuite en 1985 par Madaule et Axel<sup>1</sup> du premier gène de la famille RHO, les connaissances sur les membres, leur mécanisme d'action, leur régulation et leurs fonctions n'ont cessé de s'enrichir et de se complexifier, pour aujourd'hui être pleinement intégrées dans la notion de réseaux de signalisation régulés dans les dimensions spatiales et temporelles.

Cette introduction reviendra sur les principales caractéristiques des protéines de la sous-famille RHO et tentera de présenter comment un simple changement de conformation peut être à l'origine d'une pléiade de fonctions cellulaires. Les arguments en faveur d'une implication des RHO dans la progression tumorale seront plus particulièrement développés. L'ensemble des outils permettant l'étude de ces protéines sera par la suite récapitulée et nous discuterons la nécessité d'en développer de plus performants. Enfin, nous décrirons les anticorps à simples domaines et nous tenterons de démontrer en quoi ils nous semblent particulièrement adaptés à l'étude de cette famille de protéines.

# I. Présentation générale de la sous-famille RHO

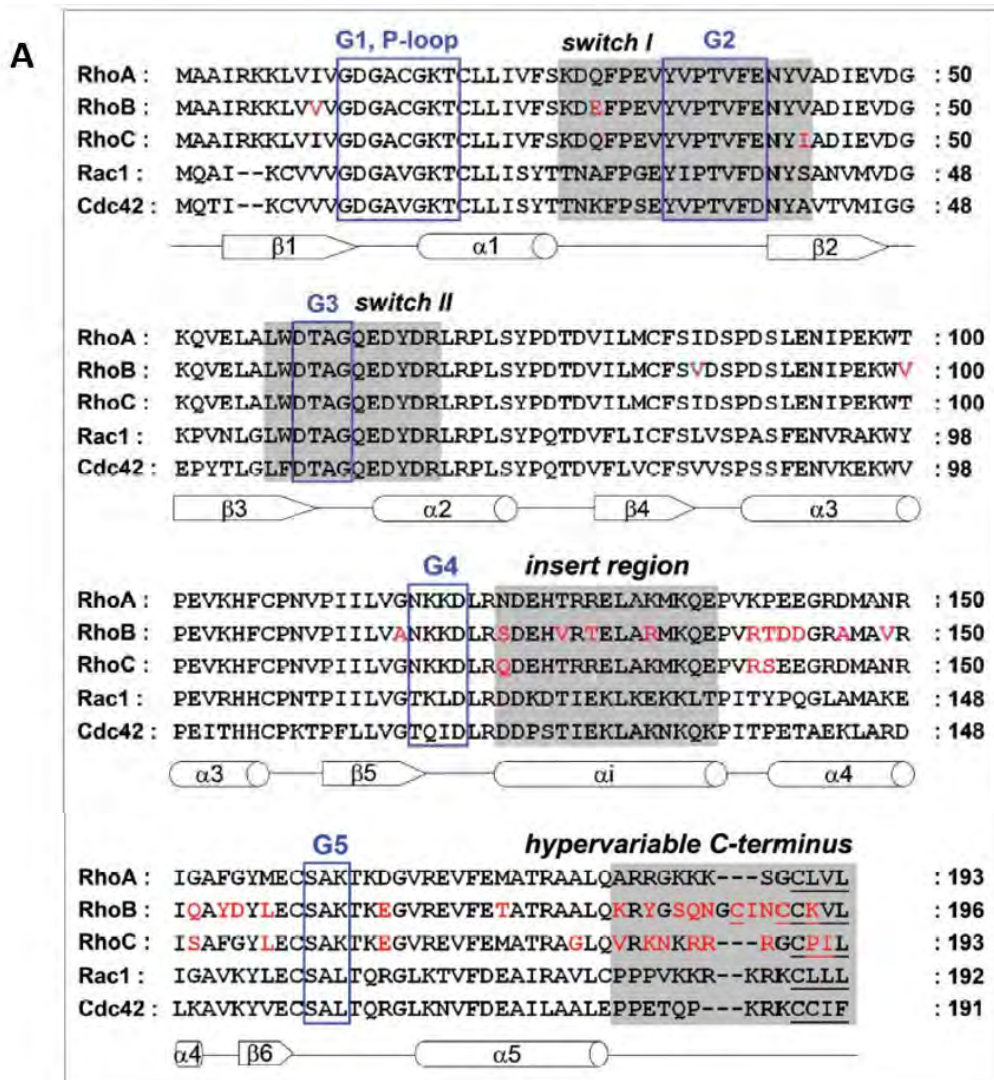
Les GTPases RHO sont des protéines G (liant le GTP), de petit poids moléculaire (20 à 30kDa) appartenant à la super-famille RAS. La super-famille RAS comprend plus de 150 membres identifiés chez l'Homme, dont certains ont été très bien conservés au cours de l'évolution. La super-famille RAS est classiquement divisée en 5 branches, sur la base d'homologies de séquences et de similarités fonctionnelles : RAS (Ras Sarcoma), RHO, RAB (Ras-like proteins in brain), ARF (ADP-ribosylation factor) et RAN (Ras-like nuclear)<sup>2</sup>. La famille RHO (Ras Homologous) comprend aujourd'hui 20 membres chez les mammifères dont les mieux étudiés sont RHOA, RAC et CDC42. L'alignement des séquences et l'analyse phylogénétique ont permis de les répartir en 8 sous-familles : RHOA, RAC, CDC42, RHOV/V, RHOD/F, RND, RHOH et RHOBTB (Figure 1). Les protéines RHO partagent donc des traits communs aux petites GTPases RAS mais présentent également des particularités. Dans ce chapitre, nous présenterons dans un premier temps les principales caractéristiques biochimiques et structurales des protéines RHO ainsi que leurs grandes fonctions. Nous aborderons ensuite leurs nombreux mécanismes de régulation pour finalement détailler leurs implications dans la tumorigénèse.



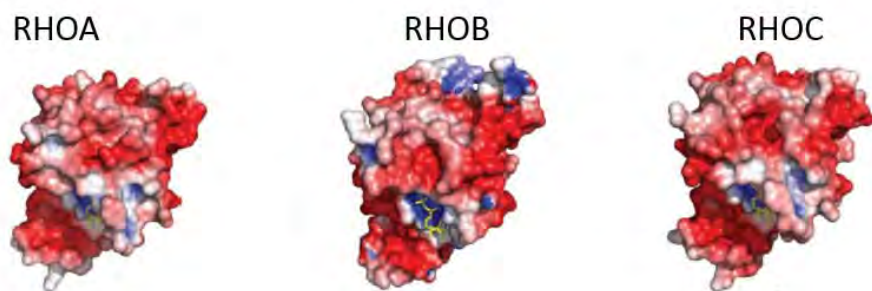
**Figure 1 :** Arbre phylogénétique de la famille RHO au sein de la super-famille RAS. Le pourcentage d'homologie dans les séquences primaires est figuré d'après Heasman *et al*<sup>3</sup>.

Parmi les GTPases de la sous-famille RHO, sont distinguées les GTPases « classiques » incluant RHO, RAC, CDC42, RHOF et RHOD car celles-ci existent soit sous une forme liée au GTP soit sous une forme liée au GDP. D' autres GTPases sont dites « atypiques », RHO-BTB, RND, RHOU, RHOV et RHOH, qui lient constamment le GTP et sont régulées par d'autres mécanismes tels que la phosphorylation ou leur niveau d'expression. Ils ne feront pas partie de cette étude. RHOA, RAC1 et CDC42 sont les protéines les plus étudiées et notre exposé se restreindra volontairement à la sous-famille RHOA, cible contre laquelle ont été développés les anticorps.

La sous-famille RHOA comprend trois membres, RHOA, RHOB et RHOC qui présentent un fort pourcentage d'homologie dans leur séquence primaire (85% entre RHOA et RHOB, 92% entre RHOA et RHOC). Ce fort pourcentage d'homologie pose immédiatement la question de la redondance de ces protéines et par conséquent celle de la capacité à les distinguer (Figure 2).

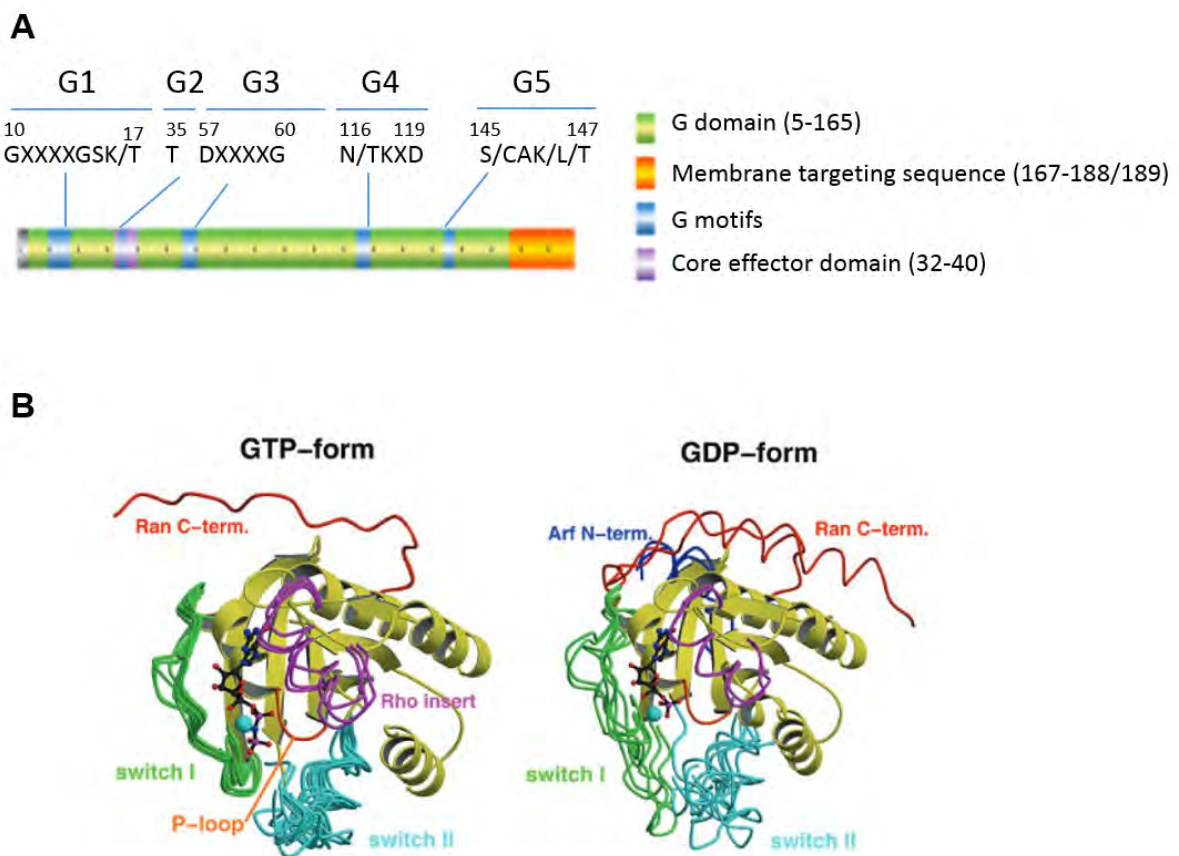


**B**



**Figure 2 : A :** Alignement des séquences primaires des protéines RHOA, RHOB, RHOC, RAC1 et CDC42. Les principaux motifs structuraux sont figurés et les acides aminés divergents sont colorés en rouge. RHOA, B et C sont à deux acides aminés près identiques dans la région des switch mais divergent notamment dans l'insert loop et dans la partie C-terminale. Ces différences sont importantes à noter car d'après Ahmandian et Drovski, d'autres régions que le site « consensus » de liaison des partenaires participaient activement à la liaison différente des partenaires. **B :** Représentation du potentiel électrostatique (calculé) des acides aminés de surface de RHOA, RHOB et RHOC. Sont figurés en rouge les acides aminés chargés négativement à pH 7,5 et en bleu ceux positivement. Il est ainsi possible de remarquer que la répartition des charges en surface diffère largement entre les trois protéines. D'après <sup>4</sup>.

## A. Organisation structurale des petites protéines G



**Figure 3** : **A** : Organisation générale des petites protéines G en domaines fonctionnels<sup>2</sup>. **B** : Conformations canoniques des différentes petites GTPases à partir de structures cristallographiques superposées. Les éléments différenciant les différentes sous-familles sont illustrés : la partie C-terminale de RAN est figurée en rouge, l'insert loop de RHO en violet et la partie N-terminale de ARF en bleu. Il apparaît que les petites G sont beaucoup plus divergentes entre elles dans la conformation GDP que dans la conformation GTP. Cependant, il faut ici distinguer les familles ARF, RAN et RAB<sup>2</sup>. Les protéines de la famille ARF et RAN possèdent respectivement une partie N et C terminale supplémentaires qui subissent de profonds changements conformationnels suite à la liaison du GTP, ce qui ne semble pas être le cas pour les protéines de la famille RHO. En outre, des fonctions spécifiques à l'état conformationnel des familles ARF, RAN et RAB ont été rapportées.

### 1. Le domaine G

Les protéines de la super-famille RAS partagent un motif structural universel de liaison au nucléotide GTP ou GDP, nommé domaine G et permettant l'identification des GTPases (EC 3.6.5). Il est constitué de 166 acides aminés (20kDa) organisés sous forme de 5 hélices  $\alpha$  et d'un feuillet  $\beta$  contenant six brins  $\beta$  antiparallèles. Le domaine G est caractérisé par 5 séquences consensus, G1 à G5

(Figure 3A). Les interactions avec le nucléotide se font principalement entre le motif G4 et la base et entre le motif G1 (P loop) et les résidus phosphates. Les repliements de ces structures secondaires en structure tertiaire apportent des informations permettant de comprendre :

- la spécificité pour les nucléotides à base guanine par rapport aux nucléotides à base adénine. L'Acide Aspartique du motif G3 forme une liaison hydrogène avec la base guanine du nucléotide et le résidu Alanine du motif G5 interagit avec l'atome d'oxygène de la base guanine, ce qui n'aurait pas, pour des raisons d'encombrement stérique, été possible avec le groupement amine d'une base adénine ;
- le rôle du magnésium dans l'affinité des protéines pour les nucléotides ;
- les mécanismes d'échange et d'hydrolyse du GTP ;
- et finalement les changements conformationnels liés à la nature du nucléotide<sup>5</sup>.

Une des propriétés remarquables de la famille RHO se situe au niveau structural. Ces protéines se distinguent des autres familles de petites GTPases par la présence d'une hélice  $\alpha 3$  aussi appelée insert loop. Située entre les motifs G4 et G5, elle étend le domaine G de 13 acides aminés. Les premiers cristaux de CDC42 et RAC1 montrent que cette région n'est pas affectée par le changement conformationnel et servirait plutôt de surface additionnelle de liaison pour les différents partenaires des RHO et notamment pour les effecteurs (ROCK, mDia, IQGAP, NADPH oxydase)<sup>6</sup>.

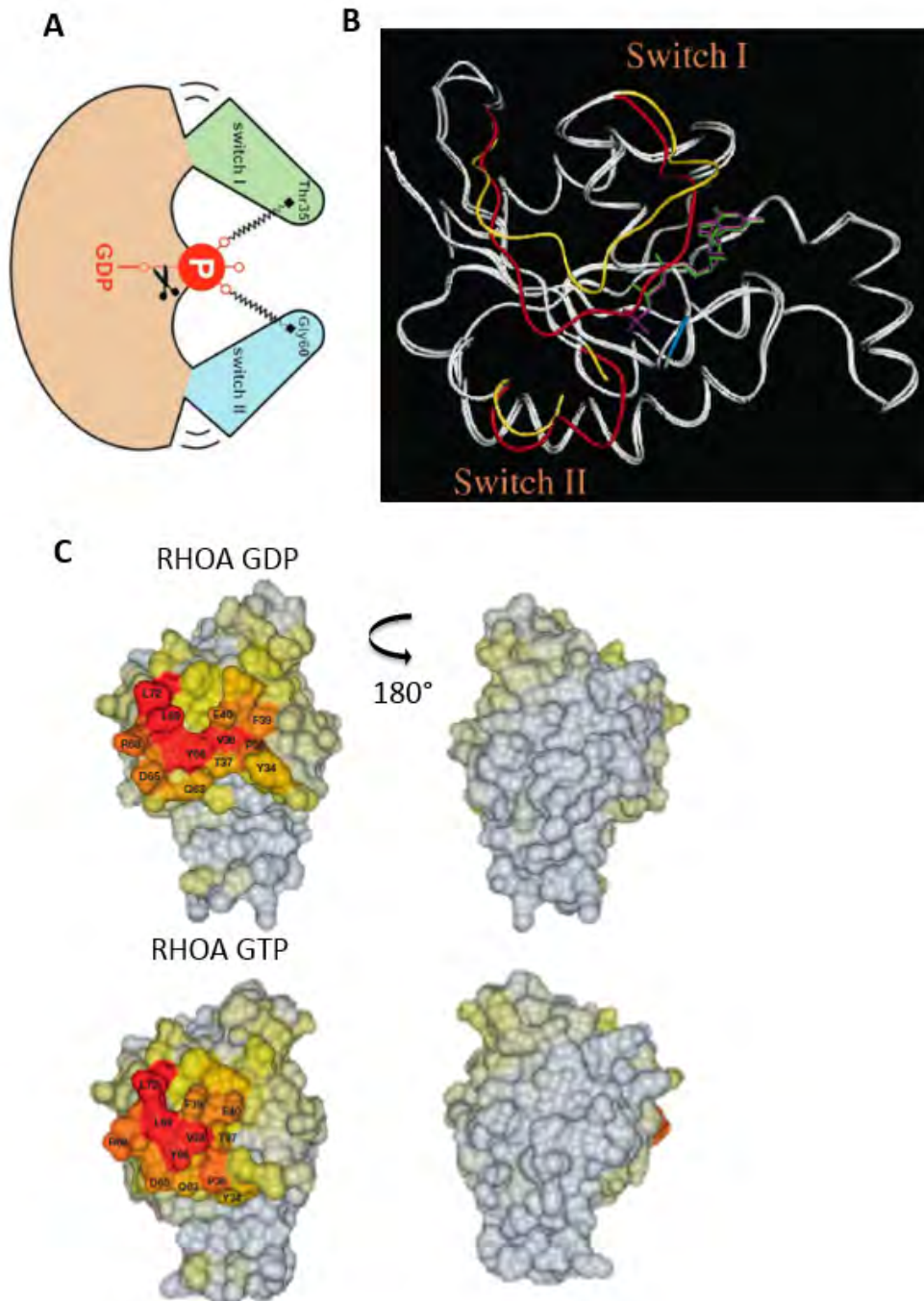
## 2. Le switch conformationnel et sa régulation moléculaire

L'étude exhaustive de la structure des protéines RAS a permis de proposer un modèle généralement applicable à la majorité des petites protéines G. Ces petites GTPases (EC 3.6.5.2) sont décrites comme des interrupteurs moléculaires régulés par l'échange entre le GTP et le GDP. Elles existent sous deux conformations distinctes : un état liant le GDP et un état liant le GTP. Structurellement, ces deux états conformationnels sont très proches, à l'exception de deux régions, nommées switch I (acides aminés 30 à 38 sur RAS) et II (acides aminés 59 à 67) dont l'orientation diffère selon le nucléotide lié. Dans l'état liant le GTP, deux liaisons H sont établies entre les groupements oxygène du phosphate en  $\gamma$  avec les groupements NH des résidus Thréonine et Glycine de la protéine. Après libération du phosphate en  $\gamma$ , la protéine adopte une conformation plus relâchée par le déplacement des acides aminés adjacents appartenant principalement au switch I et dans une moindre ampleur de ceux appartenant au switch II (Figure 4A).



L'état liant le GTP est généralement considéré comme l'état actif, préférentiellement reconnu par les protéines effectrices. Le domaine de liaison des effecteurs se situe en effet entre les acides aminés 32 à 40 (sur RAS) et englobe donc le switch I.

De plus, les structures cristallographiques de RHOA lié au GDP, au GTP et avec ses principaux régulateurs ont été résolues (Figure 4B). Ce qui permet à Ahmandian et Drovsky de remarquer que, contrairement aux autres familles des petites protéines G pour lesquelles tous les résidus en surface sont impliqués dans au moins une interaction, une très grande partie des RHO n'est en revanche impliquée dans aucune interaction<sup>7</sup> (Figure 4C). Un site de liaison consensus aux différents partenaires peut ainsi être distingué. La structure des 2 autres protéines de la sous-famille RHOA dans la conformation active sont également connues car le cristal de RHOC a été résolu en liaison avec un effecteur en 2004<sup>8</sup> ainsi que, récemment au laboratoire, le cristal de RHOB lié au GTP. Evidemment, RHOA, RHOB et RHOC sous forme active sont très largement superposables.



**Figure 4 :** A : Schéma du switch conformationnel. Les domaines switch I et II sont liés au phosphate en  $\gamma$  du GTP par les résidus invariants Thréonine et Glycine, un peu comme dans un mécanisme à ressort et l'hydrolyse du GTP en GDP permet à ces deux régions d'adopter une autre conformation, plus relâchée<sup>5</sup>. B : Représentation de la superposition des structures en ruban de RHOA lié au GTP (figuré en violet) et RHOA liée au GDP (figuré en vert). Les changements conformationnels sont minimes entre l'état lié au GDP et l'état lié au GTP, et intéressent seulement les régions du switch<sup>9</sup>. En rouge sont représentées les régions du switch dans l'état actif et en jaune dans l'état inactif. Il faut noter que la majorité des cristaux de RHO sont dépourvus de leur partie C-terminale, trop flexible pour être résolue. C : Identification sur les représentations en surface des résidus impliqués dans une interaction avec les différents partenaires des RHO, d'après Ahmandian et Drovski<sup>7</sup>. Les acides aminés représentés en gris ne sont impliqués dans aucun contact alors que les acides aminés en rouge sont impliqués dans 24 contacts parmi les 26 complexes analysés. En haut est représentée la forme liée au GDP et en bas celle liée au GTP.

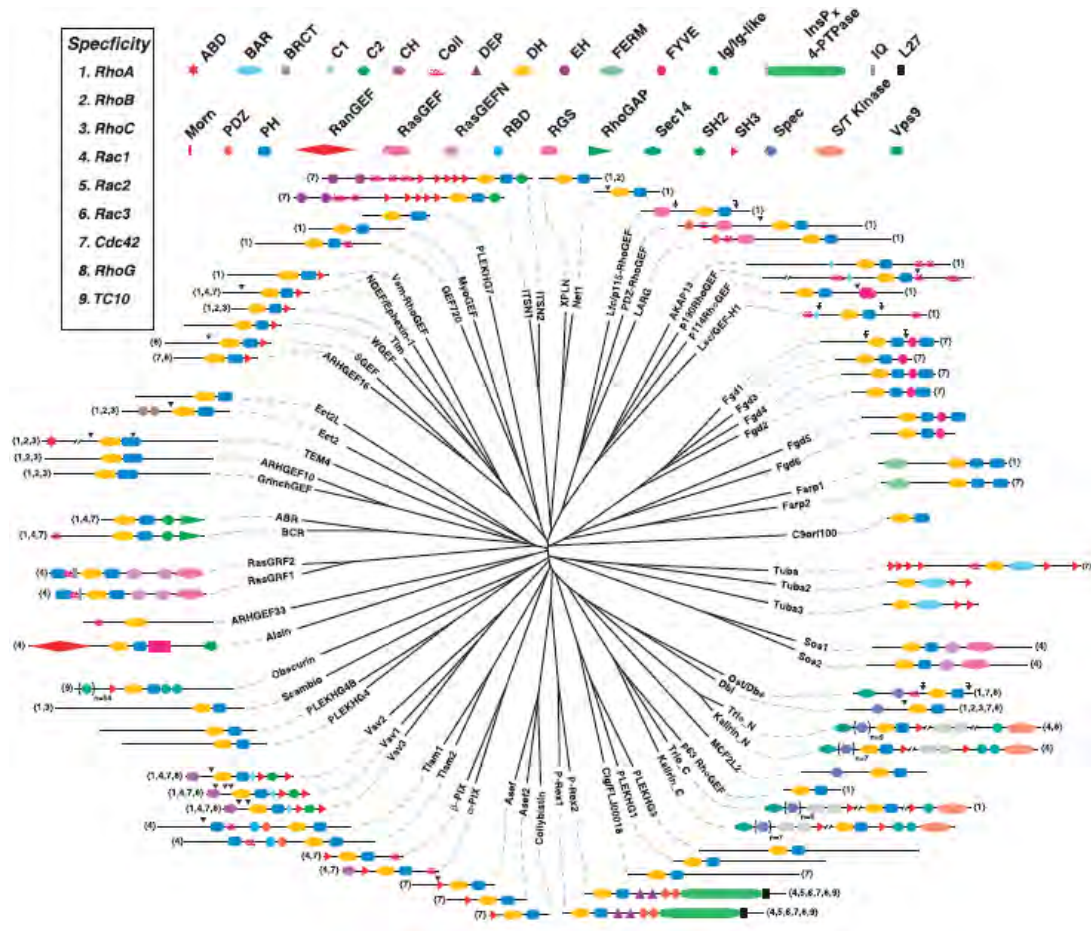
En revanche, la caractérisation biochimique décrit toutes ces protéines avec une forte affinité pour le GDP et le GTP, mais de faibles activités intrinsèques d'échange entre le GDP et le GTP et de faibles activité d'hydrolyse du GTP<sup>5</sup>. Ainsi, pour la majorité des petites G, l'alternance entre la protéine liant le GTP et celle liant le GDP est extrêmement régulée. Ainsi ont été mises en évidence des protéines partenaires : les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factor) facilitent le passage de la forme liant le GDP à la forme liant de GTP tandis que les GAPs (GTPase Activating Protein) se comportent comme des cofacteurs accélérant l'activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP en GDP. Au niveau moléculaire, le mécanisme de l'activité GTPasique de la protéine a été déterminé : l'hydrolyse du phosphate en  $\gamma$  est permise par l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau, activée par l'acide aminé Glutamine en position 61. Les GEFs et GAPs sont structurellement différents entre les familles de GTPases, et il n'y a pas de réactivité croisée entre les GEFs et les GAPs de différentes familles (à l'exception des RASGAPs et RAPGAPs)<sup>5</sup>.

#### a. Les GEFS

Les GEFs de la famille RHO se répartissent en deux familles structurales<sup>10</sup>. L'une, majoritaire comprend 70 membres présentant un domaine DH (Dbl Homology, par analogie au premier GEF découvert, Dbl) et un domaine PH (pour Plekstrin Homology). Le domaine DH est considéré comme porteur de l'activité catalytique tandis que le domaine PH sert à localiser le domaine DH à la membrane plasmique et régule son activité par allostérie. Structurellement, le domaine DH est essentiellement hélicoïdal et adopte une conformation dite en chaise longue. L'autre famille est nettement plus petite : elle rassemble 11 membres présentant une région DOCK (Docker homology) et dépourvue de domaine DH. Cette dernière présente une sélectivité restreinte aux GTPases RAC et CDC42. Le nombre important de liaisons entre la petite protéine G et le nucléotide rend la libération du GDP extrêmement lente. Le passage à l'état lié au GTP nécessite donc une stimulation par les GEFs dont le processus complexe peut être résumé en 4 grandes étapes : formation d'un complexe GEF/RHO-GDP de faible affinité, stabilisation d'un complexe de forte affinité GEF/RHO-(sans nucléotide) par déstabilisation de la poche du nucléotide, échange passif de nucléotide-et finalement libération du complexe GEF/RHO-GTP (Figure 6A). Ce qui amène à considérer les GEFs comme des catalyseurs permettant d'atteindre plus rapidement un complexe stable dans lequel la GTPase est dépourvue de nucléotide. La concentration cellulaire en GTP 10 fois supérieure à celle du GDP, les affinités relatives des GTPases pour le GTP et le GDP déplacent alors l'équilibre vers la liaison au GTP.

Les RHOGEFs sont des protéines multi-domaines et se distinguent des GEFs des autres familles par la grande diversité structurale et fonctionnelle des domaines juxtaposés au domaine GEF. Ces domaines participent à la régulation de la protéine, à son interaction avec d'autres protéines de structure, et contribuent à sa localisation intracellulaire (Figure 5). La sélectivité au sein de la famille

RHO n'a pas été déterminée de façon exhaustive. Pour les GEFs de la famille Dbl, elle serait due aux interactions établies entre la région variable dite « seatback » des GEFs et les brins  $\beta 1$  et  $\beta 2$  de la GTPase et quelques acides aminés isolés dans la région N-terminale et du switch II<sup>11</sup>.



**Figure 5 :** Arbre phylogénétique de la famille Dbl<sup>10</sup>. Remarquer la diversité structurale des autres domaines constituant les GEFs. Les têtes de flèches courbées désignent les fragments de GEFs biologiquement ou catalytiquement actifs. Les chiffres entre parenthèses renvoient aux GTPases RHO identifiées comme cibles.

### b. Les GAPs

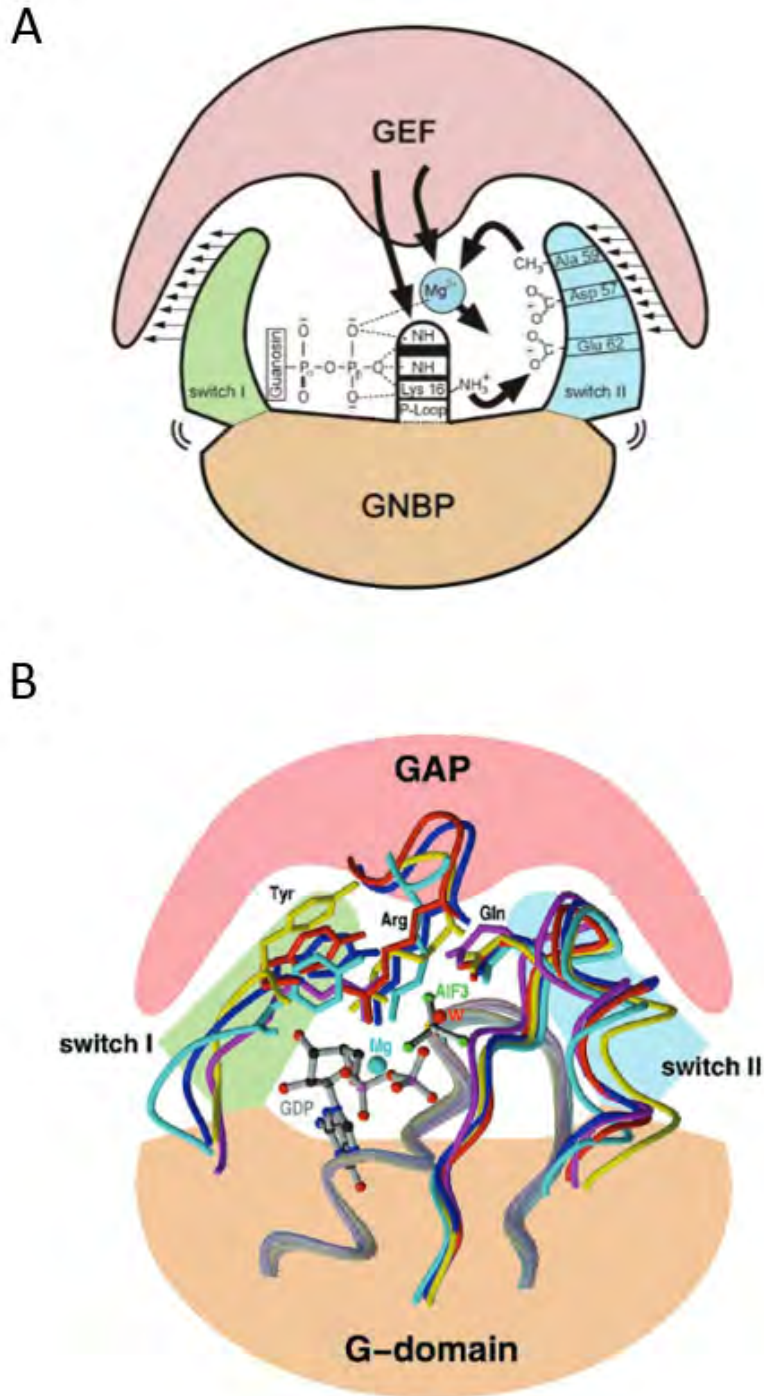
Les GAPs forment également une famille disparate du point de vue structural. Ce sont également des protéines multi-domaines, dont la diversité est aussi très importante. Elles possèdent en commun un domaine catalytique GAP de 190 acides aminés contenant un résidu arginine fonctionnellement important. Le domaine catalytique se structure en un fagot de neuf hélices réarrangées de façon antiparallèle et interagit avec les GTPases au niveau des régions switch I et II et avec le nucléotide lui-même. Pour transformer ces petites protéines liant un nucléotide à base guanine en petites GTPases véritablement efficaces, les GAPs de la famille RHO utilisent le même mécanisme d'action. Elles stabilisent d'une part la position de la glutamine 61 ou 63 selon les sous-familles

(essentielle à l'attaque nucléophile) sur la GTPase et d'autre part, la présence d'un résidu arginine dit « Arginine Finger » sur la protéine GAP permet de neutraliser la charge négative sur le  $\gamma$ -phosphate pendant l'état de transition<sup>12</sup> (Figure 6B). Dans une approche globale, l'activité GTPasique de 12 RHO en présence de 10 GAPs a été mesurée. Ainsi, l'activité GTPasique intrinsèque de la protéine, lente, (constante d'hydrolyse de  $0,0006 \text{ s}^{-1}$  pour RHOA) peut être accélérée d'un facteur 20 à 100000 selon les GAPs<sup>13</sup>.

Comme pour les GEFs, les autres domaines protéiques participeraient à l'autorégulation de la protéine, l'association aux lipides membranaires, la localisation subcellulaire ou encore la connexion avec différentes voies de signalisation par des domaines impliqués dans l'interaction protéine-protéine, lipide-protéine, aux seconds messagers ou présentant des sites de phosphorylation. Une diversité de domaines amenant à considérer les GEFs et les GAPs comme des intégrateurs de différentes voies de signalisation et probablement impliquée aussi dans des fonctions GEF/GAP indépendantes.

La majorité des GAPs n'a pas été encore caractérisée. Selon cette même approche *in silico* et *in vitro* la sélectivité des 10 différentes GAPs a été récemment déterminée sur les 12 différentes RHO. Aucune GAP ne montre de grande différence de sélectivité entre les différentes RHO. Dans cette même étude, les auteurs suggèrent également la participation des autres domaines fonctionnels dans la sélectivité et la modulation de l'activité catalytique du domaine RHOGAP<sup>13</sup>.

Ainsi, la grande diversité structurale et fonctionnelle des régulateurs du switch GTPasique implique d'interpréter avec grande prudence les expériences visant à surexprimer ou sous exprimer les RHOGEFs et des RHOGAPs. Les conséquences fonctionnelles observées ne peuvent pas en effet être seulement attribuées qu'à la modulation d'activité des protéines RHO.



**Figure 6 :** Mécanismes moléculaires associés à la réaction d'échange de nucléotide par les GEFs (A) et l'hydrolyse par les GAPs (B), d'après <sup>5</sup>. **A :** Les GEFs interagissent avec les régions switch I et II mais surtout avec les résidus situés dans la P-loop et la liaison au  $Mg^{2+}$ , créant des changements structuraux qui sont incompatibles avec la liaison du cation et du nucléotide. **B :** Schéma du mode d'action des GAPs, conservé parmi les GTPases. En rouge est figuré le complexe RHO/GAP. Sont figurés la présence du GDP, du fluorure d'aluminium (mimant l'intermédiaire réactionnel d'hydrolyse du GTP) et de la molécule d'eau (W). Remarquer le groupement arginine du domaine GAP qui interagit avec le résidu Glutamine en 61 lui même dirigé vers le phosphate  $\gamma$  du GTP. Cette interaction aboutit à une stabilisation du switch II accélérant la réaction catalytique.

### 3. La partie C-terminale et l'interaction avec les GDIs

L'activité des protéines de la super-famille RAS est intimement liée à leur localisation cellulaire. Or, celle-ci est largement dépendante d'une modification post traductionnelle de nature lipidique (cf. Figure 7B pour les détails de la réaction d'isoprénnylation). La majorité des protéines ont une séquence C terminale CAAX permettant la liaison covalente d'un motif isoprénique. Juste en amont de la boîte CAAX se situe une région hypervariable entre les trois protéines : pour RHOA et RHOC, cette région de 10 acides aminés contient des acides aminés basiques tandis que pour RHOB, cette région contient des acides aminés polaires et en particulier deux cystéines en amont de la cystéine C-terminale. RHOA et RHOC sont exclusivement géranyl-géranylées, tandis que RHOB peut être aussi bien géranyl-géranylée (RHOB-GG) que farnésylée (RHOB-F) et présenter sur ses deux résidus cystéine une palmitoylation.

#### a. Ancrage membranaire des protéines de la sous-famille RHOA

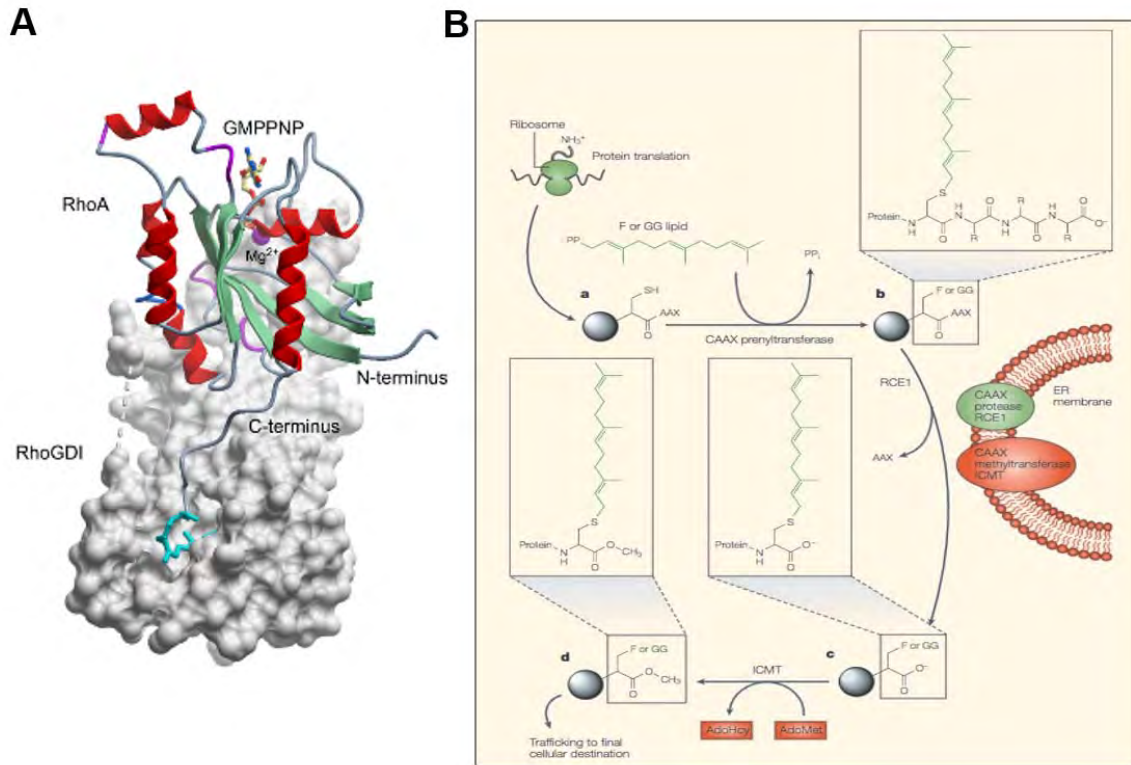
La reconnaissance de la boîte CAAX, associée aux acides aminés situés dans le voisinage immédiat (séquence polybasique ou palmitoylation des résidus cystéines à proximité) définit la localisation de ces protéines. Ainsi RHOA et RHOC sont majoritairement cytosoliques et faiblement retrouvées à la membrane plasmique tandis que RHOB est associée à la membrane plasmique, aux endosomes précoces et au comportement pré-lysosomal<sup>14</sup>. Les 2 formes de RHOB auraient des localisations cellulaires différentes : alors que RHOB-GG est retrouvée au niveau des endosomes, RHOB-F est à la membrane plasmique<sup>15,16</sup>. L'utilisation d'inhibiteurs de prénylation a permis de montrer au laboratoire que la modification de RHOA par un groupement lipidique (farnésyl ou géranyl-géranyl) était nécessaire à sa fonction<sup>17</sup>. Leur localisation est donc intimement liée à leurs fonctions : l'activation de RHOA s'accompagne de sa translocation à la membrane plasmique<sup>18</sup>, aux jonctions intercellulaires et au sillon de clivage pendant la cytokinèse<sup>19</sup>.

Si la région hypervariable gouverne l'adressage de ces protéines aux différents compartiments membranaires, cet adressage est régulé par leur liaison à une troisième classe de partenaires, les GDIs (RHO-GDP Dissociation Inhibitor)<sup>20,21</sup>. A noter que dans la famille RAS, seules les familles RHO et RAB font l'objet d'un troisième niveau de régulation au niveau de leur localisation, exercé par les GDIs.

## b. Les GDI

Malgré la vingtaine de petites G identifiées dans la famille RHO, il n'existe que 3 GDIs mais leur rôle est encore véritablement mal délimité. Ces protéines diffèrent par leur distribution tissulaire, RHO-GDI $\alpha$  étant ubiquitaire et fortement exprimé tandis que RHO-GDI $\beta$  est restreint aux lignées hématopoïétiques et RHO-GDI  $\gamma$  faiblement mis en évidence dans les tissus cérébraux, pulmonaires, pancréatiques, rénaux et testiculaires<sup>22,23</sup>. Le spectre de leur sélectivité est loin d'être totalement connu, RHO-GDI $\alpha$  étant le plus étudié et capable de se lier à RHOA, RHOC, RAC1, RAC2 et CDC42. Ce sont des protéines qui se lient aussi bien à la forme liant le GDP que le GTP et avec une forte affinité de l'ordre du nanomolaire voire picomolaire<sup>23,24</sup>. Elles sont constituées de deux domaines protéiques : un domaine N-terminal qui interagit fortement avec les domaines  $\alpha 2$  et  $\beta 3$  et avec les régions switch I et II et un domaine C-terminal, Ig-like, qui permet d'englober le groupement isoprénique de la GTPase, incompatible avec la nature hydrophile du cytosol (Figure 7A). Les nombreux contacts établis avec la GTPase résultent en une réorganisation des régions des switch permettant d'inhiber l'échange du GDP et l'hydrolyse du GTP. Plusieurs fonctions découlent de cette propriété. Elles permettent de protéger les petites protéines G matures, en absence de leur liaison aux membranes, de leur dégradation par le protéasome<sup>25</sup>. De surcroît, ce sont des protéines qui permettent aux protéines RHO d'être transportées entre les différents compartiments membranaires. Enfin, elles extraient les GTPases activées des membranes, assurant un recyclage des protéines vers le cytosol. En conséquence de quoi les GDIs sont aujourd'hui comprises comme des molécules « chaperons », permettant de constituer un pool cytosolique de GTPases soluble et inactif mais immédiatement mobilisable suite à un stimulus<sup>22</sup>. Très récemment, l'interaction entre une RHOGTPase et un GDI a pu être étudiée pour la première fois dans les dimensions spatiale et temporelle. Les auteurs montrent que l'interaction avec le GDI $\alpha$  est corrélée avec l'activation de CDC42, et suggèrent ainsi que l'activation spatiale et temporelle des GTPases RHO fait intervenir véritablement les trois types de partenaires, GEFs, GAPs et GDIs<sup>26</sup>.





**Figure 7: A :** CoCrystal de la protéine RHOA au RHOGDI1. Ce co-cristal révèle ainsi comment le groupement prényl (en turquoise) est protégé par le domaine immunoglobuline-like du GDI<sup>24</sup>. **B :** Mécanisme moléculaire permettant la prénylation des petites protéines G. a) Une farnésyltransférase ou une géranylgeranyl transférase rajoute un groupement lipidique aux protéines nouvellement synthétisées sur le résidu Cystéine. b) et c) dans le RE, l'enzyme RCE1 clive les trois derniers acides aminés AAX et l'enzyme ICMT (isoprenylcysteine carboxyl méthyltransférase) rajoute un groupement méthyl au carbone C-terminal. d) les protéines sont alors séquestrées dans le cytosol par l'intermédiaire des GDI et suite à un stimulus, par des mécanismes encore mal connus, seront dirigées vers leur compartiment membranaire. D'après <sup>27</sup>. L'orientation des GTPases vers la farnésylation ou la géranylgeranylation dépend de la séquence d'acides aminés à l'extrémité C-terminale et de leur reconnaissance par différents variants des protéines de structures SmgGDS (small GTPase guanosine diphosphate dissociation stimulator).

## B. Propriétés fonctionnelles de la sous-famille RHOA

Les protéines de la super-famille RAS autres que la famille RHO régulent des fonctions cellulaires suivantes<sup>2</sup> :

- La famille RAS est impliquée dans la régulation de la prolifération, de la différenciation, de la morphologie cellulaire, de l'apoptose et l'expression génique.
- La famille RAB régule le trafic intracellulaire des vésicules ainsi que celui des protéines entre les différents organelles des voies de sécrétion ou d'endocytose.
- La famille ARF contrôle le recyclage des vésicules au cours de l'endocytose et de l'exocytose.
- La famille RAN est la plus représentée dans la cellule ( $6\mu\text{M}$ )<sup>28</sup> et ne comprend pourtant qu'un seul membre. Sa principale fonction réside dans la régulation du transport nucléocytoplasmique des protéines et des ARN mais il intervient également dans l'organisation des microtubules lors de la mitose, l'assemblage de l'enveloppe nucléaire et la réplication de l'ADN<sup>28</sup>.

Les protéines RHO présentent quant à elles la particularité de réguler de très nombreuses et diverses fonctions cellulaires<sup>29,30</sup>. L'organisation du cytosquelette d'actine est la première fonction des protéines RHO qui a été découverte. RHOA induit l'assemblage des fibres de stress d'actine en réponse au LPA, RAC1 la formation de larges protrusions riches en actine à la surface des cellules (les lamellipodes) en réponse au PDGF et CDC42 celle de fines extensions membranaires également riches en actine, les filopodes. A leur fonction première d'organisation du cytosquelette d'actine se rajoutent celles de réguler la dynamique des microtubules, le transport vésiculaire, l'expression génique dépendante du SRF et NF $\kappa$ B, la balance apoptose/survie mais aussi des activités enzymatiques telles que la NADPH oxydase dans les granulocytes. Les RHO participent donc au contrôle de nombreuses fonctions cellulaires essentielles dépendantes du cytosquelette d'actine (cytokinèse, phagocytose, pinocytose, migration, la polarité cellulaire, morphologie et direction axonale) mais également d'autres indépendantes, telles que la progression dans le cycle cellulaire, la sécrétion vésiculaire, la transcription génique.

Au niveau moléculaire, les protéines RHO participent donc à la réponse cellulaire suite à une grande diversité de stimuli : chimiques (facteurs de croissance, cytokines et hormones) ou physiques (interaction avec la matrice extracellulaire, adhésions intercellulaires, stress mécaniques de tension...). Cette diversité de stimuli engage une diversité de récepteurs membranaires (intégrines, récepteurs à activité tyrosine kinase, RCPG, Cadhérines, récepteurs à domaine Immunoglobuline...) qui à leur tour vont stimuler la grande famille des GEFs. Pour répondre à cette diversité, il existe en effet une

multiplicité de partenaires avec lesquels les GTPases RHO interagissent : aujourd'hui, 3 GDIs, plus de 80 GEFs et GAPs et 101 effecteurs ont été recensés, faisant de cette famille celle qui compte le plus de partenaires, avec un rapport partenaire/protéine RHO moyen de 3 pour 1<sup>12</sup>.

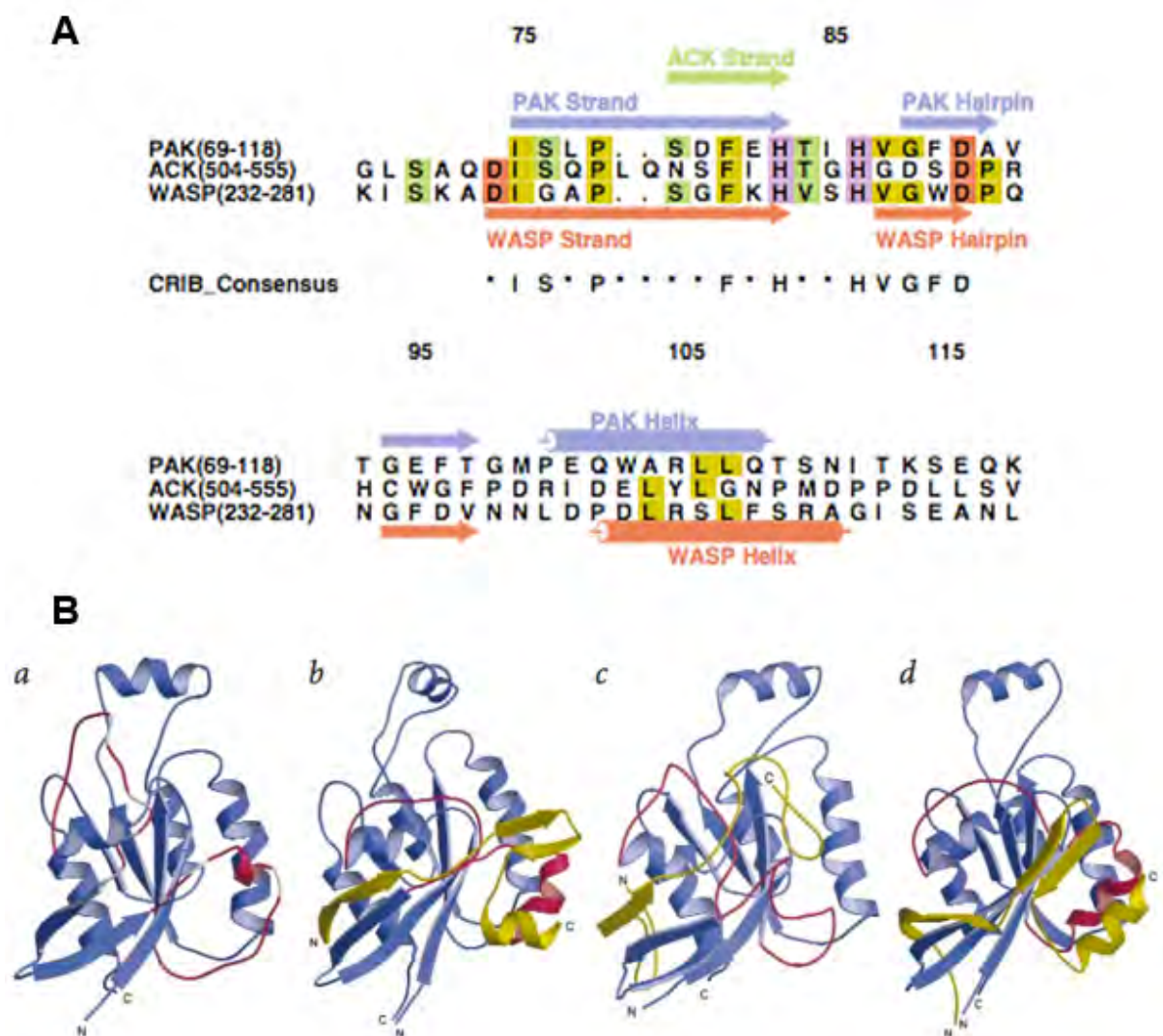
## 1. Une diversité d'effecteurs

Initialement découvertes par leur rôle sur le cytosquelette d'actine, les protéines RHO sont pourtant dépourvues de domaine de liaison identifié comme pouvant s'y lier. Dès lors, l'hypothèse de l'existence de protéines adaptatrices intermédiaires a été émise. Théoriquement, sont définis comme effecteurs des protéines qui sont capables de reconnaître la forme liée au GTP de RHOA<sup>31</sup>. En l'absence de séquences conservées dans leurs structures, la majorité des effecteurs des RHO a été identifiée dans les années 1990 par des expériences de complémentation en double hybride chez la levure ou par chromatographie d'affinité à partir de banques d'expression et caractérisées *in vitro* après purification. Aujourd'hui, plus d'une centaine d'effecteurs a été mise en évidence mais il est possible que tout le spectre n'ait pas encore été identifié, les méthodes d'étude d'interactions protéine/protéine à haut débit ayant révélé un grand nombre d'interactions potentielles<sup>32</sup>. Leurs diversités structurale et fonctionnelle les rendent très difficiles à classer.

### a. Structure des effecteurs

Les effecteurs sont des protéines de haut poids moléculaire, organisées en plusieurs domaines fonctionnels. Ils possèdent des domaines de liaison aux GTPases RHO qui diffèrent selon le type de sous-famille auquel ils se lient<sup>31</sup>.

Une majorité d'effecteurs des sous-familles RAC et CDC42 (PAK, ACK, WASP) ont un domaine de liaison N-terminal contenant une séquence consensus CRIB (CDC42/RAC-interactive binding). Le site de liaison sur la GTPase inclue les régions du switch, la région  $\alpha 1$  et  $\alpha 5$  ainsi que le brin  $\beta 2$ . Dans les trois effecteurs, la partie N-terminale du GBD (GTPase Binding Domain) se structure en un feuillet  $\beta$  intermoléculaire en se liant au brin  $\beta 2$  de CDC42. La partie C terminale du GBD adopte quant à elle différentes structures entre ces 3 effecteurs (Figure 8)<sup>33</sup>.



**Figure 8 :** **A :** Comparaison des séquences primaires des effecteurs ACK, WASP et PAK. Les structures secondaires adoptées en présence de CDC42 sont notées. **B :** Comparaison des structures de CDC42 (a), en complexe avec PAK (b), ACK (c) et WASP (d). Dans ces représentations en rubans les effecteurs sont en jaune, CDC42 en bleu, exceptée la région des switches en rouge (switch I en haut à gauche et switch II en bas à droite). Noter que les effecteurs à motif CRIB établissent de nombreux contacts avec leur GTPase. D'après <sup>33</sup>.

Les domaines de liaison des effecteurs vis à vis des protéines de la sous-famille RHOA peuvent être répartis en 3 classes selon leurs homologues de séquence et de structure : hélice parallèle (coiled coil) pour ROCK, Citron-kinase, Kinectin ; hélice antiparallèle (ACC antiparallèle Coiled Coil) pour PRK/PKN, Rhoophilin et Rhotekin ; hélice  $\alpha$  dans le cas de mDia. Les effecteurs sont capables de reconnaître préférentiellement l'état actif des protéines RHO. Ainsi, ils doivent établir des interactions avec les résidus d'acides aminés concernés par le changement de conformation. Les deux régions switch de RHOA sont effectivement impliquées dans la liaison à ROCK, tout comme elles le sont avec mDia, Rhotekin et PRK (Figures 9 et 10). Les données cristallographiques montrent également que les

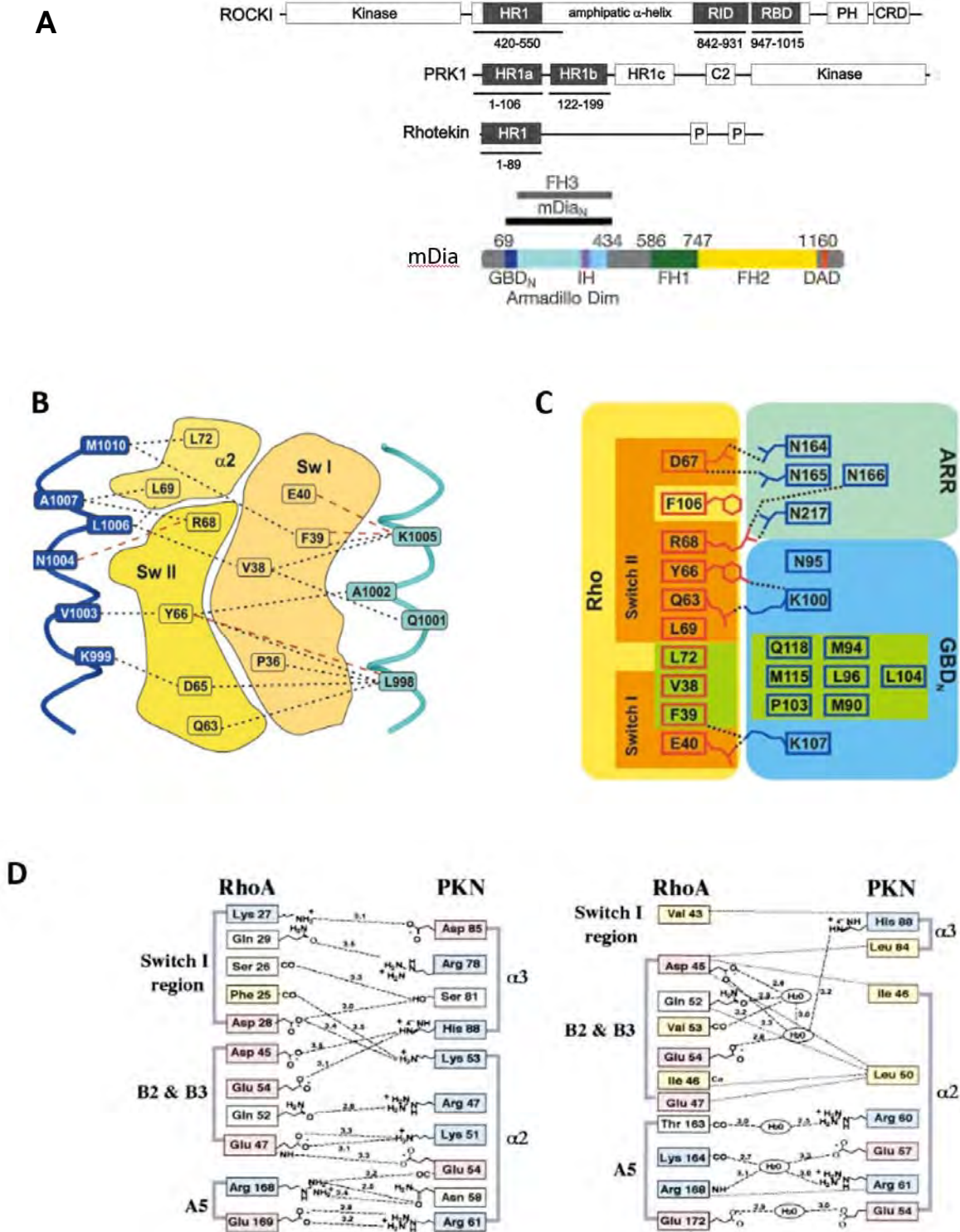
liaisons de PKN, ROCK et mDia sur les protéines RHO sont mutuellement exclusives mais qu'elles sont toutes trois établies selon le même « principe » : des interactions hydrophobes impliquant les résidus Valine 38, Phenylalanine 39 and Leucine 72 des RHO constituent le centre de l'interface d'interaction et sont stabilisées en périphérie par des interactions électrostatiques.

ROCK a été le premier effecteur de RHOA identifié et appartient à la grande famille des AGC protéines kinases (au même titre que PKA, Akt/PKB, PKC, PKG, PRK/PKN). Cette grande protéine de 1388 acides aminés (160kDa) se structure selon un domaine N-terminal portant l'activité kinase, une grande région centrale en hélice (coiled coil) englobant le site de liaison aux protéines RHO et en C terminal, un domaine PH incluant un sous-domaine riche en cystéine (CRD). La résolution du cristal d'un fragment de ROCK avec RHOA montre que le fragment de ROCK interagit avec RHOA sous forme de dimère et que les deux hélices interagissent de façon complémentaire avec les régions du switch exclusivement, par un motif minimal de liaison de 13 acides aminés : une hélice interagit préférentiellement avec le switch I tandis que l'autre interagit avec le switch II (figure 9B). Cependant, Ahmandian et Dvorsky émettent l'hypothèse de l'existence d'autres domaines de liaison de ROCK sur RHOA, notamment par les résultats de mesure de l'affinité du domaine RBD, non compatible avec celle d'un effecteur. Ils déterminent ainsi l'existence d'un second domaine RID (Rho interacting domain) juste en amont du domaine RBD et un domaine HR1, situé au tout début du domaine Coiled Coil et ne partageant que peu d'homologies avec le domaine HR1 de PRK. Ce domaine se lie à RHOA de façon indépendante du nucléotide ce qui amène les auteurs à conclure à l'existence d'un site de liaison autre que le switch de ROCK sur RHOA (Figure 10A1, 10B3).

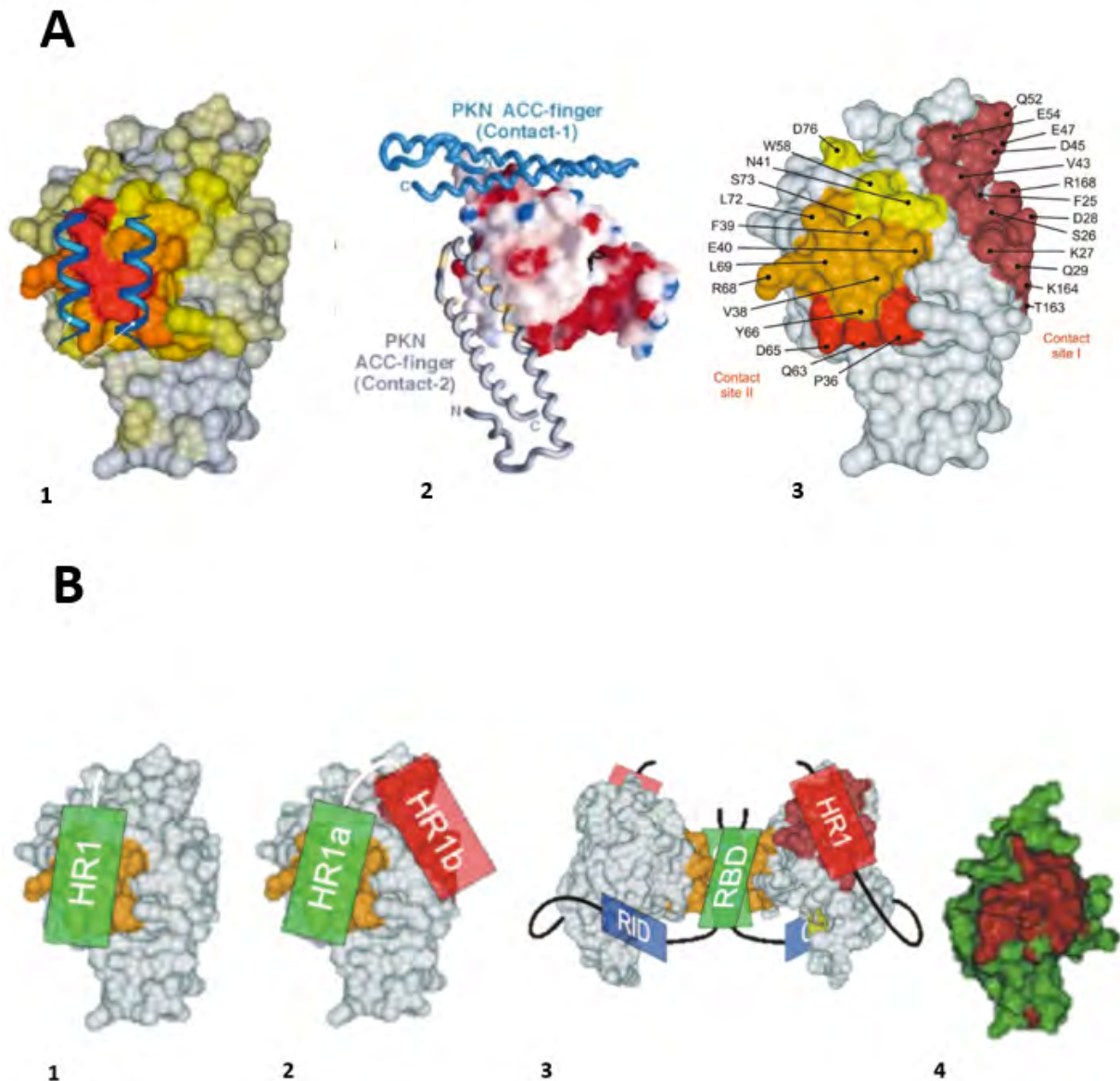
PRK/PKN possède en N-terminal une région polybasique et 3 domaines leucine zipper-like répétés (respectivement nommés HR1a, HR1b et HR1c pour Homology Region) tandis que le domaine kinase se situe en C-terminal. La partie N-terminale se structure en une boucle constituée d'une petite hélice  $\alpha 1$  suivie de deux hélices  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  plus grandes le tout formant une structure désignée sous le terme de « ACC finger », pour Antiparallel Coiled Coil (Figures 9D, 10A2, 10B2). Les hélices  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  contiennent la région basique et le premier domaine leucine zipper. Le domaine HR1a présente deux sites de liaison indépendants sur RHOA, nommés contact site I et contact site II. Le premier implique les extrémités du switch I, les brins  $\beta 2/\beta 3$  et l'hélice  $\alpha 5$  de RHOA tandis que le second est superposable à celui de ROCK et englobe les régions switch I et II et le brin  $\beta 3$ . Le domaine HR1b a été identifié comme se liant à RHOA de façon indépendante du type de nucléotide ainsi que sur RAC1. L'analyse des acides aminés impliqués dans l'interaction conduit les auteurs à suggérer, sans toutefois le démontrer, que le domaine HR1a se lie au niveau du site de contact II tandis que le HR1b se lie sur le contact I. Nous retiendrons simplement la possibilité d'une même molécule d'interagir sur des épitopes indépendants sur RHOA.

Le domaine HR a été retrouvé par homologie de séquence sur la Rhotekin et la Rhophilin, suggérant une structure en ACC finger également pour ces effecteurs, mais sans toutefois le démontrer par une structure cristallographique (Figure 10B1).

La protéine mDia présente le domaine de liaison aux protéines G en N-terminal, suivi d'un domaine FH3 (Formin Homology) puis de deux domaines FH1 et FH2 dont la fonction est d'initier l'assemblage des filaments d'actine. En position C-terminale est retrouvé un domaine DAD (Diaphanous Auto-inhibitory Domain) rapporté pour maintenir la protéine dans une conformation inactive. Le cristal de la partie N-terminale révèle que le domaine de liaison aux protéines RHO est exclusivement composé d'hélices  $\alpha$ . Le GBD interagit principalement avec le switch I et II et les hélices  $\alpha$  de la région ARR (Armadillo Repeat Region) interagissent principalement avec le switch II (Figures 9C et 10B4)<sup>34</sup>. La superposition de la forme inactive de RHOA avec celle impliquée dans le complexe avec mDia révèle une position différente des acides aminés 38, 39 et 40 du switch I et constituant le patch d'interactions hydrophobes, confirmant ainsi la préférence pour la forme active de la protéine.



**Figure 9** : Structure des principaux effecteurs de RHOA et leur mode de liaison à RHOA. **A** : Présentation des différents domaines des effecteurs. D'après<sup>34,8</sup>. **B**, **C** et **D** : Résidus d'acides aminés impliqués dans les liaisons du complexe RHOA/effecteur (**B** : ROCK, **C** : mDia, **D** : PKN). **B**, les interactions hydrophobes sont figurées en ligne pointillée grise et les interactions électrostatiques sont figurées en rouge. Sw I et II : Switch I et II. D'après<sup>35</sup>. **C** : le patch d'interaction hydrophobe est figuré en vert tandis que les liaisons électrostatiques sont en pointillés. ARR : Armadillo Repeat Region. D'après<sup>8</sup>. **D** : A droite les interactions H et à gauche, les liaisons de van de der Walls. D'après<sup>36</sup>.

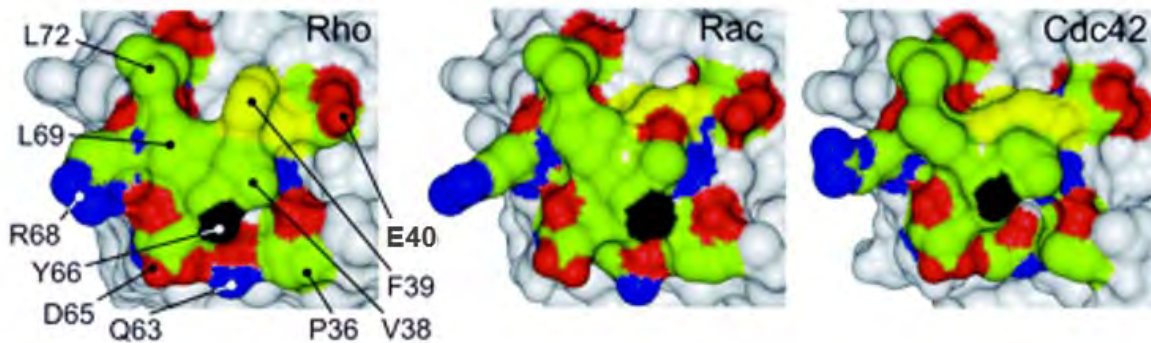


**Figure 10 : A :** Modélisation de la protéine RHOA et des sites de contact avec les effecteurs PRK et ROCK. En 1 : Site de liaison des chaînes  $\alpha$  du domaine coiled coil de ROCK sur RHOA. En 2 : localisation des sites de contact de PRK sur RHOA ; en 3 : Superposition des domaines de liaison de ROCK et PRK sur RHOA. En bordeaux est figuré le site de contact I de PRK, non concerné par le changement conformationnel, en orange les résidus d'acides aminés communs aux interfaces d'interaction de ROCK et PRK, les résidus spécifiques de ROCK et PRK sont respectivement figurés en rouge et en jaune. D'après <sup>35</sup>. **B :** Modélisation de la liaison des différents effecteurs sur RHOA : 1, domaine HR1 de la Rhotekin, 2, domaines HR1a et HR1b de PRK, 3, domaines potentiels supplémentaires de liaison de ROCK 4, lieu d'interaction de mDia sur RHOC. D'après <sup>8,34</sup>.



### *Sélectivité au sein de la famille RHO*

De la même façon que les GEFs et les GAPs, certains effecteurs peuvent être communs à plusieurs GTPases, alors que d'autres présentent une sélectivité restreinte à une sous-famille. Par exemple, ROCK est une cible exclusive de RHO et n'est pas reconnue par RAC ni CDC42. A l'inverse, PAK est une cible de RAC et CDC42 mais pas de RHO. RHO, RAC et CDC42 sont identiques dans la région du switch II et diffèrent dans la région du switch I en position 40 sur RHOA (acide glutamique à la place d'un acide aspartique). Or dans le complexe RHOA/ROCK cet acide aminé établit une liaison avec le résidu lysine 1005 de ROCK, permettant de stabiliser son orientation et l'établissement des liaisons hydrophobes avec les résidus Valine 38 et Phénylalanine 39 de RHOA. La superposition des résidus des switch entre RHOA, RAC, et CDC42 montre la différence d'orientation de deux résidus Phénylalanine 39 et Leucine 69 sur RHOA permettant d'expliquer la sélectivité de reconnaissance de ROCK vis à vis de RHOA (Figure 11). D'autre part, la mutation de D38E sur CDC42 diminue de 50 fois son affinité pour PAK3 suggérant que de la même façon, les effecteurs à domaine CRIB utilisent cet acide aminé pour distinguer RHO de RAC et CDC42.



**Figure 11** : Déterminants moléculaires de la liaison sélective de ROCK à RHOA. Représentation en surface des protéines RHOA, RAC et CDC42 dans la même orientation. Les résidus qui interagissent avec ROCK sont colorés en bleu pour les atomes N chargés positivement ; en rouge pour les atomes d'O chargés négativement ; en vert pour les atomes non chargés et hydrophobes ; en noir l'atome d'O du résidu Tyrosine 66 et en jaune le résidu Phénylalanine 39 dont l'orientation est cruciale pour la sélectivité. D'après <sup>35</sup>.

Le cristal PRK/PKN avec RHOA renseigne également sur l'établissement de la sélectivité de reconnaissance entre RHO et RAC/CDC42 en mettant en évidence un jeu d'acides aminés impliqués dans la liaison à RHOA (au niveau du site de contact I) qui diffèrent sur RAC/CDC42 : au niveau du switch I (Lysine 27 and Glutamine 29), au niveau des brins  $\beta 2/\beta 3$  (Acide Glutamique 47, Glutamine 52, and Acide Glutamique 54), et au niveau de l'hélice  $\alpha 5$  (Acide Glutamique 169). Ces acides aminés sont effectivement différents de ceux impliqués dans la sélectivité de reconnaissance entre RAC et CDC42 (Acide Aspartique 38, Valine 42, Glycine 47, et Leucine 174) par les effecteurs WASP et ACK<sup>36</sup>.

Pour mDia, si la dépendance de la sélectivité a été également attribuée au résidu Acide Glutamique 40, la construction d'un mutant F106H (résidu Histidine retrouvé sur RAC et CDC42) diminue drastiquement l'affinité pour la protéine RHOA<sup>8</sup>.

Ce qui suggère donc que d'autres régions que les switch participent pleinement à la liaison avec les effecteurs. Cela avait été soupçonné dès 1998 par l'expression de chimères RHOA/RAC dans des cellules HeLa et l'observation de leurs conséquences sur le cytosquelette d'actine<sup>37</sup>. La comparaison des structures primaires amène à considérer la région  $\alpha 5$  et la région hypervariable comme les principaux déterminants de la sélectivité. En effet, c'est dans la région  $\alpha 5$  que se situent les acides aminés impliqués dans la sélectivité de reconnaissance de CDC42 par WASP et ACK par rapport à PAK<sup>33</sup>. De la même façon, la NADPH oxydase, dépourvue de domaine CRIB, se lie avec des résidus situés dans la boucle  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  et dans la partie C-terminale<sup>38</sup>.

Toutefois, au sein de la sous-famille RHOA, aucune étude structurale n'a mis jusqu'alors en évidence d'effecteur sélectif d'une des trois protéines.

#### b. Affinité des interactions RHO / effecteurs

L'affinité des effecteurs pour les RHO a été le plus souvent estimée à partir des simples domaines de liaison (et non à partir des protéines totales) et principalement par la capacité des effecteurs à inhiber la dissociation d'un nucléotide fluorescent selon la méthode développée par Hermann pour Ras<sup>39</sup>. Dans le tableau ci-dessous (Tableau 1) sont récapitulés les paramètres d'affinité des effecteurs des protéines RHO.

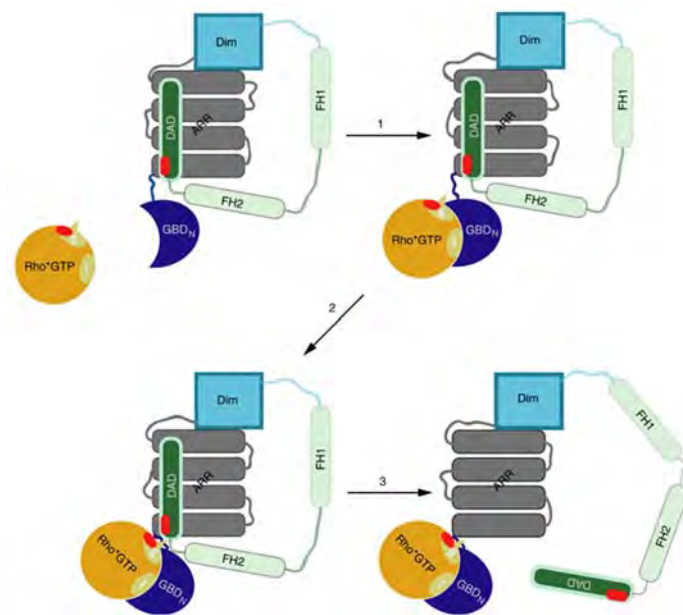
Ahmandian et Blumenstein ont également mesuré l'affinité des effecteurs vis à vis de la protéine chargée GDP : seule la Rhotekin présente une sélectivité importante pour la conformation GTP alors que les différentiels d'affinité pour les domaines de liaison de ROCK ou PRK sont respectivement de 10X et 4X. Les valeurs d'affinité des domaines de ROCK conduisent les auteurs à supposer l'existence sur RHOA d'autres sites de liaison (HR1, RID) afin d'être par effet d'avidité, compatibles avec l'affinité attendue pour des molécules effectrices. Cependant, les auteurs ne montrent pas comment ces trois domaines d'interaction avec RHOA sont agencés dans une molécule ROCK pleine taille.

**Tableau 1 :** Tableau récapitulatif des mesures d'affinité des différents effecteurs pour les formes actives des protéines RHO.

Effecteur	Protéine RHO active	Méthode de mesure	K <sub>D</sub> mesuré	Références
ROCK-RBD	RHOA	Inhibition dissociation nucléotide fluorescent	130nM	34
ROCK-HR1	RHOA		750nM	34
ROCK-RBD	RHOA		130nM	34
ROCK-RID	RHOA		260nM	34
PRK-HR1a	RHOA		150 nM	34
PRK-HR1b	RHOA		1800 nM	34
mDia (69-451)	RHOC		6 nM	8
Rhotekin-HR1	RHOA		9 nM	34
GST-Rhotekin-HR1	RHOA		147 nM	34
PAK (57-141)	RAC1/2/3		490nM/610nM/130nM	40,41
PAK full length	CDC42		610nM	42
PAK (70-92)	CDC42		600nM	43
PAK (63-135)	CDC42		38nM	44
ACK (444-507)	CDC42		50nM	44
PRK-HR1a	RHOA/B/C	Scintillation proximity assay	150/52/82nM	45
PRK-HR1ab	RHOA/B/C		140/15/90nM	45
PRK-HR1a	RHOA/RAC		282/169nM	46
PRK-HR1b	RHOA/RAC		>1µM/68nM	46
PAK (70-132)	RAC		20nM	47
PAK (70-132)	CDC42		20 nM	47
PAK (75-132)	CDC42		770nM	48
ACK (504-545)	CDC42		620nM	48
WASP (210-321)	CDC42		55nM	48
WASP	CDC42		SPR	63-77nM
PAK (51-135)	CDC42	Libération Pi	780nM	50
WASP (215-295)	CDC42		4150nM	50

### c. Mécanismes d'activation des effecteurs

La liaison RHO/effecteur est généralement considérée comme activatrice, résultant de l'interruption d'une interaction intramoléculaire au sein de la protéine effectrice, permettant d'exposer ses domaines fonctionnels. Les données structurales du complexe CDC42/PAK suggèrent un mode d'activation commun, par compétition entre les acides aminés Leucine 67 and Leucine70 de la GTPase et le domaine kinase de la protéine au niveau du résidu Leucine 107 d'une hélice  $\alpha$  du domaine inhibiteur. En se liant sur le domaine inhibiteur, la GTPase libère le domaine catalytique. Puisque les deux résidus Leucine 69 et 72 sur RHOA ont été mis en évidence comme interagissant avec les acides aminés Leucine 1006, Alanine 1007, et Méthionine 1010 de ROCK, et que la partie C-terminale de ROCK (les domaines PH et Cystéine Rich Domain) exerce une inhibition intramoléculaire sur le domaine kinase, alors le modèle proposé pour l'activation de PAK a été transposé<sup>51,52,33</sup>. Concernant mDia, la superposition (partielle, seulement deux acides aminés en périphérie de la région ARR) du site d'interaction de la RHO avec le domaine d'auto-inhibition conduit les auteurs à supposer sans toutefois le démontrer que la liaison aux protéines RHO entraîne la levée de ce domaine et permet l'activation de la protéine. Dans un travail ultérieur, ils montreront que RHOA-GTP parvient à déplacer un complexe constitué de la partie N-terminale de mDia et du domaine d'auto-inhibition et proposeront un modèle dans lequel la liaison de la forme active de RHOA à mDia se fait d'abord par la formation d'un complexe ternaire de faible affinité (RHO, GBD, DAD) dans lequel RHO interagit avec le domaine GBD. Un changement conformationnel permet de rapprocher le GBD de la région ARR pour former un complexe de forte affinité et entraînant par remaniements des liaisons le départ du domaine DAD. Ce modèle doit cependant être confirmé par des expériences effectuées sur la protéine mDia pleine taille (Figure 12). En effet le schéma conceptuel d'activation de ROCK vient d'être largement remis en cause par la résolution de la structure en microscopie électronique de l'holoprotéine ROCKII<sup>53,54</sup>. Les auteurs démontrent que l'activité kinase de la protéine ne serait ni dépendante de la liaison à RHOA, ni à la membrane plasmique, et qu'il n'existerait pas d'inhibition intramoléculaire. Les auteurs proposent alors un schéma selon lequel la longueur du domaine coil-coiled serait le véritable déterminant de l'activité kinase de la protéine.



**Figure 12** : Modèle d'activation proposé de mDia par les protéines RHO. D'après<sup>55</sup>

#### d. Fonctions des effecteurs majeurs de la sous-famille RHOA

Selon leurs fonctions, les effecteurs de la sous-famille RHOA peuvent être regroupés en 3 catégories : les effecteurs possédant une activité Serine/Thréonine kinase (PRK/PKN, ROCK, citron K), ceux possédant une activité lipide kinase (PiP5K, PLD) et enfin ceux ne possédant pas d'activité kinase et jouant un rôle structural (Rhotekin, Rhophilin, mDia, Kinectin)<sup>56</sup>. Le rôle physiologique de certains de ces effecteurs est encore mal connu faute d'étude extensive et il n'existe pas de souris KO pour tous les effecteurs. Les données obtenues pour les principaux effecteurs sont compilées dans la revue de Narumya, extrêmement bien documentée<sup>57</sup>. Très brièvement, nous retiendrons que :

- ROCK (RHO-associated Coiled-coil Containing Protein Kinase) est impliquée dans la contractilité du cytosquelette d'actine. 2 isoformes ont été mises en évidence.
- mDia (mammalian homolog of Drosophila Diaphanous) participe à l'élongation des filaments d'actine et stabilise les microtubules. 3 isoformes différents ont été identifiés chez les mammifères et des rôles dans la cytokinèse ont été attribués aux isoformes mDia2 et mDia3.
- Citron Kinase intervient principalement au moment de la cytokinèse, par action sur l'anneau contractile d'actine ;
- PRK/PKN possédant un domaine proche de la Protéine Kinase C, participe à la régulation du cytosquelette d'actine par son action sur  $\alpha$ -Actinin ainsi qu'à la régulation des filaments intermédiaires. 3 isoformes sont également recensées.
- Rhotekin a été impliquée dans la polarité cellulaire, la formation des adhésions focales et l'organisation des Septines. Le groupe de O'Connor a récemment mis en évidence la liaison

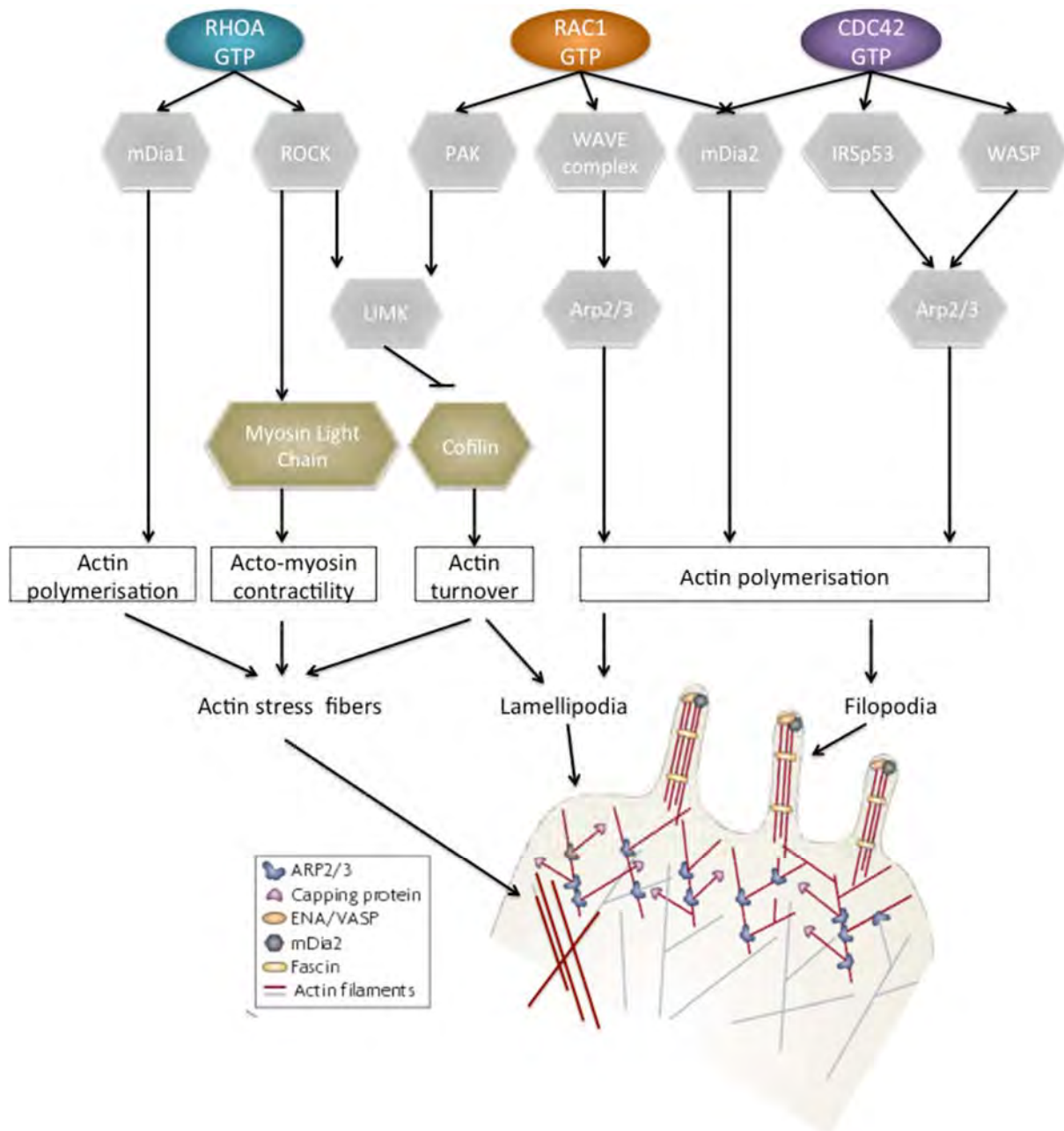
de la Rhotekin par son domaine RBD à la protéine S100A4, suggérant ainsi un rôle majeur de cet effecteur dans la migration cellulaire<sup>58</sup>. 2 isoformes existent.

Les différents effecteurs des RHO présentent eux-mêmes de nombreuses cibles différentes, mais partagent également certaines (ex : LIMK pour ROCK et PAK, MYPT pour ROCK et MRCK). Il en ressort un réseau de signalisation d'aval très intriqué entre les différentes protéines RHO.

Enfin, les effecteurs peuvent être activés par d'autres protéines que les RHO<sup>59</sup>: dans la cascade de signalisation apoptotique, ROCK peut être libéré de son domaine d'auto-inhibition par clivage issu des caspases. D'autres petites GTPases, telles que RND3 peuvent en revanche se lier à son domaine N-terminal et inhiber son activité kinase. Enfin, différents sites de phosphorylation peuvent modifier sa localisation subcellulaire. En conséquence de quoi, les stratégies utilisant des dominants négatifs des effecteurs des RHO pour étudier la fonction de ces dernières sont inévitablement à considérer avec précautions.

#### ***Mécanismes moléculaires régulant le cytosquelette d'actine***

Les voies de signalisation qui contrôlent l'organisation du cytosquelette d'actine sont complexes par la quantité de protéines intervenant<sup>60</sup>. Cependant, de grandes voies de signalisation sont maintenant bien établies pour les trois protéines régulatrices majeures RHOA, RAC, et CDC42. Elles sont décrites dans le schéma suivant (Figure 13).



**Figure 13 :** Principaux effecteurs de la famille RHO participant au contrôle du cytosquelette d'actine, d'après <sup>3,61</sup>.

La polymérisation des filaments d'actine est étroitement régulée dans une cellule soit au niveau des extrémités + (« barbed ») par l'ajout de monomères soit au niveau des extrémités – (« pointed ») par leur dépolymérisation. De plus, les filaments d'actine grandissent jusqu'à ce qu'ils soient « coiffés ». De sorte que la polymérisation de l'actine peut être régulée à plusieurs niveaux : en augmentant l'addition de monomères à l'extrémité +, en générant de nouveaux filaments, en augmentant le nombre d'extrémités + ou en réduisant la dépolymérisation. Les Formins et les membres de la famille Ena/VASP rajoutent des monomères d'actine à l'extrémité + tandis que les protéines du complexe Arp2/3 permettent la génération de nouveaux filaments d'actine,

principalement sur le côté de filaments préexistants. La Cofilin augmente le nombre d'extrémités + en sectionnant les filaments d'actine préexistants.

Un lamellipode est principalement constitué d'un réseau « branché », en arc de cercle de filaments d'actine. L'activité du complexe Arp2/3 est principalement favorisée par l'effecteur WAVE de RAC1 (*via* la protéine adaptatrice IRSp53), qui rapproche le complexe de nucléation des filaments d'actine. Les filopodes sont constitués par des filaments d'actines linéaires, et CDC42 *via* WASP ou N-WASP active de la même façon le complexe de nucléation. D'autres protéines, telles que la Fascin interviennent alors pour structurer ces filaments en filaments linéaires. D'autre part, RAC peut également affecter la dépolymérisation de l'actine *via* son effecteur PAK. La LIM-Kinase en aval phosphoryle à son tour la Cofilin, qui inhibée, perd sa capacité à libérer les extrémités masquées des filaments d'actine.

RHOA permet la formation de fibres de stress d'actine et la contractilité du cytosquelette d'acto-myosine principalement par son effecteur ROCK (I et II). Rappelons que la phosphorylation des chaînes légères de myosine est un événement clé dans la régulation de la contractilité acto-myosine, permettant de libérer la chaîne lourde de myosine et l'association de la tête des chaînes lourdes avec les filaments d'actine. ROCK augmente la phosphorylation de la myosine de deux manières : soit directement en agissant comme une kinase sur les chaînes de myosine soit indirectement en inhibant l'activité de phosphatase des chaînes légères de myosine. D'autre part, ROCK *via* la LIMKinase inhibe la Cofilin (phosphorylation de la Serine 3) pour stabiliser les filaments d'actine et favoriser leur élongation. RHOA contrôle également la polymérisation de l'actine par son effecteur de la famille des Formines, mDia1, qui, constamment accroché à l'extrémité des filaments d'actine, y rajoute des monomères d'actine. Enfin une autre fonction canonique de l'activité de RHOA réside dans la stabilisation des adhésions focales. Les premières observations de Ridley montrent que celles ci sont intimement liées à la formation des fibres de stress<sup>62</sup> et en réalité, fibres de stress et adhésions focales constituent des structures interactives : les adhésions induisent la formation des fibres de stress et la contraction des fibres de stress renforce la croissance des adhésions<sup>63</sup>. Les adhésions focales rassemblent un grand nombre de protéines, aux rôles variés (structural, adaptateur, régulateur, transduction du signal) et la Vinculine est une protéine considérée comme marqueur des adhésions focales. Les effecteurs ROCK et mDia sembleraient tous les deux impliqués dans la formation des adhésions focales, et un autre effecteur, phosphatidylinositol 4-phosphate5-kinase PIP5-K, *via* la production de PiP2 permettrait le démasquage des sites de liaison aux fibres de stress d'actine de la Vinculine<sup>64</sup>.



## 2. Une diversité de modifications post traductionnelles

Une autre propriété remarquable des protéines de la famille RHO réside dans la diversité de leurs modifications post-traductionnelles : greffage d'un groupement isoprène, phosphorylation, sumoylation, ubiquitinylation, récemment colligées dans la revue de Ridley<sup>65</sup>. Ces modifications post-traductionnelles altèrent l'activité et/ou la localisation de la protéine et constituent un niveau à part entière de régulation des GTPases. La plus étudiée est historiquement l'ajout d'un groupement prényl en C-terminal (I.A.3) et les autres modifications post traductionnelles sont aujourd'hui encore mal connues. RHOA peut être phosphorylée sur le résidu Ser188 par la protéine kinase A et la protéine kinase G ce qui augmente sa séquestration par les RHOGDI et diminue donc son activité mais la phosphorylation a été montrée comme protégeant la forme active de la dégradation par le protéasome. RHOC a été mis en évidence comme cible du complexe AKT1/PKB $\alpha$  et la phosphorylation sur la Ser73 est nécessaire pour la transduction du signal. RHOB peut être phosphorylée par la casein kinase 1 sur le résidu Sérine 185, stabilisant la forme liée au GDP<sup>65</sup>.

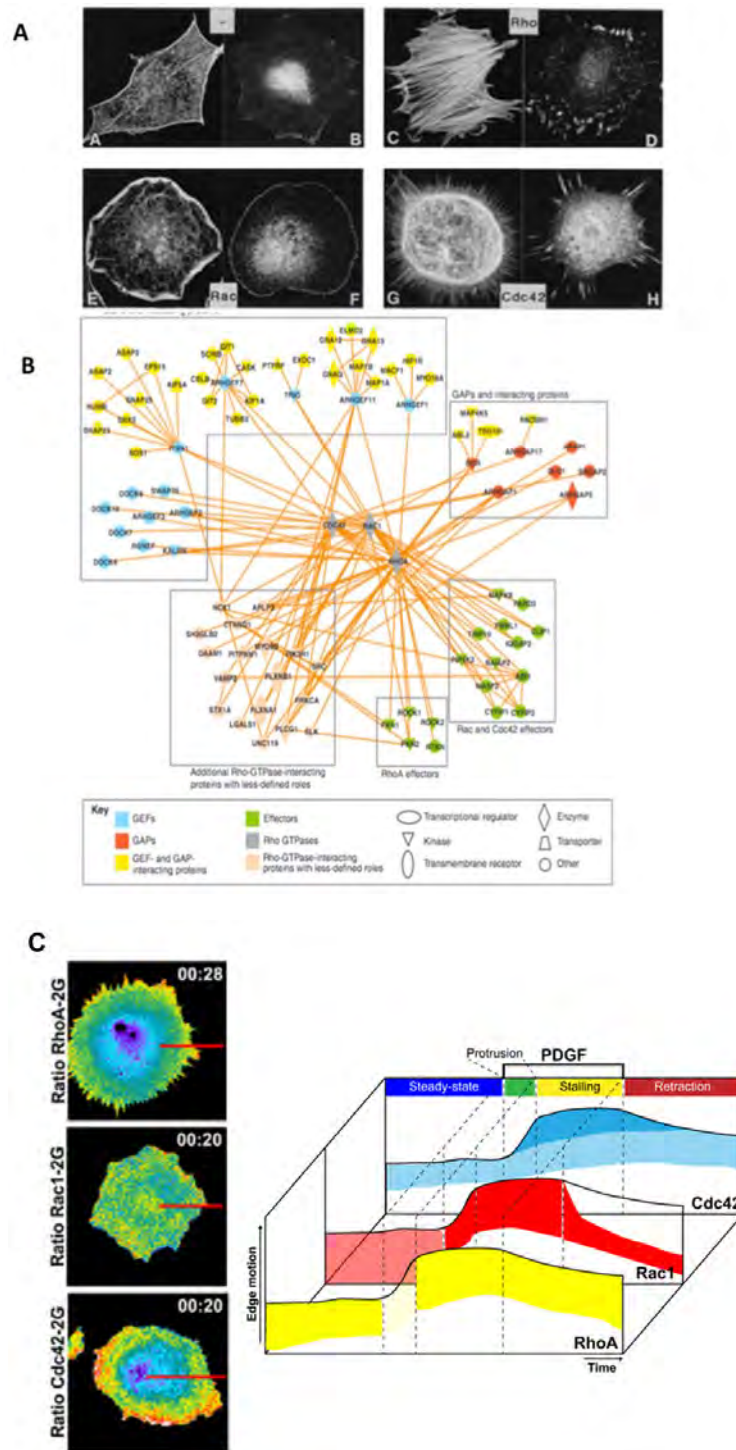
Enfin, les GTPases peuvent être (poly)-ubiquitinylées. L'addition de quatre résidus Ubiquitine ou plus correspond à un signal d'adressage pour le protéasome, permettant ainsi de contrôler l'abondance et le turn-over protéique. De façon intéressante, RHOA peut être ubiquitinylée par 3 complexes enzymatiques différents (SKP1-CUL1-F-box (SCF) complex, SMURF1 (SMAD-specific E3 ubiquitin protein ligase 1) complex et BTB/POZ domain-containing adaptor for CUL3-mediated RHOA degradation (BACURD)-CUL3-RING ubiquitin ligase complex), probablement impliqués différemment selon le contexte cellulaire<sup>65</sup> et le nucléotide lié. Alors que jusqu'à présent il n'a pas été mis en évidence de régulation de RHOC par le protéasome, le complexe SMURF1 et le complexe neddylation-cullin 2-RBX1 E3 ligase interviennent dans la régulation de l'abondance de la protéine RHOB.

Ce chapitre a tenté d'exposer les multiples et diverses composantes de la fonctionnalité des protéines RHO. Il reste à essayer de comprendre les fondements d'un tel nombre et d'une telle diversité de partenaires, de modes de régulation et de fonctions.

### 3. Une activation spatiale et temporelle

#### a. Mise en évidence

Une partie de la réponse à la multiplicité des GEFs, GAPs et effecteurs se trouve dans l'existence d'une régulation spatiale et temporelle de l'activité des protéines RHO. En effet, les travaux fondateurs de Allan Hall au début des années 90 avaient établi que les RHO, RHOA, RAC et CDC42 étaient des acteurs majeurs de la régulation du cytosquelette d'actine dans laquelle chacune de ces protéines assume un rôle différent. RHOA induit l'assemblage des fibres de stress d'actine, RAC1 la formation de larges protrusions riches en actine à la surface des cellules (les lamellipodes) et CDC42 celle de fines extensions membranaires également riches en actine, les filopodes<sup>29</sup>. Au début des années 2000, la mise en évidence de leurs nombreuses autres fonctions concordantes avec celle de leurs nombreux partenaires, a permis de poser l'hypothèse d'une régulation spatiale et temporelle de l'activité, sans toutefois la démontrer. En d'autres termes, selon le contexte spatio-temporel, la localisation de l'activité des RHO peut être modulée par une multitude de voies de signalisation. Ces voies de signalisation répondent tant aux propriétés physiques du microenvironnement (rigidité, confinement, forces de cisaillement...) qu'à ses propriétés chimiques (ligands, gradient, statut oxydoréducteur). C'est au milieu des années 2000, par l'utilisation des nouveaux outils que représentaient les biosenseurs de FRET dans le contexte de la migration cellulaire, que la démonstration a eu lieu. Jusqu'alors la migration de cellules mésenchymales cultivées en 2 dimensions était soutenue par la coordination entre la formation de protrusions d'actine au front de la cellule et la contractilité du cytosquelette dans le corps et à l'arrière de la cellule. Schématiquement, pendant la migration, RAC1 est activé au front de migration et RHOA à l'arrière de la cellule. Les travaux de Pertz montreront en premier lieu que l'activation de RHOA est effectivement spatialement délimitée dans la cellule et que RHOA est effectivement activée à la fois à l'avant et à l'arrière de la cellule pour y assumer différentes fonctions en interagissant avec différents effecteurs. Depuis, il est considéré que des fonctions cellulaires dynamiques (migration, division cellulaire, phagocytose, croissance neuronale) reposant sur un remodelage du cytosquelette d'actine impliquent une régulation spatiale et temporelle extrêmement fine de l'activité des RHO (Figure 14). Comment se met en place cette régulation dans des contextes différents reste aujourd'hui une question à répondre. En d'autres termes, les protéines régulatrices (GEFs, GAPs, GDIs) et effectrices qui interviennent dans chaque pool de RHO activé sont à identifier. Il reste également encore à comprendre les mécanismes moléculaires mis en place pour générer cette régulation spatiotemporelle : quels sont les signaux qui génèrent l'activation des GEFs, comment s'effectue le choix de tel ou tel effecteur, comment s'arrête le signal d'activation<sup>66,65,67</sup> ? Les dernières études apportent quelques éléments de réponse.



**Figure 14 :** Différentes étapes de la compréhension des GTPases RHO. **A :** Travaux fondateurs de l'équipe de Hall<sup>29</sup>. Les GTPases RHO ont été historiquement identifiées par leur rôle différent sur le cytosquelette d'actine. Observation des filaments d'actine et des points d'adhésion dans des fibroblastes déprivés en sérum (- A et B), suite à l'activation de RHOA par le LPA (C et D), à la microinjection de RAC1 (E et F), ou d'un GEF de CDC42 (G et H). **B :** Actuelle compréhension de réseaux de signalisation faisant intervenir les GTPases RHO, proposée par les travaux de Pertz<sup>66</sup>. Exemple de l'interactome de RHOA, RAC1 et CDC42 dans les neurites. **C :** régulation spatiale et temporelle de l'activité de RHOA, RAC et CDC42 dans des fibroblastes murins suite à une stimulation par le PDGF. Issu de <sup>68</sup>.

## b. Principaux déterminants moléculaire de cette activation

Des biosenseurs de l'activation des GEFs et des GAPs ont également été développés afin d'étudier leur régulation spatiale et temporelle.

Les GEFs et les GAPs peuvent présenter des modifications post traductionnelles affectant leur activité. Citons ici pour l'exemple GEF-H1 qui est phosphorylé en début de mitose pour inhiber son activité et permettre l'activation de RHOA responsable de la contraction du fuseau mitotique au moment approprié<sup>65</sup>. Les récepteurs à activité tyrosine kinase ont entre autres comme cibles certains GEFs, et étant eux-mêmes susceptibles de générer des voies de signalisation spatialement délimitées dans la cellule, il est probable qu'ils contribuent à la régulation spatiale et temporelle des GTPases<sup>69</sup>. Concernant les GAPs, retenons en particulier les travaux de Cao ayant mis en évidence la régulation spatiotemporelle de DLC1 (GAP de RHOA) pendant la migration grâce à un switch de phosphorylation<sup>70</sup>. La Phosphorylation de Tensin 3 (TNS3 étant une protéine de liaison connue de DLC1) et de PTEN en réponse à l'EGF entraîne le remodelage des complexes TNS3-DLC1 et PTEN-PI3K en complexes TNS3-PI3K et DLC1-PTEN. En conséquence, TNS3-PI3K se relocalise au front de migration et permet l'activation de RAC1. D'autre part, PTEN-DLC1 se relocalise à l'arrière de la cellule, DLC1 ne peut désactiver RHOA tandis que PTEN inhibe l'activation de RAC1 à cet endroit.

La localisation des GEFs et des GAPs dépend de la composition lipidique de la membrane plasmique et de l'interaction avec certaines protéines de structure des régions membranaires, dite « scaffold » (Shank et Scribble)<sup>69</sup>. Rappelons que les GEFs par l'intermédiaire de leur domaine PH peuvent reconnaître la nature des lipides membranaires. Les protéines participant aux adhésions focales et celles rentrant dans la composition du cytosquelette d'actine peuvent séquestrer les GEFs (myosin et GEFs de la famille Dbl par exemple<sup>71</sup>) et ainsi physiquement délimiter l'activation des RHO. De la même façon, la composition lipidique et les structures membranaires peuvent être reconnues par les GAPs, définissant ainsi leur localisation. Il est en de même pour les protéines des adhésions focales et celles du cytosquelette d'actine (FilGAP piégée par F-actin<sup>69</sup>).

Les GEFs et les GAPs peuvent agir dans le cadre de complexes multimoléculaires contenant déjà les effecteurs des GTPases, déterminant ainsi le choix d'une cible effectrice en particulier. L'exemple le mieux connu étant le complexe formé par le GEF  $\beta$ -PIX de RAC1 et CDC42 avec l'effecteur PAK mis en évidence dans la régulation des adhésions focales<sup>65</sup>. Enfin GEFs et GAPs peuvent appartenir aux mêmes complexes multimoléculaires pour contrôler très précisément la localisation et la durée de l'activité des RHO. Ces complexes peuvent intéresser la même protéine (par exemple, le complexe TIAM1 et BCR pour RAC1) ou des protéines différentes pour antagoniser leur action (RHOA et CDC42 dans un modèle de migration 3D<sup>72</sup>). Citons enfin certaines protéines comme BCR ou ACR qui contiennent déjà en elles-mêmes un domaine GEF et un domaine GAP, et qui dans un modèle de blessure assurent la séparation entre les zones d'activation de RHOA et de CDC42.

Les GDIs peuvent également être phosphorylés ou interagir avec d'autres protéines de structure ce qui peut modifier leur affinité pour les GTPases et offrir un autre moyen de réguler l'activation de celles-ci.

Il semble donc apparaître de ces dernières études qu'un jeu complexe de modification post traductionnelles intéressant à la fois les régulateurs et les GTPases elles-mêmes soit à la base de leur régulation spatiale et temporelle. En outre, l'interaction entre régulateurs et/ou effecteurs et/ou avec des protéines de structure donne un autre moyen de régulation de leur activité. Ces deux moyens réunis sont ainsi pourvoyeurs d'une grande diversité parmi les populations cellulaires pour que les RHO soient activées au bon moment et au bon endroit. Une question importante est donc celle de la dérégulation de leur activité dans le cadre de la tumorigénèse en général et de la progression tumorale ou du processus métastatique en particulier.

### c. Étude de la migration cellulaire comme exemple d'activation spatiale et temporelle des RHO

La migration cellulaire (de cellules mésenchymales en 2D) est un exemple de régulation spatiale et temporelle des GTPases RHO particulièrement étudié dans la littérature.

Quand une cellule non motile reçoit un signal motogénique, le processus migratoire s'enclenche : protrusion de la partie au front de migration cellulaire, formation de nouvelles adhésions, contraction du corps cellulaire et détachement de l'arrière de la cellule. Connaissant les rôles respectifs de RHOA et de RAC1 et CDC42 sur le cytosquelette d'actine, il était communément admis que RHOA était principalement activée à l'arrière de la cellule pour déclencher la contraction cellulaire et rapprocher l'arrière de la cellule tandis que RAC1 et CDC42 étaient activées au front de migration pour favoriser la polymérisation de l'actine. Alors RAC1 était considérée comme favorisant la migration alors que le rôle de RHOA dans la migration était considéré comme l'inhibant. L'arrivée des biosenseurs de FRET dans le domaine des GTPases RHO a largement remis en cause ce schéma. L'analyse combinée des différents signaux de FRET sur les 3 GTPases RHOA, RAC1 et CDC42 dans des cellules en migration a permis de révéler non seulement que les zones d'activation des 3 GTPases étaient distinctes mais aussi que RHOA était également activé au front de migration, que sa zone et sa période d'activation étaient corrélées avec celle des protrusions. RAC1 et CDC42 étaient quant à eux activés de façon décalée à la formation des protrusions et dans une zone en retrait. Un biosenseur de RHOC a été par la suite développé et révèle, par la même méthode, que RHOA et RHOC sont activés de la même façon au front de migration mais que dans une région plus éloignée de la membrane, l'activation de RHOC précède celle de RHOA. Si les biosenseurs de FRET ont permis de mettre en

évidence dans un modèle dynamique, la régulation spatiale et temporelle des GTPases et des rôles jusqu'alors inconnus et distincts entre RHO très homologues, il reste encore beaucoup de questions sur les mécanismes moléculaires, les partenaires des RHO impliqués dans ces régulations. Ainsi, il est supposé, entre autres mécanismes et sans que cela ait été démontré expérimentalement, que GEF H1 permettent d'activer RHOA au front de migration, que mDia soit en aval de RHOA pour permettre la polymérisation de l'actine, qui à son tour permettrait l'activation de RAC1. Le développement de biosenseurs de FRET spécifiques de GEF ou de GAP contribuera largement à une meilleure compréhension de ce processus.

#### 4. Sélectivité au sein de la sous-famille RHOA et redondance fonctionnelle

RHOA, RHOB et RHOC sont homologues à plus de 85% dans leur séquence primaire. Comprendre pourquoi des protéines aussi proches ont été conservées au fil de l'évolution est possible si elles assument effectivement des rôles différents au sein de la cellule.

L'obtention d'organismes KO pour l'une de ces protéines est difficilement interprétable sur le plan de la redondance fonctionnelle : seul le KO de RHOA est léthal au niveau embryonnaire, suggérant soit qu'il existe des fonctions de RHOA qui ne peuvent être compensées par les deux autres protéines, soit qu'au stade embryonnaire, RHOB et RHOC ne sont pas exprimées pour compenser la perte de RHOA. Les animaux KO conditionnels tissus spécifiques établis pour RHOA permettent de montrer que les fonctions sur le cytosquelette d'actine s'avèrent dépendantes du contexte cellulaire. En résumé, cette protéine peut être à la fois essentielle dans une fonction cellulaire donnée, dans un tissu cellulaire donné et à la fois non essentielle dans un autre type cellulaire. Les animaux KO pour RHOB et RHOC ne présentent pas de phénotypes majeurs mais démontrent l'existence de fonctions propres à l'une de ces isoformes et l'existence de fonctions redondantes<sup>73</sup>. L'ensemble des résultats obtenus est regroupé dans la revue de Narumiya<sup>57</sup>.

Ridley s'est particulièrement intéressée à la question de la persistance de 3 protéines aussi homologues. Les travaux de son équipe tendent effectivement à montrer que ces trois protéines, en dépit de leur fort pourcentage d'homologie présentent des rôles différents dans la morphologie cellulaire et la migration<sup>32</sup>. Pour cela, les auteurs comparent les phénotypes cellulaires et les comportements migratoires des cellules suite à l'inhibition sélective de l'expression de RHOA ou RHOC par siARN. Les cellules déficientes en RHOA présentent une morphologie allongée et de nombreuses et étroites protrusions membranaires. Leur capacité migratoire est réduite mais leur capacité invasive en Matrigel devient plus importante. Les cellules déficientes en RHOC présentent une augmentation de l'aire cellulaire et de la largeur des lamellipodes mais voient leurs capacités

migratoires et invasives réduites. La déplétion de RHOB diminue quant à elle la surface cellulaire et augmente la vitesse de migration des cellules, probablement par un effet sur les intégrines ( $\beta 1$ ) et donc sur la dynamique des adhésions focales.

L'existence de fonctions propres à l'une ou l'autre des protéines implique immédiatement la mise en évidence de partenaires protéiques capables de distinguer l'une des trois protéines. Les mesures d'affinités réalisées *in vitro* doivent être précautionneusement extrapolées au contexte intracellulaire, notamment du fait de l'encombrement moléculaire, difficile encore aujourd'hui à prendre en compte dans les études d'interactions protéines-protéines.

La littérature recense en effet quelques exemples de partenaires de la sous-famille RHOA se liant différemment à RHOA, RHOB et RHOC. Par exemple, la GEF XPLN active RHOA et RHOB mais pas RHOC. L'explication moléculaire donnée par les auteurs porte sur le rôle discriminant de l'acide aminé en position 43 sans pour autant le confirmer au niveau structural. De la même façon, SmsgDs, un GEF atypique active RHOA et RHOC mais pas RHOB. Bien que la preuve structurale fasse encore défaut, il semblerait que la région polybasique soit impliquée dans la liaison à cette GEF. Jusqu'à présent, il n'y a pas eu de GAP mise en évidence pour leur sélectivité. La Formin FLMN2 a été également décrite comme sélective de RHOC par son interaction avec l'acide aminé en position 43<sup>74</sup>. Ridley met en évidence la Formin FLMN3 comme sélective de RHOC sans donner d'explication structurale<sup>32</sup>. Nous tirerons de ces exemples la possibilité de discriminer sélectivement ces trois protéines. Et pour preuve supplémentaire, au laboratoire il a déjà été isolé un anticorps recombinant capable de distinguer sélectivement RHOB actif des deux autres membres de la famille RHO<sup>75</sup>.

Afin de comprendre comment une protéine peut être reconnue par autant de partenaires aux structures aussi différentes, Ahmandian et Drovski proposent de recenser les acides aminés sur les RHO impliqués dans une liaison protéique<sup>76</sup>. Ils s'aperçoivent ainsi que les partenaires de RHO partagent un site de liaison englobant la région des switch I et II et la boucle  $\alpha 2$ , et que les acides aminés contenus dans ce site de liaison se situent en surface de la protéine indépendamment du nucléotide lié. De plus, des acides aminés non impliqués dans une liaison avec un partenaire peuvent modifier la sélectivité et l'affinité de liaison de la protéine<sup>41</sup>. Ils concluent de leur analyse que seule la plasticité interne de ce site de liaison et les diverses conformations qu'il adopte en fonction de son partenaire peuvent expliquer la sélectivité de reconnaissance entre RHO et son partenaire. En effet, même si les RHO sont décrites comme existant sous deux états conformationnels, la comparaison des conformations tridimensionnelles des chaînes latérales des acides aminés explique leur capacité à adopter différentes surfaces d'interaction avec leurs différents partenaires. Les GDI et les GEFs induisent un changement conformationnel important de la GTPase alors que celui engendré par les GAPs et les effecteurs est nettement plus faible. La sélectivité entre une protéine et son partenaire ne

peut donc pas s'expliquer seulement par une différence de nature des acides aminés impliqués ni par la comparaison de structures cristallographiques des différentes RHO. Les auteurs préfèrent retenir le jeu complexe d'ajustements moléculaires et de phénomènes physiques dynamiques au niveau de la surface d'interaction propre à RHO et à son partenaire. Si cette conclusion permet aux auteurs de proposer une explication quant à la diversité des structures impliquées dans la reconnaissance des RHO, elle permet également de comprendre comment des protéines très proches, au sein de la sous-famille RHOA par exemple, peuvent être distinguées.

S'il est possible de distinguer sélectivement l'une des trois protéines, d'autres paramètres interviennent également pour expliquer les rôles différents de ces trois protéines : leurs différents degrés d'expression, leurs différentes modifications post-traductionnelles et leurs différentes localisations subcellulaires, aboutissant finalement à une régulation spatiale et temporelle propre à chacune d'entre elles. Dans cet ordre d'idée, notons que la mise au point des biosenseurs de FRET pour RHOA, RHOB et RHOC (cf.II.D.1) a permis récemment d'étudier la localisation spatiale et temporelle de l'activité de ces 3 protéines dans les cellules endothéliales. Il révèle ainsi les localisation et activation particulières de RHOB en réponse à la thrombine, par rapport à RHOA et RHOC (identiques dans ce cas)<sup>77</sup>. L'utilisation de ce type de construction dans des cellules en migration a également permis de visualiser la dynamique d'activation de RHOC, spatialement différente de celle de RHOA et nécessaire à l'activation de la cofilin dans la formation des protrusions membranaires<sup>78</sup>.



## C. Implications des RHO dans les tumeurs

### 1. Mécanismes moléculaires

Nous avons énuméré plus haut les fonctions régies par les GTPases RHO. Toutes ces fonctions sont cruciales dans l'homéostasie tissulaire et leurs dérégulations sont immédiatement impliquées dans la tumorigénèse. Ainsi, mécaniquement, les protéines de la famille RHO ont été impliquées dans la très grande majorité des « hallmarks of cancer » décrits par Weinberg et Hanahan<sup>79</sup>. La description de leur implication dans chacun des traits caractéristiques décrits par Weinberg nécessiterait une revue à part entière, c'est pourquoi quelques exemples seulement seront choisis pour illustrer chacun d'entre eux. Toutefois, l'implication des RHO dans la migration et l'acquisition d'un phénotype invasif sera plus particulièrement développée.

#### a. Dans les “ hallmarks of cancer”

*Prolifération cellulaire continue :* Les RHO contrôlent la prolifération cellulaire par de multiples voies de signalisation<sup>80</sup>. En particulier, RHOA favorise la transition G1/S en induisant la production de la cycline D1 et en inhibant les CDKi p21 et p27. Les RHO interviennent également pendant la mitose, en contrôlant la duplication du centrosome, son positionnement et également l'assemblage et la contraction de l'anneau d'actine formé lors de la cytotélerèse. Cependant, ces mécanismes ont été observés *in vitro* et il reste encore aujourd'hui à déterminer *in vivo* lesquels sont réellement pertinents dans la tumorigénèse.

*Rôle dans la transformation cellulaire :* Historiquement, les premières implications des RHO dans le cancer ont été faites par analogie à RAS. La première preuve de l'implication des RHO dans la tumorigénèse vient d'expériences faites avec des mutants constitutivement actifs des RHO dans des fibroblastes murins<sup>81</sup>: la surexpression de ces mutants permet aux cellules d'acquies les caractéristiques d'une cellule transformée (croissance indépendante du substrat, indépendance vis à vis des facteurs de croissance). Injectées chez la souris nude, ces cellules sont capables de former des tumeurs<sup>82</sup>. Quelques années plus tard, leur rôle dans le processus métastatique était mis en évidence *in vivo*. Cependant, leur rôle reste encore assez débattu. Malgré les résultats des premières expériences présentées ci-dessus, le pouvoir transformant des RHO est nettement inférieur à celui de RAS (mesuré par le nombre de colonies formées en agar mou)<sup>83</sup>. Les tumeurs induites chez la souris par les mutants de RHO étaient plus différenciées que les tumeurs induites par RAS<sup>82</sup>. Enfin si l'amplification du gène est capable de transformer des fibroblastes murins, d'autres n'ont pas mis en évidence de pouvoir transformant des mutants actifs<sup>83</sup>. Ainsi, il est finalement considéré que les RHO peuvent avoir

différents rôles dans la transformation mais confèreraient plutôt un avantage de croissance aux tumeurs RAS mutées. D'autres, comme RHOB, auraient un rôle suppresseur.

Gardien du génome, rôle suppresseur de tumeur : Bon nombre d'arguments permettent de considérer RhoB comme un gène suppresseur de tumeurs. L'expression de la protéine est fréquemment perdue dans de nombreux cancers et est corrélée avec la progression du stade tumoral. D'autre part, sa transcription est augmentée en réponse à divers stress cellulaires (dommage à l'ADN, hypoxie). Des souris KO pour le gène RhoB développent plus de tumeurs induites par un carcinogène<sup>84</sup>. Au laboratoire, il a été mis en évidence que la déplétion de RHOB aboutit à l'accumulation de cassures doubles brins dans des carcinomes épidermoïdes de la peau<sup>85</sup>. D'autre part, RHOB permet le déclenchement de l'apoptose dans des cellules présentant des dommages à l'ADN. Au laboratoire, il a été montré que RHOB est impliqué dans la réponse et la réparation des dommages à l'ADN *via* la recombinaison homologue<sup>86</sup>. Pour d'autres GTPases, comme RHOA et CDC42, le rôle suppresseur de tumeur semble être contexte dépendant.

Indépendance vis à vis des facteurs de croissance : Les protéines RHO sont impliquées dans les voies de signalisation dérégulées issues des récepteurs à activité tyrosine kinase (EGFR, c-Met, IGFR, certains GPCR)<sup>84</sup>. L'EGFR, par exemple, est un récepteur transmembranaire qui peut être retrouvé soit surexprimé, soit muté soit activé de façon aberrante dans de nombreuses tumeurs épithéliales. L'expression d'un dominant négatif de RHO dans une lignée cellulaire primaire de fibroblastes aviaires surexprimant un mutant de l'EGFR, parvient à inhiber la transformation de ces cellules<sup>87</sup>. Pour maintenir l'homéostasie tissulaire, l'activité de l'EGFR est étroitement régulée, notamment par son recyclage endosomal. Or, RHOA, RHOB, CDC42 contribuent au maintien de la dérégulation de cette voie de signalisation en inhibant le recyclage de l'EGFR dans les endosomes<sup>84</sup>.

Echappement au système immunitaire : L'immunothérapie est une thématique en plein essor ces dernières années avec le succès clinique des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires. Au laboratoire, il a été montré que l'inhibition des GTPases RHO favorise les réponses immunes anti-mélanome en contrecarrant l'échappement tumoral, notamment par la réexpression de molécules de costimulation<sup>88</sup>.

Angiogénèse : Pour croître au-delà d'une certaine taille, les tumeurs doivent nécessairement induire la formation de nouveaux vaisseaux. Les RHO participent aux divers aspects du switch angiogénique. Les GTPases RHO régulent la prolifération, la survie et la migration des cellules endothéliales en réponse à des facteurs proangiogéniques<sup>84</sup>. D'autre part, les GTPases participent dans les cellules tumorales à la production des facteurs proangiogéniques. RHOA, RAC1, CDC42 participent au maintien de HIF1 $\alpha$  en conditions hypoxiques<sup>84</sup> permettant ainsi la production de VEGF.

Au laboratoire, un axe intégrine/FAK/RHOB a été mis en évidence dans la régulation de HIF1 $\alpha$  dans le glioblastome<sup>89</sup>.

Métabolisme : Les cellules tumorales arborent une altération de leur métabolisme énergétique, en particulier dans la régulation des voies glycolytiques. RAC et CDC42 inhibent une importante enzyme (phosphoglycerate mutase (PGAM)-B) participant à la régulation du glucose dans la cellule tumorale, tandis que RHOA et ROCK participent au transport de récepteur d'entrée au glucose GLUT1 dans les tumeurs p53 mutées<sup>90</sup>.

Inflammation : Les voies STAT3 et NF $\kappa$ B sont particulièrement impliquées dans la promotion d'un contexte inflammatoire au sein du microenvironnement tumoral par leur action sur les leucocytes, la production de cytokines ou des protéines du complément. Leurs voies de signalisation sont croisées avec celles des GTPases. RHOA et RAC1 sont deux puissants activateurs de STAT3 : RHOA *via* ROCK stimule la phosphorylation de STAT3 par JAK2, tandis que RAC1 peut activer STAT3 soit par un mécanisme indirect de sécrétion autocrine de l'IL6 soit par un mécanisme direct de liaison à STAT3<sup>91</sup>. RHOA, RAC1 et CDC42 participent également à la transcription de NF $\kappa$ B par un mécanisme impliquant la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  et la translocation des dimères p50/p50 and p50/p65 au noyau<sup>91</sup>.

Survie cellulaire : Les voies pro apoptotiques et anti-apoptotiques impliquent toutes deux les GTPases RHO de sorte que selon le contexte cellulaire, elles participent au déclenchement de la cascade apoptotique ou à l'inverse activent des voies de survie.

Cette brève illustration suffit néanmoins à mettre en évidence la grande diversité fonctionnelle des GTPases RHO et leurs multiples implications dans les différents aspects de la tumorigénèse. Celles-ci apparaissent redondantes dans de nombreuses situations, si bien que face à la perte de l'une d'entre elles, les cellules tumorales vont surexprimer ou réactiver un autre membre de la famille pour compenser. Le tableau général se complique encore plus avec l'observation de situations où les membres d'une même famille peuvent tenir des rôles opposés. La régulation spatiale et temporelle de leur activité ressort ainsi encore une fois comme notion inévitablement nécessaire pour expliquer et comprendre leur implication dans les différents aspects de la tumorigénèse.

#### b. Détails à propos de la progression tumorale

La formation de métastases est un processus multi-étapes, extrêmement complexe dans lequel les cellules tumorales commencent par s'évader de la tumeur primaire, pénètrent dans les vaisseaux sanguins, puis s'arrêtent et prolifèrent finalement dans des organes à distance. Pour se détacher de la tumeur primaire et envahir le tissu adjacent, les cellules tumorales doivent détruire leurs jonctions intercellulaires, remodeler leurs adhésions avec la matrice extracellulaire, et finalement se frayer un

chemin jusqu'aux vaisseaux sanguins. Les cellules tumorales s'engagent ainsi dans un programme transitoire, connu sous le nom de transition épithélio-mésenchymateuse ou EMT. L'EMT est donc un processus dans lequel des cellules épithéliales, non motiles et cohésives se convertissent en des cellules individuelles douées de propriétés migratoires et invasives, en adoptant un phénotype mésenchymal. Il peut être induit par de nombreux stimuli différents (TGF $\beta$ , récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase, WINT, PI3K/Akt/mTor...) mais aboutit à un programme présentant des traits caractéristiques : dissolution des jonctions intercellulaires épithéliales, perte de la polarité apicobasale au profit d'une polarité avant/arrière, réorganisation de l'architecture du cytosquelette d'actine et changement de morphologie cellulaire, inhibition de l'expression des gènes épithéliaux et activation de celle des gènes d'origine mésenchymale, augmentation de la mobilité cellulaire et acquisition de capacités à dégrader la matrice extracellulaire. Les GTPases RHO sont donc impliquées à plus d'un titre dans ce processus par leurs rôles multiples sur le cytosquelette d'actine.

#### ***Changement de morphologie et motilité cellulaire :***

- *Dans les cellules cancéreuses :*

L'assemblage des filaments d'actine ainsi que leur contractilité sont les déterminants majeurs de la morphologie cellulaire. L'assemblage des filaments est impliqué dans la formation de différentes structures membranaires (filopodes, lamellipodes..) et dans les adhésions cellulaires à la matrice. Les filaments d'actine situés sous la membrane plasmique forment une structure corticale garante de l'intégrité cellulaire. Leur contractilité permet d'établir une tension à l'intérieur de la cellule. Ainsi la forme d'une cellule dépend d'un équilibre entre tension et adhésion. Leur contractilité leur permet également d'évaluer la rigidité de la matrice extracellulaire : c'est ce qui régit la mécano-transduction du signal, c'est à dire la capacité de la cellule à percevoir la qualité (rigidité, composition, densité) du microenvironnement tumoral et à s'y adapter en changeant de morphologie et de mode de migration. Ce qui a pour première conséquence de pouvoir observer au sein d'une même tumeur, différentes morphologies cellulaires, et différents types de migration en fonction du microenvironnement rencontré. Ce qui a pour deuxième conséquence, purement didactique, de distinguer les éléments essentiels à la migration (polarité avant/arrière, protrusion, rigidité corticale, contractilité du cytosquelette d'actine, contacts physiques avec la matrice extracellulaire) de ceux qui ne sont qu'optionnels et qui définissent le mode de migration cellulaire (attachement par l'intermédiaire des intégrines, dégradation de la matrice extracellulaire, adhésion intercellulaire, chimiotactisme). Sont ainsi définis en 3D: les modes de migration individuels et les modes de migration collectifs (selon la perte des jonctions intercellulaires) et au sein des modes de migration individuels, le mode mésenchymal ou amœboïde (selon l'engagement des intégrines et la dégradation de la matrice

extracellulaire par protéolyse)<sup>92</sup>. A noter que des transitions entre les modes de migration mésenchymal et amœboïde, mésenchymal et collectif ou amœboïde et collectif ont été observées<sup>92</sup>.

L'EMT réalisée dans sa totalité aboutira à un mode de migration mésenchymal dans lequel les cellules adopteront un phénotype allongé, fibroblastique et engageront avec la matrice extra cellulaire (MEC) des forces de tractions importantes au niveau des intégrines situées à l'avant et à l'arrière de la cellule. De façon concomitante, des protéases sont sécrétées pour digérer la matrice extra cellulaire au niveau des protrusions membranaires, qui, en 3D sont qualifiées d'invadopodes. Le mode de migration mésenchymal est réputé lent (0,1-2µm/min) par le turn-over des formations focales.

La migration amœboïde est caractérisée par un phénotype cellulaire arrondi, avec de nombreuses protrusions membranaires en bourgeons. Elle se différencie de la migration mésenchymale par l'absence d'activité sécrétoire des Matrix Metallo Protéases (MMPs), une faible adhésion à la matrice extra cellulaire et par une forte contractilité de l'actine corticale requise pour déformer la cellule au sein de la matrice. C'est un mode de migration rapide, entre 2-30 µm/min. La voie RHOA/ROCK y est prédominante<sup>93</sup>.

Migration mésenchymale et amœboïde sont classiquement opposées : les observations fondatrices datent de 2003 et remarquent que ces deux modes de migration sont sous la dépendance respective de RAC et de RHOA<sup>94</sup>. RAC permet de former les protrusions riches en actine à la membrane. L'activité de RHOA est considérée comme relativement faible mais reste nécessaire pour générer une contraction suffisamment importante pour pousser la cellule au sein de la MEC. Or, RHOA est aussi impliquée dans la migration mésenchymale par son rôle dans la formation des invadopodes et la sécrétion des MMPs en participant, avec CDC42, à la régulation du complexe d'exocytose. Dans l'invadopode, l'organisation spatiale et temporelle de son activité est en revanche aléatoire tandis que celle de RHOC est particulièrement bien définie, autour du cœur de l'invadopode, afin de restreindre l'activité de la cofiline<sup>78</sup>.

Dans la migration collective, les cellules maintiennent leurs jonctions intercellulaires et migrent en amas ou sous formes de feuillets pluricellulaires au sein de la matrice extra cellulaire. Une organisation supercellulaire peut être mise en place, avec des cellules « leaders » en front de migration et des cellules « followers » à l'arrière, superposable à l'organisation subcellulaire observée dans une cellule mésenchymale en migration. Il se met en place une gangue d'actine corticale tout autour du collectif cellulaire, nécessaire à sa cohésion<sup>95,96</sup>.

Au total, la voie RHOA/ROCK/Myosin à l'origine de la contractilité est impliquée dans tous les modes de migration des cellules tumorales. Ces mécanismes moléculaires viennent renforcer les observations fondatrices du rôle de RHOA dans l'invasion tumorale du groupe de Itoh dans un modèle de transplantation syngénique de cellules d'hépatome de rat<sup>97</sup>.

- *Dans le microenvironnement :*

Les fibroblastes associés au cancer synthétisent une grande partie des protéines constituant la matrice extracellulaire ainsi que les enzymes participant à son remodelage. Leur rôle dans la tumorigénèse est établi en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines favorisant la migration. Les cytokines pro-inflammatoires engagent également, au sein des fibroblastes, ROCK dans des voies de signalisation interdépendantes avec la voie JAK/STAT<sup>98</sup>. Il en résulte, dans les fibroblastes, une augmentation de la contractilité du cytosquelette d'acto-myosine permettant de remodeler la matrice extracellulaire et favoriser la migration des cellules tumorales. Pour preuve, des co-cultures tridimensionnelles de cellules tumorales et de fibroblastes ont montré que pendant l'invasion, les fibroblastes « ouvrent la voie » aux cellules tumorales dans la matrice extracellulaire par l'activation du module de signalisation RHOA/ROCK, LIMK<sup>99</sup>. En outre, dans les fibroblastes, cette augmentation de contractilité génère une boucle d'activation positive permettant de maintenir le phénotype de fibroblastes associés au cancer<sup>100</sup>. Ainsi la voie RHO/ROCK est engagée de façon synergique dans les cellules tumorales et dans les fibroblastes pour favoriser la dissémination tumorale.

Ayant démontré que l'activité spatiale et temporelle des GTPases RHO était fondamentale dans la compréhension de leur rôle en général et en particulier dans la tumorigénèse, la génération de modèles murins permettant d'étudier cette régulation spatiale et temporelle est extrêmement précieuse. Ces modèles sont maintenant disponibles pour RHOA<sup>101</sup> et RAC<sup>102</sup>. Dans un modèle murin de cancer du pancréas, les auteurs observent *in vivo* l'organisation spatiale et temporelle de l'activité de RHOA, mais démontrent surtout son importance fonctionnelle : le traitement pharmacologique par le Dasatinib diminue l'invasion des cellules tumorales pancréatiques en ne touchant qu'à une localisation subcellulaire (aux pôles cellulaires) de l'activité de la protéine, sans affecter l'activité présente à l'intérieur du corps cellulaire<sup>101</sup>.

Complémentaire des mécanismes moléculaires impliquant les GTPases RHO, la littérature recense la dérégulation des voies de signalisation des RHO dans les tumeurs humaines. A l'origine de cette dérégulation, sont retrouvées :

- la dérégulation de l'expression des RHO,
- la dérégulation de l'activité des RHO par leurs régulateurs GEFs, GAPs et GDIs,
- et récemment, la présence de mutations ponctuelles dans les gènes codant les GTPases.

## 2. Dérégulation de leur expression

La dérégulation de l'expression des RHO a été mise en évidence soit par analyse quantitative des ARNm soit au niveau protéique par IHC ou par immunoempreinte ; les résultats obtenus étant comparés à ceux des tissus sains. Certaines études corrélaient cette augmentation d'expression avec l'agressivité tumorale et d'autres, plus rares, y associent l'analyse de l'activité de la protéine. Si elles ont au moins le mérite d'exister, il faut tout de même rappeler le petit nombre de tumeurs analysées dans la grande majorité de ces études. Elles sont regroupées dans le tableau suivant (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Tableau récapitulatif des altérations d'expression des RHO dans les tumeurs. Adapté de

103,104,105,106

Protéine RHO	Altération	Localisation tumorale	Signification
RHOA	Surexpression	Sein	NA
		Poumons	NA
		Tête et cou	NA
		Œsophage	Progression
		Estomac	Progression
		Foie	Progression
		Colon	NA
		Ovaire	Progression
		Vessie	Invasion et métastases
		Prostate	Différenciation <sup>107</sup>
		Testicule	Progression
		RHOB	Diminution expression
Poumons	Progression		
Tête et cou	Progression		
Glioblastome	NA		
Estomac	NA		
Foie	NA		
Surexpression	Vessie		NA
	Poumons épidermoïdes		NA
	Sein tous types		NA
RHOC	Surexpression	Sein	Invasion, métastase
		Sein inflammatoire	NA
		Poumon	Invasion
		Tête et cou	NA
		Œsophage	Progression
		Estomac	Métastase
		Pancréas	Progression
		Foie	Progression et métastase
		Ovaire	Métastase
		Vessie	Invasion, métastase
		Mélanome	Métastase
		Carcinome épidermoïde peau	NA
		Prostate	Métastase
		RAC	Surexpression
Prostate	Progression		
Testicule	Progression		
Carcinome épidermoïde	NA		
LMC	NA		
Estomac	Progression		
CDC42	Surexpression	Sein	Métastases
		Tête et Cou	NA
		Poumon	
		Colon	NA
		Testicule	Progression

L'analyse de ces différentes études permet de rendre compte des différents niveaux de régulation d'expression des GTPases RHO. Certains types tumoraux présentent une corrélation entre l'augmentation de l'ARNm et celui de la protéine tandis que dans d'autres cette corrélation n'est pas retrouvée. Ainsi se distinguent deux grands niveaux de régulation : transcriptionnel et post transcriptionnel.

*Au niveau transcriptionnel :* Le promoteur de RHOA et le complexe des facteurs de transcription a été récemment identifié : Myc coopère avec Skp2 (indépendamment de son activité ubiquitine ligase) pour recruter Miz1 et p300 au niveau du promoteur de RHOA. L'implication de ce complexe transcriptionnel *via* RHOA dans la formation des métastases a été mise en évidence dans un modèle murin et validé dans une cohorte d'échantillons tumoraux humains. Toutefois, cet article n'étudie pas les circonstances dans lesquelles ce complexe transcriptionnel est mis en jeu. L'observation de l'implication des RHO GTPases dans la tumorigénèse par la dérégulation de leur expression conduit Lacal, dès 2004, à proposer l'hypothèse suivante : les GTPases RHO ne peuvent être considérées comme des oncogènes au sens classique du terme (constitutivement actif et/ou constamment surexprimés) mais leur expression est dépendante des circonstances spatio-temporelles<sup>91</sup>. C'est-à-dire que celle-ci est réversible et versatile, selon les conditions micro-environnementales. De la sorte, il est possible de comprendre les différents rôles, parfois opposés, joués par les GTPases RHO dans la tumorigénèse.

Les circonstances d'activation transcriptionnelles sont mieux connues pour d'autres GTPases. L'expression de l'ARNm de RHOB peut être induite ou inhibée selon les conditions par la signalisation du TGF $\beta$  *via* Smad3/4 ou la voie des MAPK. En réponse aux UV, c-Jun et p300 sont recrutés au niveau du promoteur de RHOB<sup>109</sup>. Au laboratoire, il a été montré qu'en réponse aux cassures double brins, l'ARNm de RHOB est stabilisé<sup>86</sup>. Enfin RHOC a été identifiée comme une cible transcriptionnelle de p53 en réponse aux dommages à l'ADN<sup>109</sup>.

*Au niveau post transcriptionnel :* Les microARN participent largement au contrôle de l'expression des GTPases RHO et la plupart des travaux ont été effectués dans le contexte tumoral. Ils régulent également l'expression des différents partenaires des GTPases, GEFs, GAPs, et effecteurs.

Ci-dessous un tableau (Tableau 3) à valeur illustrative des miARN identifiés dans la régulation de l'expression des protéines de la sous-famille RHOA.



**Tableau 3 :** Tableau récapitulatif des miARN identifiés dans la régulation de l'expression des GTPases RHO (adapté de Zheng *et al*<sup>110</sup>).

<b>Protéine RHO</b>	<b>miARN</b>	<b>localisation tumorale</b>	<b>contribution fonctionnelle identifiée</b>
<b>RHOA</b>	miR31	glioblastome, sein	métastases
	miR 125-3a-p	poumon	cytosquelette d'actine
	miR155	colon, sein	EMT
	miR185	colon	prolifération
<b>RHOB</b>	miR21	colon, sein	prolifération, métastases
	miR19	pancréas	prolifération, invasion
<b>RHOC</b>	miR509	sein	métastases
	miR138	langue	invasion
	miR10b	sein	invasion

Au total, il existe différents mécanismes à l'origine de la dérégulation de l'expression des GTPases RHO dans les cancers, corroborant l'hypothèse de Lacal. Il convient maintenant d'identifier les circonstances spatiotemporelles qui déterminent cette dérégulation et les mécanismes moléculaires impliqués afin de mieux comprendre l'implication des RHO dans la tumorigénèse.

### 3. Dérégulation de leur activité

Les autres mécanismes à l'origine de la dérégulation de la signalisation des protéines RHO sont ceux d'une altération de l'expression de leurs régulateurs et d'une activation constitutive de certains GEFs. Les études sur les GDI sont contradictoires et finalement difficilement interprétables par la multiplicité des GTPases qu'elles régulent (Tableau 4). D'autre part, elles-mêmes peuvent faire l'objet de régulation par d'autres protéines, compliquant ainsi la compréhension totale de leur implication dans la tumorigénèse. Ainsi, un variant d'épissage de la tropomyosine kinase, TrkBT1, séquestre RHOGDI1, favorisant ainsi l'activation de RHOA et la formation de métastases hépatiques dans un modèle de greffe orthotopique murin de cancer pancréatique<sup>111</sup>.

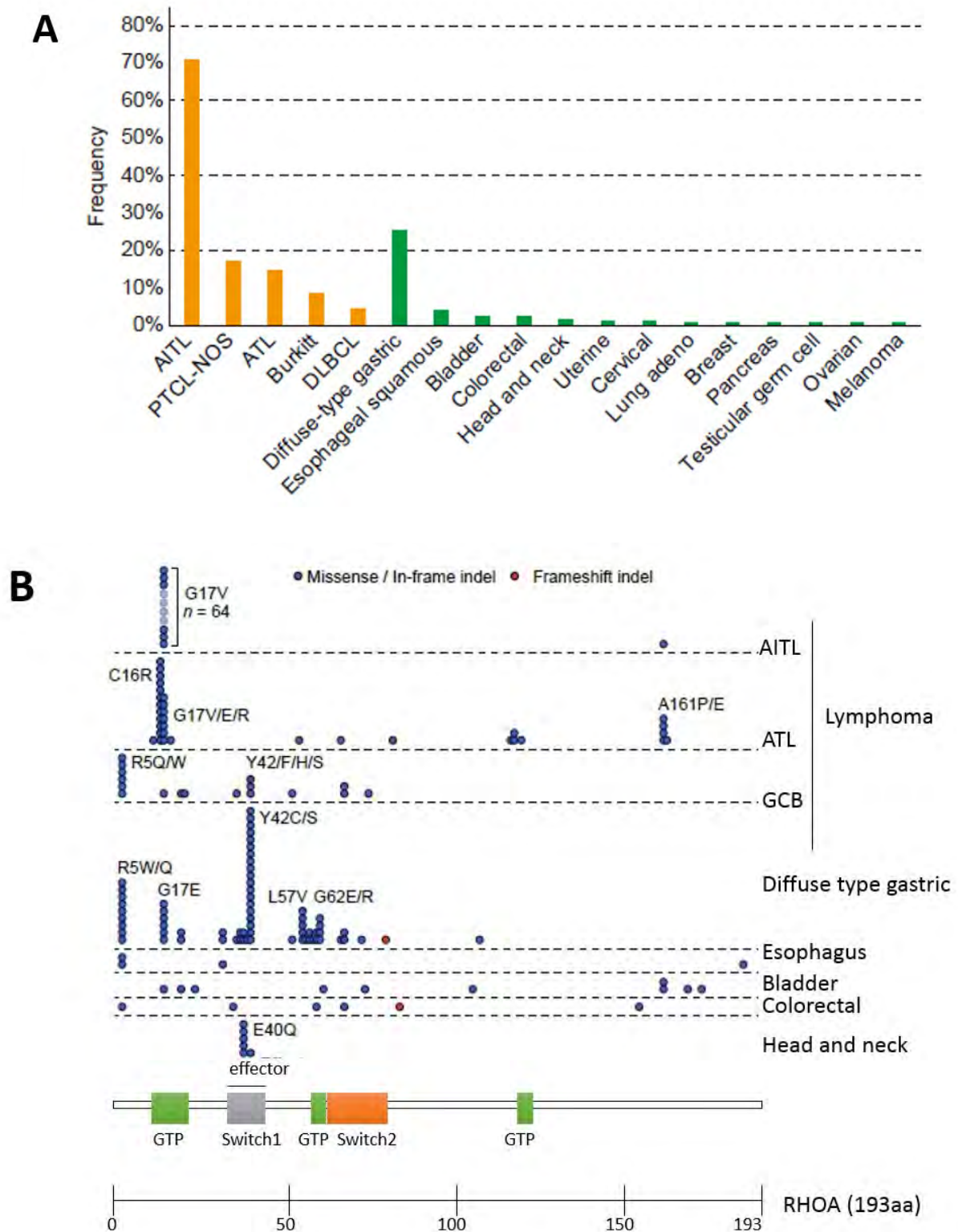
**Tableau 4 : Tableau récapitulatif des altérations des GDI dans la tumorigénèse**

GDI	Altération	Localisation tumorale	Signification
GDI-1	Surexpression	Sein	NA
		Colon	Progression
		Ovaire	Progression
		Prostate	Augmentation grade et envahissement ganglionnaire
	Diminution	Sein	Diminution survie des patients
		Foie	
GDI-2	Surexpression	Sein	NA
		Pancréas	Augmentation capacités invasives
		Ovaire	NA
	Diminution	Sein	Progression
		Vessie	Diminution survie des patients

De façon générale, les GEFs ont tendance à être surexprimées tandis que l'expression des GAPs serait plutôt diminuée. En conséquence, et par leur rôle respectif d'activation ou d'inactivation sur les GTPases RHO, le dogme actuel est de considérer les GEFs comme des oncogènes et les GAPs comme des gènes suppresseurs de tumeurs. Bien que concernant la GTPase RHOB, son rôle suppresseur de tumeur confèrerait de fait un rôle suppresseur de tumeur à des GEFs impliqués dans son activation. Diverses revues proposent un récapitulatif des études rapportant une altération de l'expression de ces régulateurs. Pour les GEFs et les GAPs, nous renverrons aux revues du groupe de CJ Der respectivement référencées en <sup>10</sup> et <sup>112</sup> pour leurs tableaux récapitulatifs. Les gènes codant certaines GEFs sont aussi connus pour être altérés dans les tumeurs, principalement par réarrangement chromosomique (LARG GEF). Le GEF TRIO est activé dans les leucémies aiguës chez l'adulte par épissage alternatif, dont en résulte une protéine tronquée TGAT constituée par le domaine catalytique DH et un résidu peptidique de 15 acides aminés <sup>113</sup>. Autre exemple, RHOGAP DLC1 (Deleted Liver Cancer 1) a été identifiée comme fréquemment perdue ou transcriptionnellement inhibée dans de nombreuses tumeurs et a été fonctionnellement caractérisée comme gène suppresseur de tumeur<sup>114</sup>. Cependant, différentes études viennent remettre en question la généralité GEF/surexpression/oncogène et GAP/sous-expression/gène suppresseur de tumeur. Récemment, l'étude des données de séquençage des ARNm dans les cancers du sein de type basal-like montre une surexpression de deux GAPs, ARHGAP11A et RACGAP1 dont la suppression induit un arrêt de prolifération des cellules cancéreuses et de cellules immortalisées. Associée à cette surexpression, les auteurs observent une augmentation d'activité de RHOA exclusivement, augmentation ayant un effet négatif sur la prolifération des cellules tumorales <sup>115</sup>.

#### 4. Mise en évidence de mutations

Jusqu'à ces dernières années, les protéines RHO, contrairement aux protéines RAS (mutées dans 20 à 30% des cancers) étaient rapportées comme peu mutées dans les tumeurs. De sorte que leur implication par la dérégulation de leur expression et/ou activité les faisait considérer comme des participants secondaires à la dérégulation de multiples voies de signalisation. La stratégie de séquençage systématique à grande échelle de tumeurs, associée aux progrès technologiques ont pu récemment mettre en évidence la présence de mutations, ce qui tend à remettre en cause cette précédente considération. Pour les connaître en détail, des bases de données en accès libre sont particulièrement utiles : <http://www.cbioportal.org><sup>116,117</sup> et <https://www.intogen.org/search>. Faciles d'utilisation, régulièrement mises à jour, elles donnent également des informations supplémentaires concernant l'expression, la présence d'amplification ou de délétion, les conséquences sur la structure de la protéine et sur la valeur « driver » de la mutation. Nous rapporterons ici les données pour RHOA (Figure 15).



**Figure 15** : Récapitulatif des mutations recensées pour RHOA dans la littérature<sup>118</sup>. **A** : Fréquence des mutations de RHOA par type tumoral recensées dans différentes études ou issues de cbioportal.org. En jaune sont distinguées les tumeurs du système lymphoïde. **B** : Détail des mutations retrouvées par type tumoral et leurs localisations sur la protéine. Données issues de cbioportal.org<sup>116,117</sup>.

RHOA est donc retrouvée comme mutée dans différents types tumoraux, principalement dans les tumeurs intéressant le tissu hématopoïétique et quelques tumeurs solides dont en particulier les tumeurs gastriques diffuses. Il existe maintenant un très gros travail de compréhension et d'identification du rôle de ces mutations dans l'oncogenèse tumorale. En premier lieu, il est à noter que le rôle des mutants mis en évidence est surprenant. Dans les lymphomes T périphériques, le hotspot G17V se comporte comme un dominant négatif, et son expression dans les cellules Jurkat (lignée de lymphocytes TCD4+ humain immortalisée) augmente leur prolifération et leur capacité invasive<sup>119</sup>. Ce qui peut être mis en rapport avec l'apparition de lymphomes T agressifs chez la souris suite à l'inactivation des trois protéines par la toxine C3<sup>120</sup>.

Parmi les autres mutations retrouvées dans les tumeurs, certaines ont été caractérisées comme des dominants négatifs (A161E, Y42C, L57V) tandis que d'autres se comporteraient plutôt comme des mutants hypercyclants (C16R, A161P)<sup>118</sup>.

La majorité des mutations retrouvées conduit donc à attribuer à RHOA sauvage un rôle suppresseur de tumeur. Ce qui peut être corroboré par les observations suivantes : aucune mutation « activatrice » n'a jusqu'alors été rapportée ; le mutant « artificiel » T19N a été montré comme susceptible d'accélérer la prolifération de cellules tumorales coliques<sup>121</sup>; certaines GAPs ont été retrouvées surexprimées dans un sous type de cancer du sein agressif<sup>115</sup>.

Cependant, d'autres études sont évidemment nécessaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. En particulier, comprendre les conséquences de l'expression des mutants sur l'expression/l'activation des autres membres de la sous-famille apparaît important au même titre qu'identifier leurs voies de signalisation en aval.

Enfin, le contexte cellulaire semble déterminant dans les fonctions pro ou anti tumorales de RHOA. Ainsi aujourd'hui, le rôle de RHOA dans la tumorigénèse est loin d'être pleinement compris mais pour sûr, RHOA ne pourra pas être considéré comme un oncogène ou un gène suppresseur au sens classique du terme.

## II. Méthodes d'études des GTPases RHO

L'étude des protéines RHO fait appel à une grande diversité d'outils. L'étude de leurs fonctions demande d'aborder l'expression, la localisation et l'activité de ces protéines, tout en tenant compte de leur cycle de régulation si particulier. Chacun de ces outils apporte donc des informations sur un de ces différents aspects. Après les avoir décrits, ce chapitre reviendra sur les limites respectives des différentes approches employées.

Pour leur description, nous avons choisi de présenter les outils selon qu'ils modifient la quantité de protéine endogène totale, qu'ils perturbent son activité, qu'ils abordent sa localisation ou encore qu'ils tentent d'appréhender la dynamique de leur activation spatiotemporelle. Nous garderons à l'esprit aussi, tout au long de cette description, que beaucoup d'entre eux sont largement inspirés de ceux utilisés pour étudier les protéines RAS.

### A. Méthodes basées sur la modification d'expression des protéines

Observer les conséquences cellulaires après déplétion de la protéine d'intérêt est une stratégie largement utilisée. Au niveau transcriptionnel, la séquence codant l'ARNm peut être délétée, ou l'ARNm lui-même dégradé.

Il existe plusieurs modèles de souris dans lesquelles les gènes codant pour les GTPases ont été inactivés de manière constitutive. Cependant, l'obtention de tels animaux est dépendante de leur survie lorsque le gène a été inactivé. Ainsi le KO total de RHOA est létal au niveau embryonnaire. Par conséquent, des approches de KO conditionnel ont été privilégiées et permettent d'étudier la fonction de la protéine dans un tissu particulier (cf. I.B.4)<sup>57</sup>.

Il existe également des lignées cancéreuses qui présentent une délétion dans leur génome comprenant le locus du gène d'intérêt. La lignée NCI-H2882 de cancer du poumon est ainsi décrite pour être RhoB<sup>-/-</sup>. Cependant, la délétion couvre une séquence d'ADN de 3,7 Mb comprenant onze gènes connus dont RhoB, ce qui devra être pris en compte dans l'interprétation des résultats.

Aujourd'hui, ces approches risquent d'être avantageusement remplacées par la technique du Crisp/CAS9 et déjà les séquences des ARN guides permettant de cibler les protéines RHO (A,B,C) ont été publiées<sup>122</sup>.

Il est également possible d'utiliser des petits ARN interférents pour diminuer l'expression des gènes cibles dans des cellules de mammifères en culture. Cependant, en plus d'une extinction pas

totale de l'expression de la cible, le siARN peuvent présenter des effets non spécifiques, dits « off target ». De plus, concernant l'étude des RHO, nous expliquerons en quoi en fin de chapitre cette stratégie peut parfois s'avérer inadaptée.

## B. Méthodes basées sur l'étude de leur localisation

Comme pour n'importe quelle protéine, connaître sa localisation renseigne beaucoup sur sa fonction. Initialement, le défaut d'anticorps de sélectivité et d'affinité suffisante pour détecter les protéines endogènes a conduit le chercheur à surexprimer les protéines avec une étiquette, pour les repérer grâce à un anticorps spécifique de l'étiquette. Puis, des anticorps capables de reconnaître la forme totale de la protéine mais également pour certaines, capables de localiser la forme active de celle-ci ont été développés. Les conclusions quant à la localisation des RHO tirées de leur usage ayant été présentées auparavant (cf. I.A.3) nous reviendrons plus largement sur leurs limites dans la dernière partie de ce chapitre.

Dans le cas des RHO, une technique indirecte, car elle ne permet pas de voir dans la cellule la localisation des protéines, est à remarquer : il s'agit du fractionnement subcellulaire. Elle permet de distinguer les proportions des protéines liées aux membranes ou solubles dans le cytosol. La présence des GTPases est alors révélée par immunoempreinte dans les différentes fractions obtenues. Si elle présente l'avantage de localiser les protéines endogènes, elle reste lourde à mettre en œuvre, peu précise sur la localisation des protéines et ne peut aborder que très vaguement les questions de dynamique spatiotemporelle.

## C. Méthodes basées sur la modification de leur activité

### 1. Mutants activateurs ou inhibiteurs

Historiquement, les fonctions de la protéine RAS ont été établies à partir d'expériences faites dans la levure mais à l'époque non applicables dans les cellules de mammifères<sup>123</sup>. Une stratégie commune pour déterminer les fonctions d'une protéine est celle d'observer les conséquences cellulaires suite à l'activation ou l'inhibition de celle-ci. Pour cela, des formes mutées de ces protéines ont été initialement développées afin de se comporter comme dominant positifs ou négatifs de la fonction étudiée. Ainsi les mutants de RHO ont été construits par analogie aux mutants de RAS.

Les dominants négatifs de la sous-famille RHO résultent de la substitution de la Thréonine en position 19 par une Asparagine. La thréonine jouant un rôle majeur dans la liaison au Mg<sup>2+</sup> qui ferme la poche nucléotidique de la protéine, sa substitution entraîne la libération du nucléotide. Ainsi il est communément admis que leur effet s'exerce par compétition directe avec les GEFs et ce pour deux raisons. Premièrement, les formes mutées des protéines présentent une affinité supérieure pour les GEFs par rapport à la protéine sauvage. Deuxièmement, les GEFs, par leur mécanisme d'action présentent eux-mêmes une affinité supérieure pour les formes dépourvues de nucléotides<sup>124</sup>.

Il existe deux grandes mutations à l'origine d'un effet dominant positif. Le mutant G14V présente une substitution de la glycine en position 14 par une valine et le mutant Q63L présente une leucine à la place d'une glutamine en position 63. Il semblerait que ces deux mutants, biologiquement actifs dans la cellule, aient perdu leur capacité d'hydrolyse du GTP (les deux acides aminés étant situés dans la poche de liaison au GTP) et leur sensibilité à la régulation par les GAPs<sup>125,126,127</sup>. Les études cristallographiques confirment que ces deux mutations conservent effectivement l'état activé de la protéine mais que ces deux mutants diffèrent néanmoins par leur capacité à se lier aux RHOGDIs, le mutant Q63L présentant une nette diminution de liaison à ce régulateur<sup>128</sup>. La surexpression de ces mutants dans des fibroblastes a permis au début des années 1990, d'obtenir des phénotypes cellulaires marqués, à l'origine de la connaissance des grandes fonctions régulées par ces petites GTPases sur le cytosquelette d'actine.

Citons aussi le mutant F30L, dit hypercyclant et demeurant toutefois peu utilisé. L'impossibilité d'exprimer dans les NIH3T3 un dominant positif de CDC42 sans effet toxique pour les cellules a conduit Lin et ses collaborateurs à imaginer un mutant de la protéine capable de réaliser un cycle complet d'activation mais de façon accélérée<sup>129</sup>. Mécanistiquement, la substitution du résidu phénylalanine par une leucine diminue la liaison de la protéine à la base guanine du nucléotide, permettant la libération du nucléotide et finalement son activation. Ce mutant présente donc une capacité d'échange du nucléotide accélérée, tout en conservant son activité GTPasique. De la sorte, il peut mimer le comportement des RHO en présence d'une GEF active de manière constitutive, et c'est cette propriété qui a été mise à profit pour mieux comprendre le rôle de l'oncogène-GEF Dbl<sup>130</sup>.

Avant de conclure ce chapitre, il convient de rappeler l'élégante approche de l'équipe de Triesman en 1998. Les auteurs tentent de mieux comprendre les rôles respectifs des différents effecteurs de RHOA dans les différentes fonctions cellulaires assumées par la protéine en établissant des mutants constitutivement actifs de RHOA, incapables de se lier à un effecteur en particulier. De la sorte, ils ont identifié les mutants G14V/F39A et G14V/F39V incapables de se lier à la majorité des effecteurs testés, excepté mDia2. Leur raisonnement les a conduit à supposer la nécessité de la présence d'un autre effecteur que ROCK dans la formation des fibres de stress induite par l'activation de RHOA<sup>131</sup>.



Bien que très employées dans la littérature, nous reviendrons sur les insuffisances de ces approches pour comprendre le rôle des RHO en fin de chapitre. Leur principale limite réside dans l'obligation de surexprimer des protéines exogènes. Ainsi, disposer d'outils permettant d'activer ou d'inhiber directement la fonction de la protéine, sans en modifier l'expression, semble plus adéquat.

## 2. Stimulation par des agonistes

La découverte des fonctions des protéines est intimement liée à celle des cascades de signalisation qui les régulent. Ainsi le LPA a été identifié comme l'agent présent dans le sérum permettant d'activer la formation des fibres de stress quelques 3 ans à peine après la découverte de leur régulation par les RHO<sup>62</sup>. Aussi certains agonistes naturels sont maintenant utilisés « en routine » en tant qu'activateurs ou inhibiteurs des RHO. Leur recueil, peut-être pas complètement exhaustif, est proposé dans les guides techniques de mesure d'activité des GTPases<sup>132</sup>.

Si l'utilisation de ces agents permet d'étudier l'activation des GTPases RHO en réponse à l'environnement cellulaire, l'interprétation des conséquences cellulaires doit être relativisée avec la possibilité d'activation de multiples voies de signalisation. D'autres méthodes, comme certaines toxines bactériennes, touchant directement les RHO, permettraient de tirer des conclusions plus solides sur les conséquences observées.

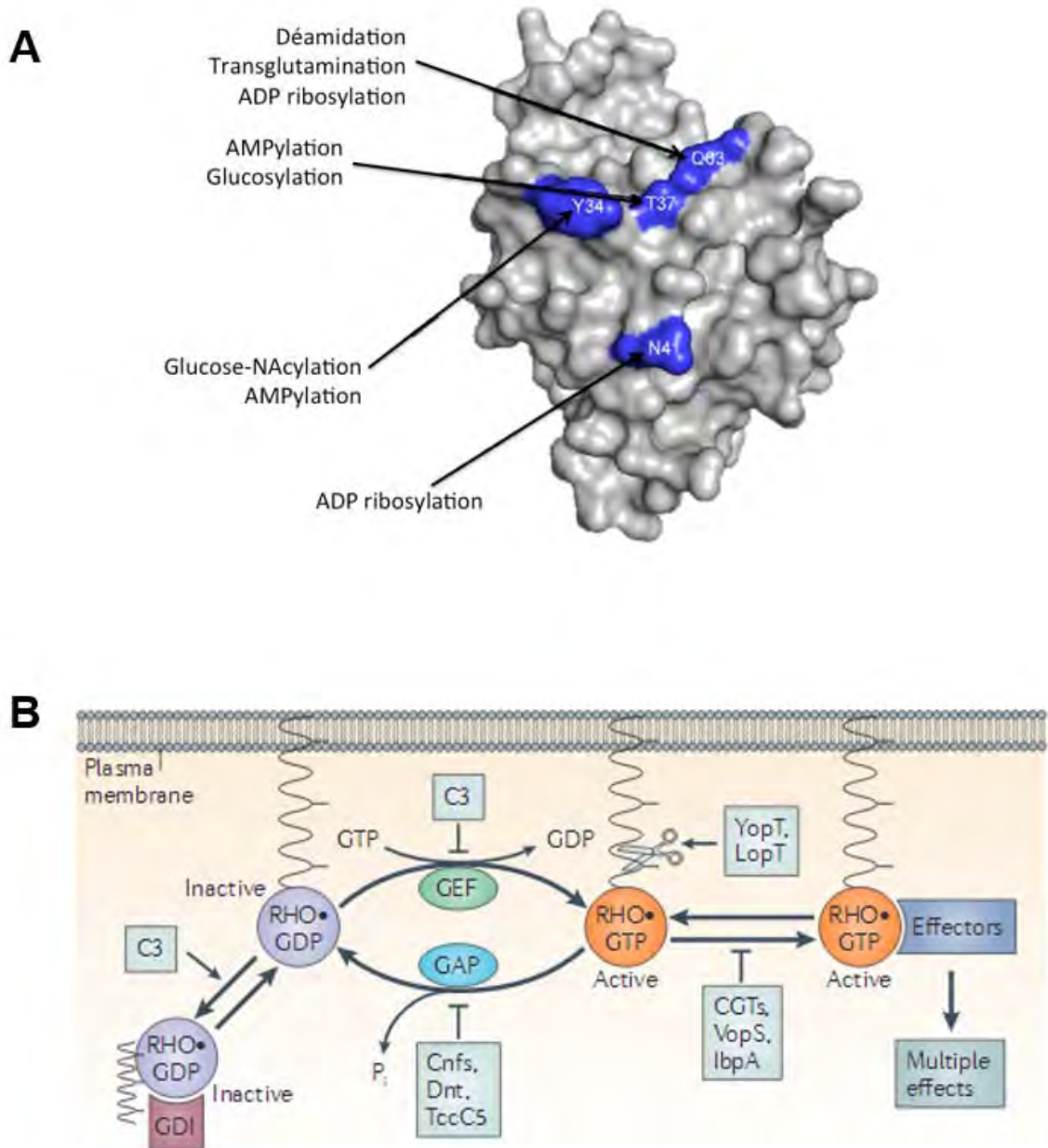
## 3. Les toxines bactériennes

L'étude du mécanisme d'action des toxines bactériennes a permis de mieux comprendre les rôles physiologiques des GTPases RHO. En effet, le cytosquelette cellulaire des cellules eucaryotes joue un rôle majeur dans les interactions hôte-pathogène (*i.e.* cellule humaine-bactérie). Les protéines RHO, en tant que régulateurs majeurs du cytosquelette cellulaire, s'avèrent être les cibles de nombreuses toxines bactériennes et certaines sont devenues de véritables outils intracellulaires permettant de moduler leur fonction.

Les toxines bactériennes peuvent interférer avec la fonction des protéines RHO en y greffant de façon covalente un groupement chimique ou en jouant le rôle d'un des régulateurs du cycle d'activation (Figure 16).

Certaines toxines bactériennes se comportant comme des GEF ou des GAPs sont alors considérées *stricto sensu* comme effecteurs bactériens et non exotoxines. Citons, pour leur sélectivité vis à vis des protéines RHO, les protéines appartenant à la famille des effecteurs à motif WXXXE dont

le mécanisme d'action est très similaire à celui des GEFs eucaryotes de la famille Dbl. D'autres à l'inverse se comportent comme des GAPs ; c'est le cas par exemple de YopE isolée chez *Pseudobacterium tuberculosis*.



**Figure 16 :** Modes d'actions des différentes toxines bactériennes. **A :** Résidus des acides aminés de RHOA (PDB : 1FTN) cibles des toxines bactériennes et types de modifications rajoutées. D'après <sup>133</sup>. **B :** Schéma récapitulatif des modes d'actions des différentes toxines bactériennes sur les GTPases RHO D'après <sup>134</sup>.

Parmi les toxines susceptibles de modifier chimiquement les RHO, la C3 exoenzyme est la toxine la plus utilisée pour inhiber leurs fonctions. Isolée en premier lieu chez *Clostridium botulinum* comme susceptible d'ADP ribosyler une protéine de 22kDa liant le GTP<sup>135</sup>, 7 autres enzymes

présentant la même activité ont été depuis identifiées chez d'autres souches de bactéries Gram +. Elles catalysent la réaction d'ADP ribosylation en présence du co-substrat NAD sur l'Asparagine 41. Cette réaction intéresse tant la forme active que inactive de la protéine, comme le suggèrent les travaux de l'équipe d'Aktories ainsi que la structure du complexe C3-RHOA récemment résolue<sup>136</sup>.

Au niveau moléculaire, les travaux de l'équipe d'Aktories démontrent que, même si l'Asparagine 41 appartient au domaine reconnu par les effecteurs, le mécanisme d'inactivation de la protéine ne passe pas par un découplage de la liaison aux effecteurs. *In vitro*, les ADPribose RHO sont toujours capables de se lier aux effecteurs ROK et PKN alors qu'*in cellulo*, cette liaison n'est plus observée. Il semblerait en réalité que l'ADPriboseylation de la protéine la piège dans un complexe RHO-GDI cytosolique. L'impossibilité de transloquer la protéine à la membrane plasmique la soustrait ainsi de son cycle d'activation. Cependant les RHO ADP ribosylées restent biologiquement actives : un traitement soit par du GTP $\gamma$ S soit par une autre toxine bactérienne ayant la propriété de modifier la Glutamine 63 en Acide Glutamique permettent d'activer la protéine et de réverser complètement le phénotype cellulaire d'inhibition<sup>137, 138</sup>. En outre, la C3 accélérerait de 50% l'activité GTPasique intrinsèque de la protéine<sup>139</sup>.

Les conséquences de l'action de la toxine C3 au niveau cellulaire ont été en partie investiguées. Seront à retenir :

- Au niveau phénotypique, la dépolymérisation du cytosquelette d'actine, témoignant ainsi de l'inactivation fonctionnelle des protéines RHO. En revanche, le squelette de microtubules n'est pas perturbé, autrement que par le changement morphologique induit<sup>140</sup>.
- l'activation de voies de signalisation correspondant à une réponse de stress cellulaire<sup>141</sup>
- l'augmentation de l'expression de la protéine RHOB par un mécanisme encore peu identifié mais impliquant au moins la machinerie transcriptionnelle<sup>142</sup>, peut-être à relier avec l'activation des voies de stress cellulaire précédemment évoquées.
- la diminution de la protéine RHOA<sup>141, 143</sup> suggérant une déstabilisation de la protéine induite par l'ADPriboseylation. A noter que cette diminution sera également observée dans les travaux de Sahai (cf. ci-après).

Utilisée en tant qu'outil de biologie cellulaire, son accessibilité intracellulaire est donc un paramètre important. Or, la C3, monomérique, est dépourvue de récepteur membranaire et de domaine de translocation. Le mécanisme de pinocytose à défaut employé s'avère en effet peu efficace<sup>138</sup>. C'est pourquoi, un peptide perméant type TAT a été ajouté à la toxine afin de s'affranchir des fastidieuses micro-injections, électroporations et perméabilisations<sup>144</sup>. Avec ce tag, les auteurs observent dans toutes les lignées traitées une diminution de la forme totale de RHOA après 16h de traitement<sup>145</sup>.

Notons enfin que la sélectivité de la toxine C3 n'est pas strictement réduite à la sous-famille RHOA : à de fortes concentrations, la C3 est également capable d'ADP ribosyler *in vitro* et *in vivo* RAC1<sup>146, 147</sup>. Cependant, à 10  $\mu$ g/mL (concentration couramment utilisée), la C3 est considérée comme RHO

sélective. Elle est en mesure également d'inhiber la protéine RALA (une petite protéine G de la famille RAS, partageant 35% d'homologie dans la séquence primaire avec RHOA) et cette liaison empêche l'ADP ribosylation de RHOA. Elle inhibe sa fonction par un mécanisme indépendant de l'ADPribosylation et d'après des travaux préliminaires, jouerait envers RALA un rôle similaire à celui d'un GDI<sup>148</sup>. Ainsi dans la cellule, l'effet de la toxine C3 est la conséquence de son action conjointe sur RALA et sur RHOA.

Les toxines A et B isolées de *Clostridium difficile* (aussi nommées TcdA et TcdB) catalysent l'ajout d'un groupement monoglucosé à partir de l'UDP-glucose sur un autre acide aminé hautement conservé entre les GTPases, la Thréonine en position 35/37. Cette glycosylation intéresse autant la sous-famille RHOA que RAC, CDC42 et TC10 et est indépendante de la conformation de la protéine. Au niveau phénotypique, les cellules adoptent une morphologie arrondie avec dépolymérisation du cytosquelette d'actine identique à celui observé après l'action de la toxine C3<sup>149</sup>. Cependant son mécanisme d'action semble bien différent. Au niveau biochimique, la glycosylation a pour conséquences fonctionnelles la diminution de l'activité GTPasique intrinsèque, l'inhibition du changement conformationnel vers la forme active par l'absence de liaison des GEF ou GAPs et enfin l'inhibition de la liaison à l'effecteur PKN<sup>150</sup>. L'étude menée par l'équipe de Just permet de proposer le modèle d'action suivant. La glycosylation diminue l'activation par les GEFs et inhibe totalement la signalisation cellulaire en aval. Les RHO glucosylées sont présentes de façon monomérique inactivables dans le cytosol mais également à la membrane plasmique où elles ne peuvent se lier aux GAPs et aux GDIs. Les RHO glucosylées saturant les sites d'interaction membranaires et empêchant les RHO non modifiées d'être activées<sup>151</sup>.

L'adénylation ou AMP-ylation est une autre modification covalente inhibitrice rajoutée par les toxines bactériennes sur les GTPases RHO. VopS a été identifiée chez *Vibrio parahaemolyticus* comme capable de catalyser l'attachement du groupement AMP (à partir du substrat ATP) sur l'acide aminé 37 (ou 35) de RHO, RAC et CDC42 et IbpA chez *Histophilus somni* sur la Thréonine 34. La sélectivité de ces toxines sur la forme active des protéines mérite d'être soulignée (la Thréonine étant alors située vers l'intérieur de la protéine) et a été particulièrement bien documentée concernant IbpA<sup>152</sup>. Bien que RHO, RAC et CDC42 soient toutes trois substrats de VopS *in vitro*, son effet a été largement étudié *in cellulo* sur RAC et CDC42 : la protéine RAC ainsi modifiée ne peut se lier à son effecteur PAK entraînant *in fine* l'inactivation de la signalisation en aval jusqu'à l'observation d'un phénotype cellulaire arrondi<sup>153,154</sup>.

D'autres enzymes bactériennes inactivent les RHO par clivage de leur groupement isoprénique. YopT est une cystéine protéase identifiée chez *Yersinia sp.* qui clive le groupement

isoprénique juste après la cystéine C-terminale. Suite à l'action de YopT, le cytosquelette d'actine est totalement détruit et les cellules adoptent un phénotype arrondi. En effet, le clivage post traductionnel du groupement lipidique induit l'inactivation des RHO par détachement de la membrane plasmique<sup>155</sup>. Enfin, bien que la partie polybasique soit reconnue par la protéase, YopT semble agir sur différentes GTPases (RHO, RAC1, CDC42 et RHOG) aussi bien *in vitro* que *in cellulo*, et ce, sans spécificité conformationnelle<sup>156</sup>.

*A contrario*, certaines enzymes sont capables d'activer les RHO. C'est le cas des CNF (Cytotoxic Necrotizing Factor) de *E.coli* ou *Yersinia pseudotuberculosis*. En réalisant la réaction de déamidation sur le résidu glutamine 61 ou 63 de RAC1, CDC42 et RHOA, l'hydrolyse du GTP est inhibée, ce qui bloque la protéine dans une conformation active. En conséquence, apparaissent filopodes, lamellipodes et fibres de stress. Des trois CNF retrouvées chez *E.coli*, seule CNF3 semble être sélective pour RHOA sans que les raisons de cette sélectivité soient clairement mises en évidence<sup>157</sup>. L'activation des RHO est un moyen d'induire leur dégradation, ce qui permet alors au pathogène d'envahir la cellule cible<sup>158</sup>.

En dépit de leur utilité pour décortiquer les fonctions des RHO dans la cellule, les toxines bactériennes ne sont que très peu utilisées en clinique. Plusieurs raisons inhérentes à cela :

- La nature de la toxine bactérienne : en tant que grosse protéine recombinante, les étapes de production sont contraignantes et celles de validation, de conditionnement et finalement de délivrance tombent inévitablement sous l'égide d'une réglementation particulière.
- La nature ubiquitaire des RHO et à leurs rôles multiples dans les cellules eucaryotes. Le profil de toxicité par voie systémique est facilement anticipé comme extrêmement large et il est nécessaire d'avoir recours à un usage localisé ou vectorisé.
- La localisation intracellulaire des RHO : il est nécessaire de pouvoir passer la membrane plasmique et ce qui dans le cas d'une protéine recombinante est une étape limitante.

Ainsi le seul exemple dans la littérature à retenir concerne la Cethrin® actuellement en phase II de développement clinique<sup>159</sup>. L'inhibition des RHO par la toxine C3 a montré un effet bénéfique sur la régénération neuronale après un traumatisme de la moelle épinière. Couplée à un agent de transport et formulée de façon à être administrée en topique, pendant l'intervention chirurgicale, la C3 a obtenu des résultats encourageants dans l'essai de phase I/IIa malgré le petit nombre de sujets inclus<sup>160, 161</sup>.

C'est pourquoi des petites molécules pharmacologiques ont été développées afin de pallier à ces limites d'usage.

## 4. Les petites molécules pharmacologiques

Les RHO GTPases, comme les protéines RAS, sont souvent qualifiées de protéines « undruggable ». En effet, il est difficile de développer des analogues de nucléotides comme cela a été fait pour les protéines kinases, du fait de l'affinité de l'ordre du nanomolaire pour le GTP et le GDP, et de la concentration importante (de l'ordre du micromolaire) de ces nucléotides dans la cellule. Il existe en outre peu de surfaces favorables en dehors de la poche de liaison du nucléotide à l'interaction protéique. Malgré tout, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre pour cibler l'activité des RHO sans modifier son expression cellulaire.

La localisation des protéines RHO actives étant sous la dépendance de leur modification post traductionnelle, la première approche a consisté à inhiber la prénylation des protéines. Il existe trois enzymes appartenant à la famille des prényltransférases : les farnésyl transférases et les géranylgeranyl transférases type I (et II). La farnésylation de RAS étant nécessaire à sa fonction et à son pouvoir transformant, les inhibiteurs de farnésyltransférases ont été largement développés et testés dans plus de 70 essais cliniques avec des résultats très décevants. Les inhibiteurs de géranylgeranyl transférases de type I ont été moins étudiés, de sorte qu'aujourd'hui cette stratégie a été laissée de côté.

Au laboratoire, de nombreuses études ont été faites au début des années 2000 à propos des inhibiteurs de prénylation (cf. figure 7). Entre autres, leur utilisation a permis de montrer que la modification de RHOA par un groupement lipidique (farnésyl ou géranylgeranyl) était nécessaire à sa fonction<sup>17</sup>. Le laboratoire a également développé une approche originale pour étudier le rôle de la prénylation en développant un anticorps polyclonal de lapin capable de reconnaître et d'immunoprécipiter sélectivement la forme farnésylée de RHOB *in cellulo*<sup>162</sup>. Cet anticorps est capable de reconnaître sélectivement la cystéine méthylée liée à un groupement farnésylé, évitant ainsi les étapes fastidieuses de marquage radioactif. Enfin, le rôle de RHOB dans la réponse aux inhibiteurs de prénylation a été plus particulièrement étudié. Selon l'hypothèse développée par Pendergast, la disparition de la forme farnésylée de RHOB au profit de la forme géranylgeranylée serait impliquée dans l'effet anti-transformant des inhibiteurs de farnésylation<sup>163</sup>. Cela implique que les deux formes de RHOB auraient des rôles cellulaires antagonistes : la forme farnésylée induirait la transformation alors que la forme géranylgeranylée l'inhiberait. Ainsi au laboratoire, des mutants de RHOB dont la boîte CAAX ne peut être que géranylgeranylée ou que farnésylée ont été réalisés pour étayer cette hypothèse. Les résultats indiquent que la transformation de cellules murines NIH-3T3 induite par ras est renforcée par l'expression du mutant farnésylé de RhoB alors qu'elle est inhibée par l'expression du mutant géranylgeranylé<sup>164</sup>. Cependant, ce résultat n'a pas été reproduit en cellules humaines. D'autre part, en 2002, l'équipe montre que la forme farnésylée de RHOB en réponse à l'inhibiteur de

géranylgeranyltransférase de type I empêche la disparition des fibres de stress et l'arrêt du cycle cellulaire<sup>165</sup>.

Une autre stratégie consiste à inhiber l'action des GEFs. Cependant la diversité des séquences et des structures malgré le domaine DH/PH conservé suggère la diversité de régulation et des mécanismes d'action des GEFs et rend peu efficace une stratégie ciblant l'activité des GEFs de façon directe.

Le premier inhibiteur décrit est un petit peptide d'une quarantaine d'acides aminés, le peptide TRIP $\alpha$  (Trio Inhibitory Peptide  $\alpha$ ). Il a été isolé à partir d'un criblage double-hybride en levure d'une banque d'aptamères<sup>166</sup>. Les aptamères sont de courts peptides dont la conformation est contrainte dans le squelette de la thioredoxine A, dont les propriétés de liaison permettent entre autres de discriminer des protéines présentant de fortes homologues de séquences. Il a été sélectionné pour sa capacité à interagir avec le domaine GEF2 de Trio. Après optimisation du peptide initial, le TRIP<sub>E32G</sub> a été retenu pour sa capacité d'inhibition sélective de l'activation de RHOA par TGAT, un variant d'épissage oncogénique de TRIO. Il a été par la suite validé dans les fibroblastes NIH 3T3 et dans des modèles de xénogreffe tumorale chez la souris<sup>167</sup>.

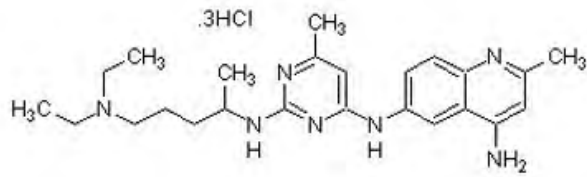
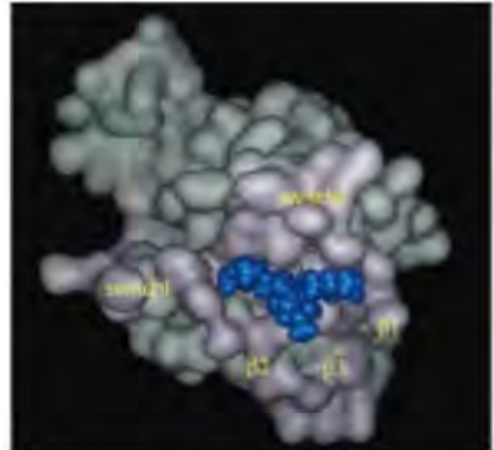
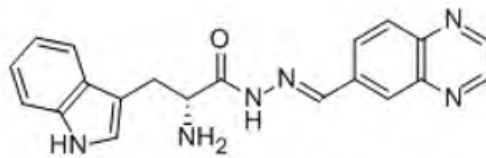
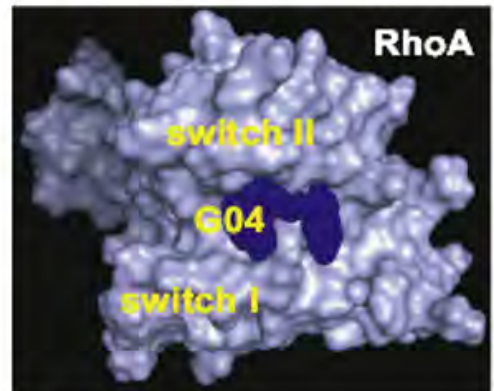
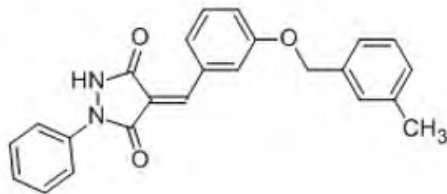
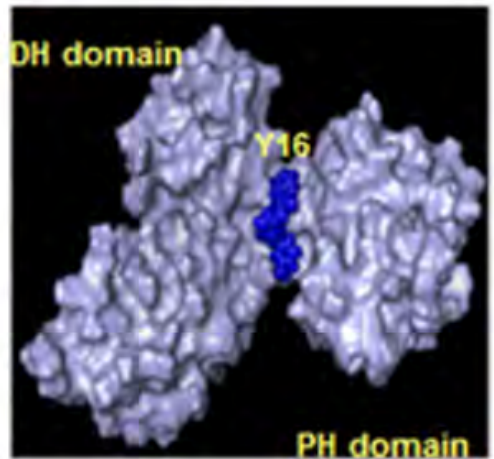
L'équipe de Zheng cible l'interaction RHO/GEF par de petites molécules pharmacologiques. Grâce aux structures tridimensionnelles des complexes GEF/RHO, elle identifie une poche de liaison sur RAC1 déterminante pour la liaison de GEFs et souligne particulièrement le rôle du résidu tryptophane 56 dans la liaison au GEF Trio et Tiam1<sup>168</sup>. Après avoir montré qu'un peptide dérivé de la séquence de RAC1 et contenant le résidu Tryptophane 56 pouvait effectivement inhiber la liaison de RAC1 à son GEF, elle crible virtuellement en 2004 la base de composés chimiques du NCI sur sa capacité à s'insérer dans la zone contenant ce résidu. Le composé NSC23766 (Figure 17) a été par la suite caractérisé *in vitro* et *in cellulo* comme capable d'inhiber effectivement l'interaction de RAC1 avec son GEF Trio ou Tiam1. Son IC<sub>50</sub> a été déterminée de l'ordre de 50  $\mu$ M et *in fine*, il inhibe la prolifération, la transformation et l'invasion d'une lignée cellulaire métastatique prostatique.

En 2012, l'équipe adopte la même démarche concernant RHOA, en ciblant une région contenant le résidu Tryptophane 58 et inhibant spécifiquement l'interaction de la GTPase avec la GEF LARG<sup>169</sup>. Après le screening de plus de 4 millions de composés de la banque ZINC, le composé G04, ou Rhosin (Figure 17) a été identifié et validé comme inhibant l'activation des GTPases RHOA, RHOB et RHOC par les GEFs LARG, DBL, LBC, p115-RHOGEF et PDZ-RHOGEF, sans interférer avec l'activation des GTPases RAC1 et CDC42. Il n'empêche pas la liaison de la GTPase à ses autres régulateurs GAPs et GDIs ni à ses effecteurs. Son affinité pour RHOA est de l'ordre de 0,4  $\mu$ M. Il permet d'inhiber la prolifération et l'invasion de cellules tumorales mammaires et restaure la croissance neuronale de PC12 en réponse au NGF. Son IC<sub>50</sub> est estimée à 30 à 50  $\mu$ M. Afin d'être

plus sélectif de l'interaction RHOGEF/RHOA, les auteurs ont choisi cette fois de cribler virtuellement la même banque mais pour isoler des molécules se liant directement au GEF et empêchant sa liaison à RHOA<sup>170</sup>. Le composé Y16 (Figure 17) avec une affinité de 80 nM se lie sur le site de jonction entre les domaines DH et PH de la protéine LARG GEF et de ses apparentés de façon sélective car il ne perturbe pas l'interaction entre les GEF DBL et LBC avec RHOA. De plus, il agit synergiquement avec la Rhosin pour inhiber la croissance, la migration, l'invasion et la formation de mammosphères. Enfin, dernièrement, l'interaction entre le GEF LBC et RHOA a pu être inhibée par une petite molécule pharmacologique issue d'un criblage virtuel sur le GEF, au niveau du site de liaison de RHOA<sup>171</sup>. La molécule inhibe en réalité l'interaction de plusieurs GEFs (LARG, GEFH1, p114, p190, PRG) avec RHOA. L'IC50 estimée est de 1,5µM. L'effet inhibiteur de la molécule est validé dans une lignée cellulaire tumorale prostatique par l'inhibition des propriétés oncogéniques et invasives de RHOA (formation des fibres de stress, formation de colonies en agar mou, prolifération cellulaire, migration cellulaire).

Un autre criblage *in silico* à haut débit a permis d'identifier la molécule ZCL278 qui bloque spécifiquement l'interaction de CDC42 avec le GEF Intersectine et prévient les fonctions induites par l'activation de CDC42 dans les cellules<sup>172</sup>. Ce composé présente une affinité de 11,4 µM pour sa cible.



**A****NSC23766****B****G04 ou RHOSIN****C****Y16 ou RHO INHIBITOR II**

**Figure 17** : Présentation des structures chimiques des petites molécules pharmacologiques inhibant les GTPases RHO. Sont figurées à côté les modélisations de leur liaison au sein des RHO. A : NSC23766 inhibant RAC1 ; B : Molécule de Rhosin inhibant RHOA. Les auteurs remarquent la nécessité pour se lier à RHOA de présenter deux structures aromatiques dans la molécule séparées par un linker de longueur et de flexibilité appropriée. C : Y16 inhibant l'interaction avec LARG GEF.

Au total les exemples fructueux rapportés montrent la validité d'une stratégie basée sur l'inhibition de l'activation de RHOs. Cependant, les molécules isolées présentent finalement de faible affinité pour leur cible et n'ont pour l'instant pas encore démontré leur efficacité en clinique. D'autre part, cibler les RHOGAPs semble beaucoup plus délicat. Notamment parce qu'il est plus facile pharmacodynamiquement d'inhiber une protéine que d'isoler un agoniste, et aussi car le mécanisme d'implication des GAPs demeure insuffisamment connu<sup>105</sup>.

## 5. Le GST-RBD pulldown

Décrite comme homologue à la petite GTPase RAS, les approches établies pour l'étude de RAS ont donc été transférées à l'étude des protéines RHO. Ainsi déterminer l'activité de la protéine endogène grâce à un anticorps à l'instar de celui employé pour RAS par Downward, a été historiquement essayé en 1996 par l'équipe de Laudanna. Malheureusement les anticorps utilisés immunoprécipitaient la forme majoritaire liée au GDP<sup>173</sup>. Dès lors seules les expériences utilisant des radionucléotides permettaient d'appréhender les questions relatives à l'activité de la protéine. En 1997, De Rooij et Bos développent une approche originale en utilisant un domaine tronqué de la protéine RAF (acides aminés 51 à 131) pour précipiter la forme active de RAS<sup>174</sup>. Leur réflexion s'est appuyée sur le fait que les effecteurs se lient à la protéine uniquement sous sa forme active. En 1999, Ren *et al*, adaptent cette démarche pour mesurer l'activité des protéines RHO. Ils choisissent d'utiliser un nouvel effecteur des RHO découvert en 1996, capable d'inhiber à la fois l'activité GTPasique intrinsèque et celle stimulée par les GAP, la Rhotekine<sup>175</sup>. Les auteurs ont donc fusionné le domaine Rho Binding Domain RBD (acides aminés 7 à 89) de la Rhotekine à la Glutathion S Transférase afin de pouvoir précipiter les complexes sur un support solide, des billes recouvertes de Glutathion<sup>176</sup>. Ainsi a été développé le GST-RBD qui est donc capable de détecter l'activité des trois protéines RHOA, RHOB et RHOC<sup>177,178</sup>. Dans une étude plus détaillée, les auteurs établissent précisément les conditions de réalisation du test<sup>179</sup>. Ils recommandent d'utiliser dans le tampon de lyse RIPA habituel une concentration saline importante (0,5 M) afin de débarrasser la protéine de sa liaison aux effecteurs et/ou GAPs et de procéder à basse température (5°C). Après centrifugation, le lysat cellulaire est directement transféré sur les billes de GST-RBD et l'interaction se fait à 4°C pendant 45 minutes maximum. En effet, au-delà, les auteurs ont remarqué diminution de la fraction RHO active. Le remplacement dans le tampon de lyse des détergents forts type SDS et Sodium Deoxycholate par 1% Triton X100 est envisageable dans les lignées cellulaires pour lesquelles l'utilisation du tampon initial entraîne une augmentation de la viscosité de l'échantillon par lyse nucléaire. L'équipe a également essayé un autre protocole consistant à utiliser le GST-RBD soluble directement dans le tampon de lyse et à capturer les complexes formés dans un second temps. En procédant de la sorte, les auteurs observent une fraction de RHO liée au RBD inférieure, diminution qu'ils imputent à l'incapacité de

capturer la totalité des complexes par les billes. Enfin ils recommandent de veiller à la concentration en protéines totales de l'extrait cellulaire, qui peut faire varier la fraction de RHO retenue sur les billes. Grâce à ce test, les auteurs ont pour la première fois pu estimer la fraction de RHO active (à partir d'une boîte de culture de 10cm de fibroblastes) à 3% et celle-ci s'avère multipliée par 3 à 6 fois après stimulation<sup>176</sup>.

L'affinité du RBD n'a, à notre connaissance, pas été directement déterminée. Les travaux de Ahmandian en 2004 apportent toutefois quelques éléments de réponse en déterminant l'affinité de différents effecteurs couplés à la GST, dont celle de la Rhotekine<sup>34</sup> (cf. I.B.1.b). A l'aide de nucléotides fluorescents (mantGpp(NH)p et mantGDP), les auteurs ont pu mesurer l'inhibition de la dissociation du mantGDP par les effecteurs et en déduire ainsi l'affinité respective des différents effecteurs. Ainsi, le RBD de la Rhothekin présente un  $K_D$  de 9nM pour RHO-mantGpp(NH)p alors que celui-ci lui est de 100 fois supérieur (1 $\mu$ M) pour RHO-mantGDP, confirmant ainsi la forte préférence de cet effecteur pour la forme active de RHOA. L'affinité de la construction GST-RBD pour la forme RHO-mantGpp(NH)p déterminée dans ce même système s'avère en revanche être largement diminuée de 16 fois (147 $\mu$ M). C'est à la taille de la protéine GST (26 kDa) et à l'encombrement stérique que les auteurs attribuent cette différence.

Le protocole de GST RBD est, dans l'histoire de la connaissance des fonctions des protéines RHO un tournant majeur, permettant de déterminer de façon relative la quantité de protéine activée dans un pool cellulaire. Cette technique sous format pull down ou ELISA (G-LISA) reste aujourd'hui la méthode standard d'évaluation de l'activité des RHO. Or, sachant que :

- la transduction d'un quelconque signal nécessite un rapide remodelage des voies de signalisation cellulaire ;
- la formation de complexes multimoléculaires transitoires et spatialement restreints conduit la même protéine à participer à la régulation de diverses fonctions cellulaires ;

alors, la régulation spatiale et temporelle de l'activité des RHO est le déterminant majeur de leurs différentes fonctions et le GST-RBD, tel que décrit dans ce chapitre, n'est pas adapté à cette question.

## D. Méthodes abordant l'étude de la régulation spatiotemporelle

Concernant les protéines RHO, les premières études qui se sont intéressées à cette question combinent des expériences de fractionnement cellulaire ou d'immunofluorescence et de cinétique à l'utilisation du GST RBD. Par exemple, en 2002, l'équipe de Cline décrit pour la première fois un protocole lui permettant de montrer comment les protéines RHO, RAC, et CDC42 régulent la morphologie neuronale. Dans ce protocole, retenons en particulier un temps d'incubation du GST RBD 4°C sur la nuit, une étape de postfixation par du PFA, un anticorps secondaire anti GST également à 4°C sur la nuit<sup>180</sup>. Ces précautions, soulignant la difficulté d'aller détecter les quelques molécules de RHO activées dans la cellule, montrent en conséquence la nécessité de développer un outil plus sensible.

D'autres ont choisi de fusionner le RBD à la protéine fluorescente GFP. Cette construction a par exemple été utilisée pour visualiser l'activation de RHOA dans des fibroblastes MEF fixés et perméabilisés après une expérience de blessure<sup>181</sup>. Trois équipes ont également tenté d'exprimer cette construction dans les cellules vivantes pour visualiser de façon dynamique sa translocation dans les régions cellulaires où la GTPase est activée. A titre d'exemple, les dynamiques d'activation de CDC42 et de RHOA dans un modèle de blessure d'oocyte de Xénope ont pu être précisément visualisées<sup>182</sup>.

Cependant, cette approche souffre du manque de sélectivité du RBD vis à vis des trois protéines de la sous-famille RHOA. Il semble également légitime de se demander si l'impossibilité de discriminer la fraction liée à la GTPase de celle non liée ne risque pas d'augmenter le bruit de fond. Et dans l'exemple cité, il est possible de supposer que le mécanisme observé génère une forte activation de RHOA, permettant de sortir du bruit de fond mais cette technique s'avèrerait insuffisante pour détecter de faibles changements d'activité.

Ces méthodes sont lourdes à mettre en œuvre et sont pourvoyeuses d'informations partielles car finalement peu sensibles. Elles soulignent la nécessité de développer des biosenseurs d'activité plus performants. En premier lieu, la technologie FRET, par sa capacité à détecter des interactions protéine-protéine *in cellulo* a donc été largement adaptée à l'étude des petites GTPases.

### 1. Les biosenseurs de FRET

Le développement des sondes de FRET (Forster Resonance Energy Transfer) dans le domaine des petites GTPases a eu lieu grâce à la découverte de variants de la GFP capables de réaliser un transfert d'énergie de type FRET et à la découverte des principaux effecteurs des RHO. Il intègre les contraintes liées à la technologie de FRET en elle-même mais également celles inhérentes à son sujet d'application, les protéines RHO.

Le FRET consiste au transfert d'énergie entre un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur si ceux-ci se trouvent à proximité l'un de l'autre et si le spectre d'émission du premier recouvre partiellement le spectre d'absorption du second. Suite à l'excitation du fluorophore donneur par un photon d'une longueur d'onde appropriée, le fluorophore donneur émet un photon de longueur d'onde caractéristique mais transmet également une partie de son énergie au fluorophore accepteur qui, s'il se trouve à proximité et correctement orienté, rentre en résonance et s'excite à son tour. Dès lors, il y a émission par le fluorophore accepteur d'un photon de fluorescence. L'efficacité du transfert d'énergie est régie par une loi mathématique qui dépasse le cadre de cette introduction mais dont nous retiendrons seulement les paramètres contraignants (outre le rendement quantique du donneur et le coefficient d'extinction de l'accepteur, généralement optimaux dans les fluorophores choisis) :

- la distance séparant les deux fluorophores doit être inférieure à 80 Å
- l'orientation relative du donneur et de l'accepteur (parallèle l'un à l'autre pour une efficacité maximale de transfert)<sup>183</sup>.

Or, dans les cellules en culture, les contributions respectives de la distance séparant les deux fluorophores et de l'orientation des deux dipôles ne sont pas analysables séparément. Ce qui conduit à l'élaboration empirique des sondes de FRET par variation de la taille des linkers et de l'orientation des fluorophores et donc à un travail important de mise au point.

L'étude des RHO rend le développement des biosenseurs de FRET quelque peu plus compliqué. Contrairement aux protéines RAS, dont l'activation peut représenter jusqu'à près de 40% de la quantité totale de protéine, les RHO ne sont que faiblement activées, au maximum à 10%. Contrairement aux protéines RAS situées constitutivement à la membrane, les protéines RHO sont liées aux GDI dans un pool cellulaire cytoplasmique inactif. Ce qui a pour contrainte d'avoir à détecter de faibles signaux d'activation dans un fort bruit de fond<sup>66</sup>.

Différentes sondes de FRET ont été imaginées et nous nous restreindrons à celles appliquées à la sous-famille RHOA (Figure 18). Cependant, elles reposent toutes sur le même principe : l'activation de la protéine cible conduit à un changement d'efficacité du transfert d'énergie en altérant la distance et/ou l'orientation des fluorophores. Ce changement d'efficacité est mesuré par une augmentation ou une diminution du ratio entre le signal de fluorescence émis par le fluorophore accepteur et le fluorophore donneur.

Nous retiendrons des premières approches sur RAC et CDC42 leurs enseignements. Initialement en effet, les premiers biosenseurs de FRET appliqués à RAC étaient sous format bimoléculaire, c'est à dire sur que le FRET s'effectuait entre deux protéines physiquement séparées. Cette méthode est aussi connue sous le terme de FLAIR pour Fluorescence Activation Indicator for RHG proteins. Le domaine de liaison de PAK était couplé à un fluorochrome tandis que RAC1 était

couplé à la GFP<sup>184</sup> (Figure 18). En dépit de la spécificité du signal mesuré (le FRET proprement dit n'ayant lieu que si les deux protéines marquées interagissent), leurs localisations et leurs taux d'expressions intracellulaires différents rendaient la quantification du signal FRET difficile, ne révélant que les localisations où RAC1 s'accumule. Ces constructions s'avéraient incapables de détecter de faibles changements d'activité<sup>185</sup>. En effet la quantification d'un signal FRET n'est envisageable que si les deux fluorophores sont distribués de façon similaire dans la cellule et si leur abondance relative est stœchiométriquement fixe. D'autre part selon cette conception des sondes de FRET, il est important de nuancer que le biosenseur révèle non pas l'activation *per se* de la protéine mais plutôt l'exposition d'un domaine protéique d'interaction. En effet le biosenseur rentre en compétition directe avec les ligands naturels de la protéine et peut alors ne pas arriver à la détecter, surtout si la protéine appartient à de larges complexes moléculaires<sup>185</sup>. Nuance importante car elle a permis de poser l'hypothèse de la régulation par les intégrines de la libération de RAC1 de son complexe formé avec les GDI dans un modèle de cellules en migration<sup>185, 184</sup>.

Afin de faciliter la quantification des signaux de FRET, la conception de sondes unimoléculaires a été privilégiée (Figure 18). En 2003, l'équipe de Matsuda rapporte le développement de deux sondes appliquées à l'étude de RHOA dans la division cellulaire : la sonde Raichu-RBD et la sonde Raichu-RHOA (Raichu par analogie à la sonde précédemment développée pour Ras, Ras and interacting protein chimeric unit)<sup>186</sup>. La sonde Raichu-RBD comprend le RBD flanqué de part et d'autre de la CFP (Cyan Fluorescent Protein) et de l'YFP (Yellow Fluorescent Protein). Sa conception est basée sur l'observation d'un changement de conformation au sein du RBD au moment de sa liaison avec RHOA-GTP. Ce changement se traduit au niveau de la sonde par une perte du signal FRET. Elle permet ainsi de suivre indirectement l'activité des RHOGDI mais reste insuffisante pour étudier précisément l'une des trois GTPases par le manque de sélectivité du RBD.

C'est pourquoi la conception de sondes unimoléculaires comprenant la protéine cible et son domaine d'interaction flanqué de part et d'autre par les deux variants de GFP entre lesquels se fera le FRET a été privilégiée. Quand les deux partenaires protéiques interagissent, alors les fluorophores se rapprochent et/ou se réorientent. Cette sonde devant mimer exactement le comportement de la protéine endogène dans son contexte intracellulaire, sa validation s'avère laborieuse. Il convient en effet de déterminer :

- l'expression en dessous de laquelle les fonctions cellulaires ne sont pas modifiées,
- mais également celle permettant d'obtenir un signal de FRET suffisamment au-dessus du bruit de fond,
- les ligands avec lesquels la sonde rentre en compétition, ceux par lesquels elle peut être régulée,

- si la localisation de la sonde de FRET est superposable à celle de la protéine endogène<sup>187</sup>.

Alors, avec une calibration adéquate, il est possible de relier le changement d'efficacité du FRET mesuré à la quantité de protéine activée<sup>188</sup>. Le recours à un système inductible permettant de mieux contrôler l'expression du biosenseur peut s'avérer nécessaire, car sa trop forte expression conduit à la saturation des RHOGDI donc à l'activation permanente de la construction à la membrane et à l'observation finale d'un ratio d'activation faible, de façon erronée<sup>187</sup>.

Dans la sonde Raichu-RHOA, le RBD de la PKN et RHOA sont reliés directement par un linker et flanqués de part et d'autre par les fluorophores donneurs et accepteurs. Après avoir testé plusieurs domaines effecteurs, leur choix s'est porté sur celui de la PKN permettant d'obtenir la sonde la plus sensible possible quant au changement d'activité de RHOA. Dans ce schéma conceptuel, la séquence d'adressage à la membrane plasmique doit être rajoutée sur les fluorophores, entraînant la translocation permanente du biosenseur à la membrane plasmique et l'empêchant d'être régulé par les GDIs. Si cette sonde s'avère utile pour mesurer les changements d'activation de RHOA à la membrane suite à l'action de GEFs ou de GAPs, elle ne peut en revanche suivre la navette cytosol / membrane. C'est pourquoi Pertz *et al.* ont imaginé une autre sonde, changeant l'organisation des protéines. Afin de conserver la partie C-terminale de RHOA intacte (celle-ci étant l'élément déterminant la localisation de la protéine), les fluorophores sont dès lors encadrés par la GTPase et son domaine effecteur, le RBD (de la Rhotekine). Avec cette sonde, ils ont été en mesure de révéler pour la première fois la localisation de l'activation de RHOA au front de migration de MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts)<sup>189</sup>.

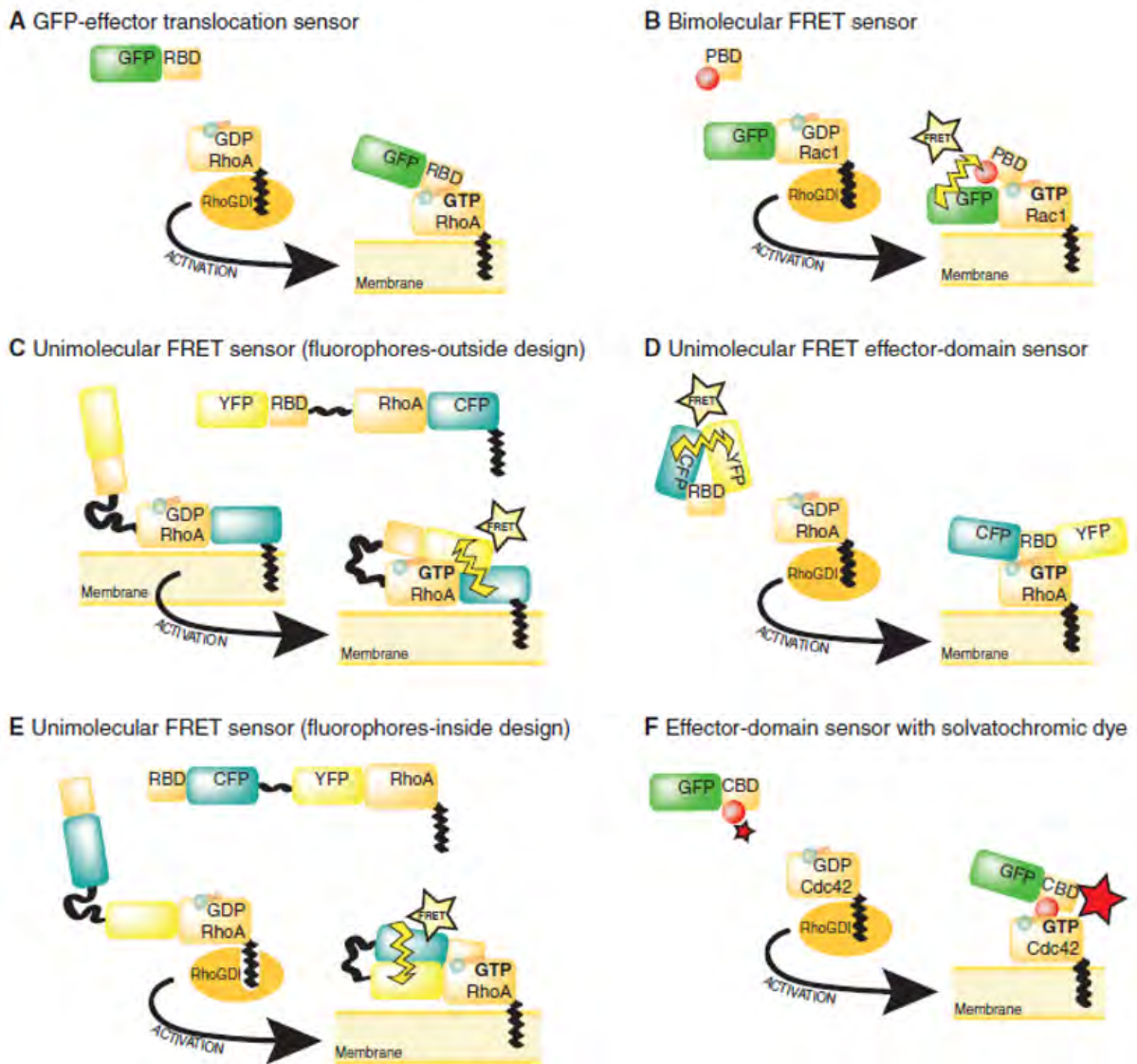
Plus récemment la même équipe a développé un biosenseur pour visualiser l'activité de RHOC selon le même schéma mais en utilisant d'autres variants de la GFP<sup>190</sup>. Enfin, dernièrement, un biosenseur de RHOB a été également développé et a permis de confirmer le rôle particulier de RHOB dans les cellules endothéliales étudiées<sup>77</sup>.

Il existe des alternatives à la technologie du FRET notamment lorsqu'une protéine ne peut être liée à la GFP ou à une molécule fluorescente sans perturber son activité. De même il existe des alternatives lorsque la liaison de la protéine à son domaine rapporteur d'activité n'induit pas un changement de position des fluorophores. Cette alternative repose notamment sur l'utilisation de molécules fluorescentes solvatochromiques. L'intensité ou la longueur d'onde de fluorescence de ces molécules varient selon la polarité du solvant ou l'établissement de liaisons hydrogènes. Cette propriété a été appliquée avec succès sur le domaine CRIB de WASP, permettant de détecter de façon très sensible l'activation de la protéine CDC42 endogène (Figure 18)<sup>191</sup>. Ce concept permet avantageusement de déterminer simultanément l'activité de plusieurs protéines endogènes en utilisant des molécules qui fluorescent à différentes longueurs. Cependant, l'étape de marquage dirigé sur un

site spécifique est délicate, réalisée *in vitro* et la construction doit ensuite être microinjectée dans les cellules.

Les biosenseurs de FRET appliqués aux GTPases RHO ont véritablement révolutionné la manière d'étudier ces protéines et finalement permis d'appréhender le degré de complexité supplémentaire rajouté par leur étroite régulation spatiale et temporelle. Ainsi il est maintenant admis que les GTPases RHO sont activées en quelques dizaines de secondes dans des zones subcellulaires de quelques micromètres<sup>69</sup>. Leur activation simultanée en de multiples localisations suggère qu'elles régulent différentes fonctions cellulaires et par-delà l'existence de complexes macromoléculaires de signalisation comprenant GEFs, GAPs, et effecteurs<sup>66</sup>. Et Pertz de proposer un modèle basé sur la dissection de ces modules de signalisation spatio-temporels pour mieux comprendre le rôle des RHO et de le complexifier encore en l'intégrant dans la réponse à différents stimuli cellulaires (engagement des intégrines, réponse au PDGF...)<sup>66</sup>. L'équipe de Hahn a été également en mesure d'appréhender la coordination spatiotemporelle de ces trois protéines précédemment suggérée par les expériences de biochimie globale (RAC1 et RHOA seraient mutuellement inhibiteurs ; CDC42 peut activer RAC1). Les auteurs ont contourné la difficulté de visualiser au sein de la même cellule plusieurs biosenseurs de FRET (due à la nécessité de non chevauchement entre les spectres d'émission et d'excitation des différentes paires FRET) en étudiant séparément les trois biosenseurs et en rapportant leur activation par un traitement informatique de l'image à un événement commun, la dynamique des protrusions cellulaires<sup>192</sup>. Ils ont ainsi mis en évidence l'existence de zones d'activation de RHOA mutuellement exclusives de celles de RAC1 et CDC42 (cf. I.B.3.c).





**Figure 18:** Illustration des différentes constructions de biosenseurs de FRET d'après <sup>66</sup>. **A** : Construction minimale du rapporteur d'interaction fusionné à la GFP utilisé par Benink<sup>182</sup> **B** : Construction bimoléculaire d'un biosenseur de FRET. Le domaine effecteur PAK fusionné au fluorophore Alexa546 est microinjecté dans des cellules exprimant de façon exogène RAC1 fusionné à la GFP. Le signal de FRET est plus sensible mais difficilement quantifiable par la distribution subcellulaire différente des deux partenaires. **C, D, E** : Construction de sondes unimoléculaires. La construction présentée en C empêche la régulation par les RHOGDI et restreint la construction à la membrane plasmique. C'est pourquoi la construction en E a été imaginée. **En D** : l'activation de la protéine endogène est visualisée par une diminution du signal FRET. Cette approche souffre toujours du manque de sélectivité des domaines d'interaction naturels des GTPases RHO. **F** : le domaine d'interaction est fusionné avec une molécule solvatochromique et lorsque celui-ci va interagir avec la GTPase, cela se traduira par une augmentation de fluorescence.

En conclusion de ce chapitre, nous retiendrons la quantité d'informations précieuses apportées par les biosenseurs de FRET sur la régulation intracellulaire de l'activité de petites GTPases. Cependant, au-delà de la simple observation de leur régulation, il convient maintenant d'identifier les partenaires moléculaires associés et pour cela d'utiliser des approches systématiques de screening en commençant les régulateurs du cycle que sont les GEFs, GAPs et GDI. Plus encore, connaître ce qui est à l'origine et ce qui régit l'activation spatiotemporelle de ces derniers permettra d'enrichir la compréhension des fonctions des petites GTPases. Les biosenseurs de FRET ne sont pas pour autant l'outil idéal :

- Leur conception pour chaque paire de GTPase/domaine effecteur est longue et laborieuse rendant difficile leur transposition à d'autres couples GTPase/partenaire.
- Leur sensibilité est limitée, nécessitant des méthodes de détection adaptées et performantes.
- De nombreuses calibrations sont nécessaires afin d'obtenir une relation entre le ratio FRET mesuré et la quantité de GTPases activées.
- L'établissement de lignées cellulaires stables peut être délicat en raison de la possibilité de recombinaison homologue entre les séquences très proches de la CFP et de l'YFP.
- Enfin le biosenseur est surexprimé dans la cellule, nécessitant de s'assurer de son comportement semblable à celui de la protéine endogène.

C'est pourquoi d'autres techniques permettant de révéler les interactions protéine-protéine *in cellulo* ont été étudiées. Elles reposent toutes sur la complémentation de deux parties, chacune greffée sur une des protéines cible de l'interaction, d'une même molécule dont la reconstitution par l'interaction des deux protéines étudiées génère un signal mesurable.

## 2. Les biosenseurs de complémentation de fragments protéiques

### a. Basés sur la complémentation de fluorescence

La complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC) repose sur le principe général suivant : la formation d'un complexe fluorescent par deux fragments d'une protéine fluorescente révèle l'interaction entre les protéines fusionnées à ces fragments <sup>193</sup>. Cependant, il existe un délai entre l'interaction des protéines fusionnées et l'apparition de la fluorescence. Ce décalage est dû au temps nécessaire à la fois à la complémentation entre les deux héli-protéines et à la maturation du chromophore <sup>193,194</sup>. Ainsi, le signal de fluorescence du complexe BiFC n'est pas corrélé à la cinétique des interactions des protéines endogènes et ne permet pas la visualisation en temps réel de la formation des complexes. Il est aussi important de noter que la formation du complexe BiFC est irréversible.

Cette irréversibilité ne permet donc pas l'application de cette technique au suivi dynamique de l'association/dissociation des partenaires.

A titre d'exemple, le split Venus a été appliqué pour étudier l'interaction de RHOA activée avec la protéine Armadillo p0071 pendant la cytokinèse<sup>195</sup> mais il n'existe pas à l'heure de biosenseur d'activité des RHO exploitant la technique de BiFC.

Les fragments des protéines fluorescentes utilisées pour le BiFC ont été optimisés pour leur brillance et leur capacité à former efficacement un complexe par complémentation. Malgré ces améliorations, l'inconvénient majeur du BiFC est la spécificité du signal, limitée par la solubilité des héli-protéines fluorescentes. En effet, lorsque les fragments sont peu solubles, les fusions obtenues présentent un mauvais repliement irréversible qui se traduit par leur agrégation<sup>194</sup>.

Le split GFP tripartite diffère seulement de la BiFC par la division de la GFP en trois fragments. L'association trimoléculaire des deux courts peptides GFP10 et GFP11, fusionnés chacun à un partenaire d'interaction, avec le grand fragment restant GFP1-9 va reconstituer la GFP pleine taille et donc le signal de fluorescence. Ce système a été caractérisé et validé pour la détection de complexes d'interaction *in vitro* et *in vivo* aussi bien en bactéries que dans des cellules de mammifères<sup>196</sup>.

Cette approche revêt de nombreux avantages. Le premier réside dans la simplicité de conception de la fusion des fragments de la GFP sur les partenaires protéiques. Leur petite taille minimise leur impact sur la solubilité et le repliement de la protéine de fusion. Le second réside dans la spécificité du signal mesuré : le désordre moléculaire induit par la présence des trois fragments empêche tout assemblage aléatoire et spontané de ces trois parties. Aussi, cette méthode est sensible car elle permet de détecter des interactions protéine-protéine de l'ordre du picomole *in vitro*. Sa résolution spatiale est celle de la protéine GFP, donc permet une résolution subcellulaire des interactions protéine-protéine. L'acquisition du signal fluorescent ne requiert pas d'équipements sophistiqués. Enfin, la reconstitution de la GFP est irréversible. De sorte que cette méthode peut être utile à la détection d'interactions *in cellulo* transitoires. Nous choisirons donc cette technologie afin de mettre en évidence des interactions intracellulaires entre les anticorps et les protéines RHO.

Au laboratoire, Koraichi *et al.* (article soumis pour publication) ont développé un rapporteur d'interaction intracellulaire des protéines RHO en mettant à profit la technique du split GFP tripartite (Figure 19). Dans des fibroblastes modifiés pour exprimer de façon constitutive le fragment GFP1-9, les auteurs ont co-exprimé la protéine RHOB tagguée par le fragment GFP10 et le RBD taggué par le fragment GFP11. L'activation de la protéine RHOB permet son interaction avec le RBD et reconstitue, à l'endroit où la protéine est activée, la protéine GFP et un signal de fluorescence détectable.

## b. Basés sur la complémentation de luminescence

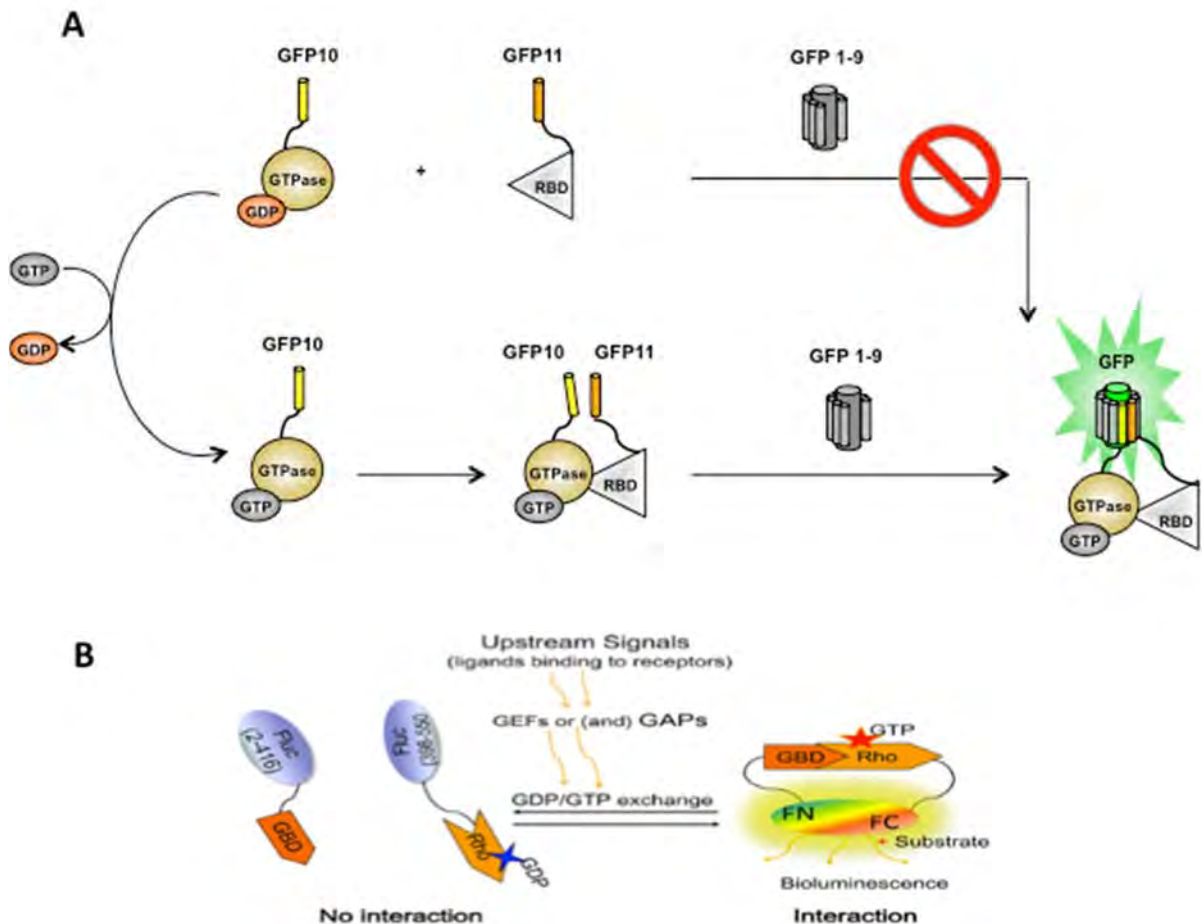
Des biosenseurs utilisant la complémentation bimoléculaire de luminescence ou split luciférase ont été récemment développés pour les GTPases RHOA, RAC1 et CDC42<sup>197</sup>. L'enzyme luciférase Firefly (LF) est divisée en deux parties, N-terminale ou FN et une partie C-terminale ou FC. Le domaine effecteur GBD et la GTPase sont respectivement fusionnés aux fragments FN et FC par de courts linkers flexibles (Figure 19).

La méthode de la split luciférase est considérée comme la plus sensible et celle présentant la plus grande gamme de réponse des méthodes d'études d'interaction protéine-protéine et ce dû à l'amplification enzymatique du signal et l'utilisation d'un substrat optimisé. En effet, l'amplitude du signal mesuré entre les dominants positifs et les GTPases sauvages est respectivement d'un facteur 2,77 ; 2,34 et 5,15 pour CDC42, RAC1 et RHOA. Ces résultats contrastent avec la plus faible sensibilité des biosenseurs FRET pour lesquelles ces mêmes facteurs sont respectivement de 1,4, 1,3 et 1,6.

Contrairement aux biosenseurs basés sur la complémentation de protéines fluorescentes, la complémentation de la split-luciférase est réversible<sup>198</sup>. Cette propriété permet l'utilisation des biosenseurs BiLC pour le suivi dynamique de l'activation et le retour à l'état d'inactivation de la GTPase. Cependant, la cinétique d'activation/inactivation des GTPases RHO détectée par bioluminescence est plus lente (de l'ordre de quelques minutes) par rapport aux sondes FRET (quelques secondes). Ces dernières présentent donc une résolution temporelle plus adaptée à un suivi en temps réel des interactions protéine-protéine.

Si on peut regretter dans cette étude de principe l'absence d'observation de ce système *in cellulo*, soulignant le manque de résolution spatiale de cette technique<sup>197</sup>, un autre avantage de la complémentation de bioluminescence est l'absence d'autofluorescence permettant l'utilisation de cette technique *in vivo* chez l'animal. Les auteurs montrent la faisabilité de cette technique en greffant des « pseudotumeurs » constituées par des cellules HEK293 exprimant les biosenseurs dans des souris nude.

Ainsi, les biosenseurs BiLC sont des outils sensibles, dynamiques, appropriés à la quantification *in vitro* et *in vivo* de l'état d'activation des GTPases RHO, et au criblage des modulateurs de leur activation. Ils sont donc complémentaires aux techniques de FRET car leur manque de résolution spatiale et temporelle ne permet pas leur utilisation pour l'étude fine de la localisation subcellulaire des GTPases.



**Figure 19 :** Illustration des techniques d'interaction protéine-protéine basées sur la complémentation moléculaire. A : Basée sur la complémentation moléculaire de fluorescence, et adaptée à l'étude des protéines RHO. B : Basée sur la complémentation moléculaire de luminescence.

## E. Difficultés inhérentes à l'étude des GTPases RHO

La diversité des outils mis en œuvre pour étudier les GTPases RHO met en évidence la difficulté de leur étude. Avant de développer les principales limites des différentes approches, il convient de récapituler ce qui rend ces protéines si particulières.

- Tout d'abord ce sont des GTPases, de petite taille et intracellulaires.
- Ce sont des protéines faiblement représentées dans la cellule. Leur quantification absolue a été rarement effectuée. Il a été proposé dans la notice des kits de mesure de la quantité de RHOA totale, une concentration variant entre 0,2 et 0,4 ng/μg de protéines totales<sup>199</sup>. Michaelson estime la quantité de RHOA, RAC et CDC42 dans trois lignées cellulaires différentes,

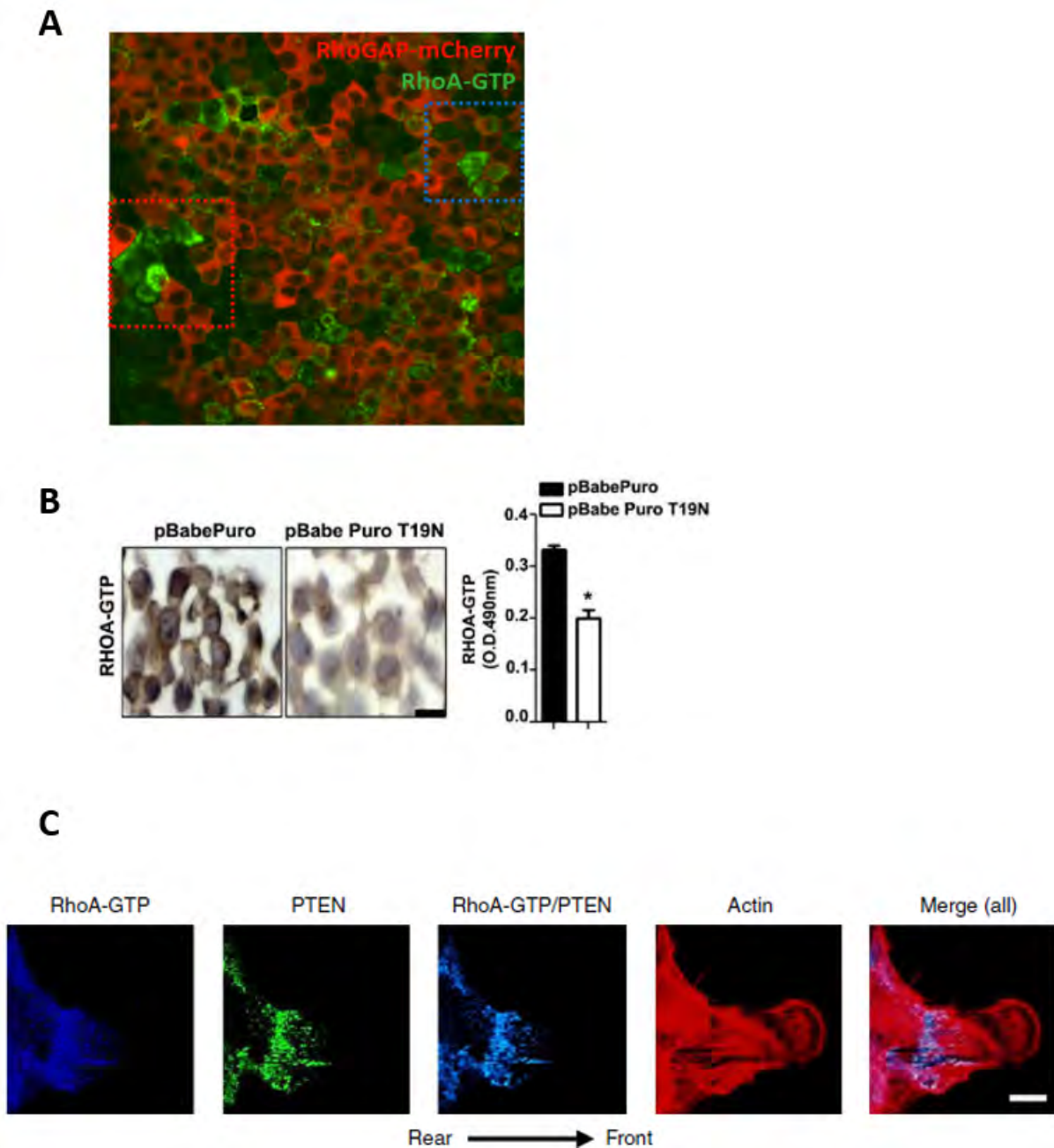
respectivement de l'ordre de 50, 100 et 40 ng à partir de 1 million de cellules<sup>21</sup>. De plus, si l'on se fie aux résultats expérimentaux du GST RBD, seulement 5 à 10% de cette quantité serait activée par un stimulus<sup>176</sup>.

- Ce sont aussi des intégrateurs de multiples voies de signalisation. La supériorité du nombre de régulateurs et d'effecteurs illustre très simplement cette notion.
- Leur activité proprement dite, celle de l'hydrolyse du GTP, n'est pas directement en rapport avec leur rôle dans la transduction du signal. C'est par leur changement conformationnel que ces protéines activent les voies de signalisation en aval. C'est donc le changement conformationnel qu'il convient de cibler pour étudier l'état actif de ces protéines.
- Ce sont des protéines dont le cycle d'activation est étroitement régulé par l'intervention d'autres protéines, soulignant ainsi la nécessité pour la cellule de contrôler précisément l'état actif de ces protéines.
- Ce sont des protéines dont l'activité est finement régulée du point de vue spatial (navette cytosol/membrane, radeaux lipidiques, surfaces intracellulaires étroites) et temporel (de quelques secondes à plusieurs dizaines de minutes).
- Ce sont des protéines dont les homologies structurales sont fortes entre protéines de la famille RHO et très fortes au sein des sous-familles respectives, conduisant à s'interroger sur cette complexité.
- Ce sont des protéines dont les membres de la même famille s'interrégulent et se coordonnent.

Reprenons alors les différentes approches.

## 1. Présentation des limites des différentes études

Localiser la protéine endogène dans une cellule consiste donc à détecter environ 1 attomole de RHO, d'après les quantités de protéines présentes, précédemment énoncées. Si la surexpression de protéines tagguées Myc ou fusionnées à la GFP ont confirmé les conclusions des expériences de fractionnement subcellulaire, l'équipe de Yonemura observe des situations où la protéines tagguées Myc ou fusionnées à la GFP ne se localisent pas au point de clivage du fuseau mitotique ou à la membrane plasmique<sup>200</sup>. La surexpression de protéines peut déséquilibrer le pool de RHO endogène et la GFP, par sa taille, peut affecter la conformation native de la protéine<sup>193</sup>. Du fait du large pool cytosolique de RHOA, surexprimer une fusion de la protéine avec la GFP masquera son activation subtile à la membrane. Donc, localiser l'activité des protéines endogènes reste aujourd'hui encore un challenge technique. Il existe néanmoins un anticorps monoclonal anti RHOA susceptible de reconnaître après fixation en PFA la forme active de la protéine. Pour autant, la fiche technique ne précise pas s'il reconnaît sélectivement une des trois RHO<sup>201</sup>. D'autre part, la résolution spatiale du marquage obtenu est à relativiser (Figure 20 pour quelques exemples de marquage dans la littérature).



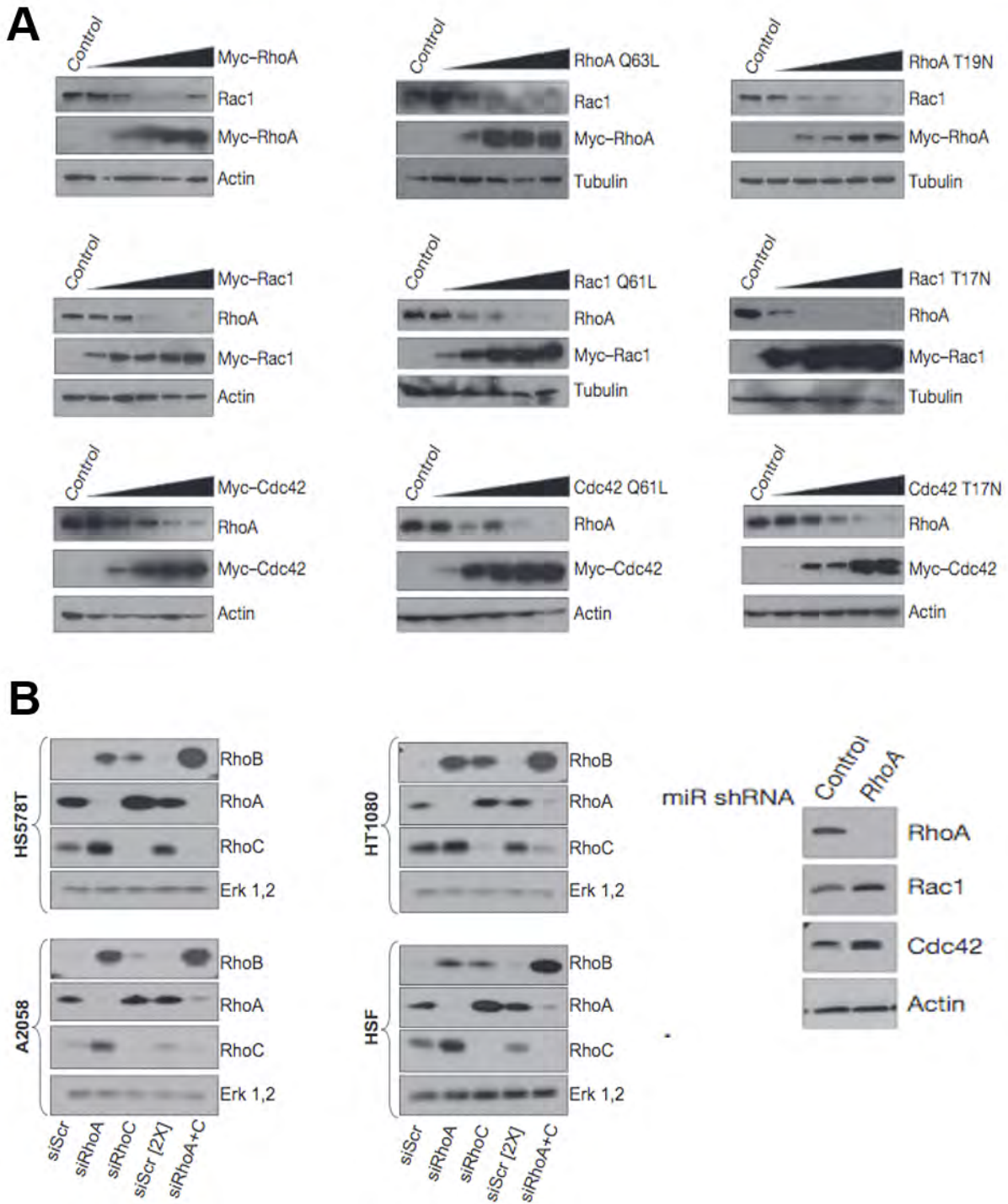
**Figure 20 :** Quelques exemples du marquage de RHOA GTP par l'anticorps monoclonal anti RHOA actif dans la littérature (<sup>202</sup>, <sup>203</sup>, <sup>204</sup>). A : Cellules MDCK exprimant p50-RHOGAP-mCherry présentent un déficit de marquage de RHOA GTP (vert) B : Validation du marquage IHC de l'anticorps sur des cellules A549 transfectées soit par un plasmide codant la Puromycine soit par un dominant négatif de RHOA. A droite, détection de RHOAGTP dans les A549 avant inclusion en paraffine C : Localisation de RHOA actif dans des cellules MCF10A en migration.

Les conclusions tirées des expériences de surexpression des protéines RHO sont à prendre avec précautions. Il a été en effet montré qu'il existe un équilibre quantitatif entre les GTPases RHOA, RAC1 et CDC42, équilibre régulé par les GDI. Dès 2001, Michaelson remarque que la quantité de GDI est équivalente à la somme des trois protéines<sup>21</sup>. Boulter, en 2010, montre que la surexpression

d'une des GTPases déplace les autres de leur liaison aux GDI ce qui favorise leur activation et leur dégradation (Figure 21)<sup>25</sup>. Par conséquent les conséquences cellulaires observées ne peuvent être seulement le fait de la surexpression de la protéine d'intérêt. Bouter de conclure au réexamen des études basées uniquement sur ce type d'approche.

Les conclusions tirées des expériences d'extinction partielle ou totale d'une protéine RHO doivent être relativisées pour les mêmes raisons. Cet équilibre est également présent entre protéines d'une même sous-famille, l'extinction de la protéine RHOA faisant augmenter la protéine RHOB et inversement<sup>205</sup> (Figure 21).





**Figure 21 :** Mise en évidence de l'interrégulation de l'expression des GTPases RHO suite à la surexpression de protéines sauvages ou mutantes<sup>25</sup>. **A :** Les cellules HEK ou HeLa ont été transfectées par des quantités croissantes de plasmides taggués myc et les cellules ont été analysées 24h après transfection. Remarquer la disparition de RHOA suite à la surexpression de RAC et CDC42 et inversement. **B :** Suite à l'extinction d'une protéine par shARN ou siARN<sup>205</sup>. Les cellules ont été transfectées par des siARN et analysées 48H après transfection. L'expression de RHOB, RAC1 et CDC42 augmentent suite à l'extinction de RHOA et de RHOC.

Les mutants DN ou CA sont souvent surexprimés sans éteindre la protéine endogène et peuvent titrer de multiples GEFs, GAPs et effecteurs en commun avec les différentes protéines de la sous-famille RHO. Feig recommande de surexprimer les mutants DN à des niveaux supérieurs à 2 à 4 fois la quantité de protéine endogène, d'effectuer des expériences de sauvetage (« rescue ») avec la protéine sauvage et insiste sur le fait que ces mutants correspondent en réalité à l'absence d'activité des GEFs et non pas à la forme inactive de la protéine<sup>124</sup>. De plus, les structures cristallographiques des mutants DN avec la forme GDP ne sont pas identiques<sup>206</sup>. Et c'est pourquoi, une approche pour bloquer les protéines Rab dans leur état actif ou inactif a été utilisée pour étudier leur localisation et serait donc très intéressante à appliquer dans l'étude des protéines RHO<sup>207</sup>. L'obtention de phénotypes cellulaires caractéristiques et typiques avec les mutants des RHO ne serait pour Pertz que le reflet de l'abondance relative des régulateurs ou des effecteurs dans une cellule<sup>66</sup>. A titre d'exemple, quand des cellules présentent une forte activité de RHOA mais une faible activité de ROCK, alors le rôle de RHOA dans les protrusions peut être mis en évidence<sup>208</sup>. Les effecteurs seraient donc activés de façon aberrante et continue, en dehors de leur régulation spatiotemporelle<sup>66</sup>.

Les toxines bactériennes modifient de façon irréversible et non sélective les RHO. Les petites molécules pharmacologiques souffrent également d'un manque de sélectivité, tant parmi les GTPases que parmi les GEFs. Ainsi toute approche d'inhibition ou d'activation globale masque les subtils changements de localisation et d'activité mis en jeu dans le contrôle de la morphologie et de la migration cellulaire. Il en est de même pour la mesure de l'activité des protéines par GST RBD pull down, celle-ci représentant une moyenne d'activation d'un pool cellulaire.

## 2. Proposition de définition d'un outil idéal

Quels seraient donc les critères requis d'un outil idéal pour l'étude des protéines RHO ? La somme des connaissances établies à partir des différentes approches suggère d'aborder la question sous l'angle de la dynamique d'activation spatiotemporelle et donc de développer un outil :

- de forte affinité pour sa cible,
- de haute sélectivité, pouvant discriminer des protéines homologues à plus de 90% (par exemple RHOA de RHOC),
- capable d'inhiber la protéine endogène,
- dont l'action peut être contrôlée à l'échelle cellulaire dans le temps et dans l'espace,
- n'ayant pas d'effet collatéraux sur d'autres protéines
- et facile à produire, stable, permettant aisément de l'ingénierie moléculaire.

### 3. Présentation de stratégies innovantes

Citons en premier lieu l'approche originale adoptée dans le laboratoire de Zheng en 2003. Afin d'inactiver sélectivement RHOA de RHOB de RHOC les auteurs proposent de fusionner le domaine GAP de p190RHOGAP avec la partie C-terminale de chacune des 3 protéines. Les auteurs parviennent à inhiber sélectivement l'activité d'une des trois protéines<sup>209</sup>.

En 2005, Inoue et collaborateurs utilisent un système basé sur l'interaction FRB/FKBP pour induire sous le contrôle de la Rapamycine la translocation d'un GEF de RAC1 à la membrane plasmique en quelques secondes, entraînant ainsi l'activation sous le contrôle de la Rapamycine de l'activation de RAC1 endogène<sup>210</sup>.

Ces dernières années ont vu aussi se développer des approches basées sur l'optogénétique. L'optogénétique est une technique qui associe dans son principe optique et génétique, c'est à dire qu'elle permet de contrôler au moyen d'un signal lumineux l'activité de cellules génétiquement modifiées. Une protéine RAC1 photo-activable a été mise au point afin de pouvoir contrôler dans le temps et dans l'espace l'activation de cette protéine<sup>211</sup>. L'activation de RHOA a pu être contrôlée par le recrutement photo-induit du GEF ECT2 à la membrane plasmique<sup>212</sup>. Les résultats obtenus démontrent la faisabilité mais aussi l'utilité de généraliser ce nouveau genre d'approche parfaitement adapté à l'étude de la régulation spatiale et temporelle de l'activité des différentes GTPases.

Au laboratoire, nous possédons une longue expérience dans la sélection d'anticorps capables de discriminer les formes activées des RHO gtpases<sup>213, 214, 75</sup>. Nous avons choisi un format particulier d'anticorps, capable d'être exprimé dans le milieu intracellulaire, comme nouveau format ciblant la forme active des RHO afin de tenter de développer de nouveaux biosenseurs d'activité des protéines de la sous-famille RHOA. Ces anticorps sont des anticorps à simple domaine, nommés VHH ou nanobody. Nous disposons en effet au laboratoire d'une nouvelle banque de nanobodies, totalement synthétique et dont le scaffold a été optimisé pour générer des anticorps solubles dans le milieu intracellulaire.

### III. Les anticorps intracellulaires

#### A. Présentation générale des anticorps recombinants

Les anticorps sont des molécules naturelles, dont les propriétés de reconnaissance pour l'antigène (diversité des structures reconnues, affinité et sélectivité) en font des outils de choix pour cibler une molécule biologique d'intérêt.

Une immunoglobuline naturelle est composée de 4 chaînes polypeptidiques, deux de 55 kDa appelées chaînes lourdes et deux de 25 kDa appelées chaînes légères (Figure 22 A et B). Ces chaînes forment des domaines d'environ 110 acides aminés, deux constituent les chaînes légères et quatre les chaînes lourdes. La molécule dans son ensemble est organisée en domaines fonctionnels : un porteur de la reconnaissance antigénique, dit Fab pour Fragment having antigen binding site et l'autre porteur des fonctions immunitaires, dit Fc pour Fragment cristallisable. La partie Fab contient deux sites de liaison à l'antigène, chacun étant lui-même constitué par l'association entre un domaine de la chaîne lourde et un domaine de la chaîne légère, dont les séquences d'acides aminés sont variables et ainsi capables de s'adapter à chaque antigène. C'est pourquoi ces derniers sont nommés VL (Variable Light) dans le cas de la chaîne légère et VH (Variable Heavy) dans le cas de la chaîne lourde. Les autres domaines possèdent des séquences qui diffèrent que très peu d'un anticorps à l'autre et sont donc nommés respectivement Constant Light (CL) et Constant Heavy (CH). La structure d'un domaine est faite de brins  $\beta$  reliés par des boucles et stabilisés par la présence de ponts disulfures (Figure 22C). Certaines de ces boucles sont directement en contact avec l'antigène, leurs séquences est donc extrêmement variable et sont appelées CDR pour Complementarity Determining Region. Les régions charpentes sont les brins  $\beta$  et les autres boucles et sont nommées FR pour Framework Region.

La production des anticorps à visée diagnostique ou thérapeutique a connu un véritable essor avec la mise au point en 1975 par Kohler et Milstein d'une technique permettant la production *in vitro* d'anticorps uniques (issus d'un seul clone de lymphocyte B) dans des conditions illimitées<sup>215</sup>. C'est la technique de l'hybridome. Auparavant, les anticorps pouvaient être obtenus par immunisation d'un animal et récupération de l'antisérum, contenant alors un pool d'anticorps dirigés contre des épitopes antigéniques différents. L'hétérogénéité de production en termes de diversité des anticorps obtenus et de reproductibilité est un des principaux inconvénients inhérents à cette technique. En fusionnant un plasmocyte de souris préalablement immunisée avec une cellule de myélome humaine, les chercheurs ont obtenus des clones de cellules hybrides ayant conservé la propriété de la cellule cancéreuse à se

multiplier indéfiniment et celle du plasmocyte à produire des immunoglobulines. Si cette technique constitue une avancée majeure scientifique, et a valu à ses auteurs le prix Nobel de médecine en 1984, elle reste pour autant limitée par la nécessité d'immuniser un animal. Ainsi l'antigène doit-il être immunogène, non toxique et si l'on désire obtenir un anticorps capable de reconnaître une conformation tridimensionnelle, alors celle-ci doit être préservée pendant le processus d'immunisation. Aussi, les premières administrations aux patients d'anticorps monoclonaux n'ont pas rencontré le succès escompté, notamment dans une stratégie thérapeutique anticancéreuse où les patients ont développé une réponse immune « anti souris ».

L'ingénierie moléculaire des anticorps monoclonaux, permise d'une part grâce à l'identification des gènes codant les immunoglobulines et aux progrès de la biologie moléculaire d'autre part, revêt une importance capitale dans leur développement tant du point de vue qualitatif que quantitatif.

#### **D'un point de vue qualitatif : diversité de formats d'anticorps recombinants**

L'engouement pour les anticorps s'inscrit à l'époque dans la démarche plus générale d'immunothérapie des cancers, soit à des fins diagnostiques ou thérapeutiques.

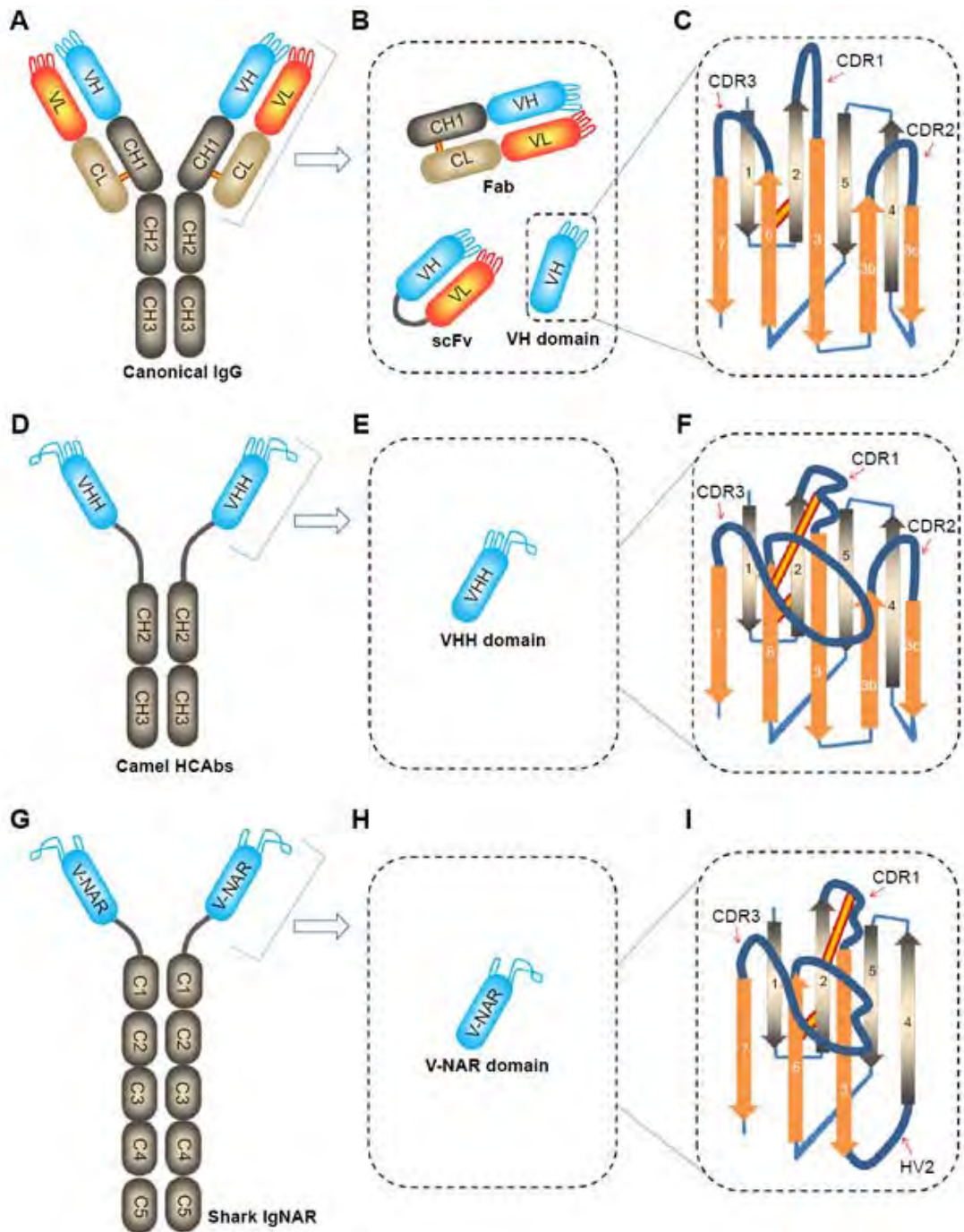
Tout d'abord, pour éviter les réactions immunitaires contre les anticorps de souris injectés, des anticorps chimériques humains/souris ont été en premier synthétisés et aujourd'hui des anticorps totalement humanisés sont majoritairement développés.

D'autre part, la chaîne constante, Fc, est connue comme porteuse de la toxicité tandis que la partie variable n'est responsable que de la reconnaissance de l'antigène et peut être isolée. En effet, il est certaines circonstances dans lesquelles la partie Fc s'avère indésirable, en donnant un fort bruit de fond en imagerie, en limitant la pénétration dans la tumeur, en déclenchant un relargage massif des cytokines<sup>216</sup>. D'où l'idée de dissocier la partie constante de la partie variable et de ne conserver seulement les domaines de liaison à l'antigène. Les travaux fondateurs sur la structure des anticorps dans les années 50 avaient montré que l'on pouvait obtenir des fragments d'anticorps fonctionnels après digestion à la papaïne ou à la pepsine<sup>217</sup> mais l'obtention du fragment Fv, plus petit domaine de liaison à l'antigène, est quant à lui beaucoup plus difficile à obtenir<sup>218, 219</sup>.

Les fragments d'anticorps sont donc le fruit des connaissances structurales des anticorps par clivage protéolytique et des progrès des techniques de l'ADN recombinant. Aujourd'hui il se distingue différents formats d'anticorps dits recombinants, c'est à dire obtenus par clonage à l'intérieur d'un vecteur d'expression procaryote ou eucaryote. Le concept a été totalement exploité avec les fragments VH et VL isolés, également appelés single domain antibodies. Pour information, en 2007, une équipe rapporte le plus petit fragment d'anticorps recombinant (3kDa) composé de deux boucles CDR

séparées par une région FR<sup>220</sup>. Cependant, ceux-ci sont peu solubles, tendent à s'agréger et à perdre leur affinité de liaison à l'antigène. En effet, la présence de la chaîne légère dans une immunoglobuline classique masque les résidus hydrophobes de la chaîne lourde.

C'est pourquoi un grand intérêt a été porté à la découverte chez les camélidés d'une part et chez les poissons cartilagineux d'autre part, de l'existence d'immunoglobulines dépourvues de chaîne légère mais porteuses d'un seul domaine de liaison à l'antigène (Figure 22 D et G). Cette classe d'immunoglobulines est fonctionnelle et représente entre 10 et 25% de la quantité totale d'anticorps d'un lama. Les domaines de liaison à l'antigène sont respectivement nommés VHH, Variable Heavy of Heavy Chain Antibody, (Figure 22E) chez les camélidés et V-NAR (Figure 22H) chez les poissons cartilagineux. Nous nous concentrerons sur les premiers.



**Figure 22 :** Comparaison des différentes structures des immunoglobulines naturelles et de leurs fragments d'anticorps recombinants dérivés. **A :** Schéma de l'organisation d'une immunoglobuline classique. **B :** Différents formats d'anticorps recombinants dérivés : Fab, scFv, single domain VH **C :** Organisation structurale du domaine VH en feuillets  $\beta$ . Les boucles CDR et le pont dissulfure sont figurés. **D :** Schéma de l'organisation d'une immunoglobuline naturelle de camélidés. **E :** Schéma du fragment VHH dérivé et son organisation structurale (**F**). Remarquer la longue boucle CDR3. **G :** Schéma de l'organisation d'une immunoglobuline naturelle retrouvée chez les poissons cartilagineux. Les immunoglobulines naturelles de camélidés sont dépourvues du domaine CH1 tandis que celles retrouvées chez les poissons cartilagineux contiennent 5 domaines constants. **H :** Schéma du fragment V-NAR dérivé et son organisation structurale (**I**). D'après <sup>221</sup>.

### **D'un point de vue quantitatif : la production chez *E.coli***

Les applications médicales nécessitent également de grandes quantités d'anticorps. Or, la production d'anticorps monoclonaux par la technique de l'hybridome demande beaucoup de précautions, est onéreuse, et difficilement mise en œuvre du point de vue industriel<sup>222</sup>. Le système d'expression choisi est donc particulièrement important. Parmi les différents systèmes d'expression, *E.coli* présente de nombreux avantages par sa simplicité de mise en œuvre, les rendements obtenus, l'efficacité de transformation, la connaissance approfondie de la génétique et de la biochimie et la maîtrise de longue date de sa manipulation à l'échelle industrielle.

La première tentative d'utilisation des techniques des techniques de l'ADN recombinant pour produire chez *E.coli* des anticorps date de 1980 et utilise l'ADNc de la chaîne kappa d'un anticorps monoclonal<sup>223</sup>. Cette preuve de principe correspond à la première synthèse d'anticorps recombinants. Des anticorps « entiers » ont aussi été exprimés mais les produits se sont avérés inactifs et agrégés dans le cytoplasme<sup>224, 225</sup>. Plükhun et Skerra sont les premiers à rapporter en 1988 la production d'un fragment variable fonctionnel chez *E.coli* en posant l'hypothèse que le transport de la protéine du cytoplasme vers le périplasma est fonctionnellement équivalent à celui vers la lumière du réticulum endoplasmique dans les cellules eucaryotes. Ce fragment variable correspond à l'hétérodimère VH/VL qui s'associe spontanément dans le périplasma oxydant et reconnaît pour forme monovalente sa cible. Il présente une affinité similaire à celui de l'anticorps monoclonal pleine taille dont il est issu<sup>226</sup>. Cependant, les difficultés d'association fonctionnelle des domaines VH et VL dans le périplasma amène l'équipe de Whitlow à imaginer une nouvelle construction liant par un peptide les domaines VH et VL. Ils rapportent la première production chez *E.coli* d'un nouveau format d'anticorps purement recombinant, plus tard nommé scFv pour single chain Fragment Variable<sup>227</sup>.

Toutefois, les rendements obtenus étaient initialement relativement décevants et ont nécessité le développement de nombreuses optimisations tant sur le plan des vecteurs d'expression cytoplasmiques ou périplasmiques que des souches bactériennes modifiées pour les enzymes régulant le caractère oxydo-reducteur de leur cytosol.



## B. Les fragments variable d'anticorps à chaîne lourde de camélidés : VHH ou nanobodies

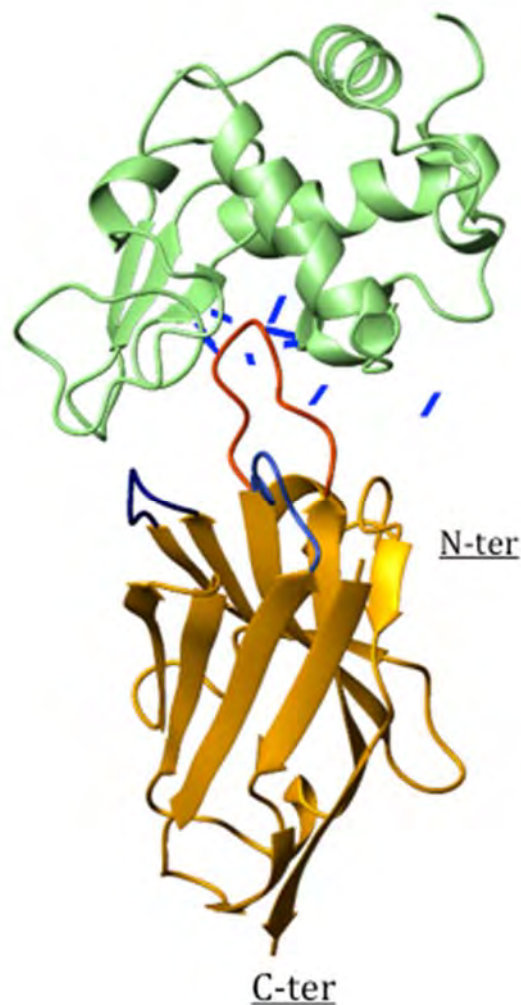
### 1. Caractéristiques générales

En 1993, Hamers-Casterman et coll. remarquent la présence de trois classes d'immunoglobulines dans le sérum de camélidés par chromatographie d'affinité sur protéine A et G. La migration en condition native et dénaturante permet d'identifier deux classes d'immunoglobulines dépourvues de chaînes légères, appelées alors anticorps à chaînes lourdes (heavy chain antibodies). Elles sont plus courtes que les chaînes lourdes des immunoglobulines classiques, due à la perte de la région CH1. Ce qui permet de répondre à deux questions concernant la sécrétion de ce type d'immunoglobuline et leur solubilité<sup>228</sup> : la perte de la région CH1 est due à une mutation entraînant un épissage alternatif de la région CH1 et cette perte empêche également la rétention dans le RE et son association à la chaîne légère<sup>229</sup>. (Les deux classes d'immunoglobulines identifiées diffèrent en réalité par la distance séparant le domaine VH du domaine CH2.) Le domaine de liaison à l'antigène est ainsi appelé VHH pour Variable Heavy of Heavy chain antibodies afin de le différencier du simple domaine conventionnel VH. Son poids moléculaire (15kDa) est 10 fois inférieur à celui des immunoglobulines classiques (150 kDa) et sa taille est de l'ordre du nanomètre, d'où leur autre dénomination « nanobodies ».

La structure des VHH a été déterminée (Figure 23). Elle est très proche de celle des VH : 9 brins  $\beta$  répartis en deux feuillets se faisant face, reliés entre eux par des boucles. L'ensemble de la structure est stabilisé par la présence d'un pont disulfure entre les cystéines (Cys22 et Cys97 dans la numérotation Kabat définie en 1991). Les boucles contenant les régions hypervariables sont situées du même côté N-terminal, et il semble que les boucles CDR 1 et 2 soient de longueur fixe tandis que la boucle CDR3 peut être de longueur variable. La boucle CDR3 étant généralement plus longue dans les VHH que dans les domaines VH d'autres IgG, ce qui semble être important pour obtenir une surface d'interaction avec l'antigène suffisamment grande, afin de pallier à l'absence de chaînes légères. Il est également à savoir que certains VHH peuvent présenter un pont disulfure supplémentaire entre les boucles CDR, afin de contraindre la flexibilité de la longue boucle CDR3 préjudiciable en terme d'entropie de liaison à l'antigène<sup>230</sup>. De façon générale, les VHH sont de forme oblongue, formant une surface paratopique convexe, très favorable pour s'insérer dans les cavités d'un antigène. La boucle CDR3 peut se comporter comme une longue protrusion mais elle peut aussi se replier sur la région FR2, formant une structure paratopique plus plate. Les possibilités de liaison à l'antigène sont donc tout aussi diverses que celles offerte par l'association des deux chaînes lourdes et légères dans les

immunoglobulines classiques. Les VHH sont aussi capables de reconnaître des épitopes concaves, comme le site actif d'une enzyme et discontinus, ce qui en fait des outils précieux pour distinguer différents états conformationnels de leur antigène cible voire les stabiliser ou les inhiber<sup>231</sup>.

La comparaison des structures primaires révèle que l'organisation structurale des régions constantes, FR (framework) et des régions variables CDR (Complementary Determinant Region) est conservée entre les VHHs et les VHs. En revanche, de nombreuses substitutions d'acides aminés se trouvent dans le FR2 où les acides aminés hydrophobes des VHs sont remplacés par des acides aminés hydrophiles et plus petits dans les VHHs. La combinaison Phenylalanine 37, Acide Glutamique 44, Arginine 45 et Glycine 47 (toujours dans la numérotation Kabat) devient ainsi une signature des VHHs et permet de diminuer l'association au VL et la tendance à agréger. De façon intéressante, il faut noter la même tendance à placer des acides aminés polaires et chargés dans ce qui serait la zone de contact avec le VL dans les V-NAR, soulignant la conservation de ce mécanisme dans l'évolution<sup>230</sup>.



**Figure 23 :** Structure cristallographique d'un VHH (orange) avec une molécule de lysozyme (vert). Les boucles CDR sont figurées en bleu clair, marine et rouge. Les liaisons H établies avec le lysozyme sont schématisées par des traits épais bleus. Noter que près de 8 liaisons H impliquent la boucle CDR3. Issu de <sup>230</sup>.

Parmi les avantages de ces anticorps, on retiendra préférentiellement :

- le fait d'être constitué d'un simple domaine de liaison. Pour les techniques de biologie moléculaire, cela suppose n'avoir qu'à cloner une seule séquence d'ADN de moins de 400pb. La construction de banques immunes ou naïves est donc aisée à partir d'une simple PCR. Leur nature monomérique autorise de nombreuses modifications par ingénierie moléculaire pour développer des constructions multidomaines, améliorant par effet d'avidité la liaison à l'antigène.
- leur affinité de liaison à l'antigène : Les VHHs issus de bibliothèques immunes présentent des KD de l'ordre du nanomolaire, ce qui en fait d'excellents outils pour la plupart des applications envisagées.
- leur production aisée : Les VHHs peuvent aussi être exprimés facilement dans des microorganismes et avec de bons rendements (plusieurs milligrammes par litre de culture). Chez *E.coli*, le clonage en fusion avec un signal de sécrétion permet l'export dans le périplasme où les conditions oxydantes sont réunies pour permettre aux ponts disulfures de se former correctement.
- leur stabilité : les VHHs sont stables, facilement concentrés entre 1 et 10 mg/ml dans des tampons standards, PBS ou Tris et peuvent être conservés longtemps à 4°C voire 37°C sans impact sur leur propriété de reconnaissance de l'antigène. Stables également à la chaleur, la plupart sont dénaturés qu'à partir de 70°C et ont la capacité à se reformer après dénaturation. Leur stabilité chimique est évaluée à 60kJ.mol<sup>-1</sup>.
- leur tolérance à l'environnement réducteur du cytosol eucaryote : les VHHs peuvent ainsi être exprimés à l'intérieur de la cellule, pour constituer des intracorps (intrabodies). Certains d'entre eux en effet peuvent être correctement maturés dans le cytosol, donc supporter l'absence de ponts disulfures ce qui en fait un format de choix pour le développement d'intracorps (cf. III).

## 2. Les banques d'ADNc de VHH et leurs méthodes de screening

Une des avancées majeures des techniques de biologie moléculaire dans la genèse des anticorps recombinants est la mise au point d'amorces de PCR permettant d'amplifier non plus un seul ADNc d'un clone de plasmocyte mais des millions<sup>232</sup>. Leur conception est basée sur la conservation des régions 5' et 3' des gènes codant pour la partie variable entre les différents clones d'anticorps. Ces amorces de PCR universelles sont ainsi à l'origine de la création des banques d'ADNc d'anticorps recombinants. Différentes banques d'ADNc de VHHs ont été développées : immunes, naïves, et synthétiques.

Les banques immunes sont obtenues après immunisation d'un lama avec l'antigène cible. Il convient de récupérer ensuite l'ARNm des lymphocytes et de le sous-cloner dans un vecteur d'expression procaryote ou eucaryote, selon la technique de sélection choisie par la suite. Une des difficultés à contourner dans la construction d'une banque immune est la contamination par des VHs. Cela peut s'effectuer par le choix d'amorces dirigées sur une région sélective du VHH ou par purification des produits PCR après migration sur gel d'agarose. Une deuxième PCR nichée peut permettre d'accroître la quantité de matériel et d'introduire des sites de restrictions en prévision de futurs clonages. Les banques immunes sont généralement peu diverses (entre  $10^6$  et  $10^7$  clones) et fortement orientées vers l'antigène cible. Mais elles fournissent en général des anticorps de forte affinité, grâce à la maturation d'affinité naturelle du système immunitaire de l'hôte. Enfin ces banques présentent les inconvénients techniques imposés par l'immunisation d'un animal : antigène immunogène, non toxique, pur, en grande quantité, non détruit par le conditionnement, et nécessité d'utiliser un animal pour chaque antigène d'intérêt. Par exemple, un VHH anti haptène (TCC : Triclocarban) présentant une forte affinité (0.98-1.37 nM) a été isolé à partir d'une banque immune de VHH et à l'aide d'un protocole de *phage display* optimisé<sup>233</sup>.

Les banques naïves correspondent au clonage du répertoire antigénique d'un animal non immunisé dans un vecteur d'expression. Monegal en 2009 décrit un protocole simple et efficace de construction d'une banque naïve à partir de sérum lama, identique à celui utilisé pour construire une banque immune<sup>234</sup>. La diversité de la banque obtenue est de  $5.10^7$  clones mais ceux-ci ne sont pas, par définition, orientés vers un antigène particulier. Cette banque permet d'obtenir des anticorps pour différentes applications : ELISA, immunofluorescence. L'affinité des anticorps retenus varie entre 10nM et 1 $\mu$ M, conformément au fait que des banques naïves fournissent des anticorps de plus faible affinité que les banques immunes. Citons pour information le développement d'une autre banque naïve, en 2014, sans originalité notable<sup>235</sup>. Enfin, les banques naïves peuvent aussi être sujettes à de la contamination par des VHs. Un travail mené au laboratoire tente d'expliquer les causes d'une telle contamination en comparant les propriétés thermodynamiques des VHs et des VHHs. Les VHHs sont effectivement plus stables que les VHs mais pourraient être paradoxalement contre-sélectionnés pendant la sécrétion périplasmique<sup>236</sup>. Ce qui permet de souligner une autre limite importante des banques naïves : l'hétérogénéité de leur structure, empêchant d'obtenir avec certitude des anticorps avec les propriétés souhaitées.

Les banques synthétiques ne présentent pas cet inconvénient car elles sont totalement fabriquées *in vitro*, garantissant leur homogénéité. La diversité est introduite dans les boucles CDR et la région FR est souvent optimisée pour certaines propriétés telles que la solubilité, stabilité. Ces banques ont été déjà développées pour différents formats d'anticorps recombinants (Fabs, scFvs, VHs) et permettent la sélection d'anticorps effectivement stables et solubles. Elles présentent en outre une large diversité fonctionnelle ( $>10^9$  clones), garantissant des clones de bonne affinité pour leur cible. En 2014, une

banque synthétique de VHH a été réalisée à partir d'un framework universel déjà identifié <sup>237</sup> et en introduisant la diversité dans la boucle CDR3<sup>238</sup>. Sa diversité fonctionnelle est estimée supérieure à 1.10<sup>9</sup> clones. Elle a été testée pour obtenir des anticorps contre 2 cibles protéiques : la préalbumine et la neutrophil gelatinase-associated lipocalin NGAL. Les auteurs montrent seulement leur capacité à reconnaître les antigènes *in vitro*, déterminent leur thermostabilité mais pas leur constante d'affinité.

La construction d'une banque demande d'anticiper son protocole de sélection. La sélection de la grande majorité des banques d'anticorps recombinants utilise la technique du *phage display* que nous détaillerons dans la partie Résultats. Ici, nous nous contenterons de comparer les principaux modes de sélection dans un tableau récapitulatif (Tableau 5).

**Tableau 5 :** Description des principaux modes de sélection des banques d'ADNc d'anticorps recombinants

	Phage display	Ribosome display	Yeast display	Mammalian display
<b>principe</b>	l'anticorps est fusionné à une protéine de la capsid du phage	l'anticorps est lié à l'ARNm par l'intermédiaire du ribosome (ou de la puromycine dans le mRNA display).	l'anticorps est fusionné à une protéine de la membrane	l'anticorps est fusionné à une protéine transmembranaire
<b>taille librairie</b>	10 <sup>7</sup> -10 <sup>10</sup>	10 <sup>12</sup> -10 <sup>14</sup>	10 <sup>7</sup> (10 <sup>9</sup> )	10 <sup>6</sup>
<b>formats d'anticorps</b>	scFv, Fab, Fab <sub>2</sub> , sdAb, diabody	scFv, sdAb	scFv, Fab, dAb	Ig pleine taille, scFv
<b>stratégie sélection</b>	<i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> , <i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	FACS	FACS
<b>valence présentation</b>	monovalent multivalent	monovalent	multivalent	multivalent
<b>avantages</b>	Robustesse simplicité large maîtrise versatilité nombreux formats d'anticorps	totalem <sup>ent</sup> <i>in vitro</i> large taille de la banque diversité par PCR rapide et automatisable	cellule eucaryote permettant la formation des ponts disulfures et N Glycosylation possible	sélection d'une paire de VH/VL par maturation d'affinité naturelle
<b>inconvénients</b>	taille de la banque introduction de la diversité par clonage lente	mise en œuvre délicate par l'instabilité relative du complexe mRNA/ribosome/Protéine	taille restreinte des banques par efficacité de transformation	taille restreinte de la banque difficile à mettre en œuvre
<b>applications</b>	banques naïves, immunes, synthétiques maturation d'affinité	maturation d'affinité augmentation de la stabilité	maturation d'affinité Augmentation de l'expression et de la stabilité	sélection d'anticorps à visée thérapeutique

Nous terminerons ce paragraphe en évoquant une méthode totalement inédite de sélection de VHH parue en 2014<sup>239</sup>. Les auteurs ont développé un outil bioinformatique leur permettant d'identifier à partir des séquences d'ADNc d'un animal immunisé d'une part, et de l'analyse en spectrométrie de masse des VHHs isolés par chromatographie d'affinité de ce même animal d'autre part, les clones d'ADNc les plus intéressants. Ils développent leur méthode sur deux antigènes communs, la GFP et la mCherry et poursuivent leur étude en caractérisant les clones obtenus. La puissance de l'outil bioinformatique permet de ne cribler que quelques anticorps (quelques dizaines seulement) par rapport au *phage display* qui nécessite de cribler quelques centaines de clones. L'intérêt de cette méthode prend également tout son sens dans l'identification d'anticorps spécifiques chez les patients atteints du VIH<sup>240</sup>.

## C. Les anticorps intracellulaires

### 1. Caractéristiques générales

Exprimer dans le cytosol des cellules un anticorps constitue une approche séduisante pour, de façon générale, aborder les questions de protéomique fonctionnelle dont les applications possibles intéressent aussi bien la recherche fondamentale que la thérapeutique. Il s'agit de cibler les interactions protéines-protéines, de perturber les voies de signalisation, de suivre en direct la dynamique spatiotemporelle de leur activation. Pour les cibles présentant des variants d'épissage ou qui diffèrent par une modification post traductionnelle, cette approche constitue un moyen d'étude inédit.

Des études rapportant l'utilisation d'anticorps à l'intérieur des cellules sont rapportées dès les années 1980, en utilisant la microinjection. Cependant, cela s'avèrera vite fastidieux, limité par la quantité d'anticorps nécessaire et la quantité de cellules à injecter, limité également par la faible proportion d'anticorps correctement formé à l'intérieur du cytosol eucaryote. Là encore, le développement des anticorps intracellulaires est donc intimement lié à celui des techniques de l'ADN recombinant. Biocca *et al.* en 1990 ont été les premiers à faire directement exprimer dans une cellule de mammifère de lignée non lymphoïde des fragments d'anticorps VH et VL, démontrant aussi leur capacité à s'associer correctement. Cependant, ils s'avèreront non fonctionnels dans la cellule. Le défi est grand : il s'agit d'identifier des molécules qui puissent être stables et solubles dans l'environnement intracellulaire, sans pont disulfure et sans l'intervention de protéines « chaperons » alors que, au fil de l'évolution, elles ont été destinées à être sécrétées et par conséquent à être stables dans l'environnement extracellulaire. Or, le caractère réducteur du cytoplasme ne permet pas la formation des ponts disulfures, qui contribuent pourtant à 4-6 kCal/mol soit environ 10% de la stabilité globale de l'anticorps<sup>241</sup>. De plus, l'encombrement moléculaire intracellulaire favorise l'oligomérisation des

protéines et leur agrégation<sup>242</sup>, agrégation à l'origine d'un stress « protéotoxique » pouvant entraîner la mort cellulaire. Enfin, le niveau d'expression propre à l'intracorp peut augmenter son instabilité<sup>241</sup>.

Quels sont donc les principaux déterminants de la fonctionnalité d'un intracorp ?

Théoriquement, ce serait un anticorps intracellulaire qui :

- Tolère l'absence de pont disulfure
- Soit soluble dans le cytosol eucaryote
- S'exprime correctement dans le cytosol eucaryote
- Soit capable d'atteindre sa cible
- Présente une bonne affinité et sélectivité pour sa cible
- Ne présente pas donc pas d'effet non spécifique
- Soit résistant aux protéases intracellulaires.

## 2. Stratégies d'identification

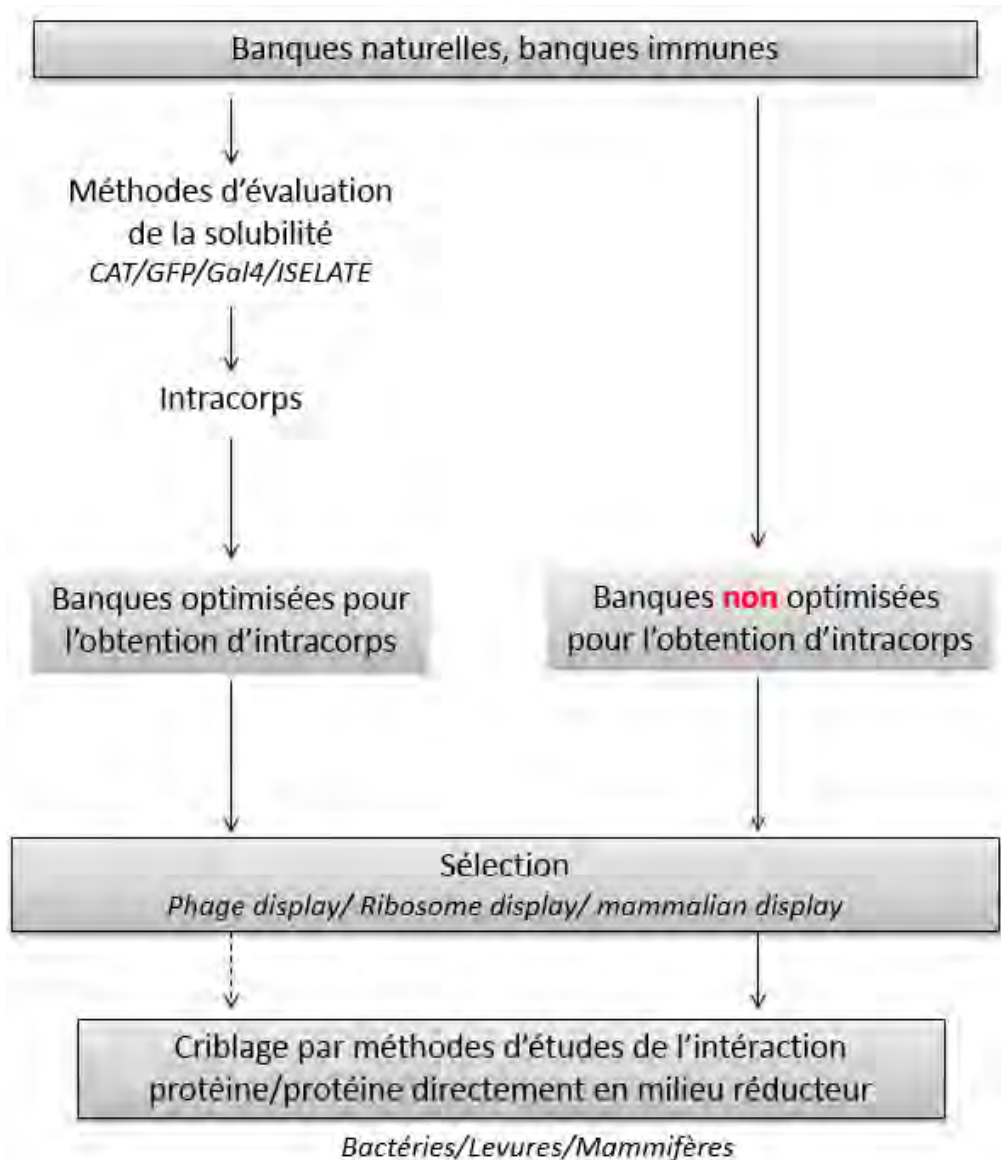
Or, réunir toutes ces conditions est difficile à prédire *in silico*. La littérature recense de nombreux exemples d'identification fortuite d'anticorps recombinants, de différents formats, stables dans le milieu intracellulaire eucaryote suggérant que tous les anticorps présents dans les banques d'anticorps recombinants ne font pas effectivement tous de bons intracorps (0,1%-10% selon les banques et les formats d'anticorps)<sup>243</sup>. Ce qui renforce la nécessité de développer une stratégie à part entière et dédiée afin de faciliter leur identification. La stabilité et la solubilité intracellulaires étant les déterminants principaux de la fonctionnalité d'un intracorp, différentes stratégies ont été mises en œuvre pour améliorer ces propriétés (Figure 24).

Nous citerons de principe la stratégie consistant à modifier les propriétés redox de la souche bactérienne utilisée pour augmenter les rendements de production et qui n'est généralisable aux cellules de mammifères. De la même façon, nous ne reviendrons pas sur l'approche qui consiste à fusionner les intracorps avec une protéine d'*E.coli* jouant le rôle de protéine « chaperon », la MBP<sup>244</sup>, car celle-ci, si elle doit être envisagée d'un point de vue thérapeutique chez l'Homme, s'avère être fortement immunogène<sup>245</sup>.

Dans l'objectif d'identifier les paramètres physico-chimiques qui influencent la stabilité et la solubilité des anticorps, Messer *et al* comparent les séquences de scFv solubles et de VHH stables dans le milieu intracellulaire<sup>241</sup>. La charge globale de la protéine et son caractère hydrophobe dans une moindre mesure sont les déterminants majeurs de la solubilité d'un anticorps : les anticorps les plus acides au pH cytoplasmique et les moins hydrophiles sont les plus solubles dans le cytoplasme intracellulaire. A noter l'influence importante de la séquence des boucles CDR sur ces deux

paramètres. Toutefois, cette simple analyse de séquences protéiques ne suffit pas à prédire avec précision le comportement des anticorps dans le milieu intracellulaire et reste simplement indicatrice.

L'analyse de la littérature permet de dégager deux grandes stratégies d'identification des intracorps (Figure 24). La première consiste à optimiser les paramètres influant sur la solubilité, pour dégager une séquence consensus permettant éventuellement soit d'améliorer un anticorps existant soit par la suite de construire une banque dédiée à la sélection d'intracorps. La seconde stratégie consiste à adapter une méthode de screening pour sélectionner directement des intracorps fonctionnels à partir d'une banque existante.



**Figure 24 :** Représentation schématique des différentes approches utilisées dans la littérature pour isoler des intracorps.



### a. Création de banques optimisées

A partir d'un anticorps recombinant déjà identifié pour ses propriétés de liaison à un antigène cible, une étape de mutagenèse dirigée ou aléatoire peut permettre d'augmenter la solubilité. Cette approche a été plusieurs fois utilisée (notamment dans les travaux de Plückthun) et nous reviendrons plus particulièrement les travaux de DaSilva qui transforme un domaine VH en un VHH par mutation dirigée sur les acides aminés 37, 44, 45, 47 et 103 (V37F, G44E, L45R, W47G et W103R) pour augmenter la solubilité intracellulaire<sup>246</sup>. Muyldermans possède une centaine de VHH dont les propriétés physicochimiques ont été caractérisées. A partir d'un VHH de propriétés connues (stabilité, taux d'expression intracytoplasmique, capacité à adopter une conformation stable sans ponts disulfure) il propose un squelette de FR qui supporte l'introduction de séquences CDR et favorise leur stabilité<sup>237</sup>.

Enfin d'autres ont réfléchi à la conception de banques d'anticorps optimisées pour l'identification d'intracorps. Celles-ci ont été bâties à partir d'un squelette d'anticorps soit identifié fortuitement comme présentant des propriétés d'intracorps soit identifié après une sélection portant sur la solubilité des intracorps. Cette approche fait donc appel à des techniques permettant d'évaluer la solubilité d'anticorps dans le cytoplasme des cellules et repose notamment sur l'utilisation d'une protéine rapportrice de la solubilité. Nous détaillerons ici ces différentes techniques.

Pour la construction d'une banque de scFv dédiée à l'identification d'intracorps, certains auteurs sont partis d'un scFv précédemment optimisé pour son expression cytoplasmique. La diversité a été introduite au sein de la boucle CDR3 et une sélection par le filtre CAT (Chloramphénicol Acetyl Transferase) a été utilisée pour éliminer les fragments VH et VL qui ne s'exprimaient pas<sup>247</sup>. La comparaison de deux scFv antitubuline issus de cette banque dans des cellules de mammifères révèle cependant que des anticorps solubles dans le cytoplasme bactérien ne le sont pas forcément dans le cytoplasme eucaryote. Les auteurs proposent alors de fusionner les anticorps avec la protéine GFP pour repérer les intracorps<sup>248</sup>. En effet, Waldo et Cabantous démontrent comment la GFP permet avantageusement de sélectionner des protéines correctement maturées sans toutefois avoir appliqué ce principe à l'identification d'intracorps<sup>249, 250</sup>. Les travaux du groupe de Barberis sont basés sur la fusion d'un scFv avec une protéine rapportrice de la solubilité du scFv, ici le domaine transactivateur de Gal4. Si le scFv est soluble, alors l'association de Gal4 sur le promoteur est permise et le gène codant lacZ s'exprime<sup>243</sup>. Il est à noter que le screening effectué en levure peut être ici transposé aux cellules humaines. D'autres encore se sont basés sur la voie d'export périplasmique Tat pour développer un système permettant de contrôler la maturation des anticorps dans le cytoplasme bactérien, c'est la méthode ISELATE pour Intrabody SElection After Tat Export. En fusionnant le scFv avec un peptide TAT et la  $\beta$ -lactamase, alors les bactéries transformées par un clone soluble dans le cytoplasme sont susceptibles de pousser sur un milieu complémenté en ampicilline<sup>245</sup>.

## b. Etude de l'interaction directement en milieu réducteur

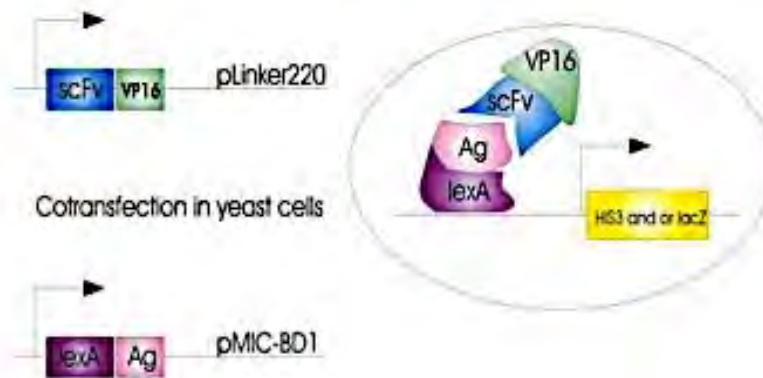
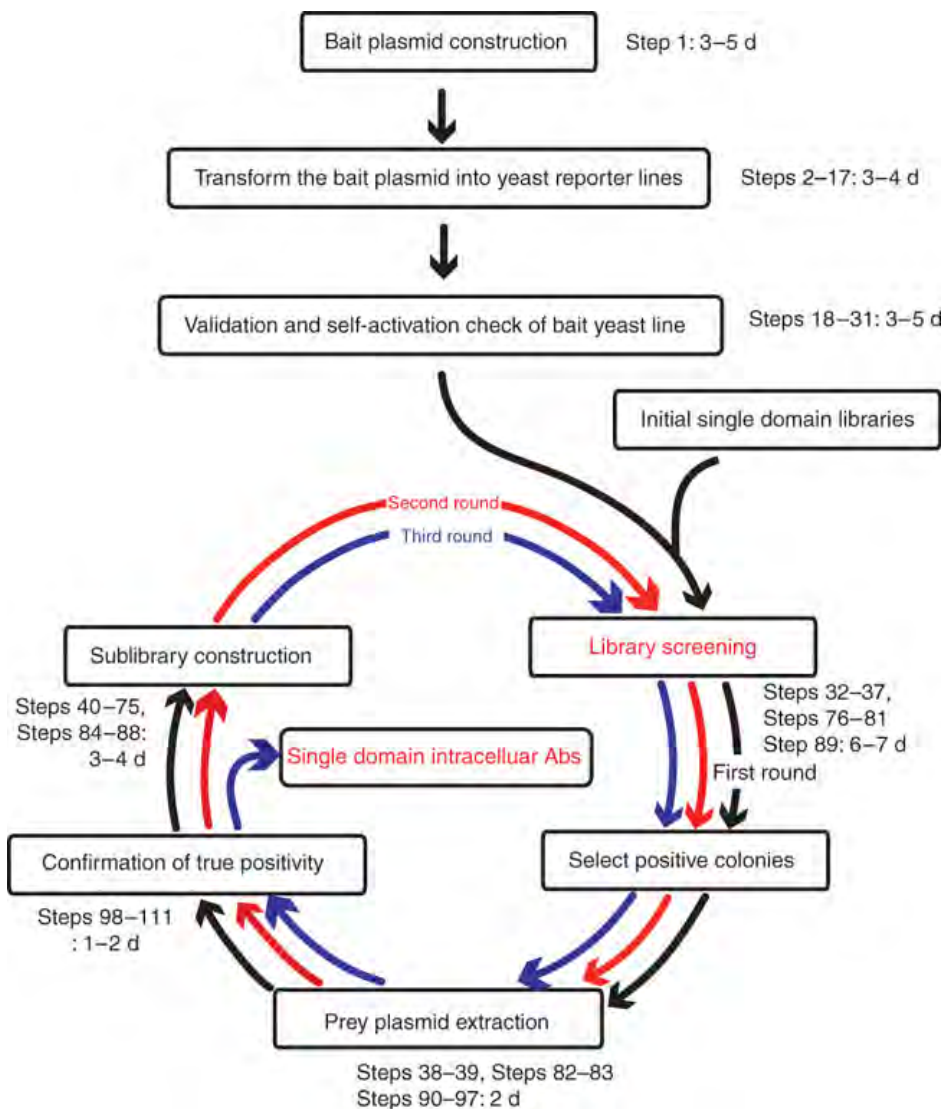
Le principe du deuxième groupe de stratégies repose sur l'identification d'une liaison antigène anticorps en milieu réducteur. L'interaction antigène anticorps peut se faire soit dans le cytoplasme bactérien, soit en levure, soit en cellule de mammifère et sera couplée à une réaction rapportrice de l'interaction basée soit sur la restauration d'une fonction enzymatique soit sur l'utilisation d'une voie de signalisation cellulaire impliquée dans le « contrôle qualité » de la maturation protéique. L'intérêt majeur de cette stratégie directe de screening sans caractérisation préalable *in vitro* est de s'affranchir d'un biais potentiel de sélection. En effet, le comportement *in vitro* n'est pas forcément prédictif du comportement *in cellulo*<sup>251</sup>.

### Levures :

Historiquement, le screening d'intracorps directement en milieu réducteur a été mis au point dans les levures. En 1999, Visintin adapte le système double hybride de Fields et Song à la détection d'une interaction entre un scFv et son antigène. Pour cela, il fusionne un scFv à un domaine d'activation transcriptionnel VP16 (AD) et son antigène cible au domaine LexA liant l'ADN (DBD pour DNA Binding Domain). Ces constructions sont cotransfectées dans une souche de levure His- (ne poussant pas sur milieu dépourvu en Histidine) mais dont le gène His est sous le contrôle d'un promoteur minimal contenant le domaine de reconnaissance LexA. Si le complexe scFv/Ag se forme *in cellulo*, alors le gène His peut s'exprimer et la croissance des levures sur un milieu dépourvu d'histidine est restaurée<sup>252</sup>. En parallèle, le gène LacZ a été aussi placé sous le contrôle d'un promoteur contenant le domaine de reconnaissance LexA de manière à disposer d'un autre test pour confirmer l'interaction *in cellulo*. La preuve de concept établie, les auteurs testent la possibilité de cribler une banque non immune de scFv par cette méthode.

Pour cela, ils y rajoutent une première sélection *in vitro* par *phage display*, développant ainsi la technologie IACT pour Intracellular Antibody Capture Technology. Ils ont notamment isolé des scFv contre la protéine associée aux microtubules TAU<sup>253</sup>, l'oncogène BCR-ABL ou l'oncogène RAS<sup>254</sup>. Cependant, l'inconvénient majeur de cette technique est la nécessité de sous cloner la banque sélectionnée après un tour de *phage display* dans le vecteur d'expression en levure VP16. La comparaison des séquences obtenues à partir de cette banque par cette technologie permet de dégager une séquence consensus, très proche des séquences des VH3 et Vκ humaines comme séquence caractéristique des intracorps. Elle sera à l'origine de la création d'une banque d'anticorps de deuxième génération, à simple domaine, après randomisation des boucles CDR directement sélectionnable par IACT (l'étape de *phage display* est donc supprimée)<sup>255</sup>. L'avantage majeur résidant dans l'absence de production et purification de l'antigène *in vitro*. La faible diversité (10<sup>6</sup> clones) de la banque reste toutefois un inconvénient mais inhérent à l'efficacité de transformation des levures. C'est pourquoi une IACT de 3ème génération a été développée<sup>256</sup>. Dans ce protocole, la faible

diversité de la banque initiale est dépassée par l'ajout d'une étape de maturation d'affinité *in vitro* par randomisation des CDR de la sous banque sélectionnée dans les tours successifs de sélection (CDR 2 au 2<sup>ème</sup> tour et CDR1 au 3<sup>ème</sup> tour). Le risque de faux positifs est largement diminué par l'alternance entre les systèmes rapporteurs de l'interaction (LexA et Gal4). Pour trouver des intracorps de haute affinité, le laboratoire de Rabbitts a développé 15 sous banques différentes (14 de VH et 1 de VL) qui peuvent être toutes criblées afin de compenser leur manque de diversité. Toutefois, cela représente un travail très fastidieux. De plus, il est difficile de discriminer les clones de fortes ou de faible affinité directement. En utilisant IAC3, les auteurs ont obtenus des VH de forte affinité contre LMO2, RAF et P53.

**A****B**

**Figure 25 :** A : Principe de la sélection par Intracellular Antibody Capture Technology. La librairie de scFv est criblée directement en levure contre son antigène cible. Une interaction positive se traduit par la croissance des levures sur un milieu sélectif. D'après <sup>257</sup>. B : Principe de la IACT3. 3 tours de sélections comprenant une étape de maturation d'affinité sont effectués avant d'obtenir des intracorps de haute sélectivité et affinité. D'après <sup>256</sup>.

Les surfaces d'interactions protéine-protéine sont souvent considérées comme très difficilement perturbables par des petites molécules pharmacologiques. Or, les voies de signalisation qui résultent de l'interaction protéine-protéine peuvent être impliquées dans de nombreux processus pathologiques. D'autre part, les anticorps sont des molécules spécialisées pour établir une interaction avec leur protéine antigénique cible. Dès lors, dans le but d'inhiber une interaction protéine-protéine, Visintin *et al* ont imaginé un essai permettant de sélectionner des intracorps « neutralisants », capables d'inhiber une interaction. Pour cela, les auteurs ont également construit une banque nommée SPLINT (Single Pot Library of Intracellular Antibodies) de scFv directement sélectionnable en levure. Le Yeast 3 Splint *assay* consiste à objectiver l'inhibition de l'interaction entre deux partenaires protéiques en présence d'un intracorps à l'aide d'un test rapporteur basé sur le double hybride de levure<sup>258</sup>.

### **Bactéries :**

Pellis *et al* adaptent la technologie IACT dans les bactéries et s'en servent pour cribler des intracorps de format VHH contre l'intégrase du virus HIV-1. Pour cela, les VHH ont été fusionnés répresseur lambda de l'opérateur du phage et cotransformés avec l'antigène fusionné à la sous unité  $\alpha$  de la RNA polymérase. L'interaction antigène/anticorps recrute la machinerie transcriptionnelle sur l'opérateur lambda et permet l'activation de gènes de sélection. L'avantage majeur étant de pouvoir cribler des banques d'ADNc de plus grande taille que des banques immunes et de cibler des antigènes non immunogènes. Ils comparent de plus cette procédure au protocole classique de *phage display*. Les anticorps retenus par le crible bactérien possèdent paradoxalement des cystéines dans leur séquence, suggérant que pour ces anticorps, l'absence de ponts disulfures n'est pas préjudiciable à leur fonction<sup>259</sup>.

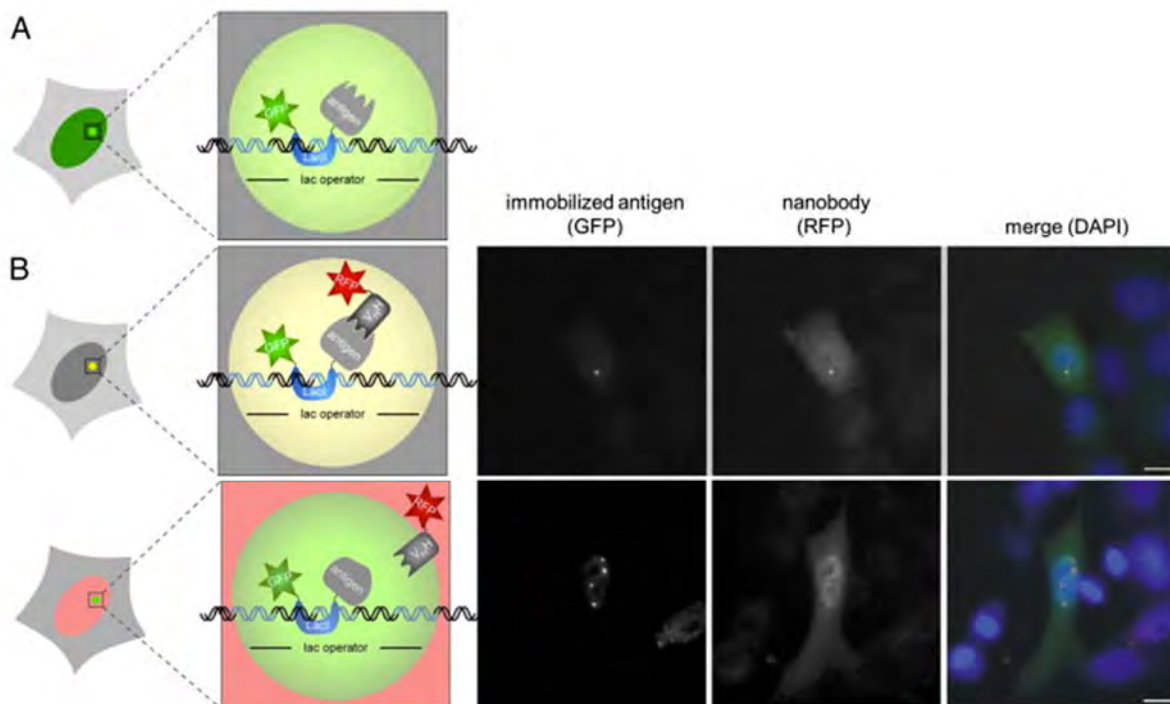
Barberis *et al* utilisent la complémentation de fragment protéique où une protéine rapportrice de l'interaction (la DHFR) est divisée en deux parties respectivement fusionnées à l'anticorps (scFv) et à sa cible<sup>260</sup>. L'interaction antigène anticorps restaurera l'activité enzymatique et les bactéries pourront être sélectionnées sur un milieu complétement en triméthopime, un antibiotique inhibant la DHFR bactérienne. Cependant, les anticorps issus d'une banque synthétique identifiés par cette méthode se sont avérés de faible affinité. L'efficacité de cette méthode est dépendante de la longueur des linkers. L'équipe ayant développé la méthode ISELATE proposera aussi d'appliquer ce système pour identifier les interactions protéines/protéines (scFv/antigène) directement dans l'environnement réducteur du cytoplasme procaryote ; c'est la méthode FLI-TRAP pour Functional Ligand-binding Identification by Tat based Recognition of Associating Proteins<sup>261</sup>. Avec cette technique, les auteurs parviennent à sélectionner des interactions de fortes affinités (1nM) nécessaires pour maintenir le complexe associé pendant le transport vers le périplasme. Cette méthode peut également être utilisée pour identifier des anticorps recombinants plus solubles ou plus affins<sup>262</sup>.

Remarquons de façon générale que ces méthodes en bactéries ne sont pas applicables à tous les antigènes (notamment si besoin d'identifier des modifications post-traductionnelles).

### Cellules de mammifères :

Sur le même principe que le 3 yeast-SPLINT, l'équipe de Rabbitts développe un test d'inhibition d'interaction protéique en cellule CHO à l'aide d'un test rapporteur basé sur la luciférase<sup>263</sup>.

Pellis *et al* adaptent le test d'interaction protéine-protéine intracellulaire F2H pour la première fois à des intracorp déjà caractérisés antiGFP. Ce test est effectué en cellules mammifères BHK ou U2OS, car celles-ci présentent l'intégration stable de 200 à 1000 copies d'un plasmide portant 256 copies de l'opérateur Lac, créant ainsi une plateforme d'interaction nucléaire avec l'expression du répresseur LacI<sup>264</sup>. Kraiser crée un vecteur d'expression GFP-LacI-Ag et fusionne l'anticorps à une autre protéine fluorescente (Figure 26). L'interaction antigène anticorps se traduit par la co-localisation de l'antigène et de l'anticorps sur la plateforme d'interaction nucléaire. L'inconvénient majeur de cette technique est la présence du bruit de fond important correspondant à la fluorescence des deux protéines, et pouvant empêcher la distinction de la liaison antigène anticorps<sup>265</sup>. La délocalisation dans le noyau de l'interaction Antigène/Anticorps peut être également limitante.



**Figure 26 :** Principe du test F2H<sup>265</sup>. **A :** Le domaine LacI lié à l'antigène reconnaît sur le chromosome l'intégration des multiples copies de l'opérateur Lac. Cela se traduit par l'apparition d'un spot de fluorescence se détachant du bruit de fond non lié. **B :** Un VHH taggué par la RFP interagissant avec son antigène cible entraîne une concentration du signal RFP au niveau de l'opérateur LacI ce qui se traduit par une colocalisation des spots de fluorescence. A l'inverse, un VHH non spécifique de la cible présente un signal de fluorescence RFP diffus dans la cellule.

### 3. Exemples d'applications des VHH

Les exemples d'applications des anticorps recombinants en tant qu'intracorps sont nombreux. Aussi dans la description des différentes applications des intracorps, nous restreindrons volontairement notre illustration aux exemples qui impliquent des VHH en particulier. C'est ici l'occasion de distinguer les intracorps des anticorps « retenus », c'est à dire des anticorps dont la voie de biosynthèse passe par le réticulum endoplasmique et dont les cibles sont membranaires. Ces derniers ne rentrent donc pas dans le champ de notre étude.

#### a. Applications *in vitro*

Les anticorps recombinants de format VHH sont de précieux outils par leur simplicité et leur robustesse autorisant toutes sortes de modifications par ingénierie moléculaire. Leurs applications en tant qu'anticorps recombinants dépassent donc celles des anticorps monoclonaux classiques. Outre leurs applications classiques *in vitro* en ELISA, immunoprécipitation (anti IgG, antiGFP ou anti EPEA tag<sup>266</sup>), c'est en immunofluorescence et en cristallographie que s'observent véritablement leurs avantages. Leur petite taille leur permet d'être avantageusement utilisés en microscopie super résolutive. En utilisant le VHH antiGFP et en le marquant avec une petite molécule, il a été possible de suivre la dynamique des microtubules ou encore le bourgeonnement chez la levure. Sachant qu'il existe de nombreuses banques de protéine tagguées GFP, les auteurs apportent ici la preuve de principe d'un moyen simple et efficace pour visualiser la localisation du protéome à l'échelle nanoscopique<sup>267</sup>. Le recours à la microscopie super résolutive (STED) est particulièrement important pour détecter l'organisation cytosquelette neuronal. L'utilisation d'un VHH antitubuline a permis ainsi de résoudre les fagots de microtubules dans des neurones<sup>268</sup>. Couplé à des particules d'or et transfecté dans les cellules, un VHH antiGFP a permis de suivre la dynamique d'une protéine de l'extrémité des microtubules<sup>269</sup>.

En cristallographie, les VHHs sont utilisées en tant que molécules « chaperons » : ils sont particulièrement adaptés pour reconnaître l'état conformationnel des protéines (cf. III.B.1) et les stabiliser<sup>270</sup>. Un bel exemple à retenir, correspond à des VHHs capables de stabiliser l'état actif des RCPG (le récepteur  $\beta 2$  adrénergique étant utilisé comme modèle d'étude). Ce sont des cibles pharmacologiques majeures mais pour autant, leur structure dans l'état actif a été extrêmement difficile à cristalliser. Afin de stabiliser le récepteur, certains ont recherché une protéine susceptible de se comporter comme la protéine Gs. Le VHH Nb80 a été ainsi isolé et caractérisé pour ses propriétés de liaison au récepteur semblables à la protéine Gs. De la sorte, le RCPG dans sa forme active a pu être cristallisé<sup>271</sup>.

### b. Applications *in cellulo*

En tant qu'intracorps, ils offrent à la communauté scientifique de nouvelles perspectives d'études des protéines en ouvrant le champ de la protéomique fonctionnelle, en :

- perturbant des interactions protéine-protéine dans l'environnement intracellulaire, jusqu'à présent inaccessibles pour les petites molécules pharmacologiques,
- révélant des interactions intracellulaires,
- ciblant des états conformationnels ou des modifications post-traductionnelles en lien direct avec la fonction des protéines,
- modulant l'activité des protéines,
- permettant de suivre la dynamique spatiotemporelle de leur antigène.

#### *Visualisation de la dynamique spatiotemporelle d'une protéine*

En 2006, Rothbauer *et al* font la première démonstration de l'utilisation des VHH en tant qu'intracorps pour suivre de façon spatiale et temporelle un antigène intracellulaire<sup>272</sup>. Cette approche fait suite à celle employée en 2003 par Nizak *et al* et utilisant un scFv pour suivre la dynamique spatiotemporelle de la petite GTPase Rab6<sup>273</sup>. La construction développée consiste en la fusion entre un VHH et une protéine fluorescente et prend le nom générique de chromobody. En premier lieu, les auteurs génèrent un anticorps antiGFP, le GFP4, qui, couplé à mRFP, leur permet de suivre des protéines étiquetée GFP pendant la phase S (GFP-PCNA) ou pendant la mitose (GFP-H2B). Par la suite, d'autres chromobodies leur permettent de cibler des protéines endogènes telles que la cytokératine ou la lamine. Plus récemment, la même équipe rapporte le développement d'un chromobody anti-vimentine qui met pour la première fois en évidence la dynamique de la protéine endogène<sup>274</sup>. Des chromobodies de haute affinité (0,16 nM) anti capsid du virus HIV permettant de suivre en direct l'assemblage du virion à la membrane plasmique. Or, cela n'était pas possible auparavant sans modifier génétiquement le virus<sup>275</sup>.

Un autre exemple majeur des applications intracellulaires des VHHs est celui qui a permis de révéler pour la première fois dans des cellules de mammifères l'activation des GPCR aux endosomes<sup>276</sup>. L'utilisation du Nb80 déjà décrit auparavant, montre qu'en réponse à un agoniste, l'activation des GPCR à la membrane plasmique est immédiatement suivie de celle dans le compartiment des endosomes précoces et que celle-ci contribue largement à la signalisation cellulaire d'aval (production d'AMPC).

#### *Détection des interactions intracellulaires in cellulo*

L'équipe de Rothbauer décline une autre application d'un anticorps antiGFP en développant le nanotrap : l'antiGFP, grâce à son affinité subnanomolaire pour sa cible, fusionné à une protéine



d'intérêt permet de déplacer efficacement celle-ci vers une localisation subcellulaire ectopique et définie par l'expression d'une autre protéine en fusion avec la GFP<sup>277</sup>.

Puis, l'antiGFP4 sera fusionné à l'opérateur LacI et exprimé dans les cellules BHK contenant l'opérateur LacO (cf. III.C.2.b) pour former une plateforme d'interaction protéine-protéine visualisable en microscopie. Les protéines partenaires de l'interaction à étudier sont respectivement fusionnées à la GFP et à la RFP. Lorsque les deux protéines partenaires interagissent alors il y a colocalisation des signaux de fluorescence et concentration de ces signaux au niveau de la plateforme de l'opérateur LacO. Cet ingénieux système de détection d'interaction protéine-protéine *in cellulo*, dénommé F3H pour Fluorescent 3 hybrid, est employé pour tester des peptides perméants capables de dissocier l'interaction protéine-protéine p53/hdm2<sup>278</sup>.

Les intracops antiGFP sont également à la base de systèmes sophistiqués permettant la modulation sélective au sein d'une population d'une activité cellulaire développés par l'équipe de Cepko (plateforme d'interaction moléculaire dépendante de la GFP et système split-recombinase dépendante de la GFP)<sup>279, 280</sup>. Ces deux systèmes ont pu être conçus grâce à l'existence de différents intracops, ciblant différents épitopes de la GFP pour être complémentaires, soulignant ainsi le potentiel tiré de la diversité des épitopes reconnus par les VHH.

Très récemment, il a été mis en évidence la possibilité de rendre l'expression de l'intracops dépendante de l'expression de son antigène avec pour applications majeures la possibilité de rendre dépendante l'expression d'une protéine de fusion de la présence d'un antigène ou encore de détecter en direct l'expression d'un antigène à l'intérieur des cellules<sup>281</sup>. Pour cela les auteurs ont créé une banque aléatoire issue de l'intracops antiGFP et fusionné les mutants à la BFP. En se concentrant sur les mutants dont l'expression de la BFP est diminuée (absente) en présence de GFP, les auteurs ont pu identifier ainsi un set de mutations à l'origine de la déstabilisation antigène dépendante de l'intracops. De façon fort intéressante, ces mutations se trouvent dans les FR et sont applicables à n'importe quel VHH.

### **Perturbation de la fonction d'une protéine**

Plusieurs stratégies ont été imaginées pour perturber la fonction d'une protéine par des intracops. Ceux-ci peuvent s'avérer intrinsèquement bloquants ou dans le cas contraire, peuvent être fonctionnalisés pour le devenir.

C'est ainsi que Caussin *et al* proposent d'exploiter la voie de dégradation dépendante du protéasome pour dégrader sélectivement une protéine fusionnée à la GFP à l'aide de l'intracops antiGFP4 lui-même fusionné à un domaine F-Box<sup>282</sup>. Ce nouveau type de knockdown protéique, ou degradFP, utilisé chez la drosophile permet ainsi d'obtenir rapidement des phénotypes « perte de fonction » en évitant les phénomènes de compensation secondaires. Il permet en outre de suivre par vidéo-microscopie simultanément la dégradation protéique et le phénotype en résultant.

Nous exploiterons ce principe au laboratoire pour dégrader, dans les cellules cancéreuses,

sélectivement la forme active de la protéine RHOB, obtenant ainsi un nouvel outil d'étude de cette petite GTPase (travail doctoral de Nicolas Béry, soumis pour publication, dont le manuscrit est présenté dans la partie résultat). De la sorte, il a pu être montré que la forme active de RHOB participe à l'acquisition du phénotype invasif et migratoire des cellules épithéliales bronchiques.

D'autres ont utilisé le domaine F-Box de  $\beta$ -TrCP en fusion avec des VHH pour dégrader la neurotoxine botulinique, permettant de rendre les neurones résistants à l'infection et plus rapidement guéris après une infection<sup>283</sup>.

La littérature recense divers exemples d'intracorps bloquants. L'expression d'un VHH inhibiteur de l'activité enzymatique de la voie de biosynthèse de l'amidon chez la pomme de terre en est l'exemple le plus pertinent<sup>284</sup>. A partir d'une banque naïve, les auteurs isolent une dizaine de VHH capable *in vitro* de se lier à l'enzyme recombinante et seulement deux capables d'en inhiber l'activité enzymatique. *In vivo*, les VHH s'expriment et se maturent correctement et n'entraînent pas de dégradation de leur cible. L'expression des VHH inhibiteurs permet d'obtenir des phénotypes plus marqués qu'avec la stratégie d'interférence à l'ARN. Cet exemple illustre par conséquent la capacité des VHH à s'insérer au niveau du site actif des enzymes et à les inhiber, sans en perturber l'expression, démontrant ainsi tout le potentiel de ces nouveaux outils pour étudier véritablement la fonction d'une protéine. Depuis, d'autres intracorps bloquants ont été décrits : un VHH anti-BAX a permis d'identifier le rôle de cette protéine dans la mort des cellules neuronales par apoptose induite par le stress oxydatif<sup>285</sup>. Issu d'une banque naïve, son affinité n'est que de l'ordre du  $\mu$ M. Une banque naïve a été également utilisée pour isoler des anticorps anti HIF1 $\alpha$ . La dimérisation de deux VHHs permet d'obtenir un intracorps de forte affinité dirigé contre le domaine de dégradation dépendant de l'oxygène. Dans les cellules, fusionnée à une séquence d'import nucléaire, cette construction inhibe la transcription dépendante du domaine NTAD (N-terminal Activation Domain) de HIF1 $\alpha$ <sup>286</sup>. La contribution de la Fascine et de la Cortactine pendant la formation d'invadopode a été élucidée par l'utilisation de deux intracorps bloquants de forte affinité (35 et 75 nM respectivement) dirigés contre chacune de ces protéines. L'anti-fascine se lie au niveau du site de liaison de l'actine, tandis que le VHH anti-Cortactine empêche son recrutement à la membrane plasmique par l'intermédiaire de son domaine SH3. Les auteurs démontrent ainsi que l'activité de la Fascine est nécessaire à la stabilisation des invadopodes et que le domaine SH3 de la Cortactine est largement impliqué dans la formation de ces structures<sup>287</sup>. A noter que les auteurs développent également une stratégie de délocalisation de la protéine en ajoutant un peptide à l'anticorps permettant son ancrage dans la membrane externe des mitochondries. Nous retiendrons particulièrement de ces deux approches la possibilité grâce aux intracorps de sélectivement cibler un domaine protéique particulier. Un intracorps capable de se lier à la CapG et inhibant son activité à l'extrémité + des filaments d'actine diminue de plus de 90% la formation de métastases pulmonaires dans un modèle de xélogreffe de cellules humaines cancéreuses mammaires. Il faut souligner ici l'importance de ces outils pour distinguer les fonctions de différentes protéines se liant à l'actine et pour lesquelles il n'existe pas d'inhibition sélective pharmacologique.

Ce papier montre également les différences dans les conclusions qui peuvent être tirées entre une approche au niveau protéique et une approche au niveau génétique<sup>288</sup> et permet de révéler aussi cette protéine comme cible potentielle au niveau pharmacologique.

### **Modulation de l'état conformationnel d'une protéine**

La diversité des anticorps antiGFP obtenus par le groupe de Rothbauer l'a conduit à examiner leurs propriétés de liaison sur la GFP. Ils caractérisent des anticorps qui se lient à des épitopes différents sur la GFP (mis à profit par le groupe de Cepko) mais également des anticorps qui modulent la fluorescence de la GFP. Ils identifient ainsi un anticorps « enhancer » et un anticorps « minimizer », qui augmente et diminue respectivement la fluorescence de la GFP en induisant des réarrangements différents au niveau du chromophore. Cet effet est observable également au sein des cellules ce qui a été mis à profit pour apporter la preuve de principe de la détection d'événement tels que la relocalisation subcellulaire<sup>289</sup>. D'autres rapportent également des anticorps capables d'activer ou d'inhiber *in cellulo* l'activité de la PKC $\epsilon$ <sup>290</sup>. Enfin, nous terminerons notre exposé sur les propriétés allostériques des VHH par les travaux effectués sur les RCPG. L'utilisation conjointe du Nb80 et d'un autre anticorps, le Nb60 (inhibiteur allostérique du récepteur  $\beta$ 2 adrénergique) a permis récemment de mettre en évidence la dynamique de réponse des RCPG suite à une activation et a conduit les auteurs à proposer un nouveau modèle d'activation de ces récepteurs<sup>291</sup>.

Ainsi les exemples tirés de l'étude des VHH antiGFP ou dirigés contre le récepteur  $\beta$ 2 adrénergique illustrent parfaitement toutes les connaissances fondamentales qui peuvent être obtenues par l'utilisation des VHH en tant qu'intracorps. Ils montrent par conséquent en quoi cette stratégie semble adaptée pour l'étude des protéines RHO.

Les récents développements de la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) cellulaire permettent de faire le lien entre la biologie structurale et la biologie cellulaire en étudiant la dynamique des conformations protéiques à l'intérieur de la cellule. Les VHHs sous format intracorps sont parfaitement complémentaires à cette nouvelle approche de façon extrêmement prometteuse<sup>231</sup>.

Les perspectives d'applications thérapeutiques des intracorps pourront être envisagées dès lors que la problématique posée par leur pénétration intracellulaire sera solutionnée. Or, à l'heure actuelle, ce point fait encore l'objet d'un champ de recherche à part entière<sup>292</sup>. Par exemple, dans un travail très récemment publié, des nanoparticules de silice ont permis de libérer efficacement des chromobodies à l'intérieur des cellules<sup>293</sup>.

En conclusion de ce chapitre, nous aborderons brièvement les applications thérapeutiques actuelles ou envisageables grâce aux anticorps de format VHH. Les VHHs peuvent être administrés chez l'Homme, et certains sont déjà en phase d'étude clinique. Leurs applications médicales relèvent à la fois du diagnostic et de la thérapeutique. Leurs résultats sont vivement attendus pour considérer définitivement les VHH comme les fameuses « balles magiques » de l'immunothérapie.

En premier lieu, il convient de s'intéresser à leur tolérance. L'immunogénicité des VHHs est une question importante, mais aujourd'hui encore controversée<sup>294</sup>. Leurs propriétés pharmacocinétiques sont de mieux en mieux connues et sont résumées dans la revue de Kijanka selon le classique ADME (Administration/Distribution/Métabolisation/Élimination)<sup>295</sup>. Elles sont particulièrement à prendre en compte en cancérologie afin d'atteindre la tumeur le plus efficacement possible. Leur clairance rénale rapide en fait de bons candidats pour l'imagerie médicale : des VHHs anti HER2, EGFR ou V-CAM1 couplés à des isotopes radioactifs ont déjà été développés.

Les VHHs ont montré leur efficacité dans quatre grands domaines de pathologies : les pathologies infectieuses, les maladies auto-immunes, les maladies neurodégénératives et l'oncologie. Différents exemples peuvent à titre d'information se trouver dans diverses revues générales<sup>296, 297</sup>. La compagnie Ablynx recense sur son site les différents VHHs en étude clinique à ce jour : <http://www.ablynx.com/rd-portfolio/overview/>.

Cette introduction a souligné les exigences associés à l'étude des protéines RHO dans une première partie, a montré que les outils d'étude disponibles à l'heure actuelle méritent d'être améliorés et complétés dans une deuxième partie, et a présenté dans une troisième partie les caractéristiques des anticorps à simple domaine issus des camélidés. Ce qui nous a conduit à développer une stratégie basée sur l'utilisation de ce format d'anticorps pour concevoir de nouveaux outils cellulaires adaptés à l'étude des protéines RHO.

# **OBJECTIFS ET RESULTATS**



# OBJECTIFS ET RESULTATS

Notre équipe tente d'identifier les mécanismes moléculaires associés à la résistance des cellules tumorales aux thérapies ciblées. Notre équipe s'intéresse particulièrement à deux grandes pathologies tumorales très agressives et pleinement concernées par la problématique de la résistance, les cancers du poumon et le mélanome. Pour cela, notre équipe adopte une stratégie translationnelle avec un laboratoire de recherche fondamental tentant d'identifier (et éventuellement d'inhiber) les mécanismes moléculaires associés à la résistance et dans lesquels les GTPases RHO sont impliquées et un secteur de biologie prospective tentant d'identifier chez les patients les marqueurs de résistance aux thérapies.

En tant qu'Assistant Hospitalo-Universitaire, j'ai partagé mon travail entre une activité hospitalière de validation d'examens de biologie médicale, une activité d'enseignement à la faculté de pharmacie et une activité de recherche dans le secteur de biologie prospective et dans le secteur de biologie fondamentale. Je présenterai ici les travaux concernant la partie la plus fondamentale.

J'ai tenté dans l'introduction de montrer en quoi les GTPases RHO sont des acteurs importants des mécanismes de résistance notamment par leurs rôles dans les processus migratoires et invasifs. J'ai également fait ressortir la nécessité de disposer d'outils d'étude plus performants afin de mieux comprendre leur rôle. Enfin j'ai présenté les avantages issus d'une stratégie basée sur la génération d'intracorps bloquants.

C'est pourquoi le principal objectif de ma thèse a été le suivant : tenter de mettre au point des anticorps sélectifs de la forme active de la protéine RHOA afin de disposer d'un outil innovant et plus performant. La versatilité du format des anticorps à simple domaine choisi a permis par la suite d'envisager différentes applications, *in vitro* avec la mise au point d'un test biochimique de mesure de l'activité des RHO et *in cellulo* avec la caractérisation des propriétés des intracorps obtenus.

A mon arrivée au laboratoire, nous disposions d'une nouvelle banque synthétique d'anticorps à simple domaine, encore non caractérisée. C'est à partir de cette nouvelle banque, optimisée pour l'obtention d'intracorps, que nous souhaitons travailler.

Pour cela, une partie de mon travail doctoral a consisté à la mise au point des conditions de sélection par *phage display* de cette nouvelle banque pour l'obtention d'anticorps sélectifs de la conformation active des protéines RHO. Les premiers résultats obtenus ont participé à la validation de cette nouvelle banque d'intracorps, validation ayant fait l'objet d'une publication et dont le manuscrit est présenté dans la partie résultats (article 1, Moutel *et al*). La mise au point des conditions de sélection de la banque et la caractérisation biochimique *in vitro* des anticorps obtenus ont été mises à profit pour l'obtention d'intracorps capables de dégrader sélectivement la forme active de RHOB. Les résultats obtenus sont le fruit du travail de Nicolas Béry et font l'objet également d'une publication

dont le manuscrit est présenté dans la partie résultats (article 2 Bery *et al*, soumis pour publication). Dans ce travail, ma participation concerne le développement des conditions et des outils permettant la mise en œuvre de la sélection par *phage display* ainsi que la caractérisation *in vitro* des propriétés de l'anticorps NB6. Enfin, la mise au point d'un nouveau test de mesure biochimique de l'activation des GTPases RHO *in vitro*, semblable au GST-RBD et la caractérisation d'un intracorps bloquant de la sous-famille RHOA constituent l'essentiel de mon travail doctoral et seront présentés sous la forme de deux articles encore en cours de préparation. C'est pourquoi nous avons choisi de rédiger la partie méthodes et résultats en anglais, et par souci de clarté, nous avons intégré les figures dans le texte des résultats.

L'obtention de ces anticorps repose en partie sur les conditions de sélection de la banque. Nous avons choisi de sélectionner cette banque par la technique du *phage display*, technique modulable à façon selon les propriétés désirées des anticorps. Afin de bien comprendre la procédure de sélection par *phage display* nous reviendrons sur quelques aspects théoriques avant de décrire comment nous avons optimisé le protocole de sélection pour obtenir des anticorps conformationnels et sélectifs des GTPases de la sous-famille RHOA.

#### **Historique et principe du phage display**

En 1985, la communauté scientifique tentait d'identifier les ADNc codant les peptides/protéines d'intérêt. Dans les cas où un anticorps anti peptide/protéine d'intérêt existait, des banques d'ADNc recombinant pouvaient alors être criblées indirectement grâce à cet anticorps, mais cela nécessitait la mise en œuvre de protocoles fastidieux dans lesquels la correspondance entre la protéine et son ADNc était établie *a posteriori*<sup>298</sup>. Smith décrit une méthode innovante dont le principe fondamental repose sur l'association indissociable du peptide d'intérêt à son ADNc grâce à un vecteur, le phage filamenteux. Smith parvient en effet à faire exprimer par le phage un peptide qui lui est étranger en fusion avec une protéine de sa surface<sup>299</sup>. Associée à une étape de sélection par affinité grâce à un anticorps anti peptide immobilisé sur un support solide, cette avancée majeure permet ainsi de faire émerger le clone d'ADNc codant pour le peptide d'intérêt au sein d'une banque.

Cinq ans plus tard, McCafferty et coll. utilisent ce principe pour sélectionner des banques d'anticorps recombinants. Cette fois ce sont des scFv qui sont présentés en surface du phage et c'est l'antigène qui est fixé<sup>300</sup>. Ils démontrent également que cette méthode permet d'enrichir en clones d'intérêt (facteur d'enrichissement estimé à  $1.10^6$ ) et donc permet de faire émerger des clones faiblement représentés au sein d'une banque grâce à la répétition des tours de sélection.

La mise en œuvre de cette technique nécessite le clonage d'une banque d'ADNc en fusion 5' du gène codant la protéine apicale PIII du bactériophage M13. Le bactériophage M13 est un virus non lytique, filamenteux qui infecte les bactéries *E.coli* munies du pilus sexuel qui peut être apporté, entre autres, par l'épisome F'. Le phage infecte les bactéries par l'intermédiaire de sa protéine P3 et transfère son matériel génétique dans le cytoplasme bactérien. Lors d'un cycle de réplication viral, le

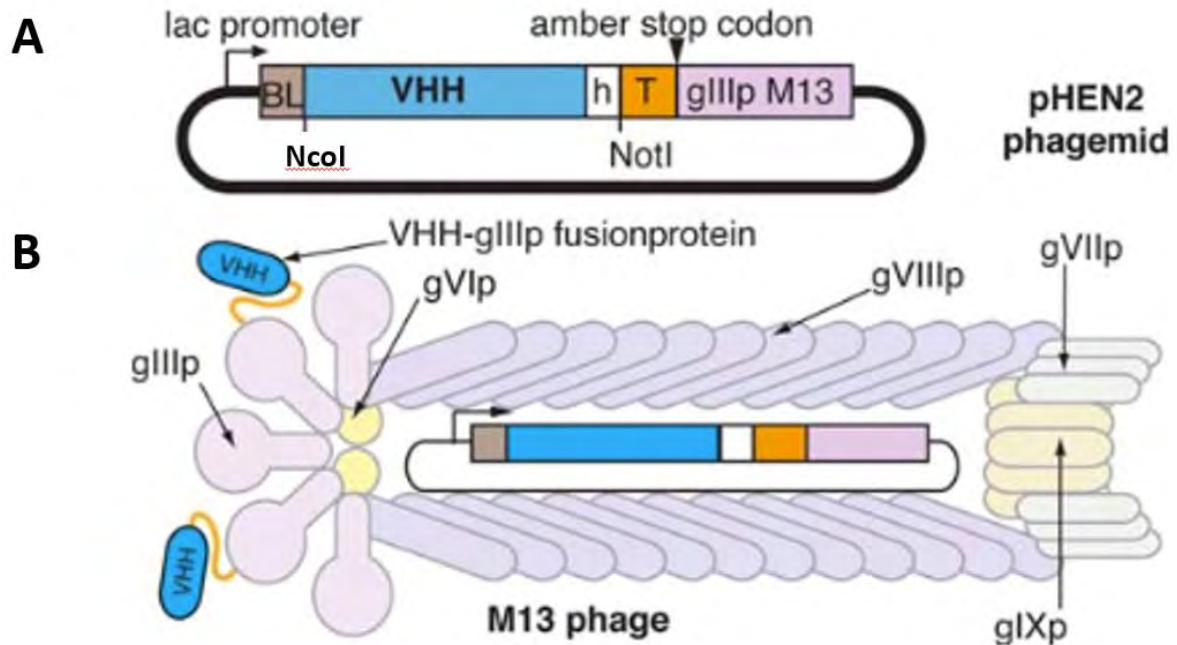


phage détourne à son profit la machinerie répliquative et transcriptionnelle de son hôte. L'expression de la protéine de fusion et son incorporation successive dans le manteau permet l'expression de l'anticorps en surface du phage tandis que son ADNc demeure au sein de la particule. Les particules virales sont assemblées dans le périplasme bactérien et finalement excrétées dans le surnageant de culture sans lyse des bactéries<sup>301</sup>. La production de particules virales étant un processus très efficace, cette technique est donc particulièrement adaptée au criblage de banques de grande taille.

Une sélection par *phage display* consiste donc à enchaîner des tours de sélection de la banque (exprimée en surface des phages) sur un antigène d'intérêt. Cet enchaînement conduit à l'enrichissement de la suspension de phages en clones spécifiques qui seront ensuite testés par criblage. Pour cela, les phages exprimant la banque initiale sont mis en présence de l'antigène cible, lui-même immobilisé sur un support solide. Les phages présentant un anticorps spécifique sont retenus par leur interaction avec leur antigène cible tandis que les phages non adhérents sont éliminés par simple lavage. Les phages liés spécifiquement sont ensuite élués et ré-infectent des bactéries pour être à nouveau amplifiés et à nouveau sélectionnés sur l'antigène. De sorte que au fil des tours de *phage display* se constitue une « sous » banque, enrichie en clones reconnaissant l'antigène cible. Finalement, le *phage display* mime *in vitro* un protocole d'immunisation naturelle (Figure 28).

Les différentes étapes du protocole de *phage display* font ressortir quelques paramètres importants à prendre en considération. En premier lieu, le mode d'expression des ADNc. Le clonage peut être réalisé directement dans le génome du phage mais pour des raisons d'efficacité de transformation bactérienne, celui-ci est le plus souvent réalisé dans un phagemide<sup>302</sup>. Un phagemide est un vecteur plasmidique qui, en plus de son origine de répllication propre contient une origine de répllication virale. Il porte le gène de la protéine PIII flanqué des sites de clonage appropriés et d'une séquence signal d'adressage à la membrane interne de la bactérie, permettant ainsi l'encapsidation de la protéine (Figure 27). Un phagemide est également préféré dans les cas nécessitant le recours à un promoteur inductible. L'avantage est de pouvoir inhiber l'expression de la fusion anticorps-PIII pendant l'amplification de la banque pour éviter un biais d'expression des différents clones dû à leur toxicité différentielle<sup>222</sup>. L'utilisation d'un phagemide implique d'avoir recours à des phages dits auxiliaires ou helpers (M13KO7 ou VCSM13) qui apportent toutes les autres protéines structurales du phage mais dont l'origine de répllication est défaillante. La particule virale sera ainsi constituée par le phagemide encapsidé et en surface par un mélange entre la protéine PIII et la protéine PIII chimère. Le choix de la protéine PIII a été largement privilégié car celle-ci est représentée en 5 copies à l'apex du phage et tolère l'expression de grosses protéines. Même si elle est impliquée dans l'infectivité du phage, l'expression d'une protéine de fusion ne semble pas affecter dramatiquement l'infectivité des phages. D'autres protéines de surface, comme la PVIII ont pu être aussi utilisées. La PVIII est exprimée en très grande quantité à la surface du phage (2700 copies), plutôt privilégiée pour les

peptides courts et l'effet d'avidité créé peut entraîner la sélection d'anticorps peu affins pour leur cible. Pour conserver un assemblage de capsid correct, les fusions pVIII ne doivent pas représenter plus de 20% des protéines de capsid. Un des paramètres déterminants dans la réussite d'une sélection par *phage display* est donc la présentation efficace de l'anticorps en fusion avec la protéine PIII. Or, il a été largement observé que celle-ci est largement inefficace, certains estimant que le nombre total de phages dépourvus de protéine de fusion est de près de 99,5%<sup>303</sup>. C'est pourquoi le type de phage auxiliaire a été optimisé. Certains, comme les hyperphages ou M13KO7ΔpIII ne possèdent aucune séquence de PIII dans leur génome. En conséquence toutes les particules infectantes seront des particules constituées par les chimères de fusion anticorps-PIII. Ceci est particulièrement avantageux au premier tour de sélection pour augmenter les chances d'isoler un anticorps par simple effet d'avidité. D'autres comme les phages helpers KM13 dans lesquels la séquence de la protéine PIII a été modifiée avec l'introduction d'un site de clivage par la trypsine<sup>304</sup>. Là encore, après traitement à la trypsine, seules les particules virales ayant incorporé une protéine PIII chimère (ne contenant donc pas ce site de clivage) seront infectieuses. Enfin, citons les phages VCSM-13 CT, présentent une protéine PIII dépourvue des domaines N1-N2 de la PIII nécessaire à l'infection. Les particules phagiques obtenues ne seront donc infectieuses que si elles possèdent de la même façon les chimères de fusion anticorps-pIII<sup>302</sup>. Une stratégie dite SIP, pour Selectively Infective Phage, combinant l'étape de sélection à l'étape d'infection a été développée. L'anticorps est fusionné à la protéine pIII délétée des domaines N1 et N2 et l'antigène est quant à lui fusionné aux domaines N1 et N2. Ainsi, l'interaction de l'anticorps avec son antigène permettra de reconstituer une protéine PIII infectieuse<sup>302</sup>.



**Figure 27 :** **A :** Schéma du phagemide utilisé pour le clonage de la banque. Les séquences d'ADN codant les fragments d'anticorps sont clonées en aval d'un promoteur inductible et d'une séquence d'export périplasmique (BL) et en fusion avec des tags (T) (permettant leur détection, capture...) ainsi qu'avec la protéine de capsid pIII. Une souche bactérienne suppressive du codon stop est utilisée pour produire les phages pendant la procédure de sélection. **B :** schéma descriptif de la structure du phage exprimant à sa surface un VHH, tel qu'utilisé pendant la sélection de la banque. Noter la nécessité dans ce cas d'utiliser un phage helper pour synthétiser l'ensemble de la particule phagique. D'après <sup>296</sup>.

Le protocole que nous avons mis au point est un compromis entre les protocoles « classiques » de *phage display* et entre les contraintes inhérentes à la préservation de la conformation active des GTPases RHO tout au long de la procédure de sélection. Nous avons établi les conditions de réussite de la procédure de sélection à la dépendance :

- de la qualité de l'antigène cible présenté (conformation, modification post-traductionnelles et encombrement moléculaire en tout point semblable à ceux retrouvés dans le milieu intracellulaire eucaryote supérieur)
- de la persistance de la conformation de l'antigène tout au long de la procédure de sélection
- de son maintien sur le support solide tout au long de la procédure de sélection.

C'est pourquoi nous avons décidé (Figure 28):

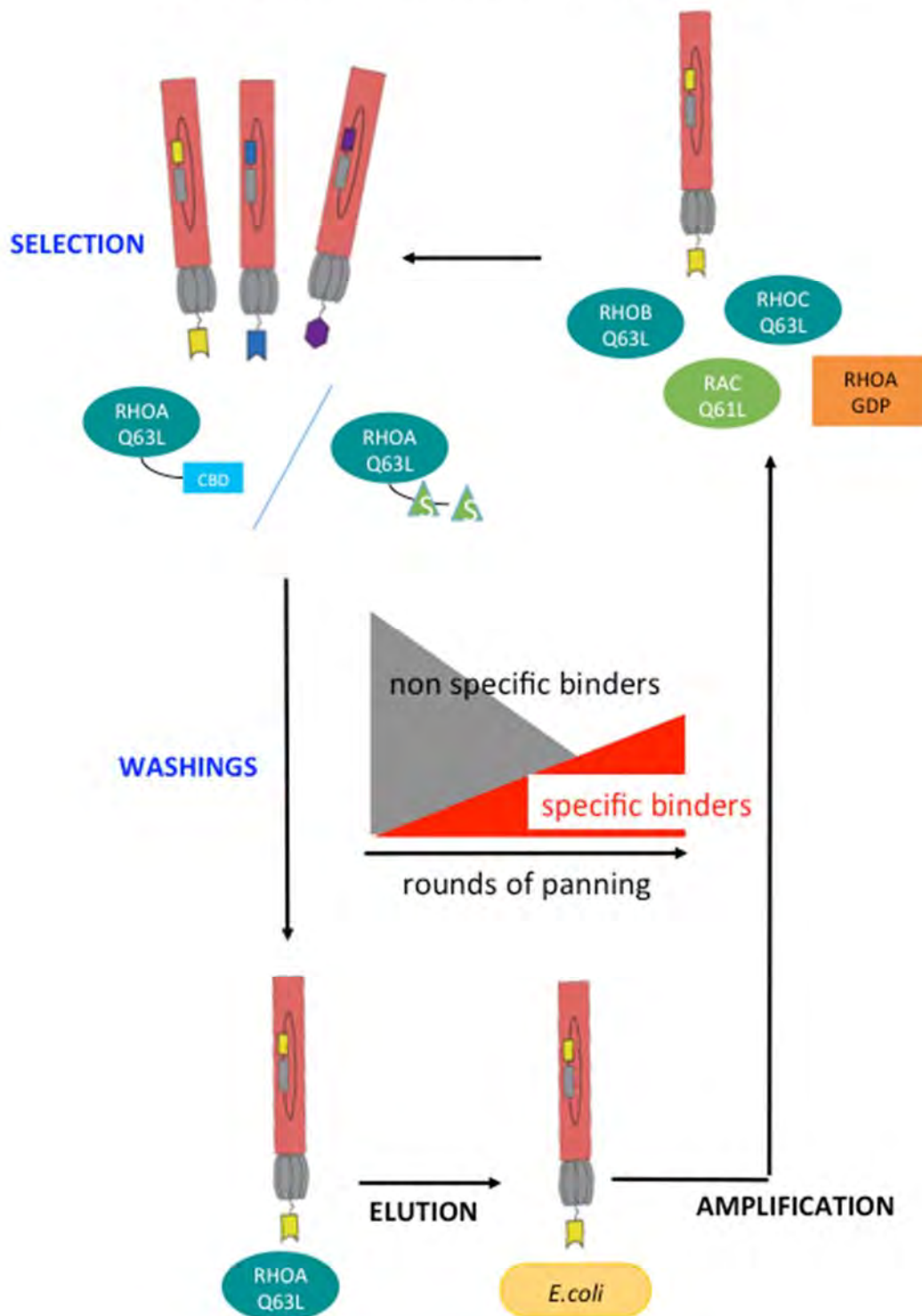
- de produire l'antigène (RHOA, RHOB) dans des cellules eucaryotes HEK293.
- d'effectuer la sélection sur un mutant constitutivement actif (Q63L) ainsi que sur la protéine sauvage, chargée au GTP $\gamma$ S

- de produire l'antigène en fusion avec deux types de tag permettant l'alternance des supports pendant la procédure de sélection et dont la résistance aux lavages a été éprouvée
- d'utiliser un tampon d'interaction phages/Antigène adapté au maintien de la conformation active pendant la procédure de sélection.

L'ensemble de ces paramètres a été testé dans des expériences préliminaires que j'ai effectuées en Master2 et en début de thèse.

Afin d'obtenir des anticorps sélectifs de la conformation active et d'une protéine au sein de la sous-famille RHOA nous avons également introduit dans le protocole de sélection une étape de soustraction par compétition avec la forme inactive et les autres membres de la sous-famille, en s'inspirant des procédures décrites dans la littérature à propos d'autres cibles<sup>305, 306</sup>. Nous avons ainsi décidé d'utiliser des antigènes compétiteurs en excès et de procéder aux étapes de compétition en phase liquide pour rester dans des conditions d'interaction homogènes.

### Phage display round of selection/enrichment



**Figure 28 :** Schéma de la procédure de sélection des anticorps conformationnels des GTPases RHO. Tout l'art d'une procédure de sélection par *phage display* repose sur le fait de parvenir à faire émerger, s'ils existent, les clones d'intérêt. Comme il n'est pas possible de cribler directement plus de  $3 \cdot 10^9$  clones, nous avons enchainé quatre tours de sélections afin de ne cribler que quelques centaines de clones.

### Modèle cellulaire d'application des intracorp

Nous avons choisi pour modèle d'étude final des intracorp une lignée de mélanome métastatique. Aussi convient-il ici de présenter les enjeux associés à l'inhibition de la forme active des RHO dans ce contexte.

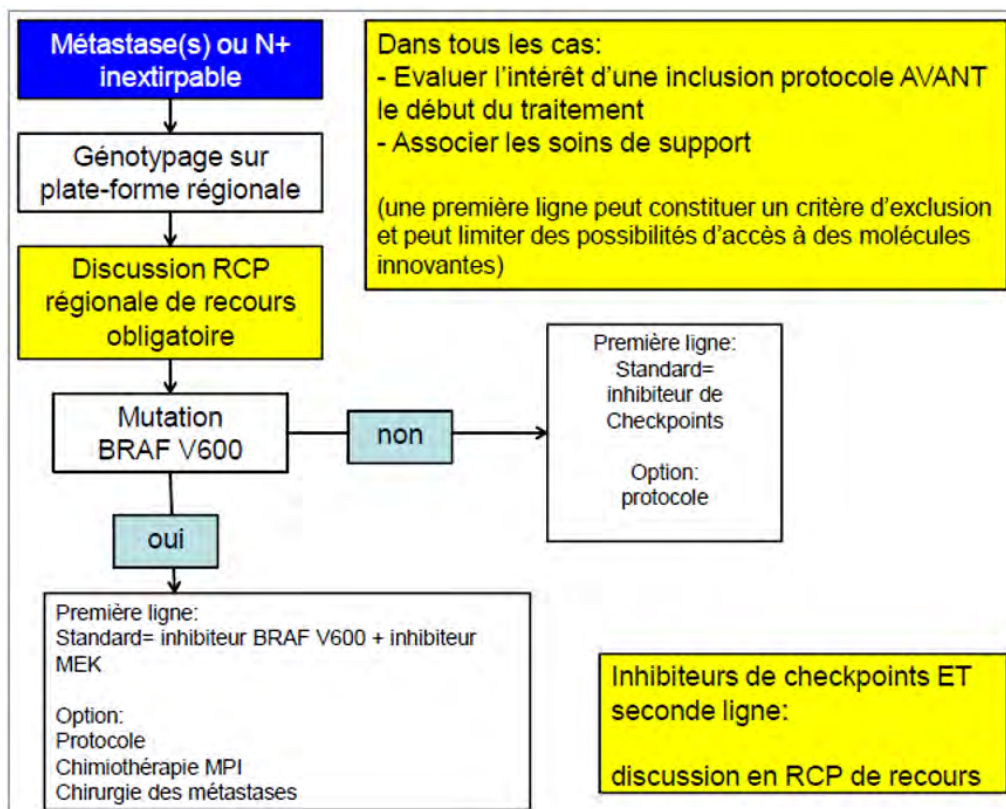
Le mélanome ne représente seulement que 2 à 3% des cancers en France, mais son augmentation constante depuis 50 ans le classe premier en terme d'incidence.

C'est un cancer très hétérogène et difficile à grader pour le clinicien à l'heure actuelle, et qui au stade métastatique présente un piètre pronostic. Aujourd'hui cependant, la prise en charge du mélanome métastatique a considérablement amélioré son pronostic par la mise en évidence de mutations récurrentes et l'utilisation de thérapeutiques ciblées.

50 à 70% des mélanomes sont en effet mutés sur le gène BRAf, une protéine effectrice majeure dans la voie de signalisation de RAS. La mutation V600E majoritairement retrouvée (90% des cancers Braf mutés) conduit à une activation constante de la kinase et une activation permanente de la voie en aval des MAPK, voie oncogénique majeure impliquée dans tous les « hallmarks of cancer » déjà décrits.

D'autres mutations ont été retrouvées en faible proportion : le gène NRas, cKit, et récemment RACP29S.

Le schéma thérapeutique actuel consiste donc à déterminer devant tout mélanome métastatique le statut génétique de la tumeur (Figure 29).



**Figure 29** : Prise en charge du mélanome métastatique selon le référentiel Oncomip. Les inhibiteurs de checkpoints correspondent à l'immunothérapie.

Cependant, l'échappement thérapeutique est inévitable et d'autres stratégies thérapeutiques sont à envisager. Les cellules de mélanome sont issues embryologiquement des cellules précurseurs de la crête neurale hautement mobiles et aux propriétés de survie accrues, leur conférant ainsi une plasticité intrinsèque importante. Alors que son rôle dans la tumorigénèse est bien établi, le rôle de la mutation BRAf V600E dans l'invasion reste encore peu étudié et débattu : en clinique, la fréquence des mutations BRAf est similaire dans les mélanomes métastatiques et dans les mélanomes *in situ*, et le statut mutationnel BRAf n'est pas rapporté comme facteur pronostic. Cependant, la protéine BRAF V600E semble être reliée à l'acquisition d'un phénotype invasif par l'induction de l'expression de la NCadhérine<sup>307</sup>. Un autre mécanisme par lequel la mutation Braf V600E participe à l'invasion tumorale est l'augmentation de la contractilité du cytosquelette d'actine *via* l'inhibition de PDE5 $\alpha$ <sup>308</sup>. Enfin, il a été rapporté la preuve récemment, *in cellulo*, dans un modèle murin et à partir d'échantillons tumoraux, que la mutation BRAf V600E favorise l'invasion tumorale en stimulant la formation de structures d'actine permettant la protrusion membranaire et la sécrétion de MMPs<sup>309</sup>.

Ainsi, cibler les mécanismes moléculaires touchant à la migration et à l'invasion ouvrirait judicieusement une autre voie thérapeutique, complémentaire et adaptée à la problématique de la formation de métastases.

Compte tenu de leur rôle majeur dans la motilité et l'invasion tumorale, les voies de signalisation médiées par les GTPases RHO apparaissent donc comme des cibles de choix.

Rappelons brièvement que les études sur lignées cellulaires ou à partir des échantillons tumoraux identifient :

- RHOC dès le début des années 2000 comme un acteur majeur associé à la formation de métastases dans un essai transcriptomique de grande ampleur comparant des lignées parentales peu métastatiques à les lignées correspondantes rendues hautement métastatiques<sup>310</sup>.
- Des mutations activatrices de RAC1 (P29S) en pourcentage non négligeable (4% à 10%) des échantillons tumoraux et dont les premières études lui confient un rôle de driver oncogénique par activation de la voie des MAPK<sup>311,312</sup>. Des mutations activatrices de CDC42 ont été également rapportées.
- RHOJ, appartenant à la sous-famille de CDC42, dont l'expression dans les cellules de mélanome stimule leurs capacités invasives et migratoires *in vitro* et *in vivo*<sup>313</sup>.
- RND3, dont l'expression est diminuée dans les cellules porteuses de la mutation BRAfV600E. Sa réexpression est associée à une augmentation des capacités invasives des cellules de mélanome<sup>314,315</sup>.

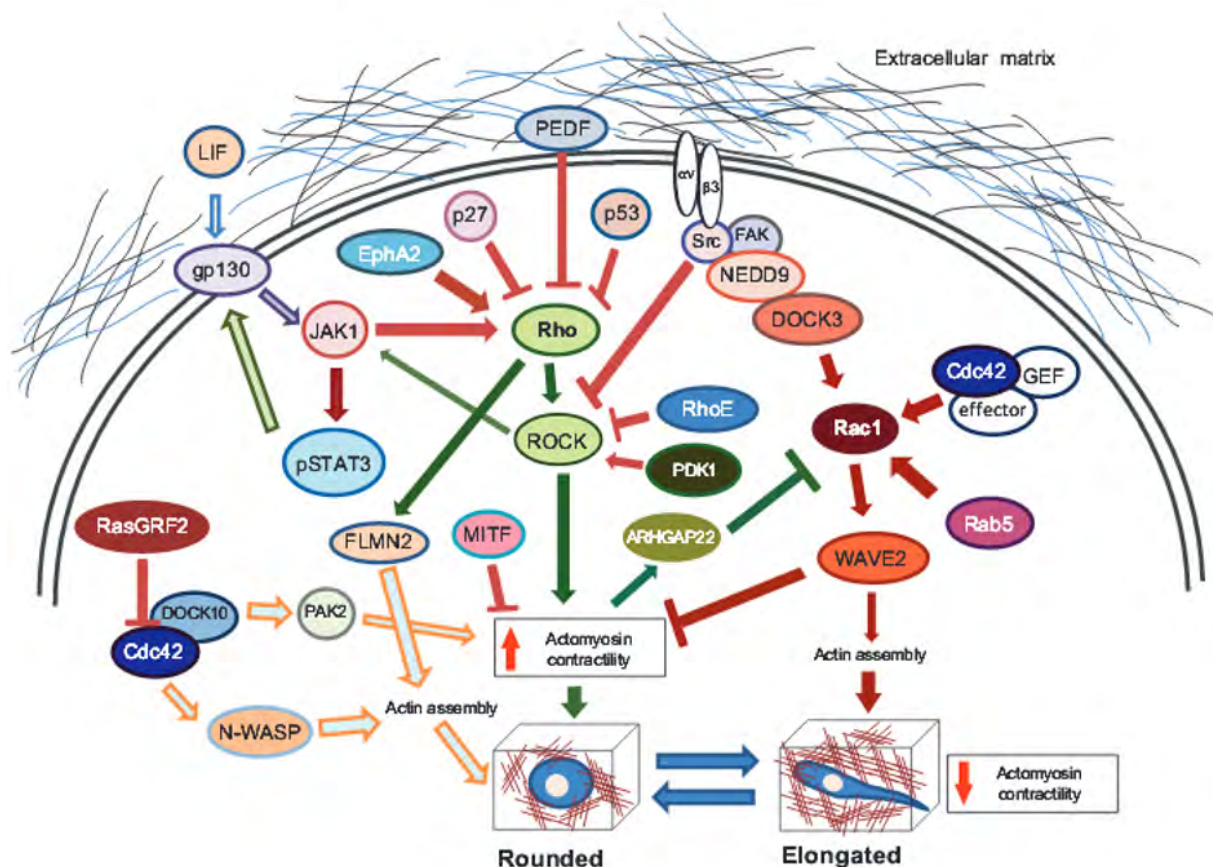
- RHOA, dans la résistance au Vémurafénib (thérapie ciblée de première ligne pour le traitement du mélanome BRAF muté V600E). L'inhibition de la voie des MAPK par le Vémurafénib induit la perte d'expression de RND3, levant ainsi son inhibition sur RHOA. Ainsi les auteurs proposent RHOA comme responsable de la migration résiduelle sous Vémurafénib<sup>316</sup>.
- RHOB dans la résistance aux inhibiteurs de BRAF<sup>317</sup>. Au laboratoire, il a été démontré que l'inhibition de BRaf ou de MEK induit l'augmentation de l'expression de RHOB par un mécanisme dépendant du facteur de transcription c-Jun. La perte de RHOB sensibilise les cellules au traitement par les inhibiteurs de BRaf et la perte de RHOB dans les mélanomes est associée à une augmentation de la PFS chez les patients traités par Vémurafénib.

Nous avons précédemment décrit les mécanismes permettant à la cellule tumorale de changer de mode de migration très rapidement afin de s'adapter à son microenvironnement tumoral (cf. I.C.1.b.). Les différents modes de migration sont interconvertibles en fonction du microenvironnement mais les mécanismes moléculaires régissant ces changements sont inégalement connus. Les mieux décrits dans le mélanome sont ceux intéressant les deux modes de migration de cellules individuelles, amœboïde et mésenchymal. L'inter-régulation de l'état d'activité des GTPases RHO, RAC et CDC42 est le fondement moléculaire de cette transition, qui a été mise en évidence par l'équipe de Marshall au cours de ces dix dernières années (Figure 30).

Grâce à une approche systématique de screening des GEFs et des GAPs impliqués dans la transition amœboïde/mésenchymale (cf I.C.1.b), les auteurs ont commencé par identifier une voie de signalisation impliquant le GEF DOCK3, activant RAC1 qui, à son tour activé, promeut un phénotype mésenchymal. D'autre part, par son effecteur WAVE2, il exerce une inhibition sur la contractilité de l'acto-myosine. Ils mettent également en évidence ARHGAP22, sous la dépendance de ROCK, pour inhiber le phénotype mésenchymal et décrivant ainsi un antagonisme RHO/RAC<sup>318</sup>. Enfin, ils complèteront cette voie de signalisation par la description de l'engagement des intégrines ( $\alpha5\beta3$ ) et de la kinase Src pour activer RAC et inhiber ROCK<sup>319</sup>. Plus récemment, ils décrivent un mécanisme original, par lequel la MMP9, de façon indépendante à son activité protéolytique de la matrice, entraîne un phénotype amœboïde<sup>320</sup>.

Leur criblage les conduit également à identifier le GEF DOCK10, activant CDC42, pour favoriser cette fois le phénotype amœboïde<sup>321</sup>. Mais le rôle de CDC42 dans la transition amœboïde/mésenchymale est moins clair car CDC42 participe également au phénotype mésenchymal, soulignant l'extrême complexité du réseau de signalisation impliqué. Evidemment, le puzzle est loin d'être complet, mais on peut s'interroger sur l'absence encore aujourd'hui d'identification d'un GEF responsable de l'activation de la voie RHOA/ROCK.





**Figure 30 :** Multiples voies de signalisation identifiées régulant la plasticité des cellules de mélanome dans l’invasion tumorale. Distinguons les deux modes de migration, amœboïde médié par RHOA/ROCK en coopération avec JAK/STAT et mésenchymal médié par RAC1, Src, NEDD9. Issu de <sup>322</sup>.

Ces travaux suggèrent une adaptation immédiate au microenvironnement. Les auteurs de façon extrêmement intéressante mettent aussi en évidence une réponse pouvant s’établir à plus long terme en faisant intervenir la machinerie transcriptionnelle. Ils retrouvent les mêmes effets du TGFβ et l’interleukine LIF/IL6 dans les cellules du mélanome et les fibroblastes du stroma (cf. I.C.1.b) pour coopérer avec ROCK et favoriser le phénotype amoéboïde<sup>98</sup>. Enfin, les auteurs ont également remarqué associée à une diminution de la contractilité acto-myosine une augmentation de la production de radicaux oxygénés, secondaires à l’augmentation d’activité de RAC1<sup>323</sup>. Une réponse transcriptionnelle impliquée dans le métabolisme de ROS et des dommages à l’ADN est alors engagée par l’activation de p53. Parmi les gènes transcrits, Pig3 a retenu leur attention par sa capacité à activer ARHGAP5 et à inhiber l’activation de RHOA. Ils mettent ainsi en évidence un mécanisme par lequel la réponse aux dommages oxydatifs de l’ADN supprime la migration cellulaire de type amœboïde, suggérant que les cellules tumorales s’arrêtent afin de réparer leurs dommages<sup>323</sup>. Les auteurs proposent aussi un schéma dans lequel des tumeurs n’ayant pas perdu p53 peuvent accumuler des dommages à l’ADN et induire la production de PIG3, et qui migreront essentiellement par voie

mésenchymale. A l'opposé, des tumeurs migrant sous forme amœboïde grâce à une forte contractilité du cytosquelette d'actine présentent un faible niveau de PIG3 et peu de dommages à l'ADN.

Au total, dans le mélanome, l'ensemble des résultats obtenus permettent de proposer la voie RHOA/ROCK comme cible thérapeutique :

- Tous les modes migration mis en jeu pendant la phase de dissémination de la tumeur primaire reposent en partie sur la contractilité du cytosquelette d'acto-myosine (cf.I.C.1.b)
- La voie RHOA/ROCK est engagée également dans les fibroblastes de façon à maintenir un microenvironnement favorable à la dissémination tumorale
- La contractilité du cytosquelette d'acto-myosine et la voie RHOA/ROCK sont mises en jeu dans toutes les étapes de la formation des métastases, depuis la migration des cellules de la tumeur primaire, jusqu'à la colonisation des organes secondaires. Par exemple au moment de l'extravasation ou pendant les premiers instants de la colonisation.

Ce faisceau d'arguments permet de considérer la contractilité du squelette d'acto-myosine comme une véritable cible thérapeutique et a conduit l'équipe de Marshall à évaluer *in cellulo* et *in vivo* chez la souris nude, l'efficacité de nouveaux inhibiteurs de ROCK<sup>324</sup>. Afin de véritablement valider cette nouvelle cible thérapeutique, il s'agira de bien comprendre sa mise en jeu en suivant un processus complet de formation de métastases. Comprendre les contributions relatives de chacun des modes de migration pour chaque type tumoral et à chaque stade (envahissement local, régional ou métastatique) est donc fondamental pour espérer efficacement contrecarrer la formation de métastases.

C'est pourquoi nous avons décidé de valider nos anticorps inhibiteurs de RHOA dans une lignée cellulaire métastatique de mélanome portant la mutation BRaf V600E, la lignée WM266-4. C'est une lignée cellulaire dans laquelle l'induction du switch phénotypique par des inhibiteurs de ROCK ou la tatC3 a déjà été décrite<sup>94, 325</sup>. Le blocage de la forme active de RHOA dans cette lignée sensible aux traitements par Vémurafénib et inhibiteurs de la voie MEK nous permettra de compléter les résultats du laboratoire sur le rôle des RHO dans la résistance aux thérapies ciblées.

ARTICLE 1 :

## **NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies**

Sandrine Moutel, Nicolas Bery, Virginie Bernard, Laura Keller, Emilie Lemesre, Ario de Marco, Laetitia Ligat, Jean-Christophe Rain, Gilles Favre, Aurélien Olichon, Franck Perez



# NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies

Sandrine Moutel<sup>1,2,3†</sup>, Nicolas Bery<sup>4,5†</sup>, Virginie Bernard<sup>1</sup>, Laura Keller<sup>4,5,6</sup>, Emilie Lemesre<sup>1,2</sup>, Ario de Marco<sup>1</sup>, Laetitia Ligat<sup>7</sup>, Jean-Christophe Rain<sup>8</sup>, Gilles Favre<sup>4,5,6</sup>, Aurélien Olichon<sup>4,5\*</sup>, Franck Perez<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institut Curie, PSL Research University, Paris, France; <sup>2</sup>CNRS UMR144, Paris, France; <sup>3</sup>Translational Research Department, Institut Curie, Paris, France; <sup>4</sup>Inserm, UMR 1037-CRCT, Toulouse, France; <sup>5</sup>Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse, France; <sup>6</sup>Institut Claudius Regaud, Toulouse, France; <sup>7</sup>Le Pôle Technologique du Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, plateau de protéomique, Toulouse, France; <sup>8</sup>Hybrigenics Service, Paris, France

**Abstract** In vitro selection of antibodies allows to obtain highly functional binders, rapidly and at lower cost. Here, we describe the first fully synthetic phage display library of humanized llama single domain antibody (NaLi-H1: Nanobody Library Humanized 1). Based on a humanized synthetic single domain antibody (hs2dAb) scaffold optimized for intracellular stability, the highly diverse library provides high affinity binders without animal immunization. NaLi-H1 was screened following several selection schemes against various targets (Fluorescent proteins, actin, tubulin, p53, HP1). Conformation antibodies against active RHO GTPase were also obtained. Selected hs2dAb were used in various immunoassays and were often found to be functional intrabodies, enabling tracking or inhibition of endogenous targets. Functionalization of intrabodies allowed specific protein knockdown in living cells. Finally, direct selection against the surface of tumor cells produced hs2dAb directed against tumor-specific antigens further highlighting the potential use of this library for therapeutic applications.

DOI: [10.7554/eLife.16228.001](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.001)

\*For correspondence: aurelien.olichon@inserm.fr (AO); Franck.Perez@curie.fr (FP)

†These authors contributed equally to this work

Competing interest: See page 21

Funding: See page 22

Received: 20 March 2016

Accepted: 18 July 2016

Published: 19 July 2016

Reviewing editor: Anna Akhmanova, Utrecht University, Netherlands

© Copyright Moutel et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

## Introduction

Antibodies expended as the biochemical tools of choice to label antigens in cells or tissues. Over the past 20 years, recombinant methods have been developed to quickly select and improve monoclonal antibodies from highly diverse libraries. Recombinant antibodies can be selected from immune or naïve libraries. Immune libraries provide in general high affinity binders but, depending on the antigen, diversity is sometimes limited. Because natural antibody selection requires animal immunization, very conserved or toxic antigens should be avoided and, in general, only limited control of the immune response is possible. On the contrary, non-immune (naïve) libraries provide a higher diversity of binders even for antigens highly conserved in mammals, but high specificity and affinity can be reached only when selecting from very large functional libraries. Immune and naïve libraries are based on the manipulation of antibody fragment that retain binding capacity and specificity of the entire immunoglobulin G (IgG).

The smallest IgG portion capable of binding with high specificity an antigen is the Fv fragment consisting of the variable heavy (VH) and the variable light (VL) domains. In the case of single domain antibodies (sdAb), a VH or a VL alone, is able to bind its target antigen. Each variable domain

**eLife digest** Antibodies are proteins that form part of an animal's immune system and can identify and help eradicate infections. These proteins are also needed at many stages in biological research and represent one of the most promising tools in medical applications, from diagnostics to treatments.

Traditionally, antibodies have been collected from animals that had been previously injected with a target molecule that the antibodies must recognize. An alternative strategy that uses bacteria and bacteria-infecting viruses instead of animals was developed several decades ago and allows researchers to obtain antibodies more quickly. However, the majority of the scientific community view these "in vitro selected antibodies" as inferior to those produced via the more traditional approach.

Moutel, Bery et al. set out to challenge this widespread opinion, using a smaller kind of antibody known as nanobodies. The proteins were originally found in animals like llamas and camels and are now widely used in biological research. One particularly stable nanobody was chosen to form the backbone of the in vitro antibodies, and the DNA that encodes this nanobody was altered to make the protein more similar to human antibodies. Moutel, Bery et al. then changed the DNA sequence further to make billions of different versions of the nanobody, each one slightly different from the next in the region that binds to the target molecules.

Transferring this DNA into bacteria resulted in a library (called the NaLi-H1 library) of bacterial clones that produce the nanobodies displayed at the surface of bacteria-infecting viruses. Moutel, Bery et al. then screened this library against various target molecules, including some from tumor cells, and showed that the fully in vitro selected antibodies worked just as well as natural antibodies in a number of assays. The in vitro antibodies could even be used to track, or inactivate, proteins within living cells.

The NaLi-H1 library will help other researchers obtain new antibodies that bind strongly to their targets. The approaches developed to create the library could also see more people decide to create their own synthetic libraries, which would accelerate the identification of new antibodies in a way that is cheaper and requires fewer experiments to be done using animals. These in vitro selected antibodies could help to advance both fundamental and medical research.

DOI: [10.7554/eLife.16228.002](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.002)

contains four conserved framework regions (FRW or framework) and three regions called CDR (Complementarity Determining Regions) corresponding to hypervariable sequences which determine the specificity for the antigen. VH and VL can be fused together using a synthetic linker and produced as a single protein in the form of a single chain Fv (scFv). Easier to manipulate, they can be produced in several bacteria or eukaryote cell types, fused to various tags or functional domains. Interestingly, antibodies called HCAb in *Camelidae* (*Hamers-Casterman et al., 1993*) or IgNAR in sharks (*Greenberg et al., 1995*) have an antigen recognition part composed of only a VH domain. Camelid natural single domain VH, referred to as VHH or nanobodies, can be expressed as recombinant fragments and represent attractive alternatives over classical antibody fragments like scFvs because they are easy to manipulate and they are not limited by potential misfolding of the two domains (*Wörn and Plückthun, 1999*). It is noteworthy that VHH FRWs show a high sequence and structural homology with human VH domains of family III (*Muyldermans, 2013*) and VHH have comparable immunogenicity as human VH (*Bartunek et al., 2013; Holz et al., 2013*). Thus, they further constitute very interesting agents for therapeutic applications, some of them are currently in phase II and Phase III clinical trials (Ablynx Nanobodies; <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ablynx>).

Recombinant antibody fragments allowed not only to accelerate the identification of unique binders, but also the development of a novel type of tool: in this case, the antibodies are directly expressed in living cells as intracellular antibodies (intrabodies), to trace or perturb endogenous target at the protein level. Some scFv or sdAb have indeed been directly expressed in eukaryotic cell as intrabodies to target with high specificity intracellular antigens. Several intrabodies have been used as fluorescent protein fusion to highlight endogenous antigen in cells in a spatio-temporal manner (*Nizak et al., 2003a; Rothbauer et al., 2006*). Intrabodies with intrinsic blocking activity have

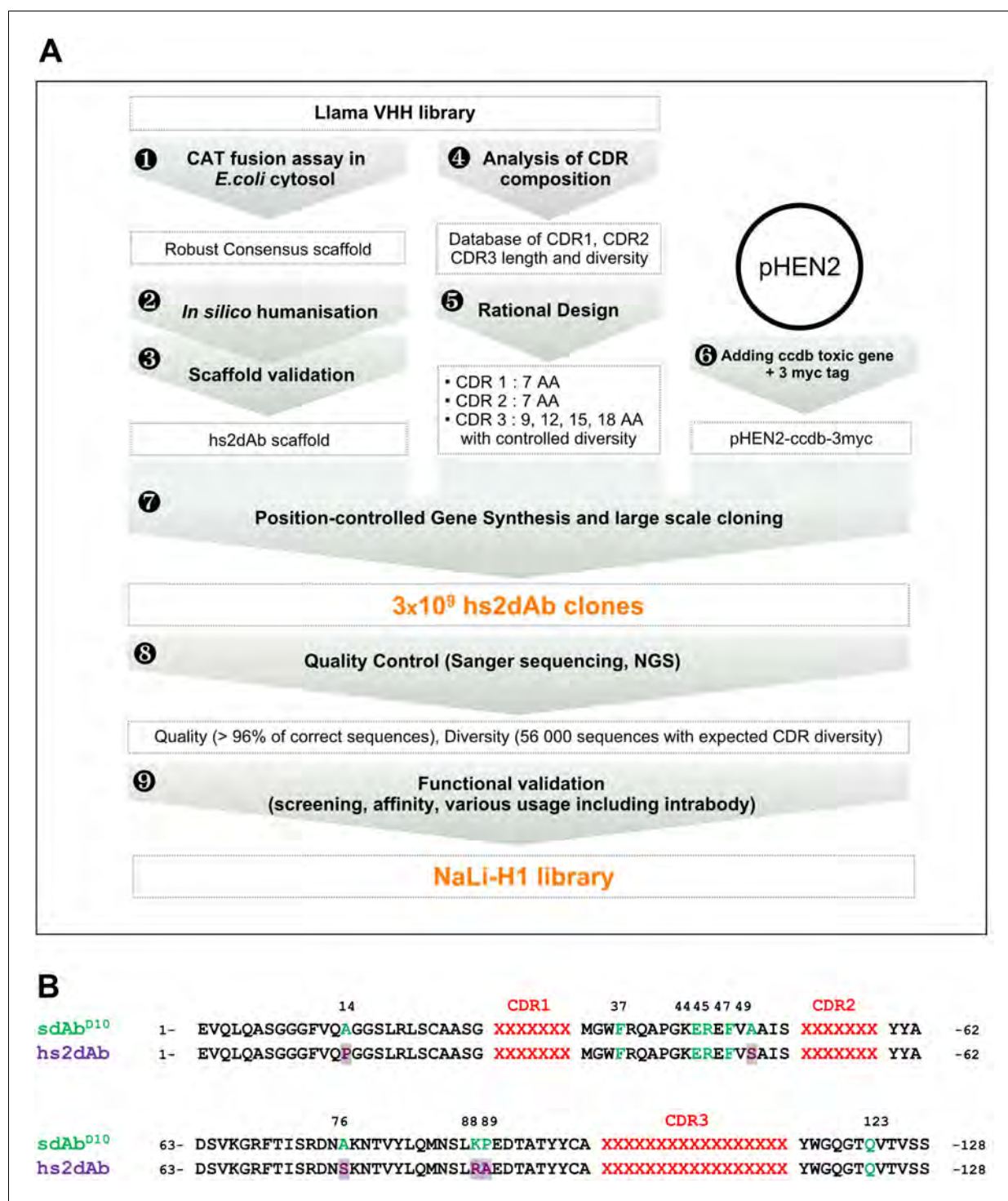
been reported (*Haque et al., 2011; Shin et al., 2005*), and several other approaches have been developed to allow a larger fraction of intrabodies to be used as inhibitory factors: forced co-localization (*Tanaka et al., 2007*), suicide through proteasome targeting (*Joshi et al., 2012; Melchionna and Cattaneo, 2007*), rerouting or sequestration to cell compartment (*Böldicke et al., 2005*), degradation (*Caussin et al., 2011*). Depending on the target, such inhibitors may have potential in human therapy. Production of functional intrabodies depends on the stability of the antibody fragments in the reducing environment of the cytosol that does not allow disulfide bond formation between conserved cysteine. In this context, many advantages of the nanobody scaffold have been reported and, in particular, higher solubility, improved stability in a reducing environment (*Wesolowski et al., 2009*), as well as higher expression yield and thermostability (*Jobling et al., 2003*). For all these reasons, the nanobody scaffold represents an attractive option to generate functional intrabodies.

Thus, we decided to create a non-immune recombinant antibody library of high diversity, based on a nanobody scaffold that would enable efficient *in vitro* antibody selection against virtually any antigen. Such a library should provide antibodies usable in conventional immune assays and be enriched in antibodies active in the intracellular environment. First, using a fusion assay in *E. coli*, a family of highly functional VHH scaffolds was isolated, optimized for intracellular expression and high stability. One particularly stable VHH scaffold consensus sequence was chosen from these selected antibodies. Additional changes were then introduced to reduce the distance between the *Camelidae* and human VH3 sequences. We confirmed by CDR grafting that this humanized synthetic scaffold (hs2dAb) was robust and functional. Statistics of amino-acid diversity in the CDRs were computed and these information were used to construct a high diversity phage display library of  $3.10^9$  independent hs2dAb. The library was then screened against diverse targets of various structures and origin. Highly specific antibodies were selected against EGFP, mCherry,  $\beta$ -tubulin,  $\beta$ -actin, heterochromatin protein HP1 $\alpha$ , GTP-bound RHO, p53 and HER2. Affinity measurement indicated that affinities in the nM range can be obtained using this library. As expected from our design, we further showed that hs2dAb are frequently usable as fluorescent intrabodies to track antigens in cells. We also showed that they can be functionalized to induce antigen knockdown. This thus represents the first report of a large and diverse synthetic single domain antibody library enabling fully *in vitro* selection of highly functional antibodies and intrabodies.

## Results

### Library design

We reasoned that the usual lower quality of these non-immune libraries may come from (1) an antibody scaffold that may not allow robust folding and presentation of CDR region, (2) a lack of control of diversity in the CDR regions and (3) a frequent occurrence of incorrect clones due to the presence of unexpected mutation or empty clones. We designed a pipeline for the development of functional synthetic libraries that aims at overcoming these limitations (**Figure 1A**). As a first step to construct a single domain antibody library enriched in highly stable and functional antibody fragments, we screened for a robust sdAb scaffold (**Figure 1—figure supplement 1**). Previously, we selected from immune or naïve llama VHH libraries several hundreds of clones (*Monegal et al., 2012; Olichon and Surrey, 2007*). From this population, we identified a set of robust scaffolds using an assay that discriminates highly stable clones from clones prone to aggregation, or unfolding, in the bacterial cytoplasm (*Olichon and Surrey, 2007*). This assay is based on the fusion of HA-tagged chloramphenicol acetyl transferase (CAT) to the carboxy-terminus of VHH sequences (**Figure 1—figure supplement 1A**). In these conditions, only bacteria expressing a functional VHH fusion in the reducing cytosol (non aggregating, non degraded) can grow in the presence of high antibiotic concentration, thus filtrating a sub-library of potential intrabodies. Expression yield in *E. coli* and apparent solubility as EGFP fusion in the mammalian cell cytoplasm were further assessed to select a set of robust antibody scaffolds. Strikingly, the consensus scaffold was matching the sequence of the most robust VHH framework, represented by a single domain antibody D10 (hereafter named sdAb<sup>D10</sup>). When compared to previously reported thermostable nanobodies (*Olichon et al., 2007a*) or intrabodies (*Rothbauer et al., 2006*) obtained from immune libraries, sdAb<sup>D10</sup> was found to provide higher antibiotic resistance in the chloramphenicol filter assay (**Figure 1—figure supplement 1A**). Its expression yield in *E. coli*



**Figure 1.** Overview of scaffold selection, diversity design, and synthetic production of the NaLi-H1 library. The development of the NaLi-H1 library followed three lines of optimization. (i) A novel scaffold was defined by selecting a set of robust nanobodies using a CAT fusion assay (1). A consensus was derived and mutations were introduced to humanize the scaffold (2). Usability and efficacy of the novel scaffolds (VHH and humanized) were then confirmed evaluating their display on phage, expression in CHO cells and use as intrabodies (3). In silico design was completed analyzing natural CDR diversity (4) and using this information to design synthetic CDRs. A fixed size of 7 aa was chosen for the CDR1 and CDR2. 4 sizes (9, 12, 15 and 18 amino acids) were chosen for CDR3. Finally, the pHEN2 vector was improved by implementing a triple myc tag and inserting a toxic gene (ccdb) to ensure low frequency of empty clones during library construction (6). Gene synthesis (using a tri-nucleotide approach) was ordered, synthetic sequences cloned into the novel pHEN2+ vector, transformed into bacteria and plated on 430 15 cm plates.  $3 \times 10^9$  clones were obtained. Quality control was

Figure 1 continued on next page



Figure 1 continued

carried out using Sanger sequencing of 315 randomly picked clones and large scale sequencing of 56 000 clones. No redundant clone was found. The NaLi-H1 was then screened in various conditions and diversity, efficacy, versatility and affinity evaluated.

DOI: [10.7554/eLife.16228.003](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.003)

The following figure supplements are available for figure 1:

**Figure supplement 1.** Robust scaffold identification.

DOI: [10.7554/eLife.16228.004](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.004)

**Figure supplement 2.** CDR3 loop grafting and synthetic scaffold validation.

DOI: [10.7554/eLife.16228.005](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.005)

**Figure supplement 3.** Nali-H1 library diversity.

DOI: [10.7554/eLife.16228.006](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.006)

**Figure supplement 4.** Solubility of secreted hs2dAb antibodies.

DOI: [10.7554/eLife.16228.007](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.007)

periplasm was in the higher range of soluble llama VHH fragments, allowing efficient and quantitative purification (**Figure 1—figure supplement 1B**). Purified sdAb<sup>D10</sup> showed excellent solubility, stability after treatment at 70°C and we did not observe aggregation when expressed as an intrabody fused to the EGFP in mammalian cells (**Figure 1—figure supplement 1C**).

To test whether the sdAb<sup>D10</sup> scaffold composed of the FRW 1 to 4 was robust independently on the CDR sequences, we grafted the CDR loops of the lam1 VHH (**Rothbauer et al., 2006**) directed against laminB into the framework of the sdAb<sup>D10</sup> (sdAb<sup>D10</sup>-anti lamin). In parallel, partial humanization of the scaffold was also tested to figure out whether it affected dramatically its intrinsic properties. Seven residues of the synthetic scaffold sdAb<sup>D10</sup> were altered towards the most represented in human VH3 while five other divergent residues were kept unchanged. The four llama VHH-specific amino acids hallmarks in the framework-2 region (positions 42, 49, 50, and 52), which are essential to increase intrinsic solubility properties, as well as the Glutamine in position 103, were maintained. We named the resulting hybrid single domain VH hs2dAb (*humanized synthetic single domain antibody*) (**Figure 1B**). After grafting the CDR of the anti-lamin into these two scaffolds, we analyzed their display on the M13 surface (**Figure 1—figure supplement 2A**) and their production by *E. coli* and by CHO cells (**Figure 1—figure supplement 2B**). Both scaffold showed similarly good efficacy. Importantly, both the sdAb<sup>D10</sup> and hs2dAb scaffolds enabled functional display of the grafted CDRs and robust detection of endogenous lamin was observed by immunofluorescence staining of HeLa cells (**Figure 1—figure supplement 2C**). Last, Rothbauer et al. (**Rothbauer et al., 2006**) showed that the original anti-lamin VHH recognized its target antigen upon intracellular expression. Similarly, we observed that both the hs2dAb and the sdAb<sup>D10</sup> scaffolds allowed the efficient intrabody use of the synthetic anti-lamin antibodies (**Figure 1—figure supplement 2D**). This further indicated that the synthetic scaffolds were robust, non-aggregating and resisted to the reducing conditions found in the cytosol, while allowing the proper display of CDR loops. As partial humanization did not affect the properties of the sdAb<sup>D10</sup> scaffold, we chose the hs2dAb scaffold as a unique framework to construct a diverse library of synthetic nanobodies endowed with the characteristic stability of these single domain antibodies while displaying an amino acid sequence closer to human VH3.

## Library construction

A synthetic diversity was introduced in the three CDRs by rationally controlling each position of the CDR1 and CDR2 using a set of amino acids that recapitulates partially natural diversity (see the Appendix for more details) while reducing the presence of the most hydrophobic residues in order to avoid the aggregation propensity (see Material and methods). A constant length of 7 amino acids was selected for CDR1 and CDR2. A large spectrum of *Camelidae* VHH CDR3 length is naturally observed and this loop is known to contribute strongly to antigen binding selectivity. Thus, we chose to use four different lengths of CDR3 to cover this spectrum (9, 12, 15 or and 18 amino acids) and introduce random amino acid (except cysteine) at each position.

Synthetic DNA was produced by the trinucleotide DNA assembly and amplification was carried out starting from  $2.10^{11}$  different molecules, using only a few cycles of PCR (PCR linearity validated by Q-PCR) to prevent drift during amplification. The synthetic library was inserted into a modified pHEN2 phagemid vector containing a triple myc-tag and suicide gene (ccdB) that allowed positive

selection of insert-bearing clones (*Bernard et al., 1994*). Massive electroporation was carried out using *E. coli* TG1 cells and 430 large agar dishes (140 mm) were used to ensure proper plating of the library. About  $3.10^9$  individual recombinant hs2dAb clones were obtained. We named this library NaLi-H1 (for Nanobody Library-Humanized 1). We first evaluated the quality of the NaLi-H1 library by sequencing 315 random clones. Only 13 sequences were found to be incorrect (bearing an in-frame stop codon, missing one base, missing a large region [the CDR1 or CDR1-FWR1- CDR2], or being empty). Thus, a total of about 4% of potential default was observed, which is rather low and only marginal in comparison to the  $3.10^9$  clones obtained. The diversity was then evaluated by sequencing  $5.6 \cdot 10^5$  inserts using ion Torrent chips (Life Technologies). This confirmed the quality of the library and showed that the four CDR3 lengths (9, 12, 15 or and 18 amino acids) were present in similar proportions. The diversity and statistical distribution of amino acids in the CDRs were found to be as expected (**Figure 1—figure supplement 3**). To estimate the overall folding of the hs2dAb present in the library, we picked randomly 24 clones and tested their solubility in bacteria medium after secretion. Medium were centrifuged at 250 000 g and the supernatant and pellet were analyzed. All tested clones showed essentially complete solubility, at least as good as a natural Lama antibody (GFP4). Even after warming at 90°C for 10 min, the hs2dAb showed good solubility (over 70%) (**Figure 1—figure supplement 4**).

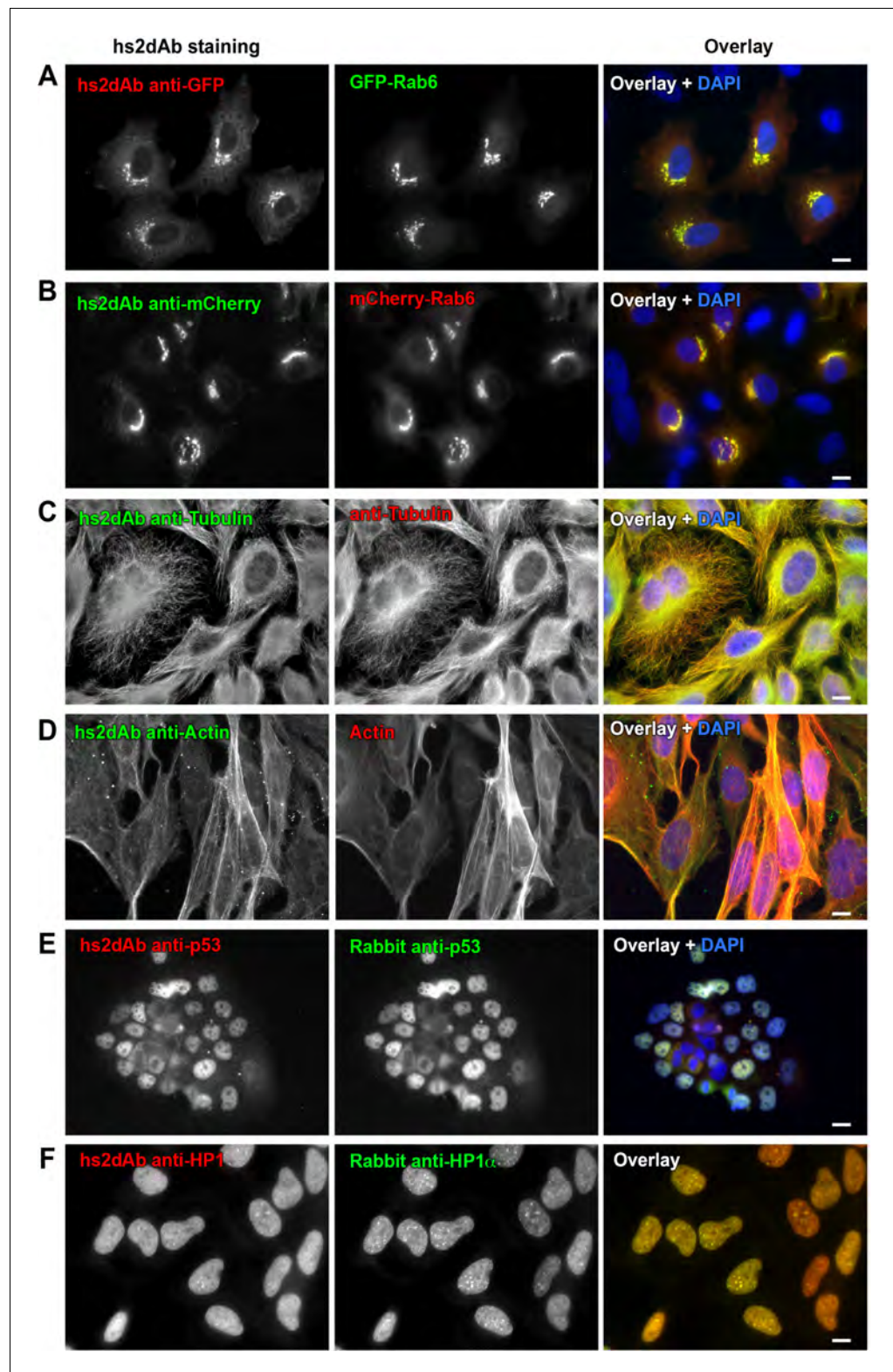
## Library screening and validation

The NaLi-H1 library was screened against a set of various antigens. Several standard phage display methods (*Hoogenboom, 2005*) were used (see Materials and methods for details): antigen adsorption on immunotube, native antigen captured on beads, direct selection at the cell surface. All conditions allowed the efficient recovery of diverse and functional antibodies.

As a first screen to evaluate the quality of the library, we chose to select specific binders for the EGFP and mCherry fluorescent proteins. NaLi-H1 phages were panned against biotinylated EGFP or mCherry and 3 rounds of selection were carried out. Eighty clones were analyzed for each screening campaign. From the panning against EGFP, 37 non redundant nanobodies were shown to detect EGFP by phage ELISA. These antibodies were then used for immunofluorescence and 10 of them were found to efficiently stain EGFP in fixed HeLa cells (**Figure 2A**). Similarly, selection against mCherry led to 6 positive binders (**Figure 2B**). As shown in **Figure 2A and B**, no staining was obtained in untransfected cells.

In the next screen, two highly and constitutively expressed components of cell cytoskeleton, tubulin and  $\beta$ -actin, were targeted. Antibodies against tubulin were selected in native conditions (*Nizak et al., 2003a*) using commercial biotinylated tubulin (Cytoskeleton). After two rounds of selection, 3 out of 40 clones analyzed were shown to detect endogenous tubulin by immunofluorescence (**Figure 2C**). As expected, staining was lost in cells treated with the microtubule destabilizing drug nocodazole, with only a few stable microtubules being labelled in these conditions (**Figure 2—figure supplement 1A**). This antibody was recently used to stain microtubules by super-resolution imaging (*Mikhaylova et al., 2015*). Among phage display methods, selection on antigens directly adsorbed on the surface of immunotube is often used as a cheap and straightforward method, despite the low capacity and the strong denaturation imposed by non-specific adsorption. A screen against coated  $\beta$ -actin led to the identification of 16 unique binders positive in phage ELISA. Seven of these antibodies decorated endogenous actin stress fibers by immunofluorescence in MRC5 cells (**Figure 2D**) as well as in other cell lines. Treatment of cells with cytochalasin D disorganizes actin fibers. Accordingly, staining with the hs2dAb was strongly altered (**Figure 2—figure supplement 1B**). Three of the hs2dAb detected a single band at the molecular weight of  $\beta$ -actin in western blot from HeLa cell extract while one of the anti-tubulin detected a band at the correct molecular weight of tubulin (**Figure 2—figure supplement 1C**).

Actin and tubulin are strongly expressed cellular proteins. Another screen was thus performed to select binders directed against proteins expressed at a lower level. A first screen was carried out against the tumor suppressor p53 protein. The 83 first amino acids of the NP\_000537.3 isoform were produced in bacteria fused to a SNAP tag, biotinylated in vitro and used as a target in the phage display selection. Among 12 clones positive in phage ELISA, 6 selected hs2dAb were shown to label endogenous p53 in immunofluorescence on A431 cells (**Figure 2E**). The specificity of the staining was confirmed using RPE-1 cells (**Figure 2—figure supplement 2**). A low nuclear staining was observed in normal conditions, with some variability between cells. As expected, the intensity was enhanced



**Figure 2.** Selection of functional hs2dAb against various antigens. (A) HeLa cells were transfected with GFP-Rab6, fixed using paraformaldehyde, permeabilized using saponin and stained with non-purified myc-tagged hs2dAb (R3TF3) directed against EGFP and revealed with anti-Myc-Tag (9E10) and Cy3-labeled secondary antibodies. (B) HeLa cells transfected with mCherry-Rab6, fixed and permeabilized as in A and stained using a myc-tagged non-purified hs2dAb against mCherry (C11). The hs2dAb was then revealed using 9E10 and A488-labeled secondary antibodies. (C) HeLa cells transfected with tubulin, fixed and permeabilized as in A and stained with anti-tubulin (red) and Cy3-labeled secondary antibodies. (D) HeLa cells transfected with actin, fixed and permeabilized as in A and stained with anti-actin (red) and Cy3-labeled secondary antibodies. (E) HeLa cells transfected with p53, fixed and permeabilized as in A and stained with anti-p53 (green) and Cy3-labeled secondary antibodies. (F) HeLa cells transfected with HP1, fixed and permeabilized as in A and stained with anti-HP1 (green) and Cy3-labeled secondary antibodies. Scale bars represent 10 μm.

Figure 2 continued

antibodies. (C) Cells were fixed in methanol and co-stained with a non-purified anti-tubulin hs2dAb (D5) fused to a human Fc domain and a mouse monoclonal anti-tubulin antibody (DM1A), and revealed using an anti-Human Fc-A488 and an anti-Mouse-Cy3 secondary antibody, respectively. (D) hs2dAb F4 anti-beta-actin was used to stain MRC5 cells fixed with paraformaldehyde and post fixed with methanol. The hs2dAb was then revealed using 9E10 and A488-labeled secondary antibodies. Cells were co-stained by red fluorescent phalloidin to detect actin stress fibers. (E) A431 cells were fixed with 3% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton and stained with the anti-p53 hs2dAb (B7) fused to a human Fc domain together with a rabbit polyclonal antibody directed against p53. Immuno-labeling was revealed using anti-Human Fc-Cy3 and anti-Rabbit-A488 secondary antibodies. (F) The hs2dAb antibody directed against HP1 $\alpha$  (A5) fused to a human Fc domain was used to stain HeLa cells fixed with paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% TritonX100. Cells were co-stained using a polyclonal rabbit antibody directed against HP1 $\alpha$  and immuno-labeling was revealed using anti-Human Fc-Cy3 and anti-Rabbit-A488 secondary antibodies. (scale bar = 10  $\mu$ m).

DOI: [10.7554/eLife.16228.008](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.008)

The following figure supplements are available for figure 2:

**Figure supplement 1.** Specificity of hs2dAb directed against tubulin and actin.

DOI: [10.7554/eLife.16228.009](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.009)

**Figure supplement 2.** Specificity of the anti-p53 hs2dAb.

DOI: [10.7554/eLife.16228.010](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.010)

**Figure supplement 3.** Specificity of the anti-HP1 hs2dAb.

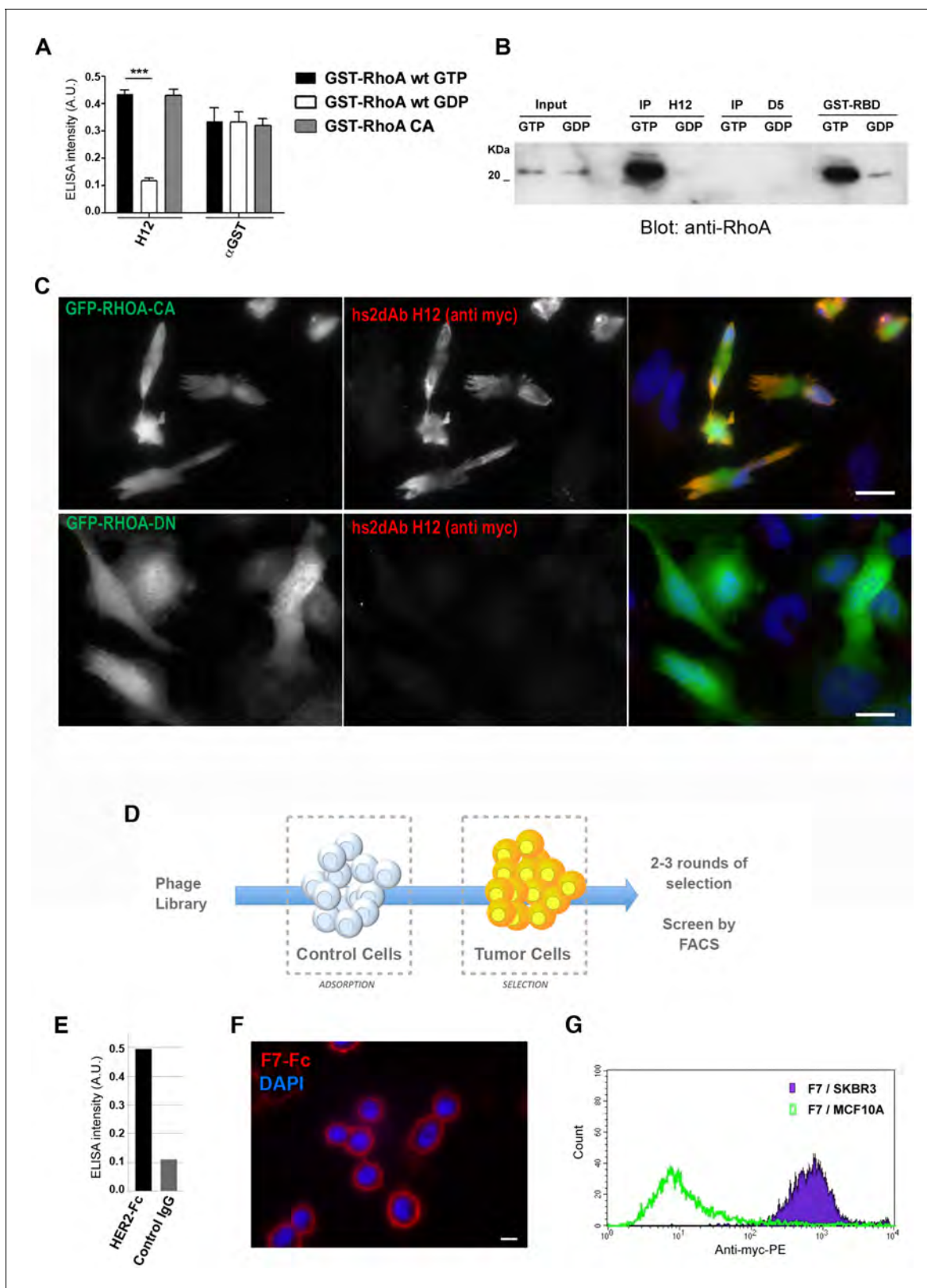
DOI: [10.7554/eLife.16228.011](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.011)

upon UV-induced DNA damage. Such an increase was not observed in a RPE-1 cell line stably expressing an shRNA against p53. A second screen was carried out against the heterochromatin protein HP1 $\alpha$ . HP1 $\alpha$  was produced in bacteria fused to an avitag to obtain a biotinylated recombinant protein. Biot-HP1 $\alpha$  was then immobilized on streptavidin beads and used as a target for 3 rounds of selection. 5 individual hs2dAb were directly identified by immunofluorescence staining of HeLa cells.

**Figure 2F** shows that selected antibodies were efficiently staining endogenous HP1 in the nucleus. Overexpression of the different HP1 variant followed by western blot and immunofluorescence analysis actually suggested that HP1 $\beta/\gamma$  were also detected by the antibody (**Figure 2—figure supplement 3**). Together these results showed that the NaLi-H1 synthetic library can be screened in various conditions against very different purified targets while leading to the rapid identification of diverse and specific binders that can be used in classical antibody-based staining methods.

## Selection of conformation-sensitive antibodies

One of the main advantages of full in vitro immunization using display technologies is the control of antigen conformation and concentration. It allows to drive selection towards the desired outcome. For example, selection schemes can be devised to improve the recovery of high affinity binders endowed with low off-rate kinetics (*Lee et al., 2007*), to target specific epitopes (*Even-Desrumeaux et al., 2014; Vielemeyer et al., 2009*), or to identify conformation sensitive-binders (*Haque et al., 2011*). Recombinant antibody fragment library screening have, for example, provided several binders targeting selectively the active conformation of GTP binding proteins (*Dimitrov et al., 2008; Nizak et al., 2003a; Tanaka et al., 2007*). We hypothesized that the NaLi-H1 synthetic library had enough diversity and functionality to enable the identification of selective conformational binders. A subtractive panning was performed to select conformation-specific antibodies directed against small GTPases from the RHO subfamily (*Chinestra et al., 2012*). Small GTPases are molecular switch that cycle between an inactive and an active state when bound to GDP or GTP nucleotides, respectively. Mutant of small GTPases can be designed that adopt stably an active or inactive conformation. A constitutively active (CA) mutant RHOA L63 was expressed in HEK293 as a bait then freshly pulled down for panning to preserve its native conformation. To enrich in phage specific for GTP-bound RHOA, a depletion step was introduced from the second round of panning using GDP-bound RHO proteins. After four rounds of selection, clones were analyzed using phage ELISA against either wild type RHOA loaded with GTP $\gamma$ S (a non-hydrolysable analogue of GTP) or GDP-loaded RHOA. Forty clones presenting a differential ELISA signal in favor of the GTP loaded RHOA were sequenced. One antibody, represented by clone H12, represented more than 50% of the population. We analyzed H12



**Figure 3.** Subtractive selection led to conformational or cell type specific hs2dAbs. (A–C) H12 is a conformational hs2dAb binding only to the GTP bound, activated state, of the RHOA GTPase: (A) ELISA using the H12 or anti-GST antibodies to reveal recombinant GST-RHOA wild type proteins loaded with either 100  $\mu$ M GTP gamma S (Black) or 1 mM GDP (White), or constitutively active mutant proteins GST-RHOA Q63L (Grey). Means  $\pm$  SEM. (B) A CBD tagged H12 pull down from HeLa cell extract loaded with 100  $\mu$ M GTP gamma S (GTP) or with 1 mM GDP as inputs. Western blot reveals Figure 3 continued on next page

Figure 3 continued

RHOA at a similar level in 5% of both input but only on the GTP loaded extract in the CBD-H12 pull down. D5 anti tubulin was used as a negative control and the standard GST-RBD (RHO binding domain of Rhotekin) as a positive control of active RHO pull down. (C) Immunofluorescence on HeLa cells overexpressing GFP-RHOA CA (constitutively active) mutant or GFP-RHOA DN dominant negative mutant. H12 staining detected using a myc tag antibody revealed only cells overexpressing the constitutively active mutant with a pattern stronger at the cell periphery where RHOA activation is high. (D) Tumor cell surface subtractive selection scheme. (E) ELISA of hs2dAb F7 anti-HER2 on HER2 fused with a rabbit Fc versus binding on rabbit Fc at equimolar concentration. (F) hs2dAb F7 anti-HER2 decorated the SKBR3 membrane in immunofluorescence. SKBR3 cells were fixed with 3% paraformaldehyde and stained with F7 revealed by an anti-HisTag (Sigma) and an anti-MouseCy3 secondary antibody (Jackson). (G) FACS analysis of F7 anti-HER2 on SKBR3 HER2 positive cells versus MCF10A HER2 negative cells. (Scale bar = 10  $\mu$ m).

DOI: [10.7554/eLife.16228.012](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.012)

The following figure supplement is available for figure 3:

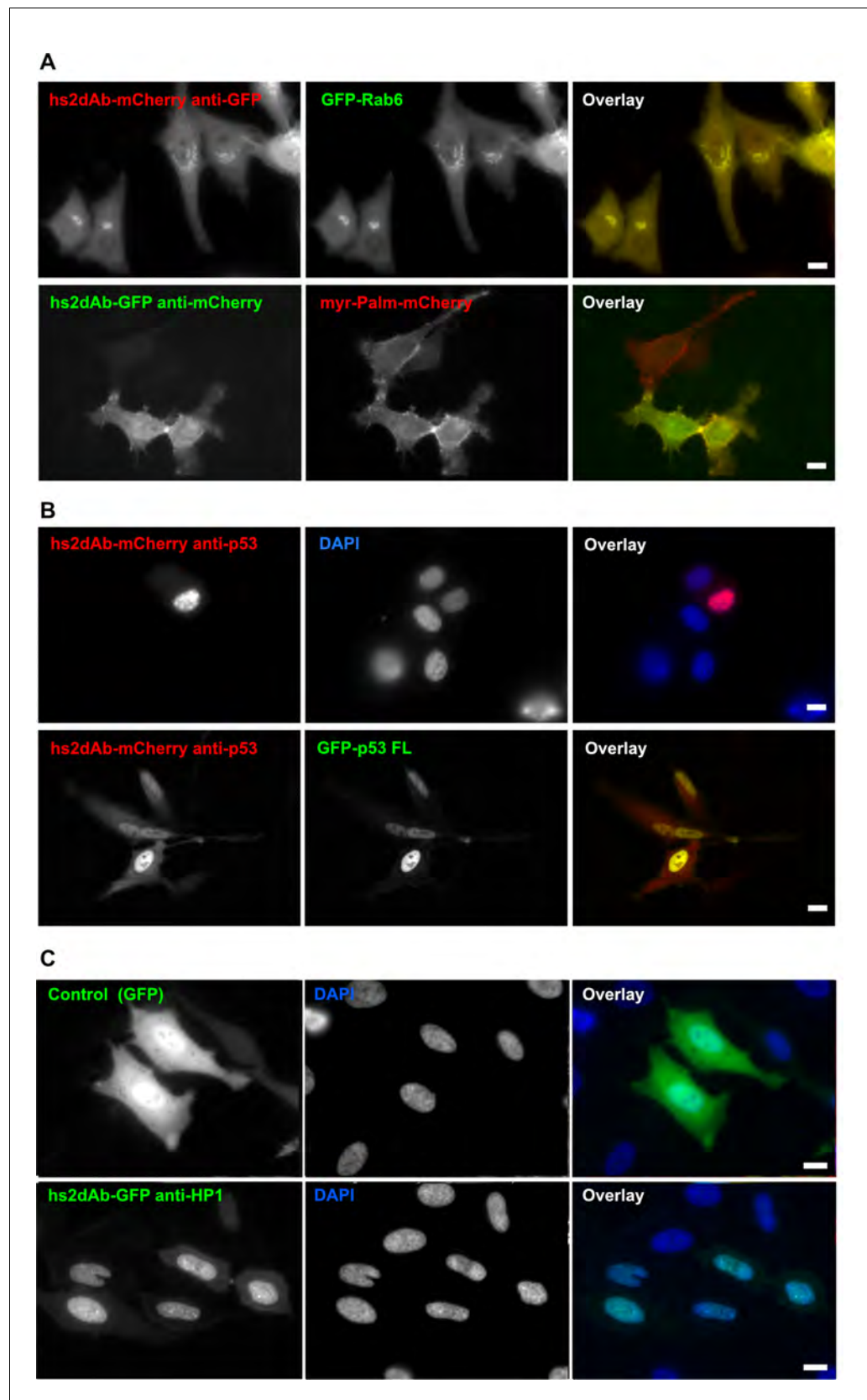
**Figure supplement 1.** non cropped western blot corresponding to **Figure 3B** detection RHOA.

DOI: [10.7554/eLife.16228.013](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.013)

binding specificity by ELISA on several purified RHO proteins expressed as GST fusion in *E.coli*. H12 recognized the constitutively active mutant RHOA L63 (RHOA-CA) which is bound to GTP due to impaired hydrolysis activity. A similar signal was obtained with wild type RHOA loaded with the non-hydrolysable GTP analogue GTP $\gamma$ S. In contrast, no binding was observed to the dominant negative RHOA N19 mutant RHOA-DN nor to GDP-loaded wild type RHOA (**Figure 3A**). The capacity of H12 to specifically immunoprecipitate GTP-loaded RHOA from mammalian cell extracts was then evaluated in comparison to the standard method to assay RHO activity (**Ren et al., 1999**). This pull down method is based on the RHO binding domain of Rhotekin fused to GST (GST-RBD) which is known to bind to the active conformation of RHO GTPase. The hs2dAb H12 bearing a carboxy-terminal CBD (Chitin-Binding Domain) was expressed in *E. coli* and immobilized on chitin beads. These beads were then incubated with HeLa cell extracts pre-treated with either GTP $\gamma$ S or GDP to load small GTPases with the respective nucleotide. The H12 hs2dAb was found to be highly selective of RHO loaded with GTP $\gamma$ S as it was unable to precipitate RHO from GDP loaded extract (**Figure 3B**). A similarly strong conformation-specificity was found when using H12 for immunofluorescence staining (**Figure 3C**). HeLa cells expressing the GFP-RHOA constitutively active mutant carrying the mutation Q63L (GFP-RHOA CA) or the dominant negative mutated T19N (GFP-RHOA DN), were fixed and stained with H12 hs2dAb. Expression of the dominant negative mutant GFP-RHOA DN, did not lead to an increased signal over the background of un-transfected cells. In contrast, a staining with H12 was correlated with the level of GFP-RHOA CA mutant expression. Note that the signal does not fully overlap GFP fluorescence and appeared stronger at the cell border and in large zone where cell shape is strongly retracted by large bundled actin stress fibers induced by a sustained activation of the RHOA/ROCK pathway (**Mayer et al., 1999**). This CA mutant, like active mutant of many small GTPases related to RAS still need to be activated by guanine nucleotide exchange factors to be loaded with GTP and display the active conformation. Thus, we believe that the H12 staining revealed the active form of this mutant in cells (**Figure 3C**). All together, these results demonstrated that the H12 hs2dAb is selective for RHO GTPases in their active conformation, highlighting the performance and diversity of the NaLi-H1 library.

### Direct selection against cell surface antigens

The use of antibodies to target cells involved in pathologies like cancers or viral infection is one of the most promising therapeutic approach. Antibodies also represent a unique tool to identify novel targets at the cell surface. Using synthetic libraries like the NaLi-H1 library to carry out direct selection against the cell surface of tumor cells would strongly accelerate the identification of specific antigens while allowing extended control over the conditions of selection. A subtractive selection scheme was set up to identify antibodies selectively detecting the surface of breast tumor cells: phages displaying hs2dAbs were first depleted against a reference cell line before being selected against the target one (**Figure 3D**). As a target cell line, we used the SKBR3 line, which is known to overexpress the HER2 cell surface protein, while the MCF7 cell line, negative for HER2, was used to pre-adsorb the library. After the third round of bio-panning, 88 clones were analyzed by FACS and 58 were found to be positive when tested on SKBR3 cells and negative on MCF7 cells. Sequencing the 58 positive clones revealed that 15 independent binders had been selected. Although the



**Figure 4.** Fluorescent intrabodies tracking endogenous proteins. Intracellular expression of hs2dAb. (A) (top panel) HeLa cells were co-transfected with GFP-Rab6 and a hs2dAb-mCherry anti-EGFP plasmids. The hs2dAb  
*Figure 4 continued on next page*

## Figure 4 continued

mCherry anti-EGFP colocalized perfectly with the Rab6 Golgi staining. (bottom panel) HeLa cells were co-transfected with Myr-palm-mCherry and a VHH-EGFP anti-mCherry plasmids. The VHH-EGFP anti-mCherry interacted with its target in vivo and colocalized perfectly with the mCherry staining at the plasma membrane. (B) SKBR3 cells were transfected with an anti-p53 hs2dAb-mCherry alone (top panel), or together with full length p53-EGFP which concentrated the hs2dAb into the nucleus (bottom panel). (C) GFP, used as a control (top panel) or a GFP-tagged anti-HP1 hs2dAb (bottom panel) were transiently expressed in HeLa cells (green). In contrast to the GFP control, the GFP-tagged anti-HP1 strongly accumulated in the nucleus where it labeled nuclear condensations. (Scale bar = 10  $\mu$ m)

DOI: 10.7554/eLife.16228.014

subtractive selection was not performed on identical cell lines expressing or not HER2, we observed strikingly that 12 clones out of 15 recognized HER2 exoplasmic domain by ELISA using HER2-Fc as a target antigen (**Figure 3E**), suggesting that it behaves as a dominant differential epitope. As shown in **Figure 4**, these antibodies efficiently detected HER2 at the cell surface by immunofluorescence (**Figure 3F**) or by FACS (**Figure 3G**). These experiments demonstrated that the NaLi-H1 library will represent a unique tool to discover, in a rapid and cost effective manner, specific antibodies detecting antigens present at the surface of pathological cells. These antibodies may then be used to identify the corresponding target.

### hs2dAbs as intracellular antibodies

Various antibody fragments have long been proposed to represent powerful tools when expressed in cells as intrabodies. Although several studies indeed report efficient use of intrabodies (reviewed in [Kaiser et al., 2014; Lobato and Rabbitts, 2003; Stocks, 2005]), this is limited to antibody scaffolds that resist to the reducing environment of the cytosol. We evaluated the use of the hs2dAb scaffold to develop intrabodies. Randomly chosen hs2dAbs were fused to a fluorescent protein and observed in living cells. In comparison to our previous experience with scFv or nanobody libraries in which a majority of tested antibodies showed aggregation when expressed in the cytosol as an EGFP-fusion, most of the hs2dAbs tested here gave a monodispersed fluorescence, and very few were showing aggregates. Monodispersed fluorescence of the EGFP has been proposed to be a convenient indicator of stability and potential use as intrabody (Guglielmi et al., 2011). Several hs2dAb directed against actin, tubulin, EGFP or p53 were tested for their ability to trace intracellular antigens in living cells. None of the anti-tubulin or anti-actin antibodies tested were found localized on microtubule or microfilament, respectively, in living cells. We reasoned that this poor efficiency may be linked to the antigen denaturing conditions used during the selection of antibodies directed against actin. The existence of a large pool of unpolymerized actin and tubulin may also prevent efficient recruitment on the polymers. In contrast, several anti-GFP and anti-mCherry hs2dAbs were found to efficiently label their targets, like for example GFP-Rab6 or Myr-Palm-mCherry fusion proteins, in living cells (**Figure 4A**). Similarly, the anti-p53 hs2dAb fused to mCherry were clearly accumulated in the nucleus of SKBR3 cells where endogenous p53 is also localized. This signal was enhanced in cells overexpressing p53-EGFP (**Figure 4B**). This further confirmed the binding specificity of the hs2dAb anti-p53 while expressed in the reducing cytosol. Effective intrabodies were also obtained against HP1. **Figure 4C** (lower panel) shows that anti-HP1 expressed as an EGFP



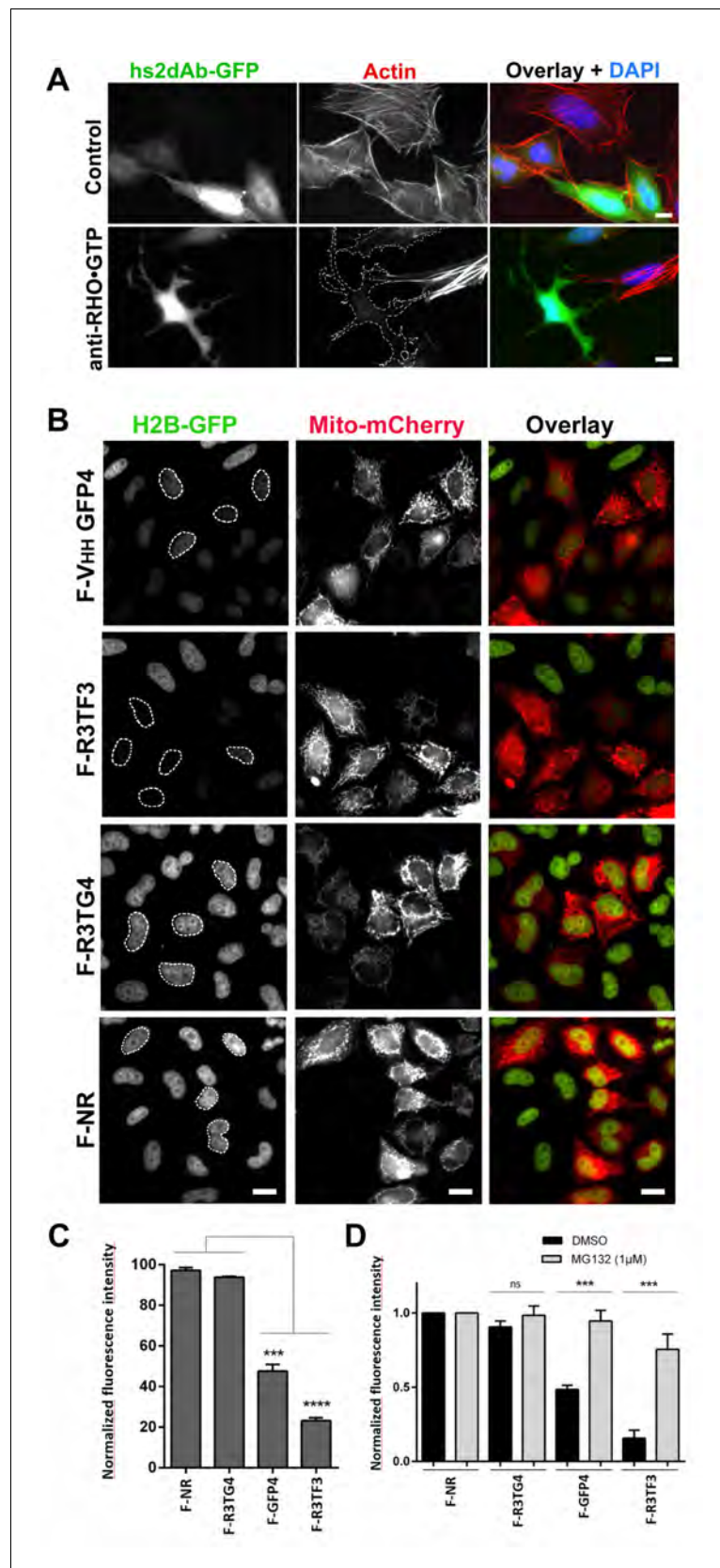
**Video 1.** mcherry-Rab6 was transiently expressed in HeLa cells together with an anti-mCherry hs2dAb fused to GFP. 24 hr after transfection, cells were imaged using a spinning disk confocal microscope.

DOI: 10.7554/eLife.16228.015

tagged protein in HeLa cells localized in the nucleus where it labels condensed structures similar to HP1 usual staining. In contrast, a diffuse cytoplasmic and nuclear staining was obtained using non relevant hs2dAbs fused to EGFP (**Figure 4C**, upper panel).

These results indicate that functional intrabodies can be obtained at high frequency using the NaLi-H1 library. Intrabodies can be used, upon fusion with a fluorescent protein, to track the dynamics of their target in living cells (see for example Nizak et al., 2003a). Such an





**Figure 5.** Targeting cellular proteins using inhibitory antibodies or by functionalizing antibodies to induce protein knockdown. (A) HeLa cells expressing transiently a EGFP-tagged non relevant hs2dAB (top panel) or EGFP-H12  
*Figure 5 continued on next page*

Figure 5 continued

anti RHO-GTP (bottom panel) were fixed 20 hr post transfection and stained using DAPI and Alexa 594 phalloidin to detect actin stress fibers. The H12 hs2dAb induced actin stress fibers disappearance and major cell shape change (see cells outlined with a dotted line) (B) Protein knockdown of H2B-EGFP mediated by functionalized inhibitory antibodies. HeLa S3 cell stably expressing histone H2B-EGFP were transfected with vectors expressing antibodies fused to an F-box (F-Ib) to induce degradation of the targeted cellular antigen. The F-GFP4 VHH (DegradFP) was used as a positive control (top panel) and a non-relevant hs2dAb as a negative control (bottom panel). F-Ib were expressed using a bi-cistronic vector driving the co-expression of mitochondrial targeted mCherry. Protein interference is analyzed in cells displaying mCherry positive mitochondria (mitoCherry channel). Efficient protein knockdown is obtained using the R3TF3 anti-EGFP intrabody. Note that not all nanobodies can be used as F-Ib because R3TG4 does not induce protein degradation. (Scale bars = 20  $\mu$ m) (C) Fluorescence decay measurement of the protein interference assay was quantified by flow cytometry (10000 cells analyzed, from 3 independent replicates). GFP fluorescence intensity was quantified in the transfected and the untransfected subpopulations for each F-Ib. The ratio of each median of fluorescence (transfected versus untransfected population) was calculated as a percentage of GFP fluorescence intensity for one F-Ib. A strong decrease in fluorescence corresponding to protein knockdown was observed with F-GFP4 VHH and F-R3TF3 hs2dAb intrabodies while the non-relevant negative control and R3TG4 did not induce a decrease of fluorescence. (D) Cells were analyzed as in C but the cells were incubated in 1  $\mu$ M MG132 or DMSO for 44 hr after transfection by the different F-Ib and fluorescence intensity was normalized using the non-relevant control. Protein knockdown was inhibited by MG132.

DOI: [10.7554/eLife.16228.016](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.016)

The following figure supplements are available for figure 5:

**Figure supplement 1.** Conformational selectivity of the H12 intrabody towards RHOA.GTP.

DOI: [10.7554/eLife.16228.017](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.017)

**Figure supplement 2.** Protein knockdown set up using F-Ib degradation with anti-GFP intrabodies.

DOI: [10.7554/eLife.16228.018](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.018)

**Figure supplement 3.** non cropped western blot corresponding to **Figure 5—figure supplement 1** detection of RHOA, Myc tagged hs2dAb intrabodies, and GAPDH which is not in the main figure.

DOI: [10.7554/eLife.16228.019](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.019)

**Figure supplement 4.** non cropped western blot corresponding to **Figure 5—figure supplement 1D** detection of tubulin, GFP and myc tag.

DOI: [10.7554/eLife.16228.020](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.020)

application is illustrated in the **Video 1** where an hs2dAb directed against mCherry is used to track mCherry-fused Rab6 in living cells. Intrabodies may allow not only to track the dynamics of their cellular target, but also to perturb, or block, their activity. Our results indeed indicate that the H12 antibody was able to perturb endogenous RHO activity when expressed in the cytosol. We could not directly image enrichment of the H12 antibodies in cellular sub-domains in living cells but we observed that H12 may behave as an efficient intrabody carrying out co-immunoprecipitation experiments. H12 carrying a carboxy-terminal myc tag was expressed in HeLa cells together with either the CBD-fused RHOA DN or with the CBD-RHOA CA mutants. H12 was pulled-down by RHOA CA but not by inactive RHOA DN (**Figure 5—figure supplement 1**). H12 thus worked as an intrabody and kept its conformation sensitivity in the cytosol. Because RHO GTPases are involved in signaling pathways that promotes the actin cytoskeleton polymerization, we looked at functional effects induced by H12 overexpression. In contrast to un-transfected cells or cells transfected with various non-relevant EGFP fused hs2dAb (**Figure 5A**, upper panel), we observed that cells expressing H12-EGFP were totally devoid of actin stress fibers (**Figure 5A**, lower panel). This alteration in actin filament organization was associated with marked changes in cell shape characteristic of loss of intracellular mechanical forces and tension. As RHOA plays a major role in activating myosin II and actin cytoskeleton reorganization, our results suggested that H12 efficiently perturbed RHO-dependent signaling, mimicking the phenotype induced by the C3 exoenzyme RHO inhibitor (**Ridley and Hall, 1992**).

Identification of blocking antibodies is a challenging task and not all functional intrabodies are inhibitory. However, it is possible to functionalize non-blocking intrabodies to inhibit their target function. One approach relies on the ubiquitylation and degradation of the recognized target as described by **Caussinus et al. (2011)**. This approach is based on the fusion of intrabodies to an F-box domain which allows interaction with Skip1, a member of the SCF complex, an E3 ubiquitin

ligase of the complex E1/E2/E3 ubiquitinylation machinery, that targets proteins to proteasome-dependent cellular degradation (Caussin *et al.*, 2011) (Figure 5—figure supplement 2). This approach was efficiently developed to target several EGFP fusion proteins in *Drosophila* using a single anti EGFP intrabody, named GFP4, which is a robust and high affinity EGFP llama intrabody originally isolated from an immune library (Rothbauer *et al.*, 2006). To get insight into the relative functionality of hs2dAb for such a protein interference approach, several of the anti EGFP hs2dAb selected from the NaLi-H1 library were fused at their amino terminus to the Fbox domain and their efficacy was compared to the efficacy of the Fbox-GFP4 nanobody. To detect cells expressing Fbox-intrabody fusion proteins (F-Ib), we constructed a bicistronic vector driving the co-expression of F-Ib together with a mitochondria-targeted mCherry (Mito-mCherry) (Figure 5B). We expressed the F-Ib antibodies in a HeLa clone stably expressing EGFP fused to histone H2B (Siljé *et al.*, 2006) and looked for EGFP-H2B depletion. As expected, F-GFP4, also known as degradFP, induced a strong reduction of H2B-EGFP expression as analyzed by western blot (Figure 5—figure supplement 2). Accordingly, a strong reduction in nuclear fluorescence intensity was observed in cells expressing F-GFP4 (see mito-mCherry positive cells, Figure 5B; Figure 5—figure supplement 2). No effect was observed when expressing either GFP4 alone or a GFP4 fused to a truncated, nonfunctional, Fbox domain (Figure 5—figure supplement 2). When anti-EGFP clones selected from the NaLi-H1 library were tested, we observed that some of the hs2dAb that were found to active as fluorescent intrabodies failed to degrade H2B-EGFP when expressed as F-Ib. This highlights the fact that not all intrabodies can efficiently be functionalized with the F-box and that *in vivo* binding to a target is not the only parameter to consider. However, several hs2dAb anti-EGFP induced a complete disappearance of nuclear H2B-EGFP signal when expressed as F-Ib (F-R3TF3, Figure 5B) while no reduction was observed when using an anti-EGFP that cannot be used as an intrabody (F-R3TG4, Figure 5B). FACS analysis showed a decreased of fluorescence intensity by as much as 70% (Figure 5C). As expected, this effect was reversed in the presence of a proteasome inhibitor (Figure 5D). Altogether, these experiments show that the hs2dAb scaffold enables the frequent selection of antibodies that can be expressed in the mammalian cell cytoplasm to be used as functional fluorescent or inhibitory intrabodies.

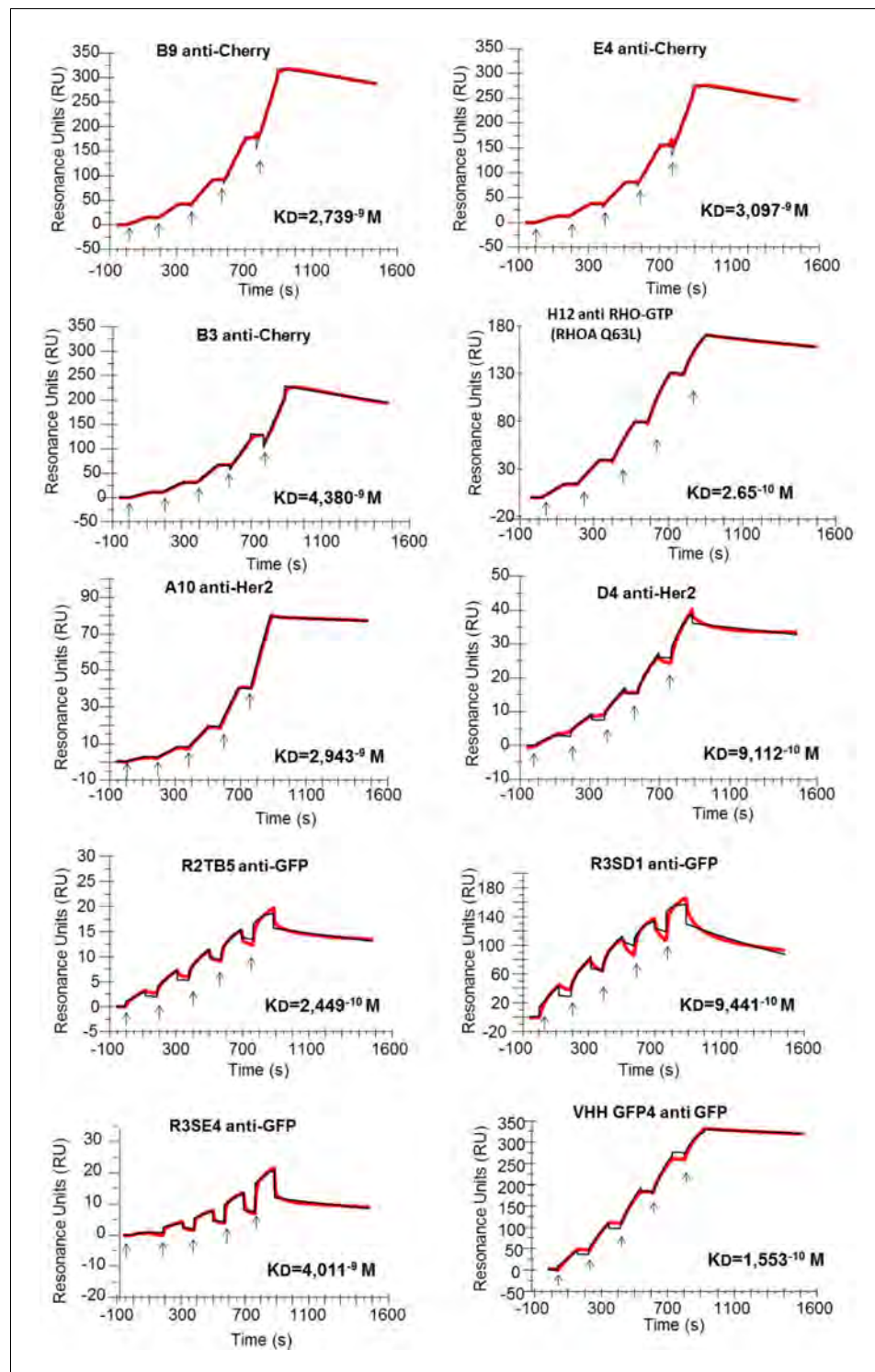
## Discussion

Here, we report the construction of the first large fully synthetic single domain antibody library based on a humanized scaffold derived from llama VHH. A set of robust nanobody scaffolds was first identified using a positive expression screening in *E. coli* cytosol. One very robust scaffold (sdAb<sup>D10</sup>) was identified and was used as a base. After introduction of several modifications that aimed at humanizing its primary sequence, we designed the hs2dAb scaffold which is as stable as sdAb<sup>D10</sup> while being closer to human VH3. Our data indicate that the hs2dAb displays partial resistance and/or refolding after treatment for 10 min at 90°C. Using CDR grafting experiments we confirmed the efficacy and the stability of the synthetic scaffold to display CDR regions. Based on our prior experience on phage display libraries, immune or naïve llama VHH libraries (Monegal *et al.*, 2012; Olichon and Surrey, 2007) or from scFv libraries (Dimitrov *et al.*, 2008; Goffinet *et al.*, 2008;

**Table 1.** Summary of screenings showing the number of unique clones giving positive signal. (ND means non determined)

Antigen	Phage ELISA	Positive clones		
		IF/FACS	Intrabody	Rounds of panning
GFP	37	10/ND	4/10	2
mCherry	ND	6/ND	2/6	3
Tubulin	ND	3/ND	0/3	2
Actin	16	7/ND	1/7	3
p53	12	6/ND	2/6	2
RHOA-GTP	24	8/ND	3/8	4
Her2	6	5/10	ND	3

DOI: 10.7554/eLife.16228.021



**Figure 6.** Affinity determination. Single cycle kinetics analysis was simultaneously performed on immobilized His fusion VHH antibodies (250–300 RU), with five injections of analytes (EGFP, HER2, RHOAQ63L and mCherry) at 3.125 nM, 6.25 nM, 12.5 nM, 25 nM, and 50 nM. Analytes injections lasted for 120 s each and were separated by 10 s dissociation phases. At this time of buffer exchange, a slight refraction index discrepancy between the sample and the flow buffer can induce a drop in resonance unit. This common bulk effect, which is clearly visible on sensorgrams with a smaller scale range on the RU axis (ie: R3SE4, R2TB5), does not affect the measurement of off-rate constant. Off-rate constant was calculated from an extended dissociation period of 10 min following the last injection according to the single cycle kinetics method. Each sensorgram (expressed in RUs as a function of time) *Figure 6 continued on next page*

Figure 6 continued

seconds) represents a differential response where the response on an empty reference channel (Fc1) was subtracted. The red curves correspond to the data and the black curves represent the fit done by the BIAevaluation software. Note that the fitted curve is almost identical to the data curve in some cases like for example the RHOA Q63L or the HER2 binding measurement.

DOI: 10.7554/eLife.16228.022

**Nizak et al., 2003a**) we then rationally designed CDR diversity with fixed CDR1 and CDR2 size and four CDR3 sizes (9, 12, 15 or and 18 amino acids). The power of modern gene synthesis approach permits to reach very high genetic diversity while controlling codon bias and cloning features. Fully random codon combination using NNN or NNK trinucleotide cannot prevent stop codon, undesired cysteine or hydrophobic residues to be incorporated, and it does not lead to the controlled probability of amino acid occurrence at a given position. Therefore a more rational design was implemented with defined set of codons for each CDR amino acid position so that it does not mimic natural diversity, in contrast to recently developed Fab synthetic libraries (**Prassler et al., 2011; Zhai et al., 2011**), but is rather optimized for intrinsic hydrophilicity or solubility. After a large-scale cloning of synthetic fragments, 3 billion independent clones were transformed in the bacteria. Library quality was confirmed by Sanger and next generation sequencing.

The library was validated by screening against various targets and in each case specific and highly functional antibodies were obtained (**Table 1**). Various selection schemes yielded a large diversity of high affinity and high selectivity binders. Selections were carried out using purified antigen coated on polystyrene, on magnetic beads or directly on the cell surface. In many cases, two rounds of selection were sufficient to obtain selective binders. We usually analyzed only 80 randomly picked clones because the diversity of specific binders was systemically high. Only a few selections led to antibodies usable in western blotting (anti-actin, ant-tubulin) probably because most screenings were done using

**Table 2.** Binding affinities of 9 selected hs2dAb fused to a 6HIS tag measured by surface plasmon resonance single cycle kinetics method. Dissociation equilibrium constant KD corresponds to the ratio between off-rate and on-rate kinetic constant  $K_{off}/K_{on}$ . Non relevant hs2dAb were used as negative controls and gave no detectable binding signal. A positive control endowed with subnanomolar affinity, the GFP binder VHH-GFP4, was analyzed in parallel to the GFP hs2dAbs. A KD of  $1.55 \cdot 10^{-10}$  M was measured for VHH-GFP4 which is similar to published values. The binding properties of the conformational H12 hs2dAb to the GTP loaded RHOA subfamily were measured using the L63 or L61 constitutively active mutants of RHO, RHOB, RHOC, RAC1 and CDC42 related small GTPases, as well as the negative mutant T19N of RHOA. ('no' means no detectable binding).

hs2dAb-6xHis	Antigen	$k_{on}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $s^{-1}$ )	KD(M)
R2TB5 anti-GFP	GFP	$1.24 \cdot 10^{+6}$	$3.05 \cdot 10^{-4}$	$2.45 \cdot 10^{-10}$
R3SD1 anti-GFP	GFP	$7.07 \cdot 10^{+5}$	$6.68 \cdot 10^{-4}$	$9.44 \cdot 10^{-10}$
R3SE4 anti-GFP	GFP	$1.45 \cdot 10^{+5}$	$5.83 \cdot 10^{-4}$	$4.01 \cdot 10^{-9}$
Llama VHH GFP4	GFP	$2.99 \cdot 10^{+5}$	$4.65 \cdot 10^{-5}$	$1.55 \cdot 10^{-10}$
D4 anti-Her2	Her2	$1.79 \cdot 10^{+5}$	$1.63 \cdot 10^{-4}$	$9.11 \cdot 10^{-10}$
A10 anti-Her2	Her2	$1.66 \cdot 10^{+4}$	$4.88 \cdot 10^{-5}$	$2.94 \cdot 10^{-9}$
B9 anti-Cherry	mCherry	$6.14 \cdot 10^{+4}$	$1.68 \cdot 10^{-4}$	$2.74 \cdot 10^{-9}$
E4 anti-Cherry	mCherry	$6.57 \cdot 10^{+4}$	$2.03 \cdot 10^{-4}$	$3.10 \cdot 10^{-9}$
B3 anti-Cherry	mCherry	$6.19 \cdot 10^{+4}$	$2.71 \cdot 10^{-4}$	$4.38 \cdot 10^{-9}$
H12 anti-RHO.GTP	RHOA Q63L	$4.81 \cdot 10^{+5}$	$1.28 \cdot 10^{-4}$	$2.65 \cdot 10^{-10}$
H12 anti-RHO.GTP	RHOB Q63L	$2.24 \cdot 10^{+5}$	$3.59 \cdot 10^{-4}$	$1.57 \cdot 10^{-9}$
H12 anti-RHO.GTP	RHOC Q63L	$1.12 \cdot 10^{+6}$	$5.41 \cdot 10^{-5}$	$4.79 \cdot 10^{-11}$
H12 anti-RHO.GTP	RHOA T19N	no	no	no
H12 anti-RHO.GTP	RAC1 Q61L	$7.53 \cdot 10^{+5}$	$2.55 \cdot 10^{-4}$	$3.3 \cdot 10^{-10}$
H12 anti-RHO.GTP	CDC42 Q61L	no	no	no

DOI: 10.7554/eLife.16228.023

natively folded targets. Accordingly, selected hs2dAb performed very well in other conventional immunoassays like ELISA, FACS, immunoprecipitation or immunofluorescence. Affinity measurements done by surface plasmon resonance revealed KD values in the order of 10 nanomolar and up to 50 picomolar. Such high affinities are rather good and usually rarely observed for monovalent binders obtained without in vivo immunization or in vitro affinity maturation steps (**Figure 6; Table 2**).

The NaLi-H1 library thus enables the rapid selection of diverse and highly functional binders. Because it is a fully synthetic, non immune, library, it does not depend on animal experimentation, it is not limited by natural immunogenicity or toxicity of antigens and allows to develop and adjust the selection without ethic consideration. In addition, because all steps are carried out in vitro, conditions can be tightly controlled. This allowed to develop powerful differential selection and to identify conformation-specific antibodies. This also allowed to directly screen for antibodies directed against antigens specifically present at the surface of a particular cell type. Such a differential selection will be a powerful approach to identify novel antigen at the surface of tumor or infected cells. Such antibodies may also represent powerful tools for diagnostic and therapeutic applications to target cells in human pathologies. For example, after dimerization using Fc domains, hs2dAb antibodies may be used to target tumor cells and benefit from antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) for example. They may also be used directly as the smallest antibody-derived domain naked as an agonist or antagonist or armed for enhanced toxicity. Similarly, it may be labeled using radioactive compounds (e.g.  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ) and used to image tumors in patient using positron emission tomography. Altogether, the NaLi-H1 library may accelerate the identification of novel potent tools to be used in human clinical applications.

The synthetic scaffold we defined was based on the selection of a set of VHH able to fold properly in the bacteria cytosol. The goal was not only to define a robust scaffold that would be efficiently produced without aggregation but also to allow frequent selection of functional intrabodies. Intrabodies have been isolated from various antibody libraries (**Nizak et al., 2003a; Rothbauer et al., 2006; Tanaka and Rabbitts, 2010; Vercruyssen et al., 2010**) as well as other protein scaffold like Darpin (**Tamaskovic et al., 2012**) or FN3 (**Koide et al., 2012**) which are devoid of cysteine. A peculiar feature of the NaLi-H1 library is that it is based on a humanized nanobody-like robust scaffold, stable in a reducing environment, while it still contains the two canonical cysteine residues. Stabilized nanobodies, human single domain scaffolds (**Christ et al., 2007; Saerens et al., 2005**) and libraries (**Goldman et al., 2006; Mandrup et al., 2013**) were reported before. However, to our knowledge, no synthetic library producing at high frequency functional intrabodies was developed before based on such stabilized scaffolds. Almost every hs2dAb antibodies we expressed in mammalian cytosol showed no sign of aggregation, which further supported the idea that the synthetic scaffold we designed is robust and highly resistant to reduction. Previous studies showed that functional intrabody identification often relied on additional steps of selection in a protein-protein interaction reporter system such as PCA (**Koch et al., 2006**) or bacterial 2 hybrid (**Pellis et al., 2012**), yeast IACT (**Tanaka and Rabbitts, 2010**) or F2H assays (**Zolghadr et al., 2008**). Using the NaLi-H1 library, we observed that without using particular selection schemes, functional intrabodies were frequently obtained. Although we did not formally compare the NaLi-H1 library to previous llama naïve or semi synthetic libraries, the functionality of selected hs2dAb was compared to a subnanomolar affinity intrabody, the GFP4 nanobody, which has been extensively used (**Caussinus et al., 2011; Kirchhofer et al., 2010**). We observed by monitoring its signal-to-noise ratio and by using it in a protein knockdown assay that NaLi-H1 can provide highly functional hs2dAb which appeared as good as intrabodies from immune libraries.

Intrabodies can be used in several applications like tracking of intracellular dynamics of endogenous proteins (**Nizak et al., 2003a, 2003b; Rothbauer et al., 2006**) but the most appealing application is to use them for rapid protein inactivation in living cells. Intrabodies may be used to directly block their target proteins in cells. One of the conformation-sensitive antibody that was selected can be used to inhibit active RHO GTPase signaling in living cells and is as potent as the C3 exoenzyme toxin. Only few intrabodies have been described to be intrinsically inhibitors of protein activity (**Haque et al., 2011; Vercruyssen et al., 2010**), and our results suggest that the NaLi-H1 library may enable rapid selection of inhibitory antibodies. The next challenge will be to select conformational sensors specifically directed against a particular member of closely related RHO subtypes (RHOA/B/C) which share more than 90% similarity in primary sequence. But in any case, our results show that the NaLi-H1 library allows the selection of efficient, conformation-specific, inhibitory intrabodies.

Another way intrabodies may be used to inactivate their targets in living cells is to fuse the intrabody to a dominant inhibitory domain. Following an idea pioneered by Affolter and colleagues (*Caussinus et al., 2011*), we showed here that intrabodies selected from the NaLi-H1 library can be fused to a proteasome-targeting domain to impose the specific degradation of their respective targets. This protein interference approach was validated using anti-EGFP hs2dAb and we believe that this approach will bring disruptive tools to generate rapid protein knockdown both in cell culture and in the animal.

In summary, we have designed a novel nanobody scaffold endowed with improved stability and created a highly diverse library, the NaLi-H1 library, that was successfully screened to identify highly functional binders directed against very diverse targets. We believe that this library will allow the fast, and fully in vitro, identification of immunological tools usable both for fundamental and medical applications.

## Materials and methods

### Plasmids and cloning

Artificial gene synthesis (Mr Gene, GmbH, Germany) composed of a 6His-Tag and a triple c-myc Tag was inserted into the pHEN2 phagemid vector (Griffin 1. library) between NotI and BamHI sites. CcdB gene from pENTR4 vector (Invitrogen - ThermoFisher Scientific, France) was inserted into the pHEN2 vector between NcoI and NotI sites. This vector allows to express antibody fragments in fusion, upstream, with the pelB leader to drive secretion in the periplasm and downstream with the PIII protein of M13 phages. An amber stop codon is present between the antibody and the pIII. This stop codon is partially suppressed in SupE *E. coli*. For expression and purification of dimeric antibodies, hs2dAb were inserted in vectors derived from pFuse (Invivogen, France) as described in *Moutel et al. (2009)*. For intrabody expression in mammalian cells, hs2dAb were digested by NcoI and NotI and ligated into the plb-mEGFP, pEGFP or the pmCherry vectors (Clontech - Takara, USA). (See the Appendix for more details).

### CAT filter assay

Previously selected VHHs from naïve or immune libraries were subcloned into pAOCAT (*Monegal et al., 2012*) using the NcoI and NotI restriction sites. Chloramphenicol resistance assay was performed using BL21 (DE3) cells transformed with the pAOCAT-VHH fusion constructs. (See the Appendix for more details).

### Library construction

Details about the construction of the library can be found in the Appendix. In short, a synthetic design was ordered based on a statistic analysis of the diversity found in natural VHH and aiming at reducing hydrophobicity at some position. The size of the CDR1 and CR2 was fixed at 7 amino acids while 4 sizes of CDR3 were chosen (9, 12, 15 and 18 amino acids). Large -scale PCR was then carried out ensuring that at least  $10^{10}$  DNA molecules were used as a matrix. Fragments were then cut and inserted into the pHEN2-3myc plasmid. The ligated DNA material was used to transform electrocompetent *E. coli* TG1 cells (Lucigen Corp., Middleton, United States). Serial dilution was used to count the total number of bacteria transformed. A potential diversity of  $3 \times 10^9$  was calculated. Transformed bacteria plated on 430 2xYT-ampicillin agar dishes (140 mm), grown overnight at 37°C, scrapped and stored in 30% of glycerol at -80°C.

### Ion torrent sequencing

IonTorrent sequencing library was prepared with the Ion Plus Fragment Library kit for AB Library Builder System (Life Technologies - ThermoFisher Scientific, France) following manufacturer's instructions and was controlled on the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, France) with the High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies). The sequencing template was prepared by emulsion PCR with the Ion OneTouch 2 system and the Ion PGM Template OT2 400 Kit (Life Technologies). Sequencing was performed on a IonTorrent Personal Genome Machine using the Ion PGM Sequencing 400 Kit and a 314v2 Ion chip (Life Technologies).

## Antigens

Human  $\beta$ Actin was purchased from Sigma-Aldrich (France). RHOA GTPase fused to either an amino terminal Chitin Binding Domain or a streptactin binding peptide were produced in HEK293 cells. EGFP (as mCherry) in fusion with a streptavidine binding peptide (SBP) were produced through in vitro translation system (Roche Life Science, France) and used directly for screening without the need for purification.

Biotinylated Tubulin was purchased from Cytoskeleton, Inc. (Denver, United States). For p53, the 83 first amino acids of the NP\_000537.3 isoform were produced in bacteria with a SNAP and His Tag, purified using Talon resin (Takara - Clontech) and biotinylated in vitro. HP1 $\alpha$  was produced in bacteria with an avitag and a His Tag, and purified using Talon resin.

For HER2, the natural receptor was used as membrane protein target on SKBR3 cells.

For more details see the Appendix for more details.

## Phage display selections

Screening for  $\beta$ actin was performed by panning in immunotubes as described (*Marks et al., 1991*). Screening for EGFP, Tubulin and p53 were performed in native condition as described (*Nizak et al., 2005*). Screening for HER2 was performed on surface cells as described (*Even-Desrumeaux and Chames, 2012*). Screening on RHO was performed in native condition. (See the Appendix for more details).

## Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Individual clones were screened by monoclonal phage ELISA as described. (See the Appendix for more details).

## Western-blot

After boiling in SDS-PAGE loading buffer, the samples were separated on a 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Whatman GmbH, Germany). Membranes were blocked in 3% non-fat milk-PBS with 0.2% Tween 20 for 1 hr at room temperature or overnight at 4°C. unpurified hs2dAb were used at 1/100 from culture supernatant and added to the membranes with an anti-hisTag antibody at 1/3000 (Sigma-Aldrich) for 90 min. Blots were then washed and incubated 1 hr with secondary anti-Mouse HRP labeled antibodies (diluted at 1/10000 in PBS 0.1% Tween 20) (Jackson ImmunoResearch Laboratories). After 5 washes with PBS 0.1% Tween 20, secondary antibodies were then revealed using the SuperSignal chemoluminescent reagent (Pierce) and Hyperfilm ECL (GE HealthCare). For RHO-GTP pull down, the primary anti RHOA mAb was used (Cell Signaling Technology; 1/1000). For protein knockdown experiments, 500 000 of transfected cells (mCherry positive cells) were sorted with a MoFlo Astrios flow cytometer (Beckman Coulter). Cells were lysed with SDS-Tris lysis buffer (Tris pH7.4 10 mM, SDS 1% supplemented with phosphatase and protease inhibitors). 20  $\mu$ g of cell extracts were separated on 12.5% SDS-PAGE and electro transferred onto PVDF membranes. Blots were probed with a rabbit polyclonal anti-EGFP full length (Santa Cruz, sc-8334, 1:500), a mouse monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma, T5168, 1:25000) and an anti-myc HRP antibody (Novus Biologicals, NB600-341, 1:40000). Detection was performed using peroxidase conjugated secondary antibodies and Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific Pierce).

## Immunofluorescence

Immunofluorescence screenings were performed on HeLa cells as described before (*Nizak et al., 2005*). (See the Appendix for more details).

## Transient transfection

HeLa or HeLa S3 H2B-EGFP Cells cultured on coverslips were transfected according to the CaPO<sub>4</sub> or jet prime procedure with 1  $\mu$ g DNA per well (24 wells plate) or 10  $\mu$ g DNA (10 cm<sup>2</sup> diameter dish). Cells can be observed from 12 hr post-transfection on.

## Flow cytometry

For HER2 immunoassay, cell surface staining were performed in phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 1% SFV. 100  $\mu$ L of supernatant (80  $\mu$ L phages + 20  $\mu$ L PBS/milk1%) were



incubated on  $1.10^5$  cells for 1 hr on ice. Phage binding was detected by a 1:300 dilution of anti-M13 antibody (GE healthcare, France) for 1 hr on ice followed by a 1:1000 dilution of PE-conjugated anti-Mouse antibody (BD Bioscience, France) for 45 min. Samples were analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur using CellQuest Pro software (BD Biosciences, France).

In the protein knockdown experiments, 48 hr after transfection, at least 10000 HeLa S3 H2B-GFP cells were analyzed on a MoFlo Astrios flow cytometer (Beckman Coulter France S.A.S) for their GFP fluorescence intensity. This fluorescence was analyzed in mCherry transfected cells and non transfected cells. Flow cytometry data were analyzed with Kaluza software (Beckman Coulter).  $1 \mu\text{M}$  of proteasome inhibitor MG132 (Sigma-Aldrich) was used in the cell growth medium for 48 hr. Values reported represent median  $\pm$  standard deviation (SD) of at least three independent experiments. p values were calculated with GraphPad Prism 6 (RRID:SCR\_002798) using a Student's t test.  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ ;  $****p < 0.0001$ .

## Affinity measurement

All binding studies based on SPR technology were performed on BIAcore T200 optical biosensor instrument (RRID:SCR\_008424, GE Healthcare). Capture of single domain Hs2dAb-6xHis was performed on a nitrilotriacetic acid (NTA) sensorchip in HBS-P+ buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.05% surfactant P20) (GE Healthcare). The four flow cells (FC) of the sensorchip were used: one (FC 1) to monitor nonspecific binding and to provide background corrections for analyses and the other three flow cells (FC 2, 3, and 4) containing immobilized Hs2dAb-6xHis for measurement.

For immobilization strategies, the four flow cells were loaded with nickel solution ( $10 \mu\text{L}/\text{min}$  for 60 s) in order to saturate the NTA surface with  $\text{Ni}^{2+}$  and an extra wash using running buffer containing 3 mM EDTA after the nickel injection. Each His-tagged hs2dAb in running buffer was injected in flow cells at a flow-rate of  $10 \mu\text{L}/\text{min}$ . The total amount of immobilized hs2dAb-6xHis was 250–300 resonance units. (RUs; 1 RU corresponds approximately to  $1 \text{ pg}/\text{mm}^2$  of protein on the sensor chip). A Single-Cycle Kinetics (SCK) analysis to determine association (on-rates), dissociation (off-rates) and affinity constants ( $k_{\text{on}}$ ,  $k_{\text{off}}$  and  $K_{\text{D}}$  respectively) was carried out. SCK method prevents potential inaccuracy due to sensorchip regeneration between cycles which are necessary in the conventional multiple cycle kinetics (MCK) (Trutnau, 2006). SCK binding parameters are evaluated for each injection according to the tools and fit models of the BIAevaluation software, giving similar values than MCK. As hs2dAb were smaller proteins than their respective antigens, hs2dAbs were captured on the sensorchip while the recombinant antigens were used as analytes. Analytes were injected sequentially with increased concentrations ranging between 3.125 nM to 50 nM in a single cycle without regeneration of the sensorship between injections. Binding parameters were obtained by fitting the overlaid sensorgrams with the 1:1. Langmuir binding model of the BIAevaluation software version 1.0.

## Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the help of the deep sequencing (ICGEx) and the imaging (PICT) platforms of the Institut Curie as well as the technical support of Aurélie Schneider, Selma Djender, and Alexis Arrial for the selection of anti-mCherry, anti-HER2 and anti-HP1 $\alpha$ , Selma Djender and Anne Beugnet for the help in antibodies purification, Ahmed El Marjou for the production of recombinant HP1-Avitag and Anne-Laure Iscache for precious help in FACS experiments. We also would like to thank Yann Louault, Jean-Pierre Quivy and Christèle Maison for their help in characterizing anti-HP1 antibodies and Solene Hervé et Daniele Fachinetti for the characterization of the anti-p53 antibodies and the kind gift of the p53 shRNA expressing RPE-1 cell line.

---

## Additional information

### Competing interests

SM, FP: Co-inventor on a patent application (filled under ref: WO/2015/063331) that covers the hs2dAb scaffold and the commercial use of the library. The library has been licensed to Hybrigenics Service SA, which will perform screens on a fee-for-service basis. A consultant for Hybrigenics

Service SA. J-CR: Employed by, and a stockholder in, Hybrigenics Service SA. AO: Co-inventor on a patent application (filled under ref: WO/2015/063331) that covers the hs2dAb scaffold and the commercial use of the library. The library has been licensed to Hybrigenics Service SA, which will perform screens on a fee-for-service basis. The other authors declare that no competing interests exist.

### Funding

Funder	Grant reference number	Author
Agence Nationale de la Recherche	ANR-09-BIOT-05	Jean-Christophe Rain Franck Perez
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale		Gilles Favre
Groupe de Recherche of the Claudius Regaud Institute		Gilles Favre
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale	ITS-201103	Franck Perez
IDEX Paris Sciences Lettres	ANR-10-IDEX-0001-02 PSL	Franck Perez
LABEX CellTisPhyBio	11-LBX-0038	Franck Perez
Centre National de la Recherche Scientifique		Franck Perez
Institut Curie		Franck Perez
Fondation pour la Recherche Médicale	DEQ20120323723	Franck Perez
Aviesan	Project TABIP	Franck Perez

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

### Author contributions

SM, Carried out most of the experiments leading to the library construction, Designed and set up some of the screening approaches, Analyzed the data, Prepared the figures, Wrote the manuscript; NB, Designed and set up some of the screening approaches and conducted the protein knockdown experiments, Analyzed the data, Prepared the corresponding figures, Corrected the manuscript; VB, Carried out deep sequencing, Designed and carried out the NGS experiments, Analyzed the data and helped prepare the figure; LK, Designed and set up the GTP-RHO experiments, Analyzed the data, Prepared the figure; EL, Set-up the conditions and carried out the time-lapse imaging of living cells, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data; AdM, LL, Executed some biochemical experiments, Analyzed the data, Acquisition of data; J-CR, Helped for the construction of the library, Discussed the data, Conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data; GF, Supported the study, Corrected the manuscript, Analysis and interpretation of data; AO, Contributed to the design and the supervision of the study, Analyzed the data, Acquisition of data, Wrote the manuscript; FP, Designed, supervised and supported the project, Wrote the article, Analysis and interpretation of data

### Author ORCIDs

Nicolas Bery, <http://orcid.org/0000-0002-2643-3897>

Laura Keller, <http://orcid.org/0000-0002-1786-9760>

Ario de Marco, <http://orcid.org/0000-0001-7729-819X>

Gilles Favre, <http://orcid.org/0000-0002-2344-1883>

Franck Perez, <http://orcid.org/0000-0002-9129-9401>

### References

- Bartunek J**, Barbato E, Heyndrickx G, Vanderheyden M, Wijns W, Holz JB. 2013. Novel antiplatelet agents: ALX-0081, a Nanobody directed towards von Willebrand factor. *Journal of Cardiovascular Translational Research* **6**: 355–363. doi: [10.1007/s12265-012-9435-y](https://doi.org/10.1007/s12265-012-9435-y)
- Bernard P**, Gabant P, Bahassi EM, Couturier M. 1994. Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene* **148**:71–74. doi: [10.1016/0378-1119\(94\)90235-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90235-6)

- Böldicke T**, Weber H, Mueller PP, Barleon B, Bernal M. 2005. Novel highly efficient intrabody mediates complete inhibition of cell surface expression of the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/KDR). *Journal of Immunological Methods* **300**:146–159. doi: [10.1016/j.jim.2005.03.007](https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.03.007)
- Caussinus E**, Kanca O, Affolter M. 2012. Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**:117–121. doi: [10.1038/nsmb.2180](https://doi.org/10.1038/nsmb.2180)
- Chinestra P**, Lajoie-Mazenc I, Faye JC, Favre G. 2012. Use of phage display for the identification of molecular sensors specific for activated Rho. *Methods in Molecular Biology* **827**:283–303. doi: [10.1007/978-1-61779-442-1\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-442-1_19)
- Christ D**, Famm K, Winter G. 2007. Repertoires of aggregation-resistant human antibody domains. *Protein Engineering Design and Selection* **20**:413–416. doi: [10.1093/protein/gzm037](https://doi.org/10.1093/protein/gzm037)
- 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. doi: [10.1126/science.1165401](https://doi.org/10.1126/science.1165401)
- Even-Desrumeaux K**, Chames P. 2012. Phage display and selections on cells. *Methods in Molecular Biology* **907**:225–235. doi: [10.1007/978-1-61779-974-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-974-7_12)
- Even-Desrumeaux K**, Nevoltris D, Lavaut MN, Alim K, Borg JP, Audebert S, Kerfelec B, Baty D, Chames P. 2014. Masked selection: a straightforward and flexible approach for the selection of binders against specific epitopes and differentially expressed proteins by phage display. *Molecular & Cellular Proteomics* **13**:653–665. doi: [10.1074/mcp.O112.025486](https://doi.org/10.1074/mcp.O112.025486)
- Goffinet M**, Chinestra P, Lajoie-Mazenc I, Medale-Giamarchi C, Favre G, Faye JC. 2008. Identification of a GTP-bound Rho specific scFv molecular sensor by phage display selection. *BMC Biotechnology* **8**:34. doi: [10.1186/1472-6750-8-34](https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-34)
- Goldman ER**, Anderson GP, Liu JL, Delehanty JB, Sherwood LJ, Osborn LE, Cummins LB, Hayhurst A. 2006. Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library. *Analytical Chemistry* **78**:8245–8255. doi: [10.1021/ac0610053](https://doi.org/10.1021/ac0610053)
- Greenberg AS**, Avila D, Hughes M, Hughes A, McKinney EC, Flajnik MF. 1995. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* **374**:168–173. doi: [10.1038/374168a0](https://doi.org/10.1038/374168a0)
- 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. doi: [10.1093/protein/gzr049](https://doi.org/10.1093/protein/gzr049)
- Hamers-Casterman C**, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R. 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**:446–448. doi: [10.1038/363446a0](https://doi.org/10.1038/363446a0)
- Haque A**, Andersen JN, Salmeen A, Barford D, Tonks NK. 2011. Conformation-sensing antibodies stabilize the oxidized form of PTP1B and inhibit its phosphatase activity. *Cell* **147**:185–198. doi: [10.1016/j.cell.2011.08.036](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.036)
- Holz J-B**, Sargentini-Maier L, De Bruyn S, Gachalyi B, Udvaros I, Rojkovich B, Bruk S, Sramek P, Korkosz M, Krause K. 2013. OP0043 Twenty-four weeks of treatment with a novel anti-IL-6 receptor nanobody (R) (ALX-0061) resulted in 84% ACR20 improvement and 58% DAS28 remission in a phase I/II study in RA. *Annals of the Rheumatic Diseases* **72**:A64. doi: [10.1136/annrheumdis-2013-eular.248](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-eular.248)
- Hoogenboom HR**. 2005. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnology* **23**:1105–1116. doi: [10.1038/nbt1126](https://doi.org/10.1038/nbt1126)
- Jobling SA**, Jarman C, Teh MM, Holmberg N, Blake C, Verhoeven ME. 2003. Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nature Biotechnology* **21**:77–80. doi: [10.1038/nbt772](https://doi.org/10.1038/nbt772)
- Joshi SN**, Butler DC, Messer A. 2012. Fusion to a highly charged proteasomal retargeting sequence increases soluble cytoplasmic expression and efficacy of diverse anti-synuclein intrabodies. *mAbs* **4**:686–693. doi: [10.4161/mabs.21696](https://doi.org/10.4161/mabs.21696)
- Kaiser PD**, Maier J, Traenkle B, Emele F, Rothbauer U. 2014. Recent progress in generating intracellular functional antibody fragments to target and trace cellular components in living cells. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1844**:1933–1942. doi: [10.1016/j.bbapap.2014.04.019](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.04.019)
- Kirchhofer A**, Helma J, Schmidthals K, Frauer C, Cui S, Karcher A, Pellis M, Muyldermans S, Casas-Delucchi CS, Cardoso MC, Leonhardt H, Hopfner KP, Rothbauer U. 2010. Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**:133–138. doi: [10.1038/nsmb.1727](https://doi.org/10.1038/nsmb.1727)
- Koch H**, Gräfe N, Schiess R, Plückthun A. 2006. Direct selection of antibodies from complex libraries with the protein fragment complementation assay. *Journal of Molecular Biology* **357**:427–441. doi: [10.1016/j.jmb.2005.12.043](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.043)
- Koide S**, Koide A, Lipovšek D. 2012. Target-binding proteins based on the 10th human fibronectin type III domain (<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3). *Methods in Enzymology* **503**:135–156. doi: [10.1016/B978-0-12-396962-0.00006-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396962-0.00006-9)
- Lee CM**, Iorno N, Sierro F, Christ D. 2007. Selection of human antibody fragments by phage display. *Nature Protocols* **2**:3001–3008. doi: [10.1038/nprot.2007.448](https://doi.org/10.1038/nprot.2007.448)
- Lobato MN**, Rabbitts TH. 2003. Intracellular antibodies and challenges facing their use as therapeutic agents. *Trends in Molecular Medicine* **9**:390–396. doi: [10.1016/S1471-4914\(03\)00163-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00163-1)
- Mandrup OA**, Friis NA, Lykkemark S, Just J, Kristensen P. 2013. A novel heavy domain antibody library with functionally optimized complementarity determining regions. *PLoS One* **8**:e76834. doi: [10.1371/journal.pone.0076834](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076834)
- Marks JD**, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. 1991. By-passing immunization. *Journal of Molecular Biology* **222**:581–597. doi: [10.1016/0022-2836\(91\)90498-U](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90498-U)

- Mayer T, Meyer M, Janning A, Schiedel AC, Barnekow A. 1999. A mutant form of the rho protein can restore stress fibers and adhesion plaques in v-src transformed fibroblasts. *Oncogene* **18**:2117–2128. doi: [10.1038/sj.onc.1202537](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202537)
- Melchionna T, Cattaneo A. 2007. A protein silencing switch by ligand-induced proteasome-targeting intrabodies. *Journal of Molecular Biology* **374**:641–654. doi: [10.1016/j.jmb.2007.09.053](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.09.053)
- Mikhaylova M, Cloin BM, Finan K, van den Berg R, Teeuw J, Kijanka MM, Sokolowski M, Katrukha EA, Maidorn M, Opazo F, Moutel S, Vantard M, Perez F, van Bergen en Henegouwen PM, Hoogenraad CC, Ewers H, Kapitein LC. 2015. Resolving bundled microtubules using anti-tubulin nanobodies. *Nature Communications* **6**:7933. doi: [10.1038/ncomms8933](https://doi.org/10.1038/ncomms8933)
- Monegal A, Olichon A, Bery N, Filleron T, Favre G, de Marco A. 2012. Single domain antibodies with VH hallmarks are positively selected during panning of llama (Lama glama) naïve libraries. *Developmental and Comparative Immunology* **36**:150–156. doi: [10.1016/j.dci.2011.06.016](https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.06.016)
- Moutel S, El Marjou A, Viele Meyer O, Nizak C, Benaroch P, Dübel S, Perez F. 2009. A multi-Fc-species system for recombinant antibody production. *BMC Biotechnology* **9**:14. doi: [10.1186/1472-6750-9-14](https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-14)
- Muyldermans S. 2013. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annual Review of Biochemistry* **82**:775–797. doi: [10.1146/annurev-biochem-063011-092449](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449)
- Nizak C, Monier S, del Nery E, Moutel S, Goud B, Perez F. 2003a. Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors. *Science* **300**:984–987. doi: [10.1126/science.1083911](https://doi.org/10.1126/science.1083911)
- Nizak C, Martin-Lluesma S, Moutel S, Roux A, Kreis TE, Goud B, Perez F. 2003b. Recombinant antibodies against subcellular fractions used to track endogenous Golgi protein dynamics in vivo. *Traffic* **4**:739–753. doi: [10.1034/j.1600-0854.2003.00132.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00132.x)
- Nizak C, Moutel S, Goud B, Perez F. 2005. Selection and application of recombinant antibodies as sensors of rab protein conformation. *Methods in Enzymology* **403**:135–153. doi: [10.1016/S0076-6879\(05\)03012-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)03012-0)
- Olichon A, Surrey T. 2007. Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry* **282**:36314–36320. doi: [10.1074/jbc.M704908200](https://doi.org/10.1074/jbc.M704908200)
- Olichon A, Schweizer D, Muyldermans S, de Marco A. 2007a. Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains. *BMC Biotechnology* **7**:7. doi: [10.1186/1472-6750-7-7](https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-7)
- Olichon A, Elachouri G, Baricault L, Delettre C, Belenguer P, Lenaers G. 2007b. OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **14**:682–692. doi: [10.1038/sj.cdd.4402048](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402048)
- Pellis M, Pardon E, Zolghadr K, Rothbauer U, Vincke C, Kinne J, Dierynck I, Hertogs K, Leonhardt H, Messens J, Muyldermans S, Conrath K. 2012. A bacterial-two-hybrid selection system for one-step isolation of intracellularly functional Nanobodies. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **526**:114–123. doi: [10.1016/j.abb.2012.04.023](https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.023)
- Prassler J, Thiel S, Pracht C, Polzer A, Peters S, Bauer M, Nörenberg S, Stark Y, Kölln J, Popp A, Urlinger S, Enzelberger M. 2011. HuCAL PLATINUM, a synthetic Fab library optimized for sequence diversity and superior performance in mammalian expression systems. *Journal of Molecular Biology* **413**:261–278. doi: [10.1016/j.jmb.2011.08.012](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.08.012)
- Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA. 1999. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *The EMBO Journal* **18**:578–585. doi: [10.1093/emboj/18.3.578](https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.578)
- Ridley AJ, 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. doi: [10.1016/0962-8924\(92\)90173-K](https://doi.org/10.1016/0962-8924(92)90173-K)
- Rothbauer U, Zolghadr K, Tillib S, Nowak D, Schermelleh L, Gahl A, Backmann N, Conrath K, Muyldermans S, Cardoso MC, Leonhardt H. 2006. Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nature Methods* **3**:887–889. doi: [10.1038/nmeth953](https://doi.org/10.1038/nmeth953)
- Saerens D, Pellis M, Loris R, Pardon E, Dumoulin M, Matagne A, Wyns L, Muyldermans S, Conrath K. 2005. Identification of a universal VHH framework to graft non-canonical antigen-binding loops of camel single-domain antibodies. *Journal of Molecular Biology* **352**:597–607. doi: [10.1016/j.jmb.2005.07.038](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.038)
- Shin I, Edl J, Biswas S, Lin PC, Mernaugh R, Arteaga CL. 2005. Proapoptotic activity of cell-permeable anti-Akt single-chain antibodies. *Cancer Research* **65**:2815–2824. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-04-2898](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2898)
- Silljé HH, Nagel S, Körner R, Nigg EA. 2006. HURP is a Ran-importin beta-regulated protein that stabilizes kinetochore microtubules in the vicinity of chromosomes. *Current Biology* **16**:731–742. doi: [10.1016/j.cub.2006.02.070](https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.02.070)
- Stocks M. 2005. Intrabodies as drug discovery tools and therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology* **9**:359–365. doi: [10.1016/j.cbpa.2005.06.003](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.06.003)
- Tamaskovic R, Simon M, Stefan N, Schwill M, Plückthun A. 2012. Designed ankyrin repeat proteins (DARPs) from research to therapy. *Methods in Enzymology* **503**:101–134. doi: [10.1016/B978-0-12-396962-0.00005-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396962-0.00005-7)
- Tanaka T, Williams RL, Rabbitts TH. 2007. Tumour prevention by a single antibody domain targeting the interaction of signal transduction proteins with RAS. *The EMBO Journal* **26**:3250–3259. doi: [10.1038/sj.emboj.7601744](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601744)
- Tanaka T, Rabbitts TH. 2010. Protocol for the selection of single-domain antibody fragments by third generation intracellular antibody capture. *Nature Protocols* **5**:67–92. doi: [10.1038/nprot.2009.199](https://doi.org/10.1038/nprot.2009.199)
- Trutnau HH. 2006. New multi-step kinetics using common affinity biosensors saves time and sample at full access to kinetics and concentration. *Journal of Biotechnology* **124**:191–195. doi: [10.1016/j.jbiotec.2006.01.006](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.01.006)

- Vercruyse T**, Pardon E, Vanstreels E, Steyaert J, Daelemans D. 2010. An intrabody based on a llama single-domain antibody targeting the N-terminal alpha-helical multimerization domain of HIV-1 rev prevents viral production. *Journal of Biological Chemistry* **285**:21768–21780. doi: [10.1074/jbc.M110.112490](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.112490)
- Vielemeyer O**, Yuan H, Moutel S, Saint-Fort R, Tang D, Nizak C, Goud B, Wang Y, Perez F. 2009. Direct selection of monoclonal phosphospecific antibodies without prior phosphoamino acid mapping. *Journal of Biological Chemistry* **284**:20791–20795. doi: [10.1074/jbc.M109.008730](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.008730)
- Wesolowski J**, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauerhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Boyer O, Seman M, Licea A, Serreze DV, Goldbaum FA, Haag F, Koch-Nolte F. 2009. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical Microbiology and Immunology* **198**:157–174. doi: [10.1007/s00430-009-0116-7](https://doi.org/10.1007/s00430-009-0116-7)
- Wörn A**, Plückthun A. 1999. Different equilibrium stability behavior of ScFv fragments: identification, classification, and improvement by protein engineering. *Biochemistry* **38**:8739–8750. doi: [10.1021/bi9902079](https://doi.org/10.1021/bi9902079)
- Zhai W**, Glanville J, Fuhrmann M, Mei L, Ni I, Sundar PD, Van Blarcom T, Abdiche Y, Lindquist K, Strohner R, Telman D, Cappuccilli G, Finlay WJ, Van den Brulle J, Cox DR, Pons J, Rajpal A. 2011. Synthetic antibodies designed on natural sequence landscapes. *Journal of Molecular Biology* **412**:55–71. doi: [10.1016/j.jmb.2011.07.018](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.018)
- Zolghadr K**, Mortusewicz O, Rothbauer U, Kleinhans R, Goehler H, Wanker EE, Cardoso MC, Leonhardt H. 2008. A fluorescent two-hybrid assay for direct visualization of protein interactions in living cells. *Molecular & Cellular Proteomics* **7**:2279–2287. doi: [10.1074/mcp.M700548-MCP200](https://doi.org/10.1074/mcp.M700548-MCP200)

## Appendix

### Supplementary methods

#### Plasmids and cloning

myc-Tags synthetic gene inserted in pHen2 vector: NotI-  
HHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAAEQKLISEEDLNGAAEQKLISEEDLNGAA\*(tag)-pIII-BamHI.

p53: TP53 hMDM2 interacting domain (aa 1 to aa 83 ref NP\_000537) has been cloned in pEB23, a pEMBL41 derivative in which MBP have been replaced by SNAP tag (New England Biolabs France). Fusion protein has been purified using Talon resin (Takara - Clontech) from 100 mL LB culture induced for 2 hr at 37°C with 1 mM IPTG. One  $\mu$ M of purified protein was biotinylated using 1  $\mu$ M of SNAP-biotin (S9110S, New England Biolabs) for 2 hr at 25°C and purified by G50.

#### Production of RHO GTPases amino terminal fusion construct.

Chitin binding domain (CBD) was amplified from pTYB2 (New England Biolabs) using the following oligos: CBDAgelfw 5'-

TACATTCAACCGGTCGCCACCATGACAAATCCTGGTGTATCCGCTTGG-3' and CBDTevRev

5'-CGAACTGAAAGTACAGATTCTCGCTGCCTTGAAGCTGCCA CAAGGCAGG-3'. RHO

cDNA was amplified from pGST-RHOBQ63L with the upstream primer TevAccRHOB Fw 5'-

GAGAACTCTGT ACTTTCAGTT CGGCGGTACC GCGGCCATCC GCAAGAAGCT GG-3'. A

single step PCR created the CBDtevRHOB fusion product that was cloned in a pEYFP-RHOB

(1) after digestion AgeI /BamHI, creating the pCBD-RHOB mammalian expression vector,

RHOB was further exchanged by RHOAQ63L or RHOA T19N using Acc65I/BamHI cloning

sites. The amino terminal CBD tag was replaced by either a dual Streptag (2S) or the

superfolder GFP using AgeI and KpnI cloning sites. A 2S tag corresponding to a tandem

repeat of the streptagII (IBA) separated by a flexible linker was gene synthesized (Genart -

ThermoFisher Biosciences). Superfolder GFP was amplified from pSuperfolder (gift from

Cabantous S) using the AgeISFGFPFw 5'-

AATGACATACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3' and SFGFPKpnIRev 5'-

AAGTCAGGTACCGCCACCGCTGCCGCCACCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG-3'. The

constructs pCBD-RHOA N19 or L63 were used in co-immunoprecipitation with GFP-hsdAb

experiments, and the pSFGFP-RHOA N19 or L63 mutants were used to monitor H12

immunofluorescence experiments.

A CBS-2S dual tag was PCR amplified and cloned at the NotI site downstream of hs2dAb in

pHEN6 vector, in order to produce pHEN- hs2dAb-CBD2S-6his. Purified hs2dAbs from this

construct were used in RHOA pull down experiments.

#### Construction of Fbox/NoFbox- hs2dAb-6Hismyc-IRES-MTS-FP expressing vectors.

A PCR was performed to extract the Fbox and noFbox sequences from the plasmids NSlmb-

VHHGFP4 and NSnoFbox-VHHGFP4 using BspHIFboxFw (5' GTTCATGTCATGATGAAAAT

GGAGACTG ACAAATAATGG 3') and FboxNcoRev (5'

CAAGATCCCATGGCGAGGTGGCGGCCAGTCCGCCAGTTG 3') primers. These fragments

were inserted in the p-Ib plasmid (intrabodies expression vector with CMV promoter) by

digesting with BspHI and NcoI. The vectors pIb-VHHGFP4, pIb-Fbox-VHHGFP4 and pIb-

NoFboxVHHGFP4 were obtained. Then IRES-MTS-fluorescent protein was inserted by PCR

downstream of the VHH. IRES was amplified from pCCEY (*Olichon et al., 2007b*) with

insertion of flanking downstream restriction sites AgeI, NheI and Acc65I. Then a mitochondrial

targeting sequence (MTS) from subunit VIII of human cytochrome c oxidase (pEYFP-MTS,

Takara - Clontech) was inserted between NheI / AgeI, followed by mCherry between AgeI /

Acc65I, thus creating the p-F-Ib\_IRES\_mito-mCherry; p-noF-Ib\_IRES\_mito-mCherry;

p-Ib\_IRES\_mito-mCherry in which any hs2dAb can be inserted by NcoI and NotI cloning sites.

## CAT filter assay

Previously selected VHHs from naïve or immune libraries were subcloned into pAOCAT (*Monegal et al., 2012*) using the NcoI and NotI restriction sites. Chloramphenicol resistance assay was performed using BL21(DE3) cells transformed with the pAOCAT-VHH fusion constructs. Bacteria were used for inoculating 500  $\mu$ L of LB containing kanamycin (35  $\mu$ g/mL) and glucose (0.2%) and were grown at 37°C until OD<sub>600</sub> was 0.8. The cytoplasmic expression of the VHH-CAT-fusion proteins was induced for 2 hr by the addition of 0.2 mM IPTG. At the end of the induction period, bacteria aliquots of 4  $\mu$ L were plated on LB-agar plates containing IPTG (0.1 mM) and increasing chloramphenicol concentrations ranging from 0 to 500  $\mu$ g/mL. Bacteria were incubated at 30°C for 20 hr before quantification of the colony formation. The resistance level was evaluated according to the colony growth rate at the different chloramphenicol concentrations. Several VHHs that were giving colonies up to 500  $\mu$ g/mL were compared to previously characterized intrabodies raised against GFP (nb GFP4) or Lamin (Lam) obtained by gene synthesis (GeneArt - ThermoFisher BioSciences) as well as to a thermostable VHH Re3. Liquid culture induced as above during 2 hr were diluted by serial dilution and 10  $\mu$ L of each dilution were spotted on agar plates containing 250  $\mu$ g/mL chloramphenicol (Cam) and 35  $\mu$ g/mL kanamycin and incubated at 30°C for 20 hr. Colony were imaged using ChemiDoc MP imaging system (Biorad France).

The D10 clone was further subcloned into the pHEN6 expression vector, leading to a periplasmic expression higher than 5 mg/L of culture in E coli Xl1blue strain.

## Library construction

The amino acids residues chosen for each position of the synthetic CDR loops were determined after analyzing the natural diversity existing at each position on natural VHH and following the rules indicated below (see *Figure 1—figure supplement 3* for diversity comparison between natural VHH and hs2dAb)

at CDR1 position 1: Y, R, S, T, F, G, A, or D [Y,S, F were the most frequent amino acid]

at CDR1 position 2: Y, S, T, F, G, T, or T [T was the most frequent amino acid so we imposed a 3 fold higher stoichiometry for T at that position]

at CDR1 position 3: Y, S, S, S F, or W [S was the most frequent amino acid so we imposed a 3 fold higher stoichiometry for T at that position]

at CDR1 position 4: Y, R, S, T, F, G, A, W, D, E, K or N [natural diversity respected while avoiding hydrophobic residues]

at CDR1 position 5: S, T, F, G, A, W, D, E, N, I, H, R, Q, or L [natural diversity respected. Because the frequency of hydrophobic I was high at this position in natural VHH, some hydrophobic amino acids were accepted]

at CDR1 position 6: S, T, Y, D, or E [S, T, and Y were the most frequently found amino acids in natural VHH]

at CDR1 position 7: S, T, G, A, D, E, N, I, or V [a high frequency of hydrophobic I or V was observed in natural VHH but their proportion was reduced here by adding polar residues]

at CDR2 position 1: R, S, F, G, A, W, D, E, or Y [D and E were added to help for solubility and W for specific interaction in hydrophobic pockets]

at CDR2 position 2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, R, Q, L or Y [introducing strong diversity]

at CDR2 position 3: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, Q, P [introducing strong diversity]

at CDR2 position 4: G, S, T, N, or D [G, S, T and N where the most frequent]

at CDR2 position 5: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K or M [allowing full diversity]

at CDR2 position 6: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, or K [allowing strong diversity]

at CDR2 position 7: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, or V [allowing strong diversity]

at CDR3 for every position: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K or M [introducing full diversity] CDR 3 length have been designed in order to produce 4 different subtype of hs2dAb with 9, 12, 15 or 18 residues in CDR3.

20 times, 1  $\mu$ L (10 ng) of the synthesis (corresponding to  $1.10^{10}$  molecules) were amplified by PCR in a total volume of 50  $\mu$ L using 1  $\mu$ L of Phusion DNA polymerase (New England Biolabs) with an equimolar mixture of the following primers:

5'-AACATGCCATCACTCAGATTCTCG-3' and 5'-GTTAGTCCATATTCAGTATTATCG-3'

PCR protocol consisted of an initial denaturation step at 98°C for 45 s followed by 20 cycles of 98°C for 10 s, 55°C for 30 s and 72°C for 30 s, and a final step extension at 72°C for 10 min. 7  $\times$  150  $\mu$ L of PCR were purified on 7 columns of a PCR clean-up kit (Macherey-Nagel). 55  $\mu$ g of the resulting purified fragment of PCR and 80  $\mu$ g of the pHEN2-ccdB-3myc phagemid were digested for 2 hr at 37°C with NcoI and NotI (New England Biolabs) in a total volume of 500  $\mu$ L. A dephosphorylation step was added for the phagemid with a Calf intestinal alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich) 30 min at 37°C. Digestions were purified on gel with respectively 4 and 6 columns of a gel extraction kit (Macherey-Nagel Sarl, France) in a final volume of 80 and 120  $\mu$ L. Then, purified PCR fragment was ligated into pHEN2-ccdB-3myc, between the PelB leader signal and the pIII gene. 50  $\mu$ g of phagemid and 19,2  $\mu$ g of insert were ligated overnight at 16°C with 10  $\mu$ L of high concentration T4 DNA ligase (New England Biolabs) in a total volume of 400  $\mu$ L. Ligation was purified on 6 columns (Macherey-Nagel) with a total volume of 150  $\mu$ L. The ligated DNA material was used to transform electrocompetent *E. coli* TG1 cells (Lucigen). 20 electroporations with 1  $\mu$ L of ligation were performed according to the manufacturer's instructions (1800 V; 10  $\mu$ F; 600  $\Omega$ ). Each electroporation was resuspended with 1 mL of warm 2XYT, 1% glucose medium and incubated with a shaking agitation for 1 hr at 37°C. 380 mL of 2XYT, 1% glucose was added to the suspension and plated on 430 2xYT-ampicillin agar dishes (140 mm) overnight at 37°C. Library size was calculated by plating serial dilution aliquots. The colonies were scraped from the plates with liquid 2xTY and library was stored in the presence of 30% of glycerol at -80°C with 1 mL aliquots at OD = 38,4.  $3.10^9$  individual recombinant clones were obtained.

### Phage display selections

Various methods outlined below were used to screen NaLi-H1 library. Three general advices can be given here: (1) In roughly 70% of the screen, specific clones were obtained. In many case, when not specific binders were recovered, we identified the antigen that was used as the principal cause of failure. It is often a good idea to insist and use an alternative target preparation and ensure its proper display during the selection phases. (2) A key step to obtain specific clones is the washing step. They should be extensive, numerous and in large volume, changing tubes several times. While it is always a good idea to start washing as quickly as possible, if the affinity of the hs2dAb obtained is too low then extended washing steps may be used in a subsequent screening to select for a low  $k_{off}$ . (3) We usually test for binders after the second and third rounds of selection, and more rarely after a fourth round. The method used to identify binders at the end of the selection should to be as close as possible to plan usage of the recombinant antibody. If immunofluorescence is planned, it ideally should be used to identify specific binders. If western blotting is the major application, It should be the preferred method to be used.

Immunotubes (Nunc) were coated with  $\beta$ Actin at a concentration of 20  $\mu$ g/mL in PBS overnight at 4°C. Immunotubes were then rinsed with PBS and blocked for 2 hr at room temperature with 2% w/v BSA or casein in PBS. After rinsing with PBS,  $> 10^{12}$  phage particles in 2% BSA or



casein were added to the immunotubes. The immunotubes were first incubated on shaker for 1 hr and then for 1 hr standing upright at room temperature. Unbound phage was washed away by rinsing the immunotubes fifteen times with PBS, 0.1% Tween 20 and five times with PBS. The bound phage fraction was eluted in 1 mL of 1 mg mL<sup>-1</sup> trypsin and inverting the tube for 10 min and then in 1 mL of 100 mM triethylamine and inverting the tube for 10 min. Triethylamine was neutralized by adding 0.5 mL 1 M Tris-HCl pH 7.4. The eluted phages were used for the infection of exponentially growing *E. coli* TG1.

Biotinylated antigens or SBP-antigen were diluted to obtain a 10–20 nM (1 mL final) and recovered on 50 µL streptavidin-coated magnetic beads (Dyna). As a reference, 10 nM of a 25-kDa protein like GFP represents 250 ng protein/mL (quantity used per round of selection). Efficient recovery was checked analyzing fractions of bound and unbound samples by Western blot using streptavidin-HRP or anti-AviTag antibodies. Antigen coated beads were incubated for 2 hr with the phage library (10<sup>13</sup> phages diluted in 1 mL of PBS + 0.1% Tween 20 + 2% non-fat milk). Phages were previously adsorbed on naked streptavidin-coated magnetic beads (to remove nonspecific binders). Phages bound to streptavidin-coated beads were recovered on a magnet and beads were washed 10 times (round 1) or 20 times (round 2 and 3) with PBS + Tween 0.1% on a magnet. Bound phages were eluted using triethylamine (TEA, 100 mM) for 10 min and neutralized using 1 M Tris pH 7.4. The elution was done twice. *E. coli* (TG1) were infected with the eluted phages and plated on ampicillin containing agarose. For round 2 and round 3, only 10<sup>12</sup> phages were used as input.

Chitin binding domain from chitinase A1 (CBD) or 2strep tag (IBA) fusion of RHOA GTPase active mutant (RHOA<sub>L63</sub>) were expressed transiently during 24 hr in HEK293 cells and captured freshly after cell lysis on magnetic beads before incubation with the library phages. Chitin magnetic beads (New England Biolabs or streptactin coated magStrep HC (IBA GmbH, Germany) were used in a similar way as described above with streptavidin beads. A phage display panning alternating rounds on chitin beads with rounds on streptactin beads was performed for 4 rounds. From the second round of panning, a depletion step on GDP loaded wild type RHOA or N19 inactive mutant was included.

When characterizing selected antibodies, various Non Relevant (NR) hs2dAb were used as controls. The one shown here are: A non-binding clone selected against FITC (in **Figure 5B–D** and **Figure 2—figure supplement 1**) and a non-binding clone selected against mCherry (in **Figure 5A** and **Figure 5—figure supplement 1**)

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Briefly, individual clones from a master plate and harboring phagemids were inoculated into 250 µL of media (2xTY, 1% glucose, 100 µg mL<sup>-1</sup> ampicillin) and grown overnight at 37°C. Ten µL of this culture were inoculated into 250 µL of fresh media for 3 hr. The culture was infected with KM13 helper phage and grown overnight in 200 µL 2xTY medium supplemented with 100 µg mL<sup>-1</sup> of ampicillin and 75 µg mL<sup>-1</sup> of kanamycin at 25°C. Supernatants from these cultures were used in phage ELISA assays. Maxisorp ELISA plate were coated with 100 µL per well of protein antigen in 100 mM carbonate buffer pH 8.6 for 2 hr at room temperature (RT) or overnight (OVN) at 4°C. Usually, 1 µg to 10 µg of antigen were used per well. A control plate was coated with BSA. Wells were rinsed once with PBS Tween 0.1% and blocked with 200 µL per well of 2% Milk + PBS Tween 0.1% for 1 hr at RT or OVN 4°C. Wells were rinsed 5 times in PBS. Twenty µL of PBS Tween 0.1% Milk and 80 µL of the phage containing supernatant were added to each well in both phage ELISA plate (antigen-coated and BSA control) for 1 hr. Wells were washed 3 times with PBS Tween 0.1% and 3 times with PBS. HRP-anti-pIII antibody (GE Healthcare) was added at 1:5.000 in PBS Tween 0.1% + 2% milk and incubated for 40 min. Wells were washed 3 times with PBS Tween 0.1% and 3 times with PBS. Reaction was developed with 100 µL of HRP substrate solution (e.g. ABTS in citrate buffer) at RT for 15 min and the optic density was read at 405 nm. RHO-GTPases ELISA were performed as previously described.

## Cells

All cells are regularly tested for mycoplasma contamination. The HeLa cells (RRID:CVCL\_0030) used in the study has been obtained from the B. Goud lab (Institut Curie). SNP characterisation has been carried out and may be shared upon request. The H2B-GFP cell line has been obtained from the lab of E. Nigg and has been described in *Silljé et al. (2006)*. RPE-1 immortalized by the expression of hTert (RRID:CVCL\_4388) as well as the CHO cells have been obtained from the ATCC.

## Immunofluorescence and real-time imaging

HeLa cells were either fixed in 3% paraformaldehyde and permeabilized with PBS (plus 0.05% saponin and 0.2% BSA) or fixed and permeabilized with ice cold methanol for 4 min at  $-20^{\circ}\text{C}$ . When needed, nocodazole (10  $\mu\text{M}$ , 90 min) or cytochalasin D (5  $\mu\text{M}$ , 60 min) were added before fixation. To activate p53 (*Figure 2—figure supplement 2*), cells were irradiated using a Stratagene UV crosslinker (100 joules/ $\text{m}^2$ ) 24 hr before fixation. hs2dAb secreted in 600  $\mu\text{L}$  2xTY cultures (produced in 96-deep well plates) after overnight induction with 1 mM IPTG at  $30^{\circ}\text{C}$  were used undiluted without purification. hs2dAbs were co-incubated with 9E10 anti-myc monoclonal for 90 min on cells. Cells were then washed quickly twice and incubated with secondary antibodies for 30 min (Invitrogen - Thermofisher). The actin cytoskeleton was stained with Alexa594 phalloidin (1/1000).

Cells were grown on coverslip and transfected with F-construct 48 hr following the manufacturer's recommendation. Cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde for 7 min then rinsed twice with PBS and mounted in Mowiol. Data acquisition was carried out on a Nikon Eclipse 90i (Nikon, France) and image processing with NIS Elements v3 software or using a Leica DM6000 B microscope equipped with a CoolSnap HQ2 camera controlled by Metamorph (Molecular Device Limited, UK, RRID:SCR\_002368)

For time-lapse imaging, HeLa cells seeded on glass the day before were transfected using calcium phosphate with mCherry-Rab6 and GFP-tagged anti-cherry expression plasmids. After 24 hr, medium is replaced by pre-warmed carbonate independent Leibovitz's medium (Invitrogen), and cells were imaged using an inverted microscope TiE (Nikon) equipped with spinning disk confocal head (PerkinElmer, Waltham, United States) and a CoolSnapHQ2 camera (Roper Scientific, France). Time-lapse images were acquired using a 63X objective and MetaMorph software (Molecular Device, RRID:SCR\_002368) every 2 s for 4 min.

## Pull down

Pull down of endogenous RHO proteins loaded in active or inactive state were adapted from well-established GST-RBD pull down. HeLa cell ( $5 \cdot 10^6$  per immunoprecipitate) were lysed in buffer (50 mM Tris pH 7.4, 500 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5% TritonX100). Crude protein lysates Extract was loaded with 0.2 mM  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  or 2 mM GDP in buffer supplemented with 10 mM EDTA for 30 min at  $30^{\circ}\text{C}$ . Reaction was stopped by adding 30 mM  $\text{MgCl}_2$ . For immunoprecipitation, beads bound by freshly captured CBD tag hs2dAb (4  $\mu\text{g}$ ) or GST-RBD (40  $\mu\text{g}$ ) positive control were incubated with loaded protein suspension for 45 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Beads were washed 3 times with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1% Tween20 and denatured in 2X Laemmli reducing sample buffer, boiled for 5 min and separated on 12.5% SDS-PAGE for Western Blot analysis with anti-RHOA followed by HRP-conjugated secondary antibodies.

Co-precipitations of intrabodies (myc- tagged hs2dAb) with RHOA CA active or DN inactive mutants were performed after transient co-transfection of pCBD-RHOA63L or pCBD-RHOA19N with plb-myc in HeLa cells. After 24 hr, crude cell lysates containing CBD-RHO mutants in buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl / 10 mM  $\text{MgCl}_2$  / 0.5% TritonX100 / 10% glycerol) were incubated with chitin beads for 1 hr at  $4^{\circ}\text{C}$ . Co precipitation was revealed by RHOA antibody and myc antibody.

## Production and Purification of recombinant protein for affinity measurement

The monovalent hs2dAb were produced in bacterial periplasm. Briefly, XL1blue *E.coli* transformed with pHEN-hs2dAb-CBD-2S-6his or pHEN-Hs2dAB-6his were grown in TB-ampicillin (100 µg/mL) medium supplemented with 1% glucose in the growth phase and with 0.1% glucose during induction with 1 mM IPTG. After 16 hr of expression at 28°C, the cells were harvested and periplasmic proteins were extracted in TES (Tris 100 mM pH 8, EDTA 1 mM, Sucrose 500 mM) after osmotic shock. hs2dAb were purified in batch using IMAC affinity chromatography using Ni-NTA beads CompleteHis resin (Roche Life Science) following manufacturer indications. Elution were dialyzed in PBS 10%glycerol.

Bivalent hs2dAb were produced as fusion proteins with the Fc domain of human IgG2 as described ([Moutel et al 2009](#)). hs2dAb were sub-cloned in pFuse-hlgG-Fc2 plasmid (NcoI/NotI) inframe between the interleukin-2 (IL2) secretion signal and the Fc domain. 4 days after transient transfection in CHO cells, supernatants were recovered and used directly for immunofluorescence staining of cells or for Western blot analysis. Hs2dAb-Fc were then revealed using anti-Human Fc fluorescent or HRP secondary antibodies (Jakson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, United States).

GST-GFP or GST-mCherry were expressed in the cytosol by overnight induction in 1 liter of *E. coli* BL21 cells by addition of 100 µM IPTG. After centrifugation and freezing, the bacterial pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 10 mM dithiothreitol, 0.1 mg/ml DNase I, and protease inhibitors (Sigma-Aldrich). After centrifugation, the supernatant fraction was bound to 500 µl of pre-washed glutathione-Sepharose beads and purified in batch according to manufacturer instructions (GE Healthcare).

RHOA CA or DN mutants as well as RAC1 CA tagged with the twin Streptag II (IBA) were expressed in the cytosol of BL21 Star (DE3) pRARE *E.coli* cells from a pET vector and purified in the same buffer as GST-GFP but on the streptactin resin (IBA) according to manufacturer instructions.

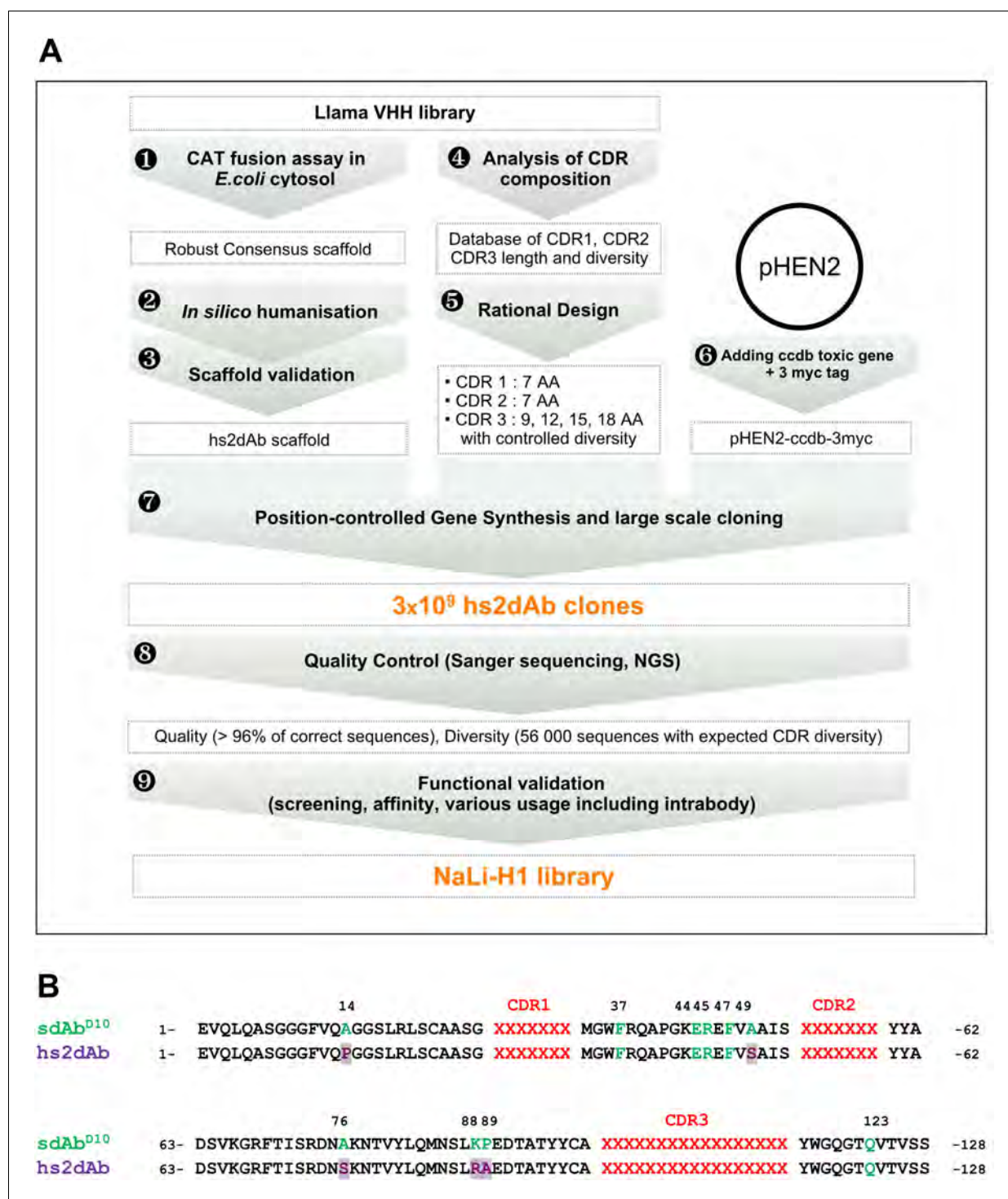


---

## Figures and figure supplements

NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies

**Sandrine Moutel et al**



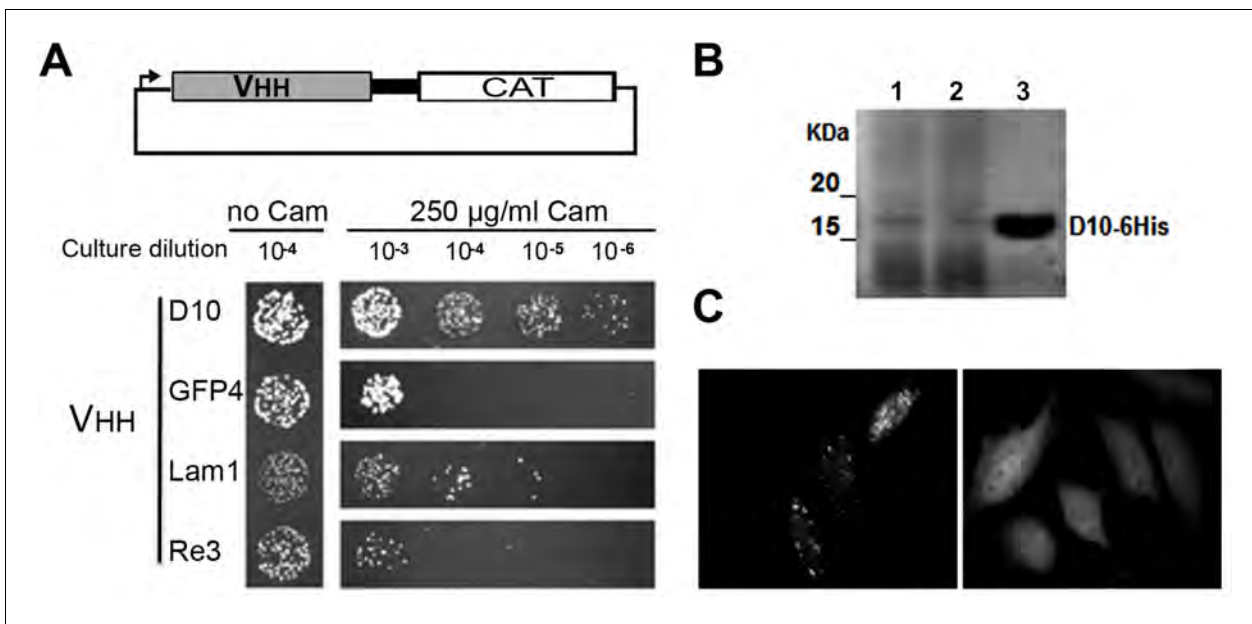
**Figure 1.** Overview of scaffold selection, diversity design, and synthetic production of the NaLi-H1 library. The development of the NaLi-H1 library followed three lines of optimization. (i) A novel scaffold was defined by selecting a set of robust nanobodies using a CAT fusion assay (1). A consensus was derived and mutations were introduced to humanize the scaffold (2). Usability and efficacy of the novel scaffolds (VHH and humanized) were then confirmed evaluating their display on phage, expression in CHO cells and use as intrabodies (3). In silico design was completed analyzing natural CDR diversity (4) and using this information to design synthetic CDRs. A fixed size of 7 aa was chosen for the CDR1 and CDR2. 4 sizes (9, 12, 15 and 18 amino acids) were chosen for CDR3. Finally, the pHEN2 vector was improved by implementing a triple myc tag and inserting a toxic gene (ccdb) to ensure low frequency of empty clones during library construction (6). Gene synthesis (using a tri-nucleotide approach) was ordered, synthetic sequences cloned into the novel pHEN2+ vector, transformed into bacteria and plated on 430 15 cm plates.  $3 \times 10^9$  clones were obtained. Quality control was

Figure 1 continued on next page

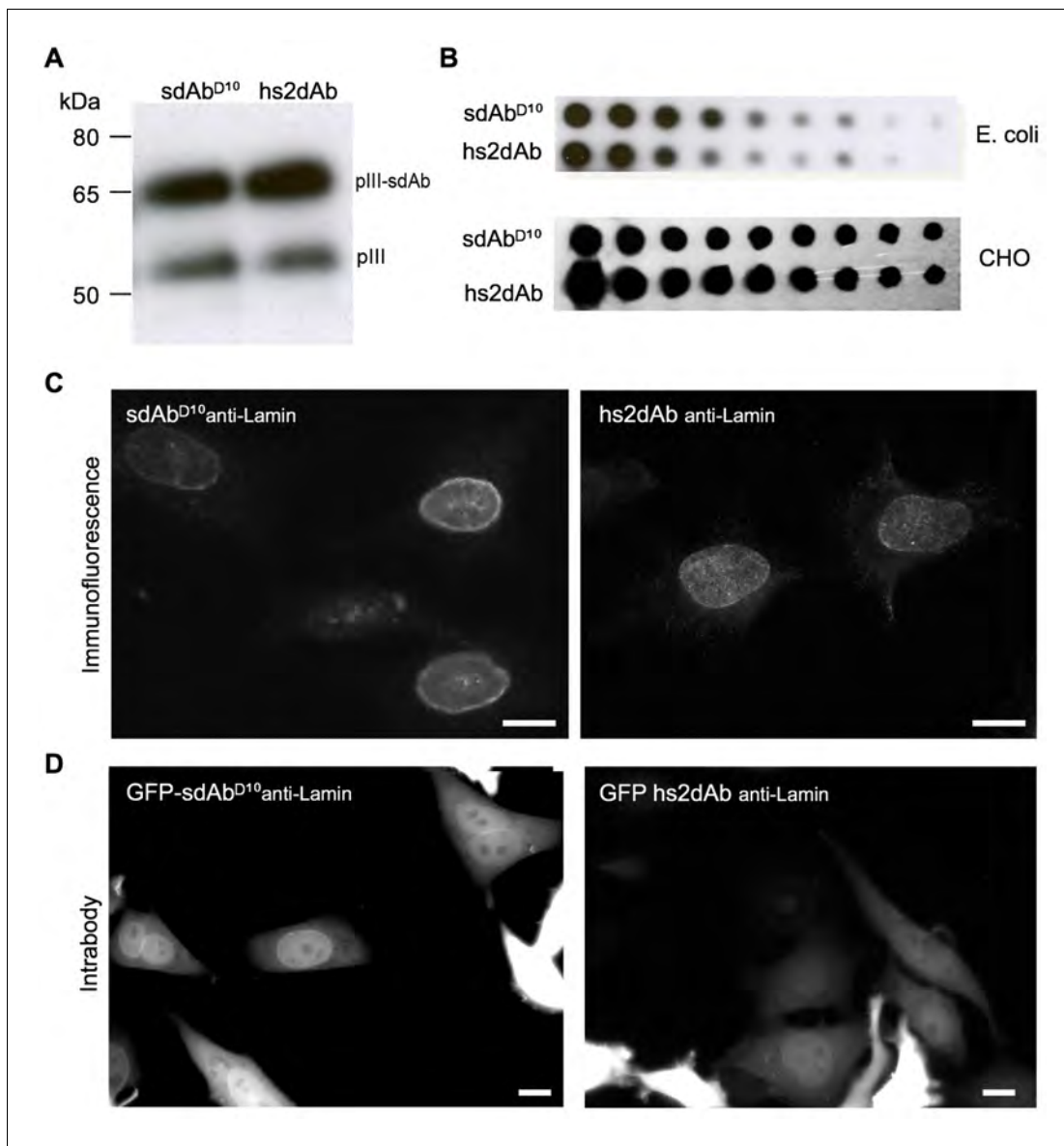
*Figure 1 continued*

carried out using Sanger sequencing of 315 randomly picked clones and large scale sequencing of 56 000 clones. No redundant clone was found. The NaLi-H1 was then screened in various conditions and diversity, efficacy, versatility and affinity evaluated.

DOI: [10.7554/eLife.16228.003](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.003)



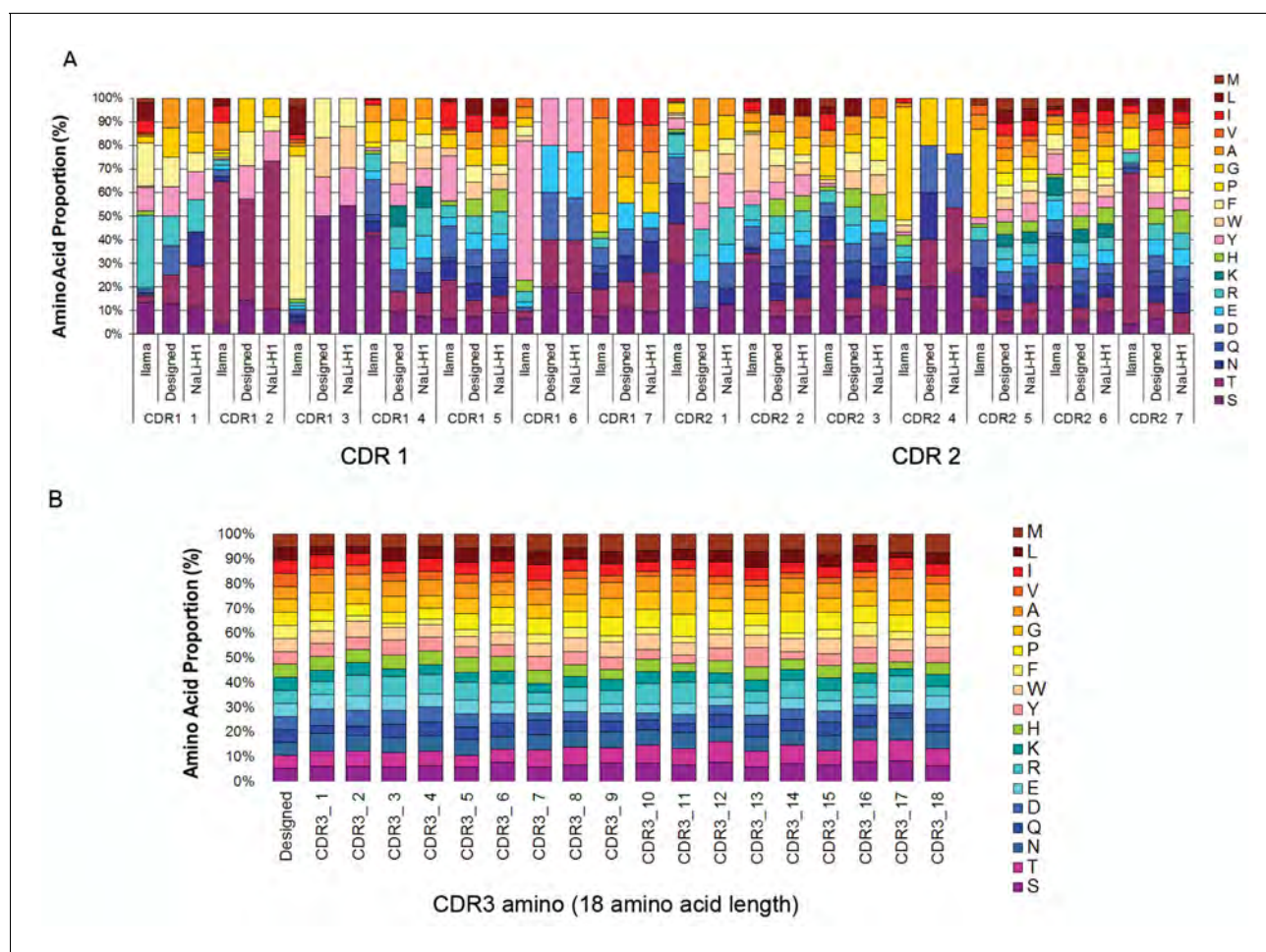
**Figure 1—figure supplement 1.** Robust scaffold identification. (A) Chloramphenicol acetyl transferase carboxy terminal fusion is a folding reporter allowing for the selection of soluble amino terminal VHH. Top: scheme of the construct expressed from pAO-VHH-CAT-HA vector. Bottom: Relative colony growth of selected VHH (GFP4 and Lam1 chromobodies, or thermostable Re3) on chloramphenicol selection medium (Cam). Serial dilution of *E. coli* culture expressing VHH. (B) Analysis of heat purified sdAb<sup>D10</sup> by SDS-PAGE. Clone D10 was expressed in *E. coli* and protein secreted in the periplasm were extracted (lane 1). Periplasmic extract was subjected to heat treatment at 70°C and insoluble proteins were pelleted by centrifugation (lane 2). The soluble supernatant containing the VHH was then concentrated using Amicon filters (lane 3). (C) HeLa cells expressing a GFP fusion of sdAb<sup>D10</sup> showing homo-dispersed fluorescence (right) compared to typical randomly chosen aggregating llama VHH considered as non intrabody (left). DOI: 10.7554/eLife.16228.004



**Figure 1—figure supplement 2.** CDR3 loop grafting and synthetic scaffold validation. (A) Phages presenting each scaffolds (sdAb<sup>D10</sup> and hs2dAb) bearing anti-lamin CDRs were produced in *E.coli* and supernatant were detected in Western Blot with an anti-pIII antibody (NEB). Two bands are visible, one for wild-type pIII and one for the pIII fusion with single domain antibodies. (B) Dot blot analysis of the production of both scaffolds either as single domain antibodies in *E. coli* supernatant or as fusions with a human Fc domain and secreted by CHO cells (Moutel et al., 2009). Serial dilutions of supernatant were revealed with an anti-His tag antibody or an anti-human Fc antibody. (C) Immunofluorescence of HeLa cells with recombinant antibody in both scaffolds labeling the nuclear rim structure characteristic of the nuclear lamina. (D) The anti-lamin based on the two scaffolds were transiently expressed in HeLa cells as GFP fusion. Living cells were imaged after 24 hr and showed that the hs2dAb recognized its intracellular target lamin. Bar = 10  $\mu$ m.

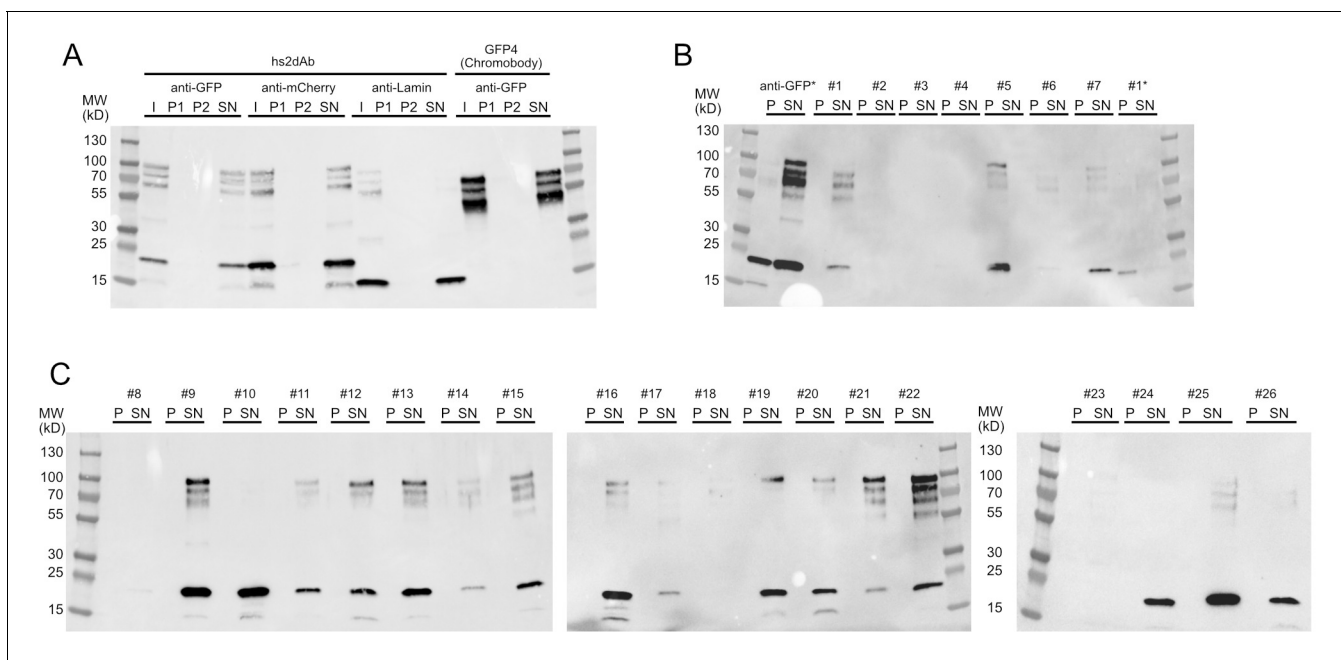
DOI: [10.7554/eLife.16228.005](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.005)





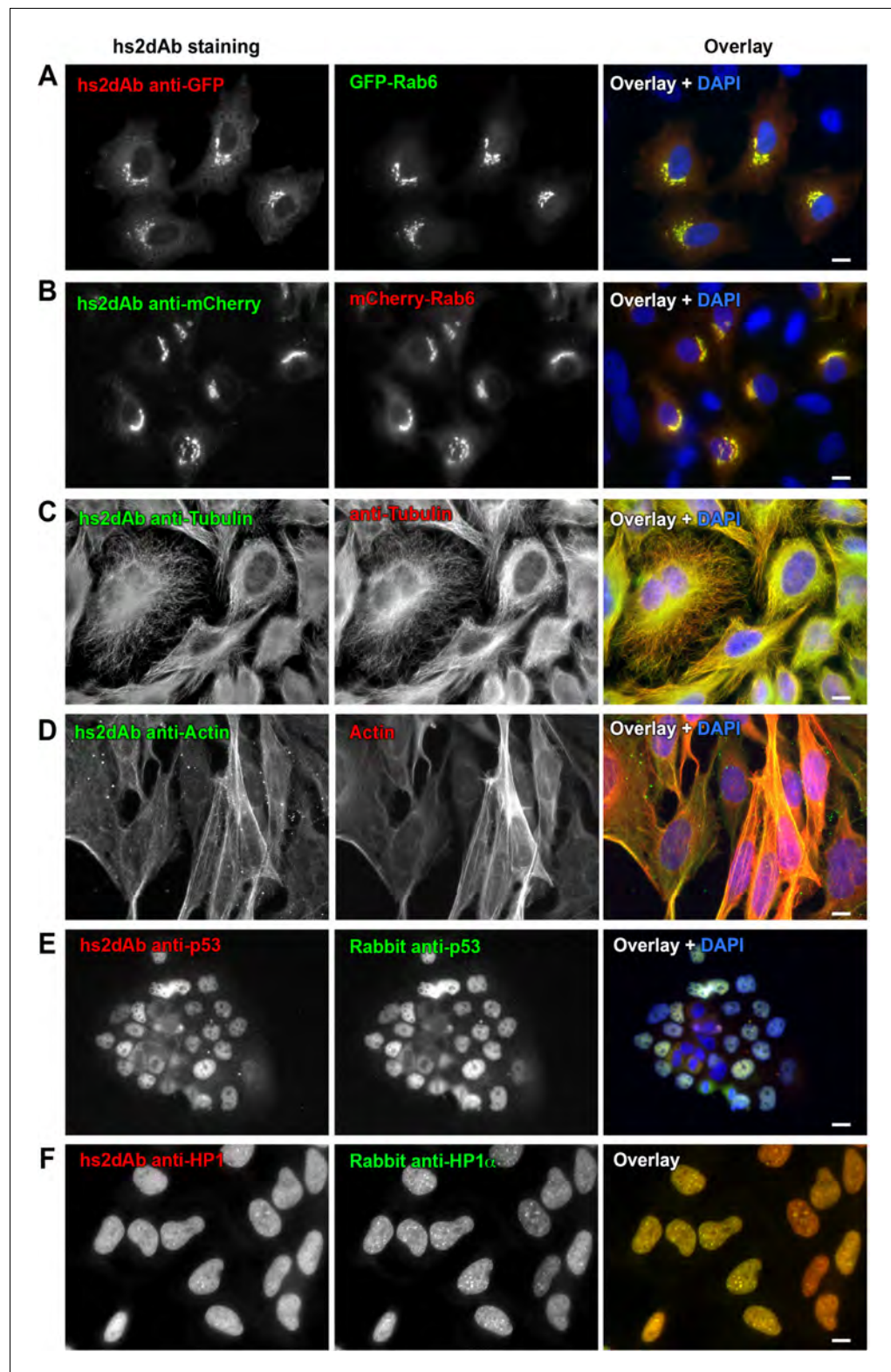
**Figure 1—figure supplement 3.** Nali-H1 library diversity. (A) Comparison between relative amino acid frequencies in CRD1 and CDR2 observed from 250 llama VHH isolated from a naive library (llama), the rationally designed (Designed) and the effective diversity in the synthetic library (Nali-H1) as computed after sequencing of 2500 clones using NGS. The position of each amino acid is indicated (CDR1 1; CDR1 2; etc). Amino Acid are indicated in single letter code. (B) Comparison between the designed diversity set for every amino acid position in the CDR3 region with the effective diversity observed after sequencing 2500 clones using NGS. Note that various CDR3 amino acid lengths are present in the library. They were almost evenly distributed with a little bias for shorter CDR3s (9 aa: 26%; 12 aa: 27.2%; 15 aa: 23.7%; 18 aa: 23.1%). For simplicity, we report in the figure the diversity observed for up to 18 aa. Note also that although cysteine occurs in natural llama CDRs, they were avoided by design and, accordingly, not found in Nali-H1 CDRs.

DOI: 10.7554/eLife.16228.006



**Figure 1—figure supplement 4.** Solubility of secreted hs2dAb antibodies. (A) Sequential centrifugation carried out using clones selected from the NaLi-H1 library (anti-GFP, anti-mCherry) or obtained after CDR grafting into the hs2dAb scaffold (anti-lamin). As a reference, the behaviour of a widely used natural anti-GFP antibody (GFP4 or Chromobody) was analysed. I: Input; P1: pellet after the 20 000 g centrifugation, P2: pellet obtained after the 250 000 g centrifugation, SN: supernatant of the 250 000 g centrifugation. Samples were analysed after western blotting using an anti-HIS antibody. Note that the apparent size of the lamin antibody and the Chromobody is lower because these antibodies are fused to only one myc tag (expressed from the parental pHEN2-His-Myc plasmid). (B), (C): a set of clones randomly chosen in the NaLi-H1 library was expressed in a multiwell format and analysed as in A. Only the pellet (P) and the supernatant (SN) of the 250 000 g centrifugation are shown. Two samples (an anti-GFP hs2dAb and a randomly picked clone #1) were heated at 90°C for 10 min before being analysed by sequential centrifugation (anti-GFP\* and #1\*). Note that in these conditions, a fraction of the hs2dAb is unfolded and found in the pellet. A significant resistance to temperature is however observed. Note that high molecular weight bands were systematically seen which may suggest that a fraction of the hs2dAb is in a multimeric form. The same behaviour was observed for the natural Chromobody.

DOI: [10.7554/eLife.16228.007](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.007)

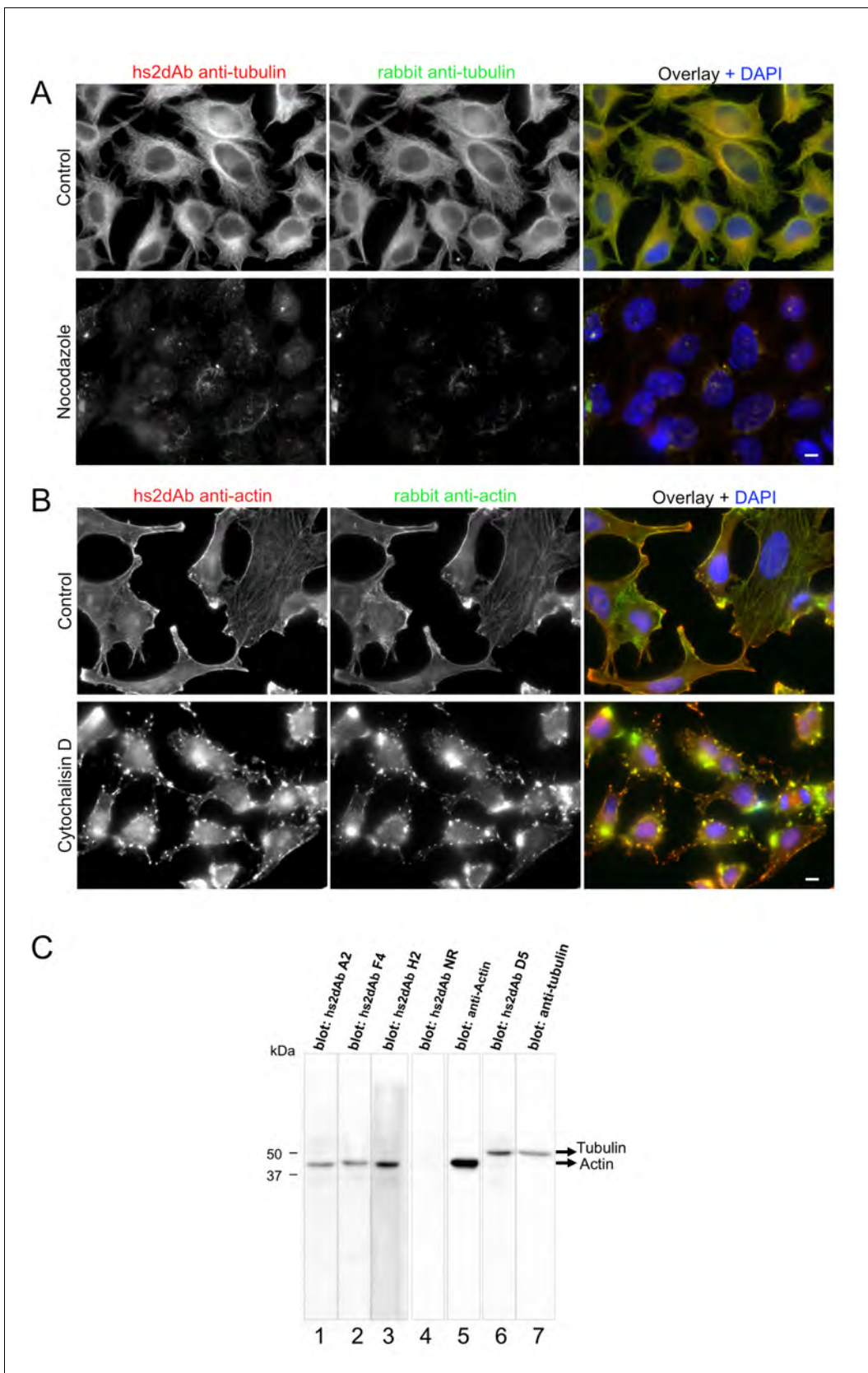


**Figure 2.** Selection of functional hs2dAb against various antigens. (A) HeLa cells were transfected with GFP-Rab6, fixed using paraformaldehyde, permeabilized using saponin and stained with non-purified myc-tagged hs2dAb (R3TF3) directed against EGFP and revealed with anti-Myc-Tag (9E10) and Cy3-labeled secondary antibodies. (B) HeLa cells transfected with mCherry-Rab6, fixed and permeabilized as in A and stained using a myc-tagged non-purified hs2dAb against mCherry (C11). The hs2dAb was then revealed using 9E10 and A488-labeled secondary antibodies. (C) HeLa cells transfected with anti-Tubulin, fixed and permeabilized as in A and stained using a myc-tagged non-purified hs2dAb against Tubulin (T11). The hs2dAb was then revealed using 9E10 and Cy3-labeled secondary antibodies. (D) HeLa cells transfected with Actin, fixed and permeabilized as in A and stained using a myc-tagged non-purified hs2dAb against Actin (A11). The hs2dAb was then revealed using 9E10 and Cy3-labeled secondary antibodies. (E) HeLa cells transfected with p53, fixed and permeabilized as in A and stained using a myc-tagged non-purified hs2dAb against p53 (P11). The hs2dAb was then revealed using 9E10 and Cy3-labeled secondary antibodies. (F) HeLa cells transfected with HP1, fixed and permeabilized as in A and stained using a myc-tagged non-purified hs2dAb against HP1 (H11). The hs2dAb was then revealed using 9E10 and Cy3-labeled secondary antibodies. *Figure 2 continued on next page*

*Figure 2 continued*

antibodies. (C) Cells were fixed in methanol and co-stained with a non-purified anti-tubulin hs2dAb (D5) fused to a human Fc domain and a mouse monoclonal anti-tubulin antibody (DM1A), and revealed using an anti-Human Fc-A488 and an anti-Mouse-Cy3 secondary antibody, respectively. (D) hs2dAb F4 anti-beta-actin was used to stain MRC5 cells fixed with paraformaldehyde and post fixed with methanol. The hs2dAb was then revealed using 9E10 and A488-labeled secondary antibodies. Cells were co-stained by red fluorescent phalloidin to detect actin stress fibers. (E) A431 cells were fixed with 3% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton and stained with the anti-p53 hs2dAb (B7) fused to a human Fc domain together with a rabbit polyclonal antibody directed against p53. Immuno-labeling was revealed using anti-Human Fc-Cy3 and anti-Rabbit-A488 secondary antibodies. (F) The hs2dAb antibody directed against HP1 $\alpha$  (A5) fused to a human Fc domain was used to stain HeLa cells fixed with paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% TritonX100. Cells were co-stained using a polyclonal rabbit antibody directed against HP1 $\alpha$  and immuno-labeling was revealed using anti-Human Fc-Cy3 and anti-Rabbit-A488 secondary antibodies. (scale bar = 10  $\mu$ m).

DOI: [10.7554/eLife.16228.008](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.008)



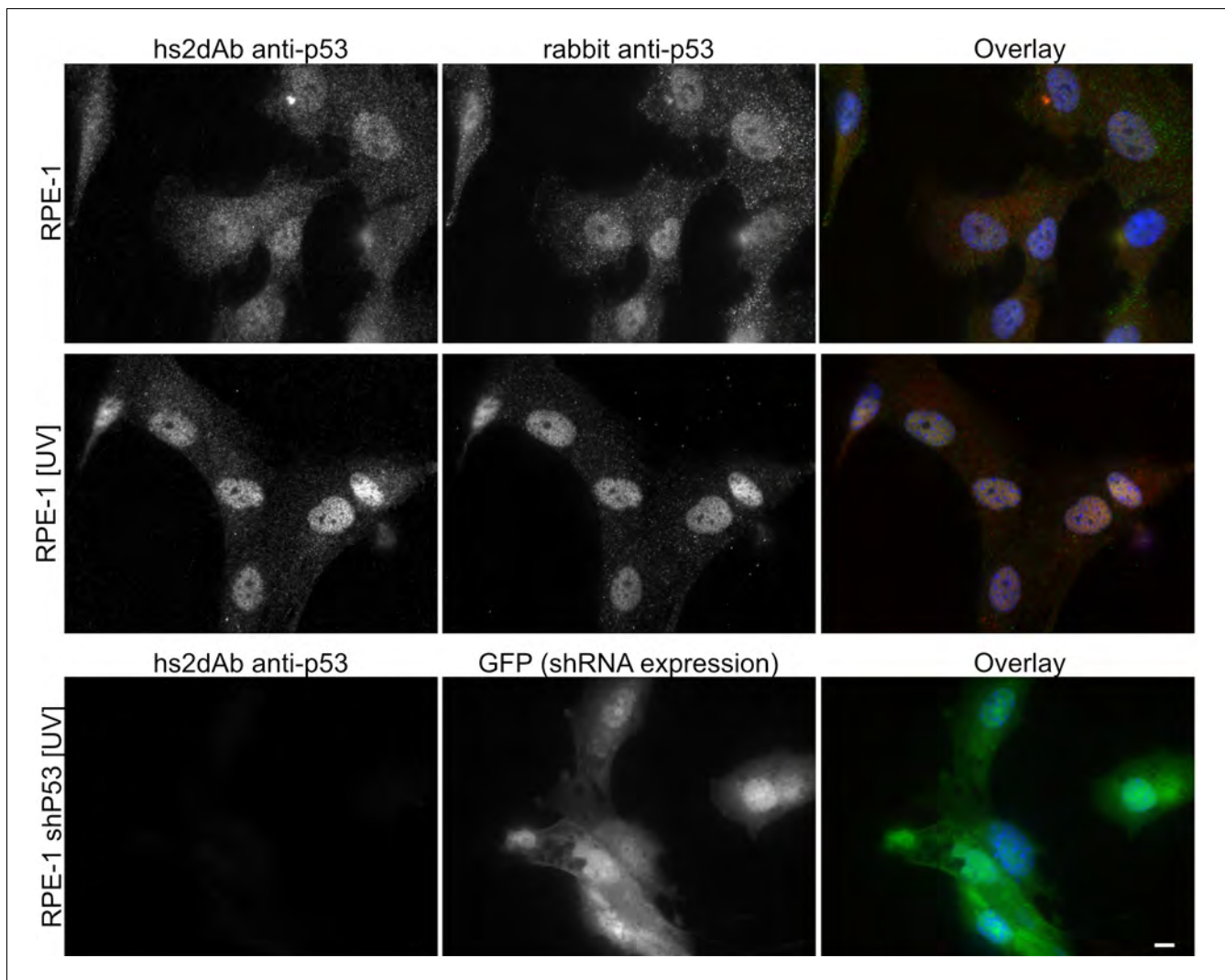
**Figure 2—figure supplement 1.** Specificity of hs2dAb directed against tubulin and actin. (A) HeLa cells were left untreated (top) or incubated with 10  $\mu$ M nocodazole for 90 min at 37°C (bottom). Cells were then permeabilized using 0.2% tritonX100, fixed using methanol (–20°C, 4 min) and

Figure 2—figure supplement 1 continued on next page

*Figure 2—figure supplement 1 continued*

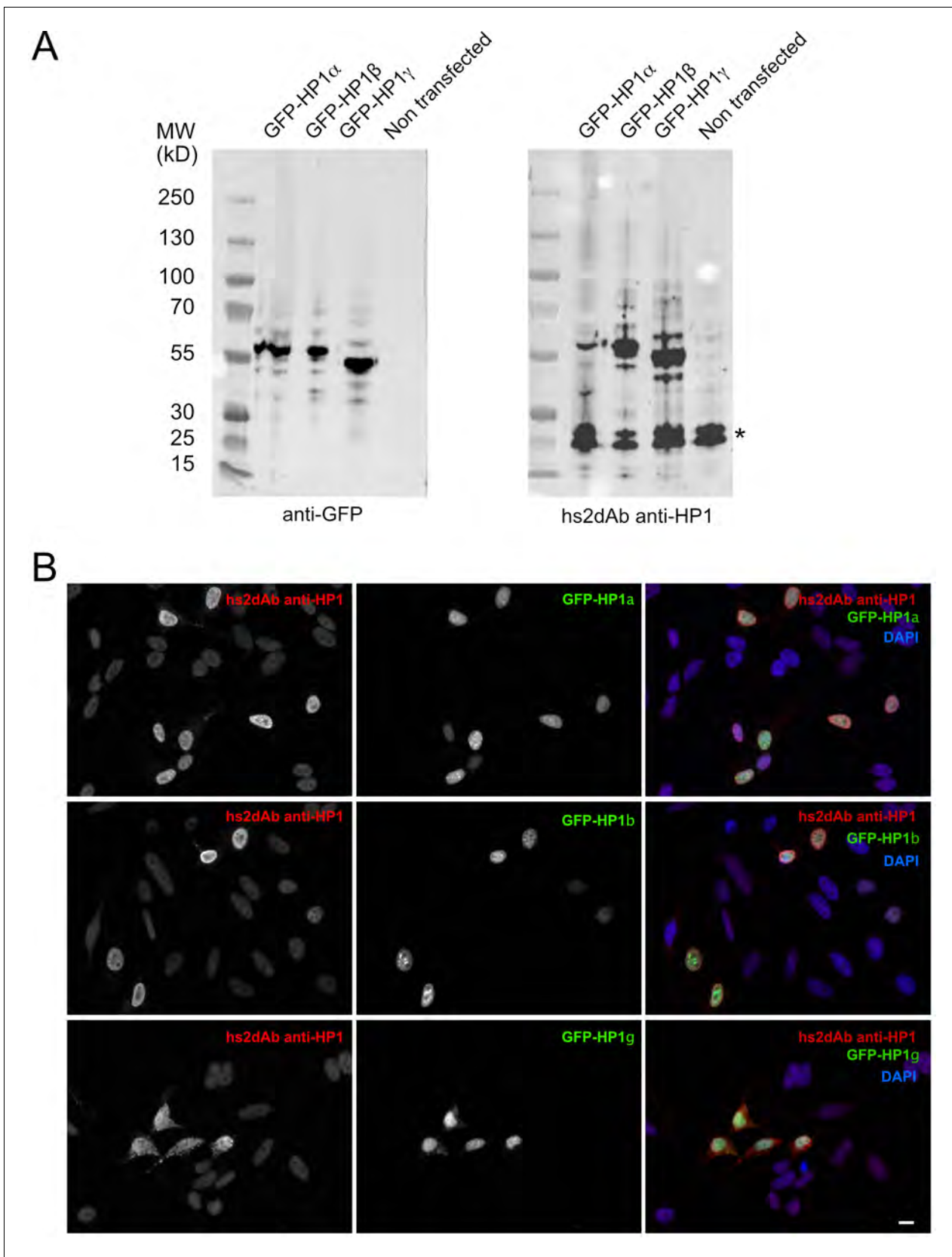
immunolabelled using an anti-tubulin hs2dAb (green) and a polyclonal anti-tubulin antibody (Red). Staining was essentially lost upon nocodazole treatment with only few nocodazole-stable microtubules being labelled. Bar = 10  $\mu\text{m}$  (B) HeLa cells were left untreated (top) or incubated with 5  $\mu\text{M}$  cytochalasin D for 60 min at 37°C (bottom). Cells were then fixed using paraformaldehyde, permeabilized with saponin and immunolabelled using the anti-actin hs2dAb H2 (green) and a polyclonal anti-actin antibody (Red). Staining was strongly reorganized upon cytochalasin D treatment. Bar = 10  $\mu\text{m}$  (C) SDS-PAGE of 40  $\mu\text{g}$  sample per well of WI38 whole cell extract was blotted and separated in stripes for each lane. Stripes were then incubated for immuno-detection with various hs2dAb (lane 1–3: anti-actin hs2dAb; lane 4: non relevant [NR] control; lane 6: anti-tubulin hs2dAb) directly used from *E. coli* culture supernatant and further revealed using myc-HRP antibodies. Control monoclonal anti-actin or anti-tubulin were used on stripes 5 and 7, respectively.

DOI: [10.7554/eLife.16228.009](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.009)



**Figure 2—figure supplement 2.** Specificity of the anti-p53 hs2dAb. (A) RPE-1 were left untreated or irradiated with UV light (100 J/m<sup>2</sup>). Cells were then fixed and stained using an anti-p53 hs2dAb together with an anti-p53 rabbit polyclonal antibody. Both the polyclonal and the hs2dAb antibodies detected the strong increase of p53 localization in the nuclei. (B) RPE-1 cells stably expressing an shRNA directed against p53 together with GFP were irradiated as in A and stained using the hs2dAb. No labeling was obtained in p53 KD cells. Bar = 10  $\mu$ m.

DOI: [10.7554/eLife.16228.010](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.010)



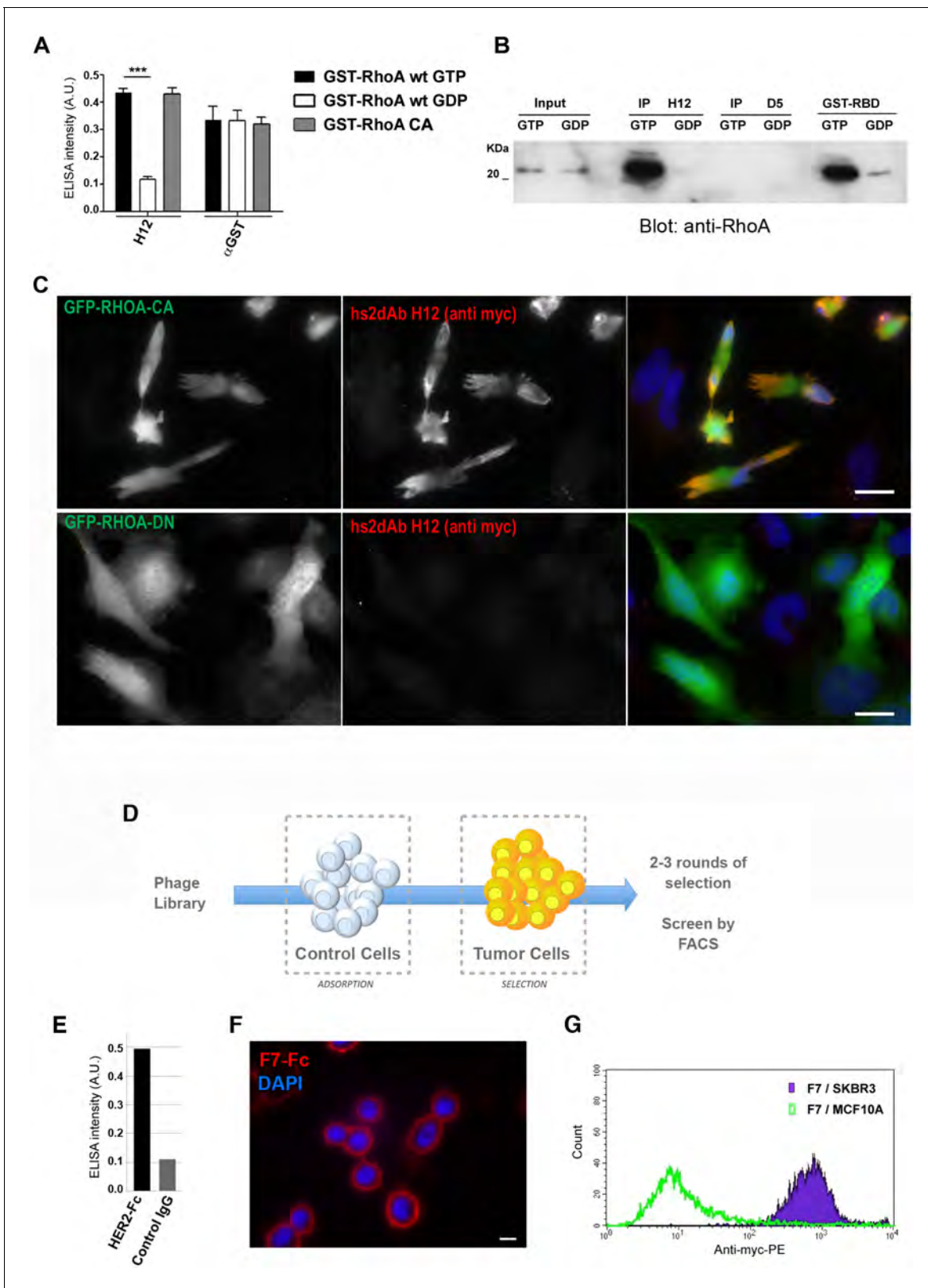
**Figure 2—figure supplement 3.** Specificity of the anti-HP1 hs2dAb. (B). (A) GFP tagged HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  and HP1 $\gamma$  were expressed in HeLa cells. Cells were then lysed and extract separated by SDS-PAGE, transferred on nitrocellulose filters. Immunodetection was carried out using an anti-GFP antibody  
 Figure 2—figure supplement 3 continued on next page



Figure 2—figure supplement 3 continued

(left) or an anti-HP1 hs2dAb. Although the selection was carried out against was HP1 $\alpha$ , the hs2dAb efficiently detected GFP tagged HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  and HP1 $\gamma$ . The band indicated by a star likely represent the endogenous HP1 proteins. (B) Cells were transfected as in (A), fixed and analyzed by immunofluorescence using the anti-HP1 hs2dAb. Nuclei were stained using DAPI. GFP tagged HP1 $\alpha$ , HP1b and HP1 $\gamma$  were all efficiently detected by the recombinant antibody. Bar = 10  $\mu$ m.

DOI: [10.7554/eLife.16228.011](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.011)

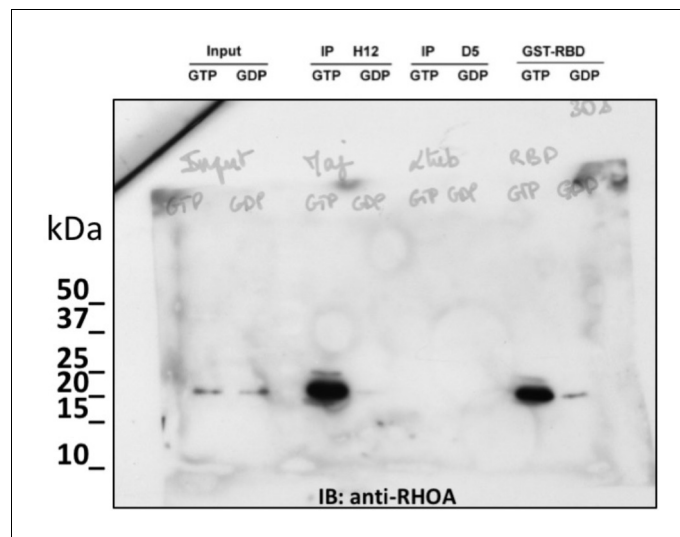


**Figure 3.** Subtractive selection led to conformational or cell type specific hs2dAbs. (A–C) H12 is a conformational hs2dAb binding only to the GTP bound, activated state, of the RHOA GTPase: (A) ELISA using the H12 or anti-GST antibodies to reveal recombinant GST-RHOA wild type proteins loaded with either 100  $\mu$ M GTP gamma S (Black) or 1 mM GDP (White), or constitutively active mutant proteins GST-RHOA Q63L (Grey). Means  $\pm$  SEM. *Figure 3 continued on next page*

*Figure 3 continued*

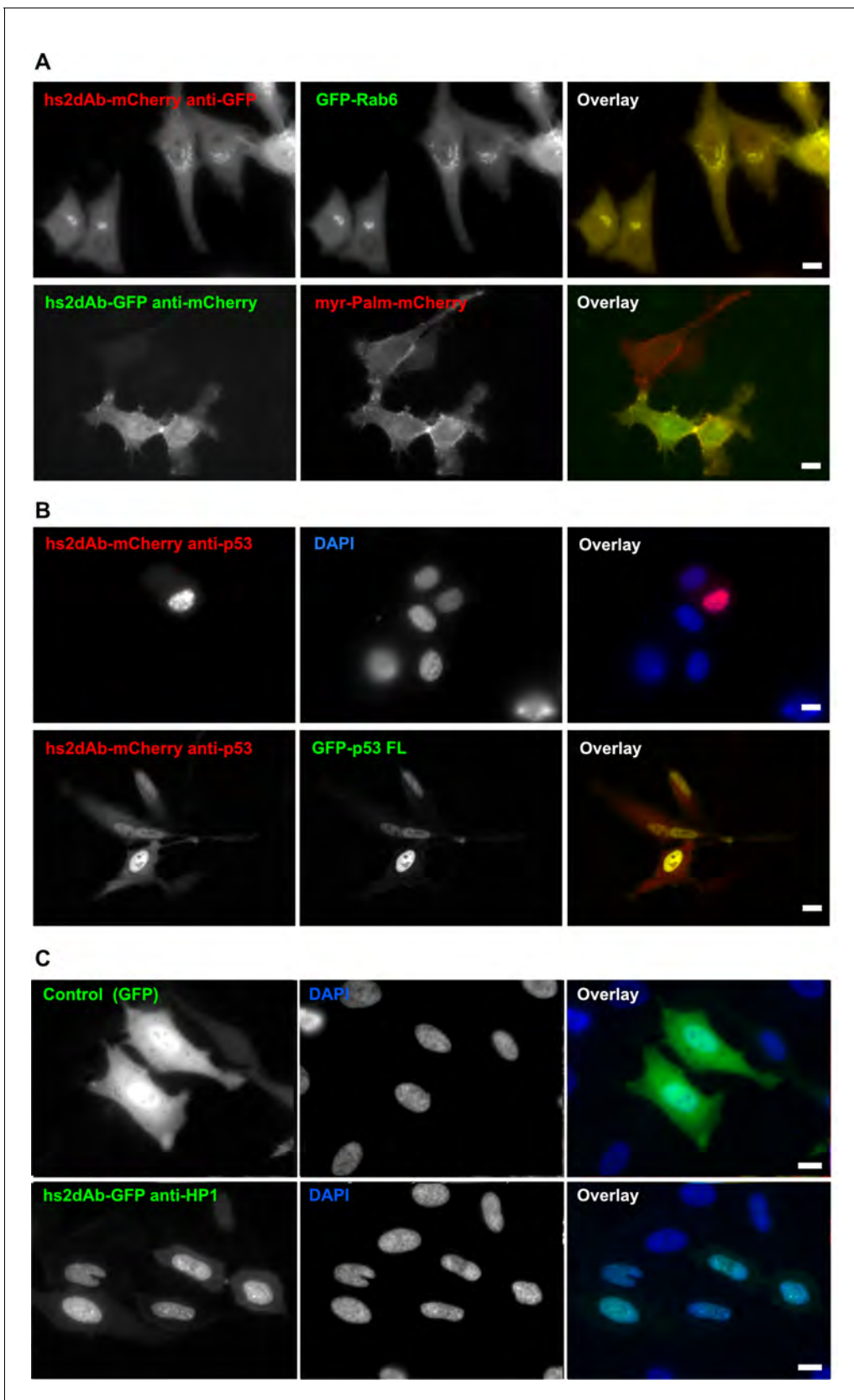
(B) A CBD tagged H12 pull down from HeLa cell extract loaded with 100  $\mu$ M GTP gamma S (GTP) or with 1 mM GDP as inputs. Western blot reveals RHOA at a similar level in 5% of both input but only on the GTP loaded extract in the CBD-H12 pull down. D5 anti tubulin was used as a negative control and the standard GST-RBD (RHO binding domain of Rhotekin) as a positive control of active RHO pull down. (C) Immunofluorescence on HeLa cells overexpressing GFP-RHOA CA (constitutively active) mutant or GFP-RHOA DN dominant negative mutant. H12 staining detected using a myc tag antibody revealed only cells overexpressing the constitutively active mutant with a pattern stronger at the cell periphery where RHOA activation is high. (D) Tumor cell surface subtractive selection scheme. (E) ELISA of hs2dAb F7 anti-HER2 on HER2 fused with a rabbit Fc versus binding on rabbit Fc at equimolar concentration. (F) hs2dAb F7 anti-HER2 decorated the SKBR3 membrane in immunofluorescence. SKBR3 cells were fixed with 3% paraformaldehyde and stained with F7 revealed by an anti-HisTag (Sigma) and an anti-MouseCy3 secondary antibody (Jackson). (G) FACS analysis of F7 anti-HER2 on SKBR3 HER2 positive cells versus MCF10A HER2 negative cells. (Scale bar = 10  $\mu$ m).

DOI: [10.7554/eLife.16228.012](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.012)



**Figure 3—figure supplement 1.** non cropped western blot corresponding to **Figure 3B** detection RHOA.

DOI: [10.7554/eLife.16228.013](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.013)

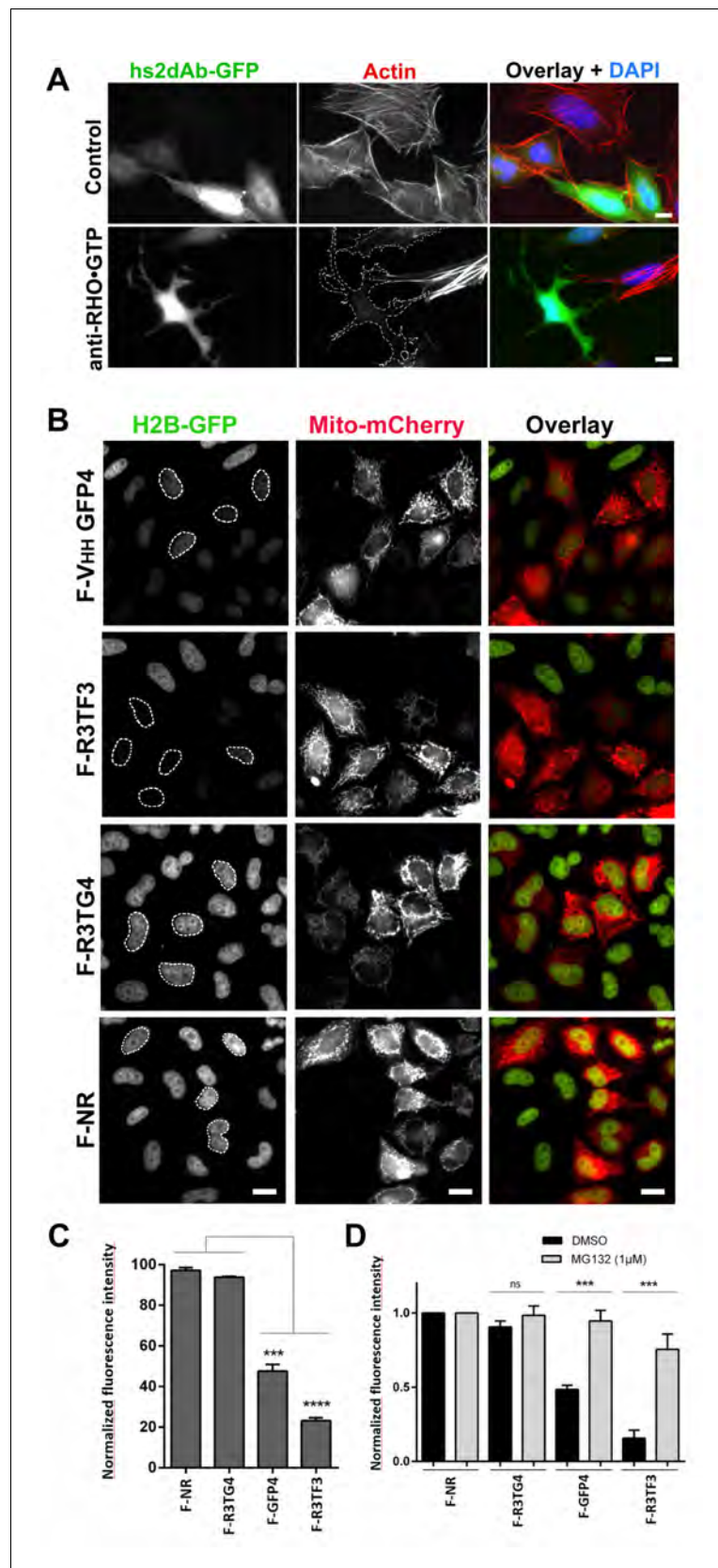


**Figure 4.** Fluorescent intrabodies tracking endogenous proteins. Intracellular expression of hs2dAb. (A) (top panel) HeLa cells were co-transfected with GFP-Rab6 and a hs2dAb-mCherry anti-EGFP plasmids. The hs2dAb mCherry anti-EGFP colocalized perfectly with the Rab6 Golgi staining. (bottom panel) HeLa cells were co-transfected with myr-Palm-mCherry and a hs2dAb-GFP anti-mCherry plasmid. The hs2dAb GFP anti-mCherry colocalized perfectly with the myr-Palm-mCherry Golgi staining. (B) (top panel) HeLa cells were transfected with hs2dAb-mCherry anti-p53 and DAPI. The hs2dAb mCherry anti-p53 colocalized perfectly with the p53 staining. (bottom panel) HeLa cells were transfected with hs2dAb-mCherry anti-p53 and GFP-p53 FL. The hs2dAb mCherry anti-p53 colocalized perfectly with the p53 staining. (C) (top panel) HeLa cells were transfected with Control (GFP) and DAPI. The Control GFP colocalized perfectly with the DAPI staining. (bottom panel) HeLa cells were transfected with hs2dAb-GFP anti-HP1 and DAPI. The hs2dAb GFP anti-HP1 colocalized perfectly with the DAPI staining. *Figure 4 continued on next page*

*Figure 4 continued*

panel) HeLa cells were co-transfected with Myr-palm-mCherry and a VHH-EGFP anti-mCherry plasmids. The VHH-EGFP anti-mCherry interacted with its target *in vivo* and colocalized perfectly with the mCherry staining at the plasma membrane. (B) SKBR3 cells were transfected with an anti-p53 hs2dAb-mCherry alone (top panel), or together with full length p53-EGFP which concentrated the hs2dAb into the nucleus (bottom panel). (C) GFP, used as a control (top panel) or a GFP-tagged anti-HP1 hs2dAb (bottom panel) were transiently expressed in HeLa cells (green). In contrast to the GFP control, the GFP-tagged anti-HP1 strongly accumulated in the nucleus where it labeled nuclear condensations. (Scale bar = 10  $\mu$ m)

DOI: [10.7554/eLife.16228.014](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.014)



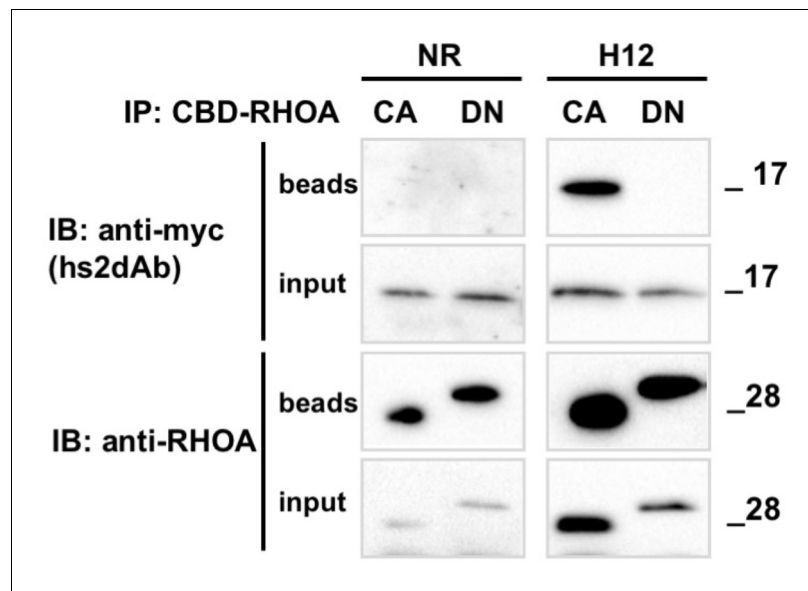
**Figure 5.** Targeting cellular proteins using inhibitory antibodies or by functionalizing antibodies to induce protein knockdown. (A) HeLa cells expressing transiently a EGFP-tagged non relevant hs2dAB (top panel) or EGFP-H12  
*Figure 5 continued on next page*

*Figure 5 continued*

anti RHO-GTP (bottom panel) were fixed 20 hr post transfection and stained using DAPI and Alexa 594 phalloidin to detect actin stress fibers. The H12 hs2dAb induced actin stress fibers disappearance and major cell shape change (see cells outlined with a dotted line) **(B)** Protein knockdown of H2B-EGFP mediated by functionalized inhibitory antibodies. HeLa S3 cell stably expressing histone H2B-EGFP were transfected with vectors expressing antibodies fused to an F-box (F-Ib) to induce degradation of the targeted cellular antigen. The F-GFP4 VHH (DegradFP) was used as a positive control (top panel) and a non-relevant hs2dAb as a negative control (bottom panel). F-Ib were expressed using a bi-cistronic vector driving the co-expression of mitochondrial targeted mCherry. Protein interference is analyzed in cells displaying mCherry positive mitochondria (mitoCherry channel). Efficient protein knockdown is obtained using the R3TF3 anti-EGFP intrabody. Note that not all nanobodies can be used as F-Ib because R3TG4 does not induce protein degradation. (Scale bars = 20  $\mu$ m) **(C)** Fluorescence decay measurement of the protein interference assay was quantified by flow cytometry (10000 cells analyzed, from 3 independent replicates). GFP fluorescence intensity was quantified in the transfected and the untransfected subpopulations for each F-Ib. The ratio of each median of fluorescence (transfected versus untransfected population) was calculated as a percentage of GFP fluorescence intensity for one F-Ib. A strong decrease in fluorescence corresponding to protein knockdown was observed with F-GFP4 VHH and F-R3TF3 hs2dAb intrabodies while the non-relevant negative control and R3TG4 did not induce a decrease of fluorescence. **(D)** Cells were analyzed as in C but the cells were incubated in 1  $\mu$ M MG132 or DMSO for 44 hr after transfection by the different F-Ib and fluorescence intensity was normalized using the non-relevant control. Protein knockdown was inhibited by MG132.

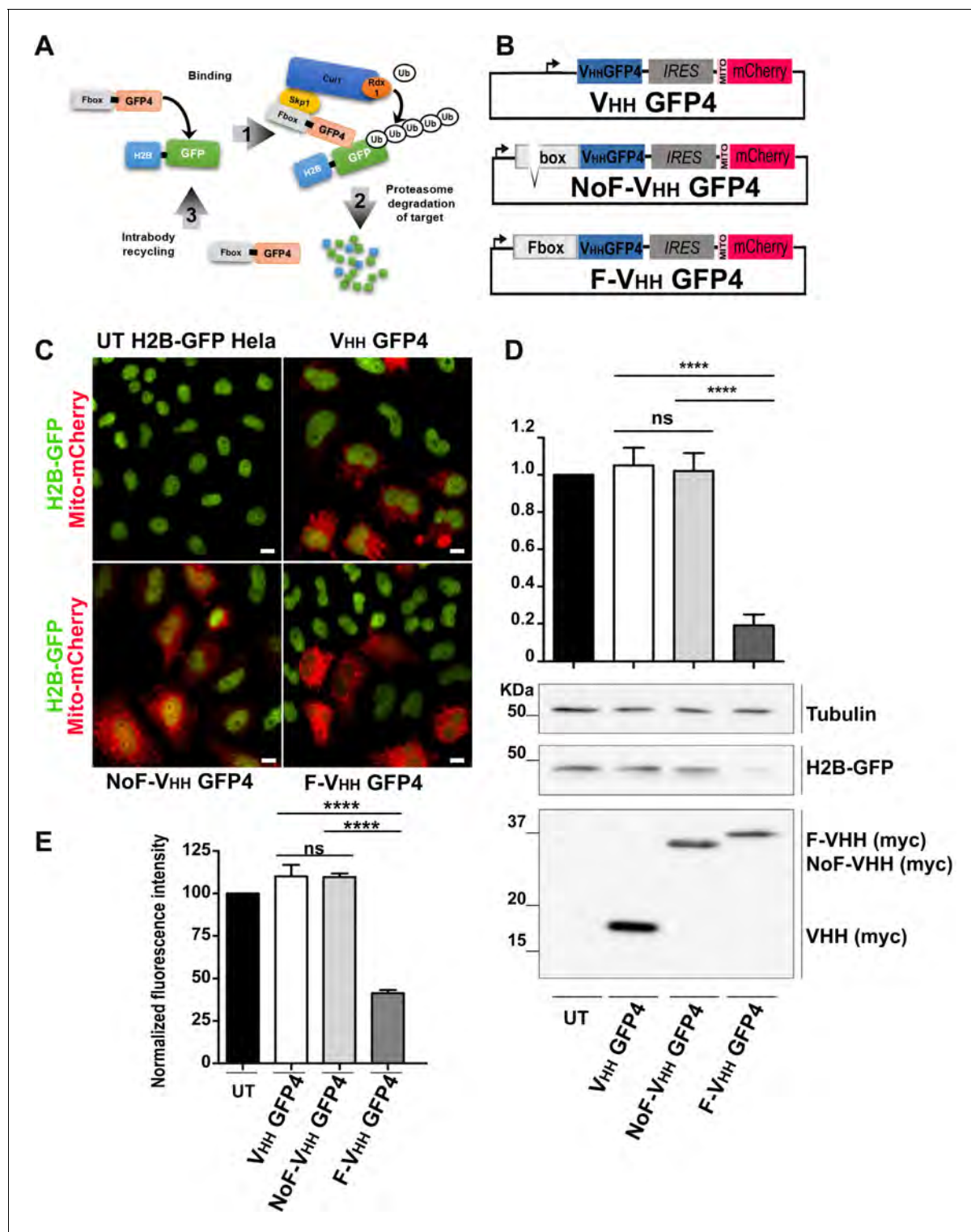
DOI: [10.7554/eLife.16228.016](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.016)





**Figure 5—figure supplement 1.** Conformational selectivity of the H12 intrabody towards RHOA.GTP. HeLa cells were co-transfected for 24 hr with the anti RHO hs2dAb H12 fused to carboxy-terminal myc tag (H12-myc) or a non relevant control (NR-myc) that was a negative clone in a panning against FITC together with chitin binding domain (CBD) fusion of either the dominant negative mutant RHOA-N19 (DN) or the constitutively active mutant RHOA-L63 locked in the GTP bound state (CA). Chitin beads pull down of CBD-RHOA-DN or CBD-RHOA-CA revealed the selective co-precipitation of H12-myc together with the RHO active mutant. The total level of CBD-RHOA or hs2dAb-myc proteins was revealed by loading 5% of the respective input. CBD-RHOA proteins were detected with anti CBD tag and the hs2dAb antibodies with an anti-myc tag antibody.

DOI: [10.7554/eLife.16228.017](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.017)

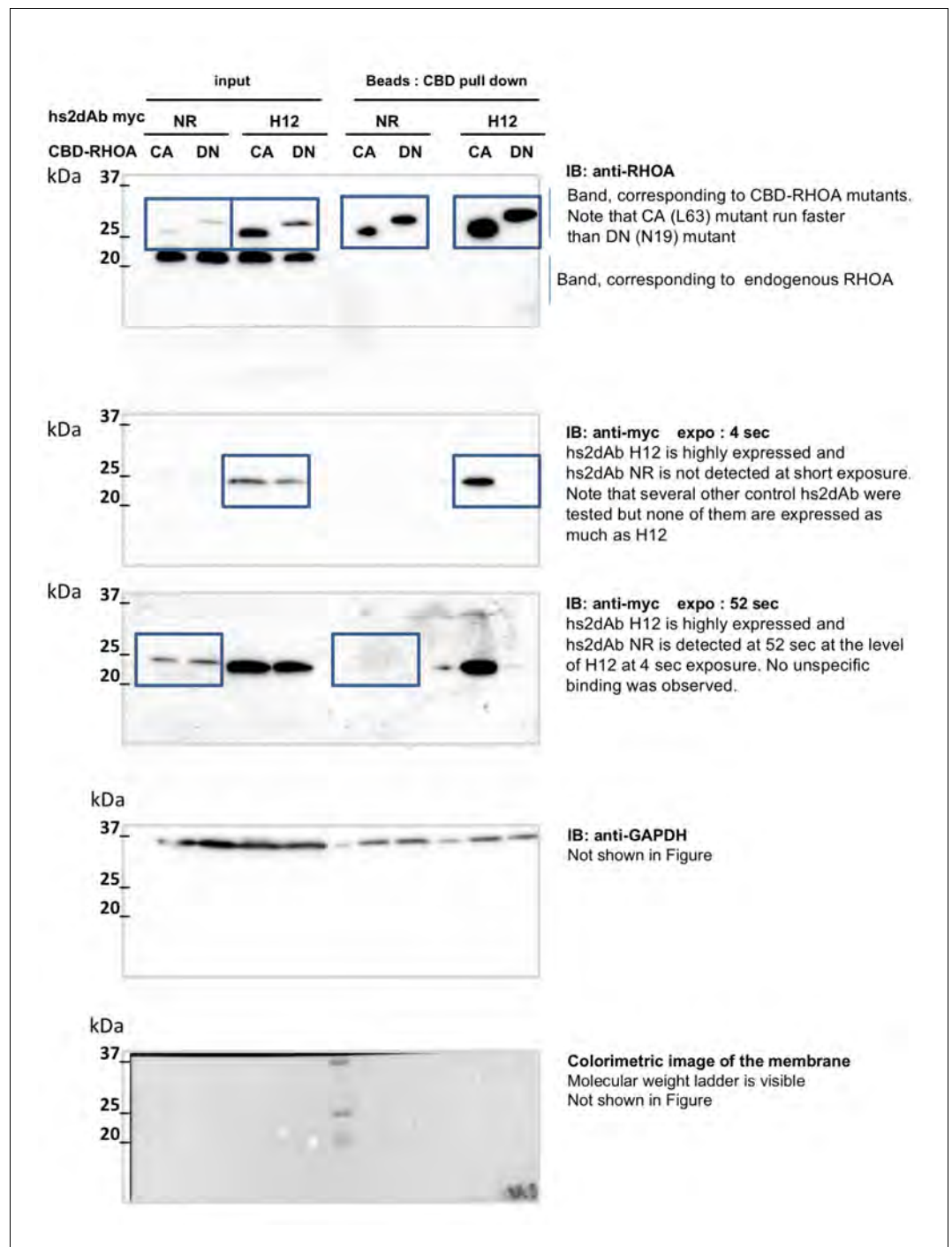


**Figure 5—figure supplement 2.** Protein knockdown set up using F-Ib degradation with anti-GFP intrabodies. (A) Model for F-Ib degradation by fusing Fbox domain to the V<sub>HH</sub> GFP4 inducing GFP target protein ubiquitiation followed by proteasome-dependent degradation of the target protein. (B) Schematic illustration of the bicistronic vectors: an Fbox or NoFbox domain, respectively, is fused to the N terminal part of hs2dAb and a transfection marker MTS-mCherry, labeling mitochondria in red, is co-expressed using an Internal Ribosome Entry Site (IRES). (C) Fluorescence visualization HeLa S3 cells stably expressing H2B-GFP and transfected with NoF-V<sub>HH</sub> GFP4 or F-V<sub>HH</sub> GFP4. Degradation by the degradFP was observed in cells expressing F-V<sub>HH</sub> GFP4. Scale bar = 10  $\mu$ m (D) Western blot quantification of protein knockdown mediated by F-GFP4. (E) Quantification of GFP fluorescence by flow cytometry in MTS Cherry positive cells.

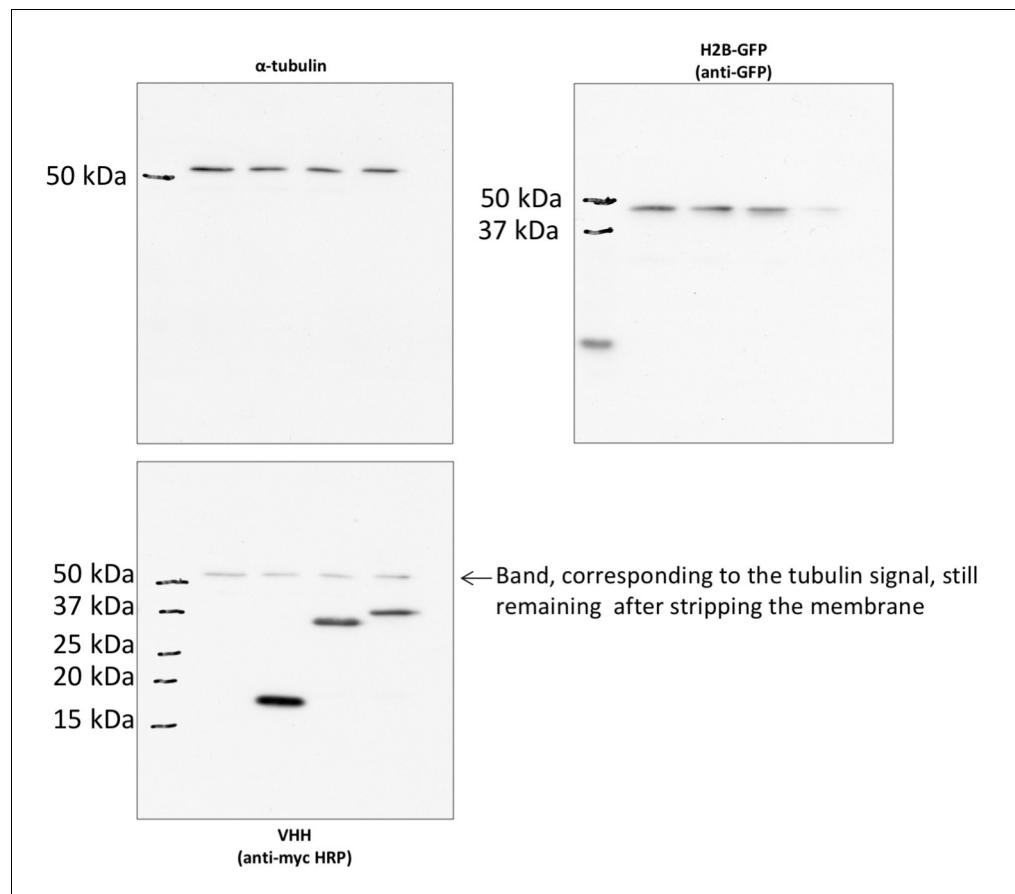
Figure 5—figure supplement 2 continued on next page

Figure 5—figure supplement 2 continued

DOI: [10.7554/eLife.16228.018](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.018)

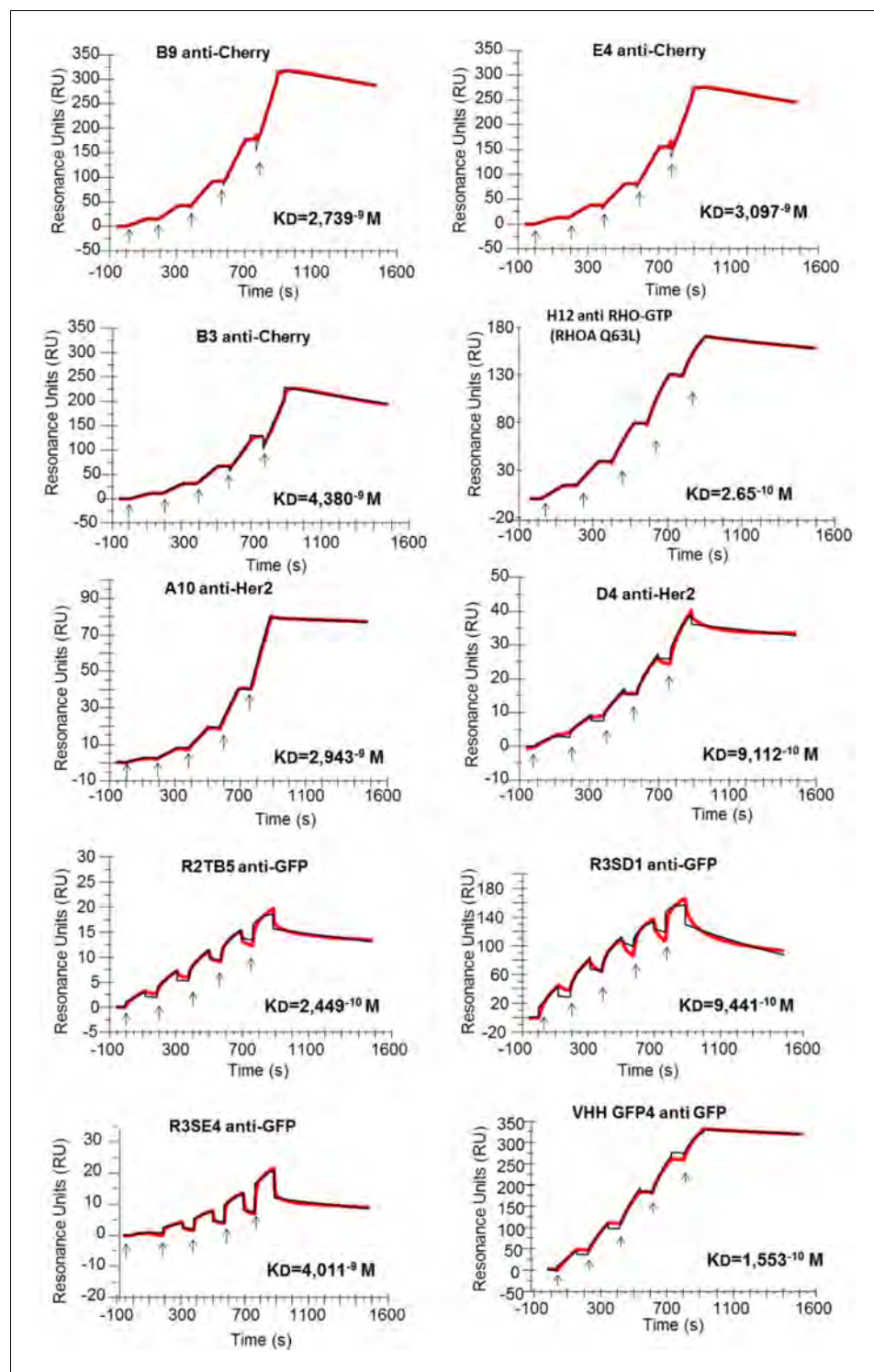


**Figure 5—figure supplement 3.** non cropped western blot corresponding to **Figure 5—figure supplement 1** detection of RHOA, Myc tagged hs2dAb intrabodies, and GAPDH which is not in the main figure.  
 DOI: 10.7554/eLife.16228.019



**Figure 5—figure supplement 4.** non cropped western blot corresponding to *Figure 5—figure supplement 1D* detection of tubulin, GFP and myc tag.

DOI: [10.7554/eLife.16228.020](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.020)



**Figure 6.** Affinity determination. Single cycle kinetics analysis was simultaneously performed on immobilized His fusion VHH antibodies (250–300 RU), with five injections of analytes (EGFP, HER2, RHOAQ63L and mCherry) at 3.125 nM, 6.25 nM, 12.5 nM, 25 nM, and 50 nM. Analytes injections lasted for 120 s each and were separated by 10 s dissociation phases. At this time of buffer exchange, a slight refraction index discrepancy between the sample and the flow buffer can induce a drop in resonance unit. This common bulk effect, which is clearly visible on sensorgrams with a smaller scale range on the RU axis (ie: R3SE4, R2TB5), does not affect the measurement of off-rate constant. Off-rate constant was calculated from an extended dissociation period of 10 min following the last injection according to the single cycle kinetics method. Each sensorgram (expressed in RUs as a function of time in Figure 6 continued on next page

*Figure 6 continued*

seconds) represents a differential response where the response on an empty reference channel (Fc1) was subtracted. The red curves correspond to the data and the black curves represent the fit done by the BIAevaluation software. Note that the fitted curve is almost identical to the data curve in some cases like for example the RHOA Q63L or the HER2 binding measurement.

[DOI: 10.7554/eLife.16228.022](https://doi.org/10.7554/eLife.16228.022)





ARTICLE 2 :

**Intrabody-mediated selective protein interference against activated form of RHOB reveals the role of RHOB-GTP in lung cancer invasion.**

Nicolas Bery, Laura Keller, Marjorie Soulié, Anne-Laure Iscache, Rémi Gence, Julia Cherier, Stéphanie Cabantous, Isabelle Lajoie-Mazenc, Jean-Denis Pedelacq, Gilles Favre, Aurélien Olichon



## **Intrabody-mediated selective protein interference against activated form of RHOB reveals the role of RHOB-GTP in lung cancer invasion.**

Nicolas Bery<sup>1,2</sup>, Laura Keller<sup>1,2,3</sup>; Marjorie Soulié<sup>1</sup>, Anne-Laure Iscache<sup>1,3</sup>, Rémi Gence<sup>1,2</sup>, Julia Cherier<sup>1,3</sup>, Stéphanie Cabantous<sup>1</sup>, Isabelle Lajoie-Mazenc<sup>1,2</sup>, Jean-Denis Pedelacq<sup>4</sup>, Gilles Favre<sup>1,2,3,5</sup>, Aurélien Olichon<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>Inserm, UMR 1037-CRCT, Toulouse, France

<sup>2</sup>Université Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse, France

<sup>3</sup>Département de Biologie, Institut Claudius Regaud, Toulouse, France

<sup>4</sup>Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, CNRS, UPS, France;

<sup>5</sup>To whom correspondence may be addressed. E-mail: [aurelien.olichon@inserm.fr](mailto:aurelien.olichon@inserm.fr) and [gilles.favre@inserm.fr](mailto:gilles.favre@inserm.fr)

### ***Footnote:***

Running title: Intrabody mediated RHOB-GTP degradation

### Competing interests

¶ N.B., L.K., G.F. and A.O. are co-inventors on the patent PTC/EP2016/052136, concerning the RHO GTP single domain antibodies discovery and their applications. The other authors declare no conflict of interest.

### Author contributions

N.B., G.F. and A.O. were responsible for conception and design of the experiments and data analysis and for drafting the article. N.B. for experiments and data analysis. L.K., A.L.I., S.C., R.G., J.C, for contributions to experiments. M.S., I.L.M., S.C., J.D.P. produced and solved the crystal structure of RHO/antibody complex. N.B, L.K., I.L.M, S.C., J. D. P., G.F. and A.O. for editing the article prior to submission. G.F.: Financial support.

***Abstract (250 words)***

Small GTPases RHO A/B/C of the RHO subgroup regulate major cellular functions such as proliferation, migration or invasion. At steady state more than 95% of the cellular RHO proteins are present in the inactive GDP-bound state. Upon stimuli, Guanine nucleotide Exchange Factors activate a fraction of RHOs, resulting in a conformational change in the GTP-bound state. Because only a minor fraction of RHOs is in the active form, their study by genetic approaches, such as overexpression or RNA interference often results in complex phenotypes due to imbalanced regulatory crosstalk between multiple RHOs. Here, we developed a novel way to selectively target and inactivate the RHO-GTP fraction using protein interference. We first established a cellular screening of single domain intrabodies functionalized with a F-box domain in order to induce proteasome-dependent target degradation. This strategy permitted the selection of several conformational intrabodies degrading the RHOB L63 constitutively active mutant. Among them, one F-box-Intrabody showed selective inhibition of endogenous RHOB-GTP with interactions between CDR3 loop and the GTP binding pocket of RHOB, as revealed by the crystal structure of the complex at 1.5 Å resolution. This new tool allowed efficient protein interference of the basal RHOB-GTP fraction as well as the fast process of RHOB activation mediated by EGF. Moreover, this genetically encoded inhibitor reveals that the minor GTP-bound fraction of RHOB but not its global expression account for the regulation of motile and invasive phenotypes acquisition of normal human bronchial cells.

***Significance Statement (120 words)***

Small GTPases RHO A/B/C are key regulators of major cellular functions. Because manipulation of the global expression level of a single RHO modifies multiple RHOs homeostasis, their functional studies are impaired by the lack of tools targeting selectively a single RHO in its active GTP conformation. A novel cell based screening approach allowed us to develop a genetically encoded inhibitor selective towards RHOB active form. We raised the dual challenge of producing an intracellular single domain antibody highly selective and specific to the GTP active RHOB conformation. This study is the first demonstration of functional inhibition of active RHOB and provides a novel way to decipher the cellular functions of small GTPases.

*body*

## **INTRODUCTION**

RAS related GTPases RHO regulate critical cellular processes including cell polarity, adhesion, cytokinesis, cell migration, cell stress response as well as the balance between cell death and survival (1–3). RHO GTPases are predominantly maintained in a GDP-bound cytosolic form by Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors (RHO GDI), and switch on to an activated GTP-bound form upon various upstream stimuli. Thus, RHO signaling downstream pathways are triggered by a tight control of the amount of GTP loaded form, which is activated by Guanine nucleotide Exchange Factors (GEF) and inactivated by GTPase Activating Proteins (GAP) (4). RHO functions have been assigned by siRNA-induced protein down regulation, gene invalidation in KO mouse models (5,6) and more recently by CrispR/Cas9 (7), or by cellular expression of dominant positive or negative mutants (5,8). However, these strategies have two major drawbacks. First, they affect both GDP and GTP loaded RHO without clarifying the roles of each cellular pool. Second, they imbalance RHO/regulators crosstalk, thus displacing the RHO cycle equilibrium of closely related RHO as well (9,10). Moreover, the inhibition of RHO activity at the protein level is usually monitored by treatment using a cell permeable form of the bacterial toxin C3 exoenzyme, which is not selective among the RHO subgroup including RHOA, RHOB and RHOC. The C3 ADP ribosylates the GDP bound RHOs in their effector binding domain, thus leading to the inactivation of the GTPases within a few hours by preventing activation by GEF (11). Similarly, while small molecule inhibitors of RHO/GEF interaction have been developed (12), the GTP active conformation of RHO is still undruggable in a selective manner. The RHO cycle dogma supports the idea that small GTPases of the RHOA subgroup functions are exerted through their GTP conformation. However there is a clear lack of selective tools to formally study direct activities of this fraction which is assumed to represent a minority of RHO cellular proteins according to the standard RBD assay (4,13).

RHOB is a peculiar RHO GTPase, as illustrated by its pleiotropic functions and localizations (14). RHOB is tightly regulated to switch on a wide range of cellular functions in a cell type and cellular context-dependent manner (7,15–18). RNAi down regulation of RHOB expression level correlates with loss of trafficking of recycling receptors (15,19), loss of prostate cancer PC3 cells adhesion (20), or with increase of human bronchial BEAS2B cells migration and invasion (16,21). Moreover RHOB is an immediate early response gene that controls cell survival after cytokines or growth factors stimuli (22) or DNA damaging agents (18,23,24). These pleiotropic functions have been traditionally considered to be mediated through the GTP-bound state according to the RHO cycle model. However it is not known whether its functions result from changes in GTP-state or from global amount of expressed RHOB because of the lack of technologies targeting selectively RHOB-GTP. To evaluate how GTP-bound RHO fraction contributes to RHOB function, there is a need of reliable and versatile tools to inhibit selectively RHOB-GTP. In this report, we produced highly selective probes based on intracellular single domain antibodies (sdAb) technology (25). To achieve this goal, we

established a visual in cell screening of protein interference through proteasome degradation mediated by F-box domain fused sdAb targeting GTP-bound RHOB (26). We have characterized intracellular sdAb expressed as functionalized intrabodies and identified one very selective towards RHOB-GTP conformation. We demonstrate that this novel tool can be used to knockdown selectively the GTP-bound RHOB fraction under physiological conditions or upon stimulation with EGF. Our results indicate that inhibition of the GTP-bound RHOB fraction, not its global expression, was sufficient for the modulation of migration and invasion in a human bronchial epithelial cell model.

## RESULTS

### Cell based screening of intrabodies targeting GTP-bound RHOB

Our objective was to select intracellular antibodies and to engineer them in order to selectively regulate the cellular pool of endogenous GTP-bound form of RHOB. To achieve this goal, we developed an original cell-based screening optimized to monitor nanobody mediated protein interference with a visual fluorescent readout.

Starting with a large synthetic library of humanized single domain antibodies based on a single intrabody scaffold, referred to as hs2dAb(25), we selected hs2dAb that recognize native conformation of active RHOB by a subtractive phage display selection. A competitive selection was carried out *in vitro* by pre-clearing steps in the presence of an excess of GDP loaded wild-type RHOB, as well as active mutants RHOA L63 and RHOC L63 to deplete nanobodies cross reacting within the RHO subgroup (27) (Fig. S1).

Because the *in vitro* selection of recombinant antibody fragments does not often lead to the enrichment of functional intrabodies (27,28), we set up a screen directly in cells to select intrabodies that enable targeted protein degradation. First we chose to functionalize hs2dAb by an amino terminal fusion of a F-box domain in order to induce ubiquitination of the target and subsequent degradation by the proteasome (26,29,30) (Fig.1A). One advantage of that protein interference strategy is that the F-box-intrabody (F-Ib) acts in a catalytic manner and is not co-degraded like suicide intrabodies (29). In addition, this selection will allow the identification of molecular tools ready to use for an inhibition strategy.

We employed a stratagem to display the antigen bait in order to avoid bias in the identification of positive hits. Despite the fact that *RHOB* is a non-essential gene, cellular inhibition of such a pleiotropic protein may have an effect on cell survival (31,32). Therefore we chose to express ectopically a RHOB mutant locked in the GTP conformation (RHOB L63) at homogenous level in the cellular background of a *RHOB*<sup>-/-</sup> lung epithelial tumor cell line H2882 (33). As expression of RHOB L63 mutant shows high cellular toxicity, we delocalized it into the nucleus. To this end, we expressed a fusion between an amino terminal histone H2B and RHOB L63 deleted for the carboxy terminal membrane anchorage CAAX motif. To establish a direct visual screening, we further introduced the sequence of the mCherry fluorescent protein as a linker between H2B and the CAAX deleted RHOB

L63 bait antigen (Fig. 1A). As a result, expression of a H2B-mCherry-RHOB L63 chimera was giving a strong fluorescent signal in the nucleus as expected for histone H2B fusion. A stable cell line, referred to as HmB (Fig. 1), was generated with this chimeric construct which appeared to be nontoxic in comparison to a control H2882 cell line expressing H2B-mCherry, and referred to as Hm (Fig. 1D).

The selection of F-Ib was performed by subcloning the pool of hs2dAb previously enriched against GTP-bound RHOB during four rounds of phage display (Fig. S1). To visualize transfected cells expressing the prey hs2dAb during the screen, we constructed a bicistronic vector expressing two proteins, individual F-Ib (F-box-hs2dAb-6his-myc) on the first cistron and, in order to identify transfected cells, a reporter monomeric GFP targeted to the mitochondrial matrix (mito-GFP) through IRES dependent translation of the second cistron (Fig. S1). Finally, the visual screen consisted in monitoring the decay of the mCherry nuclear fluorescence in cells showing green fluorescent mitochondria and analysis reached 300 randomly picked clones (Fig. 1B). The mCherry fluorescence intensity observed on some selected field by inverted microscopy suggested that less than 10% of F-Ib induced degradation of H2B-mCherry-RHOB L63 (Fig. 1). Sequencing analyses revealed that clones found multiple times gave very reproducible fluorescence knockdown, thus highlighting the robustness of the assay. As negative controls, we used a non-relevant hs2dAb originating from the same library, referred to as F-NR, and a negative intrabody F-B20 that was nonetheless highly enriched in the phage display selection towards RHOB. The cellular screening was based on the hypothesis that a functional F-Ib interaction with RHOB would induce a decrease of nuclear mCherry fluorescence in the HmB cell line but not in the Hm one (Fig. 1C&D). Flow cytometry analysis of fluorescent protein interference of positive hits permitted to identify F-Ib that induced a decrease of the average mCherry fluorescence of transfected cells 25% stronger than F-NR controls in the HmB and no effect in the Hm cell line (Fig. 1C). Finally, our *in vivo* screening revealed 4 robust interfering intrabodies, F-B12, F-B6, F-B15 and F-B50, which degraded selectively H2B-mCherry-RHOB L63 with increased efficacy for F-B12 and F-B6 in this cell line context (Fig. 1C&D). In summary, this original cell based screening provided readily functional tools that required further selectivity characterization.

### **Characterization of intrabodies selectivity in engineered cell lines.**

The positive outcome of the screen is the identification of F-Ib that degrades the constitutively activated RHOB L63 mutant with no insight into the selectivity of selected sdAb domains and protein degradation mechanism. To verify the F-Ib effective action on RHOB target, we first confirmed that the four positives F-Ib localized primarily into the nucleus in HmB cells whereas negative F-NR or F-B20 gave a whole cell staining, as shown by anti-myc immunofluorescence (Fig. S2). To control whether protein interference was dependent on the F-box domain, selected hs2dAb intrabodies were expressed alone. Flow cytometry analyses indicated that mCherry fluorescence remained at high level, confirming that the F-box domain was solely responsible for the decay (Fig. 2A). Conversely, the

fluorescence decays induced by positive intrabodies while being fused to the F-box were reversed upon MG132 proteasome inhibitor treatment (Fig. 2B). Together these results demonstrated that the F-Ib selected by the direct visual cell based screening were specifically targeting and degrading the nuclear RHOB L63 chimera in a proteasome dependent manner.

Next, we assessed the selectivity of F-Ib positive hits towards the RHO-GTP conformation in the context of H2882 engineered cell lines, we generated a stable cell line expressing H2B-mCherry-RHOB dominant negative mutant T19N (34,35). Transfection of the selected F-Ib in this cell line did not induce any fluorescence decay suggesting that all four positive hits were selective towards the constitutively active RHO L63 mutant (Fig. 2C). These results were further confirmed by analysis of localization of hs2dAb expressed as GFP fusion instead of F-box domain. We observed a complete nuclear re-localization of B50, B6, B12 or B15 hs2dAb-GFP in cells expressing H2B-mCherry-RHOB L63 but not in H2B-mCherry or H2B-mCherry-RHOB N19 cell lines (Fig. S3).

In order to evaluate cross reactivity of F-Ib between closely related RHO and RAC subfamilies (36), we engineered another H2882 cell line expressing H2B-mCherry-RAC1 L61 constitutively active mutant. Among the positive selected F-Ib, F-B50 and F-B12 induced a significant reduction in the fluorescence level of the H2B-mCherry-RAC1 L61 whereas F-B6 and F-B15 failed to degrade the active mutant of RAC1 (Fig. 2C). Accordingly, we observed a nuclear re-localization of hs2dAb-GFP only for the B12 and B50 intrabodies in the H2B-mCherry-RAC1 L63 expressing cells (Fig. S3). All together these results indicate that the four hs2dAb positive hits from the screen are conformational antibodies as they clearly discriminate in this cellular context the L63 active conformation of RHOB from the N19 inactive one. Furthermore, B50 and B12 may have a broad range of targets within the RHO/RAC homologues. Conversely, B6 and B15 appeared to be more selective towards active RHOB as they do not bind RAC1.

### **Intrabodies conformational to GTP-bound RHOB allow highly selective protein interference on endogenous protein.**

Endogenous RHO proteins are expressed at very low level and their active fraction correspond to a dramatically lower concentration as judged by Rho Binding Domain pull down assay (4,13). Thus we investigated whether the F-B6 and F-B15 RHOB selective hits were able to degrade the endogenous GTP-bound fraction of RHOB. We transfected HeLa S3 cells, a cell line that expresses significant amount of RHOB protein with a detectable basal level of active RHOB-GTP form. The protein interference with F-B6 and F-B15 was compared to the efficient but less selective F-B12 positive and the F-NR, F-B20 negative controls. The standard method to assay the RHOA subgroup GTP fraction is based on a GST pull down using RHO Binding Domain from Rhotekin (13). Basal RHOB-GTP was knocked down more selectively by F-B6 than F-B15 that also affects RHOA-GTP fraction as demonstrated by the quantification of GST-RBD assays (Fig. 3A&B). Lower selectivity of the F-B12 was confirmed by the similar depletion of RHOA, RHOB and RHOC basal GTP-bound cellular



fractions. Next, we evaluated the efficacy of the F-Ib interference on the previously described fast process of RHO activation mediated by growth factors (37). After 24h of serum starvation, RHO activation by EGF reached a maximum at 15 minutes (Fig. S4A). Expression of F-B6 prevented RHOB cellular activation with similar selectivity than on the basal RHOB GTP fraction (Fig. 3C, Fig. S4B&C). Together these results show the first example of a designed molecule that enable *in cellulo* selective inhibition through cellular proteolysis of endogenous GTP-bound RHOB fraction.

To evaluate the RHOB-GTP conformational selectivity of hs2dAb B6 missing the large amino terminal F-box or carboxy terminal GFP, we expressed intrabodies tagged with carboxy terminal 6xHis and myc in HeLa S3 cells. We demonstrated the selectivity of B6 intrabody towards RHOB in pull down assays and used the hs2dAb B12 as a pan RHO-GTP control. The conformational selectivity was monitored by loading GTPases within transfected cell lysates either with GDP or the non-hydrolysable analogue GTP $\gamma$ S, followed by Ni-NTA co-immunoprecipitation assay to capture the intrabody moiety (Fig. 4A). Considering the strong selectivity towards the GTP-bound conformation at least as high as the one observed for the Rhotekin RBD domain (13), we assumed that B6 or B12 hs2dAb based pull down of the endogenous RHO without artificial nucleotide loading would reveal only the GTP-bound fraction of RHO. The abundance of the co-precipitated fraction by B6 or B12 were in the range of 2 % of the input fully similar to the standard GST-RBD (Fig. 4B), indicating that precipitated RHO were most likely the GTP-bound fraction indeed. The B6 intrabody appeared to co-precipitate preferentially RHOB whereas B12 behaved as a pan-RHO-GTP binder (Fig. 4B&C). Taken together, these results demonstrated a strong selectivity of the hs2dAb B6 intrabody towards endogenous RHOB-GTP.

To gain insights into the binding properties of B6 hs2dAb to active RHOB, we purified the recombinant fragment B6 expressed in *E.coli* periplasm. We measured affinity by single cycle kinetics SPR with recombinant active RHOB L63. The kinetic parameters yielded KD values of  $1,45 \pm 0,23 \cdot 10^{-9}$  M, which confirmed the high specificity of B6 (Fig. S5). We then solved the three-dimensional structure of B6 hs2dAb in complex with the RHOB L63 mutant truncated for the last 11 amino acids involved in membrane anchoring (Table S1). The RHOB/B6 interface buries  $\sim 700$  Å<sup>2</sup> of highly complementary surfaces mostly dominated by hydrophilic contacts. The CDR3 loop of B6 participates actively to this interface with contributions from side-chains of Q106 and N113 that make hydrogen bond contacts with Y34 from RHOB and the GTP, respectively (Fig. 4D). The “RHO insert” helix also participates actively in this interaction network, with H126, E130 and R133 at hydrogen bond distance to the side-chains of T94 and Y96 from strand  $\beta$ 8 of the B6 hs2dAb framework 3 and the main-chain atoms of W115 and G118 from its CDR3 region (Fig. 4E). Stacking interactions with the indole ring of W112 from CDR3 also contribute to the stabilization of the “RHO insert” helix.

### **RHOB-GTP protects human bronchial cells from motile and invasive phenotypes acquisition**

We previously demonstrated that down regulation of RHOB expression induced AKT1/RAC1 pathway to favor invasiveness of human bronchial cells BEAS-2B (16,21). To determine whether the GTP-bound fraction of RHOB was involved in these effects, we analyzed the F-B6 mediated protein interference in this model. Lentiviral cell lines expressing either the F-NR or the F-B6 under the control of a doxycycline inducible promoter were generated in BEAS-2B cells (Fig. S6A). To validate F-B6 selectivity in this model, we showed that dose response of doxycycline produced increasing expression of F-B6, which correlated with a selective down-regulation of active RHOB but not RHOA or RHOC (Fig. S6 BCD). The highest significant knockdown selectivity was obtained in the presence of doxycycline at  $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (FigS6BCD). In agreement with the fact that RHOB is non-essential (5–7,16), cell viability and proliferation were unchanged during F-Ib expression (Fig. S6E&F). Furthermore, we demonstrated that the proteasome inhibitor bortezomib, which prevented total RHOB and active pools degradation in control F-NR cell line, rescued GTP-bound RHOB cellular level in F-B6 expressing cells. These results support that F-B6 effects on endogenous RHOB-GTP level are dose dependent and mediated by the proteasome as well as in BEAS-2B cells (Fig. S6G).

In this model, we examined cell migration in a transwell system (Fig. 5A-C). After 48h doxycycline induction, expression of F-B6 correlated with a two-fold increase in cell migration, strongly suggesting that inhibiting selectively GTP-bound RHOB was sufficient to induce a phenotype similar to RNAi global knockdown (Fig. 5C and S7). Next, we evaluated whether cell migration was associated to RHOB-GTP-mediated protein interference. To this end, F-Ib expression induction was stopped after 24h by doxycycline removal, and then analysis was performed after further 24h (Fig. 5A-C). As expected, the F-Ib expression levels dropped back to a non-detectable level, indicating that the F-Ib had a relatively fast turnover. As a result, the amount of migrating cells decreased, suggesting that F-B6 extinction rescued slower cell migration. Consistently, cells expressing F-B6 showed a marked increase in invading capacity in matrigel (Fig. 5D). Finally, in F-B6 expressing cells, AKT phosphorylation and RAC1 activation were significantly increased demonstrating that the GTP-bound RHOB fraction down regulates the AKT1/RAC1 pathway, and promotes motility (Fig. 5E&F). All together, these results demonstrated that F-B6 mediated protein interference on the GTP-bound RHOB fraction phenocopies the RNAi down-regulation of RHOB expression in supporting both invasiveness and AKT/RAC1 pathway modulation. Accordingly, these results showed that inactivating RHOB-GTP is sufficient to induce invasive phenotype of human bronchial cells (Fig. 5G).

## DISCUSSION

In this study we established an *in cellulo* strategy to degrade very selectively GTP-bound RHOB which is a pleiotropic protein regulating different pathways dependent on the cellular context.

Intracellular expression of scFv, VH/VL or nanobodies genes has already been used to track or modulate several intracellular targets (38). Because these strategies were often limited by the poor solubility of recombinant antibody fragments in inappropriate redox environment, only few examples

of intrabodies have been reported to be able to discriminate different state of activities. For instance, some scFv were developed to target the oxidized inactive state of the protein tyrosine phosphatase 1B (39) or to directly block the phosphorylated active form of the signal transducer and activator of transcription 3 (40). The GTP-loaded active state of small G proteins have also been targeted by intrabodies which allowed to track RAB6 small GTPase (41) or to block H-RAS effector interaction (42). However, the production of functional intrabodies in cells relies both on the availability to recognize epitope in the intracellular complexity and on the intrinsic stability of the antibody fragment while expressed into the reducing cytosol (43). This could partially explain why in a previous study we succeeded in discriminating RHOB from RHOA and RHOC *in vitro* using scFv that were not efficient while expressed as intrabodies (27). In this study, we established a novel cell based screen which permitted to select clones which are functional in the final assay format and which led to the identification of a single hs2dAb that compiles all required features.

Here, we presented a novel way to study small GTPases function by altering selectively the GTP-bound state of RHOB using protein interference. Because of the high affinity and specificity of nanobodies selected from phage display libraries, we could isolate hs2dAbs that are conformational biosensors of active RHO GTPase. Discriminating proteins among the subgroup of RHO is not obvious because RHOB share more than 85% identity with RHOA and RHOC. Particularly, the pan RHO-GTP hs2dAb B12 appeared to be very efficient in degrading active forms of the whole RHO subgroup, as well as RAC1. In addition, performing a cell based screening permitted to directly counter select some hs2dAb that would have been considered positive in conventional nanobody *in vitro* characterization. As an example, B20 hs2dAb was the most redundant construct selected by phage display, presumably as a result of favorable binding properties *in vitro* on recombinant RHOB bait, although it appeared to not bind anymore while expressed intracellularly. This illustrates the critical importance of monitoring a cell-based assay directly in the final format to identify functional F-Ib. Some selected F-Ib like F-B12 showed pan-RHO/RAC binding properties and may affect multiple pathways. Conversely, the clone B6 showed a clear intracellular selectivity towards RHOB. In contrast to F-B12, F-B6 induced a very precise and selective RHOB-GTP protein interference that does not affect the total level of any members of the RHO subgroup. This suggests that crosstalk between other RHOs and their partners is not affected by B6 interference. The selective co-immunoprecipitation of RHOB-GTP with the B6 domain alone in addition to the re-localization experiments of B6-GFP revealed that this nanobody could be functionalized in various ways and could be further engineered. In the future, we will use this genetically encoded inhibitor to engineer F-B6 in a way to reach a better spatio-temporal control of the inhibition, in order to block the intracellular local biochemistry of RHOB activities. Such approach could be useful to identify RHOB-GTP partners or to decipher RHOB-GTP functions at the plasma membrane (20,44), endosome (35,45) or in the nucleus (46), as well as during the response to stress that induces RHOB expression and activation (18,24,47).

We previously demonstrated that down regulation of RHOB protein expression induced motility and invasion of human immortalized bronchial cells, strongly suggesting that RHOB is a negative regulator of tumor progression. However, we did not know whether the observed effect could be correlated with activated RHOB-GTP fraction. Actually the siRNA or KO mice approaches used previously do not exclude the possibility that the change in RHOB total level induces interference with the equilibrium of other RHOs due to the RHO/RHOGDI crosstalk (10).

In contrast to previous studies (16,21), we demonstrated here that exclusive extinction of the GTP-bound RHOB activity is sufficient to induce a motile and invasive phenotype. This study provides a paradigm for the study of RHOB activity by inhibiting very selectively its function in BEAS-2B bronchial cells and demonstrating that RHOB activity knockdown is critical for AKT1/RAC1 mediated cell motility and invasiveness properties. These results imply that increasing the level of RHOB GTP-bound form, by inhibiting GAP function for example, may be a therapeutic strategy to limit cell invasion. In summary, this study has paved the way to fine analyses of RHOB small G protein activities and functions.

## **METHODS**

All standard methods for realization of procedures used in this study are described in SI Materials and Methods.

### **Subtractive Phage display Panning for isolating RHOB-GTP specific hs2dAb**

The NaLi-H1 library of humanized synthetic single domain antibody (25) was used for this study. A subtractive panning protocol was designed to isolate hs2dAb selective for the RHOB-GTP-Chitin binding domain from chitinase A1 (CBD) or twinstrep tag (IBA) fusion of RHOB GTPase active mutant (RHOB L63) were expressed transiently during 24 hours in HEK293 cells and captured freshly after cell lysis on magnetic beads before incubation with the library phages. Chitin magnetic beads (NEB) or strepTactin coated magStrep HC (IBA) were use. A phage display panning alternating rounds on chitin beads with rounds on streptactin beads was performed during 4 rounds. From the second round of panning, a depletion step on GDP loaded wild type RHOB or N19 inactive mutant was included. Incubate the adequate amount of biotinylated antigen coated beads for 2 h with the phage library (10.E13 phages diluted in 1 mL of PBS + 0.1% Tween 20 + 2% non-fat milk). Phages were previously adsorbed on empty streptavidin-coated magnetic beads (to remove nonspecific binders). Recover phage bound to streptavidin-coated beads on a magnet. Wash 10 times (round 1) or 20 times (rounds 2 -4) with PBS+Tween 0.1% on a magnet. Elute bound phages using triethylamine (TEA, 100 mM): add 500  $\mu$ L TEA for 10 min, recover TEA + eluted phages on a magnet and neutralize using 1M Tris pH 7.4. Repeat the elution once more. Infect E. coli (TG1) with the eluted phages. For round 2 to round 4, only  $10^{12}$  phages were used as input.

The NaLi-H1 library phages production was mixed in solution with of constitutively active mutant of RHOB (RHOB L63). This mutant was expressed in HEK293 as a carboxy terminal fusion to chitin binding domain from chitinase A1 (CBD-RHOB L63), then freshly pulled down on chitin magnetic beads for the first round of panning. In subsequent rounds of selection, a tandem repeat of a streptactin binding tag used together with streptactin magnetic beads were alternatively used with the CBD pull down to avoid tag binding phage. To enrich in GTP-bound RHOB-binding phages, a depletion step was introduced, after the first round of selection, using GDP-bound RHOB proteins before proceeding for the selection against the active RHOB L63. Then from the third round of phage display, a competition step was introduced with RHOA L63 and RHOC L63 mutants to remove non-selective binders. A total of four rounds of panning was performed. The input phages were preincubated with the magnetic beads before each round of panning to eliminate beads binding phage.

### **Stable cell lines establishment**

40000 cells / well in a 24 wells plate were plated. The day after, cells were transfected with JetPrime: 0.75  $\mu\text{g}$  of plasmidic DNA + 1.5  $\mu\text{L}$  of JetPrime in 50  $\mu\text{L}$  of JetPrime buffer. 4h after, the transfection was stop. 72h after transfection, cells were trypsinized and diluted at these concentrations: 1/50, 1/150 or undiluted and then each dilution was plated on a culture dish (100 mm) with 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of Zeocin (Invitrogen). Every 4 days the medium was changed with new Zeocin. After 3 or 4 weeks, clones appeared and were trypsinized and plated on a 96 wells plate. Antibiotic was always maintained in the culture medium (50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Production of stable cell lines with tetracycline inducible (Tet-on) F-hs2dAb expression: each p-F-Ib-IRES-BFP lentivirus was produced according to the tri-transfection procedure using the plasmids pLvPack and pLvVSVg (Sigma) in 293T cells for viral production. BEAS-2B cells were previously transduced with the rtTA doxycycline-inducible transactivator, then cells were further transduced with the F-IB-IRES-RFP lentivirus containing supernatant.

### **Plasmids**

p-F-Ib-IRES-Mito-mGFP and p-Ib-IRES-Mito-mGFP construction : of.F-box hs2dAb-6Hismyc-IRES-MTS-FP expressing vectors. A PCR was performed to extract the F-box sequence from the following plasmid: NSlmb-VHHGFP4 and NSnoF-box-VHHGFP4 using BspHIF-boxFw (5' GTTCATGTCATGATGAAAAT GGAGACTG ACAAATAATGG 3') and F-boxNcoRev (5' CAAGATCCCATGGCGAGGTGGCGGCCAGTC CGCCAGTTG 3') primers. This fragment was inserted in the p-Ib plasmid (intrabodies expression vector with CMV promotor) by digesting with BspHI and NcoI. Then IRES-MTS-fluorescent protein was inserted by PCR downstream of the VHH. EMCV IRES was amplified from pIRES vector with insertion of flanking downstream restriction sites AgeI, NheI and Acc65I. Then a mitochondrial targeting sequence (MTS) from subunit VIII of human cytochrome c oxidase (pEYFP-MTS, Clontech) was inserted between NheI / AgeI, followed by them

mGFP between AgeI / Acc65I, thus creating the p-F-Ib\_IRES\_mito-GFP in which any hs2dAb can be inserted by NcoI and NotI cloning sites..

p-H2B-mCherry-RHOBQ63LdeltaCAAX-IRES-Zeo construction: a first PCR using pcDNA3.1 Hygro H2B was performed in order to extract H2B sequence with the NotIH2BFw (5' ATTCTTAGCGGCCGCGCCACCATGCCAGAGCCAGCGAAG TCTGCTCCCG 3') and the H2BAgeIRev (5' GACCGGTGAACCGCCACC GCTGCCACCGCCATCCTTAGCGCTGGTGT ACTTGG 3') primers. Then another PCR was performed to extract mCherry sequence from the pAOint4VHH-mCherry plasmid: AgeImCherryFw (5' GCAGCGGTGGCGGTT CACCGGTGGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG 3') and mCherryBsrGIIlinkAcc65IRev (5'GCGGAAGGATCCGACCACCTATTAGGTACCGCCTGCGCTACCGCCTGTACACTTGTAC AGCTCGTCCATGCCGCC 3'). Then PCR1 + PCR2 were linked with the NotIH2BFor and CherryBsrGIIlinkAcc65IRev primers to obtain H2b-mCherry.

Then we extracted the IRES-Zeo sequence from the pIRESZeo-RHOB plasmid (48) with the following primers: IRESFw (5' GCAGGCGGTACCTAATAGGT GGTCGGATCCTTCCGCCCTCTCCCTCCCCC 3') and ZeoPmeI2BgIIRev (5' TACTAAGAGATCTGTTTAACTATTAGTCCTGCTCCTCGGCCACGAAGTGCACGCAG 3'). Finally H2B-mCherry and IRESZeo were linked with the NotIH2BFor and ZeoPmeI2BgIIRev primers and inserted into the pIRES-Zeo-RHOB vector digested with NotI/BamHI. We obtained the p-H2B-mCherry-IRES-Zeo plasmid. We next inserted the active mutants of RHOB (RHOB L63) and RAC1 (RAC1 L63) and the inactive mutant of RHOB (RHOB N19) by digesting the pH2B-mCherry-IRES-Zeo vector by KpnI/BamHI allowing the formation of the following plasmids: p-H2B-mCherry-RHOB L63deltaCAAX-IRES-Zeo; p-H2B-mCherry-RHOB N19deltaCAAX-IRES-Zeo; p-H2B-mCherry-RAC1 L63deltaCAAX-IRES-Zeo.

p-F-Ib-IRES-BFP lentiviral construction: F-Ib-IRES was inserted in the pTRIP-TRE-MCS XNCA lentiviral plasmid (gift from Loic Van Den Berghe) by XbaI / AgeI digestion of the p-F-Ib-IRES-Mito-mGFP plasmid and TagBFP, amplified from pTagBFP-actin plasmid (Evrogen) with the following primers : AgeIBFPFw (5' TTATGCACCGGTGGGTATGAGCGAGCTGATTAAGG 3') and ClaIBFPRev (5' AAGATCTGTACATCGATTAC TAATTAAGCT TGTGCCCCAG TTTGC 3'), was inserted after AgeI / ClaI digestion, thus creating p-F-Ib-IRES-BFP lentiviral vector.

Cloning of RhoB and B6 for X-ray studies. *RHOB111Q63L* was amplified by PCR using forward 5'-(GGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCC)-3' and reverse 5'-(TGTCGTGAATTCTTATCAGGAGCCGTAGCGCTTCTGCAG)-3' primers. Gel extracted and cleaned inserts from EcoRI/KpnI restriction digests were ligated into the expression vector pHisparallel2 (49) and transformed into chemically competent BL21 (DE3) star cells (Thermofisher). This vector allows expressing the protein of interest with an N-terminal His tagged followed by a linker sensitive to the tobacco etch virus (TEV) protease. The *B6* cDNA was subcloned from the p-F-Ib-IRES-Mito-mGFP vector into the periplasmic expression vector pHEN-CBD-2S-6his digested

*NcoI/NotI*. This vector allows expressing the protein as a fusion of the C terminus of CBD 2S His-tagged. A linker sensitive to the tobacco etch virus protease was added by site-directed mutagenesis using QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) using forward 5'-(TAGCGCGGCCGCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGTGGCGGTGGCA)-3' and reverse 5'-(TGCCACCGCCACCCTGAAAATACAGGTTTTTCAGCGGCCGCGCTA)-3' primers. Picked clones were grown overnight at 37°C in culture tubes containing 3 ml TB medium supplemented with ampicillin (100 µg/ml) prior to storage in 20% glycerol at -80°C.

### **Cell based screening**

Following 4 rounds of phage display panning, enriched hs2dAb were subcloned as a polyclonal pool in the p-F-Ib-IRES-Mito-mGFP bicistronic vector. Sequencing a set of 50 individual clones revealed that the F-B20 was over-represented up to 50% of the clones, the other half being fully diverse. Plasmid miniprep of 300 hs2dAb clones were transfected in the visual cell based protein interference assay in the HmB cell line and analyses by fluorescent microscopy was performed 48h post transfection on cells fixed 30 minutes in 3.7% PFA. Positive hits were then transfected in both HmB and Hm cell lines to assess the specificity towards RHOB.

### **Affinity measurement**

Hs2dAb B6 binding studies based on SPR technology were performed on BIAcore T200 optical biosensor instrument (GE Healthcare). Capture of recombinant hs2dAb-6xHis, expressed in X11blue and purified as previously reported (50), was performed on a nitrilotriacetic acid (NTA) sensorchip in HBS-P+ buffer (10mM Hepes pH 7.4, 150mM NaCl, and 0.05 % surfactant P20) (GE Healthcare). The four flow cells (Fc) of the sensorchip were used: one (Fc 1) to monitor nonspecific binding and to provide background corrections for analyses and the other three flow cells (Fc 2, 3, and 4) containing immobilized Hs2dAb-6xHis for measurement.

For immobilization strategies, flow cells were loaded with nickel solution (10 µL/min for 60 s) in order to saturate the NTA surface with Ni<sup>2+</sup> and an extra wash using running buffer containing 3mM EDTA after the nickel injection. His-tagged hs2dAb in running buffer was injected in flow cells at a flow-rate of 10 µL/min. Total amount of immobilized hs2dAb-6xHis was 250-300 resonance units. (RUs; 1 RU corresponds approximately to 1 pg/mm<sup>2</sup> of protein on the sensorchip). A Single-Cycle Kinetics (SCK) analysis to determine association, dissociation and affinity constants ( $k_a$ ,  $k_d$ , and  $K_D$  respectively) was carried out. SCK method prevents potential inaccuracy due to sensorchip regeneration between cycles which are necessary in the conventional multiple cycle kinetics (MCK) (51). SCK binding parameters are evaluated for each injection according to the tools and fit models of the BIAevaluation software, giving similar values than MCK. As hs2dAb were smaller proteins than their respective antigens, hs2dAb were captured on the sensorchip then the recombinant antigens were used as analyte and were injected sequentially with increased concentrations ranging between 3,125

nM to 50 nM in a single cycle without regeneration of the sensorship between injections. Binding parameters were obtained by fitting the overlaid sensorgrams with the 1:1. Langmuir binding model of the BIAevaluation software version 1.0.

### **Production and Purification of RHOB and B6 complex**

The B6 hs2dAb was produced in bacterial periplasm. Briefly, B6 was produced in XL1blue *E.coli* grown in TB-ampicillin (100 µg/mL) medium supplemented with 1% glucose in the start culture and 0.1% glucose during induction with 1mM IPTG. After overexpression for 16h at 28°C, the cells were harvested, suspended in 15 mL ice-cold TES (Tris 100mM pH 8, EDTA 1mM, Sucrose 500mM) and stored at -80°C. 30 mL of a ¼ dilution of TES buffer was added to the resuspended pellets prior to shaking for 45 min at 4°C. After centrifugation (1 h, 20000g, 4°C), the periplasmic extract containing B6 was purified by affinity chromatography. The protein extract was incubated 2 h in the presence of His-Tag purification beads (Roche) equilibrated with RHO buffer. The B6 protein was eluted with step gradients of 20; 50 and 400 mM imidazole. The peak fractions were pooled and the tag cleavage was performed with AcTev protease (Invitrogen) during dialysis (16 h, 4°C). The tag was removed by affinity chromatography using Ni-NTA beads (Clontech).

RHOB was expressed in BL21 Star (DE3) pRARE *E.coli* cells from a pET vector. Transformed bacteria cell were used to grow 20 mL LB-ampicillin (100 µg/ml) cultures overnight at 37°C prior to inoculation in baffled flasks containing 4 L of the same media. Cells were allowed to grow for approximately 2 h at 37°C before temperature was dropped from 37°C to 20°C. When OD<sub>600</sub> reached 0.5-0.7, cells were induced with IPTG at a final concentration of 50 µM and grown for an additional 16 h prior to harvesting by centrifugation at 4000×g for 20 min. The pellets were resuspended in buffer A (100 mM Tris HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% glycerol, 1 mM TCEP, 10 µM GTPγS) and lyzed by sonication on ice prior to centrifugation (1 h, 20000 g, 4°C). The soluble cell extract was incubated 1h, 4°C with purified B6. The complex was purified by affinity chromatography following the same protocol as for B6. RHOB/B6 was further purified by gel filtration on a HiLoad Superdex 75 16/60 (GE Healthcare) column equilibrated with 50 mM Tris HCl, pH 8,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% glycerol, 1 mM TCEP, 10 µM GTPγS. The complex was concentrated to 13.6 mg/mL (OD measurements at 280 nm using an extinction coefficient of 51340 mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) prior to crystallization trials.

### **Crystallization and Structure Determination**

Highly purified RHOB/B6 (see supplementary methods) complex was used for crystallization at 12°C using commercially available kits from Qiagen (Venlo, Netherlands) in Innovaplate SD-2 (Innovadyne, Australia). The plates were filled using a Nanodrop ExtY crystallization robot (Innovadyne Technologies, Santa Rosa, CA, USA) prior to storage and imaging using a Rock Imager 1000 (Formulatrix, Bedford, MA, USA). Drops containing 200 nL of the RHOB/B6 complex and 200



nL reservoir solution (100 mM MES pH6.5; 200 mM MgCl<sub>2</sub>; 25% v/w PEG4000) gave rise to diffraction quality crystals within days. Crystals directly flash frozen in liquid nitrogen diffracted to a maximum resolution of 1.6 Å on ID30A-1 at the ESRF synchrotron site (Table S2). They belong to space group *P12<sub>1</sub>1* with cell parameters a=66.8 Å b=70.2 Å, c=71.2 Å and four molecules (2 RHOB and 2 B6) in the asymmetric unit. The Structure was built and refined by iterative cycles of manual model building in COOT (52) and in PHENIX software suite (53).

### Accession code

The coordinates for the crystal structure of the RHOB/antibody complex have been deposited in the Protein Data Bank with PDB ID code 5L4P.

### Statistical analysis

Values reported represent median or mean ± standard deviation (SD) or standard error of mean (SEM) of at least three independent experiments. Unless indicated otherwise, P values were calculated with GraphPad Prism 6 using a Student's t-test. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001; \*\*\*\*, p< 0.0001.

### Acknowledgement

We thank Laetitia Ligat from the CRCT proteomic facility for surface plasmon resonance experiments; E. Bousquet, O. Calvayrac and A. Cristini for experimental advice and discussions; O. Sordet and S. Leocadie for comments on the manuscript. The equipment used for crystallization experiments and X-ray crystallography are part of the Integrated Screening Platform of Toulouse (PICT, IBiSA). We thank the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, France, in particular the staff of beamlines ID30A-1. ; This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM 2014) and the Cancéropole grand sud ouest (GSO emergence 2014).

### References

1. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:247–69.
2. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002 Dec 12;420(6916):629–35.
3. Ridley AJ. Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 2015 Oct;36:103–12.
4. Guilluy C, Dubash AD, García-Mata R. Analysis of RhoA and Rho GEF activity in whole cells and the cell nucleus. *Nat Protoc.* 2011 Dec;6(12):2050–60.
5. Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjano IM. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* 2007 Apr;29(4):356–70.

6. Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Sep;9(9):690–701.
7. Sebestyén Z, Scheper W, Vyborova A, Gu S, Rychnavska Z, Schiffler M, et al. RhoB Mediates Phosphoantigen Recognition by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cell Receptor. *Cell Rep.* 2016 May 19;
8. Kamon H, Kawabe T, Kitamura H, Lee J, Kamimura D, Kaisho T, et al. TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation. *EMBO J.* 2006 Sep 6;25(17):4108–19.
9. Boulter E, Garcia-Mata R, Guilluy C, Dubash A, Rossi G, Brennwald PJ, et al. Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nat Cell Biol.* 2010 May;12:477–83.
10. Garcia-Mata R, Boulter E, Burridge K. The “invisible hand”: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Aug;12(8):493–504.
11. Aktories K, Mohr C, Koch G. Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992;175:115–31.
12. Shang X, Marchioni F, Sipes N, Evelyn CR, Jerabek-Willemsen M, Duhr S, et al. Rational design of small molecule inhibitors targeting RhoA subfamily Rho GTPases. *Chem Biol.* 2012 Jun 22;19(6):699–710.
13. Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* 1999 Feb 1;18(3):578–85.
14. Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res.* 2004 Nov 15;301:43–9.
15. Marcos-Ramiro B, García-Weber D, Barroso S, Feito J, Ortega MC, Cernuda-Morollón E, et al. RhoB controls endothelial barrier recovery by inhibiting Rac1 trafficking to the cell border. *J Cell Biol.* 2016 May 9;213(3):385–402.
16. Bousquet E, Calvayrac O, Mazières J, Lajoie-Mazenc I, Boubekeur N, Favre G, et al. RhoB loss induces Rac1-dependent mesenchymal cell invasion in lung cells through PP2A inhibition. *Oncogene.* 2015 Jul 6;
17. Meyer N, Peyret-Lacombe A, Canguilhem B, Médale-Giamarchi C, Mamouni K, Cristini A, et al. RhoB promotes cancer initiation by protecting keratinocytes from UVB-induced apoptosis but limits tumor aggressiveness. *J Invest Dermatol.* 2014 Jan;134(1):203–12.
18. Wang M, Guo L, Wu Q, Zeng T, Lin Q, Qiao Y, et al. ATR/Chk1/Smurf1 pathway determines cell fate after DNA damage by controlling RhoB abundance. *Nat Commun.* 2014;5:4901.
19. Huang M, Duhadaway JB, Prendergast GC, Laury-Kleintop LD. RhoB regulates PDGFR-beta trafficking and signaling in vascular smooth muscle cells. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2007 Dec;27:2597–605.
20. Vega FM, Colomba A, Reymond N, Thomas M, Ridley AJ. RhoB regulates cell migration through altered focal adhesion dynamics. *Open Biol.* 2012 May;2(5):120076.

21. Bousquet E, Mazières J, Privat M, Rizzati V, Casanova A, Ledoux A, et al. Loss of RhoB expression promotes migration and invasion of human bronchial cells via activation of AKT1. *Cancer Res.* 2009 Aug 1;69(15):6092–9.
22. Jahner D, Hunter T. The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1991 Jul;11:3682–90.
23. Fritz G, Kaina B, Aktories K. The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *J Biol Chem.* 1995 Oct 20;270:25172–7.
24. Mamouni K, Cristini A, Guirouilh-Barbat J, Monferran S, Lemarié A, Faye J-C, et al. RhoB promotes  $\gamma$ H2AX dephosphorylation and DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* 2014 Aug;34(16):3144–55.
25. Moutel S, Bery N, Bernard V, Keller L, Lemesre E, de Marco A, et al. NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies. *eLife* [Internet]. 2016 Jul 19 [cited 2016 Oct 10];5. Available from: <http://elifesciences.org/lookup/doi/10.7554/eLife.16228>
26. Caussinus E, Kanca O, Affolter M. Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nat Struct Mol Biol.* 2011 Dec 11;19(1):117–21.
27. Chinestra P, Olichon A, Medale-Giamarchi C, Lajoie-Mazenc I, Gence R, Inard C, et al. Generation of a single chain antibody variable fragment (scFv) to sense selectively RhoB activation. *PLoS One.* 2014;9:e111034.
28. Moutel S, Nizak C, Perez F. Selection and use of intracellular antibodies (intrabodies). *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2012;907:667–79.
29. Melchionna T, Cattaneo A. A protein silencing switch by ligand-induced proteasome-targeting intrabodies. *J Mol Biol.* 2007 Nov 30;374(3):641–54.
30. Kuo C-L, Oyler GA, Shoemaker CB. Accelerated neuronal cell recovery from Botulinum neurotoxin intoxication by targeted ubiquitination. *PloS One.* 2011;6(5):e20352.
31. Kamasani U, Liu AX, Prendergast GC. Genetic response to farnesyltransferase inhibitors: proapoptotic targets of RhoB. *Cancer Biol Ther.* 2003 Jun;2:273–80.
32. Prendergast GC. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2001 Nov;1:162–8.
33. Sato N, Fukui T, Taniguchi T, Yokoyama T, Kondo M, Nagasaka T, et al. 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.* 2007 Feb 1;120:543–51.
34. Farnsworth CL, Feig LA. Dominant inhibitory mutations in the Mg(2+)-binding site of RasH prevent its activation by GTP. *Mol Cell Biol.* 1991 Oct;11(10):4822–9.
35. Lajoie-Mazenc I, Tovar D, Penary M, Lortal B, Allart S, Favard C, et al. MAP1A light chain-2 interacts with GTP-RhoB to control epidermal growth factor (EGF)-dependent EGF receptor signaling. *J Biol Chem.* 2008 Feb 15;283(7):4155–64.

36. Wennerberg K, Der CJ. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci.* 2004 Mar 15;117(Pt 8):1301–12.
37. Gampel A, Parker PJ, Mellor H. Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Curr Biol.* 1999 Sep 9;9:955–8.
38. Helma J, Cardoso MC, Muyldermans S, Leonhardt H. Nanobodies and recombinant binders in cell biology. *J Cell Biol.* 2015 Jun 8;209(5):633–44.
39. Haque A, Andersen JN, Salmeen A, Barford D, Tonks NK. Conformation-sensing antibodies stabilize the oxidized form of PTP1B and inhibit its phosphatase activity. *Cell.* 2011 Sep 30;147(1):185–98.
40. Koo MY, Park J, Lim JM, Joo SY, Shin S-P, Shim HB, et al. Selective inhibition of the function of tyrosine-phosphorylated STAT3 with a phosphorylation site-specific intrabody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Apr 29;111(17):6269–74.
41. Nizak C, Monier S, del Nery E, Moutel S, Goud B, Perez F. Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors. *Science.* 2003 May 9;300(5621):984–7.
42. Tanaka T, Williams RL, Rabbitts TH. Tumour prevention by a single antibody domain targeting the interaction of signal transduction proteins with RAS. *EMBO J.* 2007 Jul 11;26(13):3250–9.
43. Joshi SN, Butler DC, Messer A. Fusion to a highly charged proteasomal retargeting sequence increases soluble cytoplasmic expression and efficacy of diverse anti-synuclein intrabodies. *mAbs.* 2012 Dec;4(6):686–93.
44. Vega FM, Thomas M, Reymond N, Ridley AJ. The Rho GTPase RhoB regulates cadherin expression and epithelial cell-cell interaction. *Cell Commun Signal CCS.* 2015;13:6.
45. Sandilands E, Cans C, Fincham VJ, Brunton VG, Mellor H, Prendergast GC, et al. RhoB and actin polymerization coordinate Src activation with endosome-mediated delivery to the membrane. *Dev Cell.* 2004 Dec;7:855–69.
46. Gerald D, Adini I, Shechter S, Perruzzi C, Varnau J, Hopkins B, et al. RhoB controls coordination of adult angiogenesis and lymphangiogenesis following injury by regulating VEZF1-mediated transcription. *Nat Commun.* 2013;4:2824.
47. Canguilhem B, Pradines A, Baudouin C, Boby C, Lajoie-Mazenc I, Charveron M, et al. RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem.* 2005 Dec 30;280:43257–63.
48. Baron R, Fourcade E, Lajoie-Mazenc I, Allal C, Couderc B, Barbaras R, et al. 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 A.* 2000 Oct 10;97:11626–31.
49. Sheffield P, Garrard S, Derewenda Z. Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of “parallel” expression vectors. *Protein Expr Purif.* 1999;15:34–9.
50. Olichon A, Surrey T. Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2007 Dec 14;282(50):36314–20.

51. Trutnau H-H. New multi-step kinetics using common affinity biosensors saves time and sample at full access to kinetics and concentration. *J Biotechnol.* 2006 Jun 25;124(1):191–5.
52. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010 Apr;66(Pt 4):486–501.
53. Adams PD, Afonine P V, Bunkóczy G, Chen VB, Davis IW, Echols N, et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010 Feb;66(Pt 2):213–21.

## Figure Legends

**Figure 1. Cell based visual screening for degrading intrabodies.** The screen was performed in the HmB cell line that corresponds to H2882 RHOB<sup>-/-</sup> cells stably expressing the chimera of histone H2B, the fluorescent protein mCherry and a non prenylable constitutively active mutant of RHOB, namely H2B-mCherry-RHOB L63deltaCAAX (red nuclei) and also in a H2882 control cell line H2B-mCherry (Hm). Several hundreds of F-box-hs2dAb clones were expressed from a bicistronic vector also encoding a mitochondrial targeted monomeric GFP. 48h after transfection, a visual screen consisted in evaluating the nuclear red fluorescence level in transfected cells identified by GFP labelled mitochondria (green, MitoGFP). **(A)** Scheme of the protein interference screen based on F-Ib. When the hs2dAb domains are able to interact specifically with H2B-mCherry-RHOB, allowing the F-box domain to recruit the Skip1-Cullin1-F-box (SCF) complex to the target antigen, H2B-mCherry-RHOB target is degraded by the 26S proteasome. **(B)** The positive hits corresponded to HmB cells harbouring GFP in mitochondria and a decrease of the mCherry fluorescence in the nucleus. In negative hits, the red nuclear fluorescence of cells harbouring GFP in mitochondria remained high. The mCherry fluorescence intensity was monitored on an inverted microscope. **(C)** Protein interference evaluation by mCherry fluorescence quantification by flow cytometry in Hm and HmB cell lines. After 48h of F-Ib transfection in the Hm and the HmB cell lines, the mCherry fluorescence was quantified in the transfected subpopulation and in the non-transfected subpopulation for each F-Ib. The ratio of each median of fluorescence (transfected *versus* non transfected population) gives a percentage of mCherry fluorescence intensity for one F-Ib. The fluorescence intensity of each F-Ib was normalized to the F-NR one. Median  $\pm$  SD is shown (n=3). \*\*\* P < 0.001, \*\*\*\* P < 0.0001. **(D)** Representative field on fixed HmB or Hm cells expressing selected F-Ib. F-NR was a hs2dAb negative control, F-B20 was representative of all negative hits whereas F-B6, F-B12, F-B15 and F-B50 were the strongest positives hits (scale bars, 10  $\mu$ m).

**Figure 2: Functionality and selectivity of F-Ib in H2882 engineered cell lines.** Protein interference mechanism was evaluated with mCherry fluorescence quantification by flow cytometry in various H2882 derivative cell lines engineered with H2B-mCherry fused to RHOB or RAC1 mutant

constructs. **(A)** F-box domain is responsible of RHOB degradation in HmB cell line. F-Ib and Ib were transfected in HmB cell line. The median of mCherry fluorescence was determined by flow cytometry as previously described. A decrease of mCherry fluorescence is only observed with the F-Ib whereas the hs2dAb alone are not able to induce such a decay. **(B)** Degradation in HmB cell line is proteasome dependent. HmB cells were transfected with F-Ib and treated 36h with 1  $\mu$ M of MG132 (a proteasome inhibitor) or DMSO. MG132 treatment restores the fluorescence level nearly to the control level. **(C)** All RHOB positive F-Ib are conformational sensitive, selective towards the active mutant RHOB L63. After F-Ib transfection in Hm, HmB and H2B-mCherry-RHOB N19 cell lines, no significant decrease in mCherry fluorescence was observed in RHOB N19 cell line compared to the control cell line Hm for each F-Ib. F-B12 and F-B50 are not RHOA family selective. After 48h of F-Ib transfection, the mCherry fluorescence was quantified in H2B-mCherry-RAC1 L63 cell line F-B12 and F-B50 induce a significant decrease of mCherry fluorescence in RAC1 L63 cell line compared to the other F-Ib. Median of fluorescence are normalized to the NR control. Median  $\pm$  SD is shown (n=3). \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001, \*\*\*\* P < 0.0001.

**Figure 3: Endogenous RHOB activity knockdown.** **(A)** Basal endogenous RHOB activity knockdown. HeLa S3 cells were transfected 48h with F-Ib plasmids. A GST-RBD pulldown was performed for each F-Ib to control RHO-GTP level (lines RHOB-GTP, RHOA-GTP and RHOC-GTP) and the total level of RHO proteins was revealed by loading 2% of input (lines total RHOB, total RHOA and total RHOC). F-Ib production is shown with myc tag revelation and tubulin is the loading control. **(B)** Quantification of three independent GST-RBD pulldown experiments. F-B6 seems to degrade more selectively RHOB-GTP than RHOA or RHOC. F-H12 and F-B15 are pan RHO binders. The relative activity was calculated as the ratio between GTP level to input level normalized to tubulin by densitometry measurements. The relative activity was normalized to the relative amount quantified from the cells transfected with the F-NR. Normalized means  $\pm$  SEM of three independent experiments are shown. **(C)** Inhibition of endogenous RHOB activation induced by EGF treatment. HeLa S3 cells were transfected 48h with F-Ib including 24h of serum starvation. Then cells were treated 15 min by EGF and RHOB-GTP level was checked by GST-RBD pulldown. F-B12 and F-B6 are able to inhibit RHOB activation following an EGF treatment compared to the negative controls (F-NR and F-B20). Quantification is shown with normalized means  $\pm$  SEM (n=3). \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001, \*\*\*\* P < 0.0001.

**Figure 4: Specificity and conformational selectivity of the B6 intrabody towards endogenous RHOB-GTP.** **(A)** 24h after Ib transfection in HeLa S3 cells, the cell lysates were loaded separately with GDP and GTP gamma S. Then hs2dAbs were precipitated by Ni-NTA beads. The level of RHOB-GDP and RHOB-GTP gamma S bound to the Ib were revealed with an anti-RHOB antibody. The GST-RBD pulldown was used as a positive control. hs2dAbs B6 and B12 are conformational

intrabodies selective to GTP gamma S loaded RHO. **(B)** HeLa S3 cells were transfected 24h with Ib plasmids. Co-immunoprecipitation of His tag intrabodies was compared to GST-RBD pulldown as control to reveal the cellular level of active RHO-GTP (lines RHOB-GTP, RHOA-GTP and RHOC-GTP). The total level of RHO proteins was revealed by loading 2% of input (lines total RHOB, total RHOA and total RHOC). Ib production is shown with myc tag revelation and tubulin is the loading control. **(C)** Quantification of three independent intrabody co-immunoprecipitation experiments. The relative activity was calculated as the ratio between GTP level to input level normalized to tubulin. The relative activity was normalized to the relative amount quantified from the cells transfected with the B12. B6 immunoprecipitates more selectively RHOB-GTP than RHOA or RHOC. B12 is a pan active RHO binder. Normalized means  $\pm$  SEM are shown (n=3). \*\*\*\* P<0.0001. **(D)** Surface representation of the B6/ RHOB-GTP complex. Interactions between RHOB (gray) and hs2dAb B6 (black) are displayed in two orientations. The loops CDR1, CDR2, and CDR3 are colored magenta, yellow and green, respectively. GTP is also represented. **(E)** Ribbon stereoview representation detailing the interaction at the contact interface viewed in the same orientation as in left. Interactions involve residues from the switch loop I (SWI, purple), “RHOB insert” helix (RhoI, dark blue), and the CDR3 loop (green). A bound  $Mg^{2+}$  ion is shown as a green sphere. Orientation is the same as in figure 4D. (PDB accession code 5L4P).

**Figure 5: RHOB activity knockdown increases migration and invasion of BEAS-2B cells.** **(A)** Scheme of migration’s experiment. Cells were not induced (condition 1), induced 48h (2) or induced 24h and then doxycycline was removed for 24h (3). **(B)** RHOB-GTP level in BEAS-2B cells is revealed with a GST-RBD pulldown. RHOB-GTP is knockdown when F-B6 expression is induced for 48h and RHOB-GTP level is restored when dox induction of F-B6 is stopped 24h. **(C)** F-B6 induces BEAS-2B cells migration in a Transwell system compared to the F-NR control and the non-induced condition. Migration is stopped when dox is removed 24h (F-B6 condition 3) showing that RHOB-GTP knockdown is directly responsible of cells migration. **(D)** F-B6 induction increases invasion compared to the non-induced (F-B6-) and the negative control (F-NR). These effects are dependent of AKT1 phosphorylation **(E)** and RAC1 activation **(F)**. AKT1 was immunoprecipitated and revealed with an anti-phospho-S473 AKT antibody. Quantification of three independent immunoprecipitation’s experiments shows level of phosphorylated AKT1 normalized to AKT1 level on beads **(E)**. RAC1 active fraction was revealed with a GST-PAKBD pulldown and three independent experiments were quantified. Relative RAC1 activity was calculated as the ratio between GTP level to input level normalized to each F-Ib non induced activity **(F)**. **(G)** RHOB-GTP degradation by F-B6 induces migration and invasion of BEAS-2B cells through AKT1 phosphorylation and RAC1 activation. Data in D, E and F are normalized means  $\pm$  SEM (n=3) and data in C represents normalized means  $\pm$  SD (n=3). \*\* P < 0.01, \*\*\*\* P < 0.0001.

Figure 1

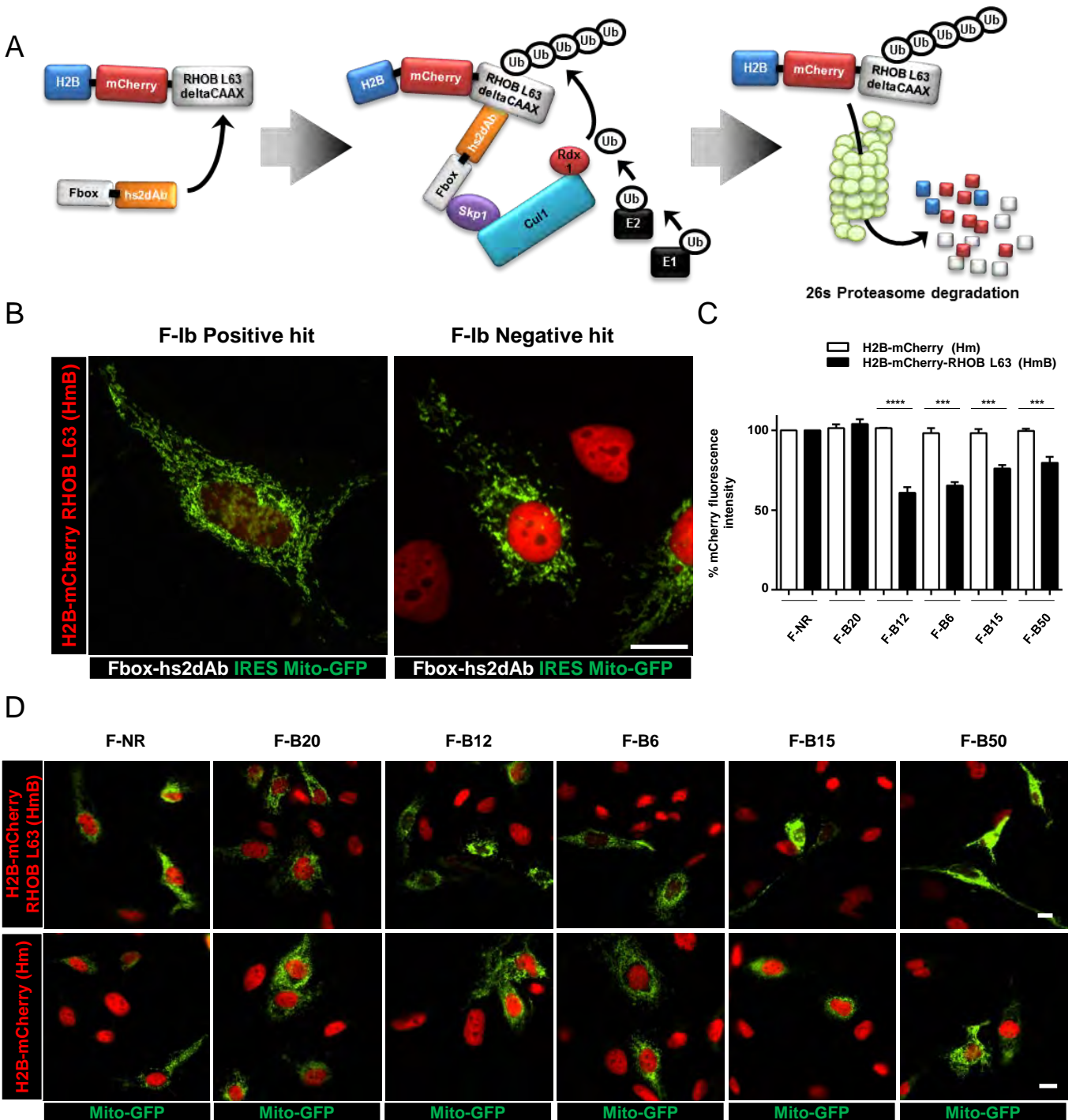
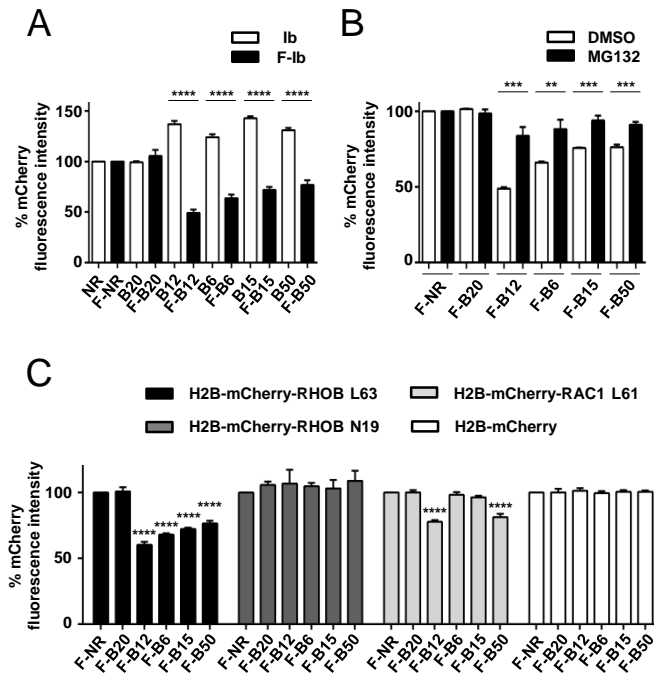
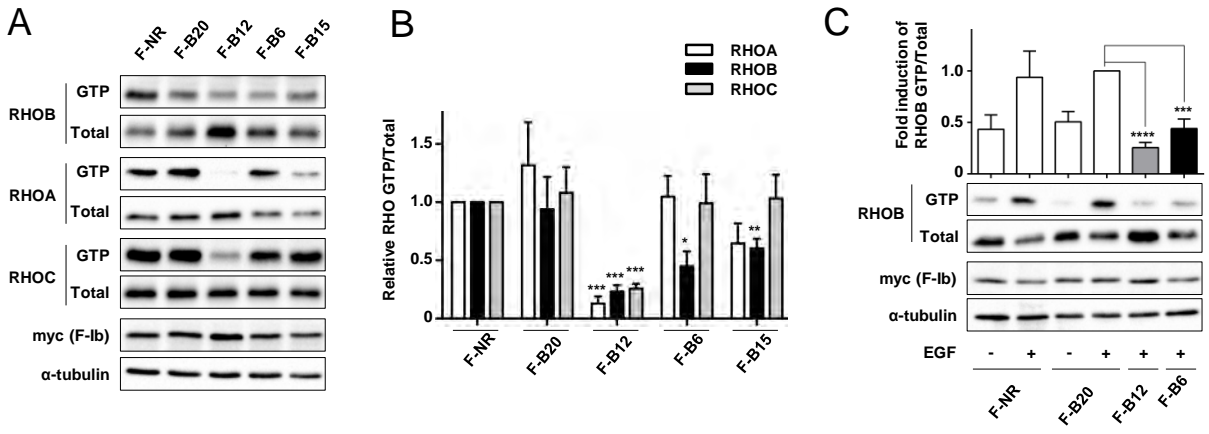




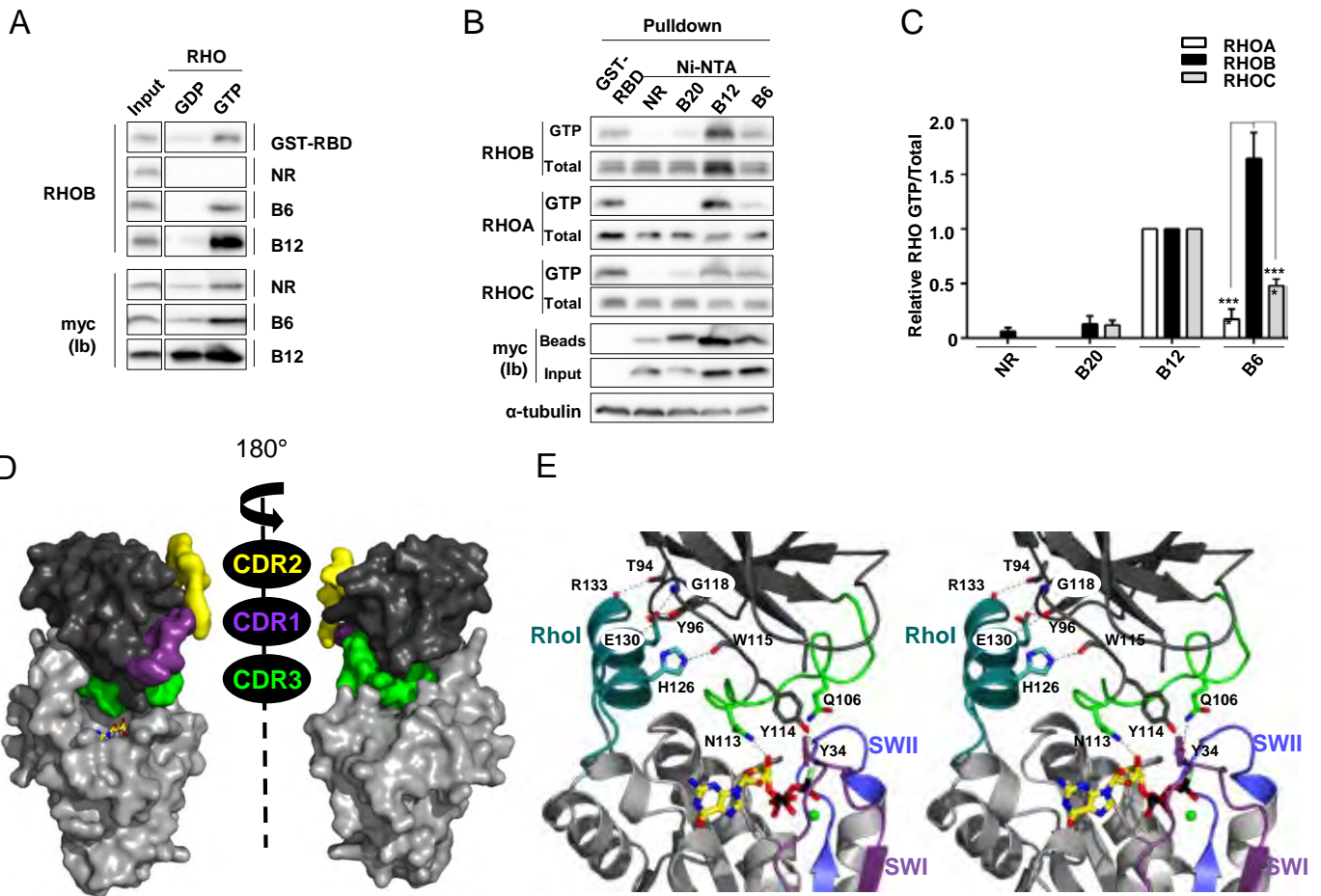
Figure 2



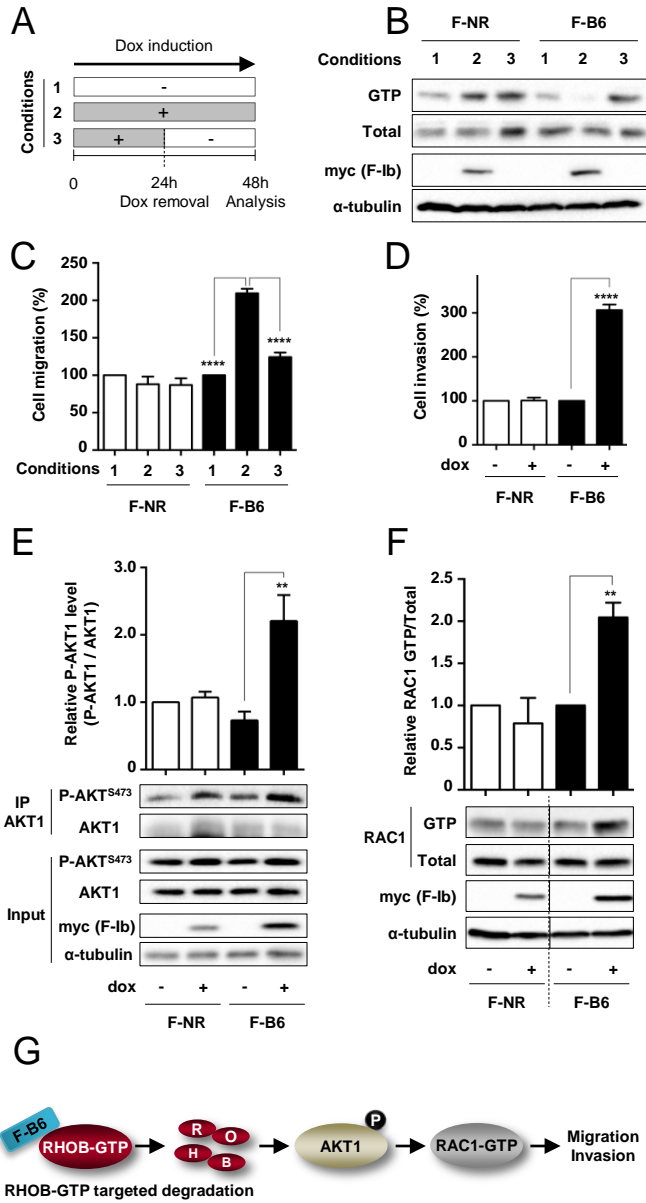
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



## Supplementary Information

### **Intrabody-mediated selective protein interference against activated form of RHOB reveals the role of RHOB-GTP in lung cancer invasion.**

Nicolas Bery<sup>1,2</sup>, Laura Keller<sup>1,2,3</sup>; Marjorie Soulié<sup>1</sup>, Anne-Laure Iscache<sup>1,3</sup>, Rémi Gence<sup>1,2</sup>, Julia Cherier<sup>1,3</sup>, Stéphanie Cabantous<sup>1</sup>, Isabelle Lajoie-Mazenc<sup>1,2</sup>, Jean-Denis Pedelacq<sup>4</sup>, Gilles Favre<sup>1,2,3,5</sup>, Aurélien Olichon<sup>1,2,5</sup>

#### **Supplementary Methods**

##### **Cell culture, transient transfection and treatment**

HeLa S3 cell lines (Cervical adenocarcinoma; ATCC, CCL-2.2 obtained from Yvan Martineau) and Human bronchial epithelial cell lines BEAS-2B (ATCC CRL-9609) were grown in DMEM supplemented with 10% FCS and H2882 stable cell lines were grown in RPMI supplemented with 10% FCS at 37°C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>. Transient transfection of small interfering RNA (siRNA; Eurogentec) and DNA plasmids were performed using the Jet Prime method, as indicated by the supplier (PolyPlus Transfection). The sequences used were two siRNAs against the 3 untranslated region of RHOB siB10 (5'GGCAUUCUCUAAAAGCUAUG3') and siB12 (5'GCUAAGAUGGUGUUUUUA3'), and siCtl (5'UGGUCACAAAGUCGCAUGA3', random sequence from Eurogentec) at 25 nM.

Epithelial Growth Factor (EGF, Sigma) treatment was performed at 50 ng.mL<sup>-1</sup> after 24h of serum deprivation. Proteasome inhibition was done adding 1 μM of proteasome inhibitor MG132 (Sigma) or 1 μM bortezomib (Selleckchem) in cell growth medium for 36h. Induction of F-hs2dAb expression in BEAS-2B stable cells lines was done using doxycycline (Clontech).

##### **Immunofluorescence staining**

Transfected cells were either fixed in 3.7% paraformaldehyde and directly mounted in Mowiol, or permeabilized with PBS-Triton 0.1%, blocked with PBS-BSA 8%, incubated with a mouse monoclonal anti-myc tag (clone 9E10, a gift from S. Moutel) and with an Alexa 488 or 350 secondary antibody (Invitrogen) and mounted in Mowiol. Data acquisition was carried out on a Nikon Eclipse 90i and image processing with NIS Elements v3 software.

### **Flow cytometry analysis**

48h after transfection, at least 10000 cells were analyzed on a MoFlo Astrios flow cytometer for their nuclear mCherry fluorescence intensity. This fluorescence was analyzed in mGFP transfected cells and non-transfected cells. Flow cytometry data were analyzed with Kaluza software (Beckman Coulter).

### **Western blot analyses**

Cell extracts were separated on SDS-PAGE and electrotransferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Blots were probed with a rabbit polyclonal anti-RHOB (Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-RHOA (Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal RHOC (Cell Signaling Technology), rabbit polyclonal anti-phosphorylated AKT (S473, Cell Signaling Technology), mouse monoclonal anti-AKT1 (Cell Signaling Technology), goat polyclonal anti-myc tag HRP conjugated (Novus Biologicals), mouse monoclonal anti-tubulin (Sigma), and rabbit polyclonal anti-RAC1 (Millipore). Detection was performed using peroxidase-conjugated secondary antibodies and chemiluminescence detection kit (Biorad).

### **Quantification of RHO and RAC1 activation**

Pull down of endogenous activated RHO or RAC proteins were performed as established previously. Cells ( $5 \cdot 10^6$  per pulldown) were lysed in buffer (50 mM Tris pH 7.4, 500 mM NaCl / 10 mM MgCl<sub>2</sub> / 0.5% Triton X100) for GST-RBD pulldown or in buffer (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM EGTA, and 0.5% sodium deoxycholate) for GST-PAKBD pulldown, each buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors. GST-RBD or GST-PAKBD (30 μg) was incubated with cleared lysate for 45 min at 4°C. Beads were washed 3 times with washing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween20) and denatured in 2X Laemmli reducing sample buffer, boiled for 5 minutes and separated on 12.5% SDS-PAGE for Western Blot analysis.

### **Immunoprecipitation**

For immunoprecipitation, cells were harvested in cell lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, glycerol 10%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM), supplemented protease and phosphatase inhibitors. Cleared lysate (0.5 mg) was then incubated with 2 μg of antibodies and 50 μL of protein A/G PLUS-Agarose (Repligen) for 4h at 4°C. Beads were washed three times in lysis buffer, and immunoprecipitates were then analyzed by Western blotting.

### **Migration and invasion assays**

The migration and invasion assays were performed as describe elsewhere (1) with a Transwell system (8- $\mu$ m pore size, BD Biosciences). Briefly, cells ( $20 \cdot 10^3$  or  $25 \cdot 10^3$  per well) were added in serum-free medium in the upper compartment of the filter. The bottom chamber was filled with complete medium. At 24 or 48h later, cells on the bottom surface of the filter were counted, after staining, under a Nikon inverted microscope in three randomized fields of 505 mm. Cell invasion assay was performed in conditions similar to above, with wells precoated with Matrigel (BD Biosciences). Forty-eight hours later, cells were fixed, stained, and counted as above.

### **MTS assay**

2000 cells per well were seeded in 96 well plates. 24h after, cells were induced with different doxycycline's concentrations for 48h (cell viability assay) or induced at  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  for 24, 48 or 72h (proliferation assay). The relative number of viable cells was measured by incubating cells with MTS reagent (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay from Promega) following the manufacturer's recommendations. Relative cell survival in the presence of doxycycline was normalized to the non-induced cells after background corrections.

**Supplementary Table 1- Data collection, phasing, and refinement statistics.**

Data collection	ID29 (ESRF)
Wavelength (Å)	0.965
Space group	P 1 21 1
Cell dimensions(Å)	66.84 70.227 71.212 90 107.681 90
Resolution (Å) <sup>a</sup>	47.17 - 1.5 (1.554 - 1.5)
R <sub>meas</sub> (%) <sup>b</sup>	0.0336 (0.4618)
CC* (%) <sup>c</sup>	1 (0.973)
Mean I/sigma(I)	20.06 (2.22)
Completeness (%)	0.95 (0.73)
Reflections, total	284589 (15398)
Reflections, unique	95400 (7264)
Multiplicity	3.0 (2.1)
R <sub>work</sub> (%) <sup>d</sup>	0.1542 (0.2400)
R <sub>free</sub> (%) <sup>d</sup>	0.1774 (0.2792)
Number of non-hydrogen atoms	5789
macromolecules	4882
water	821
ligands	74
Average B-factor (Å <sup>2</sup> )	31.31
Rmsd bond lengths (Å)	0.014
Rmsd bond angles (°)	1.36
Ramachandran favored (%)	98
Ramachandran allowed (%)	2

<sup>a</sup> Highest resolution shell is shown in parenthesis.

$$^b R_{\text{meas}} = \left( \sum_{hkl} \sqrt{\frac{n}{n-1}} \sum_{i=1}^n |I_i(hkl) - \bar{I}(hkl)| \right) / \sum_{hkl} \sum_{i=1}^n I_i(hkl)$$

$$^c CC^* = \sqrt{2CC_{1/2} / (1 + CC_{1/2})}$$

<sup>d</sup> R<sub>work</sub> =  $\sum_{hkl} (|F_{\text{obs}}(hkl)| - |F_{\text{calc}}(hkl)|) / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}(hkl)|$  and R<sub>free</sub> is the R value for a test set of reflections consisting of a random 5% of the diffraction data not used in refinement.



**Supplementary Figure 1: Scheme of the direct selection screen of intrabodies degrading active RHOB.** Step1: A subtractive phage display to enrich binders of RHOB GTP loaded form was performed on the NaLi-H1 hs2dAb library. Step2: sub-libraries of the 4th round of phage display were cloned into the p-F-Ib-IRES-Mito-mGFP plasmid that allows expression of both F-box-hs2dAb-6his-Myc and a mitoGFP as a fluorescent reporter. Step3: constructions were then transfected as individual clones into the H2882-H2B-mCherry-RHOB L63deltaCAAX (HmB) cell line. Transfected cells using pF-Ib-IRES-mitoGFP display green fluorescent mitochondria. Positive hits induce nuclear red fluorescence decay.

**Supplementary Figure 2: F-Ib cellular localization in HmB cell line.** F-Ib were expressed from the p-F-Ib-IRES-Mito-mGFP bicistronic vector in HmB cell line. 48h after transfection, F-Ib localization was revealed after immunofluorescence staining of their carboxy terminal myc tag. F-NR and F-B20 were expressed in the whole cell whereas F-B12, F-B6, F-B15 and F-B50 were mainly localized into the nucleus of cells. Scale bar: 10  $\mu$ m.

**Supplementary Figure 3: hs2dAb intrabodies (Ib) selectivity was further confirmed by a nuclear re-localization assay of Hs2dAb fused to GFP.** Ib-GFP were co-transfected in HeLa cells with each of the nuclear construct H2B-mCherry (mCherry), H2B-mCherry-RHOBL63, H2B-mCherry-RHOBN19, or H2B-mCherry-RAC1 L61. Similarly to the negative control H2B-mCherry, any Ib-GFP was able to re-localize into the nucleus when RHOB N19 was over-expressed in this sub-cellular compartment. Hs2dAb B12 and B50 re-localize into the nucleus when RAC1 L61 mutant was over-expressed as well as GTP-bound RHOB L63 whereas B15 and B6 were only nuclear together with RHOB L63. Scale bar: 10  $\mu$ m.

**Supplementary Figure 4: RHOB activation knockdown upon EGF stimulation.** (A) RHOB activation after an EGF treatment. HeLa S3 cells were transfected with F-NR control 48h including 24h of serum starvation. At 48h of transfection, cells were treated at an EGF concentration of 50 ng.mL<sup>-1</sup> for indicated times. A GST-RBD pulldown was performed to monitor the RHO-GTP induction following this treatment. RHOB is activated within 5 min until 30 min and a second wave of activation is shown at 120 min. RHOA and RHOC are activated only between 5 and 30 min with a maximum at 5 min. (B&C) After 15 min of EGF treatment and 48h of cells transfection by F-Ib, RHOA-GTP (B) and RHOC-GTP (C) levels were analysed. Unlike F-B12, F-B6 is not able to inhibit

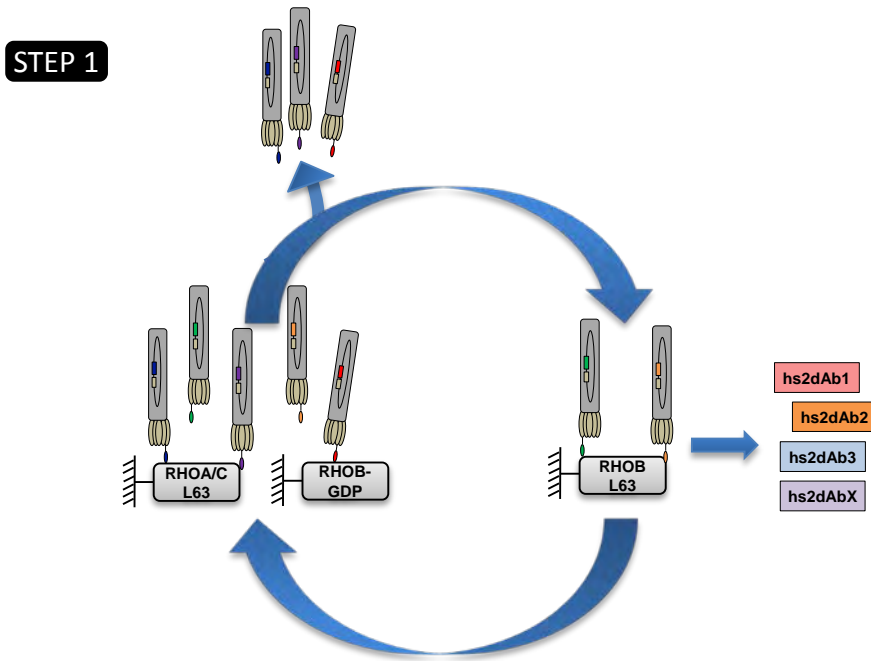
RHOA or RHOC activation following an EGF treatment compared to the negative control. Quantification is shown with normalized means  $\pm$  SEM of three independent experiments. Ns: non significant, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

**Supplementary Figure 5: Affinity determination.** Single Cycle Kinetics analysis were simultaneously performed on immobilized His6-B6 hs2dAb (250-300 RU), with five injections of RHOB-L63 purified protein at 3.125nM, 6.25nM, 12.5nM, 25nM, and 50nM (arrows). Analytes injections lasted for 120s each and were separated by 10s dissociation phases. Off-rate constant were calculated from an extended dissociation period of 10 min following the last injection according to the single cycle kinetics method. The sensorgram (expressed in RUs as a function of time in seconds) represents a differential response where the response on an empty reference channel (Fc1) was subtracted. A channel with immobilized nonspecific hs2dAb (NR) was used as control and gave no binding. The red curves correspond to the data and the black curves represent the fit done by the BIAevaluation software.

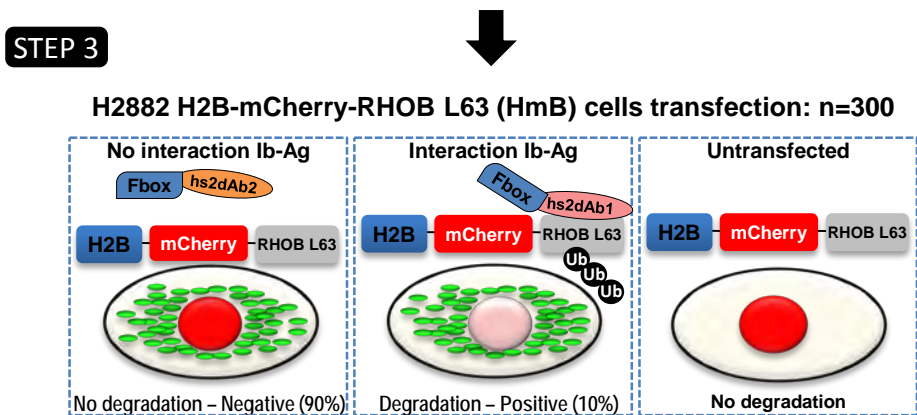
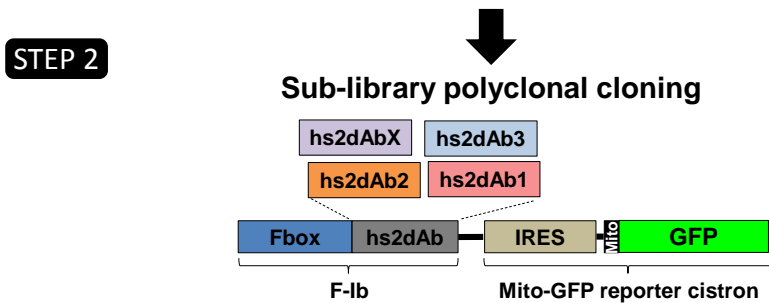
**Supplementary Figure 6: Characterization of the stable cell lines with tetracycline inducible (Tet-On) F-Ib expression.** BEAS-2B cells were transduced with a F-Ib-IRES-BFP lentiviral vector including a tetracycline inducible (Tet-On) F-Ib expression. **(A)** F-NR and F-B6 cell lines were treated with an increased dose of doxycycline during 24h and 48h and the production of F-Ib was analysed by western blot analyses (myc tag). The maximal expression of F-NR and F-B6 started at 48h after induction at  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . After 48h of F-Ib induction at various doxycycline concentrations, RHO-GTP levels were followed and quantified with a GST-RBD pulldown, RHOB-GTP **(B)**, RHOA-GTP **(C)** and RHOC-GTP **(D)**. RHOB-GTP selectivity of F-B6 is still conserved and a dose response effect is shown for RHOB-GTP degradation. Data are normalized means  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ . **(E)** BEAS-2B cell viability was measured by a MTS assay incubating cells with an increased doxycycline doses for 48h. No difference is visualized between F-NR and F-B6 for a dox dose. The relative viabilities normalized by the ones of no treatment ( $0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) were determined as means  $\pm$  SD from four independent experiments. **(F)** A proliferation assay was performed at a dox dose of  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . BEAS-2B cells were incubated with doxycycline for 24, 48 and 72h and proliferation was measured with a MTS assay. Proliferation is not modified when F-NR and F-B6 are produced by their respective cell lines. Data are means  $\pm$  SD from three independent experiments. **(G)** RHOB-GTP degradation induced by F-B6 is rescued by the proteasome inhibitor bortezomib ( $1 \mu\text{M}$ ).

**Supplementary Figure 7: SiRNA experiment on BEAS2B, RHOB inhibition increases motility and invasion of BEAS-2B cells.** (A) Extinction of RHOB protein was checked after RNAi treatment. Inhibition of RHOB expression by RNAi increases migration of BEAS-2B cells as shown in a transwell assay (B). Invasion is also enhanced after RHOB extinction (C). Normalized means  $\pm$  SD are shown (n=3). \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001.

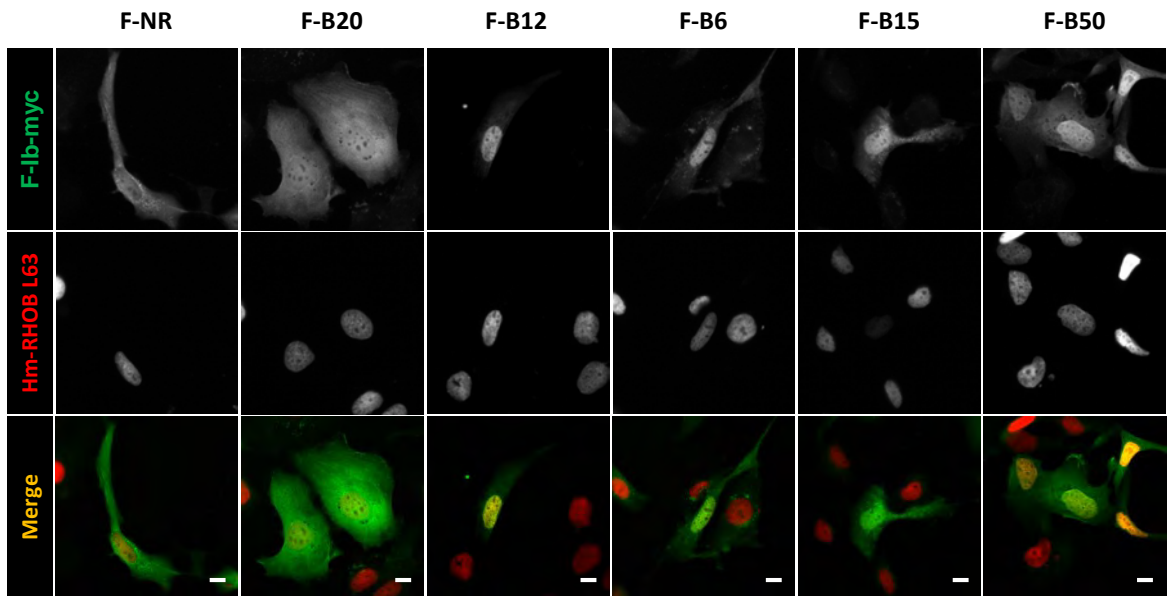
# Supplementary Figure 1



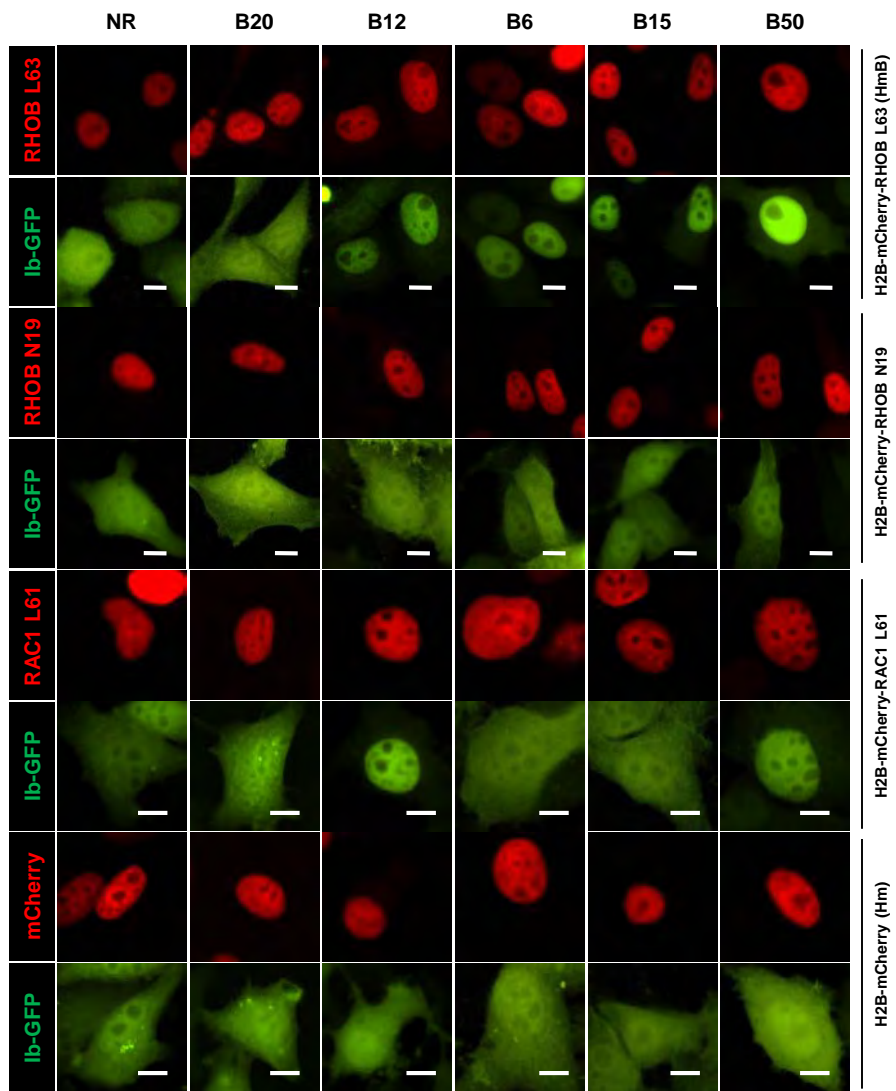
NaLi-H1 library subtractive selection by phage display to enrich specific RHOB-GTP hs2dAbs



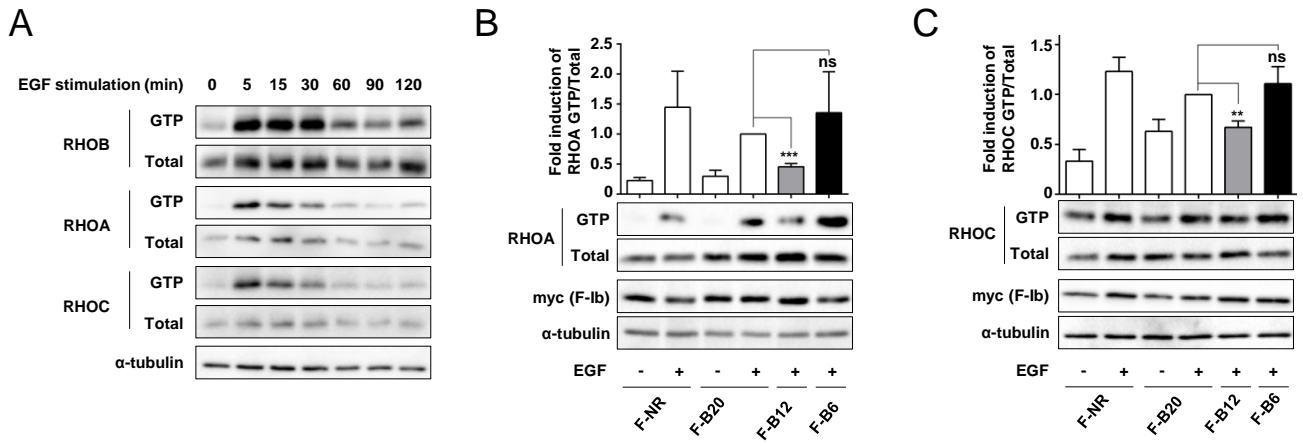
## Supplementary Figure 2



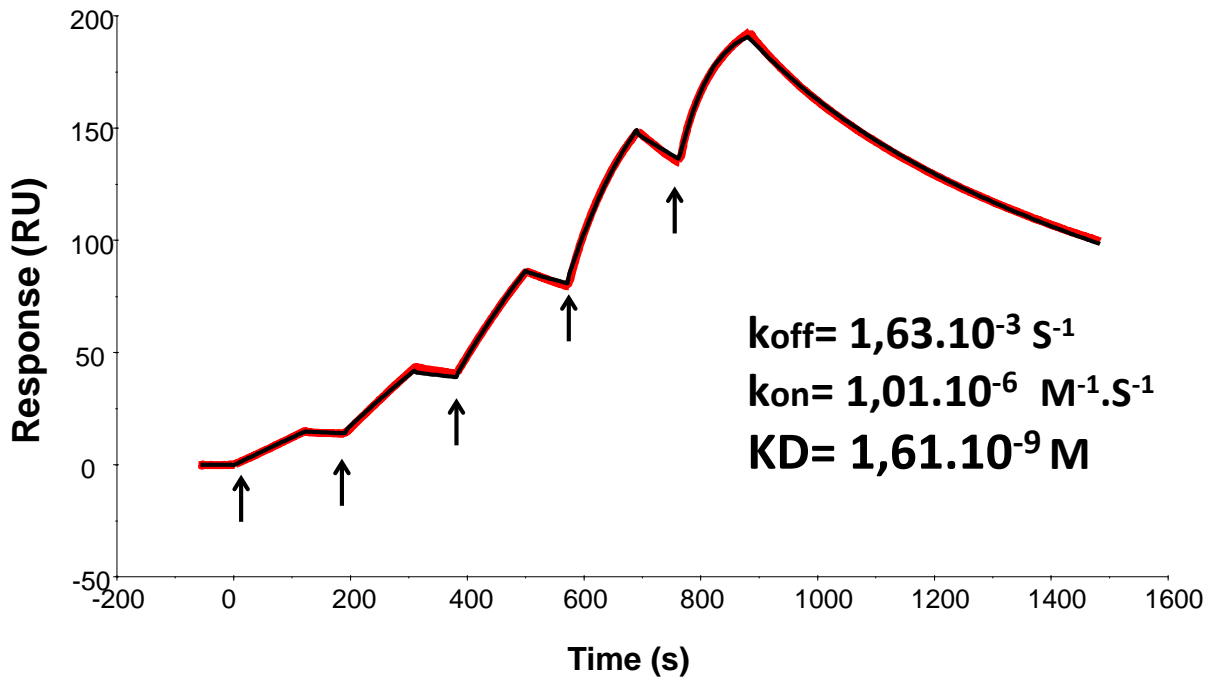
# Supplementary Figure 3



# Supplementary Figure 4



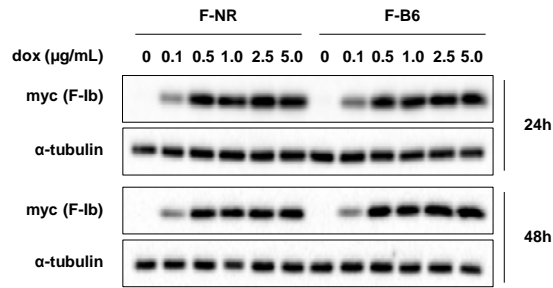
### Supplementary Figure 5



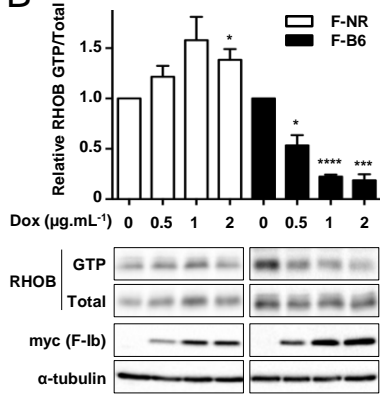


# Supplementary Figure 6

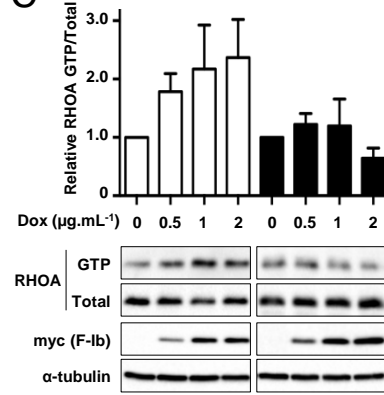
**A**



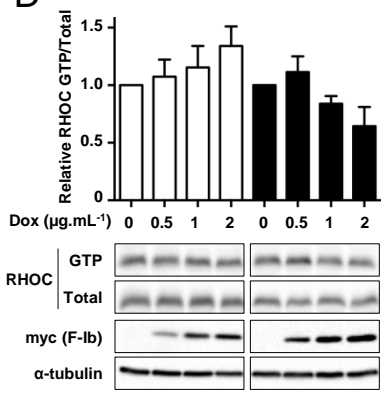
**B**



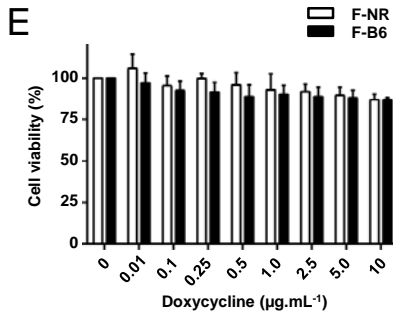
**C**



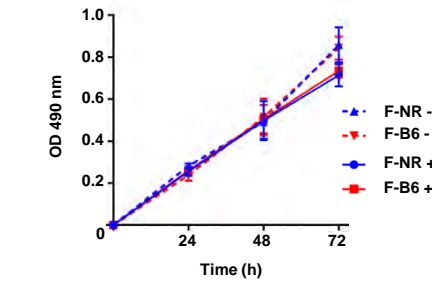
**D**



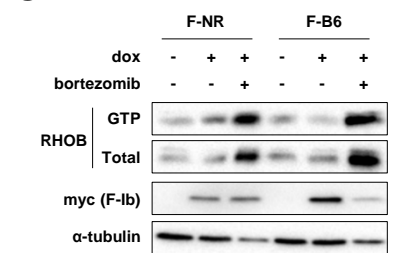
**E**



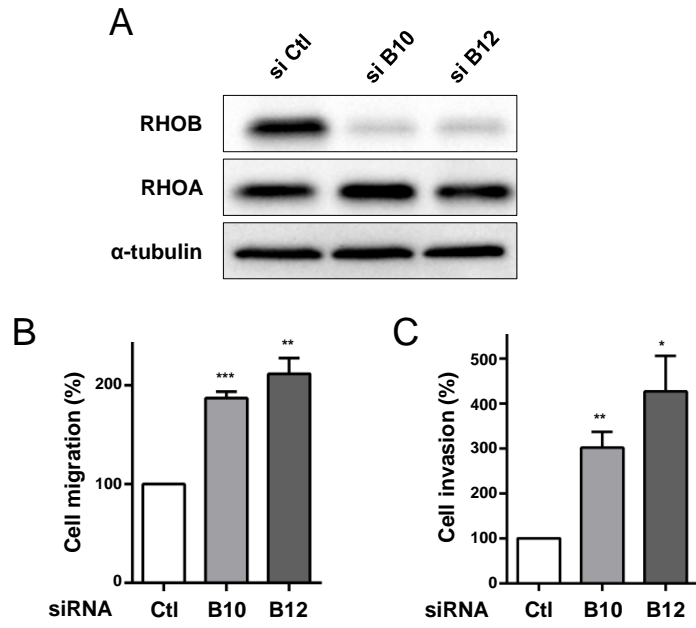
**F**



**G**



# Supplementary Figure 7



ARTICLE 3 :

## **A synthetic nanobody based ELISA assay to monitor simultaneously RHO and RAC cellular activities**

Laura Keller § ; Claudine Tardy § ; Laetitia Ligat ; Nicolas Bery ; Thomas Roux ; Alexis Aquilina ; Eric Trinquet ; Gilles Favre, Aurélien Olichon



## **A synthetic nanobody based ELISA assay to monitor simultaneously RHO and RAC cellular activities**

Laura Keller<sup>1,2,3, §</sup>; Claudine Tardy<sup>1, §</sup>; Laetitia Ligat<sup>4</sup>; Nicolas Bery<sup>1,2</sup>; Thomas Roux<sup>5</sup>; Alexis Aquilina<sup>5</sup>; Eric Trinquet<sup>5</sup>; Gilles Favre<sup>1,2,3,6</sup>, Aurélien Olichon<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup> Inserm, UMR 1037-CRCT, Toulouse, France

<sup>2</sup> Université Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse, France

<sup>3</sup> Laboratoire de Biologie Médicale Oncologique, Institut Claudius Regaud, IUCT-Oncopôle, Toulouse, France;

<sup>4</sup> Le Pôle Technologique du Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, plateau de protéomique, Toulouse, France;

<sup>5</sup> Cisbio Bioassay, Cogolet, France

<sup>6</sup> To whom correspondence may be addressed. E-mail: [aurelien.olichon@inserm.fr](mailto:aurelien.olichon@inserm.fr) and [gilles.favre@inserm.fr](mailto:gilles.favre@inserm.fr)

<sup>§</sup> These authors contributed equally to this work

### Competing interests

¶ L.K., N.B., G.F. and A.O. are co-inventors on the patent PTC/EP2016/052136, concerning the RHO GTP single domain antibodies discovery and their applications. The other authors declare no conflict of interest.

### Author contributions

Conception and design: L.K., C.T., and A.O

Development of methodology: L.K., C.T., G.F. and A.O

Acquisition of data (including facilities): L.K., C.T., and L.L.

Analysis and interpretation of data: L.K., C.T., T.R, A.A, E.T, G.F. and A.O.

Writing, review, and/or revision of the manuscript: L.K., C.T., G.F. and A.O

Administrative, technical, or material support: T.R, A.A, N.B., L.L.,

Study supervision: G.F. and A.O

Financial support: G.F.

## **INTRODUCTION**

RHO GTPases are molecular switches activating through their GTP-bound state major cellular pathways. Since the development of affinity measurement of their activity almost two decades ago<sup>1,2</sup>, the standard method to monitor their active state level is based on its trapping by the Rho Binding Domain (RBD) of the effector Rhotekin. Immunodetection in western blot or ELISA allows the identification of the RHO protein of interest<sup>3,4</sup>. Several commercial kits based on high affinity

recombinant RBD of various small G effectors allow the detection of RHO, RAC or CDC42, ARF1, RAL or RAS activities. The two main formats are pull down from agarose beads or the G-LISA assay, which is more sensitive and requires less material than pull down assay. These assays rely in essence on the capacity to capture enough amount of GTP bound RHO in a race against time that should not exceed 45 minutes <sup>1</sup>. Several biochemical and practical optimizations have been established to avoid as most as possible signal loss due to GTP hydrolysis or RHO denaturation <sup>5</sup>: (i) the lysis buffer should contain enough detergent to extract all the cellular RHO studied while preserving their native GTP-bound conformation, at least 0,5 molar NaCl to block GAPs activities and may include GDP to quench post-lytic GTP loading <sup>6</sup>; (ii) cells should be harvested on ice in a short period of time and lysate should be quickly cleared at low temperature; (iii) freeze thaw cycle of the lysate may also induce denaturation and decrease the specific signal <sup>4</sup>. The pull down assays are poorly sensitive, thus require highly concentrated cell extract and high amount of GST-RBD. Furthermore this format suffers from a lack of reproducibility due to a lot of manipulations from the capture of active form in cell extract to the western blot revelation. The G-LISA assay requires lower quantity of protein, is slightly more sensitive when optimized and mostly allows simultaneous treatment of more samples in a reproducible manner <sup>4</sup>. Despite these optimizations, the recombinant RHO binding domain affinities impose the need to use highly concentrated extract, which is a limitation for samples with precious material. Moreover these recombinant domains are very unstable proteins that need to be solubilized by GST fusion or stabilized by covalent link to a surface, thus limiting the flexibility to develop other RBD based assays<sup>7</sup>.

We previously identified a humanized synthetic single domain antibody (hs2dAb) with sub-nanomolar affinity towards the constitutively active (CA) mutant of RHOA subfamily as well as RAC1, referred here as RH12 for RHO clone H12<sup>8</sup>. Such nanobodies are very robust molecular binders that can withstand high range of buffer conditions, fusion tags or functionalization <sup>9</sup>. In this report we evaluated the potential to develop a capture ELISA assay to monitor RHOA and RAC1 from the same cellular extract and in the same binding buffer condition. Without optimization of the capture and the solid phase, we demonstrate that the RH12 hs2dAb is a very efficient GTP bound RHOA/RAC protein sensor of RHO and RAC1 cellular activation with unravel sensitivity.

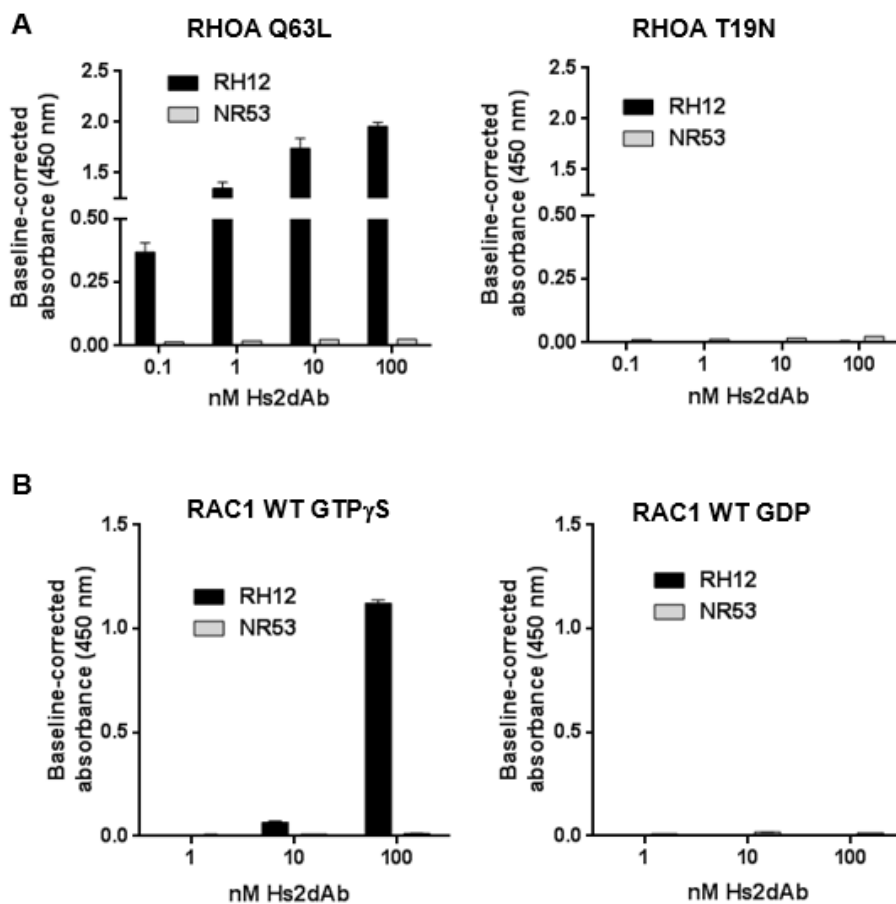
## **RESULTS**

### **Characterization of RH12 selectivity for GTP bound RHOA and RAC1**

RH12 was previously identified as detecting GST fused active RHOA or RAC1 in antibody fragment ELISA from bacterial supernatant. Purified RH12 selectivity was demonstrated in pull down of GTP versus GDP loaded cellular extract and immuno-detection of RHOA, as well as SPR affinity measurement on recombinant mutants of RHOA/RAC proteins<sup>8</sup>. In this study we expressed in *E.coli*

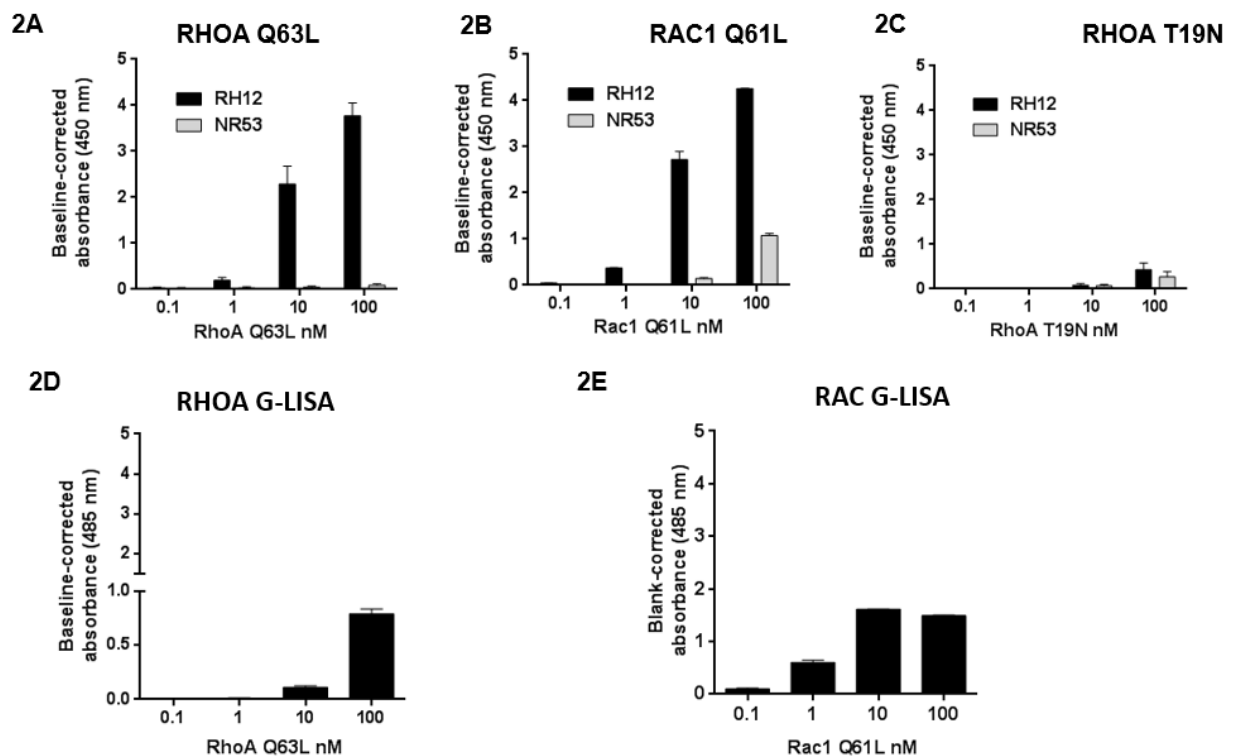
cytosol the RH12 with a carboxy terminal tag consist in 6His-Myc-6His and purified milligrams of proteins using IMAC. As a negative control we used an hs2dAb from the same library that was identified from a screen against a fluorescent protein, referred as NR53 for Non RHO. We first validated the purified RH12 protein in ELISA detecting recombinant RHO proteins with a N-terminal twin Streptag® and HA tag captured on streptactin plates.

The RH12 or NR53 were tested in ten-fold serial dilutions from 100 nM to 100 pM for the detection of CA mutant RHOA Q63L or dominant negative (DN) RHOA T19N. As expected, the results showed for the RH12 a very selective detection of the CA RHOA even at lowest dilution and no signal on DN RHOA (Figure 1A). Similarly, wild type (WT) RAC1 recombinant protein was loaded with either non-hydrolysable GTP $\gamma$ S or GDP before capture on streptactin plates and detected by different dilutions of the RH12. RH12 showed full selectivity recognition towards the GTP bound RAC1. However in these conditions the sensitivity appeared lower than on the RHOA CA mutant as no signal was obtained below 10 nM suggesting that RH12 might be slightly more selective towards RHOA than RAC1 (Figure 1B).



**Figure 1: RH12 selective detection of active conformation of RHOA and RAC1 recombinant proteins.** (A) Streptactin plates were coated at saturation with either 2S HA RHOA Q63L or 2S HA RHOA T19N. Absorbance at 405 nm reflects myc signal after hs2dAb (RH12-myc or NR53-myc) dose-effect. (B) Streptactin plates were coated with either 2S HA WT RAC1 GTP $\gamma$ S or GDP loaded. Absorbance at 405 nm reflects myc signal after Hs2dAb (RH12-myc or NR53-myc) dose-effect.

In order to develop a capture ELISA assay, we inverted the format and tested whether the RH12 could trap recombinant RHO proteins. The RH12 was bound by the 6His tag affinity to Ni<sup>2+</sup> NTA functionalized surface in 96 well format. After blocking the solid phase with 5% milk, ten-fold serial dilutions of 2S-HA tagged RHO or RAC mutant were incubated and further revealed using HRP conjugated streptactin as a tracer. As shown in Figure 2, CA mutants of both RHOA and RAC1 were efficiently and specifically captured with the RH12 down to concentrations as low as 1 nanomolar. In parallel the CA conformation of the purified mutant of RHOA and RAC1 were validated in their respective G-LISA assay (Figure 2D, 2E). Although the protocols and the tracers were different in several ways, we noticed that the RH12 ELISA capture without optimization was relatively sensitive as the RHOA G-LISA could not detect 1 nanomolar of the recombinant proteins (Figure 2). Conversely, the RAC1 G-LISA was as sensitive as the RH12 trapping assay, probably because the RAC1 primary revelation antibody has higher affinity than the one in the RHOA G-LISA assay.



**Figure 2: RH12 selective capture of CA 2SHA-RHOA and 2SHA-RAC1 recombinant proteins.** Nickel-coated plates were coated with either hs2dAb RH12 or NR53 at 0,5  $\mu$ M and absorbance at 450 nm reflects (A) RHOA signal after RHOA Q63L (B) RAC1 signal after RAC1 Q61L and (C) RHOA signal after RHOA T19N dose-effect. (D) RHOA signal after RHOA Q63L dose-effect in RHO G-LISA. (E) RAC1 signal after RAC1 Q61L dose-effect in RAC G-LISA



To gain insight whether this result could be partly due to relative affinities of the RH12 and the RBD of the RHOTEKIN used in G-LISA, we expressed and purified the RBD fused to the same 6His-Myc-6His tag as the RH12 and assessed the affinities of both proteins in SPR. We tried to get accurate measurements either by immobilization of RHO on the sensor chip surface or in an inverted format by immobilization of the hs2dAb on the sensor chip. The poor stability of the recombinant RBD when flowing did not lead to acceptable measurements, therefore we compared RH12 and RBD relative affinities when they were immobilized on Ni-NTA sensor chip<sup>10</sup>. According to Figure 3, the RH12 gave  $K_D$  values in the low nanomolar range for the CA mutants of RHOA/B/C subgroup as well as RAC1 mutant whereas no binding was measured on CA CDC42 or DN RHOA mutant. These results were fully matching our previous affinity assessments on a RH12 carrying different tags<sup>8</sup>. In the same conditions, the RBD showed only micromolar affinity towards CA RHOA, which is one order of magnitude lower than previously reported using a different assay<sup>11</sup>. We also measured binding kinetics of RH12 and RBD to WT RHOA after guanine nucleotide loading. We observed again that RH12 had nanomolar affinity to the RHOA and RAC1 loaded with non-hydrolysable GTP $\gamma$ S while the RBD had only micromolar affinity towards RHOA. Although calculated  $K_D$  values of both binding domain towards the GDP loaded RHOA appeared less than one order of magnitude higher than for their respective one for the GTP conformation, which might suggest a poor conformational selectivity, we noticed that 20 times less resonance units (RU) were captured by RH12 while RHOA was loaded with GDP than GTP. For the same protein preparation, the number of RU is also an important parameter to consider as it may reflect the heterogeneity of the proteins in the sample if the nucleotide loading is not complete. In contrast, the RBD could capture as many RU for both loading conditions, really indicating that the conformational selectivity of this domain towards the GTP bound RHO is relatively low. This observation is consistent with the low dynamic range of GST-RBD pull down<sup>7</sup> or G-LISA assays. Considering the RH12 affinity, we assumed that the residual RU captured by the RH12 did not reflect a lack of selectivity but more likely the presence of a residual pool of recombinant RHOA that displays a GTP conformation. Together these results on recombinant proteins demonstrated that the RH12 domain is a high affinity reagent suitable to implement a novel ELISA assay to simultaneously capture the GTP bound conformation of RHOA and RAC1.

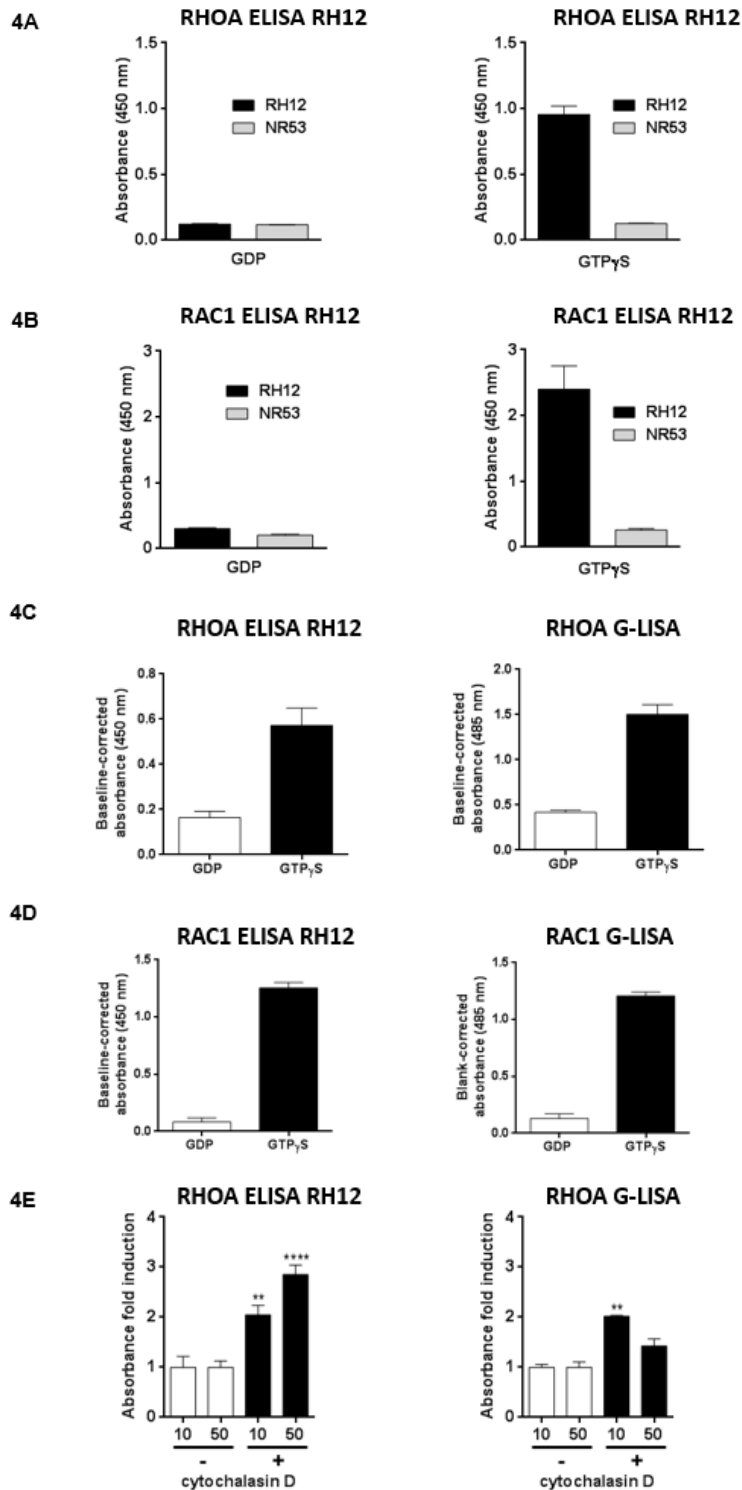
6His-myc-6His solid phase	Antigen	RU	$K_D$ (M)
<b>RH12</b>	<b>RHOAQ63L</b>	900	$0,7 \cdot 10^{-9}$
<b>RBD</b>	<b>RHOAQ63L</b>	55	$7,85 \cdot 10^{-7}$
<b>RH12</b>	<b>RHOBQ63L</b>	900	$1,57 \cdot 10^{-9}$
<b>RH12</b>	<b>RHOCQ63L</b>	800	$0,02 \cdot 10^{-9}$
<b>RH12</b>	<b>RAC1Q61L</b>	1600	$5,22 \cdot 10^{-9}$
<b>RH12</b>	<b>CDC42Q61L</b>		ND
<b>RH12</b>	<b>RHOAT19N</b>		ND
<b>RH12</b>	<b>RHOA WT GTP<math>\gamma</math>S</b>	400	$1,235 \cdot 10^{-9}$
<b>RH12</b>	<b>RHOA WT GDP</b>	20	$1,56 \cdot 10^{-8}$
<b>RBD</b>	<b>RHOA WT GTP<math>\gamma</math>S</b>	600	$1,46 \cdot 10^{-6}$
<b>RBD</b>	<b>RHOA WT GDP</b>	400	$9,01 \cdot 10^{-6}$

**Figure 3: RH12 and RBD affinities.** SPR single cycle kinetics measurements of RH12 and Rhotekin RBD fused to a 6HIS-myc-6His tag on Ni NTA sensor chip. RU corresponds to the number of resonance units allowing a curve fit. Dissociation equilibrium constant  $K_D$  corresponds to the ratio between off-rate and on-rate kinetic constant  $K_{off}/K_{on}$  calculated from the fitted curves. Flown antigen correspond to recombinant small GTPases wild type loaded with indicated guanine nucleotides or CA mutants Q63L of RHO, RHOB, RHOC, or Q61L of RAC1 and CDC42 related GTPases, as well as the DN mutant T19N of RHOA. ('ND' means no detectable binding).

### **RH12 capture ELISA of endogenous RHOA and RAC1 active conformations**

RHOA and RAC1 antagonism or crosstalk have often been analyzed in various cellular contexts and make their study obviously linked<sup>12</sup>. Considering the potential improvement of using a hs2dAb instead of RBD or PAK binding domain (BD) to monitor RHOA and RAC activities, we evaluated the performance of RH12 capture ELISA on cell extract samples from various cell lines. Firstly, to work out of the context of RHO activation and antagonism regulations and to validate the selectivity on endogenous proteins, we loaded the cell extract with GTP $\gamma$ S or GDP<sup>7</sup>. We set up the assay using similar range of total protein input as in the G-LISA, between 10 $\mu$ g and 50 $\mu$ g. After the capture step, endogenous RHOA or RAC1 had to be detected with respective specific monoclonal antibodies. Although we controlled that RH12 was able to capture ectopically expressed active RHO fused to an epitope tag and detected using anti tags, among the commercially available monoclonal antibodies

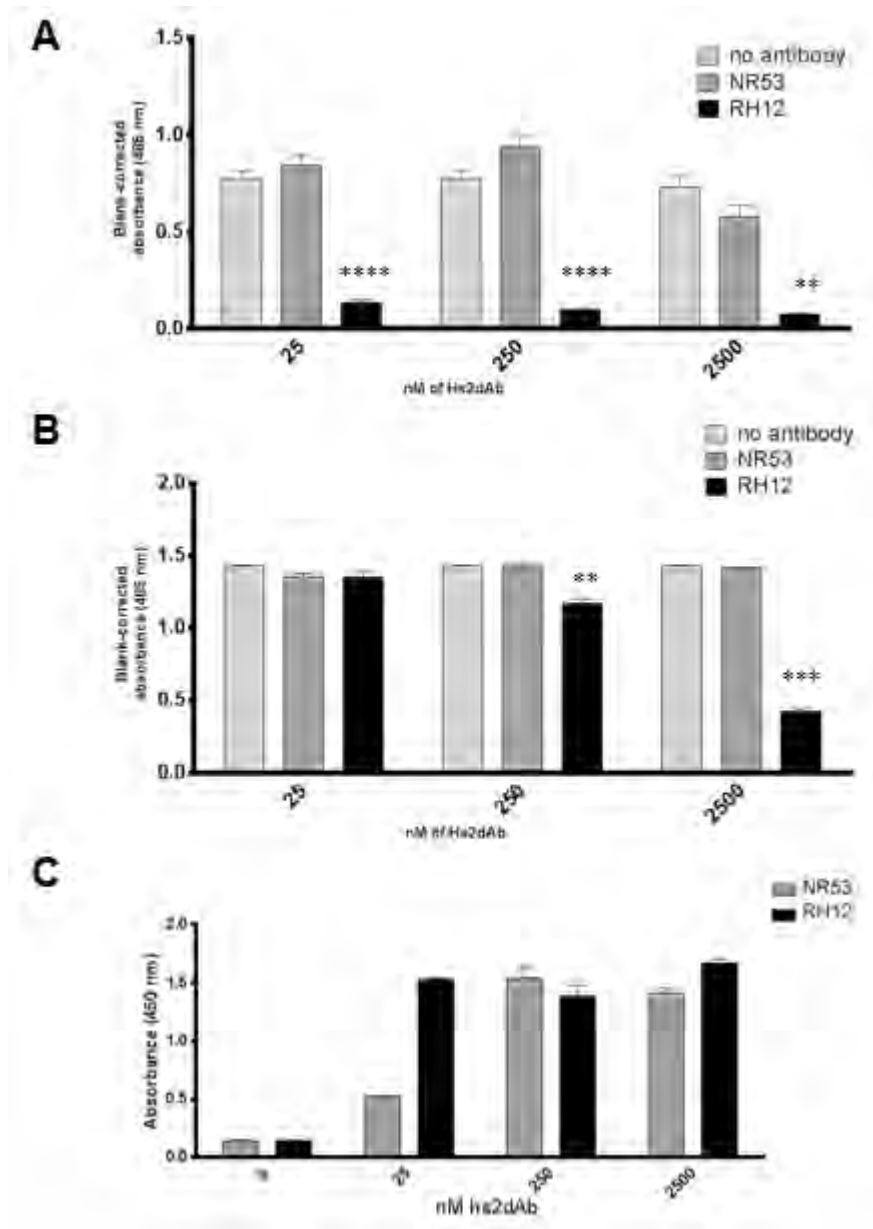
specific to RHOA subgroup or RAC1, none of them could detect GTPases trapped by the RH12 hs2dAb. We hypothesized that the recognized epitope of the detection antibodies were overlapping the RH12 epitope, thus preventing the simultaneous binding of both antibodies. Therefore we decided to unmask the epitope in the well after the selective RH12 trapping by a short treatment with 2,2,2-trichloroacetic acid (TCA) as a protein denaturing agent. TCA is a well-known protein precipitating agent that partially unfolds proteins when used at 5% (w/v), thus creating in the ELISA well a meshwork of proteins in a “molten globule” like state<sup>13</sup>. After this epitope retrieval step, most of the commercial monoclonal anti RHO or RAC could indeed detect captured protein. Note that this step is also included in the G-LISA protocol as “antigen presenting buffer”. In these assay conditions, the RH12 capture ELISA showed very good selectivity for the GTP $\gamma$ S loaded fraction of RHOA (Figure 4A) as well as of RAC1 (Figure 4B) and no background was observed with NR53 control or GDP loaded extracts. In order to control that the RH12 was capturing the active conformation of RHO proteins, we loaded the extract with guanine nucleotides and assayed the sample in parallel on the RH12 ELISA and on the G-LISA assay (Figure 4C, 4D). We obtained similar selectivity towards the GTP $\gamma$ S loaded extract when using 10 $\mu$ g of total protein. However, when cell extract was too concentrated, the GTP over GDP signal ratio of the G-LISA decreased but not the one of the RH12 capture. Finally to confirm the effective performance of the RH12 ELISA in a more physiological assay, we monitored endogenous RHOA from fresh HeLa cell extract stimulated 1 hour with cytochalasin D after serum starvation<sup>14</sup>. Again, G-LISA RHOA assay was used as a control. To prevent GTP hydrolysis, all standard precautions to preserve the active GTP bound state of RHOA were taken for both assays<sup>4</sup>. The RH12 captured both basal RHOA-GTP fraction from starved cell but more importantly efficiently captured the activated RHOA fraction as a 2 to 3 fold increase in signal was observed in stimulated cell extract (Figure 4D). While signal background ratio fluctuation according to the total protein extract input added minimal effect on the significance of the measured activation in the RH12 ELISA, an increased background signal induced a loss of significance in the G-LISA at 50 $\mu$ g of total protein (which is the highest recommended limit range for this kit). We assume that this might be probably due to the decay of the GDP to GTP signal ratio at this protein concentration. Our results demonstrated the good performance of the RH12 hs2dAb in a capture ELISA format in terms of versatility to monitor both RHOA subfamily and their homolog RAC1, but mostly in terms of exceptional conformational selectivity towards the GTP-bound fraction of these small G proteins. Furthermore, considering the capture of purified proteins of stimulated cell extract, our assay seemed to have a larger dynamic range than the state of the art.



**Figure 4: RH12 capture ELISA of endogenous RHOA and RAC1 active conformations.** Nickel-coated plates were coated with either hs2dAb RH12 or NR53 at 0,5  $\mu$ M and absorbance at 450 nm reflects (A) RHOA signal on 35  $\mu$ g of cell extract loaded with GTP $\gamma$ S or GDP. (B) RAC1 signal on 40  $\mu$ g of cell extract loaded with GTP $\gamma$ S or GDP. (C) RHOA signal on 10  $\mu$ g of cell extract loaded with GTP $\gamma$ S or GDP in RH12 ELISA or G-LISA. (D) RAC1 signal on 10  $\mu$ g of cell extract loaded with GTP $\gamma$ S or GDP in RH12 ELISA or G-LISA. (E) RHOA signal on 10 or 50  $\mu$ g of cytochalasin D-treated or not cell lysates in RH12 ELISA or G-LISA. \*\* P < 0.01, \*\*\*\* P < 0.0001

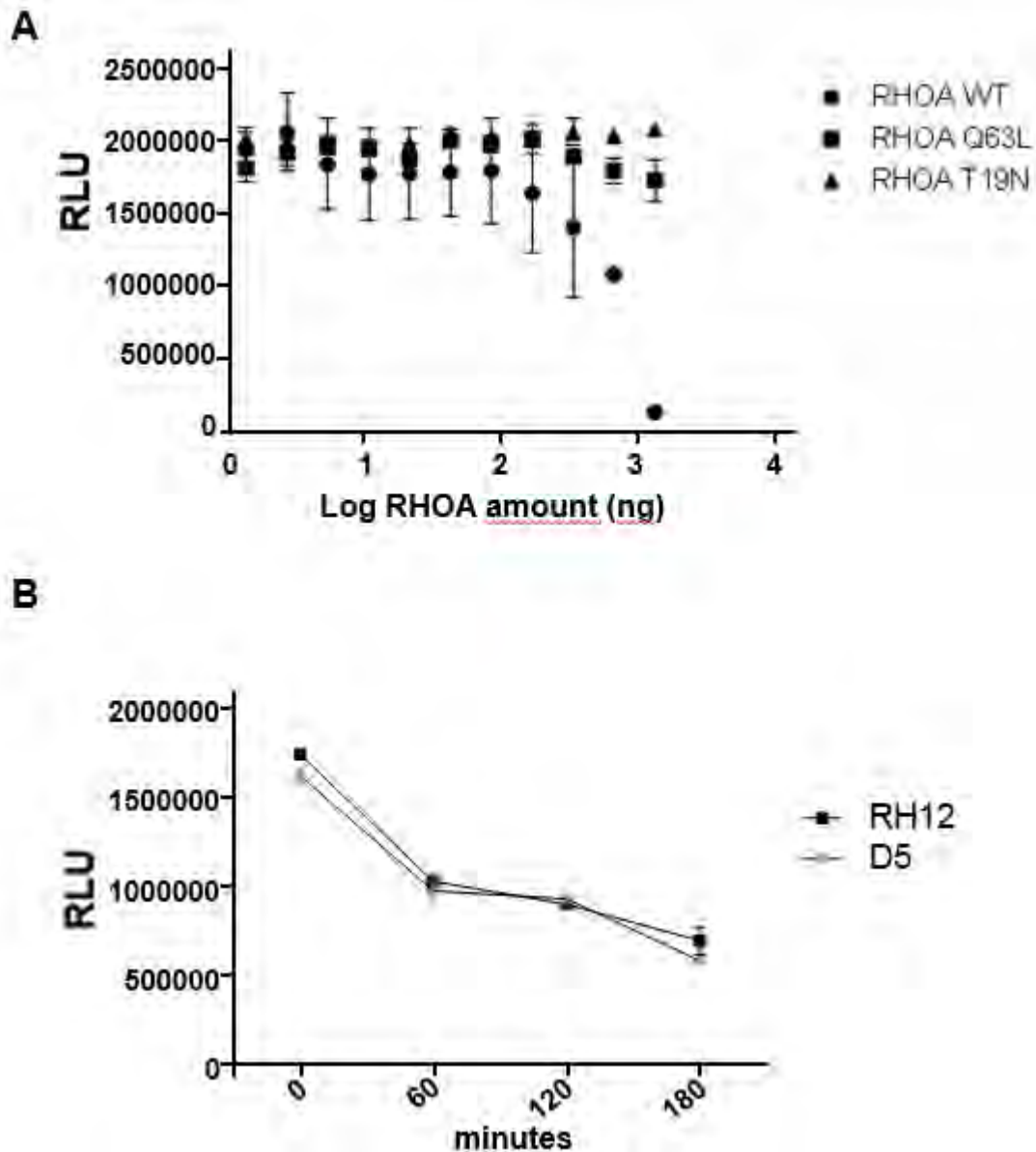
### **Binding mechanism of RH12 to GTP bound RHO**

Small G protein effectors bind to the part of the protein that undergo the conformational change<sup>15</sup>. The effector domains used in affinity capture of active RHO have been co-crystallized and are structured as  $\alpha$ -helices binding at the interface of the switch domains<sup>11</sup>. Therefore we asked whether the RH12 hs2dAb also recognized the same interface. We set up a competition assay with the RHOA RBD using the G-LISA assay. We observed that, such as the Rhotekin RBD of the G-LISA, the RH12 could not form sandwich with commercial monoclonal antibodies, indicating that the RH12 might bind an epitope on the same side of the protein than the RBD. We reasoned that if the RH12 binds to a similar interface than the effectors, it should sterically interfere with the RBD capture, providing its affinity is good enough to compete. As we measured higher affinity for the RH12 than the RBD, we assumed that the RH12, in solution, used at concentration 10 times above its nanomolar  $K_D$ , should be able to prevent the binding of CA RHOA mutant to the RBD, if epitope are shared between these domains. We used 10 fold serial dilutions of RH12 or NR53 as a control and preincubated them for 1 hour before capture with the recombinant RHOA CA mutant, resulting in condition ranging from 1 to 1 molar ratio of (hs2dAb/ CA RHOA) at 25 nM, then 10/1 and 100/1 at 250 nM and 2.5  $\mu$ M of hs2dAb respectively (Figure 5A). The saturation of CA RHOA with only 25 nM of RH12 was sufficient to induce a 90% decrease in signal of the RHOA G-LISA compared to the NR53 or no antibody conditions (Figure 5A). This result suggested that the RH12 displaced the interaction by direct competition with the RBD binding epitope. The same experiment with CA RAC1 on the RAC1 G-LISA showed less efficient competition as 2.5  $\mu$ M of RH12 was necessary to induce a relatively lower signal decrease (Figure 5B), indicating that the RH12 epitope shared by RHO and RAC would overlap with the one of the Rhotekin RBD on RHO but not the CRIB domain of POSH used in the RAC G-LISA (cytoskeleton patent, US 7,763,418 B2). When we analyzed available crystal structures of various RHO family effector-binding domains, we observed that the bound epitope of these truncated domains were not overlapping indeed. Although this may explain the different competition behavior, it is obvious that further X-Ray crystallography of the RH12 RHO complex or at least epitope mapping by RMN<sup>16</sup> or mass spectrometry<sup>17</sup> should answer this question.



**Figure 5: RH12 competition with RBD G-LISA capture.** 10 fold serial dilutions of RH12 or NR53 as a control ranging from 2,5  $\mu$ M to 25 nM were preincubated for 1 hour with 25 nM of the recombinant RHOA CA mutant and then, G-LISA RHOA (A) or G-LISA RAC1 (B) were performed. C: Input controls of hs2dAb in G-LISA RHOA. Hs2dAb/RHOA mix was divided in two parts before G-LISA assay. One part was used on G-LISA RHOA assay and the other one on Ni-NTA coated plates in order to reveal hs2dAb input control. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ . Only 2 values for 2500nM of hs2dAb in RHOA G-LISA.

Next we investigated whether RH12 could affect the intrinsic GTP hydrolysis of the antigen as it is known that the Rhotekin RBD had been chosen by Ren *et al* because it slows the hydrolysis activity of RHOA<sup>1</sup>. We used the GTPase activity bioluminescent assay<sup>18</sup> that we calibrated using WT RHOA and CA and DN mutant as controls (Figure 6A). Then the GTP hydrolysis kinetics of recombinant WT RHOA was measured in the presence of the RH12 or of a non-specific hs2dAb, previously described in <sup>8</sup> but none of them disturbed the enzymatic activity in this preliminary experiment (Figure 6B).



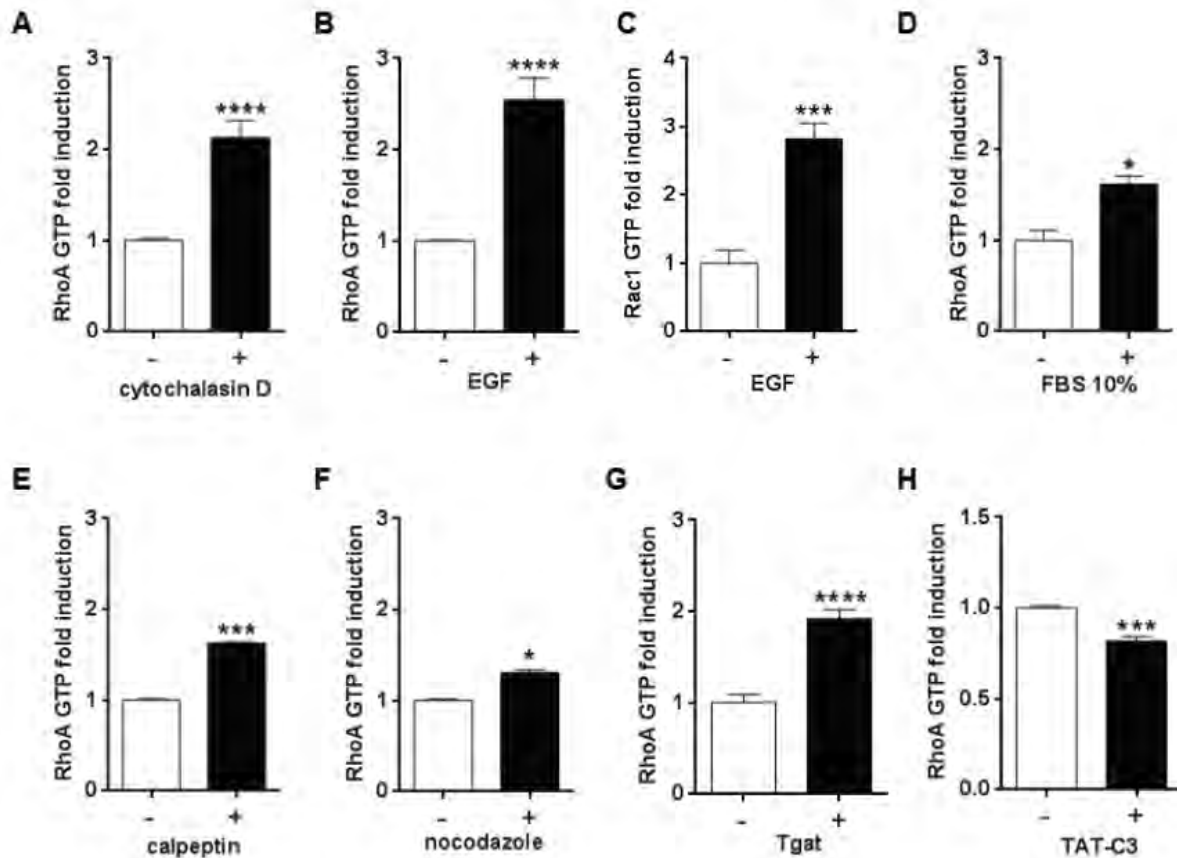
**Figure 6: RHOA WT intrinsic GTPase activity.** A: Recombinant WT, Q63L, T19N RHOA and activities were tested in order to validate recombinant productions. Different concentrations of recombinant proteins were incubated with 1 $\mu$ M GTP for 2 hours at RT. B: RHOA WT GTPase intrinsic activity in presence of RH12 or non-relevant hs2dAb, D5. (1:5)  $\mu$ M (RHOA:hs2dAb) mix were incubated for the indicated times at RT with 2mM GTP.

#### Evaluation of RH12 ELISA to quantify effect of RHOA activity modulators

A plethora of extracellular stimuli or intracellular signals can lead to transient activation of RHO GTPases by various GEF followed by their inactivation by GAP. Also a fine spatio-temporal regulation tune these pathways in the millisecond range, it is nevertheless possible to assess a global activity state at the biochemical level using affinity capture of the GTP loaded fraction in a fast process. In this study we established a novel ELISA capture based on the very selective RH12 single

domain antibody and demonstrated that it is at least as sensitive as the standard G-LISA assay with a better dynamic range. Next we evaluated the ability of our assay to monitor RHOA activation upon various well-known modulators. For all assays, cells were serum starved during 24 hours in order to decrease basal RHOA activity to the minimal level. We confirmed that 1 hour treatment of HeLa cells with 0,5µg/mL cytochalasin D actin F destabilizer induced a very significant and reproducible 2 fold increase in RHOA activity (Figure 7A). RHO GTPases are stimulated shortly after growth factor interaction with their receptor<sup>19</sup>. RH12 ELISA allowed simultaneous analysis of RHOA and RAC1 stimulation by EGF in HeLa S3 cell line (Figure 7B, 7C). We also assessed RAC1 stimulation by EGF in HEK293A in preliminary tests but observed only a mild activation. Therefore we will further test other cellular contexts to complete RAC1 stimulation characterization. Similarly to EGF, RHOA re-activation by serum add-back was efficiently monitored in HeLa cells (Figure 7D). Next we treated HeLa cells with the RHOA inducer calpeptin, which is a cell permeable calpain protease inhibitor that prevents integrin cleavage and further Src mediated inhibition of RHOA pathway. As a consequence, HeLa cells treated with 100µg/ml calpeptin induced RHOA activation maximum of 1.5 fold after 25 minutes treatment (Figure 7E). Similarly to actin cytoskeleton destabilization, microtubule depolymerization induced by nocodazole reactivates RHO pathways<sup>20</sup>. In HeLa cells, we found a very moderate activation of RHOA after 30 minutes nocodazole treatment (Figure 7F). It is important to consider that all these indirect pathways that lead to RHO activation are tightly dependent on the availability of specific GEF which may not be abundant in standard laboratory cell lines like HeLa and might be more effective in relevant cellular context. Therefore we next examine the effect of overexpression of a GEF that had been described to activate RHOA. We compared global RHOA GTP level in NIH3T3 cells that overexpressed GFP as control or an oncogenic truncated domain of the GEF TRIO, referred as T-GAT<sup>21</sup>. Our results showed a 2-fold increase in basal RHOA activity in the T-GAT expressing cell line (Figure 7G). Finally we assayed the effect of the RHO inhibitor tatC3 exoenzyme that ADP-ribosylates RHOA/B/C proteins and prevents their reactivation by GEF. After 6 hours of treatment of NIH3T3 fibroblasts with 10µg/ml tatC3, a significant decrease of RHOA basal activity was observed (Figure 7H).





**Figure 7: RHOA /RAC1 activity detection by ELISA with RH12.** GTP RHOA fold induction following different RHO activity modulator treatments from 15  $\mu\text{g}$  total protein input. Cells were serum starved for 24 hours before treatment. (A) HeLa cells were treated or not with cytochalasin D 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 1 hour. (B & C) HeLa S3 cells were treated or not with EGF 50  $\text{ng}/\text{ml}$  for 5 min. (D) HeLa cells were treated or not with FBS 10% for 30 min. (E) HeLa cells were treated or not with calpeptin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 25 min. (F) HeLa cells were treated or not with nocodazole 10  $\mu\text{M}$  for 30 min. (G) NIH3T3 that overexpressed or not TGAT GEF (H). NIH3T3 cells were treated or not with TAT-C3 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 6 hours. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$

All together our results demonstrated the very efficient performance of the RH12 ELISA capture of GTP bound RHOA protein. As the purpose of the study was not the optimization of the ELISA format, we believe that we can improve several parameters to increase sensitivity of the assay. For instance RH12 was simply binding by ion metal affinity to Ni-NTA that is a relatively low binding affinity and low capacity compared to other multiwall formats. Our results were at least as good as the reference assay G-LISA in which the RBD is covalently linked to the surface, preventing any loss of signal during the washing steps before TCA treatment. Further optimizations of the assay may allow enough sensitivity to monitor RHOA or RAC activities from low amount of cell extract originating from precious samples or non-proliferating cells.

## MATERIAL AND METHODS

### DNA constructs

**2SHA-RHO** plasmid expression were previously described in<sup>8</sup>.

**pHEN-hs2dAb 6His-myc-6His:** hs2dAb-6his myc was digested from pIB-GFP<sup>8</sup> and inserted in a modified pHEN6-VHH-6his previously described in<sup>22</sup>, thus creating a periplasmic expression vector pHEN6-hs2dAb-6his-myc-6his.

**pAOT7-hs2dAb 6His-myc-6His:** hs2dAb-6his-myc-6his were subcloned NcoI-EcoRI into the pAOT7-VHHCATHA<sup>8</sup> bacterial expression vector for cytoplasmic proteins.

### 2SHA-RHO purification

2SHA-RHO were expressed in BL21 *E.coli* cells from a pET vector as previously described in<sup>8</sup>. Transformed bacteria cells were used to grow 3mL LB-carbenicillin (100 µg/ml) cultures overnight at 37°C prior to inoculation in baffled flasks containing 1 L of the same media. Cells were allowed to grow for approximately at 37°C until OD<sub>600</sub> reached 0.5-0.7. Cells were then induced with IPTG at a final concentration of 100 µM and grown for an additional 20 hours at 25°C. Cells were harvested by centrifugation at 4000×g for 20 min. The pellets were re-suspended in lysis buffer (50 mM Tris HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% triton, 1mM DTT, lysozyme and DNase I 1X, proteases inhibitors) and lyzed by sonication on ice prior to centrifugation (15min, 10000 g, 4°C). Streptactin SuperFlow Plus (IBA®) matrix was equilibrated in buffer A (50 mM Tris HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) and was incubated with supernatant for 2 hours at 4°C. Then supernatant and matrix were loaded on a simple column in order to maximise capture of 2SHA-RHO proteins. Matrix was washed by 15 mL of washing buffer (300mM NaCl, 50 mM tris pH8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% tween20). RHO proteins were then eluted in buffer A containing 10 mM Biotin (Sigma). Dialysis was proceeded over night against buffer A containing 15% glycerol.

### hs2dAb purification

Briefly, hs2dAb was produced in XL1blue *E.coli* grown in TB-ampicillin (100 µg/mL) medium supplemented with 1% glucose in the start culture and 0.1% glucose during induction with 1mM IPTG. After overexpression for 16h at 28°C, the cells were harvested, suspended in 15 mL ice-cold TES (Tris 100mM pH 8, EDTA 1mM, Sucrose 500mM) and stored at -80°C. 30 mL of a ¼ dilution of TES buffer was added to the re-suspended pellets prior to vortex briefly and to keep for 30 min at 4°C. After centrifugation (30min, 13000g, 4°C), the periplasmic extract containing Hs2dAb was purified by affinity chromatography. The protein extract was incubated 2 h in the presence of His-Tag purification beads (Roche®) previously equilibrated with equilibration buffer (12mM Tris pH8, 0.125mM EDTA, 65mM Sucrose, 300mM NaCl, 10 mM Imidazole pH7). Beads were washed with 30 ml of washing

buffer (10mM Tris pH8, 150mM NaCl, 10 mM Imidazole pH7). Hs2dAb were then eluted with elution buffer (500mM Imidazole pH7, 25mM Tris pH6.8, 300mM NaCl) and dialysis was performed for 16 hours at 4°C in PBS 10% Glycerol. OD at 280 nm was measured in order to determine Hs2dAb concentration.

## **ELISA assays**

### Detection format

Wells of strepTactin coated plates (IBA®, 2-4101-001) were coated with 100 nM of recombinant RHOA or RAC1 2S-HA protein (200 µl in TBS by well) during 2 hours at room temperature (RT) and then blocked with 5% milk in TBS-Tween 0.05% (blocking buffer) for 1 hour at RT. Several dilutions of hs2dAb in blocking buffer were applied to the ELISA plates in duplicates for 1 hour at RT. Next, we added 1 µg/ml anti-myc HRP antibody (QED Biosciences®, 18824P) in blocking buffer for 1 hour at RT and the reaction was visualized by the addition of 100 µl chromogenic substrate (Thermoscientific®, 1-step ultraTMB, 34028) for 1 min. The reaction was stopped with 50 µl H2SO4 1N and absorbance at 450 nm was measured using FLUOstar OPTIMA microplate reader. Plates were washed three times with washing buffer (TBS containing 0.05% (v/v) Tween 20) after each step. All steps are performed under agitation (400 rpm).

### Capture format

Wells of Nickel coated plates (Thermo scientific, Pierce®, 15142) were coated with 0.5 µM Hs2dAb (100 µl in TBS by well) during 1 hour at room temperature (RT) and then blocked with 5% milk in TBS-Tween 0.05% (blocking buffer) for 1 hour at RT. Recombinant proteins or cell lysates were applied to the ELISA plates in duplicates for 30 min at 4°C. After pipetting 100 µl of TCA5% into each well and incubating exactly 2 min at RT, we added primary antibody in blocking buffer for 45 min at RT and next HRP-conjugated secondary antibody in blocking buffer for additional 45 min at RT. The reaction was visualized by the addition of 100 µl chromogenic substrate (Thermoscientific®, 1-step ultraTMB, 34028) for 30 min. The reaction was stopped with 50 µl H2SO4 1N and absorbance at 450 nm was measured using FLUOstar OPTIMA microplate reader. Plates were washed three times with washing buffer (TBS containing 0.05% (v/v) Tween 20) after each step. All steps are performed under agitation (400 rpm).

## **Affinity measurement**

Hs2dAb binding studies based on SPR technology were performed on BIAcore T200 optical biosensor instrument (GE Healthcare®). Capture of recombinant hs2dAb-6xHis, expressed in Xl1blue and purified as previously reported<sup>22</sup>, was performed on a nitrilotriacetic acid (NTA) sensor chip in HBS-P+ buffer (10mM Hepes pH 7.4, 150mM NaCl, and 0.05 % surfactant P20) (GE Healthcare). The four

flow cells (Fc) of the sensor chip were used: one (Fc 1) to monitor nonspecific binding and to provide background corrections for analyses and the other three flow cells (Fc 2, 3, and 4) containing immobilized Hs2dAb-6xHis for measurement.

For immobilization strategies, flow cells were loaded with nickel solution (10  $\mu$ L/min for 60 s) in order to saturate the NTA surface with Ni<sup>2+</sup> and an extra wash using running buffer containing 3mM EDTA after the nickel injection. His-tagged hs2dAb in running buffer was injected in flow cells at a flow-rate of 10  $\mu$ L/min. Total amount of immobilized hs2dAb-6xHis was 250-300 resonance units. (RUs; 1 RU corresponds approximately to 1 pg/mm<sup>2</sup> of protein on the sensor chip). A Single-Cycle Kinetics (SCK) analysis to determine association, dissociation and affinity constants ( $k_a$ ,  $k_d$ , and  $K_D$  respectively) was carried out. SCK method prevents potential inaccuracy due to sensor chip regeneration between cycles which are necessary in the conventional multiple cycle kinetics (MCK)<sup>10</sup>. SCK binding parameters are evaluated for each injection according to the tools and fit models of the BIAevaluation software, giving similar values than MCK. As hs2dAb were smaller proteins than their respective antigens, hs2dAb were captured on the sensor chip then the recombinant antigens were used as analyte and were injected sequentially with increased concentrations ranging between 3,125 nM to 50 nM in a single cycle without regeneration of the sensorship between injections. Binding parameters were obtained by fitting the overlaid sensorgrams with the 1:1. Langmuir binding model of the BIAevaluation software version 1.0.

#### **Preparation of lysates for ELISA or G-LISA assays**

Cells were washed once with cold TBS1X then scrapped into cold lysis buffer (Tris HCl 50 mM pH 7.2, Triton X100 1%, NaCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, supplemented extemporaneously with DTT 10 mM and phosphatase and protease inhibitors). Aliquots of lysates were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before processing.

#### **Loading GTP $\gamma$ S / GDP**

We added to cell lysates or to recombinant proteins 10 mM EDTA and 1 mM GDP or 100  $\mu$ M GTP $\gamma$ S. We incubated the reaction at least 30 min at 37°C for cell lysates or at 30°C for recombinant proteins. The reaction was stopped by adding 60 mM MgCl<sub>2</sub>, vortexed and put on ice.

#### **GTPase activity assay**

Experiments were performed according to the GTPase-Glo™ Assay (Promega®) manufacturer's protocol. 2SHA-RHO recombinant proteins and purified hs2dAb were incubated in presence of GTP for several periods of times and then, secondary indicator reaction was started. Luminescence signal was acquired on TriStar LB 942 Multimode Microplate Reader (Berthold technologies®).

## G-LISA procedure

We performed the G-LISA Activation Assay Biochem Kit™ according to the manufacturer's instructions: G-LISA® RHOA Activation Assay Biochem Kit™ (#BK124, Cytoskeleton®.) and G-LISA® RAC1 Activation Assay Biochem Kit™ (#BK128, Cytoskeleton®.). We also used G-LISA™ assay to assess if purified hs2dAb were able to compete with RBD or PAK domain. Recombinant RHOA or RAC1 CA mutants (respectively at 50 nM or 25 nM) were preincubated for at least 3 hours at 4°C with 10 fold serial dilution of hs2dAb RH12 or NR53 (50,500 and 5000 nM for RHOA or 25, 250 and 2500 nM for RAC1). The samples were next incubated in G-LISA plates during 30 min at 4°C (in the G-LISA RHOA, samples are diluted to 1/2 in binding buffer).

## REFERENCES

1. Ren, X.-D. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* **18**, 578–585 (1999).
2. Benard, V., Bohl, B. P. & Bokoch, G. M. Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J. Biol. Chem.* **274**, 13198–13204 (1999).
3. Ren, X.-D. & Schwartz, M. A. in *Methods in Enzymology* **325**, 264–272 (Elsevier, 2000).
4. Nini, L. & Dagnino, L. Accurate and reproducible measurements of RhoA activation in small samples of primary cells. *Anal. Biochem.* **398**, 135–137 (2010).
5. Benard, V. & Bokoch, G. M. Assay of Cdc42, Rac, and Rho GTPase activation by affinity methods. *Methods Enzymol.* **345**, 349–359 (2002).
6. Ogita, H. & Takai, Y. Activation of Rap1, Cdc42, and rac by nectin adhesion system. *Methods Enzymol.* **406**, 415–424 (2006).
7. Pellegrin, S. & Mellor, H. in *Current Protocols in Cell Biology* (eds. Bonifacino, J. S., Dasso, M., Harford, J. B., Lippincott-Schwartz, J. & Yamada, K. M.) (John Wiley & Sons, Inc., 2008).
8. Moutel, S. *et al.* NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies. *eLife* **5**, (2016).
9. Saerens, D., Ghassabeh, G. H. & Muyldermans, S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **8**, 600–608 (2008).
10. Trutnau, H.-H. New multi-step kinetics using common affinity biosensors saves time and sample at full access to kinetics and concentration. *J. Biotechnol.* **124**, 191–195 (2006).
11. Blumenstein, L. & Ahmadian, M. R. Models of the cooperative mechanism for Rho effector recognition: implications for RhoA-mediated effector activation. *J. Biol. Chem.* **279**, 53419–53426 (2004).
12. Guilluy, C., Garcia-Mata, R. & Burridge, K. Rho protein crosstalk: another social network? *Trends Cell Biol.* **21**, 718–726 (2011).
13. Rajalingam, D., Loftis, C., Xu, J. J. & Kumar, T. K. S. Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. *Protein Sci.* **18**, 980–993 (2009).
14. Bhadriraju, K. *et al.* Activation of ROCK by RhoA is regulated by cell adhesion, shape, and

cytoskeletal tension. *Exp. Cell Res.* **313**, 3616–3623 (2007).

15. Dvorsky, R. & Ahmadian, M. R. Always look on the bright site of Rho: structural implications for a conserved intermolecular interface. *EMBO Rep.* **5**, 1130–1136 (2004).
16. Fridy, P. C. *et al.* A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. *Nat. Methods* **11**, 1253–1260 (2014).
17. Pleiner, T. *et al.* Nanobodies: site-specific labeling for super-resolution imaging, rapid epitope-mapping and native protein complex isolation. *eLife* **4**, e11349 (2015).
18. Mondal, S., Hsiao, K. & Goueli, S. A. A Homogenous Bioluminescent System for Measuring GTPase, GTPase Activating Protein, and Guanine Nucleotide Exchange Factor Activities. *Assay Drug Dev. Technol.* **13**, 444–455 (2015).
19. Ridley, A. J. & Hall, A. 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 (1992).
20. Chang, Y.-C., Nalbant, P., Birkenfeld, J., Chang, Z.-F. & Bokoch, G. M. GEF-H1 couples nocodazole-induced microtubule disassembly to cell contractility via RhoA. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2147–2153 (2008).
21. Bouquier, N. *et al.* Aptamer-Derived Peptides as Potent Inhibitors of the Oncogenic RhoGEF Tgat. *Chem. Biol.* **16**, 391–400 (2009).
22. Olichon, A. & Surrey, T. Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **282**, 36314–36320 (2007).

ARTICLE 4 :

**A conformational single domain intrabody selective to GTP-bound RHOA subgroup suppresses the RHOA/ROCK pathway and acto-myosin contractility.**

Laura Keller; Claudine Tardy, Nicolas Bery, Laetitia Ligat, Faten Koraichi, Stéphanie Cabantous, Mélissa David, Rémi Gence, Gilles Favre, Aurélien Olichon





## **A conformational single domain intrabody selective to GTP-bound RHOA subgroup suppresses the RHOA/ROCK pathway and acto-myosin contractility.**

Laura Keller<sup>1,2,3</sup>; Claudine Tardy<sup>1</sup>, Nicolas Bery<sup>1,2</sup>, Laetitia Ligat<sup>4</sup>, Faten Koraichi<sup>1</sup>, Stéphanie Cabantous<sup>1</sup>, MéliSSa David<sup>1</sup>, Rémi Gence<sup>1,2</sup>, Gilles Favre<sup>1,2,3,5</sup>, Aurélien Olichon<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>Inserm, UMR 1037-CRCT, Toulouse, France

<sup>2</sup>Université Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse, France

<sup>3</sup>Laboratoire de Biologie Médicale Oncologique, Institut Claudius Regaud, IUCT-Oncopôle, Toulouse, France;

<sup>4</sup>Le Pôle Technologique du Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, plateau de protéomique, Toulouse, France;

<sup>5</sup>To whom correspondence may be addressed. E-mail: [aurelien.olichon@inserm.fr](mailto:aurelien.olichon@inserm.fr) and [gilles.favre@inserm.fr](mailto:gilles.favre@inserm.fr)

### Competing interests

¶ L.K., N.B., G.F. and A.O. are co-inventors on the patent PTC/EP2016/052136, concerning the RHO GTP single domain antibodies discovery and their applications. The other authors declare no conflict of interest.

### Author contributions

Conception and design: L.K., G.F. and A.O. Development of methodology: L.K., and A.O. Acquisition of data (including facilities): L.K., C.T., L.L., and A.O. Analysis and interpretation of data: L.K., C.T., S.C, G.F. and A.O. Administrative, technical, or material support: F.K., N.B., S.C., L.L., M.D Study supervision: G.F. and A.O. Financial support: G.F.

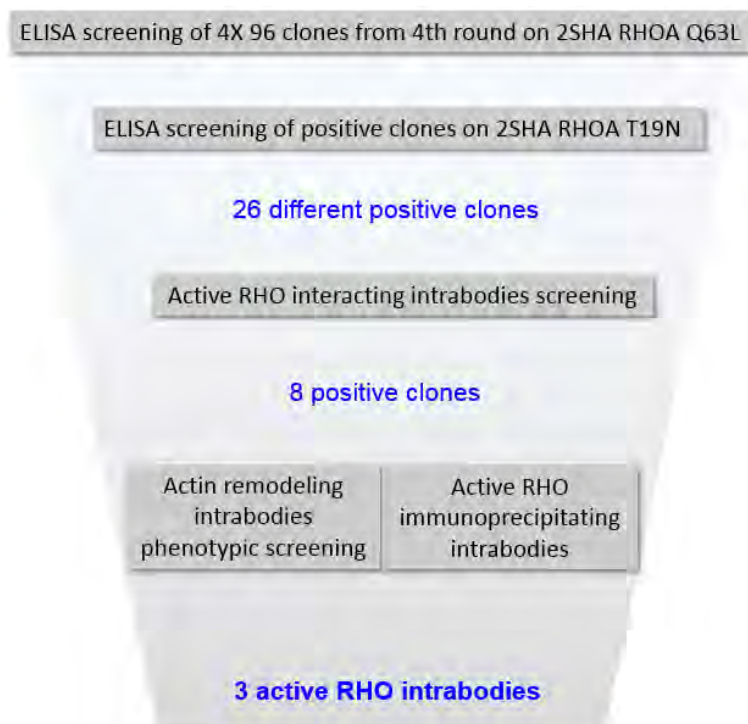
## **INTRODUCTION**

In this study we identified a single domain intrabody that selectively blocks GTP bound active conformation of RHOA subfamily and subsequent pathway. We took advantage of a large synthetic nanobody library to select a large set of functional intrabodies<sup>1</sup>. We designed a competitive *phage display* strategy to enrich the selection towards active RHOA subfamily and identified blocking intrabodies through a phenotypic screening based on actin fibers loss. By a systematic *in vitro* and *in cellulo* characterization of binding properties, we identify among ten conformational nanobodies, one high affinity clone selective towards GTP bound RHOA subgroup but not interfering with its close homologue RAC1. We demonstrated that this blocking intrabody interferes with the RHOA/ROCK pathway by direct competition with effector binding to RHOA in several cellular models.

## RESULTS

### Phenotypic screening selection of RHOA GTP blocking intrabody

The goal of the present study was the selection of a blocking intrabody more selective towards RHOA subfamily. Actually in our previous work we identified a RHO-GTP binding intrabody by phage display selection from the NaLi-H1 library of humanized synthetic single domain antibody (hs2dAb)<sup>1</sup>. Using a phage display selection towards GTP-bound RHOA by depleting against GDP bound RHOA, this clone RH12 (RHO binder H12) was strongly enriched. This was in agreement with its sub-nanomolar affinity towards the constitutively active mutants of RHOA, RHOB, RHOC as well as RAC1 small GTPases. In order to investigate the function of the GTP bound RHOA without potential interference with closely related RAC or CDC42 activity, we reconsidered *phage display* selection on the same library and emphasized steps of depletion or competition. We chose to keep a strategy using native antigens expressed in human cells, as it is important to select intrabodies. The first round of selection was performed using polyvalent display on hyperphages<sup>2</sup> to increase captured binders diversity. Subtractive panning, using an excess of cell extract expressing dominant negative (DN) RHOA mutant, followed by a capture on the constitutively active (CA) mutant, was introduced from the second round of selection. In addition, to counter select the RH12 clone, we introduced a preclearing step of phages in cellular extract expressing RHOB, RHOC and RAC1 constitutively active mutants in excess compared to the cellular extract containing CA RHOA mutant.



**Figure 1: Overview of the different steps used to identify selective RHOA active intrabodies.**

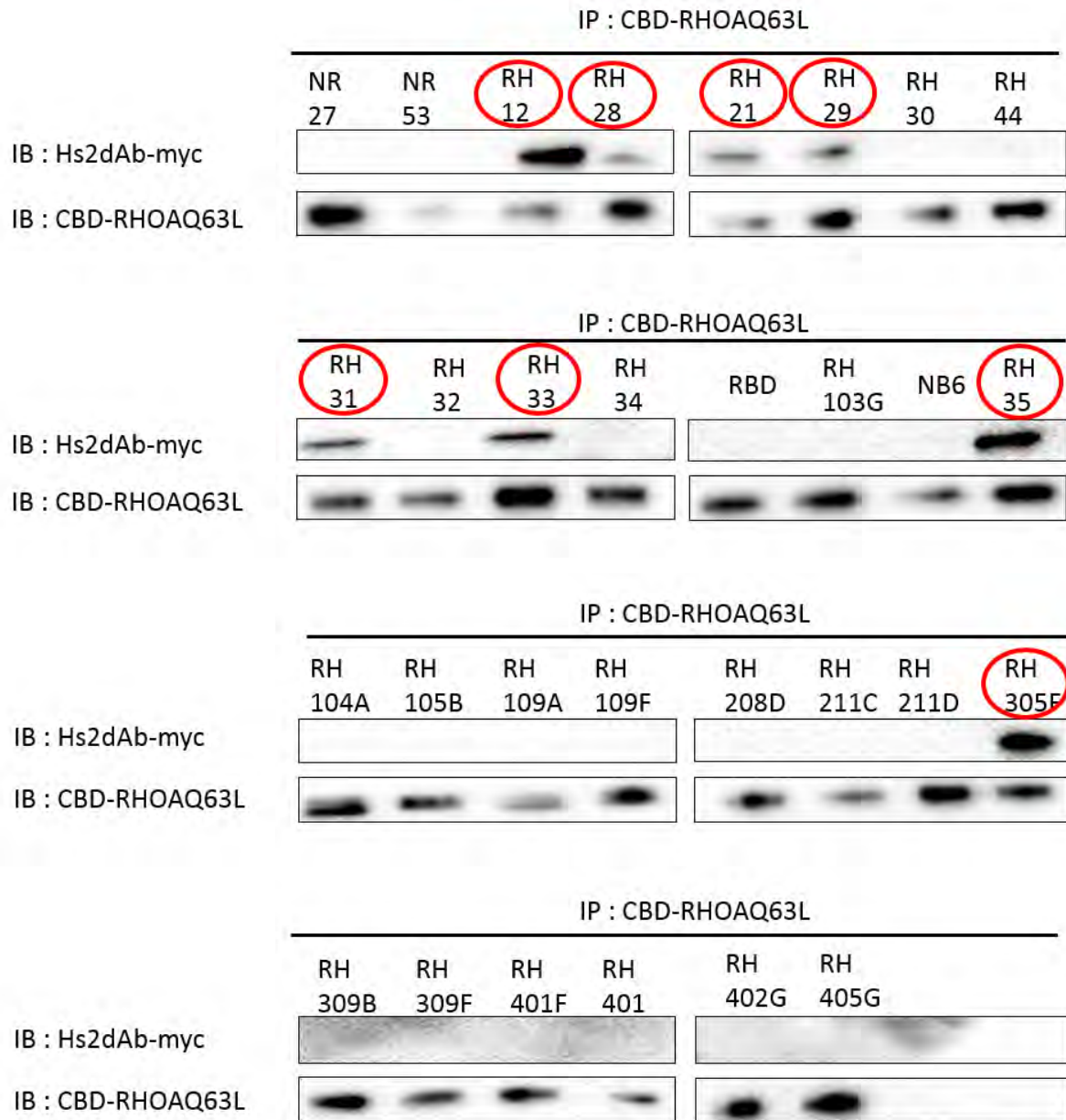
After four rounds of enrichment, we sequenced 20 clones to assess the diversity. In contrast to previous selection scheme in which the RH12 represented 95% of the clones, this time it was lower than 10%. Although the subtractive approach appeared only partial, as it did not fully eliminate this high affinity pan active RHO binder, it allowed the analysis of a much larger diversity of unique clones. Therefore we tested 390 individual hs2dAb fragments secreted by leakage from *E.coli* periplasm in culture supernatant for their ability to selectively recognize in ELISA a recombinant CA RHOA mutant captured on streptactin (Figure 1). Then we screened the positive ones on DN RHOA mutant, leading to the identification of 30 potential active RHO conformational hs2dAb, which were referred as RH followed by their order number in ELISA plates.

Amino acid sequence alignment of these hs2dAb did not indicate any conserved motif in CDR regions that could reveal a common binding mode of the selected clones (Figure 2).

Next we evaluated the ability of the 30 clones to be co-precipitated by CA RHOA mutant while co-expressed in HeLa cells (Figure 3). The 30 RH clones were sub cloned into a mammalian expression vector with carboxy terminal 6his and myc tags and co transfected with CA CBD-RHOA mutant as it was used as bait during some steps of phage display selection. Among many non-specific hs2dAb originating from previous screens against fluorescent proteins, we chose two clones, referred as NR53 and NR27 for non RHO negative controls, whose expression were in the high range in mammalian cells and which showed soluble diffuse localization in cells without apparent cellular toxicity. Chitin beads pull down revealed that only 8 RH clones could be co-precipitated with CA-RHOA (Figure 3). We considered that negative hits might have been poorly expressed, were non-soluble hs2dAb in the intracellular environment or were low affinity intrabodies. We decided that one of these criteria was relevant to eliminate them from further characterization.

In order to identify potential blocking intrabodies we performed on positive hits a phenotypic screen based on the well characterized link between RHO activity and acto-myosin cytoskeleton that leads to stable actin F fibers in most of adherent cell lines. As a phenotypic control of RHO inhibition, we treated HeLa cells with the tat-C3 and observed in more than 50% of the cell moderate loss of F actin phalloidin staining and a stretched cellular shape with a retracted cytoplasm and elongated protrusions (Figure 4). In contrast, NR53 and NR27 did not affect the cellular circularity, ranging from 0,3 to 0,8, and actin staining remained unchanged compared to mock transfected cells. Figure 4 shows the result of the 8 intrabodies that were co-precipitated with CA CBD-RHOA mutant including the pan RHO-GTP RH12 which was already identified as a blocking intrabody<sup>1</sup>. For all 8 positive CA RHOA binders, hs2dAb expression detected using anti myc tag showed that variable expression level in transient transfection led to a higher range of phenotypes compared to the treatment using the recombinant tat-C3 enzyme. Low expression of intrabodies led to partial loss of cytoplasmic actin F fibers but a strong cortical actin staining surrounding the cell shape.





**Figure 3: Active RHO interacting intrabodies in a pull down biochemical screening.** Hs2dAb and CA CBD-RHO were co-transfected in HeLa cells. 24 hours after transfection, cells were harvested and cleared cell lysates were incubated with chitin beads. Hs2dAb co-precipitated on chitin beads were revealed with myc tag antibody. (IB: Immunoblot, IP: Immunoprecipitation).

In contrast, high expression was often linked to total loss of actin staining associated with more or less cytoplasm retraction according to the different RH hs2dAb. Accordingly the RH12, RH21 and RH35 led to extensively elongated cells with circularity lower than 0.1 associated with the absence of phalloidin staining in cells expressing high level of intrabodies. RH28 and RH29 gave a less dramatic phenotype with a cell circularity ranging from 0.1 to 0.4 and persistence of protrusions all along the cell cortex. However, cells expressing the other 3 positive hits, RH31, RH33 and RH305F, appeared

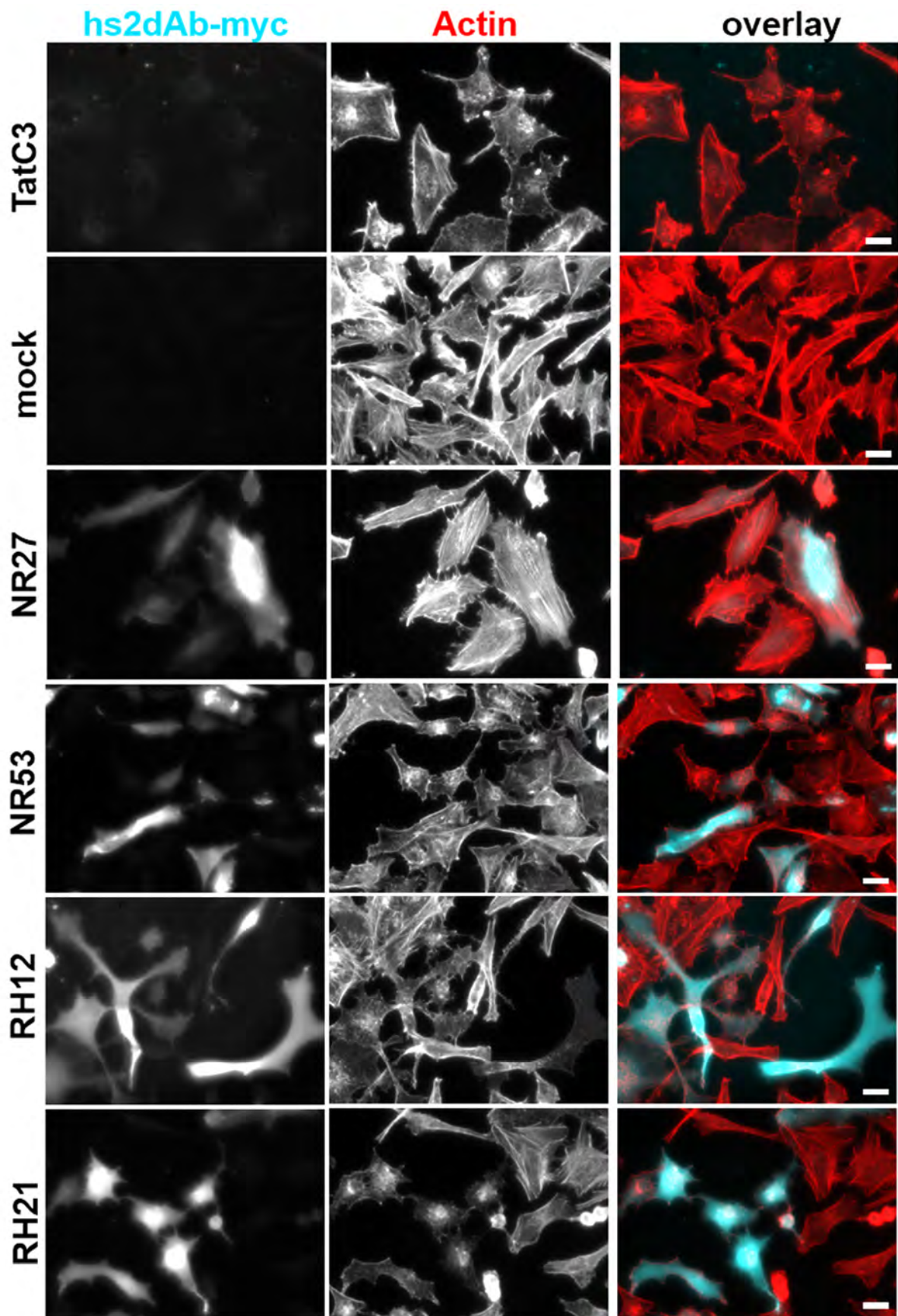
poorly perturbed, with actin fibers disorganization only in case of high expression of intrabodies, while still showing strong cortical actin, over all associated with lower loss of circularity. Moreover, high expression level of RH31 or RH33 led to large aggregates that might reflect lower solubility or stability of these binders expressed in the reducing intracellular environment (Figure 4).

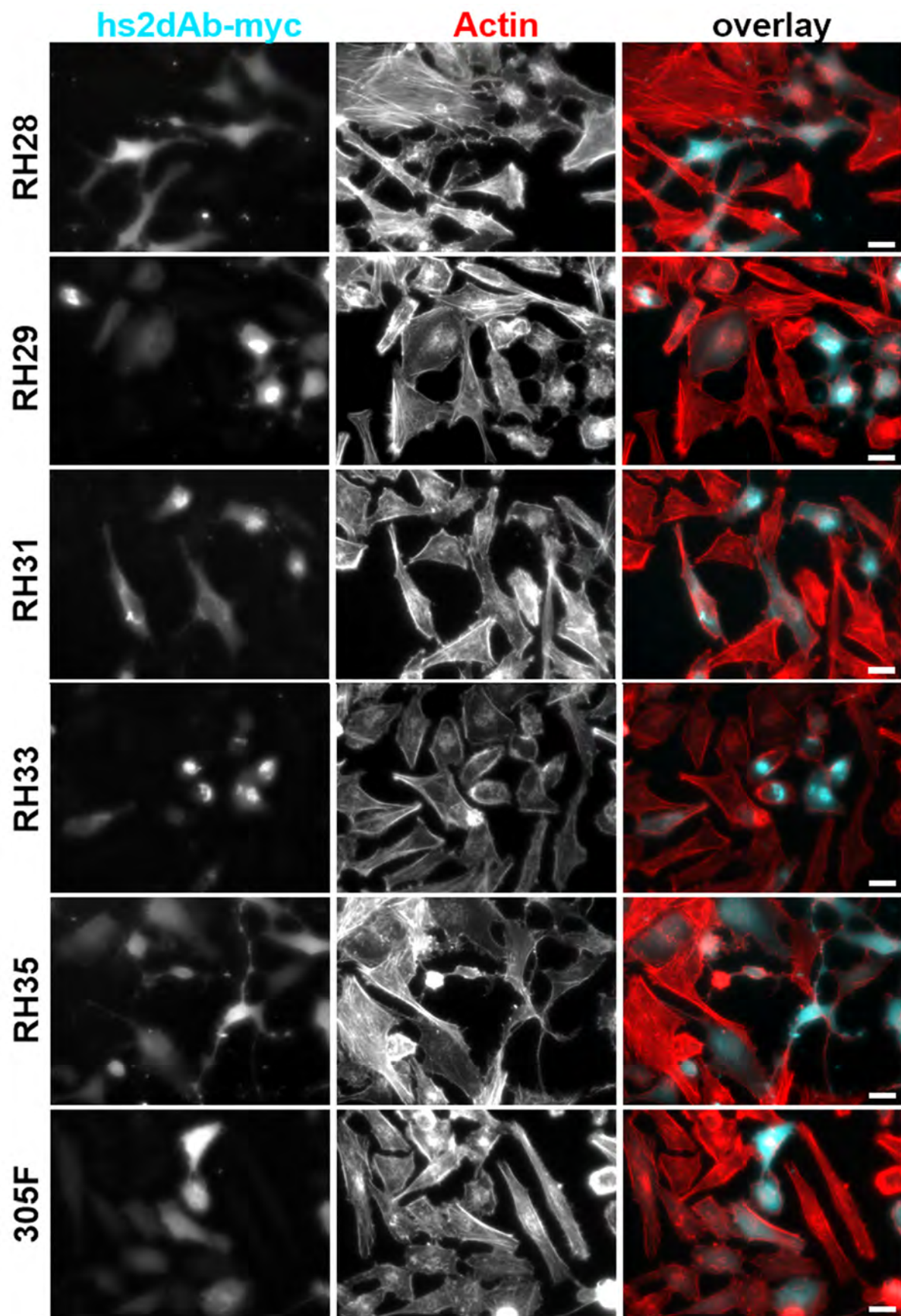
Despite similarity between the phenotypes induced by RH hs2dAb and the one of tat-C3 mediated RHO inhibition, we were not able to identify a specific RHOA inhibition phenotype that would contrast with the inhibitory phenotype induced by the pan RHO/RAC binder RH12. Therefore we evaluated the binding properties of selected intrabodies towards the CA mutant of RAC1 in a co-precipitation assay. In this counter screen in HeLa cells, the pull down format was reversed as the intrabodies were captured on beads with their 6His tag and their capacity to immuno-precipitate either CA CBD-RHOA or CA CBD-RAC1 was assessed (Figure 5). As expected, RH12, which is the highly stably expressed intrabody, immunoprecipitated very efficiently both CA-RHOA and CA-RAC1. The RH21 was the only other hs2dAb to cross-react with RAC1. In contrast, RH28, RH29, RH31 and RH35 selectively precipitated RHOA, even with no detectable expression level in the input for the RH28 and RH29. In this format RH33 and RH305F appeared simply not efficient as immuno-precipitating intrabodies.

At this stage we considered as positive RHOA selective binders, the RH28, RH29 and RH35, which do not aggregate and lead to a loss of actin stress fibers phenotype while expressed as intrabodies (Table 1).

	Expression levels	Immunoprecipitating intrabodies		Actin stress fibers loss	Aggregation propensity
		RHOAQ63L	RAC1Q61L		
RH12	+++	+++	+++	+++	-
RH21	+++	+++	+++	++	-
<b>RH28</b>	<b>+</b>	<b>+/-</b>	<b>-</b>	<b>++</b>	<b>-</b>
<b>RH29</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>++</b>	<b>-</b>
RH31	+	+	-	+	++
RH33	+	-	-	+	++
<b>RH35</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>++</b>	<b>-</b>
RH305F	++	-	-	+	++

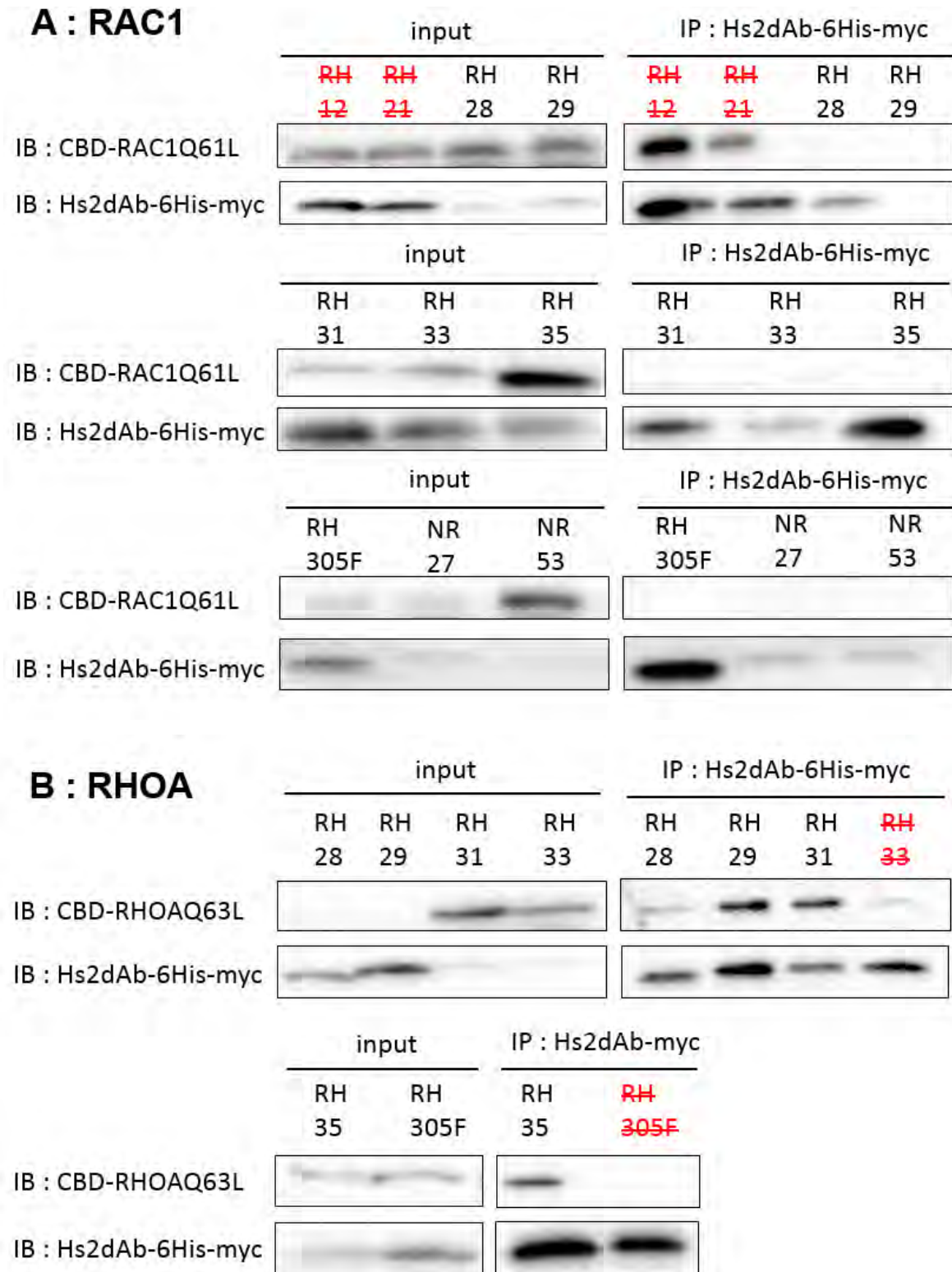
**Table 1: Intrabodies screening summary.** Table recapitulating criteria that we used to select the most interesting hs2dAb.





**Figure 4: phenotypic screening for blocking intrabodies based on actin F remodeling.** HeLa cells expressing transiently either non relevant (NR) hs2dAB or RH (anti RHO-GTP) hs2dAB were fixed 20 hours post transfection and stained using anti myc tag antibody and Alexa 568 phalloidin to detect actin stress fibers. Scale bar 20  $\mu$ m.





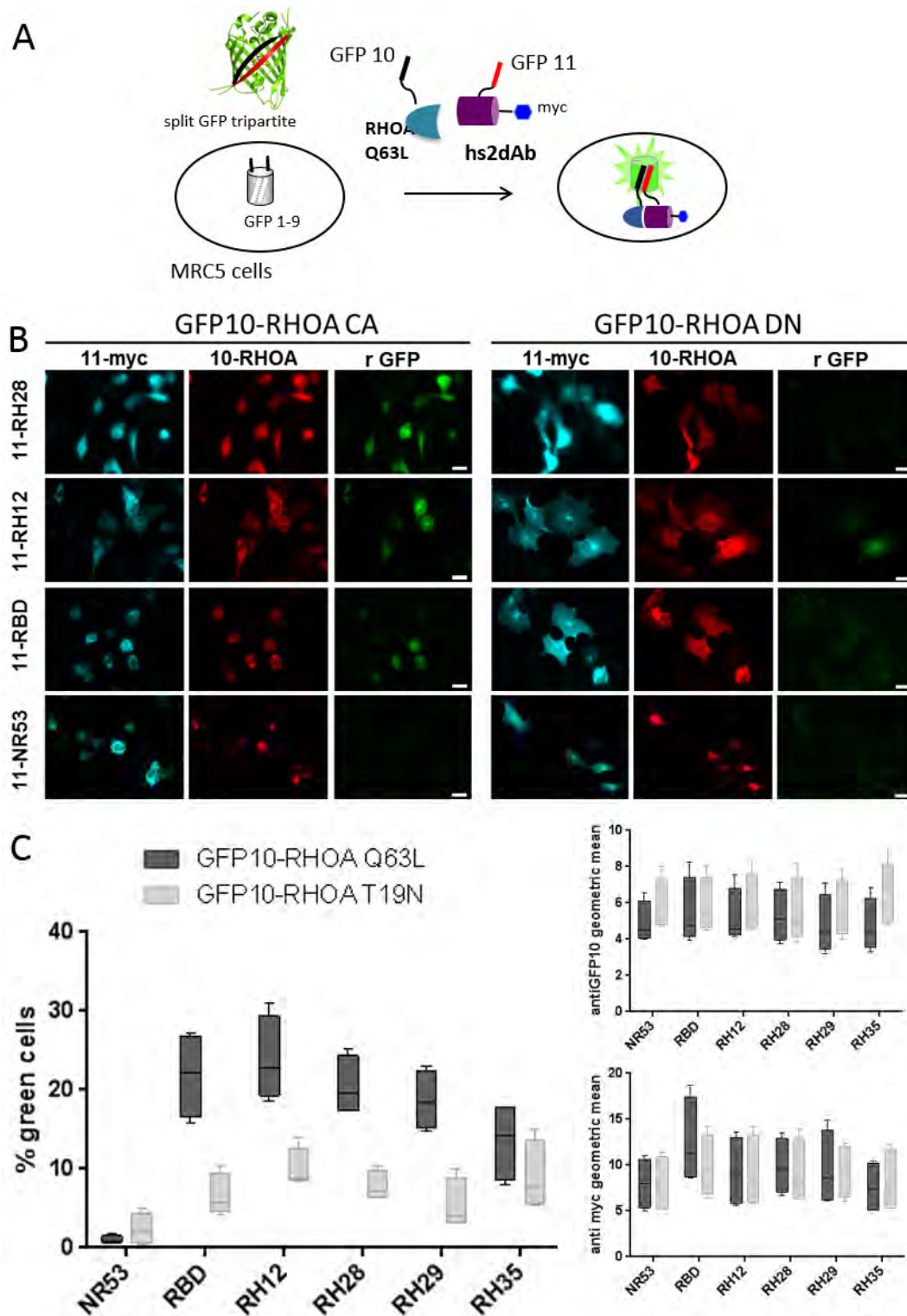
**Figure 5: Active RHO immunoprecipitating intrabodies screening.** HeLa cells were transfected for 24 hours with the RH (anti RHO) hs2dAb fused to carboxy-terminal myc tag or a non-relevant control (NR). HeLa cells were also separately transfected for 24 hours with CBD fusion of either CA RHOA (B) or CA RAC1 (A) mutants. Cells lysates were mixed and incubated on Ni-NTA beads. Loading 10% of the respective input revealed the total level of CBD-RHOA, CBD-RAC1 or hs2dAb-myc proteins. CBD-RHOA proteins were detected with RHOA antibody and CBD RAC1 with RAC1 antibody, and the hs2dAb with an anti-myc tag antibody.

### **Intracellular interaction validation of GTP bound RHOA selected hs2dAb**

Co-precipitation of proteins from cellular extract do not exclude that interaction occurred after cell lysis. To validate the intracellular interaction of the positive hits, we implemented an intracellular protein-protein interaction assay based on the split GFP tripartite<sup>3</sup>. This protein interaction reporter assay is a protein complementation between 2 minimal strands of a superfolder variant of the eGFP, referred as the GFP-10 and the GFP-11, with the remaining GFP1-9 moiety, leading to the formation of a reconstitute GFP (rGFP) that becomes fluorescent after chromophore maturation. Albeit the necessity to express 3 proteins simultaneously in cells, the major advantage of the assay resides in direct read out of the fluorescence in live or fixed cells without any background of fluorescence of non-interacting moiety as well as non-specific interactions between GFP-10 and GFP-11 strands. Interaction occurs at the location of the endogenous protein compared to 2 hybrid methods that delocalizes the bait and prey proteins<sup>4</sup>. Another feature of this assay is that the complementation irreversibility accumulates the rGFP and allows the detection of transient or low affinity interaction.

To reduce heterogeneity due to transient transfection of 3 plasmids, we used a homogenous cell line of human fibroblast MRC5 stably expressing the GFP1-9 already validated in the lab (Koraichi *et al*, unpublished). The CA or the DN mutants of RHOA were fused to an amino-terminal GFP10 strand. We constructed amino-terminal and carboxy-terminal fusion of hs2dAb with the GFP-11 tag separated by a flexible amino acid linker and used as positive control of intracellular interaction the conventional Rhotekin Rho Binding Domain (RBD) and the pan RHO hs2dAb RH12. In preliminary experiments, higher reconstituted GFP signal was obtained with the amino terminal GFP11 tag than with the carboxy-terminal indicating that the flexible linker length and position is important for proper complementation. Therefore tripartite complementation was analyzed 24 hours after co-transfection of GFP10-RHOA with GFP11 N-terminal constructs (Figure 6 A). Immunofluorescence staining clearly showed that some RH positive hits induced rGFP complementation like the RBD, leading to the split GFP tripartite complementation in cells co-expressing CA GFP10-RHOA but not DN, as illustrated by figure 6B. Although the rGFP signal could inform in principle about the spatial localization of the interaction, we were careful about any misinterpretation of localization because of the dramatic cell phenotype induced by expression of CA RHOA combined to the relative blocking effect of inhibitory intrabodies that were variable from transfected cells to another (Figure 6 B). So we did not perform fine confocal microscopy study on these cells. Therefore we quantified the rGFP signal by flow cytometry on fixed cells that were positive after both immune detection of hs2dAb using anti myc tag monoclonal antibody and ectopic RHOA mutants using GFP10 polyclonal antibody. The percentage of reconstituted rGFP positive cells was almost null in NR53 control. The specificity of the interaction between CA GFP10-RHOA and the GFP11-RBD was confirmed by reaching more than 20 % of rGFP positive cells and a percentage lower than 5% of rGFP cells expressing GFP11-RBD with DN GFP10-RHOA. Similar signal intensity and selectivity between CA and DN mutants interaction were obtained with GFP11 fusion of RH12, RH28 and RH29 however no conformational selectivity was observed

for the RH35 in this assay (Figure 6 C). These results validated that the selected hs2dAb RH28 and RH29 were functional in the intracellular environment and were conformational nanobodies selective to active RHOA.



**Figure 6: Intracellular binding using tripartite split GFP assay. A:** Principle of the tripartite split-GFP complementation assay adapted to assess hs2dAb/RHO interaction.  $\beta$ -strand 10 (GFP10) and  $\beta$ -strand 11 (GFP11) are respectively fused to RHOA and hs2dAb. These constructions are transfected in a MRC5 cell line that constitutively express the detector fragment GFP1-9 ( $\beta$ -strand 1-9). When

protein interaction occurs, GFP10 and GFP11 are tethered and then spontaneously associate with GFP1–9 fragment to form a full-length GFP. If proteins A and B do not interact, GFP10 and GFP11 are not tethered and entropy is too high to allow complementation with GFP1–9. **B:** Representative images of hs2dAb and RHOA transfected cells and rGFP visualized by fluorescence microscopy. **C:** Percentage of fluorescent cells analyzed by flow cytometry of the indicated transfection conditions. On the right, upper panel, hs2dAb expression control. Bottom panel, RHOA mutant expression control. Plot graph: min and max; n=3 experiments.

### ***In vitro* binding properties of RHOA conformational intrabodies**

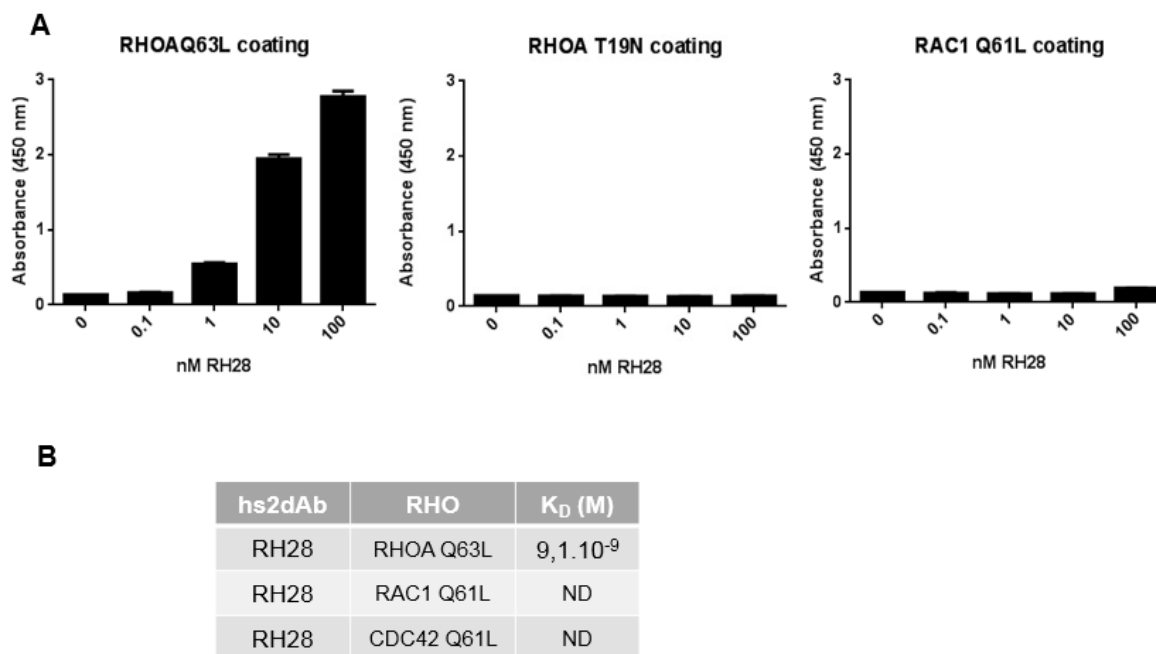
Intracellular binding to overexpressed antigens allowed the identification of three hs2dAb that were binding to CA RHOA mutant with no obvious cross reactivity towards the close RAC subfamily. However intracellular stoichiometry of the interacting protein was not controlled and binding properties such as selectivity and affinity remained to be clarified using *in vitro* direct binding assays. The hs2dAb RH28, RH29 and RH35 were expressed with a carboxy-terminal 6his-myc-6his tag in bacterial periplasm and purified on IMAC column, yielded to 1-3mg per liter of culture. We measured affinities towards recombinant purified antigens in surface plasmon resonance (SPR) using hs2dAb immobilized on the sensor chip (Table 2). We first compared the binding of CA and DN RHOA mutants for the three hs2dAb. All of them had a  $K_D$  in the sub-nanomolar range for CA RHOA but no measurable binding of DN RHOA was observed, which is consistent with intracellular experiments for RH28 and RH29. We measured sub-nanomolar affinities towards the CA mutants of the closest proteins RHOB and RHOC, indicating that these clones could not discriminate the 3 isoforms of RHOA subfamily. In this assay, CA RAC1 showed relatively good binding kinetics with a  $K_D$  in the range of 10 to 20 nanomolar towards the RH29 and RH35 hs2dAb whereas no binding could be measured with the RH28, suggesting that RH28 is the only clone highly selective towards RHOA subfamily active proteins.

$K_D$ (M)	RHOA Q63L	RHOB Q63L	RHOC Q63L	RAC1 T19N	RHOA T19N
RH28	$3.10^{-10}$	$3.10^{-10}$	$8.10^{-11}$	ND	ND
RH29	$1.10^{-9}$	$4.10^{-9}$	$5.10^{-9}$	$20.10^{-9}$	ND
RH35	$6.10^{-10}$	$2.10^{-9}$	$6.10^{-10}$	$15.10^{-9}$	ND

**Table 2: SPR measurements of the three-selected hs2dAb.**

To confirm this result we evaluated the selectivity of RH28 in an inverted format in ELISA, where purified RHO proteins had been immobilized and hs2dAb is used as a detection reagent (Figure 7). The RH28 was able to selectively detect CA RHOA but not the DN mutant when used at nanomolar concentrations. No signal was observed even at two order of magnitude higher concentration on CA

RAC1 (Figure 7A). We confirmed these results in SPR in a similar format (Figure 7B). Despite the fact that these binding conditions are far from the intracellular complexity, *in vitro* characterization comforts the choice of using RH28, as a high affinity binder selective to the GTP-bound RHOA subgroup, to monitor RHOA activity intracellular interference.



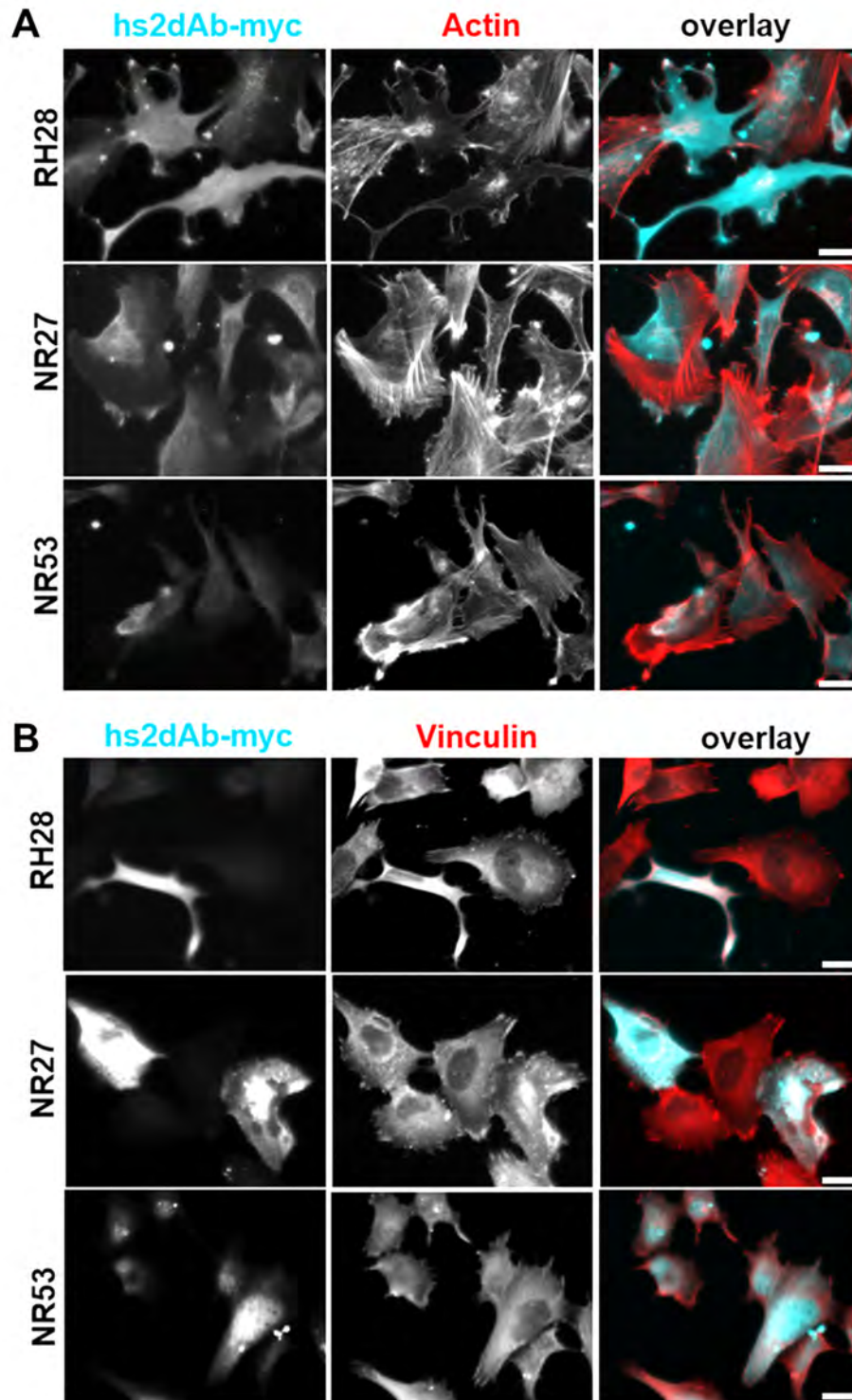
**Figure 7: *In vitro* binding properties of RH28. A: ELISA on streptactin plates.** CA or DN 2SHARHO or CA RAC1 mutants were coated on streptactin plates and different concentrations of RH28 were incubated. RH28 was revealed with anti myc epitope tag antibody. **B: SPR binding measurements.** 2SHARHO mutants were captured on strep-tag antibody immobilized on CM5 sensor chip in order to mimic ELISA binding conditions.

### Characterization of RH28 intrabody inhibitory properties.

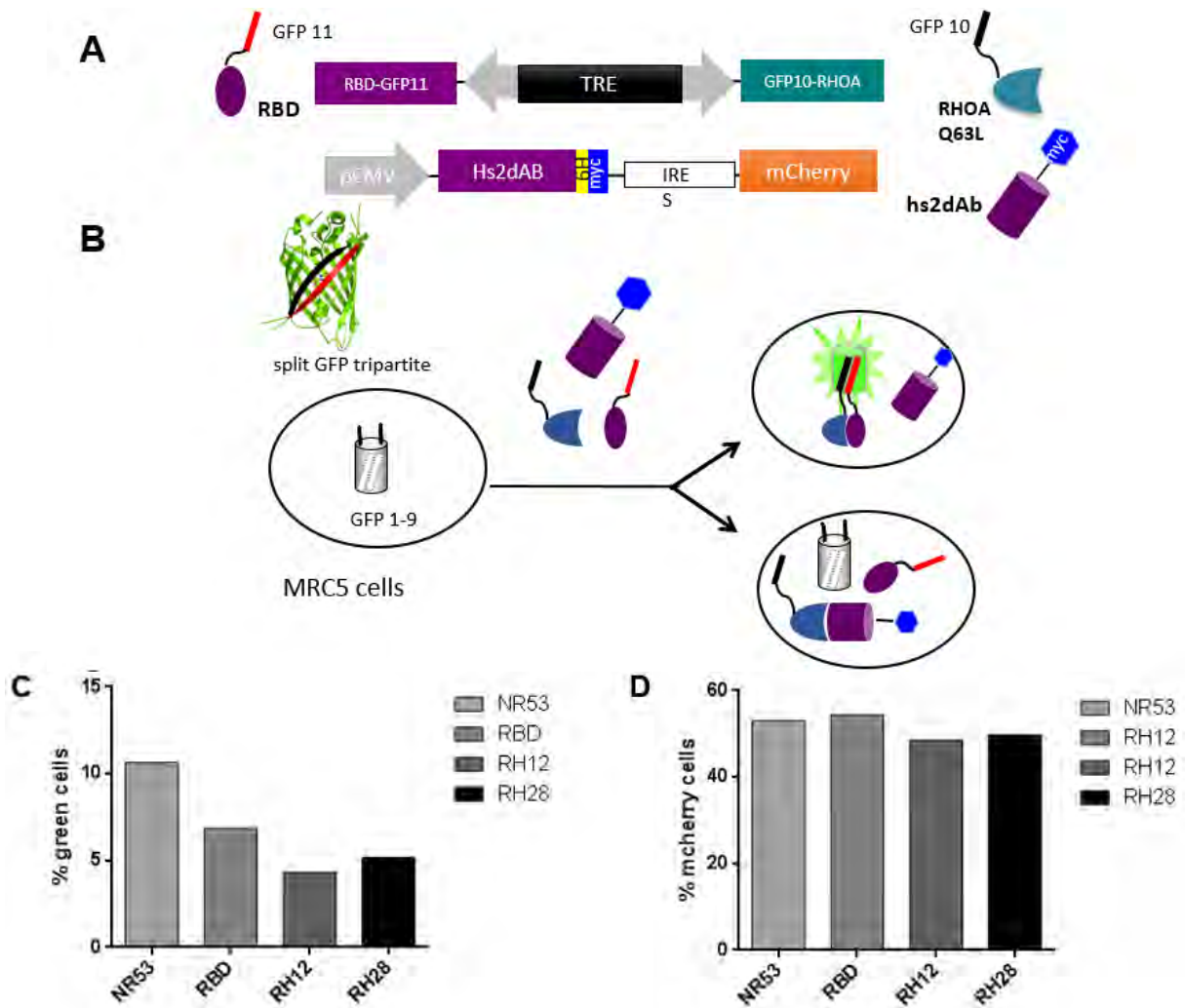
RHOA subgroup global inhibition was extensively studied using the Tat-C3 exoenzyme or by RNA interference in various cellular models. In adherent cultured epithelial cells, the main phenotype is linked to the RHOA/ROCK pathway inhibition that lead to acto-myosin contractility defect, actin fibers disorganization, and focal adhesion disassembly<sup>5,6</sup>. To evaluate whether the phenotype associated with RH28 expression in the screen effectively represents RHOA inhibition we analyzed actin cytoskeleton and focal adhesion in human fibroblast MRC5 cell line that displays high density of stress fiber in 2D cell culture. Phalloidin staining of cells expressing NR27 or NR53 hs2dAb highlights the cellular shape surrounded by strong cortical actin fibers and a high density of stress fibers crossing throughout the cell. In contrast, RH28 expression abolished totally actin fibers and induced stretched elongated cells with only subtle actin staining decorating protrusions at the periphery (Figure 8 A). In cells strongly expressing RH28, several extended protrusions appear in

multiple directions. These cellular structures phenocopied the one previously described by Burridge *et al*, who showed that RHOA inhibits RAC1 activity and limits membrane protrusions<sup>7</sup>. Vinculin is an adaptor protein that connects integrin of focal adhesions to actin fibers<sup>8</sup> and its recruitment to the focal adhesion is finely tuned by mechano-tension<sup>9</sup>. In MRC5 expressing RH28, vinculin staining of focal adhesion disappeared, compared to most of non-transfected or NR expressing cells which kept focused vinculin patches at the cell periphery (Figure 8 B). However, cells retained the capacity to be strongly attached to the support albeit they were probably lacking intracellular tensions. As acto-myosin contractility is controlled by the RHOA-ROCK pathway<sup>10</sup> and focal adhesion mechano-tension regulation more likely by the RHOA/mDia pathway, the phenotype induced by RH28 strongly suggested that its binding interferes with RHOA effectors interaction.

To determine the molecular mechanism underlying RH28 inhibition of RHOA function, we tested RH28 intrabody capacity to compete with CA RHOA and the Rhotekin RBD interaction in the split GFP tripartite assay. MRC5 expressing GFP1-9 were co-transfected with CA GFP10-RHOA and GFP11-RBD in equimolar ratio together with 5 times excess a vector expressing intrabodies with a mitochondrial mCherry under the control of an IRES used as a transfection reporter. We quantified 24 hours after transfection the FACS signal of rGFP corresponding CA RHOA and RBD interaction in mCherry positive cells. Although triple transfection was not reproducible enough to have significant quantitative data, we observed a tendency that is shown in Figure 9 for a single experiment. In cells transfected with NR27 or NR53 the rGFP signal was similarly two fold higher than the one obtained when the RBD itself was expressed as a competitor. While expressing the RH12 pan active RHO or the RH28 intrabodies, the rGFP signal was further below, suggesting that a competition may have occurred between the RH intrabodies and the GFP11-RBD. To reproduce this assay, we started the production of a stable lentiviral cell line with inducible expression of both the GFP10-RHOA and the GFP11-RBD in order to better control the level of expression of each moiety and the timing of induction after transfection of the intrabodies.



**Figure 8: RH28 expression disturbs actin cytoskeleton organization.** **A:** MRC5 cells were transfected with RH28 or NR hs2dAb and fixed 20 hours after transfection. hs2dAb were stained with an anti myc epitope tag antibody and actin stress fibers were stained with alexa 568 phalloidin. **B:** MRC5 cells were transfected with RH28 or NR hs2dAb. Transfected cells were maintained under serum-starvation for 48h, and fixed after 30 min serum (10%FBS) stimulation. hs2dAb were stained with an anti myc epitope tag antibody and mature focal adhesions were detected by vinculin. Scale bar 20  $\mu$ m.

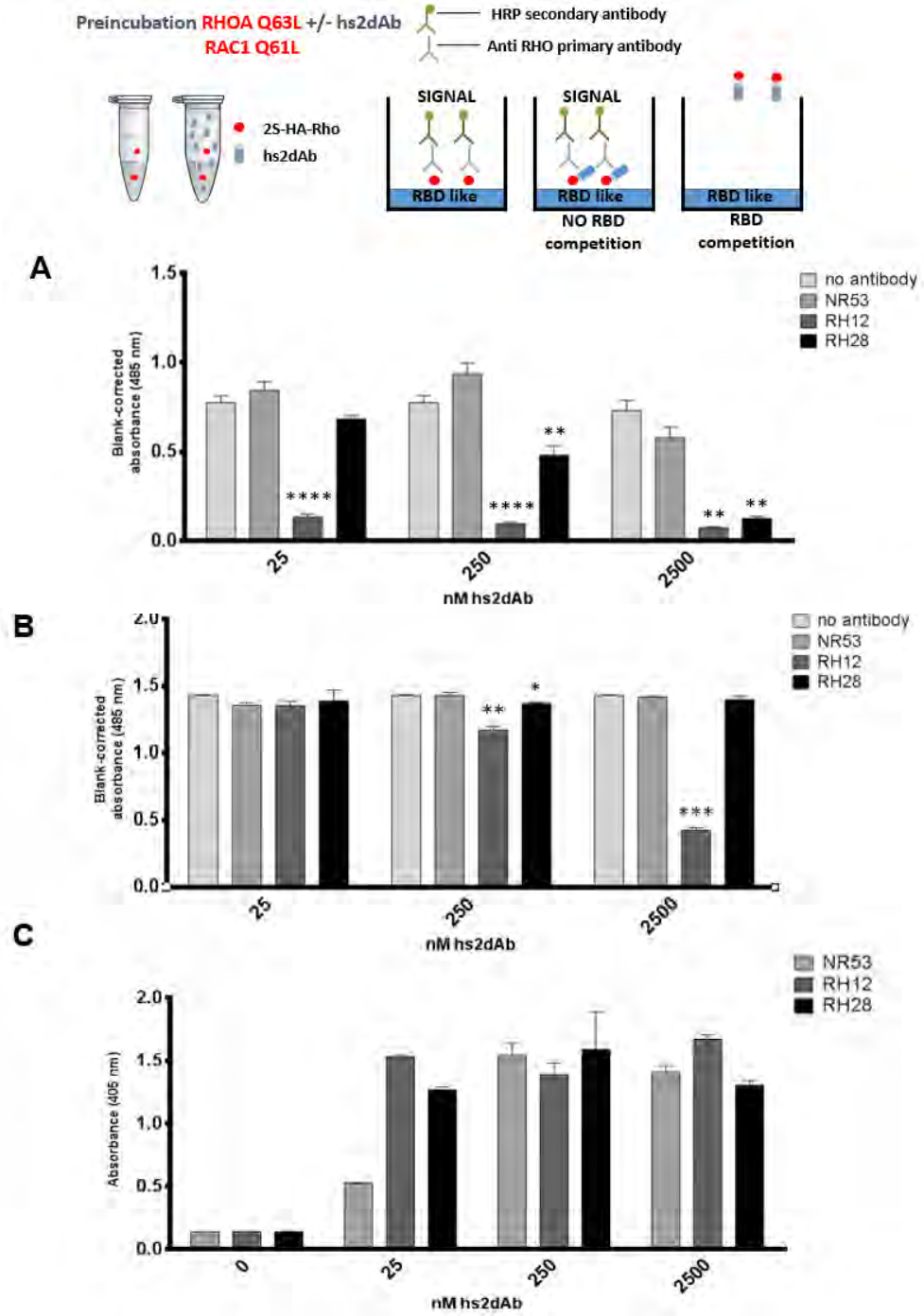


**Figure 9: RHO-GTP hs2dAb competition with the CA RHOA and Rhotekin RBD split GFP tripartite complementation cellular assay. A:** Scheme of the constructions used in the experiment. RBD-GFP11 and GFP10-RHOA are placed under the control of a doxycycline inducible promoter. **B:** Principle of the experiment. **C:** Percentage of rGFP fluorescent cells analyzed by flow cytometry of the indicated transfection conditions. **D:** hs2dAb transfection efficiency control determined using mCherry reporter.

To address the question of direct competition between an effector domain and the RH28 we set up an *in vitro* competition assay based on the G-LISA RHO activity assay. The G-LISA is based on the capture of GTP loaded RHO by RBD like proteins covalently bound to the surface of the well. Competition using a recombinant His tagged RBD failed because of the soluble RBD instability<sup>11</sup>. Therefore we used the RH12 as positive control because we have already shown that at a 25 nM concentration it was strongly depleting G-LISA signal or GST-RBD pull down assay (controls data correspond to Figure 5 of the previous article). Here we preincubated recombinant hs2dAbs NR53, RH12 or RH28 at concentrations ranging from 25 nM to 2.5  $\mu$ M with 25 nM of recombinant CA 2SHA-RHOA which is well captured by the G-LISA. In contrast to NR53 which did not interfere with the signal, the hs2dAb RH28 induced a significant decrease of the signal already at 25 nM, reaching almost 50% loss at 250 nM and a full depletion at 2.5  $\mu$ M (Figure 10 B). We confirmed that no



competition was observed on the RAC G-LISA assay (Figure 10 C). This strongly suggests that the RH28 is sterically competing with the RBD by masking at least partially the RBD epitope interface, which is around the switch II domain. The better efficacy of the RH12 might be not only due to its slightly higher affinity, but also to a stronger steric blocking of the RBD binding site.

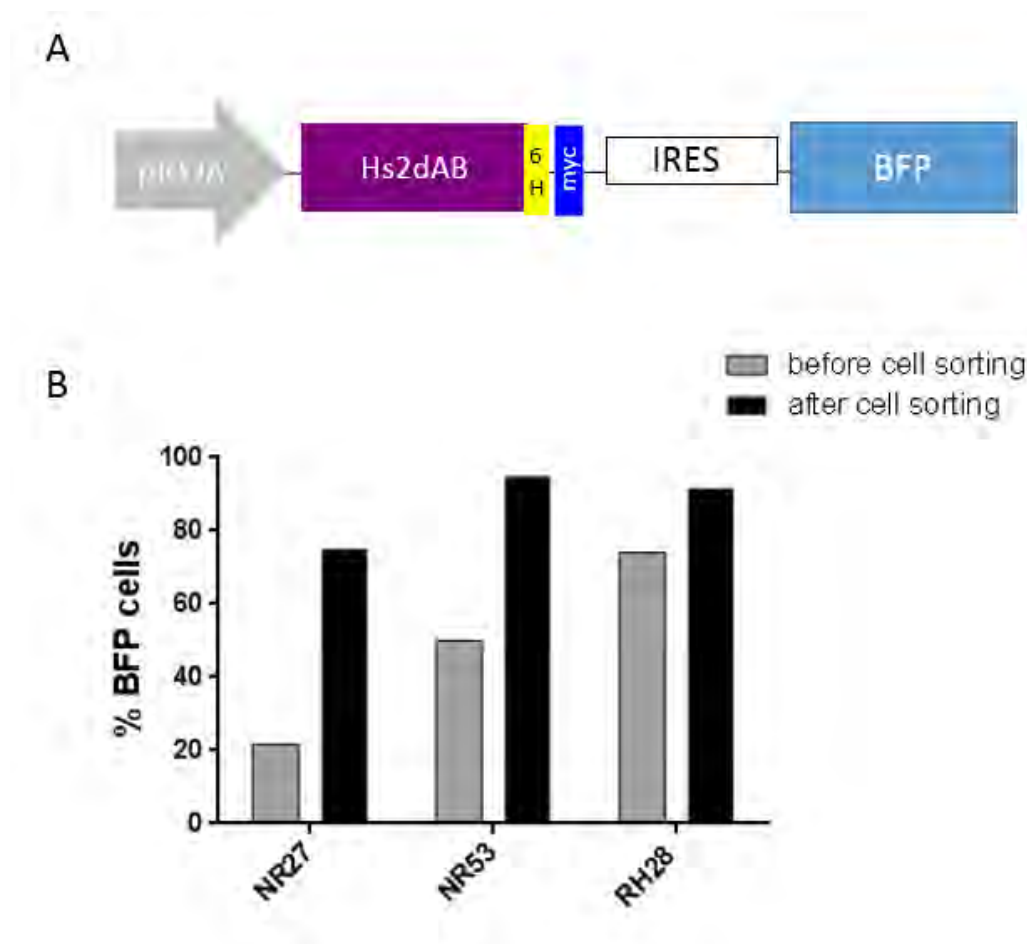


**Figure 10: Competition between RH hs2dAb and the RBD using G-LISA assay.** **A:** Scheme of the principle of the experiment. **B:** G-LISA assay on RHOA (upper panel). **C:** G-LISA on RAC1 (bottom panel). **D:** input controls of RHOA G-LISA assay. Hs2dAb were captured on Ni-NTA plates and detected by myc tag antibody. \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. Only 2 values for 2500nM.

### RH28 intrabody efficiently blocks RHOA/ROCK pathway in melanoma cancer cells

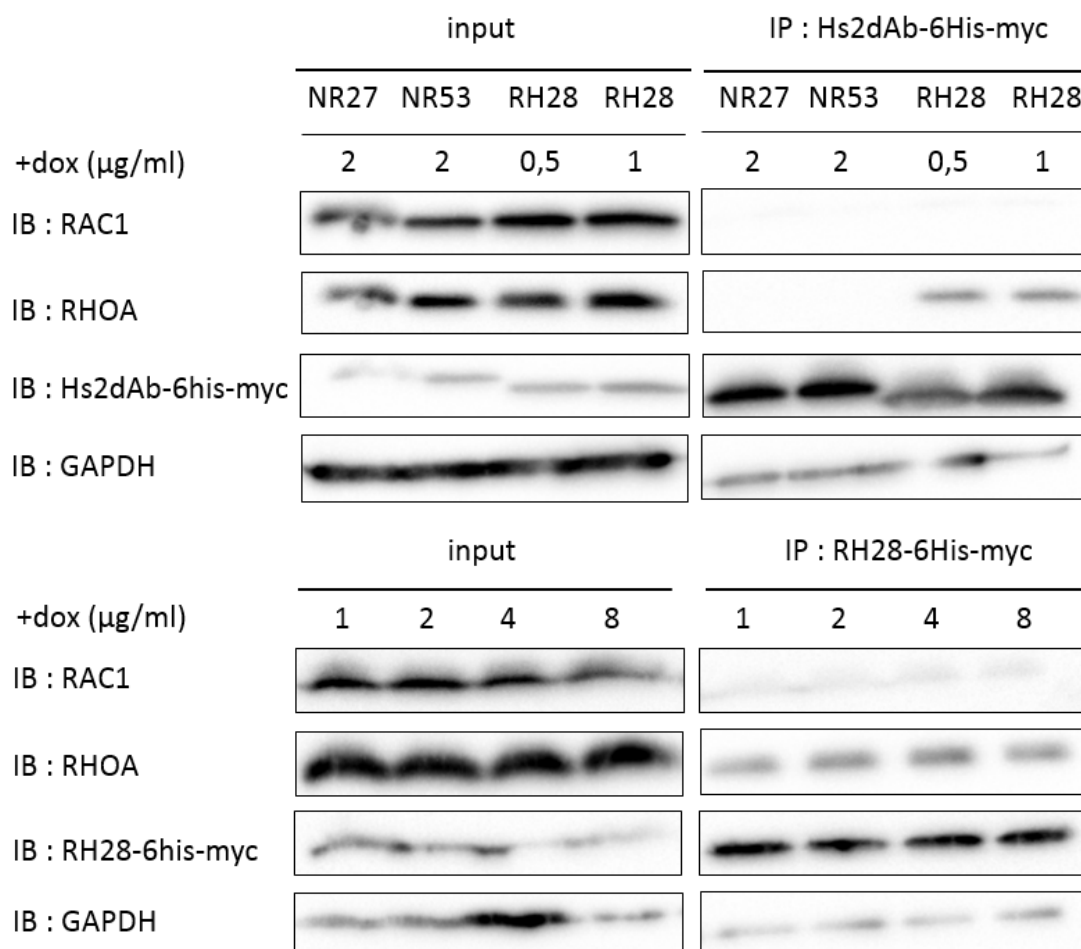
The genetic heterogeneity and the plasticity of melanoma cells are reflected by high diversity of model cell lines motility behaviors. High level of acto-myosin contractility due to RHO/ROCK pathway has been associated with amoeboid migration of melanoma cell lines<sup>12,13</sup> as well as resistance to shear forces during extravasation<sup>14</sup>. Thus, we decided to choose the human metastatic melanoma WM266.4 mutated BRAFV600E as a study model because this cell line shows both amoeboid or mesenchymal behavior according to the culture conditions and can potentially switch between these migrating modes (like the most resistant melanoma). Furthermore, several reports have linked this metastatic melanoma cell line with RHO activity or with acto-myosin cytoskeleton dynamics<sup>13,15</sup> or in the response to therapeutic compound targeting BRAFV600E active kinase<sup>16</sup>.

In order to have a better control over the expression level of intrabodies, we produced lentiviral cell lines expressing under the control of doxycycline inducible promoter, both the hs2dAb-6his-myc and a BFP fluorescent reporter through an IRES (Figure11).



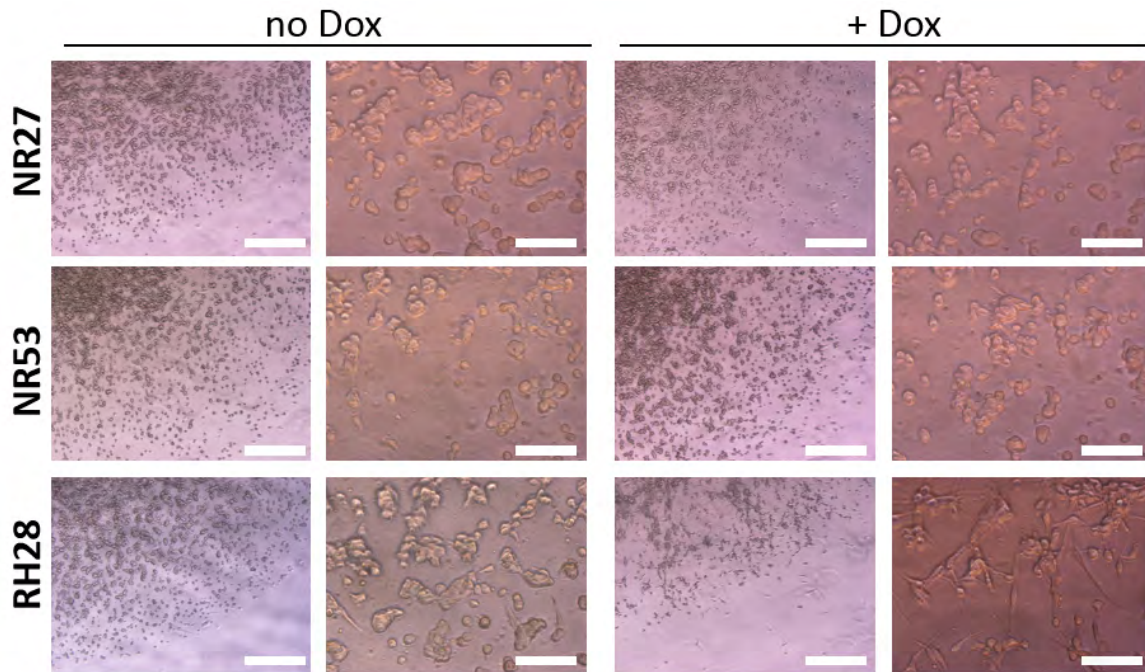
**Figure 11: WM266.4 melanoma cell line enrichment using flow cytometry cell sorting. A:** Scheme of the lentiviral construct. **B:** Flow cytometry analysis of the BFP reporter after cell sorting showing that three homogenous transduced cell lines were obtained.

After enrichment of the cell lines (Figure 11), we set up the dose response to doxycycline to express similar level of RH28 and of the two controls NR27 and NR53. We performed a precipitation assay in order to verify, in this new model, RH28 selective interaction with RHOA (Figure 12). At all doxycycline concentrations tested, RH28 selectively immunoprecipitated endogenous RHOA and not endogenous RAC1 with much clearer signal than previous similar observations in transient transfection of other cell lines.

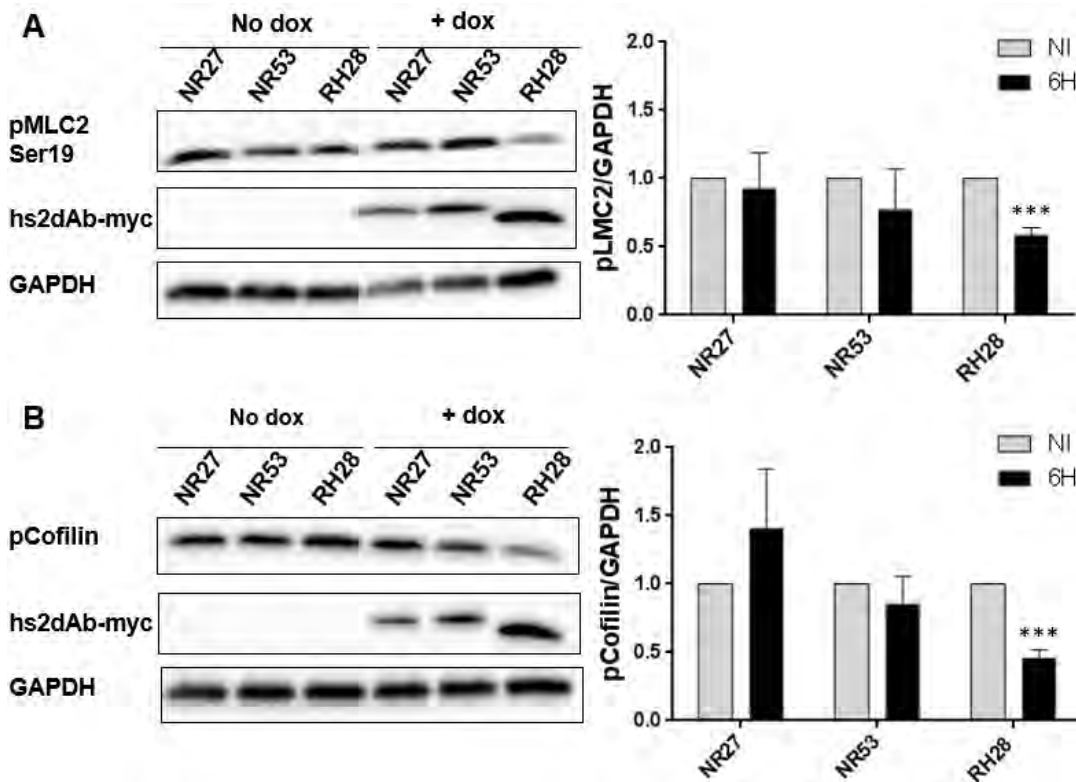


**Figure 12: RH28 selectivity validation in WM266.4 lentiviral cell line.** RH28 or NR expressions were induced with doxycycline at indicated concentrations. After 20 hours of induction, cells were harvested and cleared cell lysates were incubated with Ni-NTA beads for 45 min. Endogenous RHOA and RAC1 proteins were revealed with corresponding antibodies and hs2dAb were revealed with myc tag antibody.

In order to mimic behavior in 3D environment, cells were also seeded in collagen drops. In contrast to their spread morphology in 2D, WW266.4 exhibited a very rounded phenotype in this 3D matrix. The RH28 expression induced again a striking switch from rounded cells to highly elongated cells (Figure 13). We reasoned that this phenotype was probably correlated with the inhibition of the RHOA/ROCK pathway as the lack of contractility neither antagonize the RAC1 mediated protrusion formation nor retract the rear of migrating cells, thus elongating the cells by stretching them until adhesion collapsed.



**Figure 13: Representative images of cell lines morphology in 3D collagen drops after 6 hours of hs2dAb expression.** WM266.4 cell lines were seeded in collagen and phenotypes were analyzed 24h post doxycycline induction. At 4X magnification (left panels) cell agglutination or spreading was observed and 40X magnification (right panels) elongated or rounded cell shape could be observed. Scales bars: 500  $\mu$ m at 4X and 50  $\mu$ m at 40X.



**Figure 14: RH28 intrabody suppressed RHO/ROCK pathway in WM266.4 grown in 3D matrix.** Representative immunoblot of pMLC2 (A) and pCofilin (B) and quantification analysis. Bar graph: mean  $\pm$  SEM; n=3 experiments. \*\*\*p<0.001.

To confirm RHO/ROCK pathway inhibition, we analyzed by western blot the LIMK substrate phosphorylated cofilin and the phosphorylated Myosin Light Chain (pMLC) which are the two canonical targets defining ROCK signaling activity<sup>17</sup>. Upon RH28 expression induction in cells grown in 3D collagen, elongated cell phenotype was associated with a significant decrease of both phospho-MLC2 and phospho-cofilin markers (Figure 14). All together these results demonstrated that RH28 blocked RHOA downstream signaling due to direct interference with RHOA-GTP effector interaction.

In this study we identified the hs2dAb RH28 as a strong blocking intrabody selective towards the GTP-bound conformation of RHOA with no apparent cross reactivity towards RAC1. This new tool opens opportunities to investigate the fine-tuning of RHO activation homeostasis in various cellular contexts and allows the selective inhibition of RHOA subgroup without post-translational irreversible modification like the C3 transferase.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Cell lines, transfection method and reagents**

HeLa (cervical adenocarcinoma), MRC5-SV (human immortalized fibroblasts), WM2664 (metastatic melanoma) cell lines (ATCC) were grown in DMEM (Lonza®) supplemented with 10% FCS at 37°C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>. Transient transfection of DNA plasmids were performed using the Jet Prime method, as indicated by the supplier (PolyPlus Transfection®).

Western Blots were probed with a mouse monoclonal 26C4 anti-RHOA (1/500, O/N, 4°C, Santa Cruz Biotechnology®), goat polyclonal anti-myc tag HRP conjugated (1/3000, 1 hour, Room Temperature RT, Novus Biologicals®), mouse monoclonal anti-RAC1 (1/1000, O/N, 4°C, Millipore)®, rabbit monoclonal P-Cofilin (1/500, O/N, 4°C, Cell Signaling Technology®), Ser19 P-Myosin light chain (1/500, O/N, 4°C Cell Signaling Technology®), GAPDH (1/2000, O/N, 4°C, Cell Signaling Technology®), mouse monoclonal Chitin Binding Domain (1/1000, O/N, 4°C NEB Biosciences®). Detection was performed using peroxidase-conjugated secondary antibodies and chemiluminescence detection kit (Biorad®) except for Ser19 P-Myosin light chain and P-Cofilin which were revealed with Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent®.

Anti myc tag (clone 9E10) used in IF and FACS experiments was a gift from S. Moutel.

Anti-GFP10 rabbit polyclonal antibodies were obtained after rabbit immunization with synthetic peptides corresponding to GFP10 (DLPDDHYLSTQTILSKDLN) (Millegen, France®).

C3 exoenzyme coupled to membrane permeant peptide TAT was produced and purified in our laboratory as previously described<sup>18</sup>.

## DNA constructs

(note that the corresponding plasmid maps will be shown in the annexe of the thesis manuscript)

### Bacterial expression vectors:

**2SHA-RHO** mutants tagged with the twin Streptag II (IBA) were expressed from a pET vector as previously described in <sup>1</sup>.

**hs2dAb 6His-myc-6His:** hs2dAb-6his-myc insert was digested from pIB-GFP<sup>1</sup> and inserted in a modified pHEN6-VHH-6his<sup>19</sup>, thus creating a periplasmic expression vector pHEN6-hs2dAb-6his-myc-6his.

**hs2dAb CBD-2S-6His:** A CBS-2S dual tag was PCR amplified and cloned at the NotI site downstream of hs2dAb in pHEN6 vector, in order to produce pHEN-hs2dAb-CBD2S-6his.

### Mammalian expression vectors :

**pGFP11-Ib:** pIb-hs2dAb-6his-myc-GFP was digested AgeI and Acc65I to remove the GFP and replace it by a set of hybridized oligonucleotides which encodes 2 stop codons. Then the resulting pIB vector was digested NcoI to insert a PCR product digested BspHI/NcoI which encodes an amino terminal GFP11 tag followed by a flexible linker.

**pIb-GFP11:** pIb-hs2dAb-6his-myc-GFP was digested AgeI and Acc65I to remove the GFP and replace it by a PCR product encoding a Glycine Serine flexible linker followed by a carboxy-terminal GFP11 tag.

**pGFP10-RHOA:** CA or DN RhoA mutants were generated by site-directed mutagenesis and cloned into BspEI:XbaI sites of pcDNA\_GFP10-Nter fusion vector previously described in <sup>3</sup>.

**pGFP11-RBD:** The Rho Binding Domain of Rhotekin were amplified by PCR from pGST-RBD pGEX (Addgene#15247) and inserted into NotI:Clal cloning sites of pcDNA\_GFP11-Cter fusion vector previously described in <sup>3</sup>.

**pGFP11-RBD-TRE-GFP10-RHOA:** Lentiviral vector co-expressing 10-RHOA and RBD-11 was generated by subcloning the pTRE tight RBD-11 cassette into the MluI site of an HIV-1-based lentiviral pTrip vector carrying a tetracycline response element (TRE) (BIVICplatform, IFR 150, CHU Rangueil, Toulouse).

**pIb-IRES-MTS-FP** (Fluorescent Proteins, mCherry or GFP): were previously described in <sup>1</sup>. pIb-myc-IRES-mitoGFP: is a modified version of the pIB-myc-IRES-mitoCherry by replacing mCherry with mGFP that was previously described in <sup>1</sup>.

**pIb-myc and pIb-myc-IRES-BFP:** were previously described in <sup>1</sup>.

**CBD RHO and 2S RHO:** were previously described in <sup>1</sup>.

## Subtractive Phage display Panning for isolating RHO-GTP specific hs2dAb

The NaLi-H1 library of humanized synthetic single domain antibody was used for this study<sup>1</sup>. A Subtractive panning protocol was designed to isolate hs2dAb selective for the RHOA-GTP-Chitin binding domain from chitinase A1 (CBD) or twin strep tag (IBA) fusion of RHOA GTPase active mutant (RHOAQ63L) were expressed transiently during 24 hours in HEK293 cells and captured

freshly after cell lysis on magnetic beads before incubation with the library phages. Chitin magnetic beads (NEB®) or streptactin coated magStrep HC (IBA®) beads were used. A phage display panning alternating rounds on chitin beads with rounds on streptactin beads was performed during 4 rounds. From the second round of panning, a depletion step on GDP loaded wild type RHOA or N19 inactive mutant and on RHOB Q63L, RHOC Q63L, RAC1 Q61L active mutants was included. The adequate amount of antigen coated beads was incubated for 2 hours with the phage library ( $10^{13}$  phages diluted in 1 mL of PBS + 0.1% Tween 20 + 2% non-fat milk). Phages were previously adsorbed on empty streptavidin-coated magnetic beads (to remove nonspecific binders). Phages bound to streptavidin-coated beads or chitin beads were recovered on a magnet. Beads were washed 10 times (round 1), 15 times (round 2), 25 (round 3 and 4) with PBS-Tween 0.1% on a magnet. Bound phages were eluted using triethylamine (Sigma Aldrich®) and *E. coli* (TG1 strain) were infected with the eluted phages. For round 2 and round 3 and 4, only  $10^{12}$  phages were used as input.

### **ELISA assays**

Wells of streptactin-coated plates (IBA®) were coated with 100 nM of recombinant RHOA or RAC1 2S-HA protein (200  $\mu$ l in TBS by well) during 2 hours at RT and then blocked with 5% milk in TBS-Tween 0.05% (blocking buffer) for 1 hour at RT. Several dilutions of hs2dAb in blocking buffer were applied to the ELISA plates in duplicates for 1 hour at RT. Next, we added 1  $\mu$ g/ml anti-myc HRP antibody (QED Biosciences, 18824P®) in blocking buffer for 1 hour at RT and the reaction was visualized by the addition of 100  $\mu$ l chromogenic substrate (Thermoscientific®, 1-step ultraTMB, 34028) for 1 min. The reaction was stopped with 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N and absorbance at 450 nm was measured using FLUOstar OPTIMA microplate reader. Plates were washed three times with washing buffer (TBS containing 0.05% (v/v) Tween 20) after each step. All steps are performed under agitation (400 rpm).

### **2SHA RHO purification**

2SHA-RHO were expressed in BL21 *E. coli* cells from a pET vector. Transformed bacteria cells were used to grow 3mL LB-carbenicillin (100  $\mu$ g/ml) cultures overnight at 37°C prior to inoculation in baffled flasks containing 1 L of the same media. Cells were allowed to grow for approximately at 37°C until OD<sub>600</sub> reached 0.5-0.7. Cells were then induced with IPTG at a final concentration of 100  $\mu$ M and grown for an additional 20 hours at 25°C. Cells were harvested by centrifugation at 4000 $\times$ g for 20 min. The pellets were re-suspended in lysis buffer (50 mM Tris HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% triton, 1mM DTT, lysozyme and DNase I 1X, proteases inhibitors) and lysed by sonication on ice prior to centrifugation (15min, 10000 g, 4°C). Streptactin SuperFlow Plus (IBA®) matrix was equilibrated in buffer A (50 mM Tris HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) and was incubated with supernatant for 2 hours at 4°C. Then supernatant and matrix were loaded on a simple column in order to maximise capture of 2SHARho proteins. Matrix was washed by 15 mL of washing

buffer (300mM NaCl, 50 mM tris pH8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% tween20). RHO proteins were then eluted in buffer A containing 10 mM Biotin (Sigma®). Dialysis was performed over night against buffer A containing 15% glycerol.

### **Hs2dAb purification**

Briefly, hs2dAb was produced in XL1blue *E.coli* grown in TB-ampicillin (100 µg/mL) medium supplemented with 1% glucose in the start culture and 0.1% glucose during induction with 1mM IPTG. After overexpression for 16h at 28°C, the cells were harvested, suspended in 15 mL ice-cold TES (Tris 100mM pH 8, EDTA 1mM, Sucrose 500mM) and stored at -80°C. 30 mL of a ¼ dilution of TES buffer was added to the re-suspended pellets prior to vortex briefly and to keep for 30 min at 4°C. After centrifugation (30min, 13000g, 4°C), the periplasmic extract containing hs2dAb was purified by affinity chromatography. The protein extract was incubated 2 h in the presence of His-Tag purification beads (Roche®) previously equilibrated with equilibration buffer (12mM Tris pH8, 0.125mM EDTA, 65mM Sucrose, 300mM NaCl, 10 mM Imidazole pH7). Beads were washed with 30 ml of washing buffer (10mM Tris pH8, 150mM NaCl, 10 mM Imidazole pH7). hs2dAb were then eluted with elution buffer (500mM Imidazole pH7, 25mM Tris pH6.8, 300mM NaCl) and dialysis was performed for 16 hours at 4°C in PBS 10% Glycerol. OD at 280 nm was measured in order to determine hs2dAb concentration.

### **Affinity measurement**

Hs2dAb binding studies based on SPR technology were performed on BIAcore T200 optical biosensor instrument (GE Healthcare®). Capture of recombinant hs2dAb-6xHis, expressed in X11blue and purified as previously reported<sup>19</sup> was performed on a nitrilotriacetic acid (NTA) sensor chip in HBS-P+ buffer (10mM Hepes pH 7.4, 150mM NaCl, and 0.05 % surfactant P20) (GE Healthcare). The four flow cells (Fc) of the sensor chip were used: one (Fc 1) to monitor nonspecific binding and to provide background corrections for analyses and the other three flow cells (Fc 2, 3, and 4) containing immobilized hs2dAb-6xHis for measurement.

For immobilization strategies, flow cells were loaded with nickel solution (10 µL/min for 60 s) in order to saturate the NTA surface with Ni<sup>2+</sup> and an extra wash using running buffer containing 3mM EDTA after the nickel injection. His-tagged hs2dAb in running buffer was injected in flow cells at a flow-rate of 10 µL/min. Total amount of immobilized hs2dAb-6xHis was 250-300 resonance units. (RUs; 1 RU corresponds approximately to 1 pg/mm<sup>2</sup> of protein on the sensor chip). A Single-Cycle Kinetics (SCK) analysis to determine association, dissociation and affinity constants (k<sub>a</sub>, k<sub>d</sub>, and K<sub>D</sub> respectively) was carried out. SCK method prevents potential inaccuracy due to sensor chip regeneration between cycles which are necessary in the conventional multiple cycle kinetics (MCK)<sup>20</sup>. SCK binding parameters are evaluated for each injection according to the tools and fit models of the BIAevaluation software, giving similar values than MCK. As hs2dAb were smaller proteins than their



respective antigens, hs2dAb were captured on the sensor chip then the recombinant antigens were used as analyte and were injected sequentially with increased concentrations ranging between 3,125 nM to 50 nM in a single cycle without regeneration of the sensorship between injections. Binding parameters were obtained by fitting the overlaid sensorgrams with the 1:1. Langmuir binding model of the BIAevaluation software version 1.0. We also performed an inverted format analysis, in which 2SHA RHO were captured on strepmab (IBA®) immobilized CM5 Chip to check if binding parameters were similar.

### **Immunofluorescence staining**

Transfected cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde and permeabilized with PBS-Triton 0.1%, blocked with PBS-BSA 8%, incubated with primary antibody mouse monoclonal anti-myc tag (9E10 clone 1/800, O/N, 4°C) then Pacific blue mouse secondary antibodies (1/400, 1 hour, RT, BD Bioscience®). Alexa 568-Phalloidin (1/40, 1 hour, RT, Invitrogen®) was used to reveal actin stress fibers and primary antibody mouse monoclonal anti vinculin (1/400, O/N, 4°C, Sigma Aldrich®) followed by Alexa 568-anti mouse secondary antibody (1/400, 1 hour, RT, BD Bioscience®) to reveal mature focal adhesions. All coverslips were mounted in Mowiol. Data acquisition was carried out on a Zeiss axiovert inverted microscope and analyzed using Image J.

### **Pull down assays**

Co-precipitations of intrabodies (myc-tagged hs2dAb) with CA RHOA mutants were performed after transient co-transfection of pCBD-RHOA Q63L with pIb-myc in HeLa cells. After 24h, cleared cell lysates containing CBD-RHO mutants in buffer (50 mM Tris pH 7.4, 500mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1% TritonX100, proteases and phosphatases inhibitors supplemented) were incubated with chitin beads (NEB Biolabs®) for 1 hour at 4°C. Co precipitation was revealed by RHOA antibody and myc antibody.

Co-precipitations of intrabodies (myc-tagged hs2dAb) with endogenous mammalian RHO proteins were performed after doxycycline induction of pIb-myc-IRES-BFP in WM2664 cells. Cleared cells lysates were then incubated with His tag purification beads (Roche®) during 45 minutes at 4°C for Ni-NTA IMAC pull down. Beads were then washed thrice in washing buffer (Tris pH 7.4 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 0,1% Tween20), and immunoprecipitates were then analyzed by Western blotting and revealed by RHOA antibody and myc antibody.

### ***In cellulo* interaction with split GFP technique**

GFP1-9 fragment expressing MRC5 (GFP1-9MRC5) cells were cotransfected either by GFP10 tagged constitutively active RHOA Q63L mutant or inactive RHOA T19N mutant (gift from S. Cabantous) and by GFP11 tagged hs2dAb. 20 hours after transfection, cells were fixed with 3,7% PFA

(Sigma-Aldrich®) and permeabilized by 0,1% triton X100 (Sigma-Aldrich®). After, cells were co-stained with 9E10 anti myc monoclonal (1/3000, 4°C, 1H30) antibody and with anti GFP10 fragment antibody (1/1000, 4°C, 1H30). Secondary antibodies were respectively mouse APC and rabbit Pacific blue (1/100, 1H, 4°C BD Biosciences®) (1/200, 1H, 4°C BD Biosciences®). GFP fluorescence was measured using FACS MACS Quant 10 cytometer®. At least 20,000 gated events were counted for each sample and analysed using Kaluza analysis software (Beckman Coulter®). We quantified hs2dAb and GFP10 RHOA mutants' expression levels with geometric mean.

rGFP fluorescence was also imaged on a zeiss axiovert inverted microscope. For immunofluorescence experiment, transfected cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde and permeabilized with PBS-Triton 0.1%, blocked with PBS-BSA 8%, incubated with primary antibody mouse monoclonal anti-myc tag (9E10 clone 1/800, O/N, 4°C) and anti GFP10 fragment antibody (1/1000, O/N, 4°C) then respectively Pacific blue mouse secondary antibodies (1/400, 1 hour, RT, BD Bioscience®) and Alexa 568 -anti mouse secondary antibody (1/400, 1 hour, RT, BD Bioscience®).

### ***In cellulo* competition with split GFP technique**

hs2dAb (in mammalian expressing vector with MTS mCherry) were co-transfected with a doxycycline inducible lentivirus vector expressing GFP10-RHOAWT and GFP11-RBD in GFP1-9 fragment expressing MRC5 (GFP1-9MRC5) cells. 20 hours after transfection, GFP10-RHOAWT and GFP11-RBD expression were induced with doxycycline. 16 hours later, GFP fluorescence was measured using FACS MACS Quant VYB cytometer. At least 20,000 gated events were counted for each sample and analysed using Kaluza analysis software (Beckman Coulter®).

### **G-LISA procedure**

We used GLISA™ assay (Cytoskeleton) according to the manufacturer's instructions to assess if purified hs2dAb were able to compete with RBD domain. See article 3 for preincubation conditions.

### **Production of stable cell lines with tetracycline inducible (Tet-on) hs2dAb expression**

Each p-Ib-myc-IRES-BFP lentivirus was produced according to the tri-transfection procedure using the plasmids pLvPack and pLvVSVg (Sigma®) in 293T cells for viral production. WM2664 were previously transduced with the rtTA doxycycline-inducible trans activator, and then cells were further transduced with the IB-IRES-BFP lentivirus containing supernatant.

In order to establish the most homogeneous cell lines, for transduction efficiency, 24h after doxycycline induction, cells were then sorted on a BD Influx™ cell sorter for their cytoplasmic BFP fluorescence intensity. Flow cytometry data were analyzed with Kaluza software (Beckman Coulter®).

### Cell culture in a 3D matrix

Cells were embedded in a 3D matrix constituted of collagen type I (1.5 mg/ml, Cornig®) in EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium; 2 ×, Lonza®) at a concentration of  $1,5 \times 10^5$  cells/ml. Drops (30 µl) were placed for 1 h upside down at 37 °C to allow solidification of the matrix. The complete medium was then added and hs2dAb expression was induced by doxycycline. 6 hours later, cell morphology was observed under a Nikon inverted microscope and drops were harvested, collagenase I (100U/mL, final concentration, ThermoFisher®) added and cells were centrifuged. Pelleted cells were then lysed in RIPA buffer containing phosphatases and proteases inhibitors.

### Statistical analysis

Reported values represent mean ± standard error of mean (SEM) of at least three independent experiments. P values were calculated with GraphPad Prism 6 using a Student's t-test. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001; \*\*\*\*, p< 0.0001.

### REFERENCES

1. Moutel, S. *et al.* NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies. *eLife* **5**, (2016).
2. Rondot, S., Koch, J., Breitling, F. & Dübel, S. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat. Biotechnol.* **19**, 75–78 (2001).
3. Cabantous, S. *et al.* A new protein-protein interaction sensor based on tripartite split-GFP association. *Sci. Rep.* **3**, 2854 (2013).
4. Zolghadr, K. *et al.* A Fluorescent Two-hybrid Assay for Direct Visualization of Protein Interactions in Living Cells. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 2279–2287 (2008).
5. Uehata, M. *et al.* Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **389**, 990–994 (1997).
6. Ridley, A. J. & Hall, A. 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 (1992).
7. WorthyLake, R. A. & Burridge, K. RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J. Biol. Chem.* **278**, 13578–13584 (2003).
8. Petit, V. & Thiery, J.-P. Focal adhesions: Structure and dynamics. *Biol. Cell* **92**, 477–494 (2000).
9. Riveline, D. *et al.* Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J. Cell Biol.* **153**, 1175–1186 (2001).
10. Rodriguez-Hernandez, I., Cantelli, G., Bruce, F. & Sanz-Moreno, V. Rho, ROCK and actomyosin contractility in metastasis as drug targets. *FI000Research* **5**, 783 (2016).

11. Chineastra, P. *et al.* Generation of a single chain antibody variable fragment (scFv) to sense selectively RhoB activation. *PloS One* **9**, e111034 (2014).
12. Sanz-Moreno, V. *et al.* Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* **135**, 510–523 (2008).
13. Sahai, E. & Marshall, C. J. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat. Cell Biol.* **5**, 711–719 (2003).
14. Pinner, S. & Sahai, E. Imaging amoeboid cancer cell motility in vivo. *J. Microsc.* **231**, 441–445 (2008).
15. Yin, Z. *et al.* A screen for morphological complexity identifies regulators of switch-like transitions between discrete cell shapes. *Nat. Cell Biol.* **15**, 860–871 (2013).
16. Delmas, A. *et al.* The c-Jun/RHOB/AKT pathway confers resistance of BRAF-mutant melanoma cells to MAPK inhibitors. *Oncotarget* **6**, 15250–15264 (2015).
17. Julian, L. & Olson, M. F. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): Structure, regulation, and functions. *Small GTPases* **5**, e29846 (2014).
18. Sahai, E. & Olson, M. F. in *Methods in Enzymology* **406**, 128–140 (Elsevier, 2006).
19. Olichon, A. & Surrey, T. Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **282**, 36314–36320 (2007).
20. Trutnau, H.-H. New multi-step kinetics using common affinity biosensors saves time and sample at full access to kinetics and concentration. *J. Biotechnol.* **124**, 191–195 (2006).

# DISCUSSION



# DISCUSSION

L'objectif de ma thèse était de mettre au point des anticorps sélectifs de la forme active de RHOA à partir d'une nouvelle banque synthétique d'anticorps à simple domaine NaLiH1.

La sélection de cette banque sur la forme active de RHOA a permis d'obtenir près d'une trentaine d'anticorps susceptibles de reconnaître *in vitro* la forme active de RHOA. L'un d'entre eux, le RH12 représentant la majorité des clones retenus dans la procédure de sélection de *phage display*, possède des propriétés de liaison permettant de concevoir un nouveau test d'activation des GTPases RHO. Un autre, le RH28 s'est avéré plus particulièrement intéressant dans le contexte intracellulaire.

Etre parvenu à isoler ces différents anticorps témoigne en premier lieu de la réussite du protocole de *phage display* et valide les choix effectués pour le protocole. Nous avons en effet obtenu des anticorps capables de reconnaître la protéine dans le contexte intracellulaire des eucaryotes supérieurs et sélectifs de la forme active de ces protéines. En revanche, nous n'avons pas été en mesure d'isoler un anticorps susceptible de discriminer RHOA de RHOB et de RHOC. Un autre protocole de *phage display*, comportant une compétition plus drastique en terme de quantité de protéine recombinante utilisée ne s'est pas avéré plus fructueux. Nous verrons dans les paragraphes suivants comment nous pourrions améliorer la sélectivité.

Connaître les modalités de liaison de ces deux anticorps à leur cible est une notion essentielle. Au-delà de la simple description des liaisons impliquées entre les deux partenaires de l'interaction, celle-ci permettrait d'envisager des pistes pour améliorer l'affinité, la sélectivité de liaison, et confirmerait le mode d'action intracellulaire supposé du RH28. Dans ce chapitre, nous présenterons dans un premier temps les méthodes envisageables pour déterminer l'interaction antigène/anticorps. Nous expliquerons en quoi elles nous permettent de comprendre les propriétés de liaison (effet bloquant, affinité, sélectivité de reconnaissance) des deux anticorps retenus. Puis, nous discuterons plus largement des applications proposées pour l'étude des RHO par l'utilisation du RH12 *in vitro* et du RH28 *in cellulo*. Nous présenterons pour conclure, les applications envisageables grâce à ces nouveaux outils.

## A. Etude du mode de liaison des anticorps à leur cible

Il existe différentes méthodes permettant d'identifier les résidus d'acides aminés impliqués dans l'interaction antigène anticorps. Le cristal du complexe antigène anticorps renseignerait immédiatement sur le nombre, la nature et la localisation des liaisons établies entre l'anticorps et sa cible permettant respectivement de comprendre l'affinité, la sélectivité de reconnaissance et le mode d'action de l'anticorps dans le contexte intracellulaire. Cependant, les informations obtenues restent dépendantes des conditions expérimentales dans lesquelles a été formé le cristal et doivent toujours être extrapolées au contexte intracellulaire avec précaution. Si l'information essentielle recherchée est celle des acides aminés de RHOA impliqués dans la liaison avec l'anticorps, il serait envisageable de procéder à un « alanine scanning », un criblage par remplacement systématique des résidus en surface propices aux interactions par des résidus Alanine. Dans cet ordre d'idée, nous pourrions, dans un premier temps, évaluer la liaison au mutant RHOT37A, décrit pour ne pas se lier aux effecteurs. Cependant, ce type d'approche n'exclut pas la possibilité que la mutation d'un résidu d'acide aminé ne perturbe pas l'ensemble de la conformation de la protéine, ce qui est fondamental dans notre étude. C'est pourquoi, Fridy *et al* recourent à l'analyse par RMN de la perturbation de l'échange entre l'hydrogène et le deutérium au niveau de l'interface pour analyser la liaison de différents nanobodies sur la GFP<sup>239</sup>. D'autres proposent une méthode d'épitope mapping rapide et applicable en parallèle à plusieurs anticorps, basée sur l'analyse en spectrométrie de masse des peptides issus du couplage chimique entre l'anticorps et sa cible par des agents de pontage très courts agissant à la surface d'interaction<sup>326</sup>. Nous détaillerons dans les paragraphes ci-après en quoi la connaissance structurale du complexe RH28/RHOA-GTP ou de l'épitope d'interaction nous serait précieuse et nous incite fortement à établir des collaborations avec les équipes possédant ces technologies spécialisées et encore trop peu accessibles.

### 1. Pour comprendre l'effet bloquant du RH28

Connaître l'épitope de RHOA impliqué dans la liaison à l'anticorps permettrait de confirmer l'effet bloquant de l'anticorps au niveau stérique. En effet, les expériences *in vitro* de compétition avec le G-LISA n'excluent pas que l'anticorps se lie sur un autre site que celui du RBD et perturbe quand même la liaison RHOA/RBD par encombrement stérique. L'obtention d'un effet bloquant *in vitro* avec le RH28 pour des concentrations de l'ordre du micromolaire ne remet pas en cause l'effet bloquant observé *in cellulo*, phénotypiquement et fonctionnellement. Principalement car les conditions *in vitro* ne sont pas strictement transposables au contexte intracellulaire, notamment par l'effet d'avidité dû à la capture du domaine RBD sur une phase solide. Cependant, le caractère bloquant de l'anticorps mérite d'être renforcé sur le plan mécanistique *in cellulo*. Nous avons dans une première approche évalué l'activité de RHOA en présence des intracorps par la technique du GST-RBD pull



down. De la sorte, la quantité de GST-RBD recombinante déplace la liaison de l'intracorp et nous ne sommes donc pas en mesure par cette technique de mettre en évidence un effet bloquant. C'est pourquoi nous avons déjà entrepris des expériences de compétition dans les MRC5 avec le fragment GFP11-RBD. Nous souhaitons poursuivre ces expériences en construisant une lignée cellulaire exprimant sous le contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline les fragments GFP11-RBD et GFP10-RHOA. De la sorte nous pourrions établir une gamme de compétition avec le RH28. A plus long terme, ces expériences pourraient être complétées par des expériences effectuées avec un effecteur pleine taille de RHOA.

## 2. Pour comprendre la sélectivité conformationnelle

Connaître les acides aminés impliqués dans la liaison antigène anticorps permettrait de comprendre comment s'établit la sélectivité de reconnaissance des anticorps vis à vis de la forme active de RHOA. Il est intéressant de remarquer que les clones testés au sortir du cycle 4 d'enrichissement se sont avérés tous sélectifs de la conformation active des GTPases RHO. Le protocole de *phage display* adopté a comporté une étape d'élimination des phages reconnaissant la forme inactive de la protéine, ce qui a pu contribuer à cette situation et témoigner de son efficacité. Cependant, pour les raisons évoquées plus haut, l'antigène compétiteur a été également produit en cellules humaines. Ce qui implique que la quantité d'antigène compétiteur obtenue soit faible et certainement pas dans des proportions compatibles avec une compétition efficace. Ce qui laisserait donc supposer que la forme active des RHO soit plus propice à l'interaction protéique que la forme inactive, c'est d'ailleurs ce que la nature a choisi pour l'interaction avec les effecteurs.

Les résultats des expériences avec la technique du split GFP tripartite montrent une différence significative entre les conditions transfectées par les mutants constitutivement actifs et inactifs, confirmant *in cellulo* la sélectivité conformationnelle observée *in vitro* en ELISA et par SPR. Cependant, nous pouvons observer dans la condition transfectée avec le mutant T19N, un pourcentage non négligeable de reconstitution de fluorescence. Le split GFP tripartite est une technique sensible, permettant d'amplifier, par son caractère irréversible, des interactions faibles et transitoires dans la cellule. C'est donc une technique parfaitement adaptée par sa sensibilité au criblage d'interaction qu'il convient par la suite de confirmer par d'autres méthodes. Utiliser le split GFP tripartite *in cellulo* pour comparer la sélectivité vis à vis de deux protéines (ou conformations) est pour la même raison une méthode très discriminante, dans le cas où elle met en évidence une différence. Cela nécessite de se placer dans une fenêtre d'expression et de complémentation dans laquelle le niveau de rGFP est représentatif de la sélectivité de l'interaction. Enfin, dans la cellule, si interaction avec la forme inactive il y a effectivement, alors celle-ci ne devrait en théorie ne pas entraîner de conséquences fonctionnelles majeures puisqu'aucune fonction n'a été associée jusqu'à présent aux formes liées au GDP des RHO.

### 3. Pour comprendre la sélectivité RHOA/RAC

Le RH12 n'est pas capable de distinguer RHOA de RAC, tandis que le RH28 s'avère sélectif de la sous-famille RHOA *in vitro* et *in cellulo*. Si les résultats des expériences de co-immunoprécipitation réalisées dans deux lignées différentes sont sans équivoque vis à vis de la sélectivité RHOA/RAC (immunoprécipitation de RHOA et pas de RAC), il n'est pas exclu qu'une interaction avec RAC se produise effectivement dans le milieu intracellulaire. C'est pourquoi l'interaction intracellulaire du RH28 avec RAC mériterait d'être évaluée de la même façon que sur RHOA par la technique du split GFP, ou d'autres rapporteurs d'interaction évoqués ci-dessus. Sur le plan moléculaire, rappelons que les effecteurs possédant un domaine CRIB distinguent la sous-famille RHOA de RAC et CDC42 par l'interaction avec l'acide aminé en position 40, différent entre RAC1 (Acide Aspartique) et RHOA (Acide Glutamique). C'est aussi cet acide aminé qui est impliqué dans la liaison de ROCK à la sous-famille RHOA<sup>31</sup>. De la même façon, les résidus d'acides aminés de RHOA impliqués dans l'interaction avec PKN sont différents de ceux occupés aux mêmes positions dans RAC et CDC42, ce qui peut expliquer la sélectivité de cette protéine pour la sous-famille RHOA<sup>36</sup>. Aussi serait-il instructif de tester si la mutation RHOA E40D affecte l'interaction entre RH28 et RHOA.

Concernant le RH12, nous avons observé que celui-ci ne rentre pas en compétition directe avec le domaine CRIB de POSH dans l'expérience avec le G-LISA RAC, alors qu'il rentre parfaitement en compétition avec le RBD de la Rhotekine dans l'expérience avec le G-LISA RHOA. Sachant qu'en SPR celui-ci présente la même affinité pour RHOA et RAC1, rappelons que le mode de liaison des effecteurs à domaine CRIB sur RAC et CDC42 est différent et n'intéresse probablement pas les mêmes épitopes que le RBD sur les RHO (cf I.B.1.a). Ainsi le RH12 peut rentrer en compétition directe avec le RBD et seulement de façon partielle avec le domaine CRIB.

### 4. Pour améliorer la sélectivité au sein de la sous-famille RHOA

Le RH28 n'est pas en mesure de reconnaître préférentiellement RHOA vis à vis de RHOB et de RHOC. Dans la perspective de développement d'un biosenseur d'activation des protéines RHO endogènes ou d'un inhibiteur intracellulaire plus performant que la tatC3, obtenir ce degré de sélectivité apparaît comme nécessaire. Si le RH28 se lie effectivement au niveau des régions concernées par le switch conformationnel, rappelons que la région du switch II est identique entre les trois protéines et que la région du switch I ne diffère que par un seul acide aminé pour RHOB et pour RHOC. Comment dès lors tenter d'améliorer la sélectivité au sein de la sous-famille RHOA tout en conservant un effet bloquant ? La cristallographie du complexe RH28/RHOA-GTP permettrait de savoir si le résidu d'acide aminé différent entre les trois protéines est impliqué, déterminant et le cas échéant, s'il peut être ciblé selon une approche rationnelle de mutagenèse dirigée du RH28. D'autre part, RHOA, RHOB et RHOC présentent le plus de divergences dans la région C-terminale, réputée

non concernée par le switch conformationnel. Si en format monovalent il n'est pas possible d'obtenir un anticorps ayant effet bloquant sélectif d'une des trois protéines, une stratégie bispécifique reliant deux anticorps dirigés sur deux épitopes différents de la protéine au sein de la même molécule pourrait être envisagée. Cette stratégie fait écho au mode de liaison supposé de l'effecteur PRK qui présente deux sites de liaison à RHOA dont un n'est pas concerné par le switch moléculaire<sup>34</sup> et à la structure multidomaine des RHOGEFs et des RHOGAPs pour lesquelles les domaines annexes au domaine catalytique sont impliqués dans la sélectivité de reconnaissance<sup>13</sup>. Le mode de liaison des partenaires naturels montre ainsi qu'il existe la place suffisante sur une molécule de RHOA pour la liaison sur de deux nano-anticorps différents se liant sur deux épitopes différents. Ainsi nous pourrions envisager un nouveau protocole de *phage display* utilisant le RH28 pour capturer la forme active des protéines et favoriser la sélection de nouveaux clones dirigés sur un autre épitope de RHOA.

## B. Le RH12, nouvel outil de mesure de l'activité des protéines RHO ?

Le protocole de sélection que nous avons établi nous a permis d'obtenir des anticorps de forte affinité (subnanomolaire pour le RH12 et nanomolaire pour le RH28) pour la forme active. Cette affinité est supérieure à celle mesurée pour les ligands naturels de la forme active RHO, protéines effectrices et RHOGAPs<sup>8,45,34,47</sup>. Le choix de production de l'antigène dans des cellules immortalisées humaines, système peu efficace en termes de rendement, s'est avéré finalement suffisant et adapté à la sélection d'anticorps de forte affinité. D'autre part, il garantit la reconnaissance de la protéine eucaryote dans son contexte intracellulaire. Ainsi les choix d'optimisation du protocole de *phage display* ont-ils été adéquats et ont permis de sélectionner des anticorps de forte affinité. Ce paramètre est en effet déterminant dans la perspective d'utilisation des anticorps comme nouveaux outils de mesure de l'activité des RHO.

### 1. Mesure de l'affinité du RH12

L'affinité du RH12 vis à vis de RHOA et de RAC1 est encourageante quant à la possibilité de détecter la forme active des RHO dans un extrait de quelques microgrammes de protéines totales. Ce serait un progrès majeur pour l'étude des RHO dans des échantillons précieux (culture de cellules primaires, échantillons de patients faible en cellularité). Dans le format ELISA présenté dans les résultats, la capacité de capture de la phase solide est le point limitant. Elle pourrait être améliorée par un changement de nature de la phase solide, permettant la capture d'un plus grand nombre de molécules de RH12 de façon irréversible. Ainsi la sensibilité du test ELISA pourrait être grandement

améliorée. Nous avons également développé une construction « bivalente » du RH12, réunissant deux RH12 sur la même molécule, dans l'objectif d'augmenter la sensibilité par un gain d'avidité. Nous avons également construits des molécules bispécifiques, contenant le RH12 et un autre clone reconnaissant la forme active des RHO. Aucune de ces constructions n'a apporté un gain de sensibilité significatif pour être retenue.

Les résultats des expériences d'immunoprécipitation des formes actives *in cellulo* et les résultats *in vitro* sont cohérents avec les mesures d'affinité obtenues par SPR. Cependant, il serait souhaitable de confronter les données de liaison obtenues à celles issues d'une autre méthode de mesure. L'inhibition du déplacement d'un nucléotide fluorescent, méthode la plus fréquemment utilisée pour mesurer l'affinité des effecteurs des RHO, serait facilement envisageable<sup>39</sup>. D'autre part, la titration calorimétrique isotherme (ITC) est une méthode de mesure couramment utilisée dans les mesures d'interaction protéine/protéine qui permet d'obtenir d'autres paramètres intéressants comme la stoechiométrie de liaison, les variations d'enthalpie libre et d'entropie de la réaction et qui ne nécessite aucune modification des partenaires de l'interaction. Cependant celle-ci demande des quantités de protéines de l'ordre de la dizaine de micromolaire.

Les expériences réalisées sur la protéine recombinante ont été validées par la suite sur des extraits cellulaires traités ou non par différents agents décrits pour augmenter l'activation des RHO. Il est tentant de vouloir établir une courbe de calibration permettant de quantifier l'activation des RHO grâce à la protéine recombinante. Cependant, en l'état actuel des résultats, il existe un décalage entre le signal obtenu avec la protéine recombinante et celui avec les extraits cellulaires. Puisque la quantité de RHO est évidemment variable entre les types cellulaires et peu décrite, et qu'il ne faut pas exclure l'effet matrice du milieu intracellulaire, il serait intéressant de réaliser une expérience d'ajout dosés de la protéine recombinante dans un lysat cellulaire pour déterminer la relation entre l'absorbance mesurée et la quantité de RHO actives rajoutées dans l'extrait cellulaire. Le développement d'un test étalonné serait, en outre, un progrès significatif par rapport aux techniques commercialisées à l'heure actuelle.

## 2. Mesure de la modification de l'activité GTPasique intrinsèque par le RH12

A l'origine, le RBD de la Rhotekin a été choisi par Ren *et al* pour sa capacité à diminuer l'activité GTPasique intrinsèque de la protéine<sup>176</sup>. Tous les partenaires naturels induisent un changement plus ou moins important sur les RHO<sup>76</sup>. Aussi est-il apparu légitime de poser cette question en premier à propos du RH12. Dans la perspective de développement d'un kit de mesure de l'activité, disposer d'un outil permettant de détecter et de bloquer immédiatement l'hydrolyse du GTP offrirait des conditions d'utilisation largement moins contraignantes et augmenterait la reproductibilité des résultats.

Nous avons dans un premier temps testé le kit de mesure sur nos protéines recombinantes. La demi-vie observée dans nos conditions de réalisation de test et sur nos productions de protéines est du même ordre de grandeur que celles rapportées dans la littérature et déterminées par d'autres méthodes de mesure<sup>13, 327</sup>. Nous avons donc considéré que ces mesures étaient cohérentes et nous permettaient d'évaluer l'effet du RH12. Les mesures préliminaires effectuées montrent que le RH12 ne perturbe pas l'activité GTPasique intrinsèque de la protéine. Ces mesures sont à l'évidence à confirmer afin de pouvoir conclure. En effet, le rapport de concentrations entre RHOA et le RH12 utilisées dans cette expérience préliminaire n'a peut-être pas été suffisant (1:5). Il conviendrait de réeffectuer cette expérience à de plus forts rapports et de confronter cette méthode de mesure à celle basée sur la détection du phosphate inorganique libéré<sup>328</sup>. Enfin, dans la perspective d'utilisation d'un anticorps dans le milieu intracellulaire, il apparaît également nécessaire de déterminer cela pour le RH28.

### C. Le RH28, nouvelle stratégie d'inhibition intracellulaire de l'activité des RHO ?

La description des outils déjà existants pour étudier les protéines RHO nous a conduit à souligner leurs limites. Aussi avons nous initialement dans l'idée de développer des anticorps capables de détecter sélectivement une des trois protéines homologues de la sous-famille RHOA afin de développer des biosenseurs de l'activité de ces protéines. Fusionnés à la GFP et exprimés dans les cellules, nous avons été surpris de constater que certains entraînaient un changement phénotypique majeur associé à une perte du cytosquelette d'actine. Ce qui nous a conduit à étudier leurs propriétés bloquantes et à les valider dans différentes lignées cellulaires disponibles au laboratoire. Il sera en premier lieu important de renforcer ces résultats par l'observation des conséquences phénotypiques dans un autre modèle pour lequel l'activité des GTPases RHO est déjà bien décrite, celui des cellules

neurales. Dans ce modèle, l'inhibition des RHO est associée à la restauration de croissance des neurites<sup>329</sup>.

## 1. Proposition du mécanisme d'action intracellulaire du RH28

L'ensemble des expériences réalisées jusqu'à présent nous laisse supposer un mode d'action inhibiteur par simple « titration » de la forme active des GTPases. En effet, au vu des affinités déterminées pour les effecteurs, le RH28 présente une affinité du même ordre de grandeur voire supérieure (10nM contre 9nM et 6nM respectivement pour Rhotekin et mDia, >100 nM pour ROCK). Avec la faible quantité de forme active de RHO dans une cellule, la surexpression relative de l'anticorps vis à vis des effecteurs suffirait à déplacer leur liaison de la forme active. Ce qui, mécaniquement, est différent du mode d'action des inhibiteurs déjà décrits pour les protéines RHO. La toxine C3 se lie sans distinction de forme active ou inactive aux protéines RHO, et l'ADP ribosylation empêche leur activation et l'interaction avec les effecteurs. De plus, cette modification chimique est irréversible et déstabilise la protéine<sup>145</sup>. Des mutants inactifs des effecteurs, ne contenant que le domaine de liaison à RHOA ont déjà été décrits et développés dans l'objectif premier de comprendre les fonctions des effecteurs endogènes. L'expression de ces constructions dans les cellules inhibe la formation des fibres de stress et des adhésions focales. Nous avons également observé une perte du cytosquelette d'actine par une forte expression du RBD dans les cellules HeLa, nous confortant dans l'interprétation du phénotype inhibiteur observé avec les intracorps. Ce qui nous amène à nous interroger sur le peu de références dans la littérature (<sup>330, 52</sup>) rapportant l'utilisation du fragment RBD comme outil intracellulaire (en dehors de son utilisation dans le cadre des sondes FRET) inhibant les RHO : l'absence de sélectivité vis à vis d'une des trois isoformes, sa faible expression et stabilité en sont probablement les raisons. Dans nos expériences de pull down, nous n'avons pas réussi à capturer RHOA actif par ce fragment. Ainsi l'utilisation d'un format optimisé pour sa stabilité à l'intérieur de la cellule tel que celui des intracorps permet d'obtenir de meilleurs résultats et permet d'envisager de futures applications en tant que biosenseur d'activité après optimisation par ingénierie moléculaire (cf. III.C.3.b). En effet, en l'état, le RH28 n'est pas, lui aussi, sélectif d'une des trois protéines homologues de la sous-famille RHOA et n'est pas en mesure d'appréhender la régulation spatiale et temporelle de leur activité.

## 2. Problématique du contexte intracellulaire

Utiliser un anticorps dans le contexte intracellulaire confronte immédiatement au problème de la sélectivité de l'anticorps et au risque d'effets collatéraux. Nous avons évalué la sélectivité de l'anticorps contre les protéines les plus proches de RHOA mais nous n'avons en aucun cas évalué si l'anticorps possédait d'autres cibles intracellulaires. Nous ne pouvons donc pas exclure que les effets phénotypiques observés ne proviennent de la seule inhibition de la forme active des protéines de la sous-famille RHOA. Nous avons donc envisagé de déterminer par spectrométrie de masse l'ensemble du protéome cible de l'anticorps RH28 capturé par immunoprécipitation. Cependant, cela demande de déterminer le protéome « non spécifique », capturé par la phase solide afin de pouvoir exclure la récurrence de protéines abondantes capturées non spécifiquement. Cette approche peut s'avérer difficile lorsque le partenaire co-précipité est une protéine faiblement exprimée, le cas des RHO. Des méthodes *in cellulo* plus adaptées à cette problématique ont été publiées. Dans la méthode IMAPP (In situ cleavage and MS-label transfer After Protein Photocrosslinking), il s'agit de lier covalentement les deux partenaires d'une interaction protéique en ajoutant à l'un des partenaires un peptide de pontage covalent photoactivable puis d'analyser par spectrométrie de masse la nature du second partenaire marqué par le peptide transféré. Les auteurs effectuent la preuve de principe de leur méthode en rapportant l'interaction *in cellulo* de la rhotekine avec sa cible préférentielle RHOA<sup>331</sup>. Sur le même principe, il est possible d'exprimer un mutant de la protéine BirA en fusion avec une protéine d'intérêt dans les cellules eucaryotes. En présence de biotine, l'enzyme va biotinyler les protéines qui se trouvent à proximité (estimation à 30nm donc pouvant interagir avec la protéine d'intérêt). La capture sur des billes de streptavidine permet l'identification en western blot ou en spectrométrie de masse de l'interactome de la protéine d'intérêt<sup>332</sup>. Ainsi il serait très intéressant d'utiliser l'une ou l'autre de ces stratégies pour déterminer l'interactome du RH28. En plus des informations sur l'ensemble des protéines retrouvées, cela pourrait peut-être permettre d'identifier un complexe multimoléculaire contenant RHOA activé.

Afin de valider que les effets observés soient dus à l'interaction entre le RH28 et la protéine RHOA nous avons choisi d'interpréter nos résultats avec des anticorps intracellulaires issus de sélections de la banque sur d'autres cibles. Il est important pour pouvoir raisonner de comparer des anticorps présentant des taux d'expression intracellulaire semblables ainsi qu'une demi vie semblable. Il a été difficile de trouver des anticorps non pertinents dans la cellule qui s'expriment aussi bien que le RH28. Peut-être est-ce le fait qu'ils ne possèdent effectivement aucune cible intracellulaire susceptible de les stabiliser<sup>281</sup>? Nous aurions pu également envisager, sur le modèle des siARN « scramble », de synthétiser un anticorps possédant les mêmes résidus d'acides aminés que le RH28 mais dans un ordre différent, pour s'affranchir d'un éventuel biais de séquence.

### 3. Enjeux de l'inhibition de l'activité des RHO dans le contexte du mélanome

Nous avons validé l'effet bloquant de la fonction des RHO endogènes par l'intracorp RH28 à la fois phénotypiquement et fonctionnellement dans une lignée cellulaire de mélanome métastatique. En effet, nous observons un switch phénotypique des cellules suite à l'expression de l'intracorp et la diminution de marqueurs d'activation de la voie ROCK (pCofilin et pMLC2). Nous nous sommes placés à un temps d'observation volontairement court pour s'affranchir des voies de régulation compensatrices mises en jeu. L'adoption d'un phénotype allongé suite à l'inhibition des protéines de la famille RHOA est attendu dans ce modèle<sup>94, 318</sup> et dépendrait du dialogue RHO/ROCK/RAC déjà mis en évidence dans les lignées cellulaires de mélanome. Toutefois, d'autres expériences sont nécessaires pour confirmer nos résultats :

- l'extinction de la protéine RAC1 (par un siARN ou un inhibiteur pharmacologique) permettrait de vérifier dans ces cellules que l'allongement observé est effectivement RAC1 dépendant, si celle-ci le prévient.
- l'activité de RAC1 en présence du RH28 devrait être augmentée,
- le recrutement de ROCK à la membrane dans ces cellules devrait être inhibé ; nous observerons donc dans les cellules exprimant le RH28 sa localisation.

Sur le plan moléculaire, le dialogue RHO/ROCK/RAC impliquerait l'activation de ARHGAP22, une GAP de RAC1, sans toutefois démontrer que ARHGAP22 est effectivement activée par ROCK<sup>318</sup>. Il n'est donc pas exclu que d'autres mécanismes soient mis en jeu, comme certains promouvant directement l'activation de RAC<sup>333</sup>. Par exemple, au laboratoire, un lien entre la perte de RHOB et l'activation d'AKT permettant à son tour d'activer RAC1 *via* TRIO et d'observer un allongement cellulaire a été mis en évidence dans les cellules issues de tumeur pulmonaires non à petites cellules<sup>334</sup>.

L'allongement observé dans les différentes lignées cellulaires reflèterait ainsi la conjonction entre l'activation de RAC (formant une longue protrusion à une extrémité de la cellule) et l'absence de rétraction membranaire par inhibition de la contractilité du squelette d'acto-myosine.

Nous avons également observé le comportement migratoire et invasif des cellules exprimant le RH28 et la tatC3. Nous n'avons pas mis en évidence de différence de vitesse de migration et d'invasion par rapport aux lignées cellulaires exprimant les intracorps non pertinents. Là encore, ce résultat a déjà été décrit : un traitement seul par l'inhibiteur de ROCK Y26732 ne suffit pas à inhiber la migration des cellules<sup>94</sup>. Remarquons que le RH12, décrit comme ciblant RHO/RAC utilisé en tant



qu'intracorporelles dans ces cellules est en mesure d'inhiber leur migration. Un nouvel inhibiteur de ROCK, plus puissant parvient à inhiber les capacités migratoires des cellules WM266-4. Rappelons ici son large spectre d'activité : S6K1, AKT1, PKA, MSK<sup>324</sup>. Ainsi, il n'est pas exclu que l'inhibition des capacités invasives et migratoires des cellules soit la conséquence de l'inhibition conjointe de l'ensemble de ces cibles.

En 2011, Aplin *et al* suggèrent dans une lignée cellulaire que l'inhibition de BRAF s'accompagne d'une augmentation d'activité de RHOA, responsable de la migration cellulaire résiduelle sous Vémurafénib<sup>316</sup>. Bien que nous n'observions pas d'effet de l'inhibition de la voie RHO/ROCK sur la migration des cellules WM266-4, nous souhaiterions prochainement étudier si la migration de ces cellules résistantes au Vémurafénib est effectivement diminuée par l'inhibition de l'activité de RHOA. Néanmoins, nous vérifierons auparavant si les cellules WM266-4 engagent, elles aussi des mécanismes moléculaires adaptatifs dépendants de RHOA. A terme, ces observations permettraient de valider une stratégie thérapeutique combinant un effet antiprolifératif et un effet anti migratoire.

Nous avons observé en parallèle de l'inhibition fonctionnelle des RHO par le RH28 une augmentation de l'activation de la protéine ainsi qu'une augmentation de son abondance globale. Cette observation préliminaire nous permet de supposer l'existence de voies de rétrocontrôles entre la fraction active de la protéine et la quantité de protéine totale, qui ne pouvaient pas, de fait, être mises en évidence par les outils actuels (siARN, KO ou tatC3<sup>145</sup>). Il nous paraît par conséquent, intéressant de poursuivre l'investigation dans cette voie en étudiant les différents niveaux de régulation de l'expression génique (demi-vie de la protéine, de l'ARNm, activation transcriptionnelle..). Il conviendra de démontrer ensuite si ces voies de rétrocontrôles impliquent seulement une des trois protéines de la sous-famille en ayant recours aux technologies d'édition du génome.

## D. Perspectives de développement à plus long terme

### 1. Applications in vitro

#### a. Criblage de petites molécules chimiques

S'il paraît encore difficile d'utiliser en tant que tel des intracorp dans les situations où l'inhibition de RHOA est relevante, notamment car cela impliquerait des stratégies de thérapie génique, les anticorps dirigés contre la forme active des RHO pourraient permettre le criblage de petites molécules chimiques susceptibles de déplacer l'interaction RHO/effecteurs. Rappelons que jusqu'à présent il existe des molécules déplaçant l'interaction RHO/GEF<sup>169</sup> ou bien des inhibiteurs pharmacologiques de ROCK<sup>324</sup>.

#### b. Développement d'un kit de mesure de l'activité

Nous avons entamé une collaboration avec l'entreprise Cisbio Bioassays afin de commercialiser un nouveau kit d'activation des protéines RHO. L'entreprise Cisbio Bioassays est spécialisée dans le développement de kit de mesure d'activation de voies de signalisation par la technique du FRET HTRF® (Homogenous Time Resolved Fluorescence) et souhaite utiliser les anticorps anti RHO issus du *phage display* dans une nouvelle méthode de mesure d'activation de ces protéines, potentiellement plus sensible que les kits déjà commercialisés. Le champ d'application immédiat concerne les extraits de lignées cellulaires mais il serait intéressant de tester également des échantillons tumoraux issus de patients. Dans le domaine de la résistance aux thérapies ciblées, les voies de signalisation conduisant à une activation de RHOA viennent par exemple d'être récemment décrites comme marqueur prédictif de réponse au trastuzumab dans les cancers du sein HER2+<sup>335</sup>. La récente mise en évidence des mutations de RHOA dans les lymphomes conduit à s'intéresser à l'activité des autres RHO dans ces pathologies<sup>336</sup>. Cependant, cela confronte à la problématique de la préservation de l'activité de la protéine dans l'échantillon prélevé. En l'état actuel de nos travaux, la congélation de la pièce tumorale est préconisée.

Le développement du RH12 pour des applications en immunofluorescence et en immunohistochimie est à l'étude. En effet, nous avons montré que celui-ci est susceptible de marquer préférentiellement les cellules qui surexpriment un mutant constitutivement actif de RHOA. Cependant, visualiser l'activité de la protéine endogène sur des pièces tumorales demande que le fixateur et le temps de fixation utilisé n'aient pas altéré la conformation de la protéine. Cela demande d'optimiser le protocole : en l'état actuel, nous proposerions d'incuber l'anticorps (monovalent ou bivalent) sur la nuit puis de post-fixer l'anticorps après quelques lavages rapides afin que les quelques

molécules qui soient présentes ne soient pas éluées avec les étapes ultérieures de lavage. Ce même protocole pourrait être utilisé en immunofluorescence et l'avantage d'un format d'anticorps à simple domaine serait celui de pouvoir être utilisé en microscopie à haute résolution<sup>268</sup>.

## 2. Applications *in cellulo*

### a. Développement d'un biosenseur d'activation intracellulaire

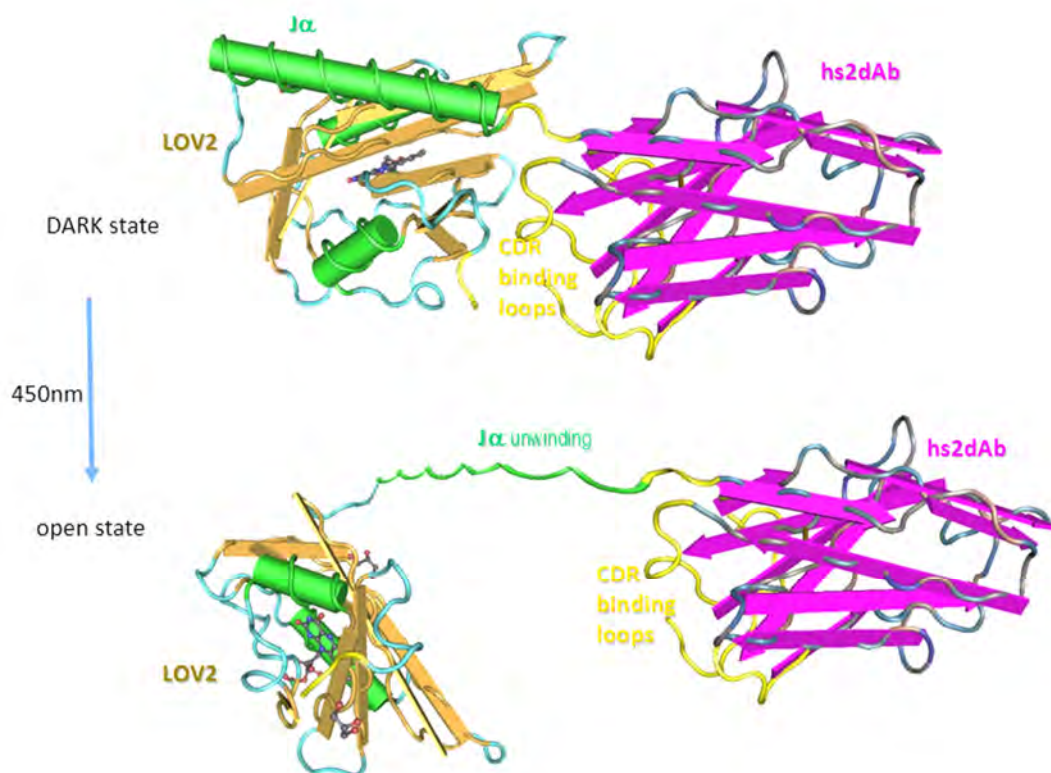
Outre la problématique de la sélectivité au sein de la sous-famille RHOA, le potentiel du RH28 en tant que biosenseur d'activité intracellulaire doit encore être développé par ingénierie moléculaire. Nous avons déjà décrit l'existence d'une régulation spatiale et temporelle de l'activité des GTPases RHO de l'ordre de la seconde et du micromètre de précision. En l'état actuel des résultats, le RH28 n'est pas en mesure d'aborder ce sujet. Notamment car une simple fusion GFP ne nous permet pas de distinguer la fraction liée de la non liée étant donnée la faible concentration intracellulaire de RHO activée. Tang *et al* proposent une approche intéressante dans cette perspective. Ils décrivent un panel d'acides aminés dans les régions framework permettant de déstabiliser l'intracorps en absence de liaison à son antigène<sup>281</sup>. Autrement dit, en absence de liaison à son antigène, l'intracorps est dégradé par le protéasome. L'avantage de cette méthode réside donc dans le fait de pouvoir fusionner des protéines d'intérêt à un intracorps déstabilisé. Dans notre cas, la fusion d'une (ou plusieurs) GFP au RH28 pourrait permettre dans le cas où les mutations déstabilisent effectivement l'anticorps de concevoir un biosenseur de l'activité spatio-temporelle des RHO endogènes.

Pour pallier au manque de sélectivité du RH28 au sein de la sous-famille RHOA, nous pourrions fusionner le RH28 et un anticorps sélectif d'une des trois protéines de la sous-famille à un couple de protéines fluorescentes afin de mesurer un signal de FRET, comme cela a déjà été réalisé sur la protéine GK3 avec des scFv<sup>337</sup>. Nous pourrions ainsi accéder à la régulation spatiale et temporelle de l'activité de chacune des protéines RHO endogène.

### b. Développement d'un inhibiteur intracellulaire photo-activable

Les outils d'optogénétique sont parfaitement adaptés à la problématique de la régulation spatiale et temporelle de l'activité d'une protéine endogène. Leur principe repose en effet sur le contrôle à l'échelle imposée par le microscope à fluorescence d'une protéine sensible à la lumière. Concernant les petites GTPases, une version de la protéine RAC1 photoactivable<sup>211</sup> ou celle d'un GEF de RHOA<sup>212</sup> ont déjà été décrites et ont permis une activation à l'échelle subcellulaire. Mais aujourd'hui, il n'a pas encore été mis au point de construction ciblant uniquement la protéine RHOA

activée. Ainsi, la fusion du RH28 avec un domaine photo-activable constituerait un outil innovant. Pour cela, il est possible d'imaginer une construction contenant un domaine issu de phytochrome de plante, AsLOV2 en fusion avec l'intracorps de sorte que le changement de conformation tridimensionnel induit par la lumière démasque les sites d'interaction de l'anticorps et lui permettent d'inhiber sa cible (Figure 31). En absence de lumière, l'intracorps est inactif car masqué et en présence de lumière, la construction se déploie et libère les sites d'interaction. L'avantage de ce système réside également dans sa réversibilité : à l'arrêt du stimulus lumineux, le domaine LOV2 reprend sa conformation. La résolution spatiale de cet outil permettrait ainsi d'aborder les questions concernant l'hétérogénéité cellulaire au sens large du terme puisqu'elle permet d'individualiser les cellules traitées. La migration collective est un sujet en plein essor dans le domaine de la cancérologie dans lequel cet outil serait utile. En effet, ses mécanismes moléculaires reposent en partie sur un dialogue entre les GTPases RHO et il a été mis en évidence une architecture supracellulaire dans laquelle toutes les cellules ne jouent pas le même rôle.



**Figure 31 :** Conception d'un hs2dAb photo-activable. Sous l'effet de lumière (450nm) une partie du domaine LOV, la chaîne  $J\alpha$  adopte une conformation plus relâchée. Nous imaginons ainsi la possibilité de démasquer les boucles CDR de l'anticorps suite au stimulus lumineux. La longueur du linker entre le domaine photo-activable et l'anticorps sera primordiale à la réussite d'une telle construction.

# CONCLUSION GENERALE

Ce travail doctoral a permis d'isoler différents anticorps à partir d'une nouvelle banque synthétique d'anticorps de format monovalent, capables de distinguer la conformation active des GTPases RHO. Ces anticorps par la diversité de leurs développements permettront de proposer de nouveaux outils pour l'étude de ces protéines *in vitro* et *in cellulo*. *In vitro*, l'augmentation en sensibilité sera une amélioration majeure permettant de détecter l'activité de ces protéines à partir d'une faible quantité de matériel cellulaire. D'autre part, leur caractérisation en tant qu'intracorps a mis en évidence leurs propriétés bloquantes mais a également souligné leurs limites d'utilisation en tant que tel. Une future optimisation de leurs propriétés par ingénierie moléculaire permettra de proposer un outil innovant, pleinement adapté à l'étude de la régulation de l'activité de ces protéines. L'ensemble de ces travaux nous a conduit à déposer un brevet, protégeant les caractéristiques des anticorps obtenus et leurs développements futurs. Et c'est dans ce cadre que nous avons déjà initié une collaboration avec l'entreprise *Cisbio Bioassays* pour le développement d'un nouveau kit de mesure de l'activité des GTPases RHO.

Ce travail doctoral aura également établi les bases permettant le développement d'autres anticorps dirigés contre les autres membres de la famille RHO. Plus généralement, la diversité des anticorps obtenus et la diversité de leurs applications sont en réalité les témoins de la qualité de la banque à partir de laquelle ils sont issus et encouragent son utilisation envers d'autres cibles d'étude.



# BIBLIOGRAPHIE

1. Madaule, P. & Axel, R. A novel ras-related gene family. *Cell* **41**, 31–40 (1985).
2. Wennerberg, K. The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* **118**, 843–846 (2005).
3. Heasman, S. J. & Ridley, A. J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 690–701 (2008).
4. Schaefer, A., Reinhard, N. R. & Hordijk, P. L. Toward understanding RhoGTPase specificity: structure, function and local activation. *Small GTPases* **5**, e968004 (2014).
5. Vetter, I. R. & Wittinghofer, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299–1304 (2001).
6. Feltham, J. L. *et al.* Definition of the switch surface in the solution structure of Cdc42Hs. *Biochemistry (Mosc.)* **36**, 8755–8766 (1997).
7. Dvorsky, R. & Ahmadian, M. R. Always look on the bright site of Rho: structural implications for a conserved intermolecular interface. *EMBO Rep.* **5**, 1130–1136 (2004).
8. Rose, R. *et al.* Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature* **435**, 513–518 (2005).
9. Ihara, K. *et al.* Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J. Biol. Chem.* **273**, 9656–9666 (1998).
10. Cook, D. R., Rossman, K. L. & Der, C. J. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene* **33**, 4021–4035 (2014).
11. Rossman, K. L., Der, C. J. & Sondek, J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 167–180 (2005).
12. Cherfils, J. & Zeghouf, M. Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.* **93**, 269–309 (2013).
13. Amin, E. *et al.* Deciphering the Molecular and Functional Basis of RHOGAP Family Proteins: A SYSTEMATIC APPROACH TOWARD SELECTIVE INACTIVATION OF RHO FAMILY PROTEINS. *J. Biol. Chem.* **291**, 20353–20371 (2016).
14. Adamson, P. Intracellular localization of the P21rho proteins. *J. Cell Biol.* **119**, 617–627 (1992).
15. Milia, J. *et al.* Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication. *Cell Death Differ.* **12**, 492–501 (2005).
16. Wherlock, M., Gampel, A., Futter, C. & Mellor, H. Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase. *J. Cell Sci.* **117**, 3221–3231 (2004).
17. Allal, C. *et al.* 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 (2000).

18. Boivin, D. & Béliveau, R. Subcellular distribution and membrane association of Rho-related small GTP-binding proteins in kidney cortex. *Am. J. Physiol.* **269**, F180-189 (1995).
19. Takaishi, K. *et al.* Translocation of activated Rho from the cytoplasm to membrane ruffling area, cell-cell adhesion sites and cleavage furrows. *Oncogene* **11**, 39–48 (1995).
20. Hori, Y. *et al.* Post-translational modifications of the C-terminal region of the rho protein are important for its interaction with membranes and the stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins. *Oncogene* **6**, 515–522 (1991).
21. Michaelson, D. *et al.* Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J. Cell Biol.* **152**, 111–126 (2001).
22. Garcia-Mata, R., Boulter, E. & Burridge, K. The ‘invisible hand’: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 493–504 (2011).
23. DerMardirossian, C. & Bokoch, G. M. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol.* **15**, 356–363 (2005).
24. Tnimov, Z. *et al.* Quantitative Analysis of Prenylated RhoA Interaction with Its Chaperone, RhoGDI. *J. Biol. Chem.* **287**, 26549–26562 (2012).
25. Boulter, E. *et al.* Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nat. Cell Biol.* **12**, 477–483 (2010).
26. Hodgson, L. *et al.* FRET binding antenna reports spatiotemporal dynamics of GDI–Cdc42 GTPase interactions. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 802–809 (2016).
27. Winter-Vann, A. M. & Casey, P. J. Opinion: Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 405–412 (2005).
28. Görlich, D., Seewald, M. J. & Ribbeck, K. Characterization of Ran-driven cargo transport and the RanGTPase system by kinetic measurements and computer simulation. *EMBO J.* **22**, 1088–1100 (2003).
29. Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509–514 (1998).
30. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629–635 (2002).
31. Bishop, A. L. & Hall, A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* **348 Pt 2**, 241–255 (2000).
32. Ridley, A. J. RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration: RHOA, RHOB AND RHOC HAVE DIFFERENT ROLES IN CANCER CELL MIGRATION. *J. Microsc.* **251**, 242–249 (2013).
33. Morreale, A. *et al.* Structure of Cdc42 bound to the GTPase binding domain of PAK. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 384–388 (2000).
34. Blumenstein, L. & Ahmadian, M. R. Models of the cooperative mechanism for Rho effector recognition: implications for RhoA-mediated effector activation. *J. Biol. Chem.* **279**, (2004).



35. Dvorsky, R. Structural Insights into the Interaction of ROCK1 with the Switch Regions of RhoA. *J. Biol. Chem.* **279**, 7098–7104 (2003).
36. Maesaki, R. *et al.* 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 (1999).
37. Fujisawa, K. *et al.* Different Regions of Rho Determine Rho-selective Binding of Different Classes of Rho Target Molecules. *J. Biol. Chem.* **273**, 18943–18949 (1998).
38. Bokoch, G. M. Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood* **100**, 2692–2695 (2002).
39. Herrmann, C., Horn, G., Spaargaren, M. & Wittinghofer, A. Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* **271**, 6794–6800 (1996).
40. Fiegen, D. Alternative Splicing of Rac1 Generates Rac1b, a Self-activating GTPase. *J. Biol. Chem.* **279**, 4743–4749 (2003).
41. Haeusler, L. C., Blumenstein, L., Stege, P., Dvorsky, R. & Ahmadian, M. R. Comparative functional analysis of the Rac GTPases. *FEBS Lett.* **555**, 556–560 (2003).
42. Buchwald, G. *et al.* Conformational switch and role of phosphorylation in PAK activation. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5179–5189 (2001).
43. Stevens, W. K. *et al.* Conformation of a Cdc42/Rac Interactive Binding Peptide in Complex with Cdc42 and Analysis of the Binding Interface †. *Biochemistry (Mosc.)* **38**, 5968–5975 (1999).
44. Nomanbhoy, T. & Cerione, R. A. Fluorescence Assays of Cdc42 Interactions with Target/Effector Proteins †. *Biochemistry (Mosc.)* **38**, 15878–15884 (1999).
45. Hutchinson, C. L., Lowe, P. N., McLaughlin, S. H., Mott, H. R. & Owen, D. Differential Binding of RhoA, RhoB, and RhoC to Protein Kinase C-Related Kinase (PRK) Isoforms PRK1, PRK2, and PRK3: PRKs Have the Highest Affinity for RhoB. *Biochemistry (Mosc.)* **52**, 7999–8011 (2013).
46. Owen, D. *et al.* Molecular Dissection of the Interaction between the Small G Proteins Rac1 and RhoA and Protein Kinase C-related Kinase 1 (PRK1). *J. Biol. Chem.* **278**, 50578–50587 (2003).
47. Thompson, G., Owen, D., Chalk, P. A. & Lowe, P. N. Delineation of the Cdc42/Rac-binding domain of p21-activated kinase. *Biochemistry (Mosc.)* **37**, 7885–7891 (1998).
48. Owen, D., Mott, H. R., Laue, E. D. & Lowe, P. N. Residues in Cdc42 That Specify Binding to Individual CRIB Effector Proteins. *Biochemistry (Mosc.)* **39**, 1243–1250 (2000).
49. Rudolph, M. G. *et al.* The Cdc42/Rac Interactive Binding Region Motif of the Wiskott Aldrich Syndrome Protein (WASP) Is Necessary but Not Sufficient for Tight Binding to Cdc42 and Structure Formation. *J. Biol. Chem.* **273**, 18067–18076 (1998).
50. Zhang, B., Wang, Z. X. & Zheng, Y. Characterization of the interactions between the small GTPase Cdc42 and its GTPase-activating proteins and putative effectors. Comparison of kinetic

properties of Cdc42 binding to the Cdc42-interactive domains. *J. Biol. Chem.* **272**, 21999–22007 (1997).

51. Amano, M. *et al.* The COOH Terminus of Rho-kinase Negatively Regulates Rho-kinase Activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 32418–32424 (1999).

52. Amano, M. Formation of Actin Stress Fibers and Focal Adhesions Enhanced by Rho-Kinase. *Science* **275**, 1308–1311 (1997).

53. Truebestein, L., Elsner, D. J. & Leonard, T. A. Made to measure – keeping Rho kinase at a distance. *Small GTPases* **7**, 82–92 (2016).

54. Truebestein, L., Elsner, D. J., Fuchs, E. & Leonard, T. A. A molecular ruler regulates cytoskeletal remodelling by the Rho kinases. *Nat. Commun.* **6**, 10029 (2015).

55. Lammers, M., Rose, R., Scrima, A. & Wittinghofer, A. The regulation of mDia1 by autoinhibition and its release by Rho•GTP: mDia1: a Rho effector regulated by autoinhibition. *EMBO J.* **24**, 4176–4187 (2005).

56. Aspenström, P. Effectors for the Rho GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 95–102 (1999).

57. Thumkeo, D., Watanabe, S. & Narumiya, S. Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals. *Eur. J. Cell Biol.* **92**, 303–315 (2013).

58. Chen, M., Bresnick, A. R. & O'Connor, K. L. Coupling S100A4 to Rhotekin alters Rho signaling output in breast cancer cells. *Oncogene* **32**, 3754–3764 (2013).

59. Julian, L. & Olson, M. F. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): Structure, regulation, and functions. *Small GTPases* **5**, e29846 (2014).

60. Olson, M. F. & Sahai, E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin. Exp. Metastasis* **26**, 273–287 (2009).

61. Spiering, D. & Hodgson, L. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adhes. Migr.* **5**, 170–180 (2011).

62. Ridley, A. J. & Hall, A. 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 (1992).

63. Le Clainche, C. & Carlier, M.-F. Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration. *Physiol. Rev.* **88**, 489–513 (2008).

64. Petit, V. & Thiery, J.-P. Focal adhesions: Structure and dynamics. *Biol. Cell* **92**, 477–494 (2000).

65. Hodge, R. G. & Ridley, A. J. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 496–510 (2016).

66. Pertz, O. Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now? *J. Cell Sci.* **123**, 1841–1850 (2010).

67. Hall, A. Rho family GTPases. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 1378–1382 (2012).

68. Martin, K. *et al.* Spatio-temporal co-ordination of RhoA, Rac1 and Cdc42 activation during prototypical edge protrusion and retraction dynamics. *Sci. Rep.* **6**, 21901 (2016).
69. Fritz, R. D. & Pertz, O. The dynamics of spatio-temporal Rho GTPase signaling: formation of signaling patterns. *Fl1000Research* **5**, (2016).
70. Cao, X. *et al.* A phosphorylation switch controls the spatiotemporal activation of Rho GTPases in directional cell migration. *Nat. Commun.* **6**, 7721 (2015).
71. Lee, C.-S., Choi, C.-K., Shin, E.-Y., Schwartz, M. A. & Kim, E.-G. Myosin II directly binds and inhibits Dbl family guanine nucleotide exchange factors: a possible link to Rho family GTPases. *J. Cell Biol.* **190**, 663–674 (2010).
72. Kutys, M. L. & Yamada, K. M. An extracellular-matrix-specific GEF-GAP interaction regulates Rho GTPase crosstalk for 3D collagen migration. *Nat. Cell Biol.* **16**, 909–917 (2014).
73. Pedersen, E. & Brakebusch, C. Rho GTPase function in development: How in vivo models change our view. *Exp. Cell Res.* **318**, 1779–1787 (2012).
74. Kitzing, T. M., Wang, Y., Pertz, O., Copeland, J. W. & Grosse, R. Formin-like 2 drives amoeboid invasive cell motility downstream of RhoC. *Oncogene* **29**, 2441–2448 (2010).
75. Chinestra, P. *et al.* Generation of a single chain antibody variable fragment (scFv) to sense selectively RhoB activation. *PloS One* **9**, e111034 (2014).
76. Dvorsky, R. & Ahmadian, M. R. Always look on the bright site of Rho: structural implications for a conserved intermolecular interface. *EMBO Rep.* **5**, 1130–1136 (2004).
77. Reinhard, N. R. *et al.* Spatiotemporal analysis of RhoA/B/C activation in primary human endothelial cells. *Sci. Rep.* **6**, 25502 (2016).
78. Bravo-Cordero, J. J. *et al.* A novel spatiotemporal RhoC activation pathway locally regulates cofilin activity at invadopodia. *Curr. Biol. CB* **21**, 635–644 (2011).
79. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
80. Sahai, E. & Marshall, C. J. RHO-GTPases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 133–142 (2002).
81. Perona, R. *et al.* Tumorigenic activity of rho genes from *Aplysia californica*. *Oncogene* **8**, 1285–1292 (1993).
82. del Peso, L. *et al.* Rho proteins induce metastatic properties in vivo. *Oncogene* **15**, 3047–3057 (1997).
83. Avraham, H. & Weinberg, R. A. Characterization and expression of the human rhoH12 gene product. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2058–2066 (1989).
84. Orgaz, J. L., Herraiz, C. & Sanz-Moreno, V. Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases* **5**, e983867 (2014).
85. Meyer, N. *et al.* RhoB promotes cancer initiation by protecting keratinocytes from UVB-induced apoptosis but limits tumor aggressiveness. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 203–212 (2014).

86. Mamouni, K. *et al.* RhoB promotes  $\gamma$  H2AX dephosphorylation and DNA double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 3144–3155 (2014).
87. Boerner, J. L., Danielsen, A., McManus, M. J. & Maihle, N. J. Activation of Rho is required for ligand-independent oncogenic signaling by a mutant epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 3691–3695 (2001).
88. Tilkin-Mariamé, A.-F. *et al.* Geranylgeranyl transferase inhibition stimulates anti-melanoma immune response through MHC Class I and costimulatory molecule expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **19**, 1513–1515 (2005).
89. Skuli, N. *et al.*  $\alpha$ 3 $\beta$ 5 integrins-FAK-RhoB: a novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. *Cancer Res.* **69**, 3308–3316 (2009).
90. Zhang, C. *et al.* Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nat. Commun.* **4**, 2935 (2013).
91. Benitah, S. A., Valerón, P. F., van Aelst, L., Marshall, C. J. & Lacal, J. C. Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1705**, 121–132 (2004).
92. Petrie, R. J. & Yamada, K. M. Multiple mechanisms of 3D migration: the origins of plasticity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **42**, 7–12 (2016).
93. Struckhoff, A. P., Rana, M. K. & Worthyake, R. A. RhoA can lead the way in tumor cell invasion and metastasis. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **16**, 1915–1926 (2011).
94. Sahai, E. & Marshall, C. J. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat. Cell Biol.* **5**, 711–719 (2003).
95. Friedl, P. & Wolf, K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* **188**, 11–19 (2010).
96. Friedl, P., Locker, J., Sahai, E. & Segall, J. E. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* **14**, 777–783 (2012).
97. Yoshioka, K., Nakamori, S. & Itoh, K. Overexpression of small GTP-binding protein RhoA promotes invasion of tumor cells. *Cancer Res.* **59**, 2004–2010 (1999).
98. Sanz-Moreno, V. *et al.* ROCK and JAK1 Signaling Cooperate to Control Actomyosin Contractility in Tumor Cells and Stroma. *Cancer Cell* **20**, 229–245 (2011).
99. Gaggioli, C. *et al.* Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1392–1400 (2007).
100. Calvo, F. *et al.* Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **15**, 637–646 (2013).
101. Timpson, P. *et al.* Spatial regulation of RhoA activity during pancreatic cancer cell invasion driven by mutant p53. *Cancer Res.* **71**, 747–757 (2011).
102. Johnsson, A.-K. E. *et al.* The Rac-FRET Mouse Reveals Tight Spatiotemporal Control of Rac Activity in Primary Cells and Tissues. *Cell Rep.* **6**, 1153–1164 (2014).

103. Karlsson, R., Pedersen, E. D., Wang, Z. & Brakebusch, C. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1796**, 91–98 (2009).
104. Alan, J. K. & Lundquist, E. A. Mutationally activated Rho GTPases in cancer. *Small GTPases* **4**, 159–163 (2013).
105. Lin, Y. & Zheng, Y. Approaches of targeting Rho GTPases in cancer drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **10**, 991–1010 (2015).
106. Porter, A. P., Papaioannou, A. & Malliri, A. Dereglulation of Rho GTPases in cancer. *Small GTPases* 1–16 (2016). doi:10.1080/21541248.2016.1173767
107. Chen, W. *et al.* High RhoA expression at the tumor front in clinically localized prostate cancer and association with poor tumor differentiation. *Oncol. Lett.* (2015). doi:10.3892/ol.2015.4070
108. Médale-Giamarchi, C. *et al.* RhoB modifies estrogen responses in breast cancer cells by influencing expression of the estrogen receptor. *Breast Cancer Res. BCR* **15**, R6 (2013).
109. Croft, D. R. & Olson, M. F. Transcriptional regulation of Rho GTPase signaling. *Transcription* **2**, 211–215 (2011).
110. Liu, M., Bi, F., Zhou, X. & Zheng, Y. Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. *Trends Cell Biol.* **22**, 365–373 (2012).
111. Li, Z. *et al.* TrkBT1 induces liver metastasis of pancreatic cancer cells by sequestering Rho GDP dissociation inhibitor and promoting RhoA activation. *Cancer Res.* **69**, 7851–7859 (2009).
112. Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K. L. & Der, C. J. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat. Rev. Cancer* **10**, 842–857 (2010).
113. Yoshizuka, N. *et al.* An alternative transcript derived from the trio locus encodes a guanosine nucleotide exchange factor with mouse cell-transforming potential. *J. Biol. Chem.* **279**, 43998–44004 (2004).
114. Xue, W. *et al.* DLC1 is a chromosome 8p tumor suppressor whose loss promotes hepatocellular carcinoma. *Genes Dev.* **22**, 1439–1444 (2008).
115. Lawson, C. D. *et al.* Rho GTPase Transcriptome Analysis Reveals Oncogenic Roles for Rho GTPase-Activating Proteins in Basal-like Breast Cancers. *Cancer Res.* **76**, 3826–3837 (2016).
116. Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* **6**, p11 (2013).
117. Cerami, E. *et al.* The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov.* **2**, 401–404 (2012).
118. Kataoka, K. & Ogawa, S. Variegated RHOA mutations in human cancers. *Exp. Hematol.* (2016). doi:10.1016/j.exphem.2016.09.002
119. Sakata-Yanagimoto, M. *et al.* Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat. Genet.* **46**, 171–175 (2014).

120. Cleverley, S. C., Costello, P. S., Henning, S. W. & Cantrell, D. A. Loss of Rho function in the thymus is accompanied by the development of thymic lymphoma. *Oncogene* **19**, 13–20 (2000).
121. Rodrigues, P. *et al.* RHOA inactivation enhances Wnt signalling and promotes colorectal cancer. *Nat. Commun.* **5**, 5458 (2014).
122. Sebestyen, Z. *et al.* RhoB Mediates Phosphoantigen Recognition by V  $\gamma$  9V  $\delta$  2 T Cell Receptor. *Cell Rep.* **15**, 1973–1985 (2016).
123. Feig, L. A. & Cooper, G. M. Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3235–3243 (1988).
124. Feig, L. A. Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat. Cell Biol.* **1**, E25-27 (1999).
125. Seeburg, P. H., Colby, W. W., Capon, D. J., Goeddel, D. V. & Levinson, A. D. Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. *Nature* **312**, 71–75 (1984).
126. Trahey, M. & McCormick, F. A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* **238**, 542–545 (1987).
127. Krengel, U. *et al.* Three-dimensional structures of H-ras p21 mutants: molecular basis for their inability to function as signal switch molecules. *Cell* **62**, 539–548 (1990).
128. Longenecker, K. *et al.* Structure of a constitutively activated RhoA mutant (Q63L) at 1.55 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **59**, 876–880 (2003).
129. Lin, R., Bagrodia, S., Cerione, R. & Manor, D. A novel Cdc42Hs mutant induces cellular transformation. *Curr. Biol. CB* **7**, 794–797 (1997).
130. Lin, R., Cerione, R. A. & Manor, D. Specific Contributions of the Small GTPases Rho, Rac, and Cdc42 to Db1 Transformation. *J. Biol. Chem.* **274**, 23633–23641 (1999).
131. Sahai, E. RhoA effector mutants reveal distinct effector pathways for cytoskeletal reorganization, SRF activation and transformation. *EMBO J.* **17**, 1350–1361 (1998).
132. Cytoskeleton. G-LISA RHOA Datasheet.
133. Aktories, K. Rho-modifying bacterial protein toxins. *Pathog. Dis.* ftv091 (2015). doi:10.1093/femspd/ftv091
134. Aktories, K. Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 487–498 (2011).
135. Morii, N. *et al.* Purification and properties of the cytosolic substrate for botulinum ADP-ribosyltransferase. Identification as an Mr 22,000 guanine nucleotide-binding protein. *J. Biol. Chem.* **263**, 12420–12426 (1988).
136. Toda, A., Tsurumura, T., Yoshida, T., Tsumori, Y. & Tsuge, H. Rho GTPase Recognition by C3 Exoenzyme Based on C3-RhoA Complex Structure. *J. Biol. Chem.* **290**, 19423–19432 (2015).
137. Genth, H. *et al.* Entrapment of Rho ADP-ribosylated by Clostridium botulinum C3 exoenzyme in the Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor-1 complex. *J. Biol. Chem.* **278**, (2003).

138. Barth, H. *et al.* Neosynthesis and activation of Rho by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor (CNF1) reverse cytopathic effects of ADP-ribosylated Rho. *J. Biol. Chem.* **274**, 27407–27414 (1999).
139. Mohr, C., Koch, G., Just, I. & Aktories, K. ADP-ribosylation by Clostridium botulinum C3 exoenzyme increases steady-state GTPase activities of recombinant rhoA and rhoB proteins. *FEBS Lett.* **297**, 95–99 (1992).
140. Chardin, P. *et al.* The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *EMBO J.* **8**, 1087–1092 (1989).
141. Beltman, J., Erickson, J. R., Martin, G. A., Lyons, J. F. & Cook, S. J. C3 toxin activates the stress signaling pathways, JNK and p38, but antagonizes the activation of AP-1 in rat-1 cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 3772–3780 (1999).
142. Huelsenbeck, J. *et al.* Upregulation of the immediate early gene product RhoB by exoenzyme C3 from Clostridium limosum and toxin B from Clostridium difficile. *Biochemistry (Mosc.)* **46**, 4923–4931 (2007).
143. Malcolm, K. C., Elliott, C. M. & Exton, J. H. Evidence for Rho-mediated agonist stimulation of phospholipase D in rat1 fibroblasts. Effects of Clostridium botulinum C3 exoenzyme. *J. Biol. Chem.* **271**, 13135–13139 (1996).
144. Coleman, M. L. *et al.* Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* **3**, 339–345 (2001).
145. Sahai, E. & Olson, M. F. in *Methods in Enzymology* **406**, 128–140 (Elsevier, 2006).
146. Just, I. *et al.* Purification and characterization of an ADP-ribosyltransferase produced by Clostridium limosum. *J. Biol. Chem.* **267**, 10274–10280 (1992).
147. Rottner, K., Hall, A. & Small, J. V. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr. Biol. CB* **9**, 640–648 (1999).
148. Pautsch, A., Vogelsang, M., Tränkle, J., Herrmann, C. & Aktories, K. Crystal structure of the C3bot-RalA complex reveals a novel type of action of a bacterial exoenzyme. *EMBO J.* **24**, 3670–3680 (2005).
149. Just, I. *et al.* Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. *Nature* **375**, 500–503 (1995).
150. Sehr, P. *et al.* Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry (Mosc.)* **37**, 5296–5304 (1998).
151. Genth, H., Aktories, K. & Just, I. Monoglucosylation of RhoA at threonine 37 blocks cytosol-membrane cycling. *J. Biol. Chem.* **274**, 29050–29056 (1999).
152. Worby, C. A. *et al.* The fic domain: regulation of cell signaling by adenylation. *Mol. Cell* **34**, 93–103 (2009).
153. Yarbrough, M. L. *et al.* AMPylation of Rho GTPases by Vibrio VopS disrupts effector binding and downstream signaling. *Science* **323**, 269–272 (2009).

154. Woolery, A. R., Yu, X., LaBaer, J. & Orth, K. AMPylation of Rho GTPases Subverts Multiple Host Signaling Processes. *J. Biol. Chem.* **289**, 32977–32988 (2014).
155. Shao, F., Merritt, P. M., Bao, Z., Innes, R. W. & Dixon, J. E. A Yersinia Effector and a Pseudomonas Avirulence Protein Define a Family of Cysteine Proteases Functioning in Bacterial Pathogenesis. *Cell* **109**, 575–588 (2002).
156. Shao, F. *et al.* Biochemical characterization of the Yersinia YopT protease: Cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 904–909 (2003).
157. Hoffmann, C. *et al.* The Yersinia pseudotuberculosis cytotoxic necrotizing factor (CNFY) selectively activates RhoA. *J. Biol. Chem.* **279**, 16026–16032 (2004).
158. Doye, A. *et al.* CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* **111**, 553–564 (2002).
159. Fehlings, M. G. *et al.* A Phase I/IIa Clinical Trial of a Recombinant Rho Protein Antagonist in Acute Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma* **28**, 787–796 (2011).
160. Ahuja, C. S., Martin, A. R. & Fehlings, M. Recent advances in managing a spinal cord injury secondary to trauma. *F1000Research* **5**, 1017 (2016).
161. McKerracher, L. & Guertin, P. Rho as a target to promote repair: translation to clinical studies with cethrin. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 4400–4410 (2013).
162. Baron, R. *et al.* 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 (2000).
163. Lebowitz, P. F. & Prendergast, G. C. Non-Ras targets of farnesyltransferase inhibitors: focus on Rho. *Oncogene* **17**, 1439–1445 (1998).
164. Mazières, J. *et al.* Geranylgeranylated, but not farnesylated, RhoB suppresses Ras transformation of NIH-3T3 cells. *Exp. Cell Res.* **304**, 354–364 (2005).
165. Allal, C., Pradines, A., Hamilton, A. D., Sebti, S. M. & Favre, G. Farnesylated RhoB prevents cell cycle arrest and actin cytoskeleton disruption caused by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298. *Cell Cycle Georget. Tex* **1**, 430–437 (2002).
166. Schmidt, S., Diriong, S., Méry, J., Fabbrizio, E. & Debant, A. Identification of the first Rho-GEF inhibitor, TRIPalpha, which targets the RhoA-specific GEF domain of Trio. *FEBS Lett.* **523**, 35–42 (2002).
167. Bouquier, N. *et al.* Aptamer-Derived Peptides as Potent Inhibitors of the Oncogenic RhoGEF Tgat. *Chem. Biol.* **16**, 391–400 (2009).
168. Gao, Y., Dickerson, J. B., Guo, F., Zheng, J. & Zheng, Y. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 7618–7623 (2004).
169. Shang, X. *et al.* Rational design of small molecule inhibitors targeting RhoA subfamily Rho GTPases. *Chem. Biol.* **19**, 699–710 (2012).



170. Shang, X. *et al.* Small-molecule inhibitors targeting G-protein-coupled Rho guanine nucleotide exchange factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 3155–3160 (2013).
171. Diviani, D. *et al.* Small-Molecule Protein-Protein Interaction Inhibitor of Oncogenic Rho Signaling. *Cell Chem. Biol.* **23**, 1135–1146 (2016).
172. Friesland, A. *et al.* Small molecule targeting Cdc42-intersectin interaction disrupts Golgi organization and suppresses cell motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 1261–1266 (2013).
173. Laudanna, C., Campbell, J. J. & Butcher, E. C. Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* **271**, 981–983 (1996).
174. de Rooij, J. & Bos, J. L. Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras. *Oncogene* **14**, 623–625 (1997).
175. Reid, T. *et al.* Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhotilin in the rho-binding domain. *J. Biol. Chem.* **271**, 13556–13560 (1996).
176. Ren, X.-D. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* **18**, 578–585 (1999).
177. Arthur, W. T., Ellerbroek, S. M., Der, C. J., Burridge, K. & Wennerberg, K. XPLN, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and RhoB, but not RhoC. *J. Biol. Chem.* **277**, 42964–42972 (2002).
178. Pan, Q., Bao, L. W., Teknos, T. N. & Merajver, S. D. Targeted disruption of protein kinase C epsilon reduces cell invasion and motility through inactivation of RhoA and RhoC GTPases in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **66**, 9379–9384 (2006).
179. Ren, X.-D. & Schwartz, M. A. in *Methods in Enzymology* **325**, 264–272 (Elsevier, 2000).
180. Li, Z., Aizenman, C. D. & Cline, H. T. Regulation of rho GTPases by crosstalk and neuronal activity in vivo. *Neuron* **33**, 741–750 (2002).
181. Goulimari, P. *et al.* Galpha12/13 is essential for directed cell migration and localized Rho-Dia1 function. *J. Biol. Chem.* **280**, 42242–42251 (2005).
182. Benink, H. A. & Bement, W. M. Concentric zones of active RhoA and Cdc42 around single cell wounds. *J. Cell Biol.* **168**, 429–439 (2005).
183. Piston, D. W. & Kremers, G.-J. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 407–414 (2007).
184. Kraynov, V. S. *et al.* Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* **290**, 333–337 (2000).
185. Gaits, F. & Hahn, K. Shedding light on cell signaling: interpretation of FRET biosensors. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* **2003**, PE3 (2003).
186. Yoshizaki, H. *et al.* Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J. Cell Biol.* **162**, 223–232 (2003).

187. Hodgson, L., Pertz, O. & Hahn, K. M. Design and optimization of genetically encoded fluorescent biosensors: GTPase biosensors. *Methods Cell Biol.* **85**, 63–81 (2008).
188. Hodgson, L., Nalbant, P., Shen, F. & Hahn, K. Imaging and photobleach correction of Mero-CBD, sensor of endogenous Cdc42 activation. *Methods Enzymol.* **406**, 140–156 (2006).
189. Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R. L. & Hahn, K. M. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* **440**, 1069–1072 (2006).
190. Zawistowski, J. S., Sabouri-Ghomi, M., Danuser, G., Hahn, K. M. & Hodgson, L. A RhoC Biosensor Reveals Differences in the Activation Kinetics of RhoA and RhoC in Migrating Cells. *PLoS ONE* **8**, e79877 (2013).
191. Nalbant, P., Hodgson, L., Kraynov, V., Touthkine, A. & Hahn, K. M. Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells. *Science* **305**, 1615–1619 (2004).
192. Machacek, M. *et al.* Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* **461**, 99–103 (2009).
193. Kerppola, T. K. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat. Protoc.* **1**, 1278–1286 (2006).
194. Hu, C.-D., Chinenov, Y. & Kerppola, T. K. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* **9**, 789–798 (2002).
195. Wolf, A. *et al.* The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1432–1440 (2006).
196. Cabantous, S. *et al.* A new protein-protein interaction sensor based on tripartite split-GFP association. *Sci. Rep.* **3**, 2854 (2013).
197. Leng, W. *et al.* Novel split-luciferase-based genetically encoded biosensors for noninvasive visualization of Rho GTPases. *PloS One* **8**, e62230 (2013).
198. Porter, J. R., Stains, C. I., Jester, B. W. & Ghosh, I. A general and rapid cell-free approach for the interrogation of protein-protein, protein-DNA, and protein-RNA interactions and their antagonists utilizing split-protein reporters. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 6488–6497 (2008).
199. Cytoskeleton. Total RHOA ELISA Datasheet.
200. Yonemura, S., Hirao-Minakuchi, K. & Nishimura, Y. Rho localization in cells and tissues. *Exp. Cell Res.* **295**, 300–314 (2004).
201. NewEast Biosciences. Active RHOA monoclonal antibody datasheet.
202. Cao, X. *et al.* A phosphorylation switch controls the spatiotemporal activation of Rho GTPases in directional cell migration. *Nat. Commun.* **6**, 7721 (2015).
203. Kuipers, D. *et al.* Epithelial repair is a two-stage process driven first by dying cells and then by their neighbours. *J. Cell Sci.* **127**, 1229–1241 (2014).

204. Konstantinidou, G. *et al.* RHOA-FAK Is a Required Signaling Axis for the Maintenance of KRAS-Driven Lung Adenocarcinomas. *Cancer Discov.* **3**, 444–457 (2013).
205. Ho, T. T. G., Merajver, S. D., Lapière, C. M., Nusgens, B. V. & Deroanne, C. F. RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGDIalpha. *J. Biol. Chem.* **283**, 21588–21598 (2008).
206. Shimizu, T. 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 (2000).
207. Wiegandt, D. *et al.* Locking GTPases covalently in their functional states. *Nat. Commun.* **6**, 7773 (2015).
208. Tsuji, T. *et al.* ROCK and mDial1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* **157**, 819–830 (2002).
209. Wang, L., Yang, L., Luo, Y. & Zheng, Y. A novel strategy for specifically down-regulating individual Rho GTPase activity in tumor cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 44617–44625 (2003).
210. Inoue, T., Heo, W. D., Grimley, J. S., Wandless, T. J. & Meyer, T. An inducible translocation strategy to rapidly activate and inhibit small GTPase signaling pathways. *Nat. Methods* **2**, 415–418 (2005).
211. Wu, Y. I. *et al.* A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* **461**, 104–108 (2009).
212. Wagner, E. & Glotzer, M. Local RhoA activation induces cytokinetic furrows independent of spindle position and cell cycle stage. *J. Cell Biol.* **213**, 641–649 (2016).
213. Goffinet, M. *et al.* Identification of a GTP-bound Rho specific scFv molecular sensor by phage display selection. *BMC Biotechnol.* **8**, 34 (2008).
214. Chinestra, P., Lajoie-Mazenc, I., Faye, J.-C. & Favre, G. Use of phage display for the identification of molecular sensors specific for activated Rho. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **827**, 283–303 (2012).
215. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
216. Holliger, P. & Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1126–1136 (2005).
217. Porter, R. R. The hydrolysis of rabbit  $\gamma$ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* **73**, 119–126 (1959).
218. Inbar, D., Hochman, J. & Givol, D. Localization of antibody-combining sites within the variable portions of heavy and light chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 2659–2662 (1972).
219. Hochman, J., Inbar, D. & Givol, D. An active antibody fragment (Fv) composed of the variable portions of heavy and light chains. *Biochemistry (Mosc.)* **12**, 1130–1135 (1973).

220. Qiu, X.-Q., Wang, H., Cai, B., Wang, L.-L. & Yue, S.-T. Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting. *Nat. Biotechnol.* **25**, 921–929 (2007).
221. Wang, Y. *et al.* Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications. *Int. J. Nanomedicine* **11**, 3287–3303 (2016).
222. Hoogenboom, null, Henderikx, null & de Haard H, null. Creating and engineering human antibodies for immunotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **31**, 5–31 (1998).
223. Amster, O. *et al.* Synthesis of part of a mouse immunoglobulin light chain in a bacterial clone. *Nucleic Acids Res.* **8**, 2055–2065 (1980).
224. Boss, M. A., Kenten, J. H., Wood, C. R. & Emtage, J. S. Assembly of functional antibodies from immunoglobulin heavy and light chains synthesised in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **12**, 3791–3806 (1984).
225. Cabilly, S. *et al.* Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 3273–3277 (1984).
226. Skerra, A. & Plückthun, A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038–1041 (1988).
227. Bird, R. *et al.* Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423–426 (1988).
228. Hamers-Casterman, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446–448 (1993).
229. Woolven, B. P., Frenken, L. G., van der Logt, P. & Nicholls, P. J. The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation. *Immunogenetics* **50**, 98–101 (1999).
230. Muyldermans, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 775–797 (2013).
231. Dmitriev, O. Y., Lutsenko, S. & Muyldermans, S. Nanobodies as Probes for Protein Dynamics in Vitro and in Cells. *J. Biol. Chem.* **291**, 3767–3775 (2016).
232. Marks, J. D., Tristem, M., Karpas, A. & Winter, G. Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes. *Eur. J. Immunol.* **21**, 985–991 (1991).
233. Tabares-da Rosa, S. *et al.* Competitive Selection from Single Domain Antibody Libraries Allows Isolation of High-Affinity Antihapten Antibodies That Are Not Favored in the llama Immune Response. *Anal. Chem.* **83**, 7213–7220 (2011).
234. Monegal, A. *et al.* Immunological applications of single-domain llama recombinant antibodies isolated from a naive library. *Protein Eng. Des. Sel.* **22**, 273–280 (2009).
235. Sabir, J. S. M. *et al.* Construction of naïve camelids VHH repertoire in phage display-based library. *C. R. Biol.* **337**, 244–249 (2014).

236. Monegal, A. *et al.* Single domain antibodies with VH hallmarks are positively selected during panning of llama (*Lama glama*) naïve libraries. *Dev. Comp. Immunol.* **36**, 150–156 (2012).
237. Saerens, D. *et al.* Identification of a universal VHH framework to graft non-canonical antigen-binding loops of camel single-domain antibodies. *J. Mol. Biol.* **352**, 597–607 (2005).
238. Yan, J., Li, G., Hu, Y., Ou, W. & Wan, Y. Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications. *J. Transl. Med.* **12**, 343 (2014).
239. Fridy, P. C. *et al.* A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. *Nat. Methods* **11**, 1253–1260 (2014).
240. Scheid, J. F. *et al.* Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science* **333**, 1633–1637 (2011).
241. Kvam, E., Sierks, M. R., Shoemaker, C. B. & Messer, A. Physico-chemical determinants of soluble intrabody expression in mammalian cell cytoplasm. *Protein Eng. Des. Sel.* **23**, 489–498 (2010).
242. Ellis, R. J. Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 114–119 (2001).
243. Auf der Maur, A., Tissot, K. & Barberis, A. Antigen-independent selection of intracellular stable antibody frameworks. *Methods San Diego Calif* **34**, 215–224 (2004).
244. Shaki-Loewenstein, S., Zfania, R., Hyland, S., Wels, W. S. & Benhar, I. A universal strategy for stable intracellular antibodies. *J. Immunol. Methods* **303**, 19–39 (2005).
245. Fisher, A. C. & DeLisa, M. P. Efficient Isolation of Soluble Intracellular Single-chain Antibodies using the Twin-arginine Translocation Machinery. *J. Mol. Biol.* **385**, 299–311 (2009).
246. Silva, F. A. da *et al.* Camelized Rabbit-derived VH Single-domain Intrabodies Against Vif Strongly Neutralize HIV-1 Infectivity. *J. Mol. Biol.* **340**, 525–542 (2004).
247. Philibert, P. *et al.* A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. *BMC Biotechnol.* **7**, 81 (2007).
248. Guglielmi, L. *et al.* Selection for intrabody solubility in mammalian cells using GFP fusions. *Protein Eng. Des. Sel.* **24**, 873–881 (2011).
249. Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J. & Terwilliger, T. C. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **17**, 691–695 (1999).
250. Cabantous, S. & Waldo, G. S. In vivo and in vitro protein solubility assays using split GFP. *Nat. Methods* **3**, 845–854 (2006).
251. Gennari, F. *et al.* Direct phage to intrabody screening (DPIS): demonstration by isolation of cytosolic intrabodies against the TES1 site of Epstein Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) that block NF-kappaB transactivation. *J. Mol. Biol.* **335**, 193–207 (2004).

252. Visintin, M., Tse, E., Axelson, H., Rabbitts, T. H. & Cattaneo, A. Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11723–11728 (1999).
253. Visintin, M. *et al.* The intracellular antibody capture technology (IACT): towards a consensus sequence for intracellular antibodies. *J. Mol. Biol.* **317**, 73–83 (2002).
254. Tanaka, T. & Rabbitts, T. H. Intrabodies based on intracellular capture frameworks that bind the RAS protein with high affinity and impair oncogenic transformation. *EMBO J.* **22**, 1025–1035 (2003).
255. Tanaka, T., Chung, G. T. Y., Forster, A., Lobato, M. N. & Rabbitts, T. H. De novo production of diverse intracellular antibody libraries. *Nucleic Acids Res.* **31**, e23 (2003).
256. Tanaka, T. & Rabbitts, T. H. Protocol for the selection of single-domain antibody fragments by third generation intracellular antibody capture. *Nat. Protoc.* **5**, 67–92 (2010).
257. Visintin, M. The intracellular antibody capture technology: towards the high-throughput selection of functional intracellular antibodies for target validation. *Methods* **34**, 200–214 (2004).
258. Visintin, M., Melchionna, T., Cannistraci, I. & Cattaneo, A. In vivo selection of intrabodies specifically targeting protein–protein interactions: A general platform for an ‘undruggable’ class of disease targets☆. *J. Biotechnol.* **135**, 1–15 (2008).
259. Pellis, M. *et al.* A bacterial-two-hybrid selection system for one-step isolation of intracellularly functional Nanobodies. *Arch. Biochem. Biophys.* **526**, 114–123 (2012).
260. Mössner, E., Koch, H. & Plückthun, A. Fast selection of antibodies without antigen purification: adaptation of the protein fragment complementation assay to select antigen-antibody pairs. *J. Mol. Biol.* **308**, 115–122 (2001).
261. Waraho, D. & DeLisa, M. P. Versatile selection technology for intracellular protein-protein interactions mediated by a unique bacterial hitchhiker transport mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 3692–3697 (2009).
262. Waraho-Zhmayev, D., Meksiriporn, B., Portnoff, A. D. & DeLisa, M. P. Optimizing recombinant antibodies for intracellular function using hitchhiker-mediated survival selection. *Protein Eng. Des. Sel.* **27**, 351–358 (2014).
263. Tanaka, T. & Rabbitts, T. H. Selection of functional single domain antibody fragments for interfering with protein-protein interactions inside cells: a ‘one plasmid’ mammalian two-hybrid system. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **911**, 175–182 (2012).
264. Zolghadr, K. *et al.* A Fluorescent Two-hybrid Assay for Direct Visualization of Protein Interactions in Living Cells. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 2279–2287 (2008).
265. Kaiser, P. D., Maier, J., Traenkle, B., Emele, F. & Rothbauer, U. Recent progress in generating intracellular functional antibody fragments to target and trace cellular components in living cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1844**, 1933–1942 (2014).
266. De Meyer, T., Muyldermans, S. & Depicker, A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol.* **32**, 263–270 (2014).

267. Ries, J., Kaplan, C., Platonova, E., Eghlidi, H. & Ewers, H. A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nat. Methods* **9**, 582–584 (2012).
268. Mikhaylova, M. *et al.* Resolving bundled microtubules using anti-tubulin nanobodies. *Nat. Commun.* **6**, 7933 (2015).
269. Leduc, C. *et al.* A highly specific gold nanoprobe for live-cell single-molecule imaging. *Nano Lett.* **13**, 1489–1494 (2013).
270. Pardon, E. *et al.* A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat. Protoc.* **9**, 674–693 (2014).
271. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Structure of a nanobody-stabilized active state of the  $\beta$  2 adrenoceptor. *Nature* **469**, 175–180 (2011).
272. Rothbauer, U. *et al.* Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat. Methods* **3**, 887–889 (2006).
273. Nizak, C. Recombinant Antibodies to the Small GTPase Rab6 as Conformation Sensors. *Science* **300**, 984–987 (2003).
274. Maier, J., Traenkle, B. & Rothbauer, U. Real-time analysis of epithelial-mesenchymal transition using fluorescent single-domain antibodies. *Sci. Rep.* **5**, 13402 (2015).
275. Helma, J. *et al.* Direct and dynamic detection of HIV-1 in living cells. *PloS One* **7**, e50026 (2012).
276. Irannejad, R. *et al.* Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature* **495**, 534–538 (2013).
277. Rothbauer, U. *et al.* A Versatile Nanotrap for Biochemical and Functional Studies with Fluorescent Fusion Proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 282–289 (2007).
278. Hecce, H. D., Deng, W., Helma, J., Leonhardt, H. & Cardoso, M. C. Visualization and targeted disruption of protein interactions in living cells. *Nat. Commun.* **4**, 2660 (2013).
279. Tang, J. C. Y. *et al.* A Nanobody-Based System Using Fluorescent Proteins as Scaffolds for Cell-Specific Gene Manipulation. *Cell* **154**, 928–939 (2013).
280. Tang, J. C. Y. *et al.* Cell type-specific manipulation with GFP-dependent Cre recombinase. *Nat. Neurosci.* **18**, 1334–1341 (2015).
281. Tang, J. C. *et al.* Detection and manipulation of live antigen-expressing cells using conditionally stable nanobodies. *eLife* **5**, (2016).
282. Caussin, E., Kanca, O. & Affolter, M. Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 117–121 (2012).
283. Kuo, C.-L., Oyler, G. A. & Shoemaker, C. B. Accelerated neuronal cell recovery from Botulinum neurotoxin intoxication by targeted ubiquitination. *PloS One* **6**, e20352 (2011).
284. Jobling, S. A. *et al.* Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nat. Biotechnol.* **21**, 77–80 (2002).

285. Gueorguieva, D. *et al.* Identification of single-domain, Bax-specific intrabodies that confer resistance to mammalian cells against oxidative-stress-induced apoptosis. *FASEB J.* **20**, 2636–2638 (2006).
286. J, G. A., H, G. E., Elsken, van der W., J, van D. P. & Marc, V. Conditional inactivation of HIF-1 using intrabodies. *Cell. Oncol.* 397–409 (2008). doi:10.3233/CLO-2008-0442
287. Van Audenhove, I. *et al.* Stratifying fascin and cortactin function in invadopodium formation using inhibitory nanobodies and targeted subcellular delocalization. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **28**, 1805–1818 (2014).
288. Van Impe, K. *et al.* A nanobody targeting the F-actin capping protein CapG restrains breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* **15**, R116 (2013).
289. Kirchhofer, A. *et al.* Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 133–138 (2010).
290. Summanen, M. *et al.* Kinetics of PKC  $\epsilon$  activating and inhibiting llama single chain antibodies and their effect on PKC  $\epsilon$  translocation in HeLa cells. *PLoS One* **7**, e35630 (2012).
291. Staus, D. P. *et al.* Allosteric nanobodies reveal the dynamic range and diverse mechanisms of G-protein-coupled receptor activation. *Nature* **535**, 448–452 (2016).
292. Marschall, A. L. J., Frenzel, A., Schirrmann, T., Schüngel, M. & Dübel, S. Targeting antibodies to the cytoplasm. *mAbs* **3**, 3–16 (2011).
293. Chiu, H.-Y. *et al.* Intracellular chromobody delivery by mesoporous silica nanoparticles for antigen targeting and visualization in real time. *Sci. Rep.* **6**, 25019 (2016).
294. Muyldermans, S. & Smider, V. V. Distinct antibody species: structural differences creating therapeutic opportunities. *Curr. Opin. Immunol.* **40**, 7–13 (2016).
295. Kijanka, M., Dorresteijn, B., Oliveira, S. & van Bergen en Henegouwen, P. M. P. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. *Nanomed.* **10**, 161–174 (2015).
296. Wesolowski, J. *et al.* Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **198**, 157–174 (2009).
297. Van Audenhove, I. & Gettemans, J. Nanobodies as Versatile Tools to Understand, Diagnose, Visualize and Treat Cancer. *EBioMedicine* **8**, 40–48 (2016).
298. Young, R. A. & Davis, R. W. Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 1194–1198 (1983).
299. Smith, G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315–1317 (1985).
300. McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552–554 (1990).
301. Rakonjac, J., Bennett, N. J., Spagnuolo, J., Gagic, D. & Russel, M. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr. Issues Mol. Biol.* **13**, 51–76 (2011).



302. Carmen, S. & Jermutus, L. Concepts in antibody phage display. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **1**, 189–203 (2002).
303. Kramer, R. A. A novel helper phage that improves phage display selection efficiency by preventing the amplification of phages without recombinant protein. *Nucleic Acids Res.* **31**, 59e–59 (2003).
304. Kristensen, P. & Winter, G. Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Fold. Des.* **3**, 321–328 (1998).
305. Haque, A., Andersen, J. N., Salmeen, A., Barford, D. & Tonks, N. K. Conformation-sensing antibodies stabilize the oxidized form of PTP1B and inhibit its phosphatase activity. *Cell* **147**, 185–198 (2011).
306. Lu, J. & Sloan, S. R. An alternating selection strategy for cloning phage display antibodies. *J. Immunol. Methods* **228**, 109–119 (1999).
307. Monaghan-Benson, E. & BurrIDGE, K. Mutant B-RAF regulates a Rac-dependent cadherin switch in melanoma. *Oncogene* **32**, 4836–4844 (2013).
308. Arozarena, I. *et al.* Oncogenic BRAF Induces Melanoma Cell Invasion by Downregulating the cGMP-Specific Phosphodiesterase PDE5A. *Cancer Cell* **19**, 45–57 (2011).
309. Lu, H. *et al.* Oncogenic BRAF-Mediated Melanoma Cell Invasion. *Cell Rep.* **15**, 2012–2024 (2016).
310. Clark, E. A., Golub, T. R., Lander, E. S. & Hynes, R. O. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* **406**, 532–535 (2000).
311. Davis, M. J. *et al.* RAC1P29S is a spontaneously activating cancer-associated GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 912–917 (2013).
312. Krauthammer, M. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat. Genet.* **44**, 1006–1014 (2012).
313. Ho, H. *et al.* RhoJ modulates melanoma invasion by altering actin cytoskeletal dynamics. *Pigment Cell Melanoma Res.* **26**, 218–225 (2013).
314. Klein, R. M., Spofford, L. S., Abel, E. V., Ortiz, A. & Aplin, A. E. B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Mol. Biol. Cell* **19**, 498–508 (2008).
315. Klein, R. M. & Aplin, A. E. Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions. *Cancer Res.* **69**, 2224–2233 (2009).
316. Klein, R. M. & Higgins, P. J. A switch in RND3-RHOA signaling is critical for melanoma cell invasion following mutant-BRAF inhibition. *Mol. Cancer* **10**, 114 (2011).
317. Delmas, A. *et al.* The c-Jun/RHOB/AKT pathway confers resistance of BRAF-mutant melanoma cells to MAPK inhibitors. *Oncotarget* **6**, 15250–15264 (2015).
318. Sanz-Moreno, V. *et al.* Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* **135**, 510–523 (2008).

319. Ahn, J., Sanz-Moreno, V. & Marshall, C. J. The metastasis gene NEDD9 product acts through integrin  $\beta$  3 and Src to promote mesenchymal motility and inhibit amoeboid motility. *J. Cell Sci.* **125**, 1814–1826 (2012).
320. Orgaz, J. L. *et al.* Diverse matrix metalloproteinase functions regulate cancer amoeboid migration. *Nat. Commun.* **5**, 4255 (2014).
321. Gadea, G., Sanz-Moreno, V., Self, A., Godi, A. & Marshall, C. J. DOCK10-mediated Cdc42 activation is necessary for amoeboid invasion of melanoma cells. *Curr. Biol. CB* **18**, 1456–1465 (2008).
322. Orgaz, J. L. & Sanz-Moreno, V. Emerging molecular targets in melanoma invasion and metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res.* **26**, 39–57 (2013).
323. Herraiz, C. *et al.* Reactivation of p53 by a Cytoskeletal Sensor to Control the Balance Between DNA Damage and Tumor Dissemination. *J. Natl. Cancer Inst.* **108**, djv289 (2016).
324. Sadok, A. *et al.* Rho Kinase Inhibitors Block Melanoma Cell Migration and Inhibit Metastasis. *Cancer Res.* **75**, 2272–2284 (2015).
325. Yin, Z. *et al.* A screen for morphological complexity identifies regulators of switch-like transitions between discrete cell shapes. *Nat. Cell Biol.* **15**, 860–871 (2013).
326. Pleiner, T. *et al.* Nanobodies: site-specific labeling for super-resolution imaging, rapid epitope-mapping and native protein complex isolation. *eLife* **4**, e11349 (2015).
327. Zhang, B. & Zheng, Y. Regulation of RhoA GTP Hydrolysis by the GTPase-Activating Proteins p190, p50RhoGAP, Bcr, and 3BP-1<sup>†</sup>. *Biochemistry (Mosc.)* **37**, 5249–5257 (1998).
328. Nixon, A. E., Brune, M., Lowe, P. N. & Webb, M. R. Kinetics of inorganic phosphate release during the interaction of p21ras with the GTPase-activating proteins, p120-GAP and neurofibromin. *Biochemistry (Mosc.)* **34**, 15592–15598 (1995).
329. Lehmann, M. *et al.* Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **19**, 7537–7547 (1999).
330. Ishizaki, T. *et al.* p160<sup>ROCK</sup>, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Lett.* **404**, 118–124 (1997).
331. Yang, Y. *et al.* Genetically encoded protein photocrosslinker with a transferable mass spectrometry-identifiable label. *Nat. Commun.* **7**, 12299 (2016).
332. Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M. & Burke, B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **196**, 801–810 (2012).
333. Guilluy, C., Garcia-Mata, R. & Burridge, K. Rho protein crosstalk: another social network? *Trends Cell Biol.* **21**, 718–726 (2011).
334. Bousquet, E. *et al.* RhoB loss induces Rac1-dependent mesenchymal cell invasion in lung cells through PP2A inhibition. *Oncogene* **35**, 1760–1769 (2016).
335. Shi, W. *et al.* Pathway level alterations rather than mutations in single genes predict response to HER2 targeted therapies in the neo-ALTTO trial. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* (2016).

336. Chiba, S., Enami, T., Ogawa, S. & Sakata-Yanagimoto, M. G17V RHOA: Genetic evidence of GTP-unbound RHOA playing a role in tumorigenesis in T cells. *Small GTPases* **6**, 100–103 (2015).
337. Rinaldi, A.-S. *et al.* The use of fluorescent intrabodies to detect endogenous gankyrin in living cancer cells. *Exp. Cell Res.* **319**, 838–849 (2013).



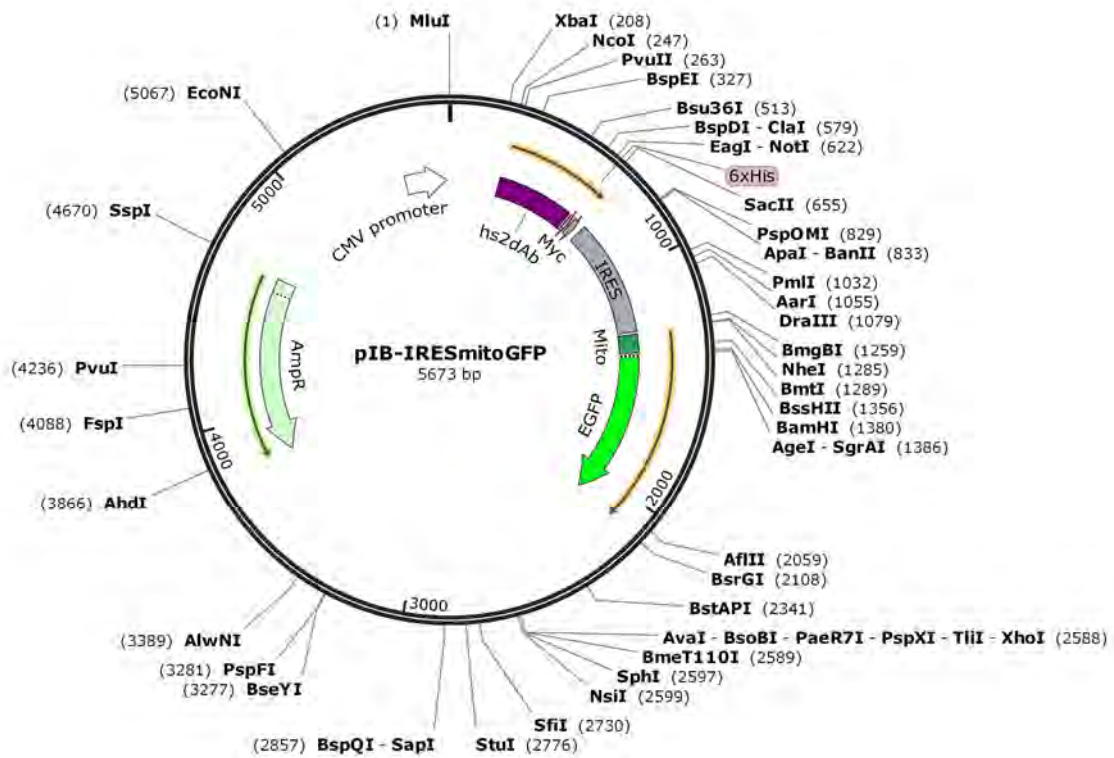
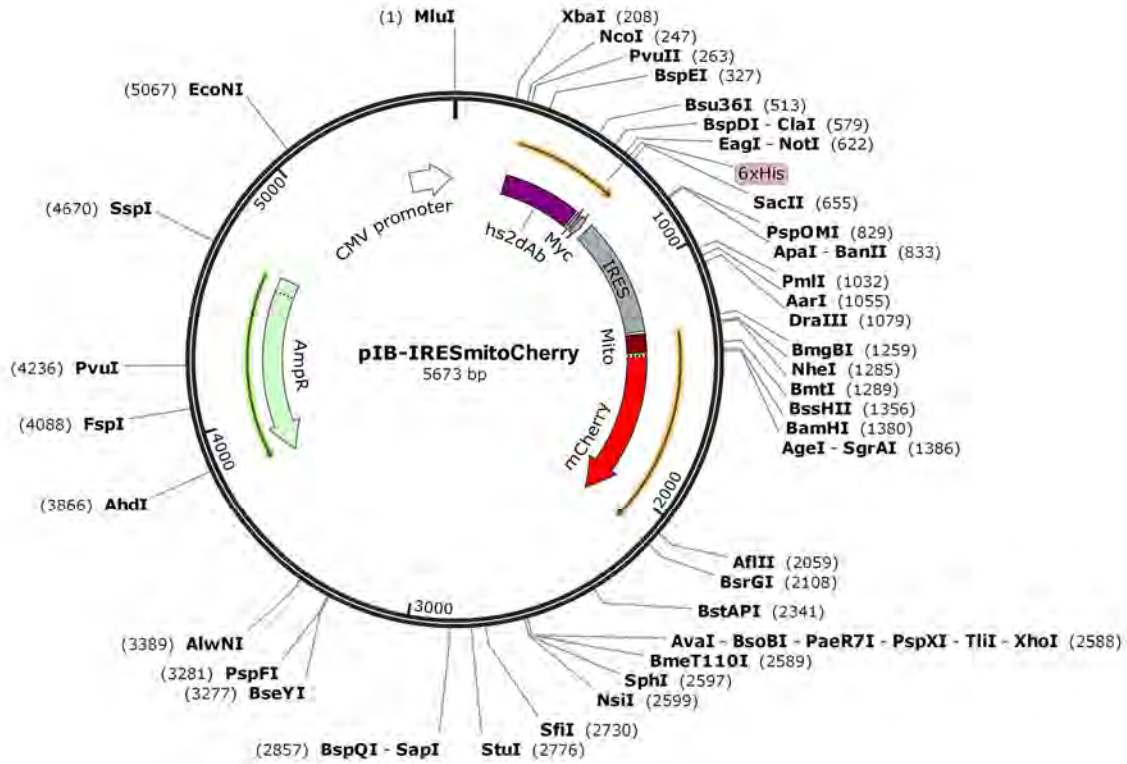
# ANNEXES

- Cartes des constructions d'ADN recombinant développées
- Brevet :  
Anti-rho gtpase conformational single domain  
antibodies and uses thereof  
Feb 3, 2015 ; WO2016124568A1  
Laura KELLER, Nicolas BERY, Aurélien OLICHON, Gilles Favre, Patrick  
CHINESTRA

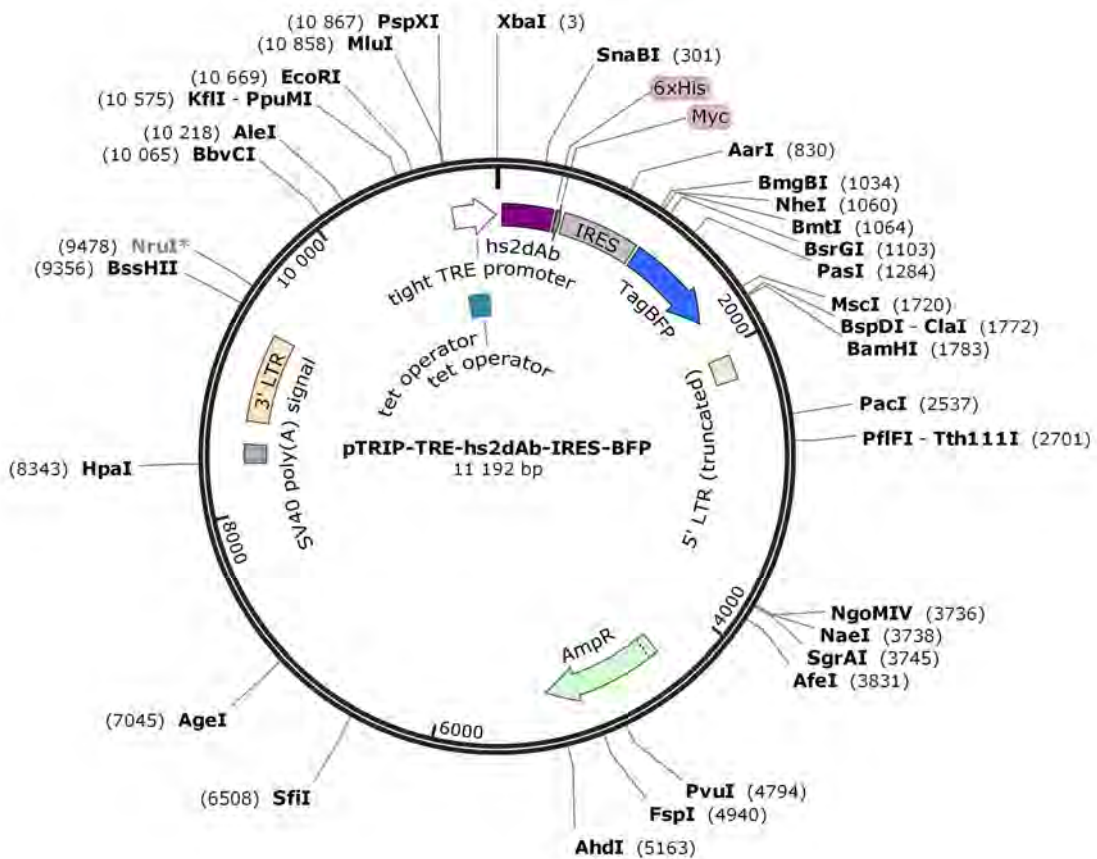
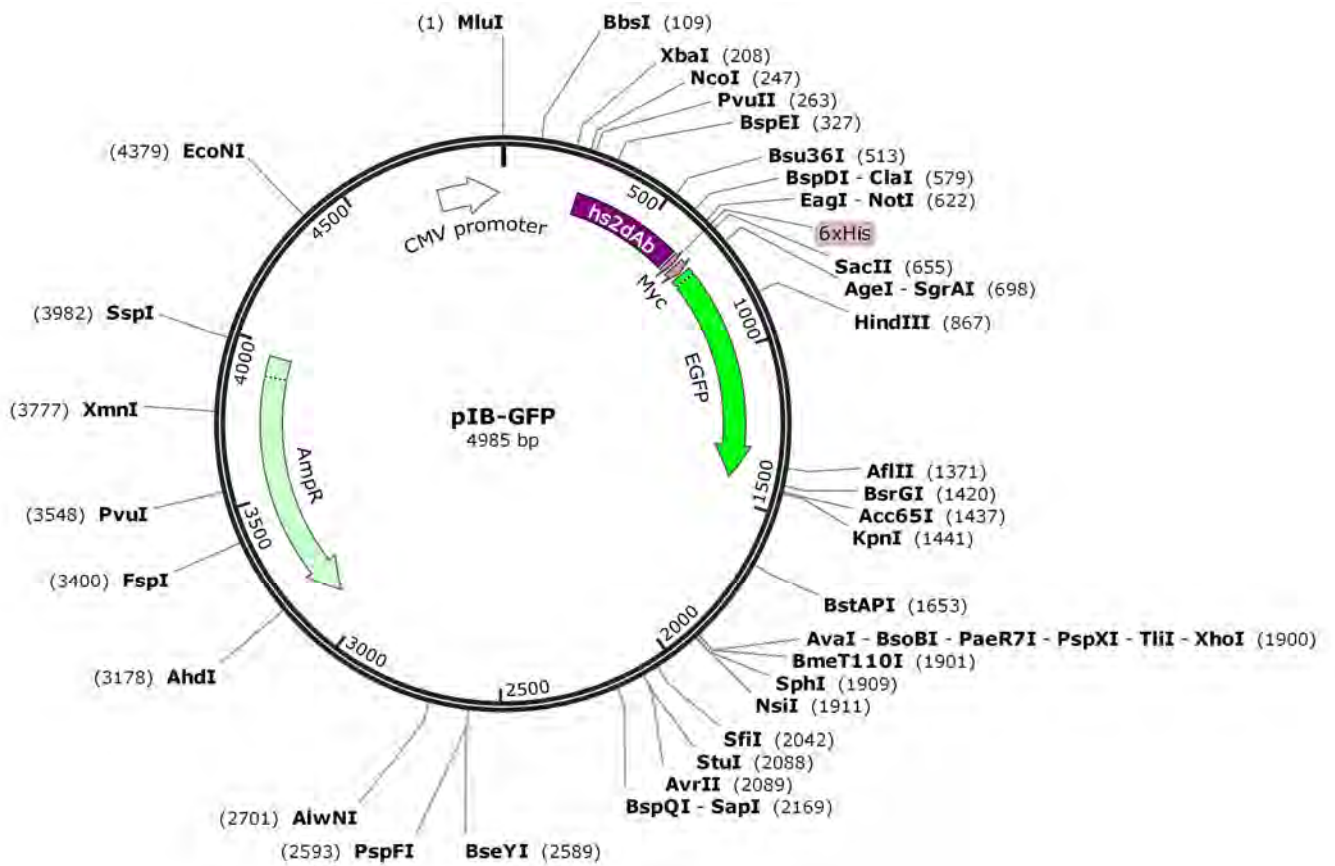


# CARTES DES PLASMIDES UTILISES POUR L'EXPRESSION INTRACELLULAIRE DES hs2dAb EN EUKARYOTE

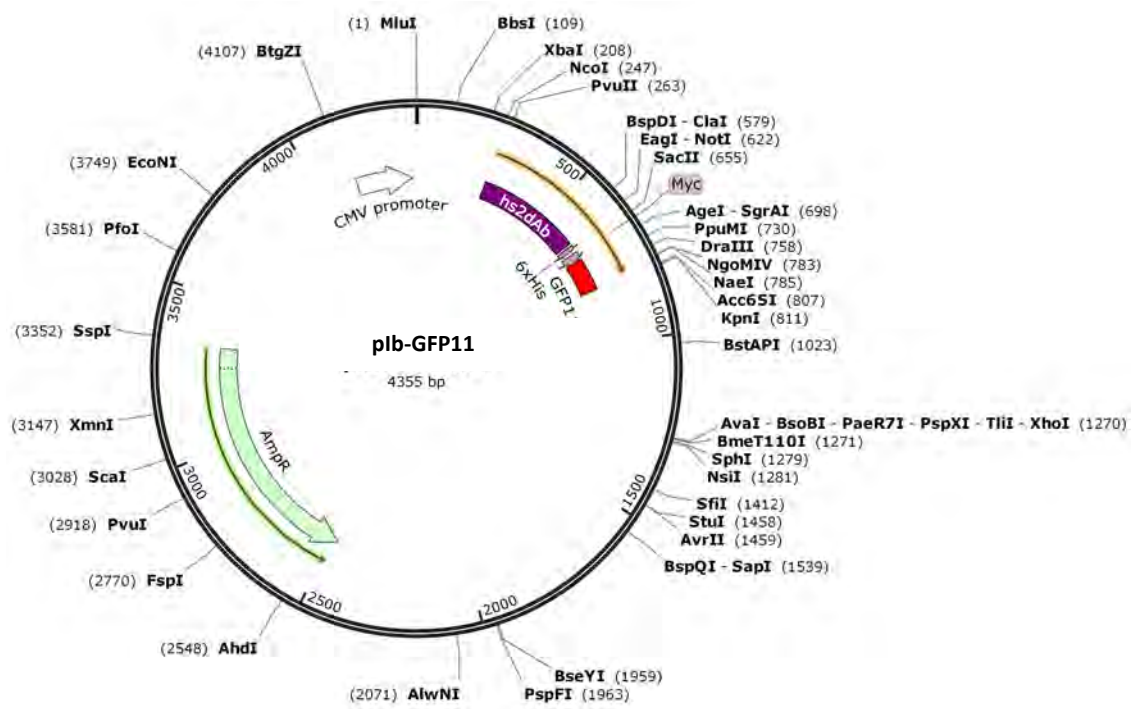
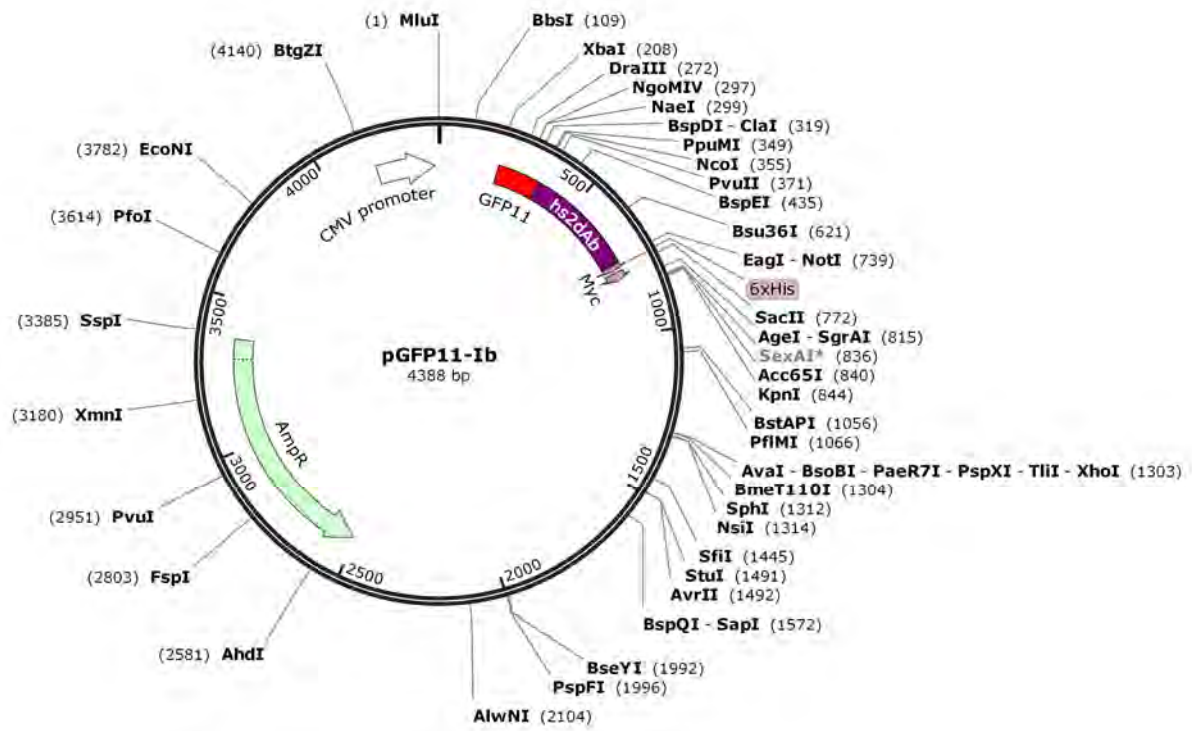
Le fragment RBD de la Rhotekin a été aussi sous cloné dans ces vecteurs.



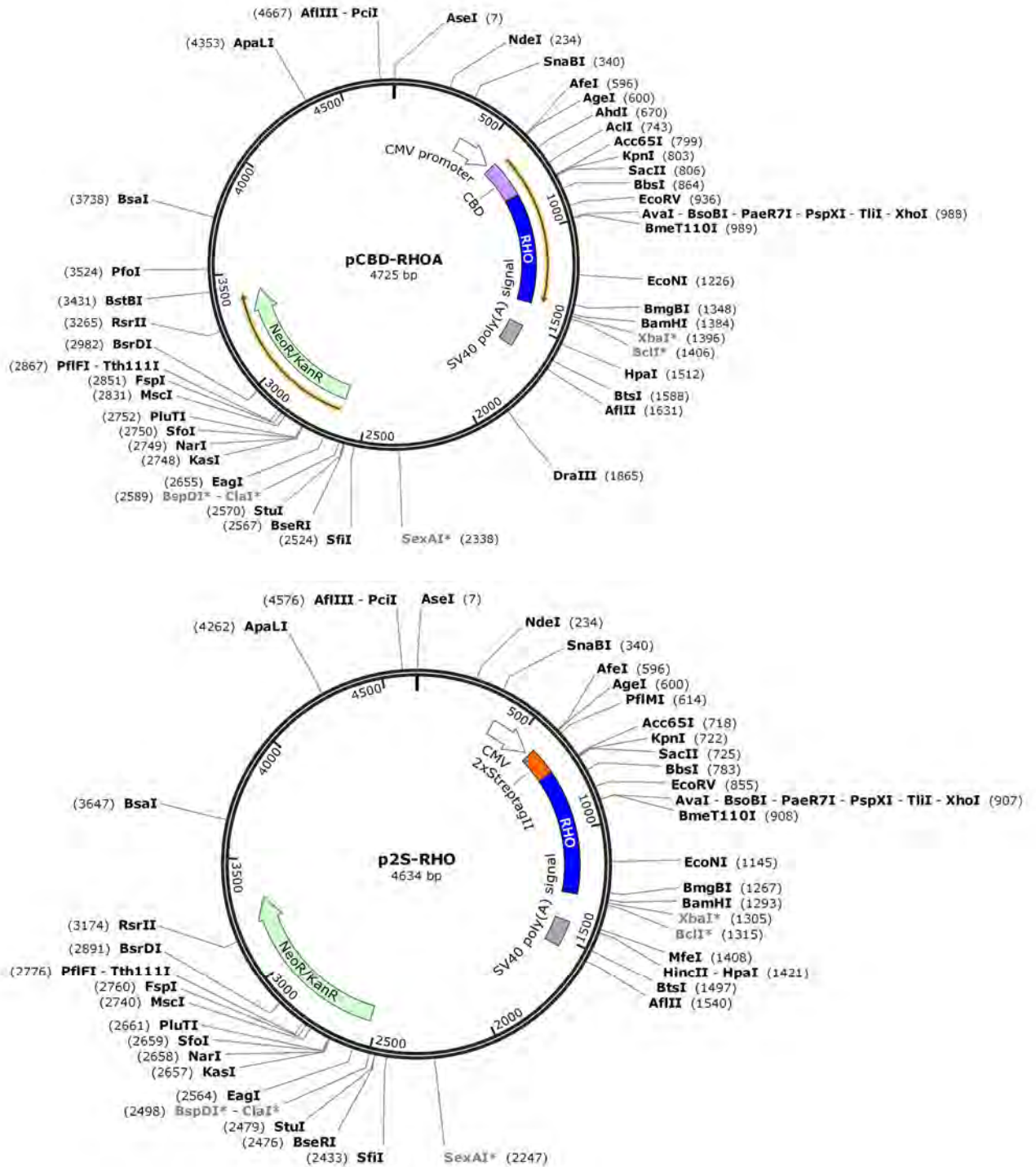
Mito : Mitochondrial Targeting Sequence

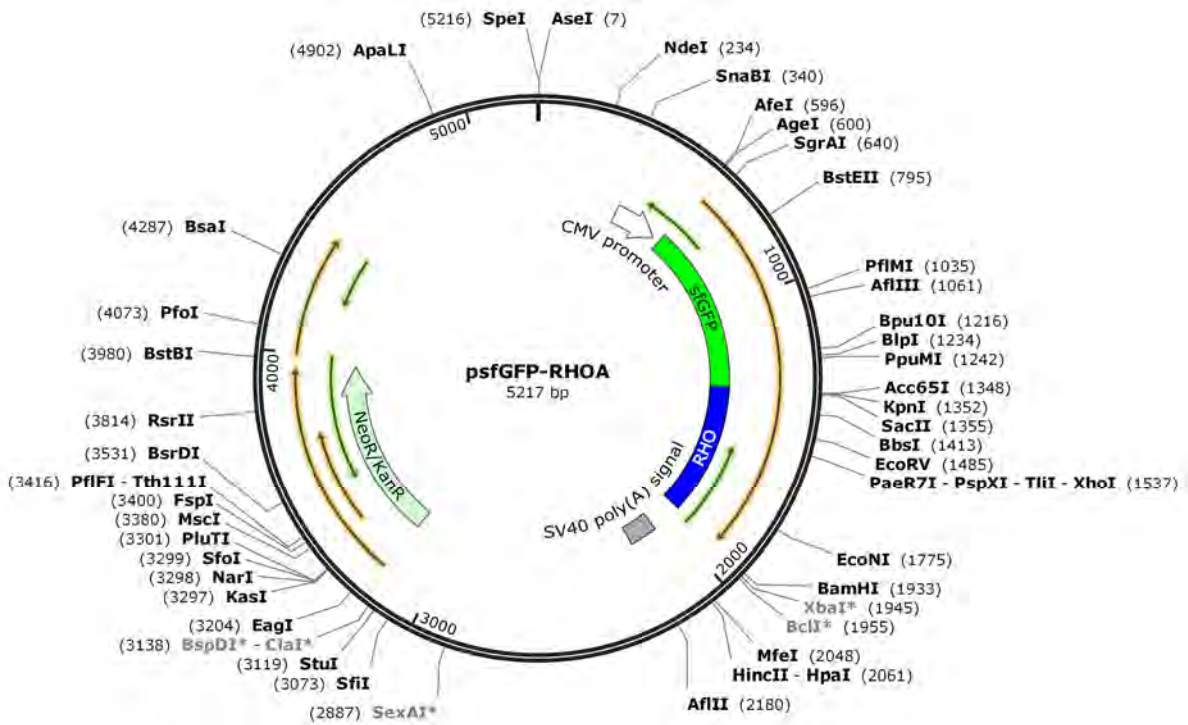
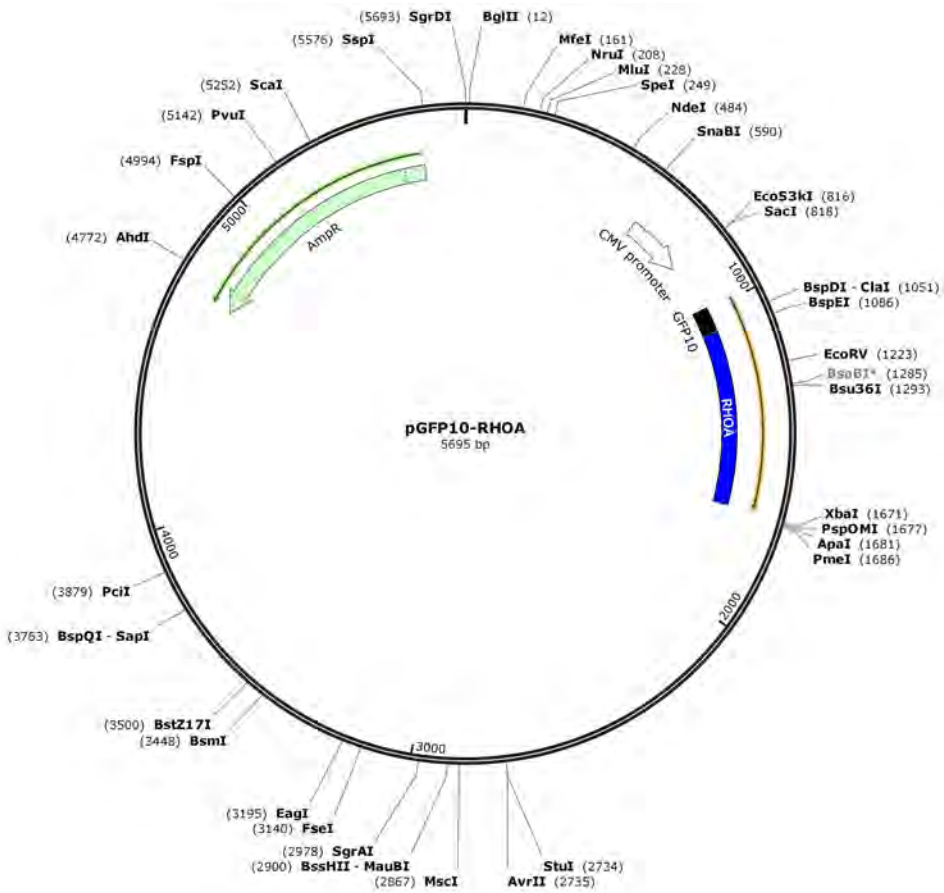




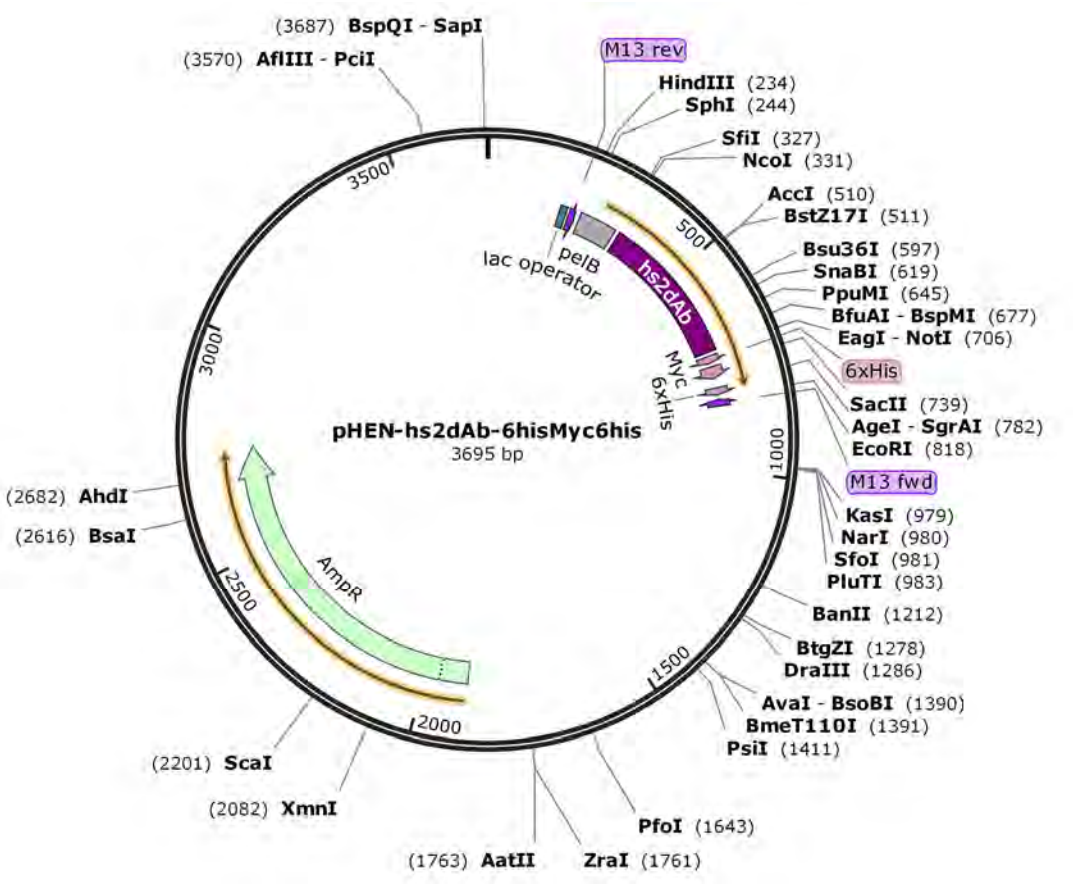
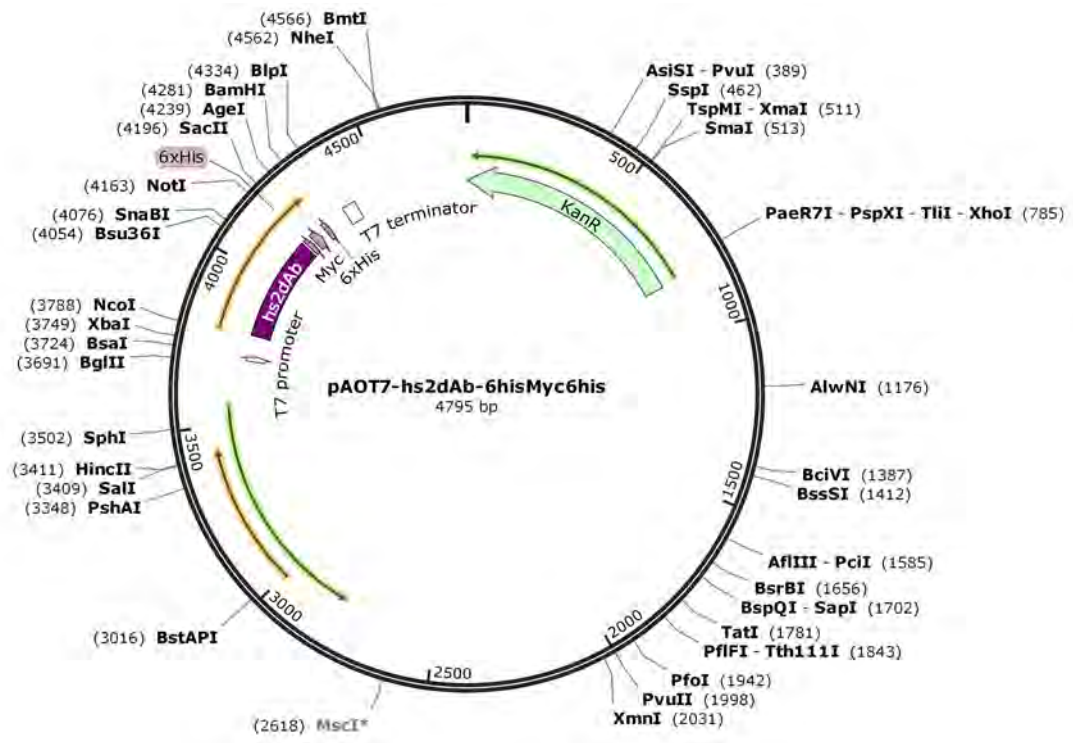


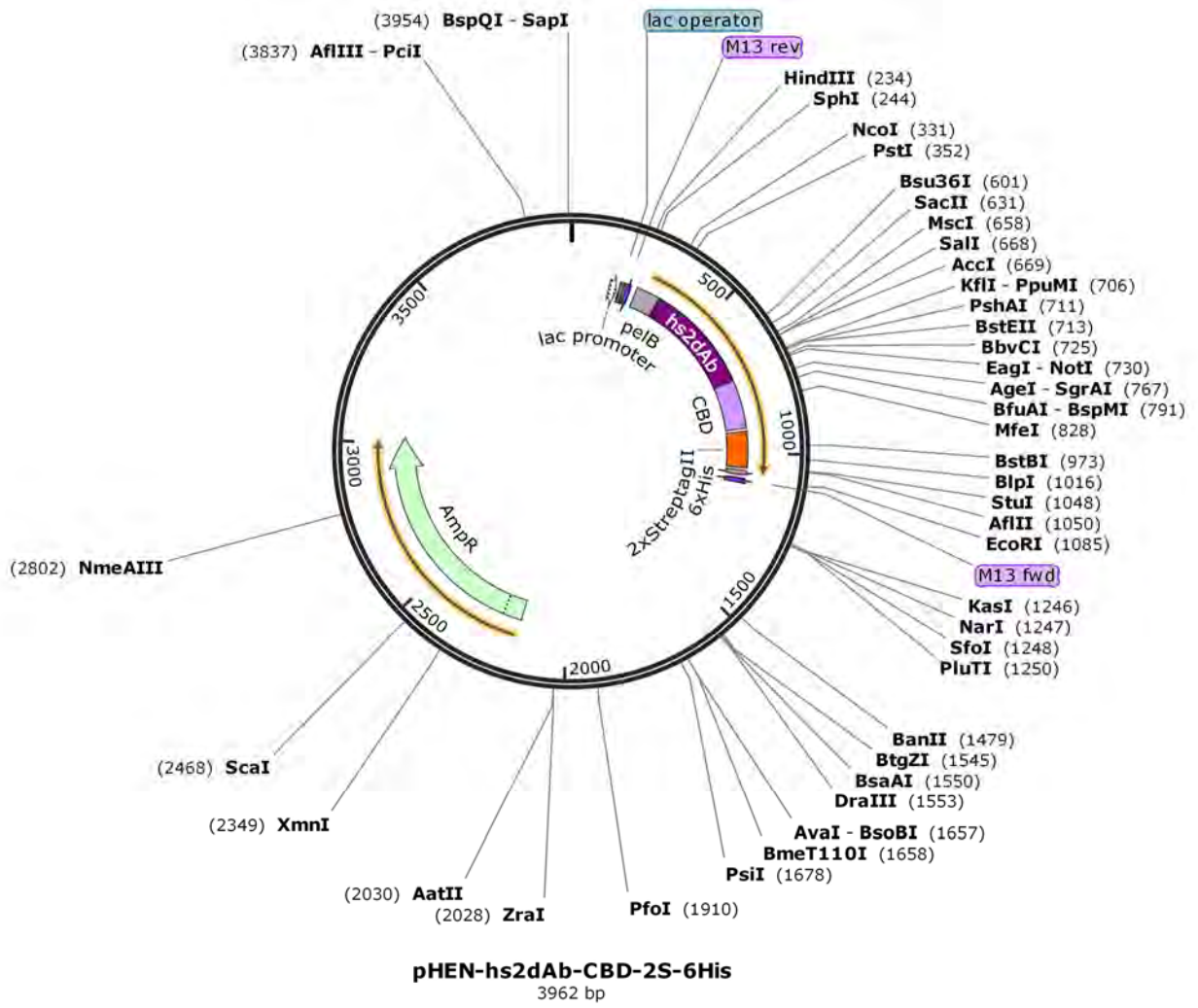
# CARTES DES PLASMIDES UTILISES POUR L'EXPRESSION INTRACELLULAIRE DES RHO EN EUCARYOTE



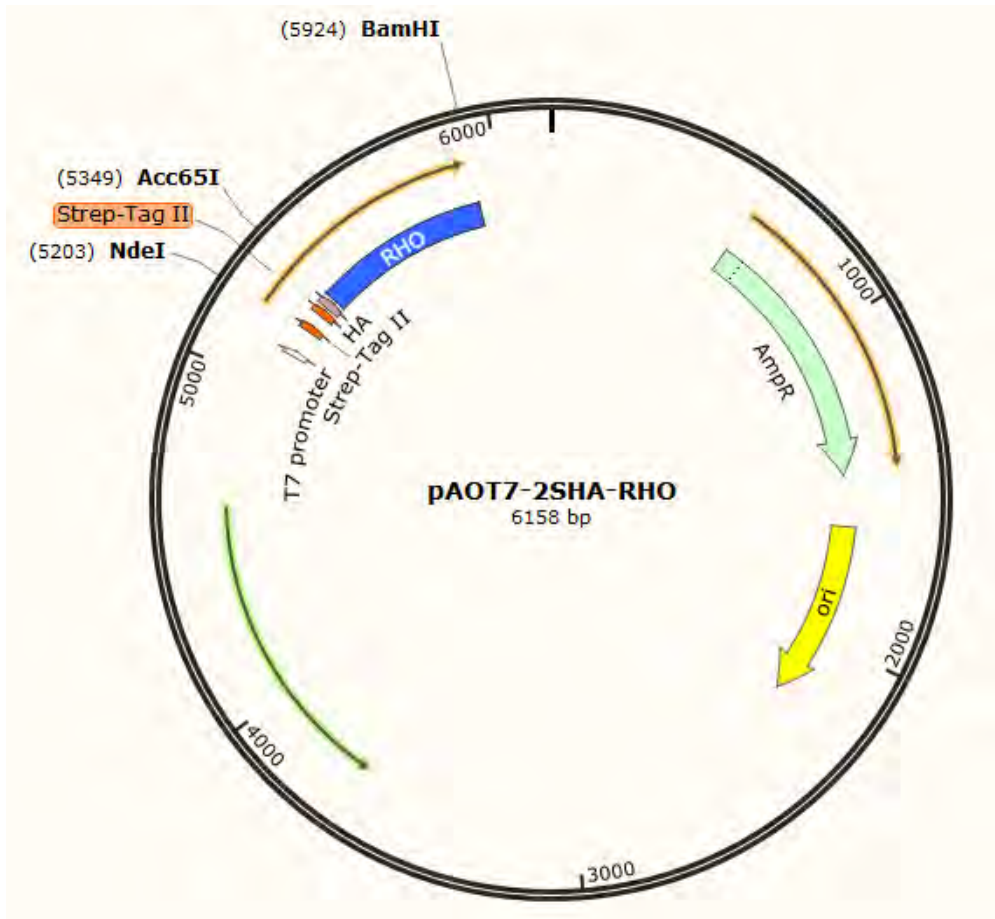


# CARTES DES PLASMIDES UTILISES POUR L'EXPRESSION DES hs2dAb EN PROCARYOTE





# CARTE DU PLASMIDE UTILISE POUR L'EXPRESSION DES RHO EN PROCARYOTE



## ANTI-RHO GTPASE CONFORMATIONAL SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AND USES THEREOF

---

### 5           **FIELD OF THE INVENTION:**

The present invention relates to anti-Rho GTPase conformational single domain antibodies and their uses thereof in particular in the therapeutic and diagnostic fields.

### 10           **BACKGROUND OF THE INVENTION:**

10           Rho GTPases belong to the family of the 20 small GTPases homologous to Ras which are largely considered as undruggable proteins. Their physiologic activity resides more in a conformational change of the switch I and switch II highly conserved domains than in their guanine nucleotide triphosphate hydrolase very slow catalytic activity. Small G proteins are therefore molecular switch that cycle between an inactive GDP bound state an active GTP  
15 bound conformation. The Rho subfamily, which contains RhoA, RhoB and RhoC that share more than 85% sequence identities are pleiotropic proteins involved in a wide range of major cell processes, including the control of actomyosin cytoskeleton, cell adhesion, cytokinesis, cell migration, stress response as well as cell survival or apoptosis. These GTPases are post-translationally modified by addition of a carboxy terminal isoprenoid  
20 group necessary for their anchorage to cellular membranes, where they can be activated upon various stimuli by an exchange of nucleotide catalyzed by Guanine nucleotide Exchange Factors (GEF). Activation step is then counterbalanced by GTP hydrolyses which is enhanced by GTPase Activating Proteins (GAPs). Therefore the cellular pool of activated Rho is maintained at the cellular membrane to limited pool. The major fraction is extracted from the  
25 membrane and sequestered in the cytoplasm by Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors (GDI). These large proteins interact by their amino terminal part with the switch domains of Rho, thus preventing the release of the GDP, and also by their carboxy terminal part to the isoprenyl group, shielding this hydrophobic moiety in order to maintain the Rho proteins soluble while excluded from membranes.

30           Together these regulators maintain the largest fraction of Rho Proteins inactive in the cell, often as much as 95 %, in order to quickly activate a very small population that will interact with effector proteins to initiate cellular transduction pathways. Moreover study of the crosstalk between the 3 GDI and all interacting Rho revealed that overexpression of a single Rho can induce artificially displacement and degradation of others and impair signaling

pathways not directly controlled by the transgene. This critical point highlights the complexity of targeting individual Rho in a selective manner.

The peculiar RhoB seems to be involved in different cellular functions and regulations than its closest homologs RhoA and RhoC. RhoB can be palmitoylated and either farnesylated or geranylgeranylated, prenylation which define localization to the plasma membrane or the endosome respectively. Some main RhoB functions in intracellular trafficking and adhesion have been characterized using conventional molecular tools such as overexpression of wild type or mutants or genetic knock down by RNA interference. Other functions have been connected to RhoB gene expression as an immediate early response to cytokines or growth factors as well as DNA damaging agent or radiation. In addition, RhoB plays paradoxal roles in cancer progression. RhoB can alter tumor formation and is often down regulated in head and neck or lung cancers.

Nevertheless RhoB is also promoting tumor angiogenesis and protecting from apoptosis in cells with genomic instability. There are now clear evidences that RhoB exert pleiotropic functions which are cells and context dependent. Previous studies targeted RhoB at the genetic level by overexpression, RNAi or gene knock out in mice. However these methods altered RhoB functions in a global way, knocking down all RhoB activities in cells, but mostly altering both the GDP bound major fraction which can induce imbalances in the GDI-Rho interactions and the minor GTP bound active pool. To decipher RhoB function without interfering with other Rho activities, it would be necessary to target RhoB at the protein level. Albeit there are no small molecule inhibitors targeting Rho GTPases, the C3 exoenzyme from *Clostridium botulinum* or *Bacillus cereus* are natural inhibitors that induce ADP-ribosylation of Rho, preventing their activation by GEF and further increasing the binding of free Rho to GDI. Actually expression of C3 gene in eukaryotic cells or incubation with cell permeable tat-C3 has been successfully used to alter globally the function of all 3 Rho, leading to a strong phenotype of actin fiber loss and cell rounding. Several other bacterial toxin target as well Rho proteins. Nevertheless all these toxins lack specificity because they do not discriminate between RhoA, RhoB or RhoC and mostly do not block directly the activated form of Rho.

In some previous studies, the selection of recombinant single chain antibodies from phage display libraries was established in order to identify binding molecules selective to the active GTP bound state of Rho proteins. Actually recombinant antibody selected from large display libraries have been used in many biotechnological or biomedical applications. Although most of recombinant antibodies require for stability the canonical disulfide bond



within the VH or VL variable domains, some peculiar intracellular antibodies, referred as intrabodies, remains stable in the reducing environment. Thus, depending on the antibody format, the scaffold properties and the library diversities, some rare recombinant antibodies have been reported to be functional while expressed in the cytosol of eukaryotic cells

5 (Tanaka, T., Williams, R. L. & Rabbitts, T. H. Tumour prevention by a single antibody domain targeting the interaction of signal transduction proteins with RAS. *EMBO J* 26, 3250-3259, doi:7601744 [pii] 10.1038/sj.emboj.7601744 (2007); Nizak, C. et al. Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors. *Science* 300,984-987, doi:10.1126/science.1083911 (2003).; Meli, G., Visintin, M., Cannistraci, I. & Cattaneo, A.

10 Direct in vivo intracellular selection of conformation-sensitive antibody domains targeting Alzheimer's amyloid-beta oligomers. *J Mol Biol* 387, 584-606, doi:10.1016/j.jmb.2009.01.061 (2009)). The first active Rho conformational single chain variable fragment (scFv), named scFvC1, recognized *in vitro* in biochemical assays the GTP bound state of all 3 Rho (Goffinet, M. et al. Identification of a GTP-bound Rho specific scFv

15 molecular sensor by phage display selection. *BMC Biotechnol* 8, 34, doi:1472-6750-8-34 [pii] 10.1186/1472-6750-8-34 (2008).). A molecular evolution of scFvC1 led to the identification of the scFvF7, a higher affinity pan active Rho binder than scFvC1, as well as the scFvE3 that preferentially recognizes active RhoB but is not functional as an intrabody.

## 20 **SUMMARY OF THE INVENTION:**

The present invention relates to active form specific anti-Rho GTPase conformational single domain antibodies and their uses in particular in the therapeutic and diagnostic fields. In particular, the present invention is defined by the claims.

## 25 **DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:**

The inventors produced a fully synthetic library of humanized nanobodies, common name of single domain VH from *camelidae*. This novel phage display library, based on a unique scaffold optimized for stability, allowed the systematic selection of highly functional binding molecules, which correspond to humanized synthetic single domain antibodies

30 (hs2dAb). The inventors thus especially selected towards various targets several functional intrabodies, among which one conformational sensor of the active GTP bound state of Rho proteins, a clone referred as H12 hs2dAb. They demonstrated that the H12 hs2dAb is a pan Rho binder that do not discriminate between the Rho subfamily members RhoA, RhoB and RhoC, and also bond members of the close Rac1 family of Ras homologous small G proteins.

The inventors further isolated by using more competitive selection scheme several active Rho selective hs2dAb molecules with more specificity towards the Rho subfamily, namely that do not recognize Rac1 or other small G proteins. They demonstrated that some of these hs2dAb had sub-nanomolar affinities towards recombinant constitutively active L63 mutant of Rhos.

5 Intracellular expression of these molecules lead to a clear reorganization of actin cytoskeleton, suggesting that they act as strong intracellular inhibitor of Rho signaling in cultured cells. Then the inventors applied the same strategy to select single domain antibodies specific that recognized RhoB in its GTP bound state. In particular, they established a visual in-cell screening of functionalized intrabodies that can induce active RhoB protein knock down. The

10 protein knock down was based on the use of an Fbox domain genetically fused to the selected single domain antibodies, which induce ubiquitination of the bound target and subsequent proteasome dependent degradation. A dual challenge was to identify an intrabody which can physiologically discriminate RhoB from the closest homologs while being selective of the active GTP-bound state. Using cell lines expressing various Rho mutants, the inventors

15 succeeded in selecting a robust genetically encoded RhoB inhibitor selective of its active state and demonstrated the efficiency of this unique tool to knock down endogenous RhoB active fraction, not only depleting its basal activity but also blocking its cellular activation after growth factor treatment. Furthermore, in a proof of principle study the inventors demonstrated that subtle RhoB activity knock down did not displace the whole cellular

20 fraction of RhoB but induced similar phenotype as RNAi on human bronchial epithelial cells migration and invasion. Accordingly, the present invention relates to anti-Rho GTPase conformational single domain antibodies and their uses in particular in the therapeutic and diagnostic fields.

25 As used herein the term “Rho-GTPase” has its general meaning in the art and refers to the Rho (ras homology) family of small molecular weight guanosine triphosphatases Rho GTPases are molecular switches that control signaling pathways regulating cytoskeleton organization, gene expression, cell cycle progression, cell motility and other cellular processes (Cell Communication and Signaling, 2010, 8, 23). Rho family GTPases are

30 important signaling proteins that control diverse cellular functions related to cancer development, including actin cytoskeleton organization, transcription regulation, cell cycle progression, apoptosis, vesicle trafficking, and cell- to-cell and cell-to-extracellular matrix adhesions (Cell Communication and Signaling, 2010, 8 (23), 1 -14; Genes Dev., 1997, 11 , 2295-2322). In particular, Rho-GTPase includes RhoA, RhoB and RhoC.

The single domain antibodies generated by the inventors are specific for at least one Rho-GTPase, and more particularly for only one Rho-GTPase (e.g. the "B6" hs2dAb is specific for RhoB). However some antibodies of the present invention are able to interact with several Rho-GTPases (e.g. the H12 hs2dAb has affinity for RhoA, RhoB and RhoC as well as Rac1). Accordingly, the single domain antibodies of the present invention are characterized by one or more functional properties such that they are humanized, they have a specific affinity for one Rho-GTPase or for several Rho-GTPases, they are specific for one activated form of the Rho-GTPase (i.e. conformational), they are able to inhibit the activated form of the Rho-GTPase, they are highly stable single domain antibodies, they present high affinity, and they are active in the intracellular environment.

As used herein the term "single domain antibody" has its general meaning in the art and refers to the single heavy chain variable domain of antibodies of the type that can be found in Camelid mammals which are naturally devoid of light chains. Such single domain antibody are also "nanobody®". For a general description of (single) domain antibodies, reference is also made to the prior art cited above, as well as to EP 0 368 684, Ward et al. (Nature 1989 Oct 12; 341 (6242): 544-6), Holt et al., Trends Biotechnol., 2003, 21(11):484-490; and WO 06/030220, WO 06/003388. The amino acid sequence and structure of a single domain antibody can be considered to be comprised of four framework regions or "FRs" which are referred to in the art and herein as "Framework region 1" or "FR1"; as "Framework region 2" or "FR2"; as "Framework region 3" or "FR3"; and as "Framework region 4" or "FR4" respectively; which framework regions are interrupted by three complementary determining regions or "CDRs", which are referred to in the art as "Complementarity Determining Region for "CDR1"; as "Complementarity Determining Region 2" or "CDR2" and as "Complementarity Determining Region 3" or "CDR3", respectively. Accordingly, the single domain antibody can be defined as an amino acid sequence with the general structure : FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 in which FR1 to FR4 refer to framework regions 1 to 4 respectively, and in which CDR1 to CDR3 refer to the complementarity determining regions 1 to 3. In the context of the invention, the amino acid residues of the single domain antibody are numbered according to the general numbering for VH domains given by the IMGT numbering system (Lefranc M.-P., "Unique database numbering system for immunogenetic analysis" Immunology Today, 18, 509 (1997)). The IMGT unique numbering has been defined to compare the variable domains whatever the antigen receptor,

the chain type, or the species (Lefranc M.-P., "Unique database numbering system for immunogenetic analysis" *Immunology Today*, 18, 509 (1997) ; Lefranc M.-P., "The IMGT unique numbering for Immunoglobulins, T cell receptors and Ig-like domains" *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999).; Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, G., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains" *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003).). In the IMGT unique numbering, the conserved amino acids always have the same position, for instance cysteine 23, tryptophan 41, hydrophobic amino acid 89, cysteine 104, phenylalanine or tryptophan 118. The IMGT unique numbering provides a standardized delimitation of the framework regions (FR1-IMGT: positions 1 to 26, FR2-IMGT: 39 to 55, FR3-IMGT: 66 to 104 and FR4-IMGT: 118 to 128) and of the complementarity determining regions: CDR1-IMGT: 27 to 38, CDR2-IMGT: 56 to 65 and CDR3-IMGT: 105 to 117. As gaps represent unoccupied positions, the CDR-IMGT lengths become crucial information. Gaps in the CDR1-IMGT and CDR2-IMGT (less than 12 and 10 amino acid long, respectively) are put at the top of the CDR-IMGT loops. For instance, when the length of CDR1-IMGT is 7 amino acids, it comprises the positions 27, 28, 29, 30, 36, 37 and 38. When the length of CDR2-IMGT is 7 amino acids, it comprises the positions 56, 57, 58, 59, 63, 64, and 65. The basic length of a rearranged CDR3-IMGT is 13 amino acids (positions 105 to 117), which corresponds to a JUNCTION of 15 amino acids (2nd-CYS 104 to J-TRP or J-PHE 118). This length and corresponding numbering were chosen since they are convenient to use. Indeed, 80% of the IG and TR rearranged sequences in IMGT/LIGM-DB have a CDR3-IMGT length less than or equal to 13 amino acids. If the CDR3-IMGT length is less than 13 amino acids, gaps are created from the top of the loop, in the following order 111, 112, 110, 113, 109, 114, etc. Accordingly, when the length of CDR3-IMGT is 9 amino acids, it comprises the positions 105; 106; 107; 108; 109; 114; 115; 116; and 117. When length of CDR3-IMGT is 9 amino acids, it comprises the positions 105; 106; 107; 108; 109; 110; 112; 113; 114; 115; 116; and 117. If the CDR3-IMGT length is more than 13 amino acids, additional positions are created between positions 111 and 112 at the top of the CDR3-IMGT loop in the following order 112.1,111.1, 112.2, 111.2, 112.3, 111.3, etc. Accordingly when the length of CDR3-IMGT is 15 amino acids, it comprises the additional positions 111.1 and 112.1.

All the single domain antibodies (hs2dAb) generated by the inventors are characterized by the same frameworks regions FR1-FR4 as described in Table A and

comprises a CDR1-IMGT and a CDR2-IMGT having a length of 7 amino acids and a CDR3-IMGT having a length of 9, 12 or 15 amino acids as described in Table B.

**Table A:** frameworks regions FR1-FR4 (IMGT) of the single domain antibodies (hs2dAb) generated by the inventors:

Framework region	Sequence
FR1	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASG (SEQ ID NO:1)
FR2	MGWFRQAPGKEREFVSAISS (SEQ ID NO:2)
FR3	YYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYYCA (SEQ ID NO:3)
FR4	YWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:4)

**Table B:** CDR-IMGT regions of the single domain antibodies (hs2dAb) generated by the inventors:

10

hs2dAb	CDR1-IMGT	CDR2-IMGT	CDR3-IMGT
H12	DGSRIYA (SEQ ID NO:5)	WEQDWEH (SEQ ID NO:6)	AFMTPHRNLTSM (SEQ ID NO:7)
4P75	RYSAWDG (SEQ ID NO:8)	SQHDLEE (SEQ ID NO:9)	ATIRTGWAD (SEQ ID NO:10)
4SP1	DTSDGYI (SEQ ID NO:11)	EYNSQSE (SEQ ID NO:12)	QSFNEVWKMPNKFPH (SEQ ID NO:13)
4SNP36	TSWKDYT (SEQ ID NO:14)	EGPGAQY (SEQ ID NO:15)	YSSWQPYVS (SEQ ID NO:16)
4SNP61	FTSTSTV (SEQ ID NO:17)	SAHTMDT (SEQ ID NO:18)	YCAPAPMLGQMITQPALP (SEQ ID NO:19)
5SP10	RFWRRYT (SEQ ID NO:20)	GTSDWT (SEQ ID NO:21)	PPHFSGAAI (SEQ ID NO:22)
5SP11	AGWRAEA (SEQ ID NO:23)	SDGDHTI (SEQ ID NO:24)	IMQTQMRRTSDYRF (SEQ ID NO:25)
5SP58	DTFSDDV (SEQ ID NO:26)	DWPTTQS (SEQ ID NO:27)	YCAQANGDHSYPLWKYGNM (SEQ ID NO:28)
5SNP47	RTSRFYS (SEQ ID NO:29)	FNSDYFL (SEQ ID NO:30)	AWWYRYTEGMTM (SEQ ID NO:31)
5SNP48	TSWFTEV (SEQ ID NO:32)	GLHDVGT (SEQ ID NO:33)	ALDKWYTKAMDARKD (SEQ ID NO:34)

	NO:32)	NO:33)	NO:34)
5SNP65	ATYEGEA (SEQ ID NO:35)	SYPSVIS (SEQ ID NO:36)	YWVNHEGTIREI (SEQ ID NO:37)
B6	YGSTIET (SEQ ID NO:38)	RAPGPSQ (SEQ ID NO:39)	PINNRTMQDSMFLWN (SEQ ID NO:40)
B20	TTSFWYT (SEQ ID NO:41)	WRFNTTT (SEQ ID NO:42)	IPRYSLDAVPHRAS (SEQ ID NO:43)
B15	SYSRGET (SEQ ID NO:44)	DTHNYET (SEQ ID NO:45)	ASPQFHKIMKGSQVG (SEQ ID NO:46)
B5	ATSGGTV (SEQ ID NO:47)	RSQTKAT (SEQ ID NO:48)	PMEHEALKQHPL (SEQ ID NO:49)
B71	DGSDGDV (SEQ ID NO:50)	RYPGRSP (SEQ ID NO:51)	ARWISRKWYTTTFQG (SEQ ID NO:52)
E3	STYETYA (SEQ ID NO:53)	ASPTIEG (SEQ ID NO:54)	TWSKMGISI (SEQ ID NO:55)
A6	DTWDQYV (SEQ ID NO:56)	RSNGTHI (SEQ ID NO:57)	PLTHQWMGRTP (SEQ ID NO:58)
G12	RTSGWYA (SEQ ID NO:59)	SRASSQE (SEQ ID NO:60)	VWMKMGIEI (SEQ ID NO:61)

The antibodies (hs2dAb) are characterized by the sequences of Table C:

**Table C:** sequences of the single domain antibodies (hs2dAb) generated by the inventors:

hs2dAb	Sequence
H12	VQLQASGGGFVQPGSLRLS CAASGDGSRIYAMGWFRQAPGKERE FVSAISWEQD WEHY YADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYYCAAFMTPHRNL TSM YWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:62)
4P75	VQLQASGGGFVQPGSLRLS CAASGRYSAWDGMGWFRQAPGKERE FVSAISSQH DLEEYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYYCAATIRTGWADYWG QGTQVTVSS (SEQ ID NO:63)
4SP1	VQLQASGGGFVQPGSLRLS CAASGDTSDGYIMGWFRQAPGKERE FVSAISEYNS QSEYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYYCAQSFNEVWKMPNK FPHYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:64)

4SNP36	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGTSWKDYTMGWFRQAPGKEREFSVSAISEGPG AQYYYADSVKGRFTISRDN SKNVYLQMNSLRAEDTATYYCAYSSWQPYVSYWGQ GTQVTVSS (SEQ ID NO:65)
4SNP61	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGFTSTSTVMGWFRQAPGKEREFSVAISSAHT MDTTYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAPAPMLGQMITQP ALPYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:66)
5SP10	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGRFWRRYTMGWFRQAPGKEREFSVAISGTSD WTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAPPHFSGAAIYWGQ GTQVTVSS (SEQ ID NO:67)
5SP11	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGAGWRAEAMGWFRQAPGKEREFSVAISSDG DHTIYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAIMQTQMRRTSDY RFYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:68)
5SP58	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGDTFSDVDMGWFRQAPGKEREFSVAISDWPT TQSYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAQANGDHSYPLWK YGNMYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:69)
5SNP47	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGRTSRFYSMGWFRQAPGKEREFSVAISFNSDY FLYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAAWWYRYTEGMTM YWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:70)
5SNP48	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGTSWFTEVMGWFRQAPGKEREFSVAISGLHD VGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAALDKWYTKAMD ARKDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:71)
5SNP65	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGATYEGEAMGWFRQAPGKEREFSVAISSYPS VISYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAYWVNHEGTIREIY WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:72)
B6	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGYGSTIETMGWFRQAPGKEREFSVAISRAPGP SQYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAPINNRTMQDSMFL WNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:73)
B20	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGTTFSWYTMGWFRQAPGKEREFSVAISWRFN TTTTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAIPRYSLDAVPHRAS TYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:74)
B15	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGSYSRGETMGWFRQAPGKEREFSVAISDTHN YETYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAASPQFHKIMKGSQ VGYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:75)
B5	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGATSGGTVMGWFRQAPGKEREFSVAISRSQT KATYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAPMEHEALKQHPL YWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:76)

B71	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGDGSDGDVMGWFRQAPGKEREFVSAISRYPG RSPYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYYCAARWISRK WYTT PF QGYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:77)
E3	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGSTYETYAMGWFRQAPGKEREFVSAISASPTI EGYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYYCATWSKMGIS IYWGQ GTQVTVSS (SEQ ID NO:78)
A6	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGDTWDQYVMGWFRQAPGKEREFVSAISRSG THGIYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYYCAPLTHQWMGR TFP YWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:79)
G12	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGRTSGWYAMGWFRQAPGKEREFVSAISSRAS SQEYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYYCAVWMKMGIEIYWG QGTQVTVSS (SEQ ID NO:80)

A first object of the present invention relates to a single domain antibody wherein the amino acid sequences of CDR1-IMGT, CDR2-IMGT and CDR3-IMGT have at least 90% of identity with the amino acid sequences of the CDR1-IMGT, CDR2-IMGT and CDR3-IMGT of the H12, 4P75, 4SP1, 4SNP36, 4SNP61, 5SP10, 5SP11, 5SP58, 5SNP47, 5SNP48, 5SNP65, B6, B20, B15, B5, B71, E3, A6 or G12 (hs2dAb) single domain antibody.

According to the invention a first amino acid sequence having at least 90% of identity with a second amino acid sequence means that the first sequence has 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99 or 100% of identity with the second amino acid sequence. Amino acid sequence identity is typically determined using a suitable sequence alignment algorithm and default parameters, such as BLAST P (Karlin and Altschul, 1990).

In some embodiments the single domain antibody of the present invention comprises the CDR1-IMGT, CDR2-IMGT and CDR3-IMGT of the H12, 4P75, 4SP1, 4SNP36, 4SNP61, 5SP10, 5SP11, 5SP58, 5SNP47, 5SNP48, 5SNP65, B6, B20, B15, B5, B71, E3, A6 or G12 (hs2dAb) single domain antibody.

In some embodiments, the single domain antibody of the present invention comprises a framework region FR1 having at least 90% of identity with SEQ ID NO:1.

In some embodiments, the single domain antibody of the present invention comprises a framework region FR2 having at least 90% of identity with SEQ ID NO:2.



In some embodiments, the single domain antibody of the present invention comprises a framework region FR3 having at least 90% of identity with SEQ ID NO:3.

5 In some embodiments, the single domain antibody of the present invention comprises a framework region FR4 having at least 90% of identity with SEQ ID NO:4.

In some embodiments the single domain antibody of the present invention comprises the framework regions FR1-FR4 having at least 90% of identity with SEQ ID NO:1-4  
10 respectively.

In some embodiments, the single domain antibody of the present invention comprises an amino acid sequence having at least 70% of identity with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:62-80.

15

According to the invention a first amino acid sequence having at least 70% of identity with a second amino acid sequence means that the first sequence has 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; or 99% of identity with the second amino acid sequence.

20

In some embodiments, the single domain antibody of the present invention comprises an amino acid sequence having at least 90% of identity with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:62-80.

25 In some embodiment, the single domain antibody of the present invention comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequences represented by SEQ ID NO:62-80.

In some embodiment, the single domain antibody of the present invention is fused to a  
30 heterologous polypeptide to form fusion protein. As used herein, a "fusion protein" comprises all or part (typically biologically active) of a single domain antibody of the present invention operably linked to a heterologous polypeptide (i.e., a polypeptide other than the same single domain antibody). Within the fusion protein, the term "operably linked" is intended to indicate that the polypeptide of the invention and the heterologous polypeptide are fused in-

frame to each other. The heterologous polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of the single domain antibody of the invention. In some embodiment, the heterologous polypeptide is fused to the C-terminal end of the single domain antibody of the present invention.

5

In some embodiments, the single domain antibody of the present invention and the heterologous polypeptide are fused to each other directly (i.e. without use of a linker) or via a linker. The linker is typically a linker peptide and will, according to the invention, be selected so as to allow binding of the single domain antibody to the heterologous polypeptide. Suitable linkers will be clear to the skilled person based on the disclosure herein, optionally after some limited degree of routine experimentation. Suitable linkers are described herein and may - for example and without limitation - comprise an amino acid sequence, which amino acid sequence preferably has a length of 2 or more amino acids. Typically, the linker has 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, or 30 amino acids. However, the upper limit is not critical but is chosen for reasons of convenience regarding e.g. biopharmaceutical production of such fusion proteins. The linker sequence may be a naturally occurring sequence or a non-naturally occurring sequence. If used for therapeutic purposes, the linker is preferably non-immunogenic in the subject to which the fusion protein of the present invention is administered. One useful group of linker sequences are linkers derived from the hinge region of heavy chain antibodies as described in WO 96/34103 and WO 94/04678. Other examples are poly-alanine linker sequences such as Ala-Ala-Ala. Further preferred examples of linker sequences are Gly/Ser linkers of different length including (gly4ser)<sup>3</sup>, (gly4ser)<sup>4</sup>, (gly4ser), (gly3ser), gly<sup>3</sup>, and (gly3ser)<sup>2</sup>.

In some embodiments, the single domain antibody of the invention is fused to an immunoglobulin domain. For example the fusion protein of the present invention may comprise a single domain antibody of the invention that is fused to an Fc portion (such as a human Fc). Said Fc portion may be useful for increasing the half-life and even the production of the single domain antibody of the invention. For example the Fc portion can bind to serum proteins and thus increases the half-life on the single domain antibody. In some embodiments, the at least one single domain antibody may also be fused to one or more (typically human) CH1, and/or CH2 and/or CH3 domains, optionally via a linker sequence. For instance, a single domain antibody fused to a suitable CH1 domain could for example be used - together with suitable light chains - to generate antibody fragments/structures analogous to

conventional Fab fragments or F(ab')<sub>2</sub> fragments, but in which one or (in case of an F(ab')<sub>2</sub> fragment) one or both of the conventional VH domains have been replaced by a single domain antibody of the invention. In some embodiments, one or more single domain antibodies of the invention may be fused to one or more constant domains (for example, 2 or 3 constant domains that can be used as part of/to form an Fc portion), to an Fc portion and/or to one or more antibody parts, fragments or domains that confer one or more effector functions and/or may confer the ability to bind to one or more Fc receptors. For example, for this purpose, and without being limited thereto, the one or more further amino acid sequences may comprise one or more CH<sub>2</sub> and/or CH<sub>3</sub> domains of an antibody, such as from a heavy chain antibody and more typically from a conventional human chain antibody; and/or may form an Fc region, for example from IgG (e.g. from IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> or IgG<sub>4</sub>), from IgE or from another human Ig such as IgA, IgD or IgM. For example, WO 94/04678 describes heavy chain antibodies comprising a Camelid VHH domain or a humanized derivative thereof (i.e. a single domain antibody), in which the Camelidae CH<sub>2</sub> and/or CH<sub>3</sub> domain have been replaced by human CH<sub>2</sub> and CH<sub>3</sub> domains, so as to provide an immunoglobulin that consists of 2 heavy chains each comprising a single domain antibody and human CH<sub>2</sub> and CH<sub>3</sub> domains (but no CHI domain), which immunoglobulin has the effector function provided by the CH<sub>2</sub> and CH<sub>3</sub> domains and which immunoglobulin can function without the presence of any light chains.

20

In some embodiments, the heterologous polypeptide is a single domain antibody. Accordingly, in some embodiments, the fusion protein of the present invention is a biparatopic polypeptide. As used herein, the term "biparatopic" polypeptide means a polypeptide comprising a first single domain antibody and a second single domain antibody as herein defined, wherein these two single domain antibodies are capable of binding to two different epitopes of one antigen (i.e. Rho GTPase). The biparatopic polypeptides according to the invention are composed of single domain antibodies which have different epitope specificities, and do not contain mutually complementary variable domain pairs which bind to the same epitope. They do therefore not compete with each other for binding to Rho GTPase.

30

In some embodiments, the heterologous polypeptide is a carrier polypeptide. Suitable carriers are well known in the art, and include, e.g., thyroglobulin, albumins such as human serum albumin, tetanus toxoid; Diphtheria toxoid; polyamino acids such as poly(D-lysine:D-glutamic acid); VP6 polypeptides of rotaviruses; influenza virus hemagglutinin, influenza

virus nucleoprotein; hepatitis B virus core protein, hepatitis B virus surface antigen; purified protein derivative (PPD) of tuberculin from *Mycobacterium tuberculosis*; inactivated *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A (toxin A); Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH); filamentous hemagglutinin (FHA) of *Bordetella pertussis*; T helper cell (Th) epitopes of tetanus toxoid (TT) and *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) cell wall; recombinant 10 kDa, 19 kDa and 30-32 kDa proteins from *M. leprae* or from *M. tuberculosis*, or any combination of these proteins; and the like.

In some embodiments, the heterologous polypeptide is a fluorescent polypeptide. Suitable fluorescent polypeptides include, but are not limited to, a green fluorescent protein (GFP), including, but not limited to, a “humanized” version of a GFP, e.g., wherein codons of the naturally-occurring nucleotide sequence are changed to more closely match human codon bias; a GFP derived from *Aequoria victoria* or a derivative thereof, e.g., a “humanized” derivative such as Enhanced GFP, which are available commercially, e.g., from Clontech, Inc.; a GFP from another species such as *Renilla reniformis*, *Renilla mulleri*, or *Ptilosarcus guernyi*, as described in, e.g., WO 99/49019 and Pelle et al. (2001) *J. Protein Chem.* 20:507-519; “humanized” recombinant GFP (hrGFP) (Stratagene); any of a variety of fluorescent and colored proteins from Anthozoan species, as described in, e.g., Matz et al. (1999) *Nature Biotechnol.* 17:969-973; and the like.

In some embodiments, the heterologous polypeptide is an enzyme. Typically, said enzyme may be selected from the group consisting of  $\beta$ -galactosidase, alkaline phosphatase, luciferase, and horse radish peroxidase). Where the heterologous polypeptide is an enzyme that yields a detectable product, the product can be detected using an appropriate means, e.g.,  $\beta$ -galactosidase can, depending on the substrate, yield colored product, which is detected spectrophotometrically, or a fluorescent product; luciferase can yield a luminescent product detectable with a luminometer; etc.

In some embodiments, the heterologous polypeptide is a polypeptide that facilitates purification or isolation of the fusion protein, e.g., metal ion binding polypeptides such as 6H is tags (e.g., acetylated Tat/6His), or glutathione-S-transferase.

In some embodiments, the heterologous polypeptide is a cell-penetrating peptide. The term “cell-penetrating peptides” is well known in the art and refers to cell permeable

sequences or membranous penetrating sequences such as penetratin, TAT mitochondrial penetrating sequence and compounds described in Bechara and Sagan, 2013; Jones and Sayers, 2012; Khafagy el and Morishita, 2012; and Malhi and Murthy, 2012. In a particular embodiment, the heterologous polypeptide is the Transactivator of Transcription (TAT) cell penetrating sequence originally derived from the cell-penetrating HIV tat peptide.

In some embodiments, the heterologous polypeptide is a domain of an ubiquitin ligase, such as E3 ubiquitin ligase. Examples of various E3 ubiquitin ligase domains include RING, HECT, U-box, RIBRR, F-box domain, DCAF domain, DDS2, HIF-mimetic peptides, Ikb-mimetic sequences, BTB domain, or combination thereof. These E3 ligase domains facilitate ubiquitination, and when fused with the single domain antibody of the present allows for the degradation of the antigen-antibody complex. Any E3 ligase domains including E2 binding domains known or later discovered or developed can be used. Recombinant E3 ligase domains can be used. In some embodiment, the heterologous polypeptide is a F-box domain. The F-box domain is typically a protein motif of approximately 50 amino acids. The F-box domain tethers the F-box protein to other components of the SCF complex by binding the core SCF component, Skp1.

In some embodiments, the heterologous polypeptide is a switchable domain, which can be activated by a small molecule or by photoactivation. Examples of small molecule switchable system include hormone ligand binding domain such as ERalpha LBD, Auxin AID system, HaloTag2 derivative system HyT or HALTS, FKB-FRB rapamycin or shield1 systems. Examples of photoactivation systems include Lov2 domain, PhyB-PIF, Cry2, UVR8, or Dronpa. These switchable systems are typically used for a precise spatial or temporal control of protein functions by conformational changed or relocalisation.

The single domain antibody of the present invention (fused or not to the heterologous polypeptide) is produced by any technique known in the art, such as, without limitation, any chemical, biological, genetic or enzymatic technique, either alone or in combination. For example, knowing the amino acid sequence of the desired sequence, one skilled in the art can readily produce said single domain antibody (fused or not to the heterologous polypeptide), by standard techniques for production of polypeptides. For instance, they can be synthesized using well-known solid phase method, preferably using a commercially available peptide synthesis apparatus (such as that made by Applied Biosystems, Foster City, California) and

following the manufacturer's instructions. Alternatively, the single domain antibody of the present invention (fused or not to the heterologous polypeptide) can be synthesized by recombinant DNA techniques well-known in the art. For example, the single domain of the present invention (fused or not to the heterologous polypeptide) can be obtained as DNA expression products after incorporation of DNA sequences encoding the single domain antibody (fused or not to the heterologous polypeptide) into expression vectors and introduction of such vectors into suitable eukaryotic or prokaryotic hosts that will express the desired single domain antibody, from which they can be later isolated using well-known techniques. A variety of expression vector/host systems may be utilized to contain and express the single domain antibody of the present invention (fused or not to the heterologous polypeptide). These include but are not limited to microorganisms such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid or cosmid DNA expression vectors; yeast transformed with yeast expression vectors (Giga-Hama et al., 1999); insect cell systems infected with virus expression vectors (e.g., baculovirus, see Ghosh et al., 2002); plant cell systems transfected with virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or transformed with bacterial expression vectors (e.g., Ti or pBR322 plasmid; see e.g., Babe et al., 2000); or animal cell systems. Those of skill in the art are aware of various techniques for optimizing mammalian expression of proteins, see e.g., Kaufman, 2000; Colosimo et al., 2000. Mammalian cells that are useful in recombinant protein productions include but are not limited to VERO cells, HeLa cells, Chinese hamster ovary (CHO) cell lines, COS cells (such as COS-7), W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 and 293 cells. Exemplary protocols for the recombinant expression of the peptide substrates or fusion polypeptides in bacteria, yeast and other invertebrates are known to those of skill in the art and are briefly described herein below. Mammalian host systems for the expression of recombinant proteins also are well known to those of skill in the art. Host cell strains may be chosen for a particular ability to process the expressed protein or produce certain post-translation modifications that will be useful in providing protein activity. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation and acylation. Post-translational processing which cleaves a "prepro" form of the protein may also be important for correct insertion, folding and/or function. Different host cells such as CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, and the like have specific cellular machinery and characteristic mechanisms for such post-translational activities and may be chosen to ensure the correct modification and processing of the introduced, foreign protein. In the recombinant production of the single domain antibody of

the present invention (fused or not to the heterologous polypeptide), it would be necessary to employ vectors comprising polynucleotide molecules for encoding said single domain antibody. Methods of preparing such vectors as well as producing host cells transformed with such vectors are well known to those skilled in the art. The polynucleotide molecules used in  
5 such an endeavour may be joined to a vector, which generally includes a selectable marker and an origin of replication, for propagation in a host. These elements of the expression constructs are well known to those of skill in the art. Generally, the expression vectors include DNA encoding the given protein being operably linked to suitable transcriptional or translational regulatory sequences, such as those derived from a mammalian, microbial, viral,  
10 or insect genes. Examples of regulatory sequences include transcriptional promoters, operators, or enhancers, mRNA ribosomal binding sites, and appropriate sequences which control transcription and translation. The terms "expression vector," "expression construct" or "expression cassette" are used interchangeably throughout this specification and are meant to include any type of genetic construct containing a nucleic acid coding for a gene product in  
15 which part or all of the nucleic acid encoding sequence is capable of being transcribed. The choice of a suitable expression vector for expression of single domain antibody of the present invention will of course depend upon the specific host cell to be used, and is within the skill of the ordinary artisan. Expression requires that appropriate signals be provided in the vectors, such as enhancers/promoters from both viral and mammalian sources that may be used to  
20 drive expression of the nucleic acids of interest in host cells. Usually, the nucleic acid being expressed is under transcriptional control of a promoter. Typically, the nucleotide sequences are operably linked when the regulatory sequence functionally relates to the DNA encoding the protein of interest (e.g., a single domain antibody). Thus, a promoter nucleotide sequence is operably linked to a given DNA sequence if the promoter nucleotide sequence directs the  
25 transcription of the sequence. They may then, if necessary, be purified by conventional procedures, known in themselves to those skilled in the art, for example by fractional precipitation, in particular ammonium sulphate precipitation, electrophoresis, gel filtration, affinity chromatography, etc. In particular, conventional methods for preparing and purifying recombinant proteins may be used for producing the proteins in accordance with the  
30 invention.

A further object of the present invention relates to a nucleic acid molecule which encodes for a single domain antibody of the present invention (fused or not to the heterologous polypeptide).

As used herein, the term "nucleic acid molecule" has its general meaning in the art and refers to a DNA or RNA molecule. However, the term captures sequences that include any of the known base analogues of DNA and RNA such as, but not limited to 4-acetylcytosine, 8-  
 5 hydroxy-N6-methyladenosine, aziridinylcytosine, pseudoisocytosine, 5-  
 (carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-  
 carboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-carboxymethyl-aminomethyluracil, dihydrouracil,  
 inosine, N6-isopentenyladenine, 1 -methyladenine, 1 -methylpseudouracil, 1-methylguanine,  
 1- methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine,  
 10 5- methylcytosine, N6-methyladenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-  
 methoxyamino-methyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-  
 methoxycarbonylmethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-  
 5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, oxybutoxosine, pseudouracil, queosine,  
 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, -uracil-5-  
 15 oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine,  
 and 2,6-diaminopurine.

In some embodiments, the nucleic acid molecule of the present invention is included in a suitable vector, such as a plasmid, cosmid, episome, artificial chromosome, phage or a  
 20 viral vector. So, a further object of the invention relates to a vector comprising a nucleic acid encoding for a single domain antibody of the invention (fused or not to the heterologous polypeptide). Typically, the vector is a viral vector which is an adeno-associated virus (AAV), a retrovirus, bovine papilloma virus, an adenovirus vector, a lentiviral vector, a vaccinia virus, a polyoma virus, or an infective virus. In some embodiments, the vector is an AAV vector. As  
 25 used herein, the term "AAV vector" means a vector derived from an adeno-associated virus serotype, including without limitation, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, and mutated forms thereof. AAV vectors can have one or more of the AAV wild-type genes deleted in whole or part, preferably the rep and/or cap genes, but retain functional flanking ITR sequences. Retroviruses may be chosen as gene delivery vectors due  
 30 to their ability to integrate their genes into the host genome, transferring a large amount of foreign genetic material, infecting a broad spectrum of species and cell types and for being packaged in special cell- lines. In order to construct a retroviral vector, a nucleic acid encoding a gene of interest is inserted into the viral genome in the place of certain viral sequences to produce a virus that is replication-defective. In order to produce virions, a



packaging cell line is constructed containing the gag, pol, and/or env genes but without the LTR and/or packaging components. When a recombinant plasmid containing a cDNA, together with the retroviral LTR and packaging sequences is introduced into this cell line (by calcium phosphate precipitation for example), the packaging sequence allows the RNA transcript of the recombinant plasmid to be packaged into viral particles, which are then secreted into the culture media. The media containing the recombinant retroviruses is then collected, optionally concentrated, and used for gene transfer. Retroviral vectors are able to infect a broad variety of cell types. Lentiviruses are complex retroviruses, which, in addition to the common retroviral genes gag, pol, and env, contain other genes with regulatory or structural function. The higher complexity enables the virus to modulate its life cycle, as in the course of latent infection. Some examples of lentivirus include the Human Immunodeficiency Viruses (HIV 1, HIV 2) and the Simian Immunodeficiency Virus (SIV). Lentiviral vectors have been generated by multiply attenuating the HIV virulence genes, for example, the genes env, vif, vpr, vpu and nef are deleted making the vector biologically safe. Lentiviral vectors are known in the art, see, e.g.. U.S. Pat. Nos. 6,013,516 and 5,994,136, both of which are incorporated herein by reference. In general, the vectors are plasmid-based or virus-based, and are configured to carry the essential sequences for incorporating foreign nucleic acid, for selection and for transfer of the nucleic acid into a host cell. The gag, pol and env genes of the vectors of interest also are known in the art. Thus, the relevant genes are cloned into the selected vector and then used to transform the target cell of interest. Recombinant lentivirus capable of infecting a non-dividing cell wherein a suitable host cell is transfected with two or more vectors carrying the packaging functions, namely gag, pol and env, as well as rev and tat is described in U.S. Pat. No. 5,994,136, incorporated herein by reference. This describes a first vector that can provide a nucleic acid encoding a viral gag and a pol gene and another vector that can provide a nucleic acid encoding a viral env to produce a packaging cell. Introducing a vector providing a heterologous gene into that packaging cell yields a producer cell which releases infectious viral particles carrying the foreign gene of interest. The env preferably is an amphotropic envelope protein which allows transduction of cells of human and other species. Typically, the nucleic acid molecule or the vector of the present invention include "control sequences", which refers collectively to promoter sequences, polyadenylation signals, transcription termination sequences, upstream regulatory domains, origins of replication, internal ribosome entry sites ("IRES"), enhancers, and the like, which collectively provide for the replication, transcription and translation of a coding sequence in a recipient cell. Not all of these control sequences need always be present so long

as the selected coding sequence is capable of being replicated, transcribed and translated in an appropriate host cell. Another nucleic acid sequence, is a "promoter" sequence, which is used herein in its ordinary sense to refer to a nucleotide region comprising a DNA regulatory sequence, wherein the regulatory sequence is derived from a gene which is capable of binding  
5 RNA polymerase and initiating transcription of a downstream (3'-direction) coding sequence. Transcription promoters can include "inducible promoters" (where expression of a polynucleotide sequence operably linked to the promoter is induced by an analyte, cofactor, regulatory protein, etc.), "repressible promoters" (where expression of a polynucleotide sequence operably linked to the promoter is induced by an analyte, cofactor, regulatory  
10 protein, etc.), and "constitutive promoters".

A further object of the present invention relates to a host cell transformed with the nucleic acid molecule of the present invention. The term "transformation" means the introduction of a "foreign" (i.e. extrinsic or extracellular) gene, DNA or RNA sequence to a  
15 host cell, so that the host cell will express the introduced gene or sequence to produce a desired substance, typically a protein or enzyme coded by the introduced gene or sequence. A host cell that receives and expresses introduced DNA or RNA has been "transformed". For instance, as disclosed above, for expressing and producing the single domain antibody of the present invention, prokaryotic cells and, in particular *E. coli* cells, will be chosen. Actually,  
20 according to the invention, it is not mandatory to produce the single domain antibodies of the present invention in a eukaryotic context that will favour post-translational modifications (e.g. glycosylation). Typically, the host cell may be suitable for producing the single domain antibody of the present invention (fused or not to the heterologous polypeptide) as described above. In some cases, the host cell is used as a research tool, to study e.g. the impact of the  
25 Rho GTPase activation or inactivation (e.g. functional knockdown) in a cell of interest as described in the EXAMPLE. In some embodiments, the host cells is isolated from a mammalian subject who is selected from a group consisting of: a human, a horse, a dog, a cat, a mouse, a rat, a cow and a sheep. In some embodiments, the host cell is a human cell. In some embodiments, the host cell is a cell in culture. The cells may be obtained directly from a  
30 mammal (preferably human), or from a commercial source, or from tissue, or in the form for instance of cultured cells, prepared on site or purchased from a commercial cell source and the like. The cells may come from any organ including but not limited to the blood or lymph system, from muscles, any organ, gland, the skin, brain, lung... In some embodiments, the cells are selected from the group consisting of epithelial cells, neural cells, epidermal cells,

keratinocytes, hematopoietic cells, melanocytes, chondrocytes, hepatocytes, B-cells, T-cells, erythrocytes, macrophages, monocytes, fibroblasts, muscle cells, vascular smooth muscle cells, hepatocytes, splenocytes, pancreatic  $\beta$  cells... In some embodiments, the host cell is a cancer cell. Typically, the cancer cells are isolated from a cancer selected from the group consisting of breast cancer, prostate cancer, lymphoma, skin cancer, pancreatic cancer, colon cancer, melanoma, malignant melanoma, ovarian cancer, brain cancer, primary brain carcinoma, head-neck cancer, glioma, glioblastoma, liver cancer, bladder cancer, non-small cell lung cancer, head or neck carcinoma, breast carcinoma, ovarian carcinoma, lung carcinoma, small-cell lung carcinoma, Wilms' tumor, cervical carcinoma, testicular carcinoma, bladder carcinoma, pancreatic carcinoma, stomach carcinoma, colon carcinoma, prostatic carcinoma, genitourinary carcinoma, thyroid carcinoma, esophageal carcinoma, myeloma, multiple myeloma, adrenal carcinoma, renal cell carcinoma, endometrial carcinoma, adrenal cortex carcinoma, malignant pancreatic insulinoma, malignant carcinoid carcinoma, choriocarcinoma, mycosis fungoides, malignant hypercalcemia, cervical hyperplasia, leukemia, acute lymphocytic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, chronic granulocytic leukemia, acute granulocytic leukemia, acute myelogenous leukemia, chronic myelogenous leukemia, hairy cell leukemia, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, Kaposi's sarcoma, polycythemia vera, essential thrombocytosis, Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphoma, soft-tissue sarcoma, osteogenic sarcoma, primary macroglobulinemia, and retinoblastoma. In some embodiment, the host cells is a stem cell. As used herein, the term "stem cell" refers to an undifferentiated cell that can be induced to proliferate. The stem cell is capable of self-maintenance or self-renewal, meaning that with each cell division, one daughter cell will also be a stem cell. Stem cells can be obtained from embryonic, post-natal, juvenile, or adult tissue. Stem cells can be pluripotent or multipotent. The term "progenitor cell," as used herein, refers to an undifferentiated cell derived from a stem cell, and is not itself a stem cell. Some progenitor cells can produce progeny that are capable of differentiating into more than one cell type. Stem cells include pluripotent stem cells, which can form cells of any of the body's tissue lineages: mesoderm, endoderm and ectoderm. Therefore, for example, stem cells can be selected from a human embryonic stem (ES) cell; a human inner cell mass (ICM)/epiblast cell; a human primitive ectoderm cell, a human primitive endoderm cell; a human primitive mesoderm cell; and a human primordial germ (EG) cell. Stem cells also include multipotent stem cells, which can form multiple cell lineages that constitute an entire tissue or tissues, such as but not limited to hematopoietic stem cells or neural precursor cells. Stem cells also include totipotent stem cells, which can

form an entire organism. In some embodiment, the stem cell is a mesenchymal stem cell. The term "mesenchymal stem cell" or "MSC" is used interchangeably for adult cells which are not terminally differentiated, which can divide to yield cells that are either stem cells, or which, irreversibly differentiate to give rise to cells of a mesenchymal cell lineage, e.g., adipose, osseous, cartilaginous, elastic and fibrous connective tissues, myoblasts) as well as to tissues other than those originating in the embryonic mesoderm (e.g., neural cells) depending upon various influences from bioactive factors such as cytokines. In some embodiments, the stem cell is a partially differentiated or differentiating cell. In some embodiments, the stem cell is an induced pluripotent stem cell (iPSC), which has been reprogrammed or de-differentiated. Stem cells can be obtained from embryonic, fetal or adult tissues.

The single domain antibody of the present invention (fused or not to the heterologous polypeptide) may be used in the research and diagnostic field. For instance, the single domain antibody of the invention is thus particularly suitable for detecting the presence of an activated form of a Rho GTPase, said detection may find usefulness for research or diagnostic purpose.

Thus, a further aspect of the present invention, there is provided a method of detecting the presence of a least one activated form of a Rho GTPase (e.g. RhoA, RhoB, and/or RhoC) comprising the steps of i) a) obtaining a sample from a subject, ii) contacting, in vitro, the sample with a single domain antibody of the present invention (fused or not to the heterologous polypeptide), iii) detecting the binding of said single domain antibody to said sample, and iv) comparing the binding detected in step (iii) with a standard, wherein a difference in binding relative to said sample indicated the presence of the activated form of the Rho GTPase. Typically, the detection is performed with any suitable means such as a microscope or an automated analysis system.

As used herein the term "sample" encompasses a variety of sample types obtained from a subject and can be used in a diagnostic or research assay. Biological samples include but are not limited to blood and other liquid samples of biological origin, solid tissue samples such as a biopsy specimen or tissue cultures or cells derived therefrom, and the progeny thereof. In some embodiments, the sample is a tumor tissue sample. The term "tumor sample" means any tissue sample derived from the tumor of the subject. The tissue sample is obtained for the purpose of the in vitro evaluation and typically results from biopsy performed in a tumor of the subject. The sample can be fresh, frozen, or embedded (e.g., FFPE biopsy).

Accordingly, in some embodiments, the single domain antibody of the present invention (fused or not to the heterologous polypeptide) is conjugated with a detectable label. Suitable detectable labels include, for example, a radioisotope, a fluorescent label, a chemiluminescent label, an enzyme label, a bio luminescent label or colloidal gold. Methods of making and detecting such detectably-labeled immunoconjugates are well-known to those of ordinary skill in the art, and are described in more detail below. For instance, the detectable label can be a radioisotope that is detected by autoradiography. Isotopes that are particularly useful for the purpose of the present invention are  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  and  $^{14}\text{C}$ . The single domain antibody of the present invention (fused or not to the heterologous polypeptide) can also be labeled with a fluorescent compound. The presence of a fluorescently-labeled single domain antibody of the present invention is determined by exposing the immuno conjugate to light of the proper wavelength and detecting the resultant fluorescence. Fluorescent labeling compounds include fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerytherin, phycocyanin, allophycocyanin, o-phthaldehyde and fluorescamine and Alexa Fluor dyes. Alternatively, the single domain antibody of the present invention can be detectably labeled by coupling said single domain antibody to a chemiluminescent compound. The presence of the chemiluminescent-tagged immuno conjugate is determined by detecting the presence of luminescence that arises during the course of a chemical reaction. Examples of chemiluminescent labeling compounds include luminol, isoluminol, an aromatic acridinium ester, an imidazole, an acridinium salt and an oxalate ester. Similarly, a bio luminescent compound can be used to label the single domain antibody of the present invention. Bioluminescence is a type of chemiluminescence found in biological systems in which a catalytic protein increases the efficiency of the chemiluminescent reaction. The presence of a bioluminescent protein is determined by detecting the presence of luminescence. Bioluminescent compounds that are useful for labeling include luciferin, luciferase and aequorin. Typically, when the single domain antibody is fused to a fluorescent polypeptide as described above, the presence of the fusion protein can be detected with any means well known in the art such as a microscope or microscope or automated analysis system. Typically, when the single domain antibody is fused to an enzyme then, the fusion protein is incubated in the presence of the appropriate substrate, the enzyme moiety reacts with the substrate to produce a chemical moiety which can be detected, for example, by spectrophotometric, fluorometric or visual means. Examples of enzymes that can be used to detectably label polyspecific immunoconjugates include  $\beta$ -galactosidase, glucose oxidase, peroxidase and

alkaline phosphatase. Those of skill in the art will know of other suitable labels which can be employed in accordance with the present invention. The binding of marker moieties to anti-  
the single domain antibody of the present invention is accomplished using standard  
techniques known to the art. Typical methodology in this regard is described by Kennedy et  
5 al., *Clin. Chim. Acta* 70: 1, 1976; Schurs et al., *Clin. Chim. Acta* 81 : 1, 1977; Shih et al.,  
*Int'U. Cancer* 46: 1101, 1990; Stein et al, *Cancer Res.* 50: 1330, 1990; and Coligan, *supra*.  
Moreover, the convenience and versatility of immunochemical detection can be enhanced by  
using single domain antibodies of the present invention (fused or not to the heterologous  
polypeptide) that have been conjugated with avidin, streptavidin, and biotin. {See, e.g.,  
10 Wilchek et al. (eds.), "Avidin-Biotin Technology," *Methods In Enzymology* (Vol. 184)  
(Academic Press 1990); Bayer et al., "Immunochemical Applications of Avidin-Biotin  
Technology," in *Methods In Molecular Biology* (Vol. 10) 149- 162 (Manson, ed., The  
Humana Press, Inc. 1992).) In some embodiments, the presence of the single domain antibody  
(fused or not to the heterologous polypeptide) is detected with a secondary antibody that is  
15 specific for the single antibody of the present invention (fused or not to the heterologous  
polypeptide). Typically said secondary is labeled by same methods as described above. For  
instance when the single domain antibody of the present invention is fused to a tag (e.g.  
histidine tag) the secondary antibody is specific for said tag. Methods for performing  
immunoassays are well-established. {See, e.g., Cook and Self, "Monoclonal Antibodies in  
20 Diagnostic Immunoassays," in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical  
Application* 180-208 (Ritter and Ladyman, eds., Cambridge University Press 1995); Perry,  
"The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology," in  
*Monoclonal Antibodies: Principles and Applications* 107-120 (Birch and Lennox, eds.,  
Wiley-Liss, Inc. 1995); Diamandis, *Immunoassay* (Academic Press, Inc. 1996).)

25

The single domain antibody of the present invention (fused or not to the heterologous  
polypeptide) and nucleic acid molecules encoding thereof can be used as medicament. In  
particular, the nucleic acid molecules of the present invention (inserted or not into a vector)  
are particularly suitable for gene therapy.

30

In some embodiments, the single domain antibody and nucleic acid molecules of the  
present invention (inserted or not into a vector) are particularly suitable for the treatment of  
cancer. As used herein, the term "cancer" has its general meaning in the art and includes, but  
is not limited to, solid tumors and blood borne tumors. The term cancer includes diseases of

the skin, tissues, organs, bone, cartilage, blood and vessels. The term "cancer" further encompasses both primary and metastatic cancers. Examples of cancers that may be treated by methods and compositions of the invention include, but are not limited to, cancer cells from the bladder, blood, bone, bone marrow, brain, breast, colon, oesophagus, gastrointestinal, gum, head, kidney, liver, lung, nasopharynx, neck, ovary, prostate, skin, stomach, testis, tongue, or uterus. In addition, the cancer may specifically be of the following histological type, though it is not limited to these: neoplasm, malignant; carcinoma; carcinoma, undifferentiated; giant and spindle cell carcinoma; small cell carcinoma; papillary carcinoma; squamous cell carcinoma; lymphoepithelial carcinoma; basal cell carcinoma; pilomatrix carcinoma; transitional cell carcinoma; papillary transitional cell carcinoma; adenocarcinoma; gastrinoma, malignant; cholangiocarcinoma; hepatocellular carcinoma; combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma; trabecular adenocarcinoma; adenoid cystic carcinoma; adenocarcinoma in adenomatous polyp; adenocarcinoma, familial polyposis coli; solid carcinoma; carcinoid tumor, malignant; branchiolo-alveolar adenocarcinoma; papillary adenocarcinoma; chromophobe carcinoma; acidophil carcinoma; oxyphilic adenocarcinoma; basophil carcinoma; clear cell adenocarcinoma; granular cell carcinoma; follicular adenocarcinoma; papillary and follicular adenocarcinoma; nonencapsulating sclerosing carcinoma; adrenal cortical carcinoma; endometrioid carcinoma; skin appendage carcinoma; apocrine adenocarcinoma; sebaceous adenocarcinoma; ceruminous; adenocarcinoma; mucoepidermoid carcinoma; cystadenocarcinoma; papillary cystadenocarcinoma; papillary serous cystadenocarcinoma; mucinous cystadenocarcinoma; mucinous adenocarcinoma; signet ring cell carcinoma; infiltrating duct carcinoma; medullary carcinoma; lobular carcinoma; inflammatory carcinoma; paget's disease, mammary; acinar cell carcinoma; adenosquamous carcinoma; adenocarcinoma w/squamous metaplasia; thymoma, malignant; ovarian stromal tumor, malignant; thecoma, malignant; granulosa cell tumor, malignant; androblastoma, malignant; Sertoli cell carcinoma; Leydig cell tumor, malignant; lipid cell tumor, malignant; paraganglioma, malignant; extra-mammary paraganglioma, malignant; pheochromocytoma; glomangiosarcoma; malignant melanoma; amelanotic melanoma; superficial spreading melanoma; malignant melanoma in giant pigmented nevus; epithelioid cell melanoma; blue nevus, malignant; sarcoma; fibrosarcoma; fibrous histiocytoma, malignant; myxosarcoma; liposarcoma; leiomyosarcoma; rhabdomyosarcoma; embryonal rhabdomyosarcoma; alveolar rhabdomyosarcoma; stromal sarcoma; mixed tumor, malignant; Mullerian mixed tumor; nephroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenchymoma, malignant; Brenner tumor, malignant; phyllodes tumor, malignant; synovial sarcoma;

mesothelioma, malignant; dysgerminoma; embryonal carcinoma; teratoma, malignant; struma ovarii, malignant; choriocarcinoma; mesonephroma, malignant; hemangiosarcoma; hemangioendothelioma, malignant; kaposi's sarcoma; hemangiopericytoma, malignant; lymphangiosarcoma; osteosarcoma; juxtacortical osteosarcoma; chondrosarcoma; chondroblastoma, malignant; mesenchymal chondrosarcoma; giant cell tumor of bone; ewing's sarcoma; odontogenic tumor, malignant; ameloblastic odontosarcoma; ameloblastoma, malignant; ameloblastic fibrosarcoma; pinealoma, malignant; chordoma; glioma, malignant; ependymoma; astrocytoma; protoplasmic astrocytoma; fibrillary astrocytoma; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; primitive neuroectodermal; cerebellar sarcoma; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; olfactory neurogenic tumor; meningioma, malignant; neurofibrosarcoma; neurilemmoma, malignant; granular cell tumor, malignant; malignant lymphoma; Hodgkin's disease; Hodgkin's lymphoma; paragranuloma; malignant lymphoma, small lymphocytic; malignant lymphoma, large cell, diffuse; malignant lymphoma, follicular; mycosis fungoides; other specified non-Hodgkin's lymphomas; malignant histiocytosis; multiple myeloma; mast cell sarcoma; immunoproliferative small intestinal disease; leukemia; lymphoid leukemia; plasma cell leukemia; erythroleukemia; lymphosarcoma cell leukemia; myeloid leukemia; basophilic leukemia; eosinophilic leukemia; monocytic leukemia; mast cell leukemia; megakaryoblastic leukemia; myeloid sarcoma; and hairy cell leukemia.

20

Accordingly a further object of the present invention relates to a method for treating cancer in a subject in need thereof comprising administering the subject with a therapeutically effective amount of a single domain antibody of the present invention (fused or not to the heterologous polypeptide) or a nucleic acid molecule of the present invention which is inserted or not in to a vector as above described.

25

As used herein, the term "treatment" or "treat" refer to both prophylactic or preventive treatment as well as curative or disease modifying treatment, including treatment of patient at risk of contracting the disease or suspected to have contracted the disease as well as patients who are ill or have been diagnosed as suffering from a disease or medical condition, and includes suppression of clinical relapse. The treatment may be administered to a subject having a medical disorder or who ultimately may acquire the disorder, in order to prevent, cure, delay the onset of, reduce the severity of, or ameliorate one or more symptoms of a disorder or recurring disorder, or in order to prolong the survival of a subject beyond that

30



expected in the absence of such treatment. By a "therapeutically effective amount" is meant a sufficient amount of the single domain antibody or the nucleic acid molecule of the present invention thereof for the treatment of the disease at a reasonable benefit/risk ratio applicable to any medical treatment. It will be understood that the total daily usage of the active agent will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment. The specific therapeutically effective dose level for any particular subject will depend upon a variety of factors including the age, body weight, general health, sex and diet of the subject; the time of administration, route of administration, and rate of excretion of the specific compound employed; the duration of the treatment; drugs used in combination or coincidental with the specific polypeptide employed; and like factors well known in the medical arts. For example, it is well known within the skill of the art to start doses of the compound at levels lower than those required to achieve the desired therapeutic effect and to gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. However, the daily dosage of the products may be varied over a wide range from 0.01 to 1,000 mg per adult per day. Typically, the compositions contain 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 and 500 mg of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the subject to be treated. A medicament typically contains from about 0.01 mg to about 500 mg of the active ingredient, preferably from 1 mg to about 100 mg of the active ingredient. An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level from 0.0002 mg/kg to about 20 mg/kg of body weight per day, especially from about 0.001 mg/kg to 7 mg/kg of body weight per day.

According to the invention, the single domain antibody (fused or not to the heterologous polypeptide) or the nucleic acid molecule (inserted or not into a vector) of the present invention is administered to the subject in the form of a pharmaceutical composition. Typically, the single domain antibody or the nucleic acid molecule (inserted or not into a vector) of the present invention may be combined with pharmaceutically acceptable excipients, and optionally sustained-release matrices, such as biodegradable polymers, to form pharmaceutical compositions. "Pharmaceutically" or "pharmaceutically acceptable" refer to molecular entities and compositions that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to a mammal, especially a human, as appropriate. A pharmaceutically acceptable carrier or excipient refers to a non-toxic solid, semi-solid or liquid filler, diluent, encapsulating material or formulation auxiliary of any type. In the pharmaceutical compositions of the present invention for oral, sublingual, subcutaneous,

intramuscular, intravenous, transdermal, local or rectal administration, the active principle, alone or in combination with another active principle, can be administered in a unit administration form, as a mixture with conventional pharmaceutical supports, to animals and human beings. Suitable unit administration forms comprise oral-route forms such as tablets, gel capsules, powders, granules and oral suspensions or solutions, sublingual and buccal administration forms, aerosols, implants, subcutaneous, transdermal, topical, intraperitoneal, intramuscular, intravenous, subdermal, transdermal, intrathecal and intranasal administration forms and rectal administration forms. Typically, the pharmaceutical compositions contain vehicles which are pharmaceutically acceptable for a formulation capable of being injected.

5 These may be in particular isotonic, sterile, saline solutions (monosodium or disodium phosphate, sodium, potassium, calcium or magnesium chloride and the like or mixtures of such salts), or dry, especially freeze-dried compositions which upon addition, depending on the case, of sterilized water or physiological saline, permit the constitution of injectable solutions. The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions; formulations including sesame oil, peanut oil or aqueous propylene glycol; and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases, the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and

10 fungi. Solutions comprising compounds of the invention as free base or pharmacologically acceptable salts can be prepared in water suitably mixed with a surfactant, such as hydroxypropylcellulose. Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms. The single

15 domain antibody or the nucleic acid molecule (inserted or not into a vector) of the present invention can be formulated into a composition in a neutral or salt form. Pharmaceutically acceptable salts include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts

20 formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like. The carrier can also be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable

25 30

mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminium monostearate and gelatin. Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with several of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the typical methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof. The preparation of more, or highly concentrated solutions for direct injection is also contemplated, where the use of DMSO as solvent is envisioned to result in extremely rapid penetration, delivering high concentrations of the active agents to a small tumor area. Upon formulation, solutions will be administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is therapeutically effective. The formulations are easily administered in a variety of dosage forms, such as the type of injectable solutions described above, but drug release capsules and the like can also be employed. For parenteral administration in an aqueous solution, for example, the solution should be suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration. In this connection, sterile aqueous media which can be employed will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

5 **FIGURES:**

**Figure 1: The H12 hs2dAb is selective for Rho in its active conformation.** (A) H12 is a conformational hs2dAb binding only to the GTP bound, activated state of RhoA GTPase. ELISA revealing recombinant GST-RhoA wild type loaded with either 100 $\mu$ M GTP gamma S (Black)) or 1mM GDP (White), or a purified GST fusion of a RhoA constitutively active mutant Q63L (Check). (B) A CBD tagged H12 pull down from HeLa cell extract loaded with 100 $\mu$ M GTP gamma S (GTP) or with 1mM GDP as inputs. Western blot reveals RhoA at similar level in 5% of both input but only on the GTP loaded extract in the CBD-H12 pull down. D5 anti tubulin was a used as negative control and the standard GST-RBD (Rho binding domain of Rhotekin) as a positive control of active Rho pull down. (C) immunofluorescence on HeLa cells overexpressing GFP-RhoAT19N inactive mutant or GFPRhoAQ63L. H12 staining detected using a myc tag antibody revealed only cells overexpressing the constitutively active mutant with a pattern similar to the GFP fluorescence.

20

**Figure 2: The H12 hs2dAb is able to perturb endogenous Rho activity when expressed in the cytosol.** HeLa cells transfected with a control non relevant hs2dAb or the clone H12 anti Rho-GTP expressed as GFP fusion. Cells were fixed 20h hours post transfection and stained with DAPI and Alexa 594 phalloidin to label actin stress fibers.

25

**Figure 3: Direct selection of intrabodies by visual screen of fluorescent protein knock down** (A). Scheme for F-Ib degradation by fusing Fbox domain to hs2dAb. F-hs2dAb binds a target protein and interacts with Skip1 via the Fbox domain which is a component of the Skip1-Cullin1-Fbox (SCF) complex, an E3 ubiquitin-protein ligase. SCF is recruited and leads to the proteasome dependent degradation of the target protein. (B) Strategy of the direct intrabodies screen. The sub-library of the 4th round of phage display was sub-cloned into the p-F-Ib-IRES-Mito-mGFP plasmid. These constructions were then transfected in a stable cell line expressing H2B-mCherry-RhoBL63deltaCAAX mutant and several hundred of clones were screened. The mCherry fluorescence intensity was monitored on an inverted

30

microscope: if an intrabody is able to interact specifically with RhoB (F-H12, F-B6, F-B15 and F-B5), the Fbox domain will recruit the SCF complex, the H2B-mCherry-RhoB construction will be degraded by the proteasome 26S and consequently a decrease of the mCherry fluorescence in the nucleus will be visualized. If there is no interaction (F-NR and F-B20) or no transfection, the nuclear fluorescence will be intact.

**Figure 4: Characterization of selected F-Ib.** (A) mCherry fluorescence quantification by flow cytometry in Hm and HmB cell lines. After 48h of F-Ib transfection in the Hm and the HmB cell lines, the mCherry fluorescence was quantified in the transfected subpopulation and in the non transfected subpopulation for each F-Ib. The ratio of each median of fluorescence (transfected versus non transfected population) gives a percentage of mCherry fluorescence intensity for one F-Ib. (B) Fbox domain is responsible of RhoB degradation in HmB cell line. F-hs2dAb and hs2dAb were transfected in HmB cell line. The median of mCherry fluorescence was determined by flow cytometry as in (A). A decrease of mCherry fluorescence is only observed with the F-Ib whereas the hs2dAb alone are not able to induce such decay. (C) Degradation in HmB cell line is proteasome dependent. HmB cells were transfected with F-Ib and treated 36h with 1  $\mu$ M of MG132 (a proteasome inhibitor) or DMSO. MG132 treatment restores the fluorescence level nearly to the control level. Medians of fluorescence are normalized to the NR control. (D) F-H12 and F-B5 degrade Rac1 mutant. After 48h of F-Ib transfection, the mCherry fluorescence was quantified by flow cytometry in Hm, HmB and H2B-mCherry-Rac1L63 cell lines as describe in (A) and median of fluorescence for each cell line was normalized to the NR control. F-H12 and F-B5 induce a significant decrease of mCherry fluorescence in Rac1L63 cell line compared to the other F-Ib. (E) All RhoB positive F-Ib are conformational sensitive, selective towards the active mutant RhoBL63. As describe above, the mCherry fluorescence was quantified by flow cytometry after F-Ib transfection in Hm, HmB and H2B-mCherry-RhoBN19 cell lines and median of fluorescence for each cell line was normalized to the NR control. No significant decrease in mCherry fluorescence was observed in RhoBN19 cell line compared to the control cell line Hm for each F-Ib.

30

**Figure 5: Endogenous RhoB cellular activation knockdown.** (A) HeLa S3 cells were transfected 48h with F-Ib plasmids. A GST-RBD pulldown was performed for each F-Ib to control Rho-GTP level (lines RhoB-GTP, RhoA-GTP and RhoC-GTP) and the total level of Rho proteins was revealed by loading 2% of input (lines total RhoB, total RhoA and total

RhoC). F-Ib production is shown with myc tag revelation and tubulin is the loading control. (B) Quantification of three independent GST-RBD pulldown experiments. F-B6 seems to degrade more selectively RhoB-GTP than RhoA or RhoC. F-H12 and F-B15 are pan Rho binders. Relative activity was calculated as the ratio between GTP level to input level  
 5 normalized to tubulin. Normalized means  $\pm$  SEM are shown. (C) RhoB activation kinetic after an EGF treatment. HeLa S3 cells were transfected with F-NR control 48h including 24h of serum starvation. At 48h of transfection, cells were treated at an EGF concentration of 50 ng.mL<sup>-1</sup> for indicated times. A GST-RBD pulldown was performed to monitor the Rho-GTP induction following this treatment. RhoB is activated within 5 min until 30 min and a second  
 10 wave of activation is shown at 120 min. RhoA and RhoC are activated only between 5 and 30 min with a maximum at 5 min. (C, D, E) After 15 min of EGF treatment and 48h of cells transfection by F-Ib, RhoB-GTP (B), RhoA-GTP (C) and RhoC-GTP (D) levels were checked. F-H12 and F-B6 are able to inhibit RhoB activation following an EGF treatment compared to the negative control. F-H12 inhibits partially RhoA activation (50 %) and nearly  
 15 decreases RhoC-GTP level to the basal level (without treatment) under EGF treatment whereas F-B6 has no inhibitory effect after EGF treatment on these two RhoGTPases activation. Quantification is shown with normalized means  $\pm$  SEM.

## EXAMPLES:

20

### Example 1: selection of conformation-sensitive antibodies

One of the main advantages of full *in vitro* immunization using display technologies is the control of antigen conformation and concentration in order to drive selection towards the desired outcome. For example, selection schemes can be devised to improve the  
 25 recovery of high affinity binders endowed with low off-rate kinetics, to target specific epitopes, or to identify conformation sensitive-binders. Recombinant antibody fragment library screening have for example provided several binders targeting selectively the active conformation of small GTPase. We hypothesized that our synthetic library (described in PCT/EP2014/073713) had enough diversity and functionality to enable the identification of  
 30 selective conformational binders. We carried out subtractive panning to select conformation-specific antibodies directed against small GTPases from the Rho subfamily. Small GTPases are molecular switch that cycle between an inactive and an active state when bound to GDP or GTP nucleotides respectively. Mutant of small GTPases can be designed that adopt stably an active or inactive conformation. A constitutively active mutant (e.g. RhoA

Q63L, RhoB Q63L or RhoC Q63L) was expressed in HEK293 as bait then freshly pulled down for panning to preserve its native conformation. To enrich in phage specific for GTP-bound RhoA, a depletion step was introduced from the second round of panning using GDP-bound RhoA proteins, to remove generic binders before selecting against the active mutant. After four rounds of selection, clones were analyzed using phage ELISA against either the Rho GTPase bound to GTP $\gamma$ S (a non-hydrolysable analogue of GTP)-loaded Rho GTPase or GDP-loaded Rho GTPase. The basic features of the selected single domain antibodies are depicted in Table 1:

10 **Table 1: basic features of the selected single domain antibodies: (ND = non determined)**

Name	ELISA	IF	IP	IB		Kon (10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup> .sec-1)	Koff (10 <sup>-3</sup> sec-1)	Kd (nM)
					(2SHA)			
H12	X	X	X	X	RhoA Q63L	4.81+5	1.28-4	<b>2.65-10= 0.265nM</b>
					RhoB Q63L	2.24+5	3.59-4	<b>1.57-9= 1.57nM</b>
					RhoC Q63L	1.12+6	5.41-5	<b>4.79-11= 0.0479nM</b>
					RhoA T19N	négatif	négatif	<b>négatif</b>
					Rac Q61L	7.53+5	2.55-4	<b>3.3-10= 0,33nM</b>
4P75	X	X	ND	ND	RhoA Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoB Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoC Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoA T19N	ND	ND	<b>ND</b>

					Rac Q61L	ND	ND	<b>ND</b>
4SP1	X	X	X	X	RhoA Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoB Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoC Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoA T19N	ND	ND	<b>ND</b>
					Rac Q61L	ND	ND	<b>ND</b>
4SNP36	X	0	X	X	RhoA Q63L	1.76+6	5.22-4	<b>2.96-10=0.296nM</b>
					RhoB Q63L	2.99+6	8.34-4	<b>2.78-10=0.278nM</b>
					RhoC Q63L	6.52+6	5.42-4	<b>8.31-11=0.0831nM</b>
					RhoA T19N	ND	ND	<b>ND</b>
					Rac Q61L	ND	ND	<b>ND</b>
4SNP61	X	0	X	X	RhoA Q63L	1.10+6	0,0013	1.21-9=1.21nM
					RhoB Q63L	7.22+5	0,0033	4.68-9=4.68nM
					RhoC Q63L	8.75+5	0,0046	5.30-9=5.30nM
					RhoA T19N	ND	ND	<b>ND</b>



					Rac Q61L	ND	ND	<b>ND</b>
5SP10	X	0	X	X	RhoA Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoB Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoC Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoA T19N	ND	ND	<b>ND</b>
					Rac Q61L	ND	ND	<b>ND</b>
5SP11	X	0	X	X	RhoA Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoB Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoC Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoA T19N	ND	ND	<b>ND</b>
					Rac Q61L	ND	ND	<b>ND</b>
5SP58	X	0	X	X	RhoA Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoB Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoC Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoA T19N	ND	ND	<b>ND</b>

					Rac Q61L	ND	ND	<b>ND</b>
5SNP47	X	0	X	X	RhoA Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoB Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoC Q63L	ND	ND	<b>ND</b>
					RhoA T19N	ND	ND	<b>ND</b>
					Rac Q61L	ND	ND	<b>ND</b>
5SNP48	X	0	X	X	RhoA Q63L	8.14+5	6.86-4	8.4210= 0.84nM
					RhoB Q63L	4.62+5	0,0024	5.21-9= 5.21nM
					RhoC Q63L	1.72+6	9.01-4	5.24-10= 0.524nM
					RhoA T19N	négatif	négatif	négatif
					Rac Q61L	ND	ND	ND
5SNP65	X	0	X	X	RhoA Q63L	8.70+5	5.22-4	6.00-10= 0.600nM
					RhoB Q63L	2.53+5	5.99-4	2.36-9= 2.36nM
					RhoC Q63L	1.71+6	0,001	6.08-10= 0.608nM
					RhoA T19N	négatif	négatif	négatif

					Rac Q61L	ND	ND	ND
B6	ND	X	X	X	RhoA Q63L	1,05	0,8	1,3125 nM
					RhoB Q63L	1,1	1,55	0,70969 nM
					RhoC Q63L	1,45	0,625	2,32 nM

### Example 2: functional characterization of the H12 antibody:

The clone H12 was further analyzed by ELISA, using in this case the soluble form of the antibody, on several purified Rho proteins expressed as GST fusion in *E.coli*.

5 We showed that the H12 hs2dAb efficiently bound to the constitutively active mutant RhoA<sub>L63</sub> as well as to wild type RhoA loaded with GTP $\gamma$ S. In contrast, no binding was observed to the inactive RhoA<sub>N19</sub> mutant or to GDP-loaded wild type RhoA (Figure 1A). We then tested whether H12 was able to specifically pull-down GTP-loaded RhoA from mammalian cell extracts. A CBD tagged H12 construct expressed in *E. coli* was

10 immobilized on chitin beads and incubated with a HeLa cell extract pre-treated with either GTP $\gamma$ S or GDP. The Rho binding domain of Rhotekin fused to GST (GST-RBD) was used as a control. This domain is known to bind to the active conformation of Rho GTPase and is the standard method to assay Rho activity up to now. The H12 hs2dAb was found to be highly selective of Rho loaded with GTP $\gamma$ S, giving no signal on the GDP loaded

15 extract (Figure 1B). We next tested whether H12 specifically detected RhoA active conformation in immunofluorescence. HeLa cells expressing the GFP-RhoA<sub>L63</sub> active mutant or the inactive GFP-RhoA<sub>N19</sub> were fixed and stained with the H12 hs2dAb. Overexpression of the inactive mutant GFP-RhoA<sub>N19</sub>, which has no dominant negative effect on RhoA pathway nor on cell shape, did not lead to an increased signal over the

20 background of untransfected cells. In contrast, a strong staining was selectively obtained on cells expressing the GFP-RhoA<sub>L63</sub> active mutant. Note that these cells display bundled actin stress fibers, a characteristic phenotype linked to enhanced RhoA activity (Figure 1B). Altogether these results showed that the H12 hs2dAb is selective for Rho in its active conformation.

Furthermore our results suggest that the H12 antibody was able to perturb endogenous Rho activity when expressed in the cytosol. First, we co-expressed H12-GFP in HeLa cells together with either the RhoA<sub>N19</sub> inactive mutant or with the RhoA<sub>L63</sub> constitutively active one and carried out a co-immunoprecipitation experiment using an anti-GFP monoclonal antibody. Active RhoA was co-immunoprecipitated with H12-GFP while inactive RhoA was not. This showed that H12 worked as an intrabody and kept its conformation sensitivity in the cytosol. Because Rho GTPases are involved in signaling pathways that promotes the actin cytoskeleton polymerization we looked at functional effects induced by H12 overexpression. In contrast to untransfected cells or cells transfected with various non-relevant GFP fused hs2dAb, we observed that cells expressing H12-GFP were totally devoid of actin stress fibers (Figure 2). This alteration in actin filament organization was associated with marked changes in cell shape characteristic of loss of intracellular mechanical forces and tension (Figure 2). As RhoA plays a major role in activating myosin II and actin cytoskeleton reorganization, our results suggested that H12 efficiently perturbed Rho-dependent signaling, mimicking the effects induced by the C3 exoenzyme Rho inhibitor.

### **Example 3: Functionalization conformational intrabodies to target RhoB activity**

*Direct selection of intrabodies by visual screen of fluorescent protein knock down*

In the goal of interfering with RhoB activity in cells using intrabodies, we established a strategy starting with a phage display selection then followed by in-cell screening aiming at the identification of a functional inhibitory intrabody. In the past decade we established sophisticated phage display selection scheme in order to isolate binders discriminating the GTP conformation of Rho proteins. To preserve the native conformation of RhoB during the selection, bait antigens were expressed in mammalian cells and freshly extracted and used in the nanomolar range during the incubation with the NaLi-H1 library phages. A competitive panning selection was carried out using a constitutively active mutant RhoBL63 after a preclearing step in the presence of an excess of GDP loaded wild type RhoB to enrich in binders more selective towards RhoB than its closest homologs. After two round of enrichment, we added a 5 molar excess of RhoAL63 and RhoCL63 to further compete with the bait. After controlling positive enrichment of binding phages to a bacterially expressed and purified GTS-RhoBL63 in phage ELISA, we wanted to develop a direct screening for RhoB intrabodies. We

learned from our previous experiences in recombinant antibody technologies that such monoclonal binding domains efficacy can be very assay-dependent, namely that positive one in ELISA screen often failed to work in immunofluorescence or vice versa. We also isolated intrabodies using a selection scheme base on co-localization of a fluorescent fusion of the nanobody with the target. Then when we functionalized a set of these tracking intrabodies, replacing the GFP by a proteasome targeting domain to degrade the antigen, there was surprisingly no obvious correlation between the best trackers and the best degraders. Therefore we reasoned that the best way to identify an intrabody that work in a specific assay would be to screen directly in the final format.

10 Here we chose to inhibit RhoB by inducing its proteasome mediated degradation. Several functionalization of intrabodies mend to induce degradation of the target. One of them consists in fusing the Fbox domain of an Fbox protein. Fbox protein contains two modular domains, one for target recognition and the Fbox domain that interact with Skip1, a component of the SCF E3 ubiquitin ligase complex, which induce polyubiquitylation of the Fbox protein target followed by subsequent proteasomal degradation. Replacement of the target binding domain with an intrabody can specify the target, therefore inducing degradation of the antigen (Figure 3A). One advantage of that knockdown strategy is that the Fbox-intrabody (F-Ib) act in a catalytic manner and is not co-degraded. Another one resides in the fact that if degradation is observed, this report indirectly the intracellular interaction between the antigen and the nanobody. The main drawback can be that the targeted antigen does not display ubiquitylation site, but it is not the case for small GTPases or any protein that could be degraded naturally by the proteasome. We have previously tested this strategy for several anti-GFP hs2dAb intrabodies and constructed a plasmid which allows the expression of an amino terminal Fbox domain from drosophila slmb gene fused to hs2dAb and a carboxy terminal myc tag upstream of a mitochondrial fluorescent reporter gene expressed as a second cistron translated from an IRES. We choose to set up a visual screen of target degradation by fusing RhoB to a fluorescent protein. To mimic active RhoB, we choose to express a constitutively active mutant RhoBL63, which is strongly impaired in catalyzing GTP nucleotide hydrolysis, thus remains in the GTP loaded active state. To avoid binding crosstalk with endogenous RhoB, we used a RHOB<sup>-/-</sup> lung epithelial cell line H2882. As RhoBL63 expression toxicity did not allow us to produce a stable cell line, we constructed a chimera which consist in a sequence coding an amino terminal histone H2B, followed by the mCherry fluorescent protein and a carboxy terminal RhoBL63

deleted for the 5 terminal amino acid that correspond to the palmitoylation and prenylation signals. This fusion protein loss the membrane anchorage capacity and was artificially incorporated to the chromatin nucleosomes, giving a fluorescent signal in the nucleus while displaying active RhoBL63 mutant at a localization which appeared to be nontoxic to generate a stable cell line, referred as HmB. To control the binding specificity to RhoBL63, a cell line expressing only H2B-mCherry was generated as well, referred as Hm. We hypothesized that if a Fbox-hs2dAb is a stable F-Ib and if interaction occurs specifically with RhoBL63, a decrease of nuclear mCherry fluorescence would be observed in the HmB cell line but not in the Hm one. Therefore a fluorescence decay correlated to RhoBL63 degradation could be the basis of a visual screening for F-Ib RhoB inhibitors. Chromatin quantity and density is cell-dependent, fluctuating according to the cell cycle, giving a slight heterogeneity in the cell nuclear fluorescence could (Figure 3B). Another source of cell-dependent heterogeneity in a screen based on transient plasmid transfection comes from the variable plasmid copy number, the transfection efficiency and the relative expression level of F-Ib. To better assess these parameter, we used our F-Ib bi-cistronic expression vector with a monomeric GFP targeted to the mitochondrial matrix as a reporter gene and set up the assay using two negative hs2dAb in this screening, referred as F-NR that is non relevant to RhoB phage display and the F-20, previously selected towards RhoB but that is not a degrading intrabody. In summary, the visual screen resides in the observation of mCherry nuclear fluorescence decay in cells showing GFP fluorescent mitochondria (Figure 3B).

After 4 rounds of panning, hs2dAb sequence were digested in pool and directly inserted in the F-Ib bicistronic vector (Figure 3B). Although such polyclonal subcloning could lead to a certain extend to diversity loss compared to the phagemid sublibrary, we reasoned that in conventional phage display strategies, only a set of randomly picked colonies are screened and that the effective enrichment of specific binders during phage selection have less probability to be not transferred during subcloning. After a single cloning step, we screened several hundred of F-hs2dAb, by transient transfection of individual plasmid clones in both cell lines (HmB and Hm), and observed the mCherry fluorescence intensity on an inverted microscope. After sequencing positive hits, we identified four unique clones that induced a strong decay of mCherry fluorescence in HmB cell transfected cells only in comparison with to the two negative internal controls F-NR and F-B20 (Figure 3B). One of the selected clones was the H12 hs2dAb, which is

the pan active Rho that was previously identified from that NaLi-H1 library. The fluorescent decay quantification on some selected field suggested that these F-Ib were inducing degradation of H2B-mCherry-RhoBL63 depending on the presence of RhoBL63. Then, these results were further quantified by flow cytometry, confirming that F-H12, F-B6, F-B15 and F-B5 degrade selectively H2BmCherry-RhoBL63 and showing that F-H12 and F-B6 are the most efficient F-Ib (Figure 4A).

#### *Characterization of selected F-Ib*

The fusion of a Fbox domain to a peptide or an intrabody have been reported to mediate target degradation by the proteasome in various cellular context. To confirm whether the presence of the Fbox domain was responsible to the degradation, we expressed hs2dAb alone in Hm and HmB cell lines and observed no decrease in mCherry fluorescence (Figure 4B). Next, using the MG132 proteasome inhibitor, we controlled that the observed degradation was proteasome dependent. In comparison to DMSO treatment that barely reduce the 4 F-Ib induced fluorescent decay quantified by flow cytometry, the treatment at 1 $\mu$ M of MG132 during 36h restored the mCherry fluorescence almost to the control level (Figure 4C). Finally we analyzed whether the fluorescence decay was a direct effect of the F-Ib expression by quantifying the fluorescence after decreasing the concentration of plasmid in the transfection from 2  $\mu$ g to 0. A dose-response direct effect was observed for the effective F-H12 and F-B6, as the lower was the plasmid concentration the higher was the fluorescence signal (data not shown). Together these results demonstrated that the F-Ib selected by the direct visual screening were specifically targeting and degrading in a proteasome dependent manner the RhoBL63 delta CAAX protein concentrated on the chromatin.

25

#### *Specificity and conformational selectivity of the selected F-Ib*

The H12 hs2dAb is a conformational sensor and a blocking intrabody of the GTP loaded Rho proteins without distinction between RhoA, RhoB, RhoC homologs and even recognizing Rac1 and CDC42 closely related GTPases. The fact that it was enriched and selected again in this study was not surprising as in previous panning its enrichment was very high in the early round of selection as its representation was above 50% of the clones at the third round of panning on RhoAL63. Despite here we introduced competition with active RhoA and RhoC, H12 was not totally eliminated from the selection, suggesting that others newly selected hs2dAb could also be pan Rho

30

as well. Nevertheless H12 enrichment was much lower, suggesting that the new subtractive selection was at least partially efficient. To determine the selectivity of the selected F-hs2dAb, we produced different stable cell lines on the same basis than H2B-mCherry-RhoBL63. Transfection of H2B-mCherry-RhoAL63 and H2B-mCherry-RhoCL63 failed to produce stable cell line and the heterogeneity of transient expression did not lead to conclusive quantification of fluorescence decay (data not shown). However the generation of a similar cell line was possible with H2B-mCherry-Rac1L61, Rac1 being the closest homolog of the Rho subfamily mainly in the switch domains. As expected, F-H12 induced a fluorescence decay in the later cell line. Among the other selected F-Ib, F-B5 was also affecting the fluorescence level of the H2B-mCherry-Rac1L63 but F-B6 and F-B15 failed to degrade the active form of Rac1 (Figure 4D). At this point we pursued the study without the hs2dAb 5 or its F-5 functionalization but we kept the hs2dAb H12 as a pan active Rho control. Then we addressed the conformational selectivity of the remaining F-Ib by comparing their effect on a RhoBN19 mutant which is supposed to be mainly inactive as the same mutation lead to a GTPase defective in the nucleotide binding for other Ras homologs. We generated a H2B-mCherry-RhoBN19 stable cell line in order to determine the conformational selectivity hs2dAb expressed as F-Ib in our fluorescence decay assay. After FACS analysis, all effective F-Ib were degrading only the active mutant of RhoB and not the inactive form (Figure 4E). These results indicate that F-B6 and F-B15 are conformational hs2dAb that preferentially recognize RhoB in its active conformation.

#### *Endogenous RhoB activity knockdown*

We then investigated whether these intrabodies were able to degrade the endogenous active form of RhoB. To this end we used HeLa S3 cells, a common cell line that express significant amount of RhoB protein with a detectable basal level of active RhoB. The standard method to assay the Rho GTPase activity is based on a pull down using the GST-RBD. RBD is the Rho Binding Domain from Rhotekin, a common effector of the three Rho which interacts only with the GTP bound Rho. After 48h of transient transfection of F-Ib, pull down of RhoB basal active fraction was lower in cells transfected by F-B6, F-B15 or F-H12 than with the controls F-B20 and F-NR. Detection of RhoA and RhoC allowed to assess whether their basal activities were also affected. As expected F-H12 induced a strong decrease in the level of all 3 Rho active fractions. However, the level of the 3 active Rho was not decreased equally for the F-B15 and F-



B6 expression, suggesting that they do not have the same selectivity than F-H12. In contrast to the F-B15 hs2dAb that induced degradation of both active RhoB and RhoA, F-B6 did not induced apparent modulation of RhoA or RhoC pulled down fractions (Figure 5A). Quantifications indicated that F-B6 degrades solely RhoB activity in this cellular context and assay conditions (Figure 5B). This result is the first example of a molecule which would discriminate RhoB from RhoA in their GTP loaded state and that would enable their cellular proteolysis.

To investigate whether the protein knockdown observed 48h post transfection with the F-6 was direct and specific, we targeted the fast process of cellular activation of Rho proteins. Actually RhoB and RhoA, and to a lesser extend RhoC, have been reported to be activated in few minutes after an EGF treatment. After 24h of serum starvation, activation kinetics of each Rho by EGF was assessed in HeLaS3 cells. Activation was observed as soon as 5 minutes after stimulation for all 3 Rho and reached a maximum at 15 minutes, which was chosen as activation time for further experiments (Figures 5C&D). We characterized the effect of F-H12 and F-B6 on Rho activation and confirmed the selective observed degradation of RhoA/B activity. While F-NR or F-B20 controls did not prevent EGF mediated Rho activation, F-B6 degrades only RhoB activity induced by EGF whereas FH12 inhibit all Rho activities indeed (Figures 5C & D).

In conclusion, the hs2dAb B6 seems to be a RhoB-GTP very selective intrabody, which is able to block RhoB basal activity as well as its stimulated activation while functionalized as F-Ib, without down regulating major fraction of cellular RhoB.

#### REFERENCES:

Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

**CLAIMS:**

1. A single domain antibody wherein the amino acid sequences of CDR1-IMGT, CDR2-IMGT and CDR3-IMGT have at least 90% of identity with the amino acid sequences of the CDR1-IMGT, CDR2-IMGT and CDR3-IMGT of the H12, B6, 4P75, 4SP1, 4SNP36, 4SNP61, 5SP10, 5SP11, 5SP58, 5SNP47, 5SNP48, 5SNP65, B20, B15, B5, B71, E3, A6 or G12 (hs2dAb) single domain antibody which are defined in Table B.
2. The single domain antibody of claim 1 which comprises the CDR1-IMGT, CDR2-IMGT and CDR3-IMGT of the H12, B6, 4P75, 4SP1, 4SNP36, 4SNP61, 5SP10, 5SP11, 5SP58, 5SNP47, 5SNP48, 5SNP65, B20, B15, B5, B71, E3, A6 or G12 (hs2dAb) single domain antibody.
3. The single domain antibody of claim 1 which comprises a framework region FR1 having at least 90% of identity with SEQ ID NO:1.
4. The single domain antibody of claim 1 which comprises a framework region FR2 having at least 90% of identity with SEQ ID NO:2.
5. The single domain antibody of claim 1 which comprises a framework region FR3 having at least 90% of identity with SEQ ID NO:3.
6. The single domain antibody of claim 1 which comprises a framework region FR4 having at least 90% of identity with SEQ ID NO:4.
7. The single domain antibody of claim 1 which comprises an amino acid sequence having at least 70% of identity with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:62-80.
8. The single domain antibody of claim 1 which comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequences represented by SEQ ID NO:62-80.
9. The single domain antibody of claim 1 which is fused to a heterologous polypeptide to form fusion protein.
10. The single domain antibody of claim 1 which is fused to an immunoglobulin domain, a single domain antibody, a carrier polypeptide, a fluorescent polypeptide, an enzyme,

a polypeptide that facilitates purification or isolation of the fusion protein, a cell-penetrating peptide or an ubiquitin ligase domain.

11. The single domain antibody of claim 1 which is fused to a F-box domain.

12. A nucleic acid molecule which encodes for the single domain antibody of claim 1.

5 13. A vector which include the nucleic acid molecule of claim 12.

14. A host cell transformed with the nucleic acid molecule of claim 12.

15. A method of detecting the present of a least one activated form of a Rho GTPase (comprising the steps of i) a) obtaining a sample from a subject, ii) contacting, in vitro, the sample with a single domain antibody of claim 1, iii) detecting the binding of said  
10 single domain antibody to said sample, and iv) comparing the binding detected in step (iii) with a standard, wherein a difference in binding relative to said sample indicated the presence of the activated form of the Rho GTPase.

16. The single domain antibody of claim 1 or the nucleic acid molecule of claim of claim 12 for use as medicament.

15

**ABSTRACT OF THE INVENTION****ANTI-RHO GTPASE CONFORMATIONAL SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AND  
USES THEREOF**

5

The present invention relates to active form specific anti-Rho GTPase conformational single domain antibodies and their uses in particular in the therapeutic and diagnostic fields. In particular, the present invention relates to a single domain antibody wherein the amino acid sequences of CDR1-IMGT, CDR2-IMGT and CDR3-IMGT have at least 90% of identity with the amino acid sequences of the CDR1-IMGT, CDR2-IMGT and CDR3-IMGT of the H12, B6, 4P75, 4SP1, 4SNP36, 4SNP61, 5SP10, 5SP11, 5SP58, 5SNP47, 5SNP48, 5SNP65, B20, B15, B5, B71, E3, A6 or G12 (hs2dAb) single domain antibody which are defined in Table B.

15

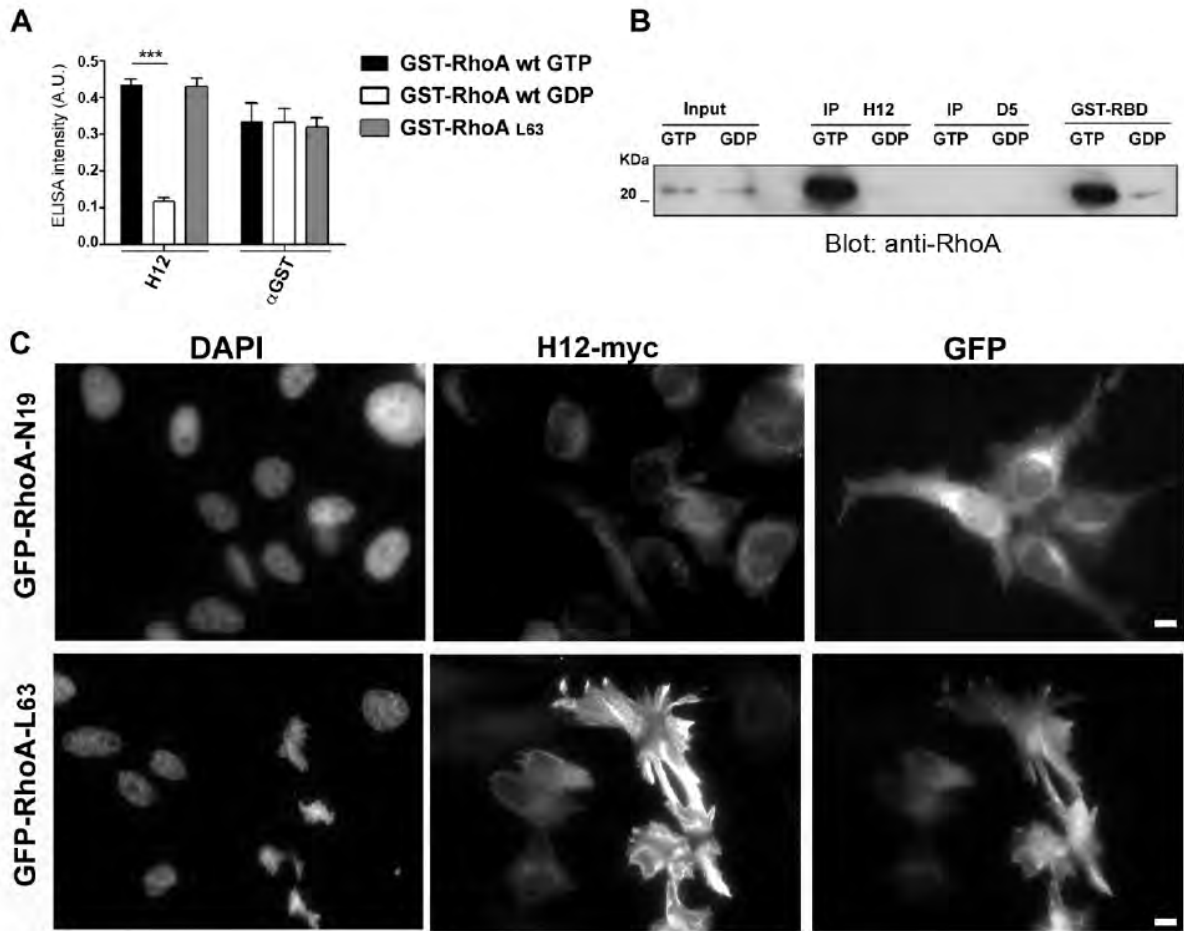


Figure 1

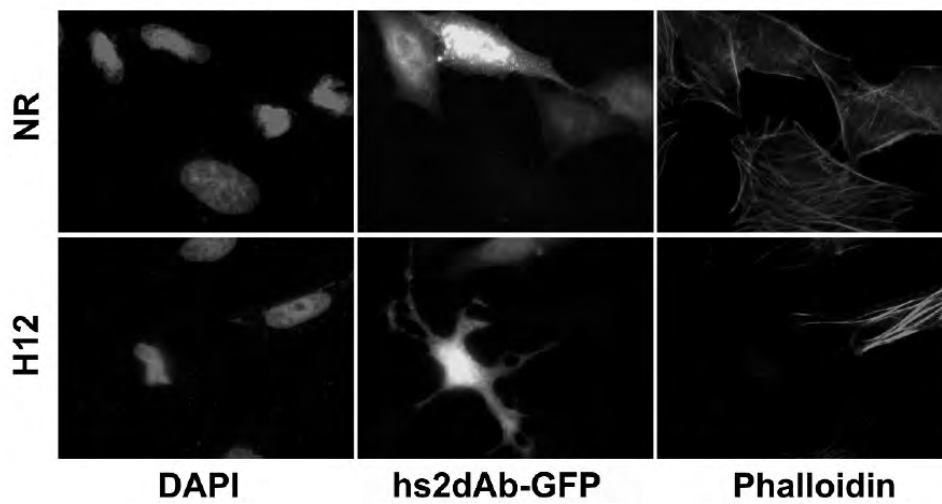


Figure 2

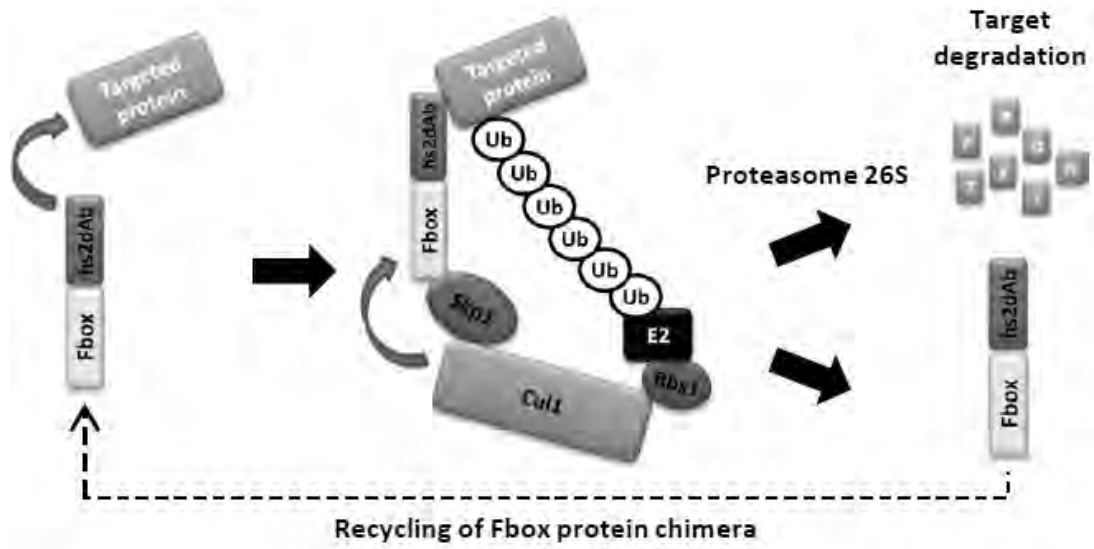


Figure 3A

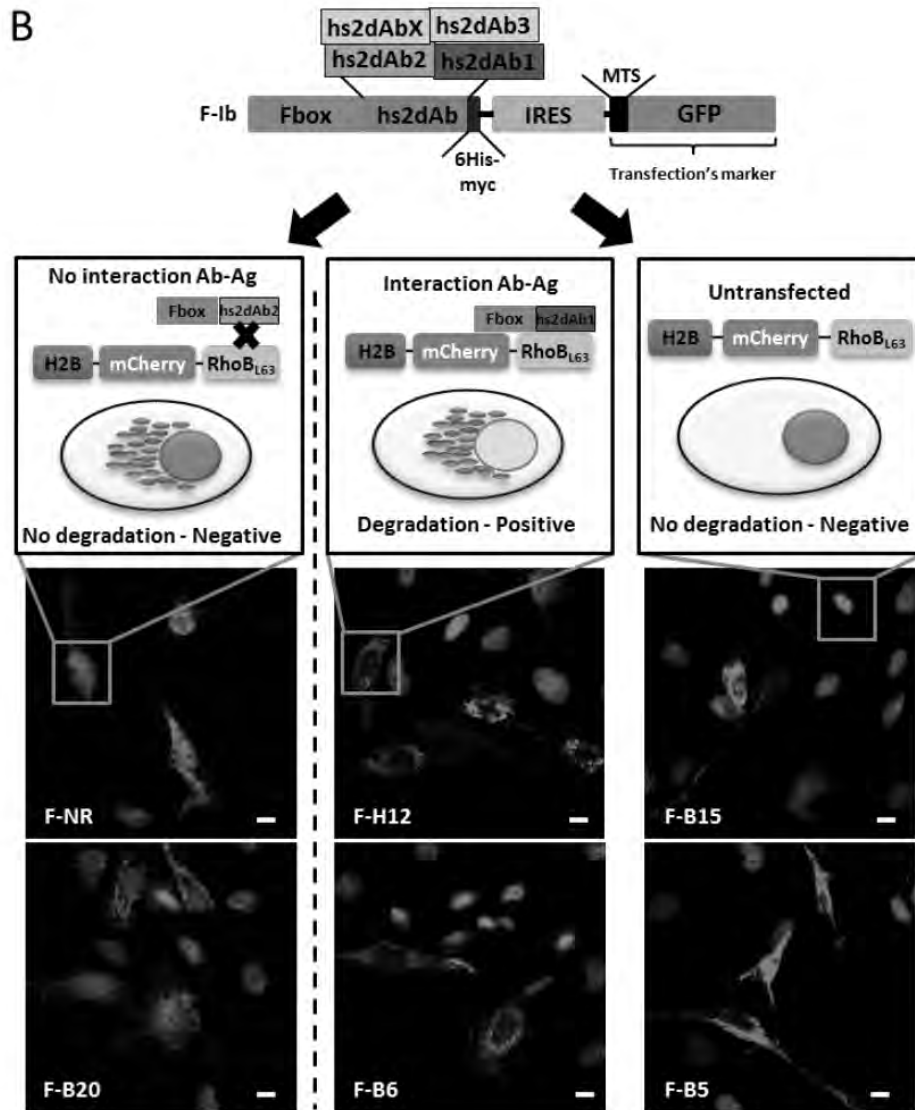


Figure 3B

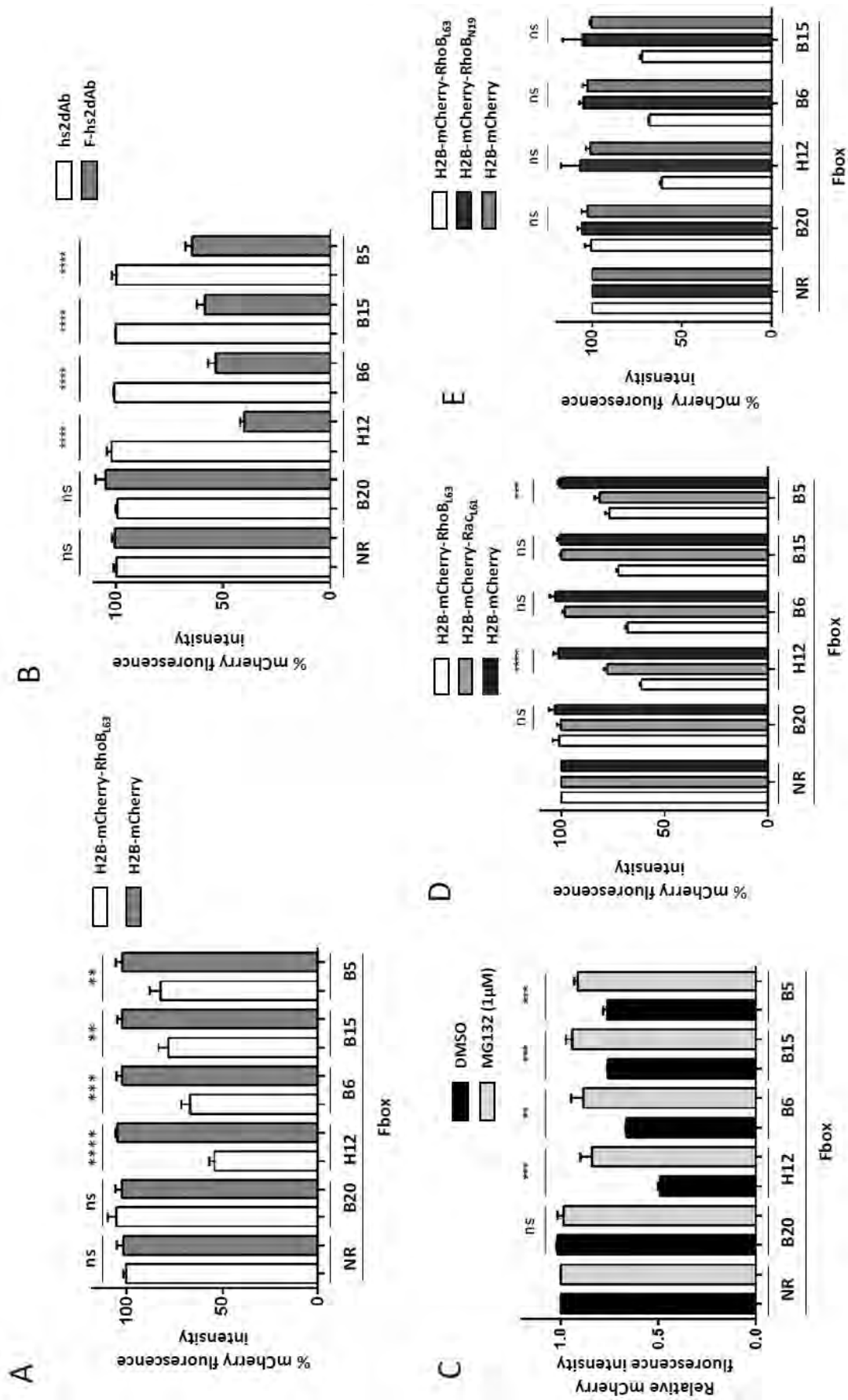


Figure 4

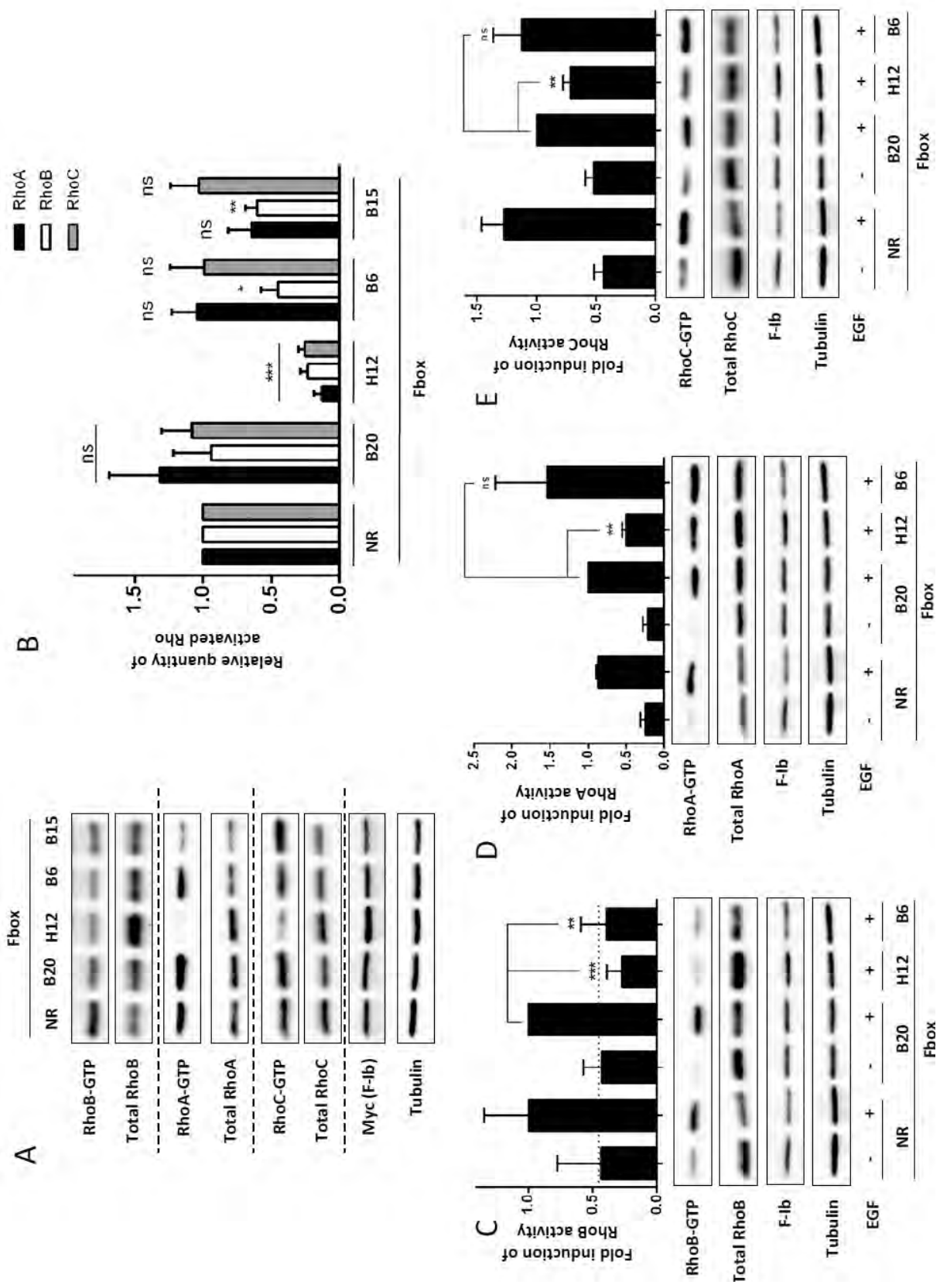


Figure 5









## **TITRE : Conception de nano-anticorps conformationnels comme nouveaux outils d'étude de l'activité des GTPases de la sous-famille RHOA**

Mots clés : RHOA, GTPase, activité, intracorps, nanobodies.

Les GTPases de la sous famille RHOA participent à la régulation de nombreuses voies de signalisation qui contrôlent la dynamique du cytosquelette cellulaire et une grande diversité de fonctions telles que la prolifération, la division, la migration et la polarité cellulaires. Ce sont de véritables interrupteurs moléculaires qui, en réponse à un stimulus, changent de conformation tridimensionnelle pour activer leurs protéines effectrices cibles. Elles existent donc sous deux formes, une forme inactive liant le GDP et une forme active, liant le GTP. La proportion de forme active est extrêmement régulée au niveau spatial et temporel dans une cellule et représente moins de 10% de sa totalité. Depuis près de 20 ans, le seul outil disponible pour étudier leur activation est constitué par le domaine de liaison d'un effecteur, le RBD. Peu stable, faiblement soluble et peu adaptable, de nouveaux outils sont nécessaires afin de mieux comprendre la fine régulation de ces protéines. Les anticorps à simple domaine, VHH ou nanobodies, sont caractérisés par leur stabilité, solubilité, haut rendement de production et versatilité de fonctionnalisation. A partir d'une nouvelle banque d'anticorps à simple domaine optimisée pour la production d'intracorps, nous avons isolés différents clones capables de reconnaître *in vitro* et de bloquer *in cellulo* la forme active de ces protéines. L'un de ces clones permettra le développement d'un nouvel outil de mesure de l'activité de ces protéines *in vitro* tandis qu'un autre, *in cellulo*, permettra de mieux comprendre la régulation spatiale et temporelle des protéines endogènes.

## **TITLE : Conformational nanobodies as new way to study RHOA subfamily activity**

Key words: RHOA, GTPase, activity, intrabodies, nanobodies.

RHOA small GTPase belongs to a subfamily acting as a molecular switch activating major signaling pathways that regulate cytoskeletal dynamics and a variety of cellular responses such as cell cycle progression, cytokinesis, migration and polarity. RHOA activity resides in a few percent of GTP loaded protein, which is finely tuned by a crosstalk between regulators of the GTPase cycle. Manipulating a single RHO at the expression level often induces imbalance in the activity of other RHO GTPases, suggesting that more specific tools targeting these active pools are needed to decipher RHOA functions in time and space. We decided to use single domain antibodies, also known as VHH or nanobodies, as a new tool for studying RHOA activation. We produced and screened a novel fully synthetic *phage display* library of humanized nanobodies (NaLi-H1) to develop conformational sensors of the GTP loaded active conformation of RHO subfamily. We obtained several high affinity nanobodies against RHOA's active form which we characterized as RHO active antibodies *in vitro* and RHO signaling blocking intrabodies *in cellulo*. These new tools will facilitate and improve our current knowledge of this peculiar protein subfamily and will be a paradigm for the study of other RHO related small GTPases.