



HAL
open science

Sélection et caractérisation d'anticorps et de fragments d'anticorps pour l'immunociblage intracellulaire

Guillaume Freund

► **To cite this version:**

Guillaume Freund. Sélection et caractérisation d'anticorps et de fragments d'anticorps pour l'immunociblage intracellulaire. Immunothérapie. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ005 . tel-01219807

HAL Id: tel-01219807

<https://theses.hal.science/tel-01219807>

Submitted on 23 Oct 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

UMR 7242 – Biotechnologie et Signalisation Cellulaire

THÈSE

présentée par :

Guillaume FREUND

soutenue le 31 janvier 2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects cellulaires et moléculaires de la biologie

Sélection et caractérisation d'anticorps et de fragments d'anticorps pour l'immunociblage intracellulaire

THÈSE dirigée par :

M. WEISS Etienne

Professeur des Universités, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. PAUL Stéphane

Maître de conférences, Université Jean Monnet, Saint-Etienne

Mme WITKO-SARSAT Véronique

Directeur de recherche, Institut Cochin, Paris

AUTRES MEMBRES DU JURY :

GUILLOT-COMBE Emmanuelle

Docteur, MRIS/DGA, Bagneux

POTERSZMAN Arnaud

Directeur de recherche, IGBMC, Strasbourg

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée dans l'équipe Modifications Post-Traductionnelles et Cancérogénèse au sein de l'UMR 7242 – Biotechnologie et Signalisation Cellulaire. Les travaux ont été soutenus par la Région Alsace et la Direction Générale de l'Armement.

Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de thèse, le Pr Etienne Weiss, pour m'avoir accueilli dans son équipe et encadré tout au long de ces quatre années. Etienne, je te remercie pour le temps conséquent que tu m'as accordé, pour tes qualités scientifiques mais surtout pédagogiques, ton dynamisme et ta sympathie. J'ai énormément appris à tes côtés (et ce n'est pas fini !), et je tiens à t'exprimer toute ma reconnaissance pour cela.

Je tiens à remercier le Dr Véronique Witko-Sarsat et le Dr Stéphane Paul, rapporteurs, ainsi que le Dr Emmanuelle Guillot-Combe, le Dr Arnaud Poterszman et le Dr Jean-Luc Galzi qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mes plus proches collaborateurs : Audrey, toujours de bonne humeur, toujours prête à rendre service, merci d'être une voisine de bureau si agréable ; Dominique, je te remercie pour tes conseils, ton avis très franc et constructif, tu as toujours été disponible pour m'aider et m'écouter ; Annie-Paule, merci pour ta sympathie et ta gentillesse qui n'a, à mon avis, pas d'égal dans notre institut. Je tiens également à vous remercier toutes les trois pour l'aide que vous m'avez apportée aussi bien pour la rédaction de la thèse que pour les différentes manip'. C'est surtout grâce à vous que j'ai eu la chance de pouvoir présenter trois articles dans mon manuscrit.

Je remercie tous les membres de l'équipe MPTC et en particulier : Jérôme, pour sa disponibilité et ses conseils tout au long de ces 4 années ; le responsable informatique en chef Marc B., pour sa gentillesse et nos discussions (sport, actus, la vie commune avec un prof, etc...) ; merci les gars, grâce à vous le labo D446 est assurément « ze place to be » à l'ESBS ; Etienne S., reçois l'assurance de mon profond

respect, grâce à toi nous avons introduit un peu de poésie (entre autres) dans ce monde de sauvages, bon courage pour la dernière ligne droite ; Célia, Bruno, Mariel, pour votre aide et votre sympathie au quotidien. Un grand merci à Sascha, Robin (B. H.) et Nils, nos stagiaires qui ont participé aux différents projets d'immunociblage.

Je remercie le Dr Valérie Schreiber et le Dr Arnaud Poterszman d'avoir examiné mes travaux de thèse à mi-parcours.

Je remercie également les membres (présents et passés) de l'équipe RU : François, Mumu, Juline, merci pour votre contribution à la bonne ambiance de la pause de midi ; Anaëlle, Sadek, Anso, Xav', merci d'y avoir contribué par le passé, bon vent à tous ; Max, ton départ a laissé dans mon cœur une cicatrice, merci pour ta bonne humeur et vive le RCS. Un grand merci au Dr Pascal Didier pour son accueil toujours très chaleureux au sein de son laboratoire.

Je remercie mes proches, amis et famille, pour leur soutien et leurs encouragements. J'oublie probablement de citer certaines personnes, je les prie de m'en excuser... et j'en profite pour les remercier à leur tour !

Enfin, que serais-je sans ma moitié, toujours à mes côtés, tu as toujours cru en moi. Les mots me manquent pour te remercier, Anne-Sophie, à ta juste valeur, pour ta patience et ton soutien au travers des aléas de la vie. Je ne saurais terminer sans dédier ce manuscrit à la personne à qui je tiens tant et qui partage ma vie, et à Charles, disparu depuis de trop longues années.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	3
ABREVIATIONS ET SYMBOLES	6
LISTES DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	10
PREAMBULE	11
INTRODUCTION	13
1. Les anticorps et les différents formats d'anticorps	13
1.1. Structure générale et propriétés des anticorps	13
1.1.1. La structure des anticorps	14
1.1.2. La diversité des anticorps	15
1.1.2.1. La recombinaison VDJ	15
1.1.2.2. L'hypermutation somatique	17
1.1.2.3. La commutation isotypique (ou commutation de classe)	19
1.1.3. Les anticorps thérapeutiques	20
1.1.3.1. Les anticorps chimériques	21
1.1.3.2. Les anticorps humanisés	22
1.1.3.3. Les anticorps humains	24
1.2. Les différents formats d'anticorps	25
1.2.1. Le format Fab	26
1.2.2. Le format scFv	27
1.2.3. Le format V _H H (« Nanobody »)	28
1.3. Les banques de fragments d'anticorps recombinants	29
1.3.1. Les banques naïves	29
1.3.2. Les banques immunes	30
1.3.3. La sélection de fragments d'anticorps à partir de banques	30
1.3.3.1. Le système « phage display »	30
1.3.3.1.1. Le bactériophage M13	30
1.3.3.1.2. La sélection de fragments d'anticorps par la méthode dite « phage-display »	33
1.3.3.2. Les autres « display »	34
1.3.3.2.1. Yeast display	34

1.3.3.2.2. Ribosome display	35
1.3.3.3. Evolution moléculaire <i>in vitro</i>	36
2. Immunociblage d'une protéine intracellulaire	38
2.1. Les techniques d'immunociblage d'une protéine intracellulaire : vectorisation ou expression d'anticorps dans le cytoplasme ?	39
2.1.1. Expression intracellulaire des anticorps : les intracorps	40
2.1.2. Vectorisation d'anticorps dans le cytoplasme	43
2.1.2.1. La transfection de protéines (profection)	44
2.1.2.2. La transduction de protéines : les peptides internalisants	46
2.1.2.3. Méthodes de vectorisation physiques	47
2.1.2.3.1. La micro-injection	47
2.1.2.3.2. L'électroporation	48
2.1.2.3.3. La sonoporation	49
2.1.3. Applications de l'immunociblage intracellulaire	50
2.1.3.1. Etude de la fonction et de la dynamique d'une protéine intracellulaire	50
2.1.3.2. Immunisation intracellulaire	50
3. Les protéines PCNA et gankyrin	52
3.1. PCNA	52
3.1.1. Structure et fonction de PCNA	52
3.1.2. Partenaires de PCNA et motifs d'interaction	54
3.1.3. Modifications post-traductionnelles de PCNA	56
3.1.3.1. La phosphorylation de PCNA	56
3.1.3.2. L'acétylation de PCNA	56
3.1.3.3. La SUMOylation de PCNA	57
3.1.3.4. La mono-ubiquitylation de PCNA	57
3.1.4. PCNA, une cible d'intérêt thérapeutique	60
3.1.4.1. Cancer, chimiorésistance et myélome multiple	60
3.1.4.2. Inflammation	61
3.2. La gankyrin	63
OBJECTIFS DE LA THESE	65
RESULTATS ET DISCUSSION	67

1. Détection d'une protéine intracellulaire endogène avec des scFv fluorescents	67
1.1. Introduction	67
1.2. Article n°1	68
1.3. Conclusion	69
2. Visualisation de PCNA à l'aide d'un intracorp bispécifique fluorescent dans les cellules vivantes	70
2.1. Introduction	70
2.2. Article n°2	71
2.3. Conclusion	72
3. Développement d'un système de mutagenèse <i>in vitro</i> inspiré de la SHM	73
3.1. Introduction	73
3.2. Principe du système de diversification des scFv <i>in vitro</i>	74
3.2.1. Traitement au bisulfite de sodium	75
3.2.2. PCR mutagène ou « error-prone » PCR	75
3.2.3. Sélection de scFv diversifiés	76
3.3. Applications	78
3.3.1. scFv anti-PCNA P40	78
3.3.2. scFv polyclonaux anti-IgG de lapin	82
3.4. Discussion	87
4. Vectorisation d'anticorps monoclonaux pour l'immunociblage analytique et fonctionnel de protéines intracellulaires dans les cellules cancéreuses vivantes	88
4.1. Introduction	88
4.2. Article n°3	90
4.3. Conclusion	91
CONCLUSION GENERALE	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	99

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
APIM	AlkB homologue 2 PCNA Interacting Motif
AR	Ankyrin
ARN	Acide RiboNucléique
ARN_m	Acide RiboNucléique messenger
CAT	Chloramphénicol AcétylTransférase
Cdc45	Cell division cycle 45
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CDR	Complementary Determining Region
C_H	Constant Heavy-chain domain
CHC	Carcinome Hépatocellulaire
CKI	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor
C_L	Constant Light-chain domain
CPP	Cell Penetrating Peptide
CRL4	Cullin 4-based ubiquitin ligase
CSR	Class-Switch Recombination
Ctf4	Chromatin transmission factor 4
dsRNA	double stranded RiboNucleic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Elg1	Enhanced level of genomic instability 1
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
Fab	Fragment antigen-binding
Fc	Fragment crystallizable
FITC	Fluorescéine IsoThioCyanate
FR	Framework
Fv	Fragment variable
GFP	Green Fluorescent Protein
GINS	Go Ichi Nii San
GST	Glutathion S-Transférase
HACA	Human Anti-Chimeric Antibody

HAMA	Human Anti-Mouse Antibody
HcAb	Heavy chain only Antibodies
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus 1
HRP	HorseRadish Peroxidase
IDCL	InterDomain Connector Loop
IMAC	Immobilized Metal ion Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	kiloDalton
Ig	Immunoglobuline
mAb	monoclonal Antibody
MCM	MiniChromosome Maintenance
MM	Masse Moléculaire
MMR	MisMatch Repair
MSH	MutS Homolog
MPT	Modification Post-Traductionnelle
NaHSO₃	Bisulfite de sodium
ng	nanogramme
NLS	Nuclear Localization Signal
pb	paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PDI	Protein Disulfide Isomerase
PIP	PCNA Interacting Peptide
PLA	Proximity Ligation Assay
PLK1	Polo-Like Kinase 1
pg	picogramme
pRb	protéine du Rétinoblastome
RAG	Recombination Activating Gene
RE	Réticulum Endoplasmique
RFC	Replication Factor C
RNAi	RiboNucleic Acid interference
RPA	Replication Protein A
RT-PCR	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
sb	simple brin

scFv	single-chain Fragment variable
SHM	Somatic HyperMutation
shRNA	short hairpin RiboNucleic Acid
siRNA	small interfering RiboNucleic Acid
SPR	Surface Plasmon Resonance
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
TAT	Trans-Activator of Transcription
TLS	TransLesion Synthesis
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
UBM	Ubiquitin-Binding Motif
UBZ	Ubiquitin-Binding Zinc finger
UDG	Uracil-DNA Glycosylase
USP1	Ubiquitin Specific Peptidase 1
UV	UltraViolet
V_H	Variable Heavy-chain domain
V_L	Variable Light-chain domain

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Représentation d'une immunoglobuline G.
- Figure 2.** Réarrangement VDJ d'une chaîne lourde d'un anticorps.
- Figure 3.** Maturation et activation d'un lymphocyte B.
- Figure 4.** Mécanisme d'introduction de mutations ponctuelles au cours de l'hypermutation somatique.
- Figure 5.** Différentes générations d'anticorps thérapeutiques : anticorps de souris, chimérique, humanisé et humain.
- Figure 6.** Représentation schématique de différents formats d'anticorps.
- Figure 7.** Génération de fragments d'anticorps naturels après digestion enzymatique d'une IgG.
- Figure 8.** Le bactériophage filamenteux M13.
- Figure 9.** Principe de la sélection de scFv par la méthode dite « phage-display ».
- Figure 10.** Principe de la technologie du « yeast display ».
- Figure 11.** Principe de la technologie du « ribosome display ».
- Figure 12.** Méthodes de vectorisation d'anticorps et de fragments d'anticorps dans les cellules.
- Figure 13.** Caractéristiques des scFv de la banque V1 et V2.
- Figure 14.** Représentation schématique du transfert de protéines dans une cellule eucaryote par transfection.
- Figure 15.** Schéma illustrant le principe du système de nano-électroporation.
- Figure 16.** Structure tridimensionnelle de PCNA.
- Figure 17.** Schéma du réplisome eucaryote.
- Figure 18.** Expression de PCNA au cours du cycle cellulaire.
- Figure 19.** La mono-ubiquitylation de PCNA : une étape clef de la synthèse translésionnelle.
- Figure 20.** Les fusions peptide-CPP permettent d'inhiber la croissance de tumeurs xénogreffées.
- Figure 21.** Structure tridimensionnelle du complexe formé par la gankyrin et le domaine carboxy-terminal de la S6 ATPase.

- Figure 22.** Représentation schématique du principe de l'hypermutation somatique et de la méthode de mutagenèse *in vitro*.
- Figure 23.** Structure chimique du bisulfite de sodium.
- Figure 24.** Représentation schématique des étapes de la construction d'une banque de scFv diversifiés.
- Figure 25.** Analyse de la nature des mutations induites par la mutagenèse au bisulfite de sodium et epPCR sur la séquence du scFv P40.
- Figure 26.** Sélection par phage-display de variants du scFv P40.
- Figure 27.** Expression et purification du scFv P40 et des mutants P40M1 et P40M2.
- Figure 28.** Détection de PCNA par immunofluorescence.
- Figure 29.** Performance du réactif scFv-GST-eGFP pour détecter par immunofluorescence des bactéries préincubées avec un anticorps anti-*E. coli*.
- Figure 30.** Analyse de la nature des mutations induites par la mutagenèse au bisulfite de sodium et epPCR sur les séquences des scFv anti-IgG de lapin sélectionnés par phage-display.
- Figure 31.** Comparaison de la réactivité testée en phage-ELISA des scFv anti-IgG de lapin avant et après maturation d'affinité.

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.** Propriétés des immunoglobulines humaines.
- Tableau 2.** Liste des anticorps monoclonaux approuvés pour la thérapie.
- Tableau 3.** Liste non exhaustive des protéines interagissant avec PCNA.
- Tableau 4.** Nature des mutations introduites lors d'une réaction d'epPCR.

PREAMBULE

PREAMBULE

Le cancer est une cause majeure de décès à travers le monde. Le terme générique de « cancer » regroupe un ensemble de pathologies caractérisées par la prolifération incontrôlée de cellules au sein de l'organisme. La transformation d'une cellule normale en cellule tumorale se traduit en général par des altérations des systèmes de réparation de l'ADN ou d'une perte de contrôle du cycle cellulaire. En 2012, 355 000 nouveaux cas ont été diagnostiqués et le nombre de décès par cancer a été estimé à 148 000 en France (données de l'Institut de Veille Sanitaire). Le nombre de nouveaux cas ne cesse de progresser et il est primordial de poursuivre l'important effort de recherche qui est actuellement mis en œuvre pour décrypter les mécanismes de cancérogenèse et améliorer le diagnostic ainsi que les traitements.

Les anticorps monoclonaux jouent un rôle clef dans le domaine du diagnostic, de la recherche fondamentale et de la thérapie anti-cancéreuse en particulier avec l'avènement des anticorps thérapeutiques. Grâce à leur haute spécificité de liaison et leur affinité pour l'épitope reconnu, ce sont des molécules de choix pour le traitement standard de nombreuses formes de cancers, aussi bien en monothérapie qu'en association avec des petites molécules chimiques utilisées dans le cadre d'une chimiothérapie. L'application des anticorps thérapeutiques est à ce jour restreinte au compartiment extracellulaire à cause de leur taille trop importante qui les empêche de traverser la membrane cellulaire.

La plupart des cibles thérapeutiques du cancer sont pourtant situées dans le milieu intracellulaire, comme par exemple des oncoprotéines impliquées dans la cancérogenèse ou des facteurs non oncogènes qui favorisent la croissance et le maintien des cellules cancéreuses. Il serait profitable de pouvoir exploiter les propriétés des anticorps dans les cellules pour étudier et perturber l'activité de ces cibles thérapeutiques. Néanmoins, l'utilisation des anticorps dans le milieu intracellulaire constitue un véritable challenge notamment à cause de la membrane cellulaire et de l'environnement réducteur du cytoplasme. Ce manuscrit décrit les travaux réalisés au cours de cette thèse dans le cadre de la vectorisation d'anticorps et de l'expression intracellulaire de fragments d'anticorps. Les résultats obtenus ont assurément ouvert de nouvelles perspectives pour l'immuno-intervention et l'imagerie intracellulaires.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1. Les anticorps et les différents formats d'anticorps

1.1. Structure générale et propriétés des anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines appartenant à la famille des immunoglobulines (Ig). Ils sont sécrétés par des cellules B différenciées, les plasmocytes, afin de détecter et neutraliser spécifiquement des éléments étrangers de l'organisme. Par définition, une immunoglobuline est qualifiée d'anticorps lorsqu'elle rencontre un antigène lors d'une réaction immunitaire. Les protéines de la famille des immunoglobulines partagent plusieurs domaines structuraux caractéristiques et notamment le « domaine immunoglobuline » constitué de 70 à 130 acides aminés formant deux feuillets β antiparallèles superposés et stabilisés par des ponts disulfures entre des cystéines très conservées (Williams & Barclay, 1988). Chaque anticorps est formé de deux chaînes lourdes identiques (H pour « Heavy ») et de deux chaînes légères (L pour « Light »). Classiquement, chaque chaîne lourde est formée de quatre ou cinq domaines et chaque chaîne légère présente deux domaines.

On distingue cinq classes d'immunoglobulines chez l'Homme : les Ig A, D, E, G et M (Tableau 1). La classe d'une Ig est déterminée par son type de chaîne lourde α , δ , ϵ , γ ou μ . Comme il existe plusieurs types de chaînes lourdes α ($\alpha 1$ et 2) et γ ($\gamma 1$ à $\gamma 4$), les IgA et les IgG se répartissent également en sous-classes IgA1, IgA2, et IgG1 à IgG4. Ainsi, les neuf chaînes lourdes différentes définissent les neuf classes et sous-classes (également appelées isotypes) des immunoglobulines humaines.

Dans les sections suivantes, seules les immunoglobulines de classe G seront présentées. Elles constituent la quasi-totalité des anticorps actuellement utilisés aussi bien pour des applications thérapeutiques, que dans le domaine du diagnostic et de la recherche fondamentale.

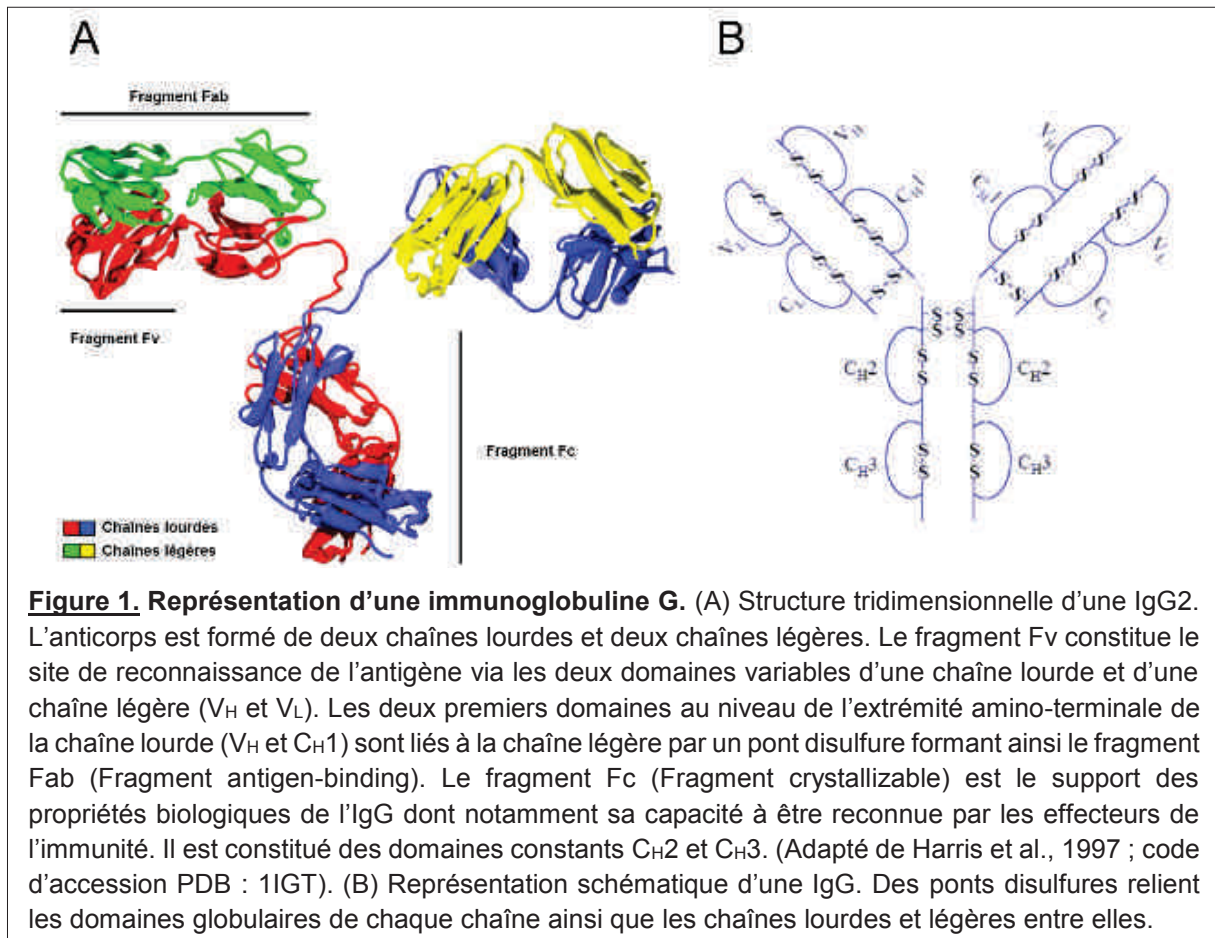
Tableau 1. Propriétés des immunoglobulines humaines.

Classe	Sous-classe	Conc. sérum (mg/mL)	MM (kDa)	Sites de liaison	Propriétés biologiques
IgG	4	12	150	2	Activation du complément, cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)
IgM	-	1	900	10	Activation du complément, Ig de surface des cellules B
IgA	2	2	(160) _n	2, 4, 6	Secrétoire
IgD	-	0,03	180	2	Ig de surface des cellules B
IgE	-	0,003	200	2	Médiation de l'allergie

1.1.1. La structure des anticorps

L'immunoglobuline G est généralement utilisée comme modèle pour décrire la structure générale des anticorps. Les IgG forment la classe prédominante des immunoglobulines et sont essentiellement présentes dans le sérum (environ 80% des Ig circulantes). Les quatre sous-classes d'IgG diffèrent principalement au niveau structural et sur le nombre et la position des ponts disulfures qui relient les chaînes lourdes et légères. Chaque chaîne lourde possède trois domaines constants C_{H1}, C_{H2} et C_{H3} (Constant Heavy-chain domain) et un domaine variable V_H (Variable Heavy-chain domain) pour une masse moléculaire d'environ 50 kDa. La chaîne légère est formée d'un domaine constant C_L (Constant Light-chain domain) et d'un domaine variable V_L (Variable Light-chain domain) pour une masse moléculaire d'environ 25 kDa. Une IgG présente donc une masse moyenne de 150 kDa et la combinaison des quatre chaînes aboutit à une structure tridimensionnelle en forme de « Y » (Figure 1).

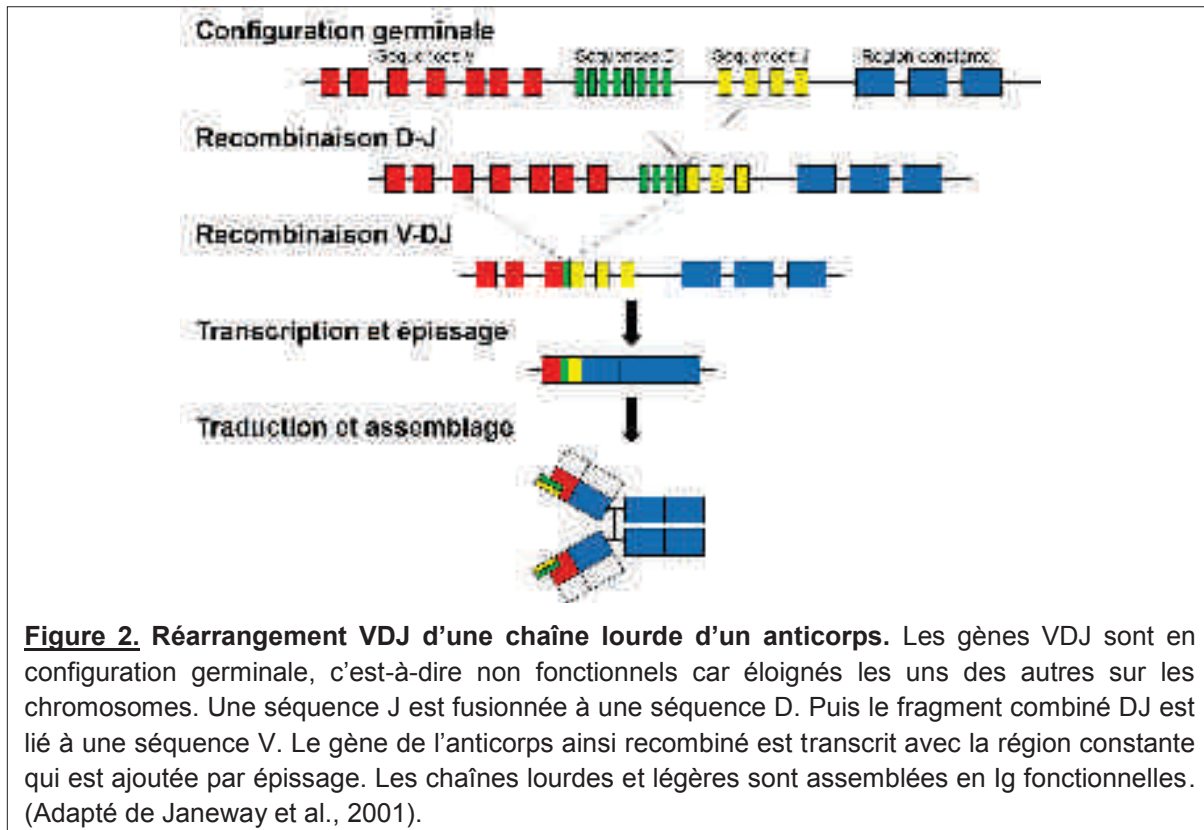
Les domaines variables V_H et V_L constituent le fragment variable (Fv) dont la fonction est de lier l'antigène via les boucles hypervariables CDR (Complementary Determining Region). Chaque domaine variable contient trois régions hypervariables CDR (CDR1, CDR2 et CDR3) formées de cinq à 15 acides aminés et situées entre des régions charpentes ou « framework » (FR). L'ensemble des boucles CDR du fragment Fv forment le site de liaison à l'antigène ou paratope. Les séquences des régions hypervariables sont très peu conservées, ce qui fait que l'organisation spatiale du paratope de chaque anticorps est unique. La région liée par le paratope au niveau de l'antigène est appelée épitope (Schroeder & Cavacini, 2010).



1.1.2. La diversité des anticorps

1.1.2.1. La recombinaison VDJ

Une grande diversité d'immunoglobulines est nécessaire afin de reconnaître l'immense variété d'antigènes. La recombinaison VDJ (gènes Variable, de Diversité et de Jonction) est un mécanisme de recombinaison de l'ADN qui permet de générer cette diversité. Chaque cellule B n'exprime qu'un seul type d'Ig à sa surface. Les chaînes lourdes et légères des Ig sont codées par plusieurs gènes exprimés dans les cellules B (VDJ pour la chaîne lourde, VJ pour la chaîne légère). Ces gènes sont assemblés par réarrangement combinatoire de fragments d'ADN pour former des séquences codant pour chaque chaîne des immunoglobulines (Figure 2 ; Janeway et al., 2001). Ce mécanisme est catalysé par les ADN recombinases RAG1 et RAG2 (Recombination Activating Gene). Il existe 50 séquences V, 27 séquences D et 6 séquences J pour la chaîne lourde ; 40 séquences V et 5 séquences J pour la chaîne légère. De plus, des mutations sont introduites au cours du mécanisme de recombinaison ce qui accroît le nombre de réarrangements possibles.



La recombinaison VDJ a lieu au cours de la maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse. Elle permet de créer un répertoire primaire d'anticorps dont certains seront capables de se lier à un antigène. Cependant, les Ig de ce répertoire ne se lient pas à un antigène avec une grande affinité et elles sont toutes du même isotype IgM. Il existe également deux autres mécanismes qui augmentent la diversité du répertoire d'anticorps après la recombinaison VDJ. L'hypermutation somatique (« Somatic HyperMutation » ; SHM) et la commutation isotypique (« Class-Switch Recombination » ; CSR) sont deux processus de mutagenèse intervenant après la rencontre entre une immunoglobuline présentée par une cellule B et un antigène. Ils se déroulent dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires qui sont les lieux de rencontre entre des antigènes et les cellules de l'immunité. La SHM permet d'améliorer l'affinité d'un anticorps et la CSR de remplacer la région constante d'une Ig pour modifier sa fonction et ses propriétés biologiques (Figure 3).

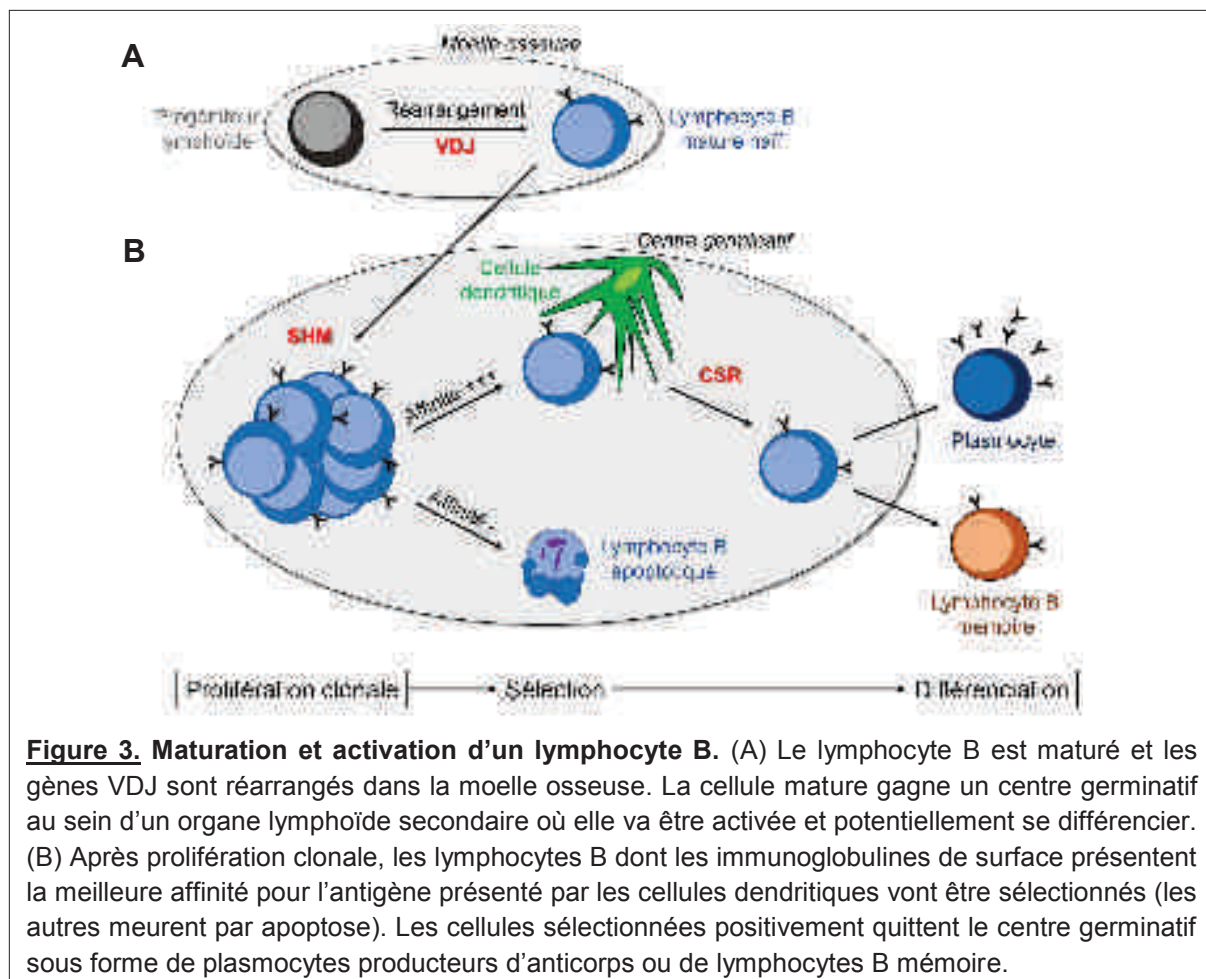


Figure 3. Maturation et activation d'un lymphocyte B. (A) Le lymphocyte B est maturé et les gènes VDJ sont réarrangés dans la moelle osseuse. La cellule mature gagne un centre germinatif au sein d'un organe lymphoïde secondaire où elle va être activée et potentiellement se différencier. (B) Après prolifération clonale, les lymphocytes B dont les immunoglobulines de surface présentent la meilleure affinité pour l'antigène présenté par les cellules dendritiques vont être sélectionnés (les autres meurent par apoptose). Les cellules sélectionnées positivement quittent le centre germinatif sous forme de plasmocytes producteurs d'anticorps ou de lymphocytes B mémoire.

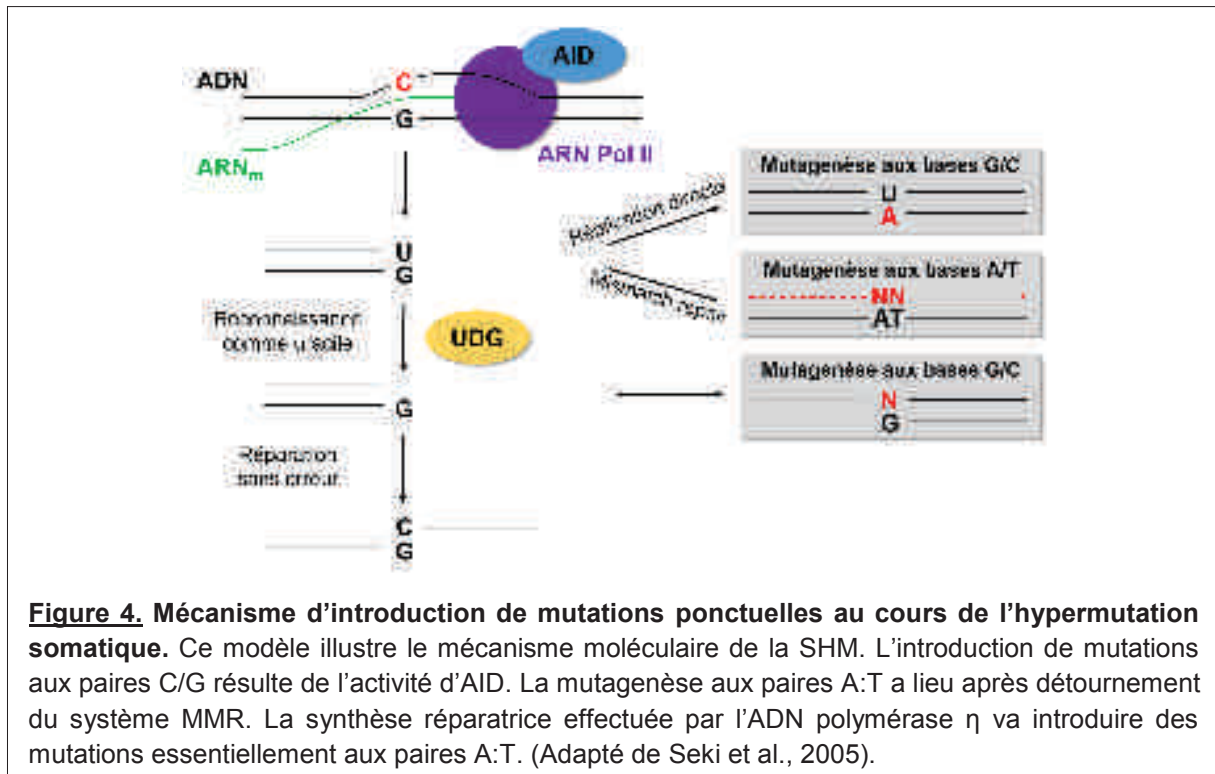
1.1.2.2. L'hypermutation somatique

La nature a mis au point un système très élaboré et original pour améliorer au cours du temps l'affinité des anticorps après le réarrangement qui conduit à la diversité et l'unicité des séquences variables. Il s'agit du phénomène d'hypermutation somatique qui a lieu principalement dans les centres germinatifs des ganglions lymphatiques, à la suite du premier contact avec l'antigène. De nombreuses études visant à élucider les mécanismes moléculaires de la SHM ont permis de montrer que cette mutagenèse est induite par l'enzyme AID (Activation-Induced cytidine Deaminase ; Muramatsu et al., 1999). AID catalyse la désamination d'une base nucléotidique, la cytosine (C), en uracile (U) au niveau du locus des gènes variables des immunoglobulines. Exprimée exclusivement au niveau des lymphocytes B localisés dans les centres germinatifs, elle cible les cytosines sur l'ADN simple brin généré au cours de la transcription (Sohail, 2003). Les transitions de cytosine en thymine (T) qui résultent de l'action d'AID sont liées aux propriétés codantes de l'uracile (appariement spécifique avec l'adénine). Cette enzyme cible très souvent les

cytosines situées dans le motif WRCY (W = A ou T, R = A ou G, et Y = C ou T) ou son complément RGYW : ce type de séquence est notamment appelé point chaud de mutagenèse ou « hotspot » (Teng & Papavasiliou, 2007).

Mais l'activité enzymatique d'AID ne suffit pas à elle seule à expliquer la mutagenèse qui a été observée au niveau des parties variables des gènes des immunoglobulines. En effet, l'apparition d'un U est un événement assez courant dans l'ADN et ce sont des uraciles glycosylases (UDG) qui sont à la clé de la reconnaissance et de l'élimination de cette base dans l'ADN. Dans le procédé d'hypermutation somatique, les mésappariements résultant de l'action d'AID ne sont pas réparés et des mutations dans les paires de bases A:T sont également observées. Ceci est notamment dû au système de réparation des mésappariements ou MMR (MisMatch Repair) qui va être « détourné » au cours de la SHM pour créer des mutations au niveau des parties variables des anticorps qui sont activement transcrites, en complément d'AID (Figure 4; Seki et al., 2005).

Dans les ganglions lymphatiques, les protéines MSH2 et MSH6 (MutS Homolog 2 et 6) forment un complexe et initient le mécanisme de MMR en reconnaissant les mésappariements U:G. Ce complexe va ensuite recruter l'ADN polymérase η qui en temps normal n'intervient pas dans ce système de réparation. L'ADN polymérase η appartient à la famille des ADN polymérases translésionnelles qui permettent le franchissement des lésions de l'ADN bloquant la progression de la fourche de réplication (ce mécanisme est détaillé dans la section 3.1.3.4. de l'introduction). Les ADN polymérases translésionnelles possèdent en outre la spécificité d'être très peu fidèles lors de la duplication d'un ADN non endommagé. Ces polymérases « infidèles » sont dénuées d'activité exonucléase 3' - 5' et leur taux d'erreurs est de 100 à 10 000 fois supérieur à celui des ADN polymérases réplicatives (Friedberg et al., 2002). Au cours de la SHM, l'ADN polymérase η va donc introduire pendant la synthèse réparatrice de nouvelles mutations essentiellement aux paires A:T et contribue ainsi à l'équilibre entre la fréquence d'apparition de mutations aux paires C:G et A:T. Le taux d'erreurs global de la SHM est compris entre 10^{-2} et 10^{-3} mutations par paire de base et par division cellulaire, ce qui justifie l'emploi du terme « hypermutation » (Delbos et al., 2007).



1.1.2.3. La commutation isotypique (ou commutation de classe)

Bien que l'hypermutation somatique et la commutation isotypique soient deux mécanismes indépendants régulés par différents types d'enzymes, l'activité d'AID est aussi à la base du processus de CSR. La commutation isotypique permet d'échanger le locus $C\mu$ (segment d'ADN exprimant le domaine constant de la chaîne lourde d'une IgM) par un autre locus afin d'exprimer une immunoglobuline d'un autre isotype sans changement de la spécificité antigénique. Cette modification s'effectue en fonction de la réponse immunitaire au cours de l'activation d'un lymphocyte B et correspond à un réarrangement irréversible de l'ADN. La commutation isotypique est un mécanisme complexe et hautement régulé. Il cible des régions spécifiques appelées «switch» ou S, situées en amont de tous les domaines constants (à l'exception de $C\delta$). Ces régions S sont des sites de recombinaison intra-chromosomique de longueur variable et riches en G-C (Li et al., 2004). A l'instar de la SHM, AID va catalyser la désamination de C en U au niveau des régions S. Dans ce cas, les mésappariement U:G résultants de l'activité d'AID sont à l'origine de cassures simple-brin qui, lorsqu'elles sont relativement proches les unes des autres, peuvent également conduire à des cassures double-brin de l'ADN. Le mécanisme de réparation NHEJ (Non-Homologous End

Joining) va pouvoir lier deux régions S à partir de cassures double-brin permettant ainsi la commutation de classe (Longerich et al., 2006).

En conclusion de ce chapitre, nous avons vu que la recombinaison VDJ, l'hypermutation somatique et la commutation isotypique sont les principaux mécanismes qui contribuent à générer la diversité des anticorps. Le potentiel thérapeutique des anticorps repose entre autres sur cette diversité, mais aussi sur l'évolution des techniques de biologie moléculaire et de l'expression recombinante.

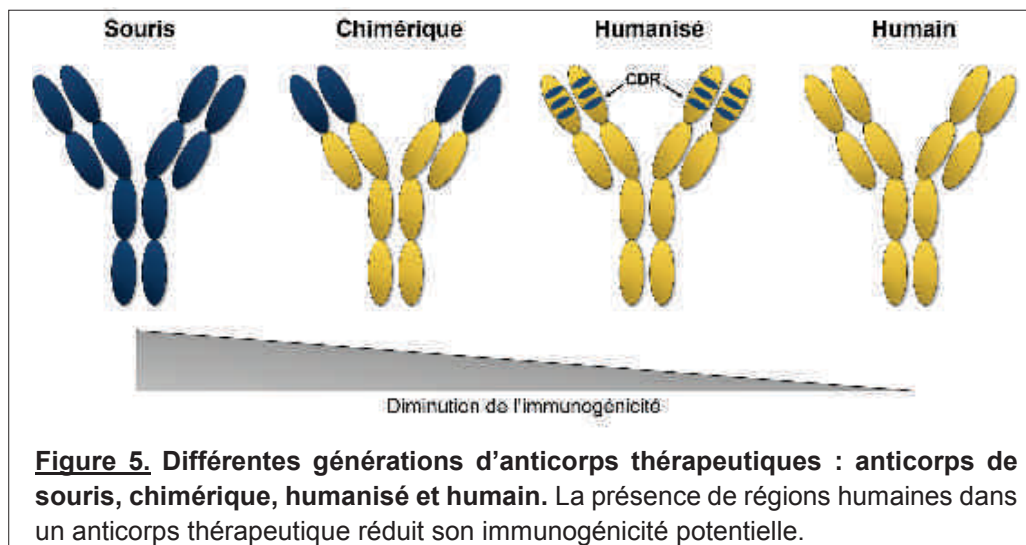
1.1.3. Les anticorps thérapeutiques

La découverte des mécanismes à l'origine de la diversité des anticorps et le clonage des gènes des immunoglobulines ont permis de développer des anticorps pour de nombreuses applications cliniques, et dans la recherche et le diagnostic. César Milstein et Georges Köhler ont radicalement bouleversé l'utilisation des anticorps en développant une technique permettant de produire des anticorps monoclonaux (mAb) *in vitro* à partir d'un hybridome résultant de la fusion entre une cellule myélomateuse et un lymphocyte B murin (Köhler et Milstein, 1975). Cette méthode a permis d'immortaliser des cellules B sécrétant un seul type d'anticorps par opposition aux anticorps polyclonaux constitués d'un mélange d'anticorps avec des spécificités variées qui sont obtenus à partir du prélèvement direct du sérum d'un animal immunisé avec un antigène. La découverte des hybridomes a révolutionné l'utilisation des anticorps dans le domaine de la recherche, le diagnostic et surtout la thérapie. En effet, les anticorps (1) sont capables de cibler un nombre d'antigènes potentiellement infini, (2) se caractérisent par une haute spécificité de liaison et une affinité importante pour leur antigène et (3) sont des molécules très stables grâce à leurs ponts disulfures intra- et inter-domaines.

Grâce à ces différentes caractéristiques, les anticorps monoclonaux ont été développés pour être utilisés en thérapie. Ils représentent une avancée majeure dans le traitement de plusieurs pathologies comme les cancers ou les maladies auto-immunes, mais aussi pour contrôler les réactions de rejet après une greffe d'organe. Une trentaine d'anticorps monoclonaux sont actuellement sur le marché et plus de 250 molécules sont en développement (Scott et al., 2012). Il existe plusieurs générations d'anticorps thérapeutiques. Les anticorps monoclonaux d'origine murine utilisés en

thérapie chez l'Homme induisent une réponse immunitaire et la production d'anticorps humains anti-souris (réponse HAMA pour Human Anti-Mouse Antibody), ce qui réduit considérablement leur effet thérapeutique et entraîne de nombreux effets secondaires. Les avancées technologiques dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis de développer rapidement de nouveaux types d'immunoglobulines plus proches des anticorps humains (Chames et al., 2009).

Le clonage des gènes des immunoglobulines a rendu possible la génération de nouveaux types d'anticorps : chimériques, humanisés et humains. Les régions variables responsables de la spécificité sont greffées sur des régions constantes d'origine humaine, réduisant ainsi l'immunogénicité des anticorps monoclonaux utilisés en thérapie (Figure 5). Selon une nomenclature internationale, les suffixes appliqués aux noms des anticorps thérapeutiques permettent d'identifier leur origine : -omab (murin), -ximab (chimérique), -zumab (humanisé) et -umab (humain).



1.1.3.1. Les anticorps chimériques

Les anticorps chimériques sont obtenus en greffant les fragments Fv d'un anticorps de souris sur les parties constantes d'immunoglobuline humaine C_H1, C_H2, C_H3 et C_L (Figure 5 ; Imai et Takaoka, 2006). Plusieurs anticorps chimériques sont actuellement commercialisés pour la thérapie du cancer. C'est le cas du rituximab dirigé contre le récepteur CD20 et qui est utilisé dans le traitement du lymphome non-hodgkinien. Même si globalement les anticorps chimériques sont moins immunogènes que les IgG de souris de par la proportion réduite de séquences murines, il arrive que certains patients produisent des anticorps anti-souris dirigés contre les régions

charpentes des domaines variables (Lobuglio et al., 1989 ; Baert et al., 2003). Les réactions immunitaires de type HACA (Human Anti-Chimeric Antibody) reste un problème même si les anticorps monoclonaux chimériques sont solidement implantés sur le marché des biomédicaments (Tableau 2).

1.1.3.2. Les anticorps humanisés

D'autres anticorps dits humanisés ont vu le jour en 1986 (Jones et al., 1986). Ces anticorps sont construits en greffant les régions hypervariables murines sur la charpente d'un anticorps humain, ce qui permet de substituer les boucles CDR de l'IgG humaine par celles de l'anticorps monoclonal de souris d'intérêt (Figure 5). Cette technique est appelée « CDR grafting » (Chames et al., 2009). Même si les réactions immunitaires sont très rares chez les patients traités avec des anticorps humanisés, l'obtention de ce type de biomédicament est un processus complexe dont la réussite n'est pas garantie.

En effet, le CDR grafting ne peut pas être appliqué à tous les anticorps (Fransson et al., 2010). L'organisation du paratope dépend grandement de la structure des régions charpentes. Le greffage de régions CDR murines sur un anticorps humain conduit souvent à des paratopes d'affinité et de spécificité plus faible pour la cible d'intérêt. Il est nécessaire que les résidus essentiels à la liaison ne soient situés que sur les boucles CDR et que l'assemblage des régions V_H et V_L ne soit pas modifié par la greffe de CDRs murins (Foote & Winter, 1992). Des modifications supplémentaires comme des mutations ponctuelles ciblées peuvent être introduites dans la charpente du fragment Fv afin de restaurer l'affinité et la spécificité des anticorps humanisés par rapport à leurs analogues murins (Ewert et al., 2009). Bien que la technologie nécessaire pour produire des anticorps monoclonaux humanisés soit lourde à mettre en œuvre, ils représentent la classe principale d'anticorps sur le marché avec une quinzaine de molécules (Tableau 2).

Tableau 2. Liste des anticorps monoclonaux approuvés pour la thérapie. (Adapté de www.antibodysociety.org)

International non-proprietary name	Trade name	Type	Indication first approved	First EU (US) approval year
Muromonab-CD3	Orthoclone Oki3	Anti-CD3; Murine IgG2a	Reversal of kidney transplant rejection	1986 (1986)
Abciximab	Reopro	Anti-GP IIb/IIIa; Chimeric IgG1F Fab	Prevention of blood clots in angioplasty	1995 (1994)
Rituximab	MabThera, Rituxan	Anti-CD20; Chimeric IgG1	Non-Hodgkin's lymphoma	1998 (1997)
Basiliximab	Simulect	Anti-IL2R; Chimeric IgG1	Prevention of kidney transplant rejection	1998 (1998)
Palivizumab	Synagis	Anti-RSV; Humanized IgG1	Prevention of respiratory syncytial virus infection	1999 (1998)
Infliximab	Remicade	Anti-TNF; Chimeric IgG1	Crohn disease	1999 (1998)
Trastuzumab	Herceptin	Anti-HER2; Humanized IgG1	Breast cancer	2000 (1998)
Alemtuzumab	MabCampath, Campath-1H	Anti-CD52; Humanized IgG1	Chronic myeloid leukemia	2001(2001)
Adalimumab	Humira	Anti-TNF; Human IgG1	Rheumatoid arthritis	2003 (2002)
Tositumomab-I131	Bexxar	Anti-CD20; Murine IgG2a	Non-Hodgkin lymphoma	NA (2003)
Cetuximab	Erlitux	Anti-EGFR; Chimeric IgG1	Colorectal cancer	2004 (2004)
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	Anti-CD20; Murine IgG1	Non-Hodgkin's lymphoma	2004 (2002)
Omalizumab	Xolair	Anti-IgE; Humanized IgG1	Asthma	2005 (2003)
Bevacizumab	Avastin	Anti-VEGF; Humanized IgG1	Colorectal cancer	2005 (2004)
Natalizumab	Tysabri	Anti-a4 integrin; Humanized IgG4	Multiple sclerosis	2006 (2004)
Ranibizumab	Lucentis	Anti-VEGF; Humanized IgG1F Fab	Macular degeneration	2007 (2006)
Panitumumab	Vectibix	Anti-EGFR; Human IgG2	Colorectal cancer	2007 (2006)
Eculizumab	Soliris	Anti-C5; Humanized IgG2/4	Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	2007 (2007)
Certolizumab pegol	Cimzia	Anti-TNF; Humanized Fab, pegylated	Crohn disease	2009 (2008)
Golimumab	Simponi	Anti-TNF; Human IgG1	Rheumatoid and psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis	2009 (2009)
Canakinumab	Ilaris	Anti-IL1b; Human IgG1	Muckle-Wells syndrome	2009 (2009)
Catumaxomab	Removab	Anti-EPCAM/CD3; Rat/mouse bispecific mAb	Malignant ascites	2009 (NA)
Ustekinumab	Stelara	Anti-IL17/23; Human IgG1	Psoriasis	2009 (2009)
To cilizumab	RoActemra, Actemra	Anti-IL6R; Humanized IgG1	Rheumatoid arthritis	2009 (2010)
Ofatumumab	Arzerra	Anti-CD20; Human IgG1	Chronic lymphocytic leukemia	2010 (2009)
Denosumab	Prolia	Anti-RANK-L; Human IgG2	Bone Loss	2010 (2010)
Belimumab	Benlysta	Anti-BLyS; Human IgG1	Systemic lupus erythematosus	2011(2011)
Ipilimumab	Yervoy	Anti-CTLA-4; Human IgG1	Metastatic melanoma	2011(2011)
Brentuximab vedotin	Adcetris	Anti-CD30; Chimeric IgG1; immunocojugate	Hodgkin lymphoma	2012 (2011)
Pertuzumab	Perjeta	Anti-HER2; humanized IgG1	Breast Cancer	2013 (2012)
Raxibacumab	(Pending)	Anti-B. anthracis P.A; Human IgG1	Anthrax infection	NA (2012)
Trastuzumab emtansine	Kadcyla	Anti-HER2; humanized IgG1; immunocojugate	Breast cancer	In review (2013)

1.1.3.3. Les anticorps humains

Afin d'éviter les réactions d'hypersensibilité observées avec les anticorps contenant encore des séquences murines, la production d'anticorps entièrement humains a été développée et repose principalement sur deux méthodologies : les banques combinatoires de régions variables d'anticorps et les souris transgéniques exprimant les gènes des immunoglobulines humaines.

Les banques combinatoires sont construites en associant aléatoirement les gènes des parties variables V_H et V_L des immunoglobulines humaines provenant de cellules B issues de donneurs naïfs ou immunisés. Les fragments d'anticorps correspondant aux régions variables sont ensuite exprimés à la surface de micro-organismes comme le phage filamenteux M13 ou la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Hoogenboom, 2005). Les fragments d'anticorps exprimés sont testés *in vitro* contre un antigène d'intérêt et les fragments sélectionnés sont séquencés puis clonés afin de reconstituer une IgG totalement humaine (la sélection de fragments d'anticorps à partir de banques sera présentée dans la section 1.3.3. de l'introduction). L'adalimumab (dirigé contre le TNF α , nom commercial Humira®) est le premier anticorps humain obtenu grâce à cette technologie et a été mis sur le marché en 2002 dans le cadre du traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Tableau 2).

Cependant, la majorité des anticorps humains commercialisés proviennent de l'immunisation de souris transgéniques puisque pas moins de sept anticorps sont approuvés pour une utilisation clinique (Tableau 2). Chez ces « xenomice », les gènes des Ig ont été inactivés et substitués par ceux des immunoglobulines humaines (Lonberg, 2005). Les souris sont immunisées avec un antigène d'intérêt et l'obtention d'anticorps humains se fait par la technique des hybridomes en fusionnant une cellule B murine (exprimant des IgG humaines) avec un myélome. En dépit des problèmes rencontrés pour développer ce type de molécules, les anticorps humains représentent une part importante des essais cliniques.

En conclusion, malgré le succès des anticorps monoclonaux dans la thérapie et en particulier dans le traitement du cancer, il existe plusieurs limites à l'utilisation de ces biomolécules, notamment leur coût très élevé de production et leur taille importante qui empêche leur pénétration dans les tumeurs solides. Il est possible d'utiliser des fragments d'anticorps recombinants ou naturels qui offrent une alternative

intéressante aux anticorps conventionnels, même si leurs applications thérapeutiques sont encore très limitées.

1.2. Les différents formats d'anticorps

L'émergence de l'ingénierie moléculaire a permis d'obtenir différents formats d'anticorps qui peuvent être produits plus facilement que les anticorps complets grâce à leur taille plus réduite et une structure moins complexe. Comme évoqué dans la section précédente, les fragments d'anticorps peuvent être sélectionnés *in vitro* à partir de banques combinatoires au contraire d'une IgG complète dont le clonage et la masse moléculaire empêchent sa présentation à la surface d'un phage filamenteux ou d'une levure. Il existe de nombreux formats d'anticorps et tous possèdent la région capable de lier spécifiquement l'antigène et une délétion partielle ou totale de la région Fc (Figure 6). Les Fab et les scFv (single-chain Fragment variable) sont les formats d'anticorps les plus couramment utilisés et sont obtenus par digestion enzymatique d'une IgG ou par voie recombinante.

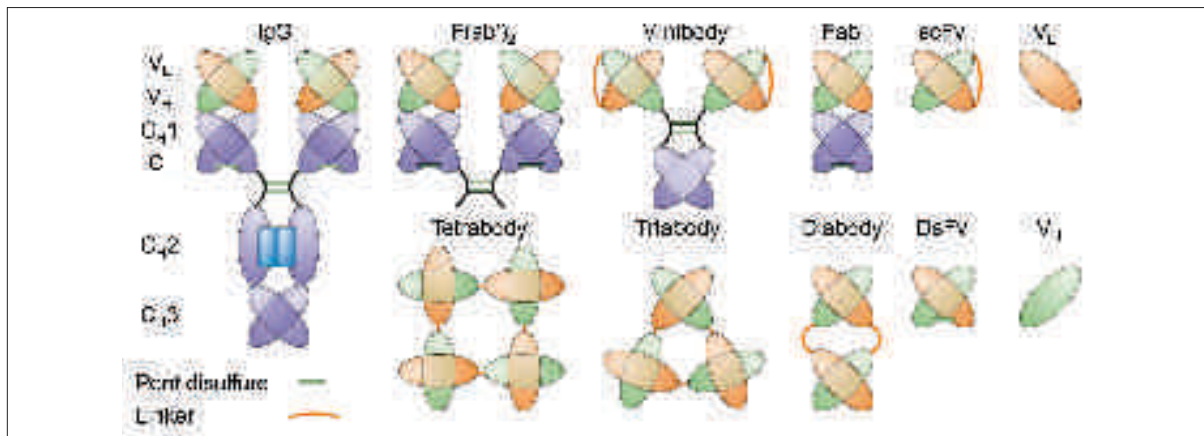


Figure 6. Représentation schématisique de différents formats d'anticorps (liste non exhaustive). L'architecture en domaines des IgG a été exploitée pour construire plusieurs types de fragments d'anticorps dont la masse moléculaire est comprise entre 12 et 150 kDa et sous forme monovalente ($n = 1$) à tétravalente ($n = 4$). Tous les formats présentés ici sont sous forme mono-spécifique, mais il est possible de créer grâce à leur multivalence des fragments d'anticorps capables de se lier à deux ou plusieurs antigènes (multi-spécificité). (Adapté de Carter, 2006).

1.2.1. Le format Fab

Les formats Fab (~55 kDa) et F(ab')₂ (~110 kDa) ont été les premiers fragments d'anticorps développés. Ils sont obtenus après clivage protéolytique d'une IgG par la papaïne ou la pepsine (Figure 7). La papaïne clive un anticorps en deux fragments Fab et un fragment Fc. La pepsine conduit à la formation d'un fragment F(ab')₂ composé de deux Fab reliés par une liaison covalente, la partie Fc est digérée en petit fragments. Le format F(ab')₂ conserve une activité de liaison et une affinité pour l'antigène identique à celles de l'anticorps entier. Il est également possible d'obtenir des Fab recombinants exprimés chez *Escherichia coli* (*E. coli*), mais le rendement de production est très faible. A l'heure actuelle, deux Fab sont utilisés en immunothérapie : l'abciximab dirigé contre les récepteurs des glycoprotéines IIb/IIIa des thrombocytes est utilisé comme antiagrégant plaquettaire pour prévenir les risques d'infarctus du myocarde ; le certolizumab (dirigé contre le TNFα) est indiqué dans le traitement de la maladie de Crohn (Tableau 2 ; Chames et al., 2009).

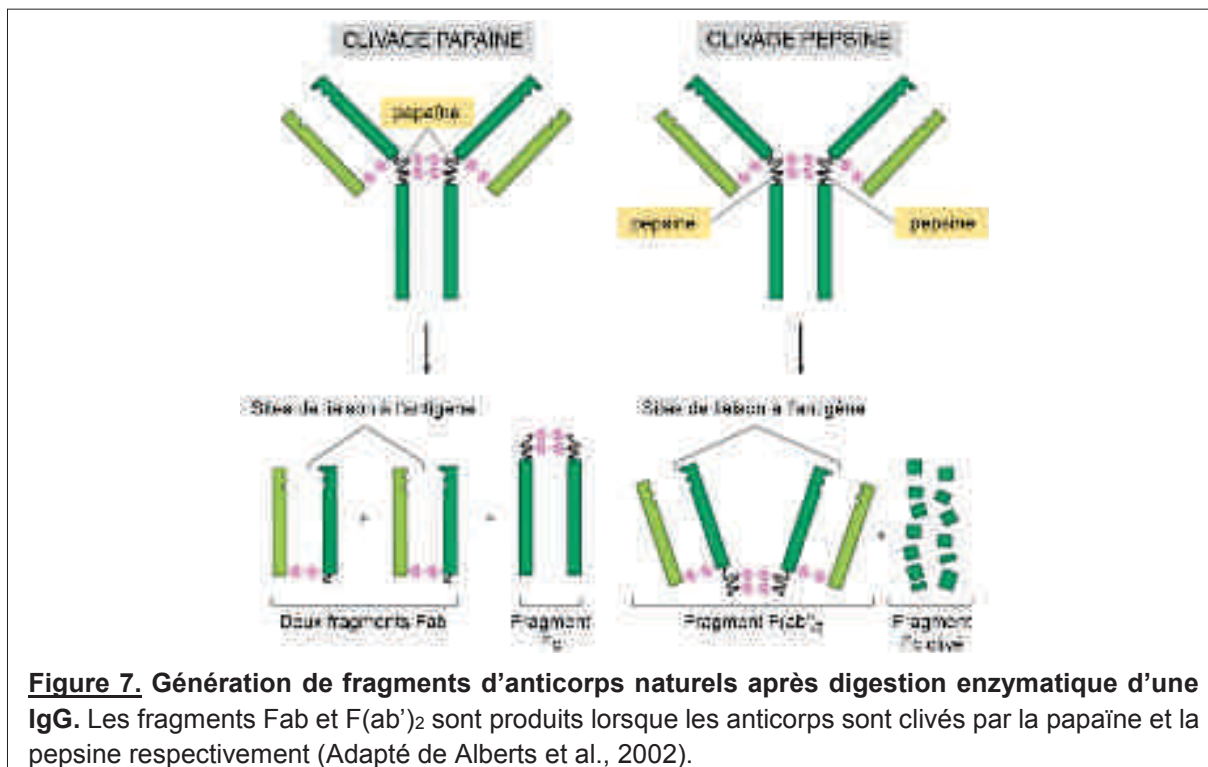


Figure 7. Génération de fragments d'anticorps naturels après digestion enzymatique d'une IgG. Les fragments Fab et F(ab')₂ sont produits lorsque les anticorps sont clivés par la papaïne et la pepsine respectivement (Adapté de Alberts et al., 2002).

1.2.2. Le format scFv

L'expression d'une protéine résultant de la fusion génétique des deux domaines V_H et V_L d'un anticorps a été décrite pour la première fois en 1988 (Huston et al., 1988). Ce type de format d'anticorps appelé scFv est constitué des régions variables légères et lourdes d'un anticorps reliés par un lien peptidique appelé « linker » de 10 à 25 acides aminés, le tout pour une masse moléculaire d'environ 25 kDa (Figure 6). Le « linker » est généralement composé d'une répétition de résidus glycine et sérine qui apportent flexibilité et solubilité (Weisser & Hall, 2009). Un scFv se lie à son antigène avec la même spécificité et affinité que l'anticorps dont il est dérivé, mais avec une avidité plus faible puisque le scFv est une molécule monovalente contrairement à une IgG qui est bivalente et présente deux sites d'interaction avec son antigène.

En règle générale, les domaines variables d'un scFv sont organisés sous la forme V_H-V_L même s'ils peuvent être agencés sous forme V_L-V_H et l'orientation des domaines a un effet sur l'activité de liaison du scFv (Desplancq et al., 1994). A partir du format scFv ont été développés d'autres formats comme les diabodies qui sont des dimères de scFv possédant deux domaines de liaison à l'antigène. Un diabody peut être un homo-dimère (bivalent) ou hétéro-dimère possédant des spécificités différentes (diabody bispécifique).

Les applications des scFv sont pour le moment principalement limitées à la recherche fondamentale où ils sont utilisés pour détecter et/ou neutraliser une protéine. Il est possible de les produire à grande échelle à moindre coût et grâce à leur petite taille, leurs caractéristiques pharmacocinétiques sont meilleures que les anticorps monoclonaux. Néanmoins, ceci limite également leur utilisation thérapeutique puisqu'ils sont éliminés rapidement de la circulation (Monnier et al., 2013). Pour augmenter leur demi-vie, il est possible de multimériser les scFv sous la forme de triabodies, tetrabodies et minibodies (Figure 6). Ces formats basés sur celui du scFv sont notamment utilisés *in vivo* pour des applications d'imagerie.

1.2.3. Le format V_HH (« Nanobody »)

Il est également possible d'utiliser des fragments d'anticorps constitués d'un seul domaine. Ils sont dérivés d'immunoglobulines dénuées de chaîne légère et de domaine C_H1 qui existent naturellement chez les camélidés, en sus des anticorps conventionnels : on parle de HcAb (Heavy chain only Antibodies ; Hamers-Casterman et al., 1993). Le format d'anticorps dérivé de ces Ig est capable de lier son antigène uniquement par son domaine V_H (~15 kDa) et par conséquent est appelé V_HH ou « nanobody ». Contrairement aux domaines V_H humains, les V_HH sont généralement solubles et peuvent être produits de façon efficace chez *E. coli* ou la levure. Malgré leur petite taille, les « nanobodies » sélectionnés chez des animaux immunisés présentent des affinités similaires à celles des anticorps humains. De plus, ils sont très stables puisqu'ils sont capables de recouvrer leur activité après une incubation à 80–90°C et ils sont actifs en milieu réducteur (Dumoulin et al., 2002 ; Tanaka et al., 2003). Par conséquent, ils résistent très bien à la réduction cytoplasmique et peuvent être utilisés comme anticorps intracellulaires.

A l'instar des scFv présentés précédemment, il est possible de former des formats plus complexes dérivés des V_HH en les multimérisant afin d'augmenter leur affinité apparente par effet d'avidité (Zhang et al., 2004). Il a également été montré que l'on peut « humaniser » des V_HH en substituant certains acides aminés dans la charpente du V_HH. Enfin, plusieurs « nanobodies » sont déjà en phase d'essai clinique ce qui témoigne du potentiel de ce type de molécules (Vincke et al., 2009).

En résumé, nous avons décrit les principaux types de fragments d'anticorps qui sont utilisés en tant qu'outils de recherche fondamentale pour étudier la fonction d'une protéine, mais aussi pour développer de nouveaux outils thérapeutiques. Ils sont plus faciles à manipuler et à produire que les anticorps conventionnels. Ainsi, les fragments d'anticorps sont particulièrement adaptés pour l'expression à la surface de phages filamenteux ou de levures utilisés pour construire des banques d'anticorps recombinants.

1.3. Les banques de fragments d'anticorps recombinants

1.3.1. Les banques naïves

Le répertoire immunitaire naïf correspond à l'ensemble des cellules B exprimant des immunoglobulines avant leur rencontre avec un antigène donné. Il contient des anticorps capables de se lier potentiellement à n'importe quelle cible avec une affinité modérée. Ce répertoire provient du réarrangement VDJ des gènes des parties variables des immunoglobulines au niveau des précurseurs des lymphocytes B avant la maturation d'affinité qui a lieu après la rencontre avec l'antigène. Chaque cellule B exprime une seule combinaison de domaines V_H et V_L . Les gènes V de ces cellules peuvent être amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction) à partir d'ARNm (ARN messenger) de cellules B de sujets non-immunisés, associés de façon aléatoire, puis clonés sous la forme de scFv dans un système tel que le phage filamenteux M13 afin d'obtenir une banque combinatoire qualifiée de naïve naturelle (Griffiths et al., 1993).

Les banques naïves dites semi-synthétiques sont construites à partir des gènes V, D et J non réarrangés. Leur réarrangement est effectué *in vitro* en augmentant la diversité des boucles hypervariables par PCR en utilisant par exemple des oligonucléotides aléatoires s'hybridant au niveau des régions CDR (Hoogenboom & Winter, 1992). La plupart des banques combinatoires sont diversifiées uniquement au niveau des boucles CDR3. En effet, ce sont les régions les plus variables (séquence et nombre d'acides aminés) dans les immunoglobulines et il a été montré qu'il suffit de diversifier les régions CDR3 pour générer des fragments d'anticorps contre un large éventail de protéines (Silacci et al., 2005).

Les banques naïves sont particulièrement intéressantes pour sélectionner des anticorps humains contre une cible pour laquelle l'immunisation est impossible comme par exemple une protéine non immunogène ou un agent pathogène mortel. En revanche, en raison de l'absence d'immunisation et donc de maturation d'affinité, l'inconvénient majeur des banques naïves est l'obtention de molécules se liant à un antigène avec une affinité modérée.

1.3.2. Les banques immunes

Lorsqu'une banque est construite à partir d'une source immunisée (animal immunisé ou humain naturellement immunisé ou infecté), des fragments d'anticorps de forte affinité pour leur antigène peuvent être sélectionnés (Burton et al., 1991). En effet, les clones d'une telle banque proviennent d'individus immunisés, ils ont donc subi une maturation d'affinité contrairement à une banque combinatoire formée à partir d'un répertoire naïf. La construction d'une banque immune est contraignante puisqu'il est nécessaire de créer une nouvelle banque pour chaque antigène en immunisant un individu (souris, poule, macaque par exemple) sachant que l'antigène n'est pas forcément immunogène.

1.3.3. La sélection de fragments d'anticorps à partir de banques

Plusieurs systèmes de sélection de fragments d'anticorps recombinants à partir de banques combinatoires ont été développés dont l'expression de protéines à la surface de phages filamenteux (« phage display ») qui est la méthode la plus couramment utilisée. La puissance de cet outil réside dans le lien entre la protéine présentée (phénotype) et l'information génétique encodée par le phage (génotype). Dans notre étude, nous nous intéressons à l'expression de scFv à la surface du bactériophage M13 (phage-scFv).

1.3.3.1. Le système « phage display »

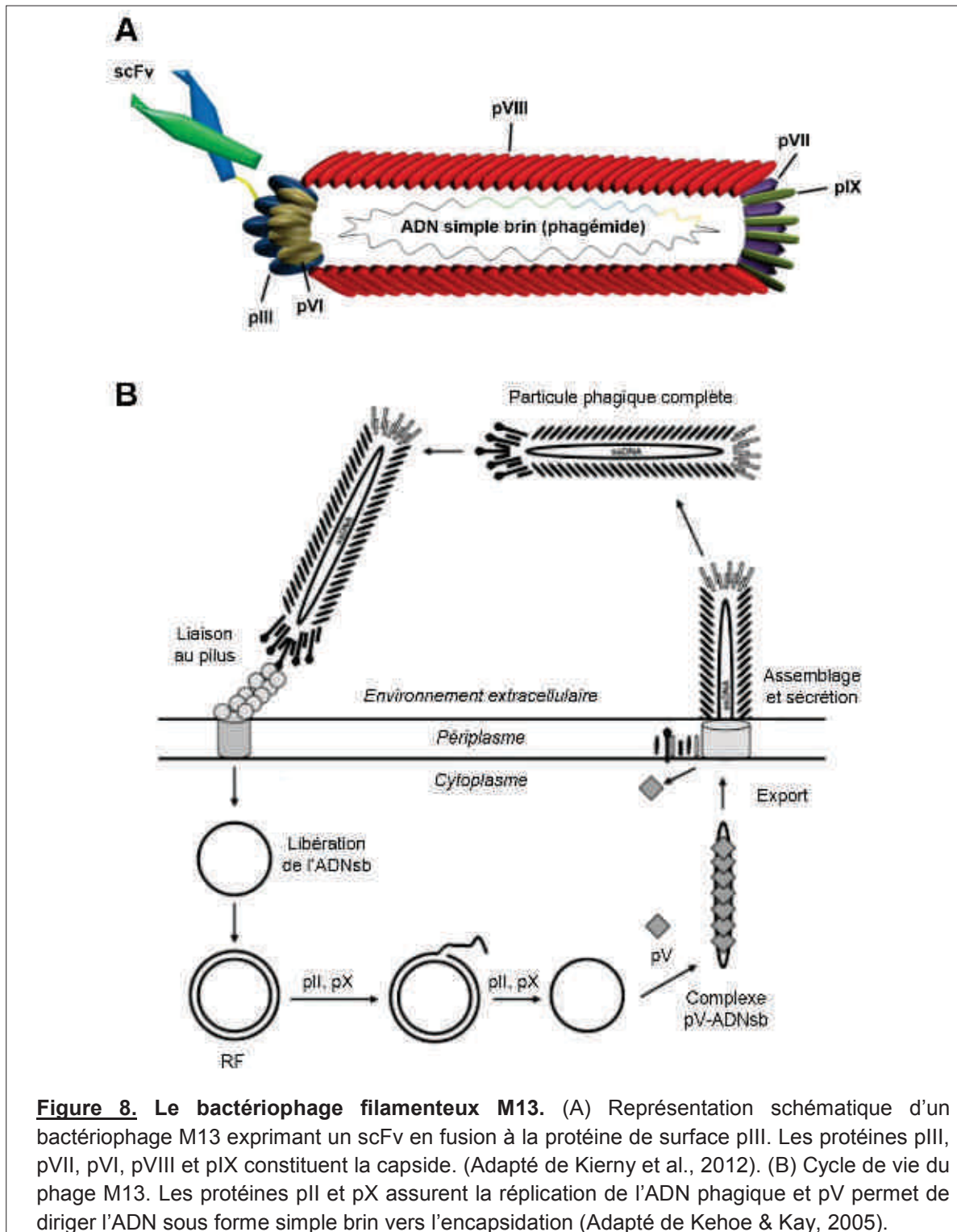
1.3.3.1.1. *Le bactériophage M13*

Cycle de vie du bactériophage M13. Le bactériophage (appelé également phage) M13 forme un cylindre flexible de 6,5 nm de diamètre dont la longueur dépend de l'ADN encapsidé (Figure 8A ; Makowski, 1994). Il appartient à la famille des phages filamenteux. Ils infectent les souches d'*E. coli* possédant un pilus dont la séquence codante est présente sur le facteur conjugatif F. L'infection est initiée par l'interaction entre l'extrémité du pilus et la protéine de surface pIII (produit du gène III) du phage. Les protéines de la capside du phage s'intègrent dans la membrane bactérienne permettant à l'ADN simple brin (ADNsb) phagique de pénétrer dans le cytoplasme de la bactérie (Bratkovič, 2009). Les enzymes bactériennes synthétisent le brin

complémentaire et l'ADN phagique est converti sous forme superenroulée RF (Replicative Form), qui va servir de matrice pour produire les protéines du phage. Les nouvelles particules phagiques sont assemblées au niveau de la membrane interne de la bactérie et ce processus est qualifié de non-lytique puisque le phage M13 ne lyse pas la cellule hôte (Figure 8B). La production de telles particules est bien tolérée par la bactérie qui continue à se diviser bien que deux fois plus lentement qu'une souche non infectée (Kehoe & Kay, 2005).

Les protéines du phage. La capsid du phage M13 est formée par les protéines pIII, pVI, pVII, pVIII et pIX. Elles sont toutes intégrées dans la membrane interne de la bactérie avant d'être assemblées sous forme de capsid. Une extrémité de la particule phagique contient cinq protéines pVII et cinq pIX ; l'autre extrémité présente cinq protéines pIII et cinq pVI. La protéine pVIII est la plus abondante puisque près de 2700 copies de cette protéine forment le cylindre protéique entourant l'ADN (Figure 8A ; Kehoe & Kay, 2005). Les protéines pII et pX assurent la réplication proprement dite et pV stabilise la forme d'ADN simple brin (ADN sb) générée et la dirige vers l'encapsidation (Figure 8B).

Le phagémide. Un phagémide est un plasmide qui contient un signal d'encapsidation, une origine de réplication phagique et un gène de résistance à un antibiotique. A l'instar d'un plasmide « classique », ce type de vecteur a la capacité de se maintenir et se répliquer chez *E. coli*. Le phagémide contient le gène de la protéine pIII, ce qui permet de cloner la séquence codante de fragments d'anticorps en fusion à celle de la protéine de surface. Il ne possède pas les gènes indispensables à la synthèse de particules phagiques. En effet, la bactérie contenant un phagémide est surinfectée par un phage auxiliaire également appelé « helper » qui apporte les gènes codant pour les protéines nécessaires à la réplication et l'encapsidation du génome de phage, puis l'ADN sb du phagémide est incorporé dans une particule phagique infectieuse (Mead & Kemper, 1988). L'origine du phage auxiliaire est modifiée pour qu'elle soit moins efficace que celle du phagémide. Ce phage confère à la bactérie infectée la résistance à un second antibiotique, différent de celui de phagémide afin de sélectionner uniquement les bactéries co-infectées.



L'expression de fragments d'anticorps en fusion avec la protéine pIII sans phagémide (et donc sans phage auxiliaire) est possible, mais les phages génétiquement modifiés sont moins stables car la séquence codante des fragments d'anticorps sont très souvent délétées (Hoogenboom et al., 2005). La construction de larges banques et la production de l'ADN phagique sont moins aisées, c'est pourquoi

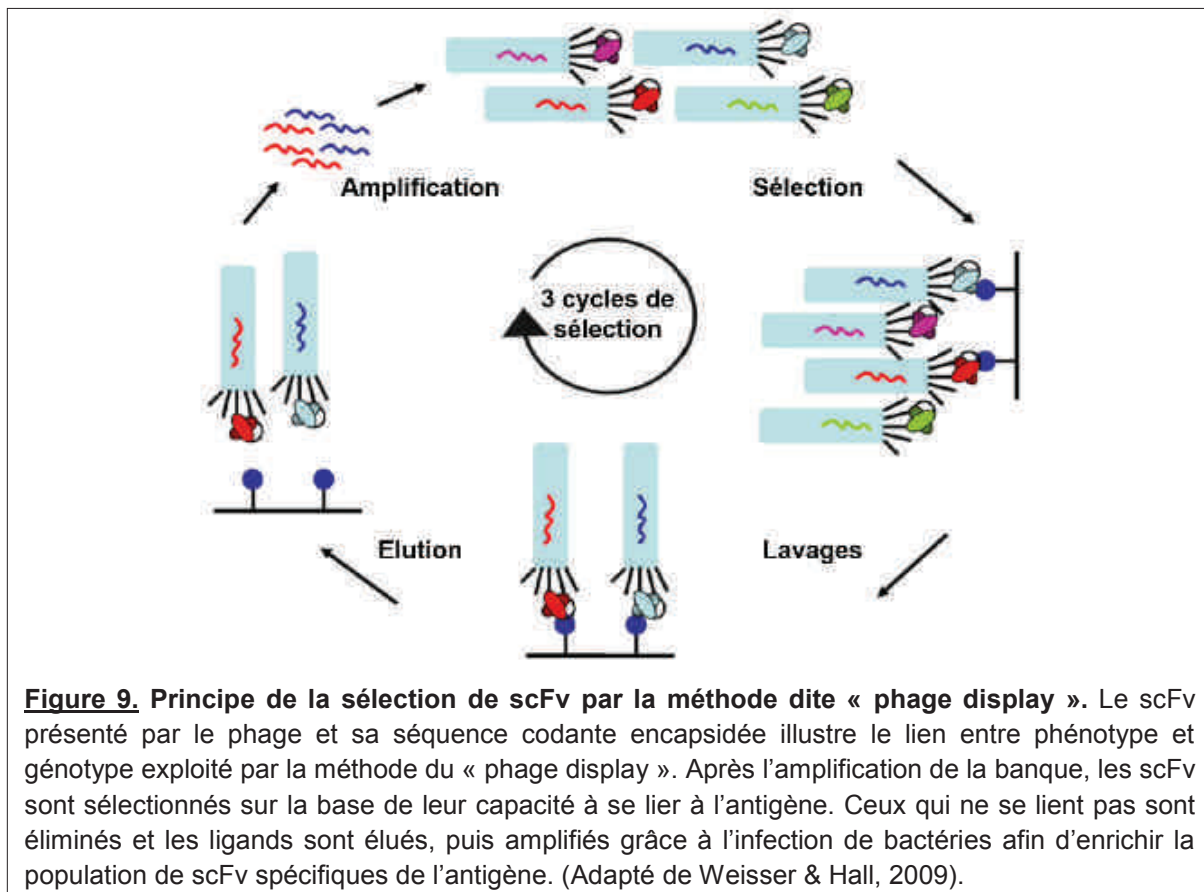
le système phagémide est le plus couramment utilisé pour générer des banques de fragments d'anticorps qui peuvent facilement être criblés par la méthode du « phage display » (Hoogenboom et al., 1991).

1.3.3.1.2. *La sélection de fragments d'anticorps par la méthode dite « phage-display »*

La présentation de polypeptides recombinants à la surface de phages filamenteux a été décrite pour la première fois en 1985 (Smith, 1985). La méthode dite « phage-display » permet de fusionner les séquences codantes de fragments d'anticorps à l'extrémité amino-terminale du gène de la protéine pIII du phage filamenteux (Figure 8A). Il est également possible de fusionner des fragments d'anticorps à la protéine pVIII, mais il a été démontré que l'expression de la fusion pIII-scFv est plus efficace (Kretzschmar & Geiser, 1995).

Les phages exprimant un fragment d'anticorps à leur surface sont sélectionnés par affinité pour une cible. En règle générale, l'antigène (peptide, protéine) purifié est présenté directement sur un support solide comme un puits de plaque 96 puits ou des billes magnétiques ; il peut également être immobilisé via une étiquette peptidique ou une autre protéine (anticorps, ...) sur ces supports. La banque combinatoire de phages-scFv est incubée en présence de l'antigène. Après lavages, les phages-scFv fixés sur la cible sont élués et amplifiés grâce à l'infection de bactéries. Après amplification, les phages-scFv sont purifiés et à nouveau mis en présence du même antigène pour être sélectionnés : on parle de cycle de sélection-amplification (Figure 9). Chaque cycle permet d'enrichir progressivement la population de phages-scFv reconnaissant spécifiquement l'antigène. En règle générale, les phages-scFv ainsi sélectionnés sont analysés après trois tours de sélection-amplification.

Cette méthode très performante permet d'isoler un clone rare spécifique à partir d'une banque contenant plus de 10^8 phages (Marks et al., 1992). Bien que la méthode dite « phage-display » soit la plus couramment utilisée, il existe d'autres méthodes de sélection qui reposent sur le même principe de sélection-amplification comme le « yeast display » et le « ribosome display ».

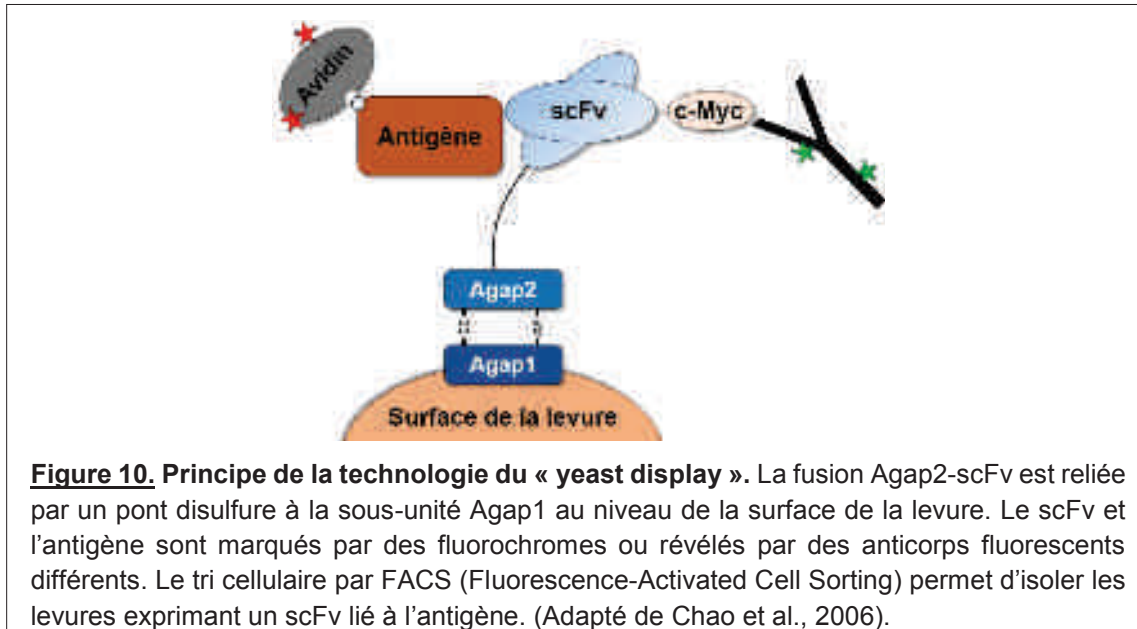


1.3.3.2. Les autres « display »

1.3.3.2.1. *Yeast display*

L'expression de fragments d'anticorps est souvent plus efficace dans les systèmes eucaryotes que dans les bactéries. En effet, les modifications post-traductionnelles et les voies de sécrétion des protéines sont assurées chez la levure. Cet avantage est exploité par la méthode du « yeast display » dans laquelle les fragments d'anticorps sont exprimés à la surface de la levure en fusion à une protéine membranaire. Les scFv sont fusionnés à l'extrémité carboxy-terminale de la séquence codante de la sous-unité Agap2 de l' α -agglutinine, un récepteur d'adhésion présent sur la membrane de la levure. La fusion Agap2-scFv est reliée à la sous-unité Agap1 par un pont disulfure (Figure 10 ; Chao et al., 2006). Chaque levure présente entre 10^4 et 10^5 exemplaires de scFv. De la même façon que les phages-scFv, il est possible de construire une banque de fragments d'anticorps chez la levure, mais la taille de celle-ci est très limitée (10^6 à 10^7 clones ; Boder & Wittrup, 1997). L'avantage principal de la technologie du « yeast display » réside dans son association avec la cytométrie en flux. Le tri cellulaire par FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) permet de

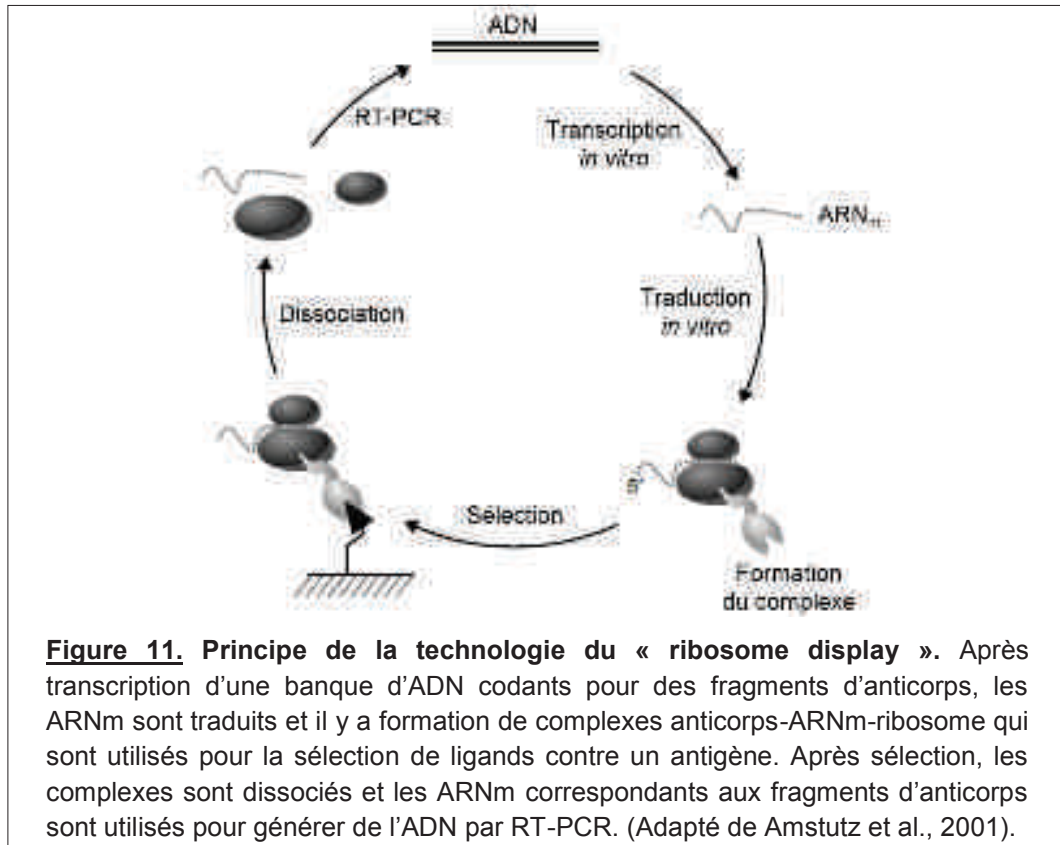
discriminer entre des clones qui ont une affinité différente pour la cible, offrant ainsi la possibilité de sélectionner directement les fragments d'anticorps qui ont la meilleure affinité pour l'antigène (Doerner et al., 2013).



1.3.3.2.2. Ribosome display

Le « ribosome display » permet d'isoler des anticorps recombinants totalement *in vitro*. Une banque de séquences d'ADN codant pour des fragments d'anticorps fusionnés génétiquement à une séquence « spacer » est transcrite en ARNm. Ensuite, la traduction de l'ARNm est bloquée grâce au « spacer » de telle sorte que la protéine néo-synthétisée reste attachée au ribosome, et donc à son ARNm. Ce complexe protéine-ARNm-ribosome peut être sélectionné en fonction de la capacité de liaison à un antigène donnée. L'ARN messager est récupéré et sert de matrice lors d'une réaction de RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) afin d'obtenir la séquence d'ADN codant pour le fragment d'anticorps sélectionné (Figure 11). Une nouvelle transcription / traduction *in vitro* permet de faire des tours de sélection supplémentaires (Hanes & Plückthun, 1997). Le « ribosome display » permet de générer des banques de très grande taille (10^{12} à 10^{13} clones) puisque ce système n'est pas limité par une étape de transformation dans un organisme. La sélection peut également être effectuée en conditions réductrices afin d'isoler des fragments d'anticorps qui résistent à la réduction cytoplasmique et qui peuvent être exploités en tant qu'anticorps intracellulaires (Amstutz et al., 2001). Cependant, cette technique est moins robuste que le « phage display » en raison de la fragilité de l'ARNm qui limite

les possibilités de sélection. Bien que cette technologie soit « théoriquement » optimale, il n'y a que très peu d'exemples dans la littérature de fragments d'anticorps sélectionnés par « ribosome display » (Finlay et al., 2009).



1.3.3.3. Evolution moléculaire *in vitro*

Les méthodes de « display » présentées ci-dessus miment la sélection clonale des cellules B par expression de fragments d'anticorps à la surface d'un organisme ou *in vitro*. Le parallèle entre ces techniques de sélection et le système immunitaire ne s'arrête pas là. En effet, après avoir obtenu des fragments d'anticorps spécifiques d'une cible à partir d'une banque combinatoire naïve, il est possible d'effectuer une maturation d'affinité *in vitro* afin d'améliorer leur activité de liaison à l'antigène. Plusieurs méthodes sont employées comme par exemple l'« error-prone » PCR (epPCR) qui introduit des mutations ponctuelles de façon aléatoire dans la séquence nucléotidique codant pour un fragment d'anticorps d'intérêt. Une nouvelle banque de variants peut ainsi être construite afin de sélectionner des clones d'affinité accrue (Daugherty et al., 2000 ; Van Blarcom et al., 2010). En alternant des cycles d'introduction de mutations et de sélection par phage-display (ou par une autre

méthode), ce type d'approche mime la maturation d'affinité qui a lieu *in vivo* au niveau des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires.

Pour conclure, plusieurs méthodes de sélection permettent d'isoler des fragments d'anticorps à partir de banques. Notre laboratoire a récemment construit et validé une banque naïve semi-synthétique de scFv dont la charpente commune à tous les clones est optimisée pour l'expression de scFv soluble dans le cytoplasme (Philibert et al., 2007). Au cours des travaux réalisés lors de cette thèse, nous avons notamment choisi de sélectionner des fragments d'anticorps par phage-display à partir de cette banque et de les utiliser pour cibler des antigènes intracellulaires.

2. Immunociblage d'une protéine intracellulaire

L'homéostasie cellulaire est contrôlée par des mécanismes indispensables comme la transcription, la signalisation, la duplication et le maintien de l'intégrité du génome qui reposent sur des interactions protéine-ADN ou protéine-protéine. Dans les cellules cancéreuses, ces interactions sont dérégulées suite à l'apparition de mutations qui conduisent *in fine* à la prolifération incontrôlée des cellules (Luo et al., 2009). Les propriétés des interactions protéine-protéine offrent des opportunités pour des interventions thérapeutiques. Malheureusement, le développement de petites molécules capables de moduler ces interactions est très difficile. En effet, les interactions protéine-protéine forment généralement des interfaces planes et sont considérées comme non « druggable » (Blundell et al., 2006).

La spécificité de liaison et l'affinité des anticorps pour leur épitope leur permettent d'interférer efficacement avec les interactions protéine-protéine. En raison de leur taille (~150 kDa), ils ne peuvent pas diffuser librement dans les cellules et sont donc limités à la reconnaissance d'antigènes extracellulaires. De plus, il est impossible d'exprimer ces molécules dans le cytoplasme des cellules, environnement réducteur qui empêche la formation de ponts disulfures et donc le repliement fonctionnel des anticorps exprimés après transfert du matériel génétique dans la cellule.

Récemment, plusieurs techniques ont été mises au point pour cibler spécifiquement avec des anticorps une protéine intracellulaire et ses interactions afin de neutraliser/perturber sa fonction ou étudier sa dynamique, mais aussi pour valider des cibles thérapeutiques. Ces technologies sont relativement récentes, mais elles offrent des alternatives intéressantes à l'interférence à l'ARN très largement utilisée pour étudier la fonction d'une protéine en recherche fondamentale.

L'interférence à l'ARN (RNAi) est la technique la plus utilisée pour étudier la fonction d'un gène en réprimant l'expression de la protéine codée. Cette stratégie repose sur l'introduction dans une cellule d'un ARN double-brin (dsRNA) inhibant l'expression d'un gène cible en induisant la dégradation spécifique de son ARNm complémentaire (Fire et al., 1998). L'introduction de dsRNA exogène dans les cellules peut se faire de deux manières distinctes : transfecter (1) directement des dsRNA synthétiques (siRNA) ou (2) un vecteur d'expression codant pour un ARN se repliant sous forme d'une épingle à cheveux partiellement double-brin (shRNA).

L'interférence à l'ARN a également des applications thérapeutiques puisqu'elle permet d'inhiber l'expression ou la surexpression pathologique de protéines impliquées dans l'apparition de nombreuses maladies, au premier rang desquelles on trouve les cancers. Néanmoins, malgré des résultats expérimentaux encourageants dans les cellules en culture et chez les souris, aucun traitement concret n'est à ce jour prêt pour des applications cliniques (Zhang et al., 2004). En effet, plusieurs problèmes concernant l'utilisation de l'interférence à l'ARN restent à résoudre. Les siRNA (ou shRNA) peuvent induire des effets sur des gènes autres que ceux ciblés, on parle d'effets « hors-cible » (ou « off-target »). Il est également nécessaire d'améliorer la délivrance ciblée et efficace des siRNA *in vivo*. Enfin, l'interférence à l'ARN est basée sur l'utilisation d'acides nucléiques exogènes, ce qui soulève de nombreuses questions d'éthique dans le cadre de la thérapie chez l'homme.

2.1. Les techniques d'immunociblage d'une protéine intracellulaire : vectorisation ou expression d'anticorps dans le cytoplasme ?

Une alternative à l'utilisation de l'interférence à l'ARN est de moduler la fonction d'une protéine cellulaire plutôt que son expression, autrement dit par interférence à la protéine. Plusieurs méthodologies sont envisageables dont l'expression et/ou la vectorisation d'anticorps dans les cellules. Cette stratégie repose sur deux concepts permettant de cibler une protéine intracellulaire. La première option est d'introduire dans les cellules des vecteurs capables d'exprimer des fragments d'anticorps recombinants par vectorisation virale ou non. Ceux-ci feront alors fonction d'anticorps intracellulaires (ou intracorps) pour perturber, neutraliser ou suivre la dynamique d'une protéine endogène. La seconde option consiste à adresser un anticorps ou le fragment d'anticorps purifié *in vitro* directement dans la cellule (Figure 12 ; Pérez-Martínez et al., 2010).

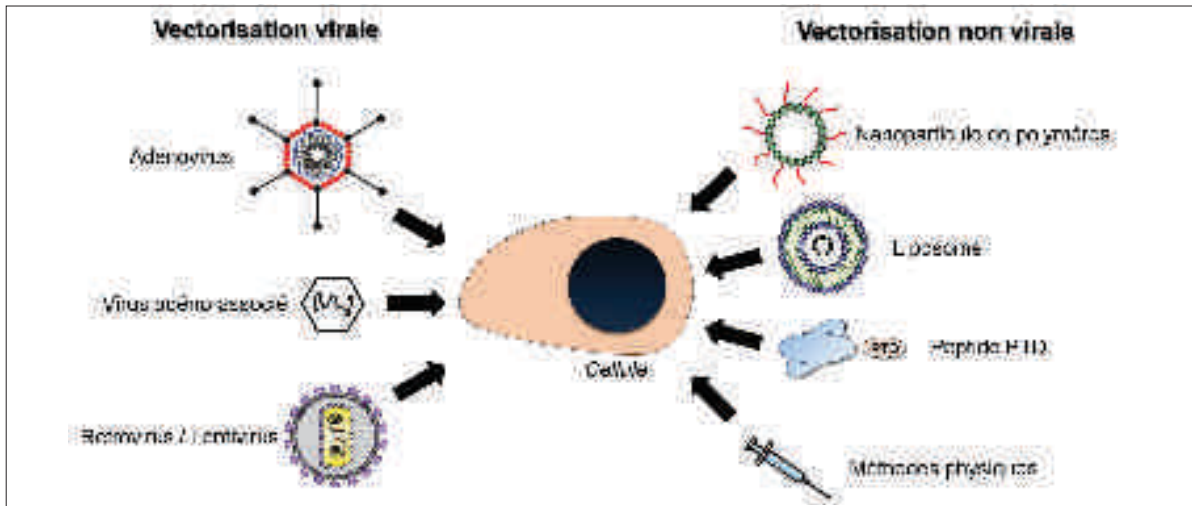


Figure 12. Méthodes de vectorisation d'anticorps et de fragments d'anticorps dans les cellules. L'introduction de vecteurs d'expression dans la cellule peut se faire par vectorisation virale (Adénovirus, Virus adéno-associé et Rétrovirus / Lentivirus) ou non-virale (Nanoparticules de polymères et liposomes). La vectorisation non-virale permet en outre la pénétration dans la cellule d'anticorps complets par fusion à des peptides d'internalisation PTD ou grâce à des méthodes physiques comme la micro-injection. (Adapté de Pérez-Martínez et al., 2010).

Contrairement à la technique de l'interférence à l'ARN qui peut engendrer des effets aspécifiques appelés « off-target », les anticorps lient leur antigène avec une haute spécificité (Caffrey et al., 2011). De plus, ces outils devraient permettre de cibler des modifications post-traductionnelles d'une protéine afin de bloquer des fonctions précises de celle-ci. Dans la section suivante, nous nous intéresserons uniquement aux différentes méthodes de vectorisation non-virale permettant d'utiliser les propriétés des anticorps et des fragments d'anticorps dans un contexte intracellulaire.

2.1.1. Expression intracellulaire des anticorps : les intracorps

Les premiers travaux d'immunociblage intracellulaire ont été réalisés avec des anticorps monoclonaux micro-injectés (la micro-injection est abordée dans la section 2.1.2.3.1 de l'introduction ; Morgan & Roth, 1988). Avec le développement du clonage des immunoglobulines, il a été possible d'utiliser des fragments d'anticorps recombinants produits dans les cellules eucaryotes après transfection de l'ADNc correspondant (Biocca et al., 1990). Les anticorps exprimés dans le cytoplasme sont alors appelés intracorps (ou « intrabodies »), dont le format scFv est le plus couramment utilisé.

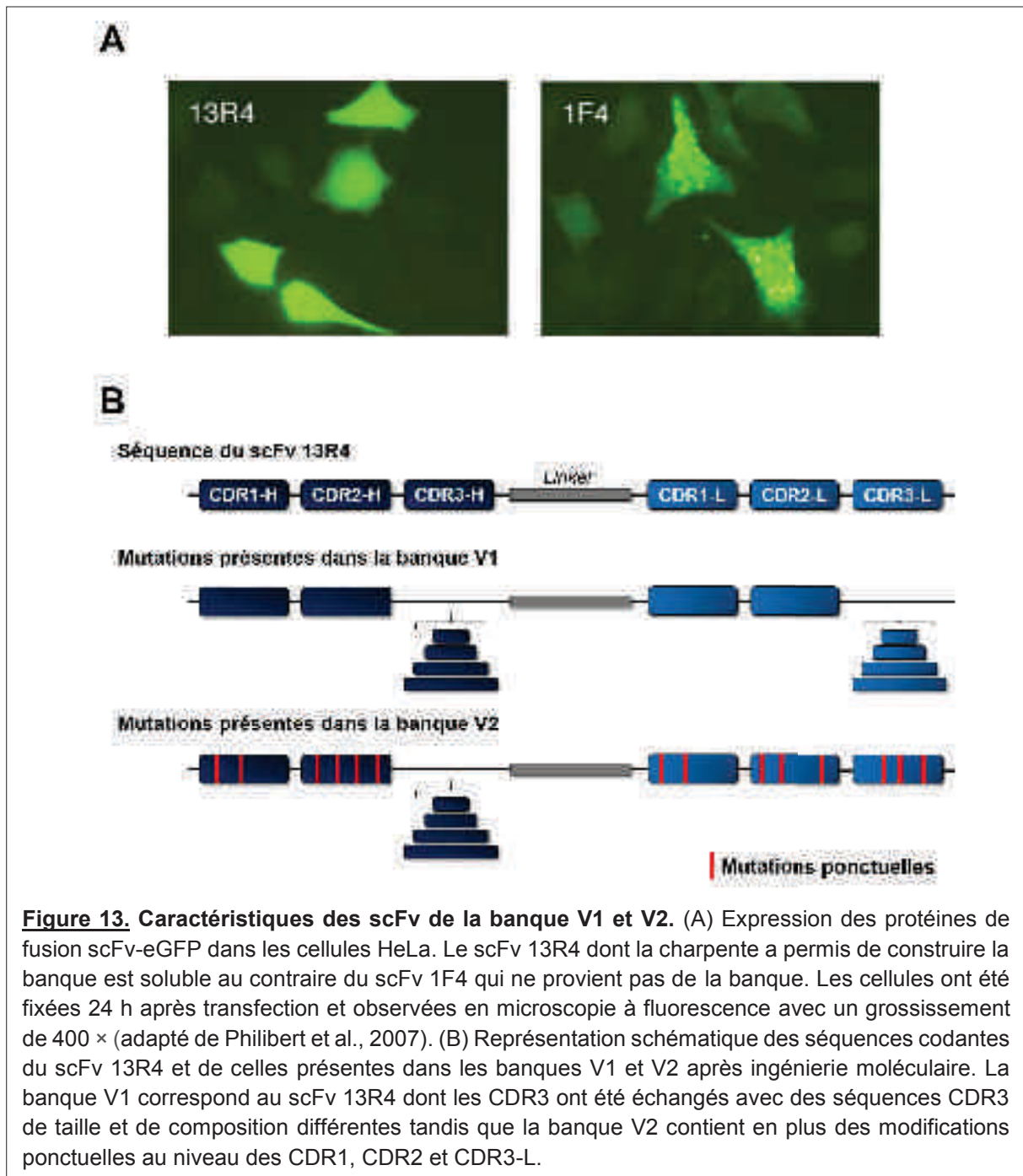
Les anticorps sont des protéines extracellulaires sécrétées. Des feuillets β rigides stabilisés par des ponts disulfures permettent aux anticorps d'être résistants à la dénaturation. La formation de ces ponts disulfures est essentielle pour la fonction et l'intégrité structurale de la majorité des anticorps (Stocks, 2005). Un fragment d'anticorps de type scFv peut être exprimé dans la cellule après transfert de son matériel génétique. Dans le cas où celui-ci est destiné à la sécrétion, le repliement conforme du scFv et la formation des ponts disulfures sont favorisés par des protéines chaperones comme la PDI (Protein Disulfide Isomerase) qui sont situées dans le réticulum endoplasmique (RE ; Mayer et al., 2000). La fusion d'un fragment d'anticorps au peptide KDEL permet de retenir celui-ci dans le RE et ainsi de le maintenir dans une conformation active. Dans le cas où l'antigène provient de la même voie de sécrétion, il sera piégé dans le RE et ne sera pas acheminé vers la surface de la cellule (Böldicke, 2007). Cette méthodologie a déjà été exploitée à de nombreuses reprises avec succès notamment pour perturber la sécrétion et l'activité de protéines membranaires comme le récepteur de l'IL-2 (Interleukine 2 ; Richardson et al., 1995). Les fragments d'anticorps peuvent aussi être relocalisés dans d'autres compartiments cellulaires via l'adjonction de peptides comme par exemple une séquence NLS (Nuclear Localization Signal) qui permet d'adresser l'anticorps au noyau (Sibler et al., 2003).

En revanche, l'expression directe de fragments d'anticorps dans le cytoplasme est beaucoup plus délicate puisque l'absence des chaperones évoquées précédemment empêche le bon repliement de la protéine. De plus, dans ce cas, la formation des ponts disulfures intra-chaînes n'a pas lieu à cause de l'environnement réducteur du cytosol (Biocca et al., 1995). Dans ces conditions, la quasi-totalité de scFv sont incapables de reconnaître leur cible. En effet, dans la majorité des cas, l'expression transitoire de fragments d'anticorps dans des lignées cellulaires eucaryotes entraîne la formation d'agrégats insolubles qui s'accumulent dans le cytoplasme et qui sont extrêmement toxiques. L'accumulation progressive des formes non solubles de scFv, par saturation des systèmes de dégradation, provoque la formation de structures particulières en périphérie du noyau appelées agrésomes (Johnston et al., 1998). Le pH et la température intracellulaire, la présence de chaperones, la charge et l'hydrophobicité globale du scFv sont quelques facteurs parmi d'autres qui vont influencer sur la solubilité du fragment d'anticorps (Kvam et al.,

2010). Plusieurs approches ont été développées pour améliorer la solubilité des intracorps dans le milieu intracellulaire.

La stratégie la plus couramment utilisée pour obtenir des scFv correctement repliés et capables de se lier à leur antigène dans le cytoplasme est de modifier leur charpente par mutagenèse. Il est possible de muter des cystéines pour empêcher la formation des ponts disulfures afin de stabiliser la synthèse du scFv (Wörn & Plückthun, 1998). L'utilisation de régions charpentes stables en absence de formation des ponts disulfures est une alternative à l'évolution moléculaire *in vitro*. Cette stratégie a été exploitée dans notre laboratoire (en collaboration avec l'équipe de Pierre Martineau, IRCM Montpellier) pour construire deux banques de scFv solubles, V1 et V2, à partir du scFv 13R4 qui reconnaît l'enzyme β -galactosidase. La charpente de ce scFv a été modifiée pour favoriser son repliement fonctionnel en l'absence de formation de ponts disulfures (Figure 13A). Ainsi, ce scFv est exprimé à haut rendement sous une conformation active et soluble dans le cytoplasme bactérien (Martineau et al., 1998). La banque V1 a été construite en diversifiant uniquement les boucles CDR3 de ce scFv tout en conservant une représentation en acides aminés similaire à celle observée dans les boucles CDR3 humaines. Ces fragments d'anticorps recombinants sont produits chez *E. coli* avec un rendement de l'ordre du g/L de milieu de culture (Philibert et al., 2007). La banque V2 a été construite pour avoir en plus d'une variation de la taille et de la composition du CDR3-H des mutations au niveau des séquences CDR1, CDR2 et CDR3-L. La banque V1 n'est donc mutée que sur les CDR3, tandis que la banque V2 présente une variabilité sur l'ensemble des 6 CDR (Figure 13B).

En résumé, nous avons vu que la solubilité est un paramètre critique pour l'activité des intracorps exprimés dans un contexte intracellulaire. Les scFv solubles capables de se lier à une cible intracellulaire représentent un outil de choix pour l'étude des protéines et de leurs interactions. Pour certaines applications comme la neutralisation de l'activité d'une protéine, l'affinité des intracorps est aussi un facteur limitant. Afin de contourner les difficultés liées à la solubilité et à l'affinité des intracorps, plusieurs technologies permettant d'adresser des anticorps purifiés dans la cellule ont été développées (Marschall et al., 2011).



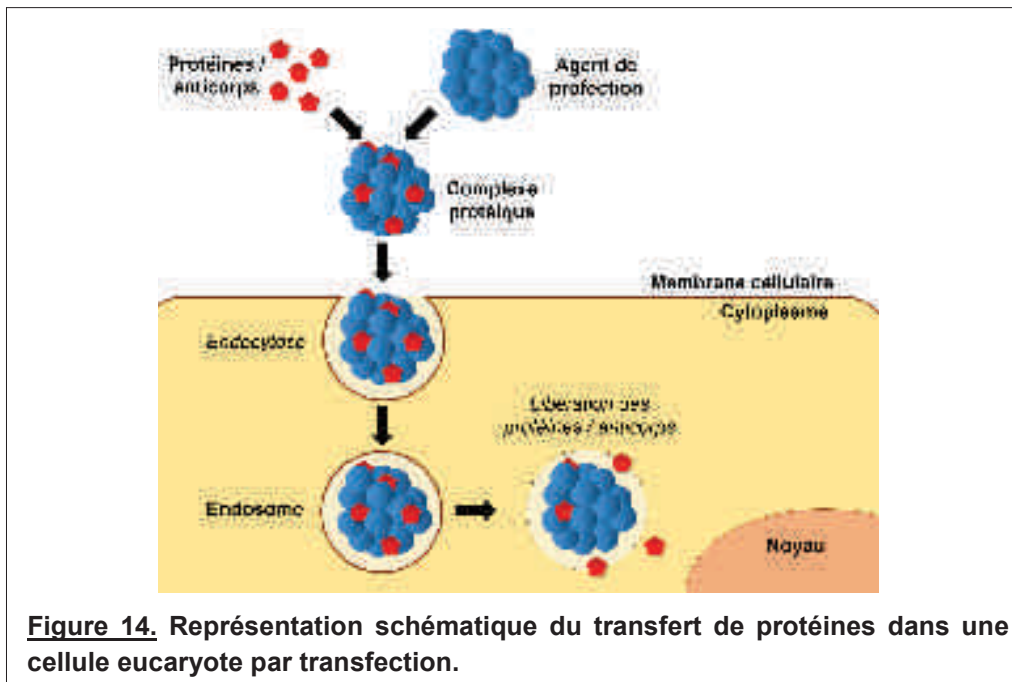
2.1.2. Vectorisation d'anticorps dans le cytoplasme

La vectorisation d'anticorps dans le cytoplasme constitue une approche complémentaire aux « intrabodies ». Elle repose sur l'adressage dans le compartiment intracellulaire des anticorps à travers la membrane cellulaire qui normalement empêche la diffusion des macromolécules. Seules les protéines extracellulaires endocytées par la cellule sont naturellement transportées dans le cytosol. Trois types de méthodes ont été mises au point pour vectoriser des anticorps dans la cellule.

2.1.2.1. La transfection de protéines (profection)

Inspirée de la transfection d'ADN, une technique robuste utilisée en routine depuis plusieurs décennies, l'introduction dans la cellule de polypeptides par transfection (ou profection) est un procédé beaucoup plus délicat en raison des propriétés physico-chimiques des protéines. En effet, l'organisation et la composition de l'ADN sont uniformes par rapport à la taille, la charge et la structure des protéines qui varient énormément. Contrairement à l'ADN, les protéines et en particulier les anticorps doivent conserver leur structure tertiaire lorsqu'elles sont associées à un agent de transfection. Bien que la profection soit hautement protéine-dépendante, plusieurs études ont démontré la faisabilité de cette technique (Courtète et al., 2007 ; Dalkara et al., 2004).

Les systèmes de profection reposent sur le même mécanisme que la transfection d'ADN et ce quel que soit le réactif utilisé. L'agent de transfection et les polypeptides forment des complexes chargés positivement qui interagissent avec les protéoglycanes présents à la surface des cellules. Ces complexes sont internalisés dans la cellule par endocytose, puis libérés des endosomes après osmolyse (Figure 14 ; Khalil et al., 2006). Le ratio entre la charge de la molécule d'ADN et celle du réactif est un paramètre critique lors de la transfection d'ADN. En ce qui concerne la profection, il semblerait que la charge ne soit pas primordiale, mais davantage le ratio entre la surface de la protéine et celle de l'agent de transfection, ainsi que les interactions hydrophobes (Dalkara et al., 2004). En fonction de leur taille et de leur nature, les complexes protéiques entrent dans la cellule via différentes voies d'endocytose. Il existe deux types de complexes : (1) les lipoplexes obtenus avec des lipides cationiques endocytés via la clathrine ; (2) les polyplexes qui sont endocytés indépendamment de la clathrine et qui sont formés grâce à des polymères comme le PEI (polyéthylèneimine) déjà utilisé pour la transfection de l'ADN (Rejman et al., 2005 ; Futami et al., 2012).



Nous avons montré qu'il est possible de vectoriser dans le cytoplasme de cellules transformées par le virus HPV16 un anticorps dirigé contre la protéine E6 à l'aide de lipides cationiques, avec pour effet, l'arrêt de la prolifération cellulaire. L'anticorps est donc actif après vectorisation et ceci a été possible parce qu'il a des propriétés physico-chimiques qui lui permettent d'interagir stablement avec les composés lipidiques (Courtête et al., 2007). Il existe dans le commerce plus d'une vingtaine de produits à base de lipides permettant de vectoriser des protéines dans des cellules en culture et de plus en plus de groupes les utilisent pour transférer des protéines dans le cytoplasme (van der Gun et al., 2007 ; Chiang et al., 2010).

L'alternative principale aux lipides cationiques est l'utilisation de nanoparticules de polymères (Canton et al., 2013), mais le développement de ces réactifs n'en n'est qu'à ses prémices. A l'image de l'efficacité de transfection de l'ADN qui est un facteur limitant pour de nombreuses applications, la protection est limitée par le faible nombre de cellules transfectées. De plus, la vectorisation de protéines par protection reste perfectible en raison de son efficacité protéine-dépendante, sa cytotoxicité, et de la perte d'activité de la protéine que peut engendrer l'association avec l'agent de transfection (Marschall et al., 2011).

2.1.2.2. La transduction de protéines : les peptides internalisants

La délivrance d'une protéine à l'intérieur d'une cellule peut se faire en fusionnant à des peptides permettant de franchir la membrane cellulaire. Ce type de peptide est appelé PTD (Protein Transduction Domain) ou encore CPP (Cell Penetrating Peptide). En général, un peptide PTD est issu du domaine de transduction d'une protéine capable d'entrer dans la cellule. Les séquences en acides aminés des PTD sont variables, néanmoins leur charge globale est franchement positive (Fischer, 2007). Les peptides les plus utilisés et les plus étudiés font partie de la famille des PTD riches en arginine.

Le domaine de transduction de la protéine TAT (Trans-Activator of Transcription) du virus HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus) a été utilisé dans de nombreuses études pour vectoriser des anticorps dans la cellule. Sa séquence est YGRKKRRQRRR. Ce peptide peut être fusionné génétiquement à un scFv ou synthétisé *in vitro* pour être couplé à un Fab ou à une IgG (Cohen-Saidon et al., 2003 ; Anderson et al., 1993 ; Chen & Erlanger, 2002). Comme pour les autres peptides internalisants, le mécanisme d'entrée du PTD issu de la protéine TAT dans la cellule n'est pas connu (Duchardt et al., 2007). Il semblerait néanmoins que les PTD soient endocytés et que les protéines de surface de la cellule soient nécessaires pour leur internalisation (Gump et al., 2010). La charge positive des peptides riches en arginine pourrait entraîner leur concentration au niveau des glycoprotéines de la surface de la cellule, de façon similaire au mécanisme de la profection décrit dans la section précédente.

D'autres CPP ont été décrits et notamment un peptide dérivé de la protéine X du virus de l'Hépatite B impliquée dans la transcription de l'ARN viral. Ce peptide est uniquement internalisé par les cellules adhérentes et plusieurs types de biomolécules (β -Galactosidase, siRNA, IgG) conjugués à ce CPP ont été transduits avec succès (Montrose et al., 2013). Le peptide BR2 dérivé de la buforine (peptide anti-microbien retrouvé dans l'estomac de nombreuses espèces d'amphibiens) est un autre exemple de CPP qui semble être internalisé spécifiquement par les cellules cancéreuses. En effet, la séquence codante d'un scFv a été fusionnée à BR2 et le fragment d'anticorps a été vectorisé avec succès dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses, mais pas dans des cellules normales (Lim et al., 2013).

Contrairement à la profection où la protéine est liée de façon non covalente au réactif de transfection, le couplage ou la fusion de peptides PTD à des anticorps sont covalents. Dans le cas où les CPP ont des caractéristiques physico-chimiques trop différentes de celles des anticorps, l'expression de protéines de fusion anticorps-CPP peut engendrer des problèmes de production, ce qui n'est pas le cas avec la profection. De même, le couplage chimique de peptides sur un anticorps peut altérer sa structure et son activité. L'utilisation de peptides d'internalisation et la transfection de protéines partagent toutefois un paramètre critique qui est la libération de la protéine des endosomes après endocytose. Si les protéines endocytées ne sont pas rapidement relarguées dans le cytosol, l'acidification des endosomes conduit à la dénaturation des polypeptides endocytés (Marschall et al., 2011). Pour s'affranchir de la délivrance des anticorps par endocytose, ils peuvent être vectorisés dans le cytoplasme grâce à des méthodes qui n'impliquent pas de modifications chimiques ou génétiques de l'anticorps.

2.1.2.3. Méthodes de vectorisation physiques

2.1.2.3.1. *La micro-injection*

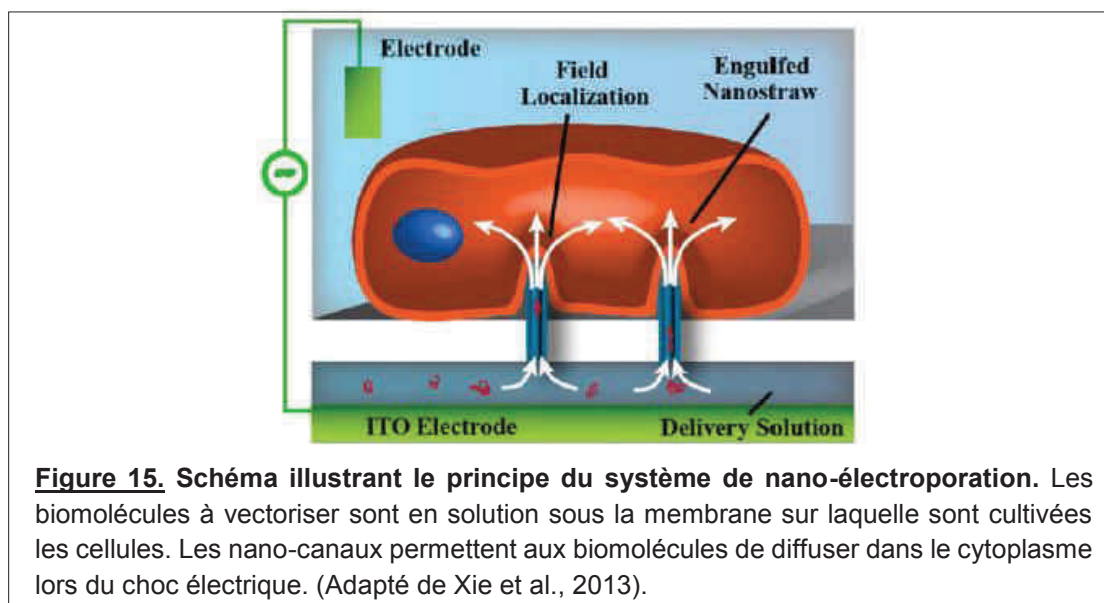
La micro-injection a été la première méthode employée pour vectoriser des anticorps monoclonaux directement dans le cytoplasme de cellules en culture (Morgan & Roth, 1988). Cette technique est en général réalisée à l'aide de capillaires en verre d'un diamètre interne inférieur à 1 μm qui vont permettre de percer la membrane des cellules. De nombreuses études ont démontré que les anticorps complets micro-injectés sont stables et actifs dans l'environnement réducteur du cytosol (Madsen et al., 1986 ; Marg et al., 2008). Ils peuvent donc être utilisés pour étudier la dynamique fonctionnelle d'une protéine ou interférer avec son activité dans les cellules vivantes. La micro-injection d'un anticorps dirigé contre PLK1 (Polo-Like Kinase 1) a notamment permis de montrer que cette protéine est impliquée dans la maturation des centrosomes lors de la division cellulaire. Les travaux présentés dans cette étude constituent un parfait exemple d'immunociblage fonctionnel puisque les cellules traitées avec l'anticorps ne peuvent plus se diviser normalement (Lane & Nigg, 1996). Cependant, la reproductibilité de la micro-injection d'anticorps entre plusieurs traitements est limitée et la technique peut se révéler très contraignante à mettre en

œuvre lorsqu'il est nécessaire de traiter un grand nombre de cellules. C'est peut-être pour cette raison que des méthodes plus standardisées ont été développées.

2.1.2.3.2. L'électroporation

L'électroporation est utilisée depuis de nombreuses années pour introduire de l'ADN dans les bactéries et les levures. Le principe de cette technique est d'appliquer un champ électrique sur la membrane cellulaire qui est ainsi déstabilisée, ce qui permet à l'ADN (chargé négativement) présent dans l'espace extracellulaire de rentrer dans la cellule par diffusion via l'ouverture temporaire de pores membranaires. Il est également possible d'utiliser l'électroporation pour introduire de l'ADN ainsi que des polypeptides dans les cellules animales. Cependant, cette technique est rarement utilisée dans le cas des cellules de mammifères parce qu'il est nécessaire de traiter un très grand nombre de cellules pour obtenir suffisamment de cellules viables après le choc électrique. En effet, lors du choc électrique, les cellules en suspension sont exposées brièvement à un courant de haut voltage qui induit un taux de mort cellulaire élevé. Ainsi, plusieurs applications de vectorisation d'anticorps par électroporation avec une efficacité relative ont été décrites (Berglund & Starkey, 1991 ; Lukas et al., 1994).

Très récemment, un système microfluidique permettant d'électroporer efficacement des cellules animales a été décrit (Xie et al., 2013). Le principe de cette innovation consiste à cultiver des cellules directement sur une membrane ponctuée de nano-canaux en aluminium qui vont acheminer les biomolécules dans le cytoplasme par diffusion lors du choc électrique sans affecter la viabilité des cellules (Figure 15). Une faible tension électrique est suffisante pour transporter l'ADN dans le cytoplasme contrairement à l'électroporation classique qui s'effectue à des tensions électriques beaucoup plus élevées dans des micro-cuvettes. Ce système qui semble très efficace pour introduire du matériel génétique dans les cellules est toutefois basé sur une technologie microfluidique très lourde à mettre en œuvre, et il n'a pas été appliqué pour l'instant à la délivrance de protéines.



2.1.2.3.3. La sonoporation

La sonoporation est basée sur le même type de procédé que l'électroporation. Elle perméabilise temporairement la membrane cellulaire en appliquant localement des ultrasons combinés à des microbulles qui sont généralement utilisées en imagerie médicale. La sonoporation peut être appliquée à la vectorisation de différents types de biomolécules, dont les anticorps, et la viabilité des cellules traitées est supérieure à celle des cellules électroporées. Le transfert par sonoporation d'un anticorps anti-E6 dans le cytoplasme de cellules HPV positives permet de restaurer l'activité de p53 (Togtema et al., 2012). Même si peu d'applications de cette technique récente sont décrites à ce jour, elle représente une approche originale qui sera sûrement exploitée avec succès à l'avenir.

Les trois méthodes qui viennent d'être présentées nécessitent de purifier et de concentrer les anticorps qui doivent résister à l'agrégation et être disponibles en grande quantité, ce qui n'est pas évident quand on connaît le coût de ces réactifs. De plus, contrairement aux intracorps qui sont exprimés constitutivement dans la cellule, la quantité d'anticorps vectorisés est définie, c'est pourquoi ces deux types d'approches sont complémentaires. Cependant, il n'existe pas encore de protocole générique et facile à mettre en œuvre pour adresser des anticorps dans une cellule vivante. La transfection de l'ADNc d'un fragment d'anticorps est actuellement la méthode la plus utilisée pour cibler un antigène intracellulaire avec des outils dérivés du système immunitaire. Une nouvelle méthode permettant la délivrance d'anticorps

complets et actifs dans le cytoplasme est nécessaire afin de compléter l'utilisation des intracorps.

2.1.3. Applications de l'immunociblage intracellulaire

2.1.3.1. Etude de la fonction et de la dynamique d'une protéine intracellulaire

Pour suivre la dynamique endogène d'un antigène intracellulaire, deux approches d'immunociblage peuvent être exploitées. D'une part, il est possible d'utiliser des intracorps non bloquants, c'est-à-dire ceux qui ne neutralisent pas l'activité d'une protéine donnée et qui se lient à leur cible sans perturber sa fonction. On évite ainsi d'avoir recours à la surexpression de protéines sauvages, mutées ou tronquées qui très souvent peut biaiser les résultats obtenus (Gibson et al., 2013). En pratique, un fragment d'anticorps peut être étiqueté avec une protéine fluorescente comme la GFP (Green Fluorescent Protein) afin de visualiser la localisation de la protéine cible et ainsi étudier sa dynamique (Nizak et al., 2003 ; Rothbauer et al., 2006). Pour ce type d'application, les fragments d'anticorps utilisés doivent bien entendu résister à la réduction cytoplasmique.

D'autre part, les anticorps peuvent également être utilisés pour des applications d'imagerie *in vivo* pour étudier la dynamique d'un antigène intracellulaire comme par exemple des anticorps couplés à des fluorophores comme le FITC (Fluorescéine IsoThioCyanate) ou ses dérivés qui sont très largement utilisés pour détecter des protéines par immunofluorescence. Il est toutefois nécessaire de disposer d'un système de vectorisation efficace.

2.1.3.2. Immunsation intracellulaire

Les anticorps peuvent également être utilisés dans un contexte intracellulaire pour des applications thérapeutiques. L'immunsation intracellulaire repose sur l'utilisation d'anticorps pour moduler la fonction de sa cible dans la cellule. Un intracorps ou un anticorps vectorisé peut bloquer l'interaction d'une protéine avec ses partenaires cellulaires par gène stérique (Biocca et al., 1990). Il est aussi possible de fusionner la séquence codante d'un intracorps à une séquence d'adressage comme le peptide PEST (peptide riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine) qui permet de relocaliser la protéine ciblée vers le protéasome pour y être dégradée (Sibler et al., 2005). Enfin, les fonctions d'une protéine peuvent être modulées en modifiant

sa conformation grâce à la liaison d'un anticorps. Deux scFv sont par exemple capables d'induire un changement conformationnel du facteur de transcription p53 et de restaurer son activité dans des cellules cancéreuses (Caron de Fromentel et al., 1999).

En conclusion de ce chapitre, les anticorps et les fragments dérivés peuvent être utilisés dans le compartiment intracellulaire via deux approches différentes : la délivrance directe dans le cytoplasme ou l'expression intracellulaire sous la forme d'intracorps. Malgré de nombreuses investigations en cours, aucun anticorps ciblant une protéine intracellulaire n'est utilisé en thérapie à ce jour. L'immunisation intracellulaire s'est principalement développée autour de trois axes de recherche basés sur le traitement du SIDA, des pathologies neuro-dégénératives et des cancers (Lo et al., 2008).

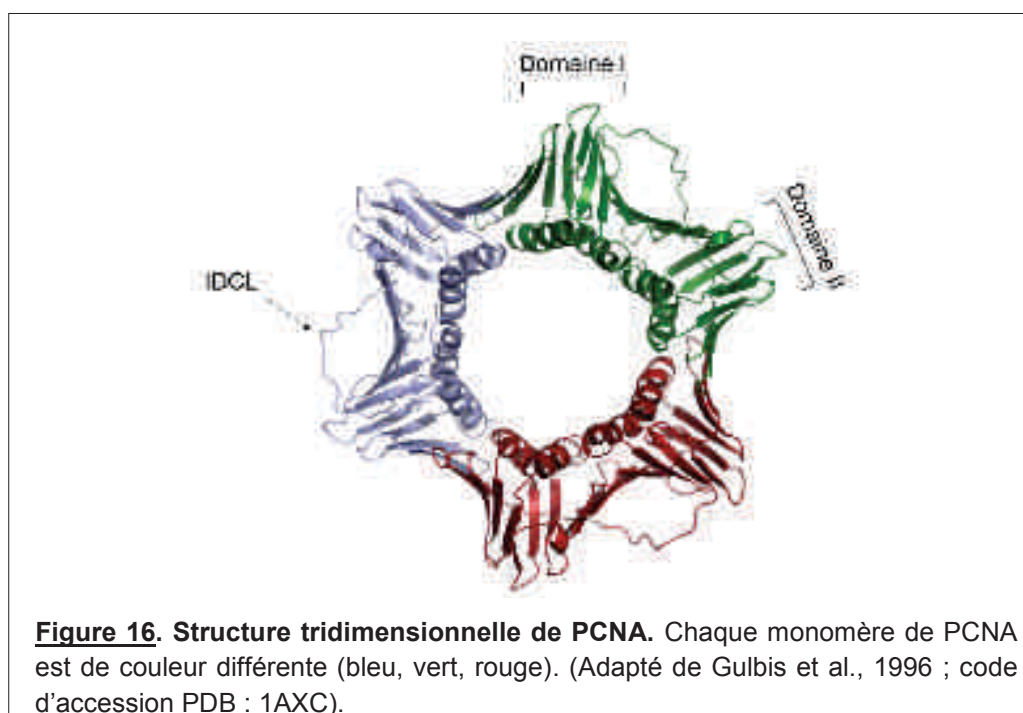
Notre équipe s'intéresse notamment à l'étude de deux mécanismes de cancérogenèse que sont (1) la réplication de l'ADN endommagé en réponse à un stress génotoxique et (2) la dégradation de suppresseurs de tumeurs comme le facteur de transcription p53. Les protéines intracellulaires PCNA (1) et gankyrin (2) sont impliquées dans ces mécanismes et ont été clairement identifiées comme des cibles potentielles pour la thérapie du cancer (Mailand et al., 2013 ; Higashitsuji et al., 2005). Nous souhaitons cibler PCNA et la gankyrin afin de développer notamment une stratégie d'inhibition d'interactions protéine-protéine à l'aide d'anticorps et de fragments dérivés.

3. Les protéines PCNA et gankyrin

3.1. PCNA

3.1.1. Structure et fonction de PCNA

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) est un facteur nucléaire de processivité des ADN polymérases indispensable à la réplication de l'ADN des cellules en prolifération. Cette protéine est également impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN et l'organisation de la chromatine en facilitant de multiples interactions protéine-protéine et protéine-ADN (Moldovan et al., 2007 ; Mailand et al., 2013). Elle est constituée de 261 acides aminés pour une masse moléculaire de 29 kDa. PCNA appartient à la famille des anneaux de processivité ou « sliding clamps » qui sont constitués de plusieurs sous-unités formant un anneau. Ils sont capables d'encercler l'ADN et de se déplacer le long de celui-ci. Ces protéines sont structurellement et fonctionnellement conservées au cours de l'évolution (Kelman et al., 1995). PCNA est un homo-trimère dont chaque monomère est composé de deux domaines similaires reliés entre eux par une boucle de 18 acides aminés appelée IDCL (InterDomain Connector Loop ; Figure 16).



Même si la charge globale de PCNA est négative, la surface interne de l'anneau est positive à cause de la présence de nombreux résidus lysine et arginine, ce qui facilite le passage de l'ADN chargé négativement (Naryzhny, 2008). PCNA est chargé autour de l'ADN au niveau de l'extrémité 3'-OH d'une jonction matrice amorcée par le complexe RFC (Replication Factor C ; Hedglin et al., 2013). PCNA ainsi chargé sur l'ADN augmente la processivité des ADN polymérase en facilitant leur maintien sur l'ADN au niveau de la fourche de réplication (Figure 17). Inversement, le « déchargement » de PCNA de l'ADN semble être régulé par la protéine Elg1 (Enhanced level of genomic instability 1) puisqu'en absence de ce facteur, il y a une accumulation de PCNA sur la chromatine (Shiomi et al., 2013).

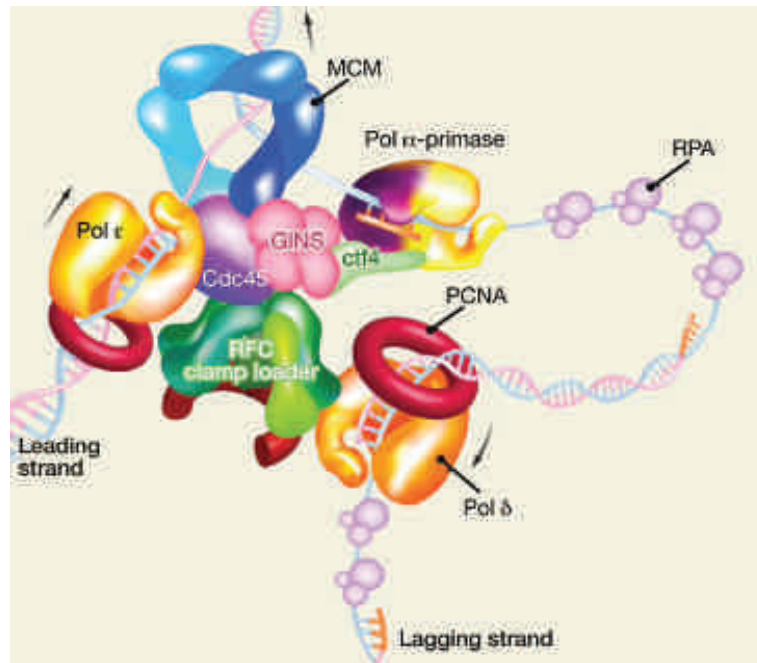
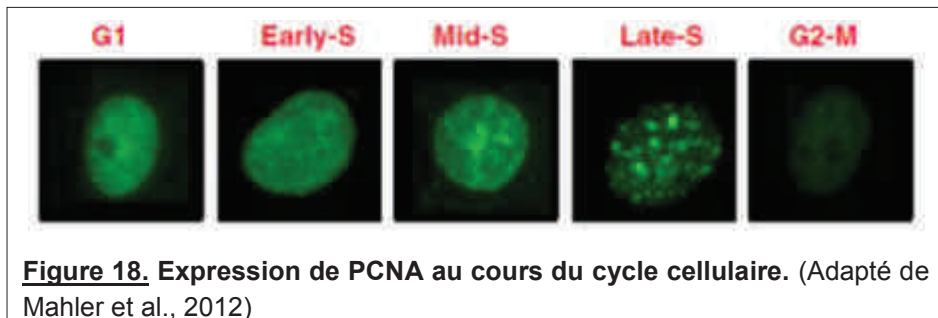


Figure 17. Schéma du réplisome eucaryote. L'hélicase MCM (MiniChromosome Maintenance) sépare l'ADN double brin. Les ADN polymérase ε et δ synthétisent l'ADN sur les brins continus et discontinus respectivement. RPA (Replication Protein A) empêche la formation de structures secondaires sur l'ADN simple brin et le protège de la dégradation. L'ADN polymérase α-primase synthétise une amorce hybride ARN-ADN. Les protéines Ctf4, Cdc45 et le complexe GINS interagissent avec l'hélicase MCM et sont des éléments essentiels du réplisome, mais leur fonction n'est pas clairement établie. (Adapté de Cell SnapShot : the replisome, 2010).

PCNA est localisé dans le noyau des cellules prolifératives sous deux formes distinctes. La fraction liée à la chromatine (insoluble aux détergents) est impliquée dans la réplication et les processus associés ; la fraction libre n'est pas engagée dans la synthèse d'ADN et peut être extraite à l'aide de détergents (Wang et al. 2006). L'expression de PCNA est dépendante du cycle cellulaire, c'est pourquoi la forme de

PCNA liée à la chromatine n'est visible qu'au cours de la phase S du cycle au niveau des foyers de réplication (Figure 18).



3.1.2. Partenaires de PCNA et motifs d'interaction

PCNA coordonne un large éventail de processus impliqués dans le métabolisme de l'ADN, la réplication et la transmission du génome en jouant le rôle de plate-forme d'interactions pour de nombreux facteurs. PCNA interagit avec de nombreux partenaires différents au cours du cycle cellulaire. La régulation spatio-temporelle des interactions entre PCNA et ses partenaires est primordiale. La plupart des interacteurs de PCNA se lient à un site localisé dans la boucle IDCL via un motif d'interaction appelé PIP-box (PCNA-Interacting Peptide). Ce motif conservé est présent dans la plupart des protéines qui interagissent avec PCNA (Tableau 3), et sa séquence consensus est Q-x-x-[ILM]-x-x-[FY]-[FY] (De Biasio et al., 2012). Dans certains cas, le motif PIP-box est précédé d'une séquence KA (KA-box) (Xu et al., 2001).

Tableau 3. Liste non exhaustive des protéines interagissant avec PCNA. Les protéines en gras contiennent un motif d'interaction PIP-box. (Adapté de Moldovan et al., 2007).

ADN polymérase	Polδ, Polϵ, Polη, Polι, Polκ, Polζ, Polλ, Polβ, Rev1
Clamp loader	Rfc1, Rfc3, Rfc4
Flap-endonucléase	FEN-1
ADN ligase	ADN Ligase 1
Topoisomérase	Topo IIα
Ubiquitine ligases E3	Rad18, Rad5
Enzyme de conjugaison SUMO E2	Ubc9
Hélicases, ATPases	Srs2, Rrm3 , Mgs1, WRN, RECQ5
Enzymes du MMR	Msh3, Msh6, Mlh1, EXO1
Enzymes du BER	UNG2, MPG , NTH1, APE1, APE2 , XRCC1
Enzymes du NER	XPG
ADN méthyltransférase	DNMT1
Régulateurs du cycle cellulaire	p21, p57 , Cycline D1
Facteurs apoptotiques	ING1b, p53

Les protéines possédant des PIP-box se lient à PCNA dans la même région, leur liaison est donc exclusive et compétitive. L'affinité semble être l'élément essentiel qui gouverne l'ensemble de ces interactions (Maga et al., 2003). L'inhibiteur de CDKs (Cyclin-Dependent Kinase) p21 bloque la réplication grâce à sa capacité à se lier à PCNA en empêchant le chargement de l'ADN polymérase sur l'anneau de processivité (Cazzalini et al., 2003). En effet, le peptide PIP correspondant à la région carboxy-terminale du CKI (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor) p21 se lie à PCNA avec une affinité 200 fois plus importante que le peptide PIP issu de la sous-unité de l'ADN polymérase δ (Bruning et al., 2004). Ceci suggère (1) le rôle de l'affinité dans l'organisation des interactions entre PCNA et ses nombreux partenaires et (2) comment p21 exerce sa fonction d'inhibiteur du cycle cellulaire en bloquant la synthèse d'ADN.

Un autre motif d'interaction avec PCNA appelé APIM (AlkB homologue 2 PCNA Interacting Motif) a été récemment décrit et est caractérisé par la séquence [KR]-[FYW]-[LIVA]-[LIVA]-[KR]. Ce motif serait important pour la liaison à PCNA de protéines impliquées dans la réponse à un stress génotoxique (Gilljam et al., 2009). Ce motif est présent dans plus de 200 protéines humaines et son site de liaison sur PCNA serait situé dans la même région que le motif PIP-box (Müller et al., 2013).

La hiérarchie des interactions de PCNA avec ces protéines met en jeu des mécanismes supplémentaires, à la source de la régulation de la réplication de l'ADN endommagé ou non. Parmi ces mécanismes, il a été montré que ce sont les modifications post-traductionnelles de PCNA qui jouent un rôle essentiel pour la régulation de ces interactions (Mailand et al., 2013).

3.1.3. Modifications post-traductionnelles de PCNA

3.1.3.1. La phosphorylation de PCNA

La phosphorylation de la tyrosine Y211 stabilise la fraction de PCNA liée à la chromatine. La kinase responsable de cette modification est l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), qui joue un rôle essentiel dans la prolifération cellulaire. De plus, la phosphorylation de la tyrosine Y211 prévient la dégradation de PCNA par le protéasome en perturbant l'interaction entre l'ubiquitine ligase CRL4 (Cullin 4-based ubiquitin ligase) et l'anneau de processivité (Wang et al., 2006). La tyrosine Y211 n'est pas l'unique site de phosphorylation. PCNA phosphorylé sur la tyrosine Y114 induirait le développement de tissu adipeux, suggérant ainsi un rôle de PCNA dans la différenciation cellulaire (Lo et al., 2013).

3.1.3.2. L'acétylation de PCNA

PCNA est également acétylé et cette modification post-traductionnelle (MPT) semble affecter sa stabilité à l'instar de la phosphorylation de la tyrosine Y211. L'acétylation de PCNA empêcherait donc sa dégradation, mais l'impact de cette modification sur la réplication de l'ADN endommagé n'est pas connu. De plus, le résidu modifié n'a pas encore été identifié pas plus que les enzymes impliqués dans la réaction et le mécanisme qui induit cette modification (Yu et al., 2009).

3.1.3.3. La SUMOylation de PCNA

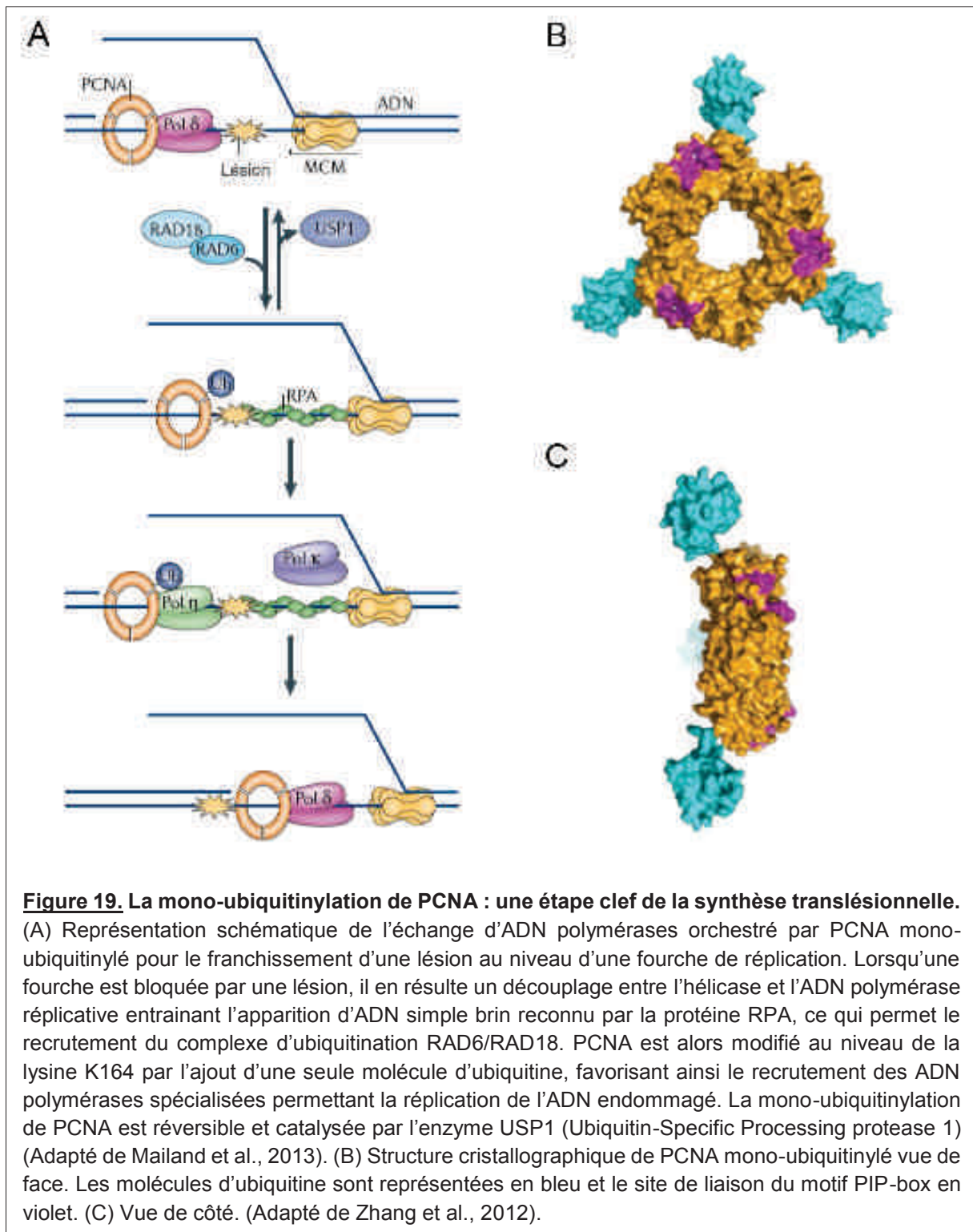
Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la SUMOylation de PCNA permet de recruter l'hélicase Srs2 au niveau de la fourche de réplication afin de prévenir des événements de recombinaison. Dans les cellules humaines, la SUMOylation de PCNA commence à peine à être caractérisée mais il semblerait que la protéine ainsi modifiée inhibe la recombinaison et la formation de cassures double-brin de l'ADN lorsque la fourche de réplication est bloquée au niveau d'une lésion (Gali et al., 2012).

3.1.3.4. La mono-ubiquitylation de PCNA

La modification post-traductionnelle de PCNA la plus étudiée est sans aucun doute sa mono-ubiquitylation. PCNA est également poly-ubiquitylé, mais nous n'aborderons pas cette MPT dans cette section. Le facteur de processivité est modifié par l'addition d'une molécule d'ubiquitine en réponse à des dommages sur l'ADN (Kirchmaier, 2011). Cette modification de PCNA est un élément central de la tolérance des dommages et notamment de la synthèse translésionnelle (TLS), mécanisme qui permet à la machinerie répliquative de franchir les lésions de l'ADN (Ulrich et al., 2013). En effet, PCNA est mono-ubiquitylé sur la lysine K164 par le complexe d'ubiquitylation RAD6/RAD18 lorsqu'une fourche de réplication est bloquée par une lésion ou des structures secondaires de l'ADN. PCNA ainsi modifié recrute des ADN polymérase spécialisées (ou translésionnelles) capables de franchir les lésions afin d'assurer la réplication complète du génome (Figure 19 ; Chen et al., 2011). Contrairement aux ADN polymérase répliquatives, les ADN polymérase translésionnelles sont dénuées d'activité exonucléase 3'-5' et présentent une faible fidélité de réplication caractérisée par un site actif plus flexible leur permettant de franchir des lésions induites par des agents génotoxiques au risque d'introduire des mutations dans le génome. Chez l'homme, il existe au moins cinq ADN polymérase (η , ι , κ , ζ et Rev1) capables d'effectuer la TLS et chacune a une spécificité de lésion différente. Par exemple, l'ADN polymérase η est impliquée dans le franchissement de dommages à l'ADN de type dimères de pyrimidine induits par les rayons UV (McCulloch et al., 2008). Lors de la TLS, le recrutement des ADN polymérase translésionnelles est facilité grâce à leur domaine de liaison à l'ubiquitine de type UBZ (Ubiquitin-Binding Zinc finger) ou UBM (Ubiquitin-Binding Motif). Ainsi, leur affinité pour PCNA est plus importante lorsque l'anneau de processivité est mono-ubiquitylé (Lehmann et al., 2007). Il est intéressant de noter que les cellules B utilisent la TLS

pour introduire des mutations somatiques lors de la SHM afin de franchir et/ou réparer les lésions induites par AID (Langerak et al., 2007).

La TLS décrite précédemment est un parfait exemple du rôle de PCNA en tant que plate-forme d'interactions protéine-protéine. De plus, ce mécanisme de survie est impliqué dans la chimiorésistance acquise des cellules cancéreuses traitées avec des drogues génotoxiques (Xie et al., 2010). Le blocage de la mono-ubiquitinylation de PCNA devrait donc permettre d'augmenter la chimiosensibilité des cellules tumorales. C'est une de ces propriétés pour laquelle PCNA est considéré comme une cible thérapeutique.



3.1.4. PCNA, une cible d'intérêt thérapeutique

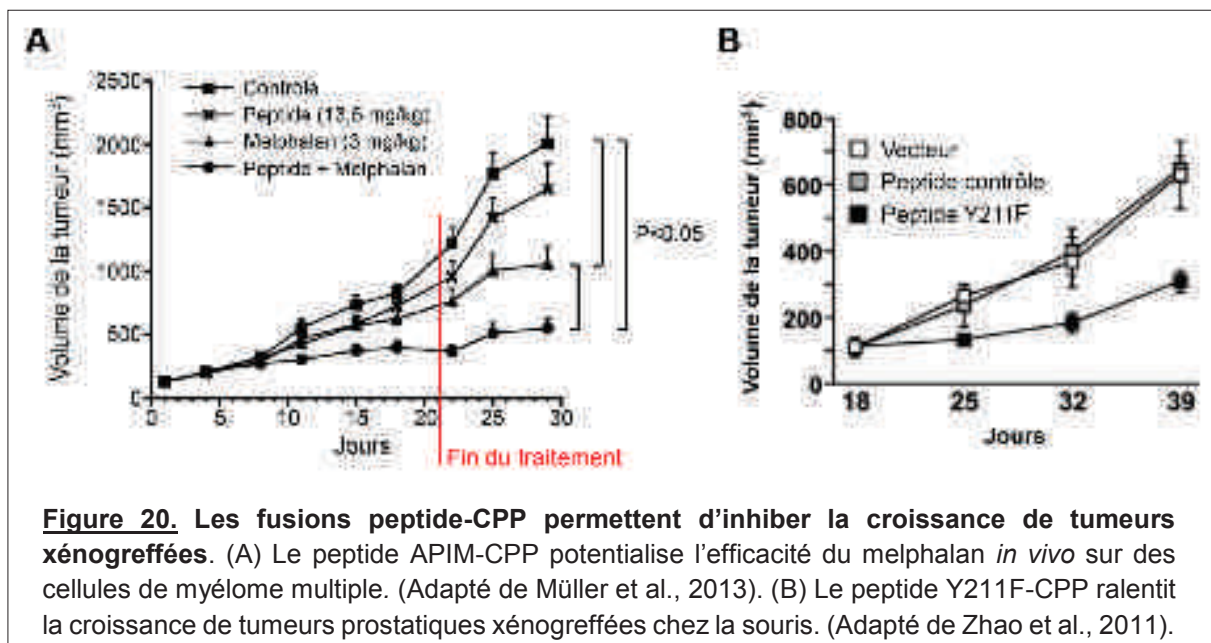
3.1.4.1. Cancer, chimiorésistance et myélome multiple

PCNA est essentiel pour la survie des cellules en prolifération et son niveau d'expression est plus élevé dans les cellules tumorales (Sakakura et al., 1994 ; Naryzhny, 2008). C'est un biomarqueur universel de la prolifération et de l'agressivité des cellules cancéreuses (Schramm et Mann, 2011). PCNA est considéré comme un facteur non-oncogénique favorisant la croissance des cellules tumorales et de ce fait, c'est une cible de choix pour le traitement potentiel de tous les cancers accessibles. En effet, il est nécessaire de restreindre l'activité d'éventuels inhibiteurs de PCNA aux cellules cancéreuses puisque cette protéine est nécessaire pour la prolifération et la survie des cellules, ce qui pourrait engendrer des effets indésirables importants. Plusieurs petites molécules chimiques modulant l'activité de PCNA *in vitro* et *in vivo* ont déjà été développées : des inhibiteurs de l'interaction entre PCNA et les protéines à motif PIP-box inhibent la réplication de l'ADN et la croissance des cellules tumorales (Tan et al., 2012 ; Punchihewa et al., 2012). Il a également été décrit que l'utilisation de ce type de petites molécules permet d'inhiber spécifiquement la TLS afin de chimiosensibiliser des cellules résistantes à certains agents génotoxiques utilisés en chimiothérapie (Actis et al., 2013).

Le cis-platine est un agent alkylant couramment utilisé en chimiothérapie. Ce type de composé génotoxique peut malheureusement induire l'émergence de sous-populations de cellules cancéreuses qui ne répondent plus aux traitements : on parle alors de chimiorésistance acquise (Doles et al., 2010). La TLS et plus précisément les ADN polymérases translésionnelles sont capables de franchir les lésions sans tenir compte de la base modifiée par un agent génotoxique. Elles contribuent donc à l'instabilité génétique, et il a été montré que la TLS fait partie des mécanismes à l'origine de la mutagenèse observée dans des cellules tumorales résistantes au traitement par le cis-platine (Xie et al., 2010). D'un point de vue thérapeutique, il serait intéressant d'inhiber la TLS en ciblant spécifiquement les interactions entre PCNA et les ADN polymérases translésionnelles afin d'augmenter la chimiosensibilité des cellules cancéreuses en potentialisant l'action des drogues génotoxiques telles que le cis-platine. Une approche similaire a récemment été utilisée pour traiter le myélome multiple. En effet, des cellules de myélome multiple xenogreffées chez la souris sont plus sensibles au traitement par le melphalan (agent alkylant) lorsqu'elles sont traitées

avec un peptide constitué de la séquence consensus du motif APIM fusionnée à un CPP (Figure 20A ; Müller et al., 2013).

La régulation des modifications post-traductionnelles de PCNA est aussi une stratégie intéressante pour la thérapie du cancer. En effet, la phosphorylation de PCNA sur la tyrosine Y211 est un événement fréquemment observé dans les cellules cancéreuses. Cette phosphorylation est inhibée après transfection dans les cellules d'un peptide correspondant aux 12 acides aminés de la région proximale de la tyrosine Y211 de PCNA (la tyrosine étant remplacée par une phénylalanine Y211F) fusionné à un CPP (Wang et al., 2006). De plus, le peptide Y211F-CPP conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase S et à la mort cellulaire dans des lignées tumorales prostatiques, et ralentit la croissance de tumeurs humaines xéno greffées sur des modèles murins (Figure 20B ; Zhao et al., 2011).



3.1.4.2. Inflammation

PCNA n'est pas seulement considérée comme une cible thérapeutique pour le traitement du cancer. Le mécanisme inflammatoire vise à éliminer un agent pathogène et à réparer les lésions tissulaires face à une agression. Il repose sur l'intervention de différents types de cellules et notamment les neutrophiles, médiateurs de l'immunité innée qui sont recrutés rapidement au site de la lésion au cours d'une infection. Le neutrophile chargé de détruire l'agent pathogène ne peut pas proliférer et il a été

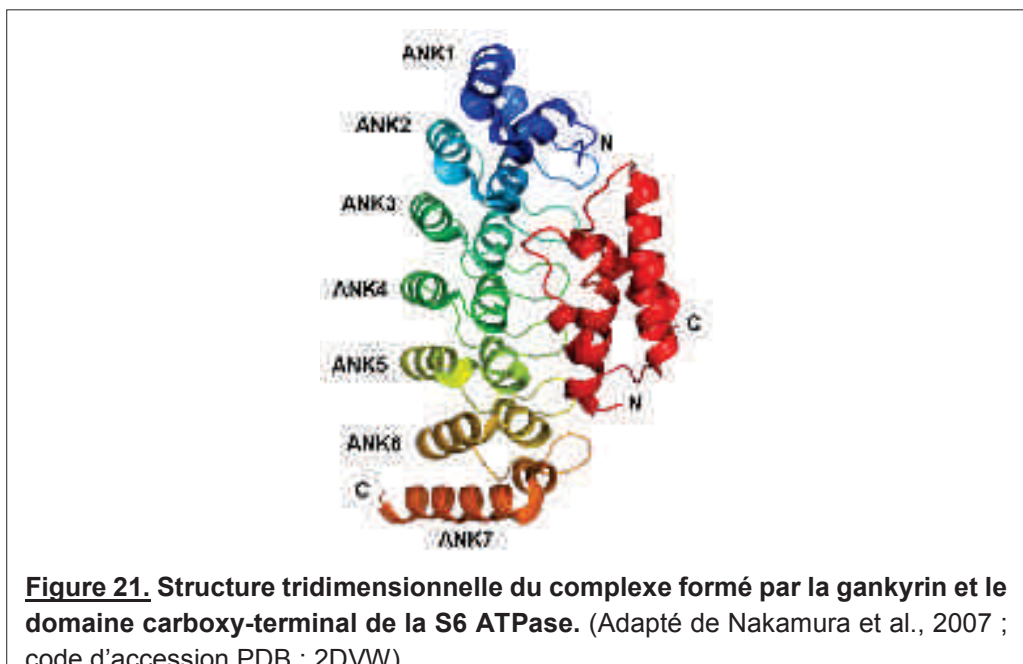
montré que PCNA est localisé exclusivement dans le cytoplasme de celui-ci (Witko-Sarsat et al., 2010).

Dans certaines maladies inflammatoires, l'apoptose des neutrophiles est retardée et ceci accentue les effets délétères du processus inflammatoire. PCNA est directement impliqué dans la survie du neutrophile en séquestrant des pro-caspases dans le cytosol, empêchant ainsi leur activation et donc l'apoptose (De Chiara et al., 2012). Ainsi, il serait intéressant de moduler la réponse inflammatoire en perturbant l'interaction entre PCNA et les pro-caspases dans le cytoplasme du neutrophile afin de déclencher l'apoptose.

En raison de son rôle de facteur non-oncogénique impliqué dans la croissance des cellules cancéreuses, PCNA constitue donc une cible intéressante pour la thérapie du cancer. C'est pourquoi nous avons choisi cette protéine, en sus de son rôle de plate-forme d'interactions, comme modèle d'étude.

3.2. La gankyrin

L'oncoprotéine gankyrin fait partie de la famille des protéines à motifs ankyrin (AR) répétés impliquées dans les interactions protéine-protéine. En général, les protéines qui possèdent des domaines AR présentent une structure concave. La gankyrin est surexprimée dans les CHC (Carcinome Hépatocellulaire) par rapport aux cellules hépatiques saines (Higashitsuji et al., 2000). La gankyrin également appelée p28 est une protéine chaperone de 25 kDa. Elle est impliquée dans l'assemblage du domaine de régulation 19S du protéasome 26S, complexe majeur de dégradation des protéines de la cellule (Kaneko et al., 2009). Elle est composée de sept domaines ankyrin répétés et interagit via ces domaines avec une autre sous-unité du protéasome, la protéine S6 ATPase (Nakamura et al. 2007). Chaque motif ankyrin est constitué de 33 acides aminés formant une structure de type $\beta 2\alpha 2$ en hélice-boucle-hélice précédée d'une boucle en épingle à cheveux constituée de feuillets β (Figure 20). Les interacteurs de la gankyrin se lient via la partie concave de la protéine.



La gankyrin fait partie, tous facteurs étiologiques confondus, des principaux éléments responsables du développement des CHC. En effet, elle est surexprimée dans près de 95 % des cas de CHC, mais son implication dans les mécanismes de l'hépatocarcinogenèse n'est pas connue (Fu et al., 2002). En revanche, il a été montré que la gankyrin induit la dégradation par le protéasome des suppresseurs de tumeurs

p53 et pRb (protéine du Rétinoblastome ; Higashitsuji et al., 2005). De récents travaux indiquent que la surexpression de la gankyrin pourrait aussi être impliquée dans d'autres pathologies comme les cancers colorectaux ou oesophago-gastriques (Meng et al., 2010 ; Ortiz et al., 2008).

Très peu de stratégies ont été employées pour inhiber l'oncogénicité de la gankyrin. Deux études ont démontré que l'extinction du messenger de la gankyrin par interférence à l'ARN induit l'apoptose dans la plupart des CHC traités (Li et al., 2005 ; Higashitsuji et al., 2005). La gankyrin est considérée comme oncoprotéine lorsqu'elle est surexprimée, mais elle n'en demeure pas moins une protéine ubiquitaire, chaperone de l'assemblage correct du protéasome 26S. Il serait donc plus approprié d'inhiber spécifiquement par interférence à la protéine les interactions dites « oncogéniques » de la gankyrin qui entraînent la dégradation de p53 et pRb en utilisant par exemple des fragments d'anticorps de type scFv.

Comme PCNA, la gankyrin représente un modèle d'étude intéressant pour développer de nouveaux outils d'immunociblage intracellulaire. Les deux protéines peuvent être produites sous forme solubles chez *E. coli*, ce qui est un paramètre très important pour pouvoir générer des outils dérivés du système immunitaire capables de reconnaître spécifiquement ces protéines (Zhang et al., 2005 ; Desplancq et al., 2011).

OBJECTIFS DE LA THESE

OBJECTIFS DE LA THESE

Le ciblage de protéines intracellulaires à l'aide d'anticorps et de fragments d'anticorps recombinants présente de nombreuses applications médicales et biotechnologiques. En effet, l'utilisation de ces molécules dans les cellules vivantes permet de suivre la dynamique de protéines endogènes (**imagerie**) et/ou de perturber leur fonction (**interférence**). La spécialité de notre équipe est de développer des outils issus du système immunitaire afin d'étudier et perturber des mécanismes biologiques de cancérogenèse. Notre expertise principale repose sur la génération et la caractérisation d'anticorps monoclonaux murins et polyclonaux de lapin, ainsi que des fragments d'anticorps humains exprimés sous la forme de scFv solubles dans un contexte intracellulaire (Philibert et al., 2007). Ces outils nous permettent d'étudier et d'inhiber l'activité de protéines comme PCNA et la gankyrin qui sont impliquées dans des mécanismes de cancérogenèse. Les objectifs de cette thèse étaient de développer des réactifs pour l'immunociblage intracellulaire de PCNA et de la gankyrin en exploitant plusieurs aspects de l'ingénierie des anticorps comme (1) la sélection d'anticorps recombinants, (2) la fonctionnalisation de ces outils en tant qu'intracorps, (3) l'amélioration de l'affinité par évolution moléculaire *in vitro* et (4) la génération d'anticorps monoclonaux et la mise au point d'une technique de vectorisation dans le cytoplasme.

Les techniques d'immunomarquage classiques ne permettent pas de détecter la gankyrin endogène. J'ai participé au développement d'un système de détection de la gankyrin endogène dans les cellules vivantes basé sur l'association de deux scFv fluorescents. Cette méthode permet de visualiser par FRET (Förster Resonance Energy Transfer) la protéine ciblée après co-transfection de deux scFv fusionnés à l'eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) et à la RFP (Red Fluorescent Protein) respectivement. Les résultats de cette étude sont décrits dans l'[article n°1](#) (Rinaldi et al., 2013 ; page 68).

Les procédures expérimentales mises en œuvre pour la sélection et la caractérisation de scFv anti-gankyrin ont ensuite été appliquées à l'obtention de ligands spécifiques de PCNA. L'objectif initial était de cibler PCNA afin (1) d'étudier la dynamique de la protéine endogène, notamment en réponse à des stress génotoxiques et (2) neutraliser son activité de cofacteur de la réplication de l'ADN dans

les cellules vivantes. Les intracorps anti-PCNA obtenus ont permis de visualiser la protéine endogène mais pas d'inhiber sa fonction. L'[article n°2](#) présente l'approche originale qui a été développée pour sélectionner et caractériser des scFv anti-PCNA fonctionnels dans les cellules (Freund et al., manuscrit en préparation ; page 71).

Nous avons également imaginé et développé un système *in vitro* de mutagenèse permettant d'améliorer l'affinité des scFv, à l'image de ce qui se passe au cours de l'hypermutation somatique mise en place par le système immunitaire lors de l'activation des lymphocytes B. En associant cette méthode à la sélection de fragments d'anticorps par « phage-display » à partir de banques combinatoires, nous avons pu isoler avec succès plusieurs mutants de meilleure affinité. Une application de ce système de mutagenèse sera décrite ultérieurement (Stoessel et al., manuscrit en préparation).

Enfin, nous avons mis au point un moyen simple et efficace pour vectoriser par électroporation des anticorps dans le cytoplasme de cellules en culture. La méthode mise au point est extrêmement efficace puisque 100 % des cellules traitées sont transduites. De plus, les anticorps sont actifs après transduction. Après obtention d'une large palette d'anticorps monoclonaux spécifiques de PCNA (en collaboration avec le service des anticorps monoclonaux de l'IGBMC), nous avons ensuite appliqué cette technique à l'immunociblage de PCNA dans les cellules vivantes. L'[article n°3](#) présente cette nouvelle technique générique de transduction d'anticorps ainsi que les essais de ciblage de PCNA avec des anticorps monoclonaux murins non bloquants (Freund et al., 2013 ; page 90).

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis (1) de montrer qu'il est possible de détecter avec des scFvs fluorescents des antigènes non détectables par des anticorps conventionnels, (2) de sélectionner des fragments d'anticorps recombinants (scFv anti-PCNA) utilisables en tant qu'intracorps afin de visualiser la dynamique d'une protéine intracellulaire en temps réel et (3) de développer une nouvelle application des anticorps monoclonaux dans les cellules vivantes.

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Détection d'une protéine intracellulaire endogène avec des scFv fluorescents

1.1. Introduction

Les fragments d'anticorps recombinants peuvent être exprimés dans les cellules eucaryotes en tant qu'intracops. En les fusionnant à des protéines fluorescentes, ils permettent d'étudier la localisation et la dynamique d'une protéine intracellulaire, à condition que tous les scFv exprimés se lient à la cible. La gankyrin est une protéine ubiquitaire très faiblement exprimée dans les cellules. Comme les techniques d'immunomarquage classiques ne permettent pas de détecter cette protéine endogène, nous avons développé un système basé sur l'utilisation de scFv fluorescents qui permet par FRET de ne voir que les scFv liés.

A partir de la banque combinatoire de phages-scFv V1 construite au laboratoire, un scFv (clone F5) capable de lier la gankyrin en solution a été isolé (Desplancq et al., 2011). Au cours de ce travail, nous avons sélectionné plusieurs autres fragments d'anticorps (R19, G3) qui interagissent avec la gankyrin en présence du F5. Des expériences de cartographie d'épitope par cristallographie et par chromatographie d'exclusion ont permis de déterminer des paires de fragments d'anticorps qui se lient simultanément à la gankyrin conduisant à la formation d'un complexe tri-moléculaire F5 – gankyrin – R19 (ou G3). Les scFv ainsi caractérisés ont été fusionnés à l'eGFP ou à la RFP, et nous avons mesuré l'intensité du signal de FLIM-FRET après co-transfection de deux scFv fluorescents dans des cellules vivantes. Dans ce cas, ne sont révélés que les scFv qui se lient à la même molécule de gankyrin.

Ce système a ainsi permis de détecter la gankyrin endogène dans des cellules vivantes et d'observer que la gankyrin est monomérique et localisée uniformément dans le cytoplasme et le noyau de plusieurs lignées cellulaires différentes. Les résultats de cette étude sont détaillés dans l'article suivant. En particulier, j'ai sélectionné la paire de scFv G1 et G3 qui ont permis de confirmer les résultats obtenus pour détecter la gankyrin par FRET.

1.2. Article n°1

The use of fluorescent intrabodies to detect endogenous gankyrin in living cells.

Anne-Sophie Rinaldi^a, Guillaume Freund^a, Dominique Desplancq^a, Annie-Paule Sibler^a, Mireille Baltzinger^a, Natacha Rochel^b, Yves Mély^c, Pascal Didier^c, Etienne Weiss^a.

^a *Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, UMR 7242, CNRS/Université de Strasbourg, boulevard Sébastien Brant, Illkirch, France.*

^b *Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7104, CNRS/INSERM/Université de Strasbourg, rue Laurent Fries, Illkirch, France.*

^c *Faculté de Pharmacie, UMR 7213, CNRS/Université de Strasbourg, route du Rhin, Illkirch, France.*

Available online at www.sciencedirect.com
SciVerse ScienceDirect
journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexcr

Research Article

The use of fluorescent intrabodies to detect endogenous gankyrin in living cancer cells

Anne-Sophie Rinaldi^{a,1}, Guillaume Freund^a, Dominique Desplancq^a, Annie-Paule Sibling^a, Mireille Baltzinger^a, Natacha Rochel^b, Yves Mély^c, Pascal Didier^{c,2}, Etienne Weiss^{a,*,2}

^aEcole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, UMR 7242, CNRS/Université de Strasbourg, boulevard Sébastien Brant, 67412 Illkirch, France

^bInstitut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7104, CNRS/INSERM/Université de Strasbourg, rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France

^cFaculté de Pharmacie, UMR 7213, CNRS/Université de Strasbourg, route du Rhin, 67401 Illkirch, France

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 12 October 2012

Received in revised form

7 December 2012

Accepted 10 January 2013

Available online 25 January 2013

Keywords:

Single-chain Fv

Intrabodies

Gankyrin

Intracellular targeting

Imaging in living cells

FLIM–FRET

ABSTRACT

Expression of antibody fragments in mammalian cells (intrabodies) is used to probe the target protein or interfere with its biological function. We previously described the *in vitro* characterisation of a single-chain Fv (scFv) antibody fragment (F5) isolated from an intrabody library that binds to the oncoprotein gankyrin (GK) in solution. Here, we have isolated several other scFvs that interact with GK in the presence of F5 and tested whether they allow, when fused to fluorescent proteins, to detect by FRET endogenous GK in living cells. The binding of pairs of scFvs to GK was analysed by gel filtration and the ability of each scFv to mediate nuclear import/export of GK was determined. Binding between scFv-EGFP and RFP-labelled GK in living cells was detected by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). After co-transfection of two scFvs fused to EGFP and RFP, respectively, which form a tri-molecular complex with GK *in vitro*, FRET signal was measured. This system allowed us to observe that GK is monomeric and distributed throughout the cytoplasm and nucleus of several cancer cell lines. Our results show that pairs of fluorescently labelled intrabodies can be monitored by FLIM–FRET microscopy and that this technique allows the detection of lowly expressed endogenous proteins in single living cells.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: ANK, ankyrin repeat; CDR, complementarity-determining region; DAPI, 4',6'-diamidino-2 phenyleindole; EGFP, enhanced green fluorescent protein; FLIM, fluorescence lifetime imaging microscopy; FRET, Förster resonant energy transfer; GK, gankyrin; GST, glutathione-S transferase; LMB, leptomycin B; NES, nuclear export signal, NLS, nuclear localization signal; PLA, proximity ligation assay; RFP, red fluorescent protein; S6CT, S6 ATPase C-terminal domain; scFv, single-chain Fv; VH, variable heavy chain domain; VL, variable light chain domain.

*Corresponding author.

E-mail address: eweiss@unistra.fr (E. Weiss).¹ Present address: Institute for Microbiological Research J-M Wiame, Université Libre de Bruxelles, avenue E. Gryson, Brussels, Belgium.² Contributed equally to the supervision of this work.

Introduction

Genetically encoded fluorescent proteins (FPs) have revolutionised the ability to study protein localization and dynamics in living cells. They enable the construction of fluorescent tools that are produced by the cell transcriptional and translational machineries and are well tolerated by most cell types [1]. Fluorescent fusion proteins are the most widely used application of FPs, since they allow specific proteins to be tracked in cells using time-lapse microscopy [2,3] or, more recently, a fluorescence-activated cell sorter [4]. While this technique is useful for imaging of proteins that have a distinct localization or show an aggregation pattern, this approach is not suitable for monitoring endogenous proteins expressed at low levels and is uninformative if transient overexpression leads to protein accumulation up to levels which affect its localisation. Fluorescent antibodies that bind specifically to the target may offer a means of studying endogenous proteins in living cells; however a technique to deliver these molecules to cells efficiently is still being developed [5].

The advances in recombinant antibodies technologies have allowed cloned antibody variable domains to be stably expressed in mammalian cells either as single-domain antibodies, such as camelid variable heavy chain domains (V_{H2}) [6,7], or as single chain Fv antibody fragments (scFvs) constituted by the assembly of the variable heavy (VH) and light (VL) chain connected by a flexible linker [8–13]. These so-called intrabodies can be easily fused to FPs to allow the recognized antigen to be imaged, for instance, by fluorescence microscopy [14–17]. Although this technique overcomes some of the limitations associated with overexpressing fluorescent fusion proteins, it is difficult to determine if the fluorescence of FP-labelled intrabodies reflects binding specifically to the protein target in the intracellular environment. Indeed, it is likely that a large portion of the overexpressed intrabodies remain free in the cytosol especially when the antigen is expressed at low levels, with the results that fluorescence does not necessarily reflect the localisation of the antigen.

We recently isolated scFvs from an intrabody library that bind gankyrin (GK), a cellular protein initially found to be expressed at higher levels in hepatocellular carcinoma cells [18]. This ubiquitous protein, also termed p28(GANK) or PSMD 10, interacts with the S6 ATPase subunit of the 19S proteasome regulatory particle and binds to pRb, cyclin-dependent kinase 4/6, MDM2 and RelA, and thereby contributes to oncogenic processes [19,20]. Since GK interacts with the 26S proteasome and tumour suppressors, it is a potential drug target for liver cancers [21]. The native structures of human GK and its yeast homologue, Nas6p, have been reported [22,23]; however, it remains unclear how GK interacts with the aforementioned proteins *in cellulo* and how it regulates their functions. One reason for this is that GK cannot be easily detected with conventional antibodies in single cells. Since scFvs that are stably expressed under reducing conditions and that bind specifically to GK in solution are available, we hypothesized that if these scFvs were used to make FP-labelled intrabodies, they may enable GK to be visualised in living cancerous cells. Since no washing steps can be performed under these conditions, non-specific fluorescence from scFvs not bound to GK may be a problem. We reasoned that this could be overcome using the

principle of a recently described method, the proximity ligation assay (PLA) [24], which uses two antibody recognition events for identification to enhance selectivity, and Förster resonant energy transfer (FRET) to monitor the dual binding of the fluorescent intrabodies to GK. FRET involves non-radiative energy transfer between two adjacent fluorophores, a property that has been successfully used to detect protein-protein interactions in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM-FRET) [25–28].

In this study, we describe the selection and characterisation of scFvs that bind specifically to GK in cells. Following precise epitope binning using gel filtration and structural analysis, scFvs fused to either enhanced green fluorescent protein (EGFP) or red fluorescent protein (RFP) were used in combination with each other to detect endogenous GK by FLIM-FRET analysis in living cells. GK was found to be homogeneously expressed at a constant rate in various cancerous cell lines including a hepatocellular carcinoma line. This is the first example of the detection of endogenous GK in single cells, since its low expression level means it cannot be detected by conventional antibody-based methods. The biosensing strategy described in this study, in which FRET measurement is performed with pairs of fluorescent intrabodies is likely to have many applications in live-cell imaging and may provide a means of imaging other endogenous proteins that are expressed at low levels in cells.

Materials and methods

Plasmid construction

pSV-scFv-E was generated by replacing the scFv 13R4 coding region of p513-13R4-EGFP [29] with scFv fragments amplified from pETOM-scFv vectors [18] digested with HindIII and SpeI restriction enzymes. This vector was used to generate pSV-scFv-G by replacing the EGFP tag with the glutathione-S transferase (GST) coding region from pETM30 [18] and adding a myc tag encoded by the following oligonucleotides 5'-CTAGTGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATG and 5'-CTAGCATTGAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTGTGCA. To construct pSV-scFv-N-R, the coding region of RFP was amplified from pDsRed-monomerN1 (Clontech Laboratories, Mountain View, USA) and inserted into pSV-scFv-E that had been digested with SpeI and EcoRI. Myc, B10 and NLS tags were inserted into the resulting plasmid using oligonucleotides encoding the myc and B10 tags, followed by the insertion of oligonucleotides 5'-CTAGTCCTC-CAAAAAAGAGAGAAAAGGTAGAAGACCCCG and 5'-CTAGCGGG-GTCTTCTACCTTCTCTCTTTTTGGA GGA into the unique SpeI site. These oligonucleotides were also used to modify pSV-scFv-E to generate pSV-scFv-NLS-E. To construct vectors containing the β -actin promoter, the unique SpeI site of pDRIVE-h β -actin (InvivoGen, San Diego, USA) was first deleted. The resulting plasmid p β A was modified by inserting a scFv, followed by an EGFP, RFP, nuclear export signal (NES) or nuclear localization signal (NLS) tag using the unique NcoI and EcoRI restriction sites as described above for the pSV series, generating p β A-scFv-E, p β A-scFv-R, p β A-scFv-NES and p β A-scFv-NLS, respectively. The cloned NES sequence was the same as that in pscFv-NES [15].

The pSV-GK vector corresponds to pCMV4-HA-gankyrin previously described [18]. To construct pSV-GK-NLS plasmid, the coding region of GK was amplified and inserted into p513-scFv-E

that had been digested with HindIII and SpeI and oligonucleotides encoding the NLS tag were inserted between the SpeI and EcoRI restriction sites. pSV-R-NLS-GK was generated from this plasmid by inserting the coding region of DsRed-monomer amplified from pDsRed-monomerN1 and GK amplified from pSV-GK as SpeI-EcoRI fragments, and then adding oligonucleotides encoding the NLS tag as above. A similar strategy was used to generate the p β A-based vectors containing GK. To generate p β A-GK-E, GK was amplified from pSV-GK and inserted into p β A-scFv-E that had been digested with NcoI and SpeI. This plasmid was modified using oligonucleotides encoding the NLS tag to generate p β A-GK-NLS-E. p β A-E-S6CT and p β A-R-S6CT were generated by subcloning EGFP or RFP into p β A-scFv-E and then the S6 C-terminal domain region (S6CT) amplified from pETM30-S6(337–418) [18] was added. To generate pSV-GK-NLS-Neo construct which contains GK-NLS in-frame with the neomycin resistance gene from pRSVNeo (ATCC 37198), the relevant sequences were amplified and inserted into the p β A-scFv-E plasmid that had been digested with NcoI and EcoRI. The primers used to amplify the neomycin coding sequence were as following: 5'-GCGCGCACTAGTATGATTGAACAAGATGGATTGCA and 5'-GCGCGCAATTCTCAGAA-GAAGCTCGTCAAGAAGG. The pET-GK and pET-scFv bacterial expression plasmids have been described previously [18]. For co-expression of S6CT, the relevant coding region was subcloned from pETM30-S6(337–418) into the pncS plasmid (a generous gift of C. Romier, Illkirch), which contains a compatible origin of replication. All constructs were verified by sequencing and stored at -20°C .

Cell culture, transfection and siRNA

The HeLa and Huh-7 cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with L-glutamine (2 mM), gentamycin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), HEPES buffer (10 mM) and 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum, at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. The day before transfection, 4×10^4 cells were plated in 35 mm-diameter Ibidi dishes (Biovalley, Marne La Vallée, France) and 8×10^4 cells were plated in 12-well culture plates containing glass coverslips. Transient DNA transfection was performed using jetPEI (Polyplus transfection, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions. Stably transfected cells were selected by supplementing the culture medium with the antibiotic G418 (0.5 mg/mL). Control siRNA and siRNAs against GK mRNA were obtained from Ambion (Life Technologies, Saint Aubin, France). The target siRNA sequence for GK was 5'-UGAAUCGUGUCAUGUUAdTdT (siGK2). For the transfection with the Neon transfection system (Life Technologies), 1 μL siRNA (50 μM stock solution) was added to 10^5 cells in R buffer (Life Technologies) and the mixture was processed in the electroporation device as recommended by the manufacturer. Where indicated, electroporated cells were transfected with jetPEI after 24 h as described above. To analyse GK levels, treated cells were lysed in RIPA buffer (Pierce, Rockford, USA) and approximately 25 μg of soluble protein was run per lane for Western blotting. The primary antibodies anti-GK (H-231; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) and anti-actin (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) were used. HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma-Aldrich) were detected using chemiluminescence (Immobilon; Millipore, Billerica, USA).

ScFv selection and *in vitro* binding assays

ScFv-phages were selected as previously described [29], except that the antigen was immobilised on plates coated with 9E10 antibody [30] or directly on NHS-activated magnetic beads (GE Healthcare, Velizy, France). In some experiments, biotinylated antigen bound to streptavidin-coated magnetic beads (Dynabeads, Invitrogen) was used for panning and pure scFv F5 (5–20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to the washing solutions. Labelling with biotin was performed using the EZ-link NHS biotin reagents kit (Fisher Scientific Pierce, Illkirch, France). Following the third round of selection, the scFvs were subcloned into the pETOM vector, expressed in *Escherichia coli* by autoinduction, and purified on Talon™ beads as described previously [18]. Binding in solution was evaluated by mixing the monomeric fraction of the scFvs with equimolar amounts of pure antigen and loading on a Superdex 75 10/300 column (GE Healthcare) in 25 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl and 1 mM DTT. Chromatography was performed at a flow rate of 0.3 mL/min. The components of the collected fractions were identified by SDS-PAGE and Brilliant Blue G staining (Sigma-Aldrich).

Immunofluorescence and FLIM-FRET microscopy

For the analysis by conventional fluorescence microscopy, the cells were fixed 48 h after transfection with 4% (w/v) paraformaldehyde for 20 min, washed several times with PBS, and the coverslips were mounted with 4',6'-diamidino-2 phenyleindole (DAPI) Fluoromount-G (SouthernBiotech, Birmingham, UK). Where indicated, the cells were permeabilised with 0.2% (v/v) Triton-X100 for 5 min after fixation and incubated with an anti-tag monoclonal antibody or anti-GK rabbit immunoglobulin (Santa Cruz Biotechnology), and then with AlexaFluor488 labelled-anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulins (Molecular Probes), as previously described [31]. Cells were imaged with a Leica DM5500 microscope equipped with FITC and Cy3 filters. Images were collected with a $63\times$ objective and analysed with Image J or Photoshop software. The experimental setup used for FLIM measurements has been described previously [32]. Briefly, time-correlated single-photon-counting measurements were performed on a scanning microscope based on an Olympus IX70 inverted microscope with a water immersion $63\times$ objective. Excitation at 900 nm was provided by a titanium-sapphire laser (Tsunami; Spectra Physics, Beaulieu la Rolande, France). Photons were collected using a short-pass filter with a cutoff wavelength of 680 nm and a band pass filter of 520 nm (AHF, Tübingen, Germany). Typically, transfected cells in DMEM without phenol red were scanned at room temperature for approximately 30 s to achieve appropriate photon statistics to calculate fluorescence decay. Data were analysed using SPCLImage software and images are constructed through an arbitrary colour scale, ranging from blue (short lifetime) to brownish-yellow (long lifetime), which corresponds to the lifetime of EGFP. The FRET efficiency was calculated using the equation: $E = 1 - (\tau/\tau_0)$, where τ is the lifetime of EGFP in the presence of RFP and τ_0 the lifetime of EGFP in the absence of RFP [33].

Crystallography

Crystals of the complex of GK with scFv F5 were obtained at 17°C by vapour diffusion in sitting drops of protein in 0.1 M HEPES pH 7.0, 8% PEG 8000. Data collection was performed at

100 K on the beamline ID29 at the ESRF, Grenoble (France). The collection of diffraction data and structure refinement was performed as described previously [34]. Details of data collection and refinement will be published elsewhere and can be obtained from the authors.

Results

The structure and in cellulo binding characteristics of scFv F5

We previously described the isolation of anti-GK scFvs that were expressed in the bacterial cytoplasm and were soluble [18]. The scFv F5 has been extensively characterised *in vitro* and large quantities of F5 bound to GK were obtained by a single gel filtration step (Supplementary Fig. 1A). To map the surface of the interaction between F5 and GK, we performed a structural study of the complex. Crystals were obtained and the structure of the complex was solved by X-ray crystallography at 2.5 Å resolution. The overall structure of the ankyrin repeats (ANK) of GK (Fig. 1A) is identical to that previously reported [22,35], suggesting that binding of F5 does not modify the conformation of GK. The fold of F5 corresponds to that of the immunoglobulin domains, except that the disulfide bridge between Cys24 and Cys98 in the VH domain is absent. Interestingly, F5 recognizes the α -helices in the region encompassing ANK4 to ANK6, which is not where S6 ATPase binds to GK [35]. F5 recognises GK via the six antibody complementary-determining region (CDR) loops forming key hydrogen bonds and polar interactions (Fig. 1A). Details of the structure of the F5–GK complex will be described elsewhere.

Next, the folding capacity and the binding activity of F5 when expressed in mammalian cells were assessed. F5 tagged with EGFP or RFP at the C-terminus was inserted into mammalian expression vectors containing either the SV40 early (SV) or the β -actin (β A) promoter (Supplementary Fig. 2) and transiently transfected in HeLa cells. F5 expression was monitored using fluorescence microscopy and Western blotting. F5 was homogeneously expressed in the cytoplasm and in the nucleus (Fig. 1B). This differs from the localisation of another scFv, 1F4, subcloned from a mouse hybridoma cell line [36], which accumulates as aggregates. The expression level of RFP-tagged F5 was increased in the transfected cells when a vector containing the SV promoter was used in place of the β A promoter (Fig. 1C). Since cells containing varying amounts of F5 remained flat and did not round up even after prolonged incubation (>72 h), it appears that expressing F5 in this way does not affect the fundamental functions of the cell. Furthermore, the presence of F5 in the nucleus suggests that the expressed molecules are soluble and can passively diffuse into the nuclear compartment.

We used the classical re-targeting assay [16,37] to analyse the antigen-binding capacity of F5 in transfected cells. The expression vectors were modified so that a NLS or NES tag was appended to the F5 coding region at the C-terminus (Supplementary Fig. 2). Similar constructs were generated with D12, a closely related scFv isolated from the same library that strongly binds to BSA *in vitro* [18]. GK–EGFP was almost completely re-targeted when co-transfected with F5–NLS fused to RFP (Fig. 1D, panel 2). However, when the same experiment was performed with D12–NLS, the localisation of GK–EGFP was not affected (Fig. 1D, panel 1). When similar experiments were

performed using scFvs containing at the C-terminus a NES tag, F5 promoted the export of nuclear GK (Fig. 1D, panel 4). This was not observed when D12 was used, or when cells were treated with the nuclear export inhibitor leptomycin B (LMB) [38] shortly before imaging. Nuclear export of GK was also previously observed with another scFv, 13R4, [15] and these results suggest that binding of monomeric F5 to its epitope on the convex side of GK permits exogenously expressed GK to undergo nuclear import and export.

We have previously shown that bivalent scFvs can be generated if they are tagged with GST, an enzyme that accumulates as stable active dimers in the bacterial cytoplasm [18]. Since GST is soluble in the reducing environment of eukaryotic cells [39], we tested whether F5 fused to GST at the N-terminus generates active bivalent molecules in mammalian cells. F5–GST cloned into the pSV-based vector accumulated almost exclusively in the cytoplasm (Fig. 1D, panel 6). This was expected since the scFv–GST fusions have a M_r of 110 kDa, and so are too large to diffuse passively into the nucleus. GK was specifically localized to the cytoplasm and did not move in the nucleus when cotransfected with F5–GST; however, this was not observed when F5–GST was expressed under the control of the β -actin promoter, likely due to the reduced expression level under these conditions (Fig. 1C). This indicates that a scFv fused to GST is able to sequester a small-sized antigen in the cytoplasm. It also suggests that the efficiency of F5 binding in the cells is correlated to its expression level. Together with the functional analysis of F5 tagged nuclear import or export signals, these findings illustrate that F5 can be used to monitor the localisation of GK and that the majority of the expressed F5 fusions were active in mammalian cells (Supplementary Fig. 4).

Selection and characterization of scFvs that bind GK in the presence of F5

To isolate scFvs that bind GK in a region outside of the F5 epitope, which was mapped using the crystal structure, we performed phage display selections in the presence of excess F5. GK was immobilized on beads using myc-tagged F5 and the anti-myc 9E10 antibody (E), or binding biotinylated GK to coated-streptavidin plates (R). These two approaches are schematically represented in Fig. 2A. After three rounds of panning, we subcloned the most represented clones in each selection (scFvs E21 and R19) into expression vectors and analysed their ability to bind to GK *in vitro* and *in cellulo*. The CDR3 loops of these two scFvs differ greatly in length and amino acid composition and are not homologous to the CDR3 loops of F5 (Supplementary Fig. 3). When equimolar amounts of bacterially-expressed R19 were mixed with GK and analysed by gel filtration, a single peak corresponding to a 1:1 complex (retention volume: 9.8 mL) was observed (Fig. 2B) and a similar result was seen with F5 (Supplementary Fig. 1A). This was not observed when R19 was mixed with GK in complex with bacterially-expressed S6CT [35]. In this case, in addition to the main monomer peak of R19, a smaller peak corresponding to the GK–S6CT complex (GK/S6) was observed. Similar results were obtained with E21, although the peaks were less sharp, probably because E21 tends to aggregate after purification. Since a single peak with a retention volume of 9.4 mL was observed when F5 was analysed in the presence of the GK–S6CT complex, it appears

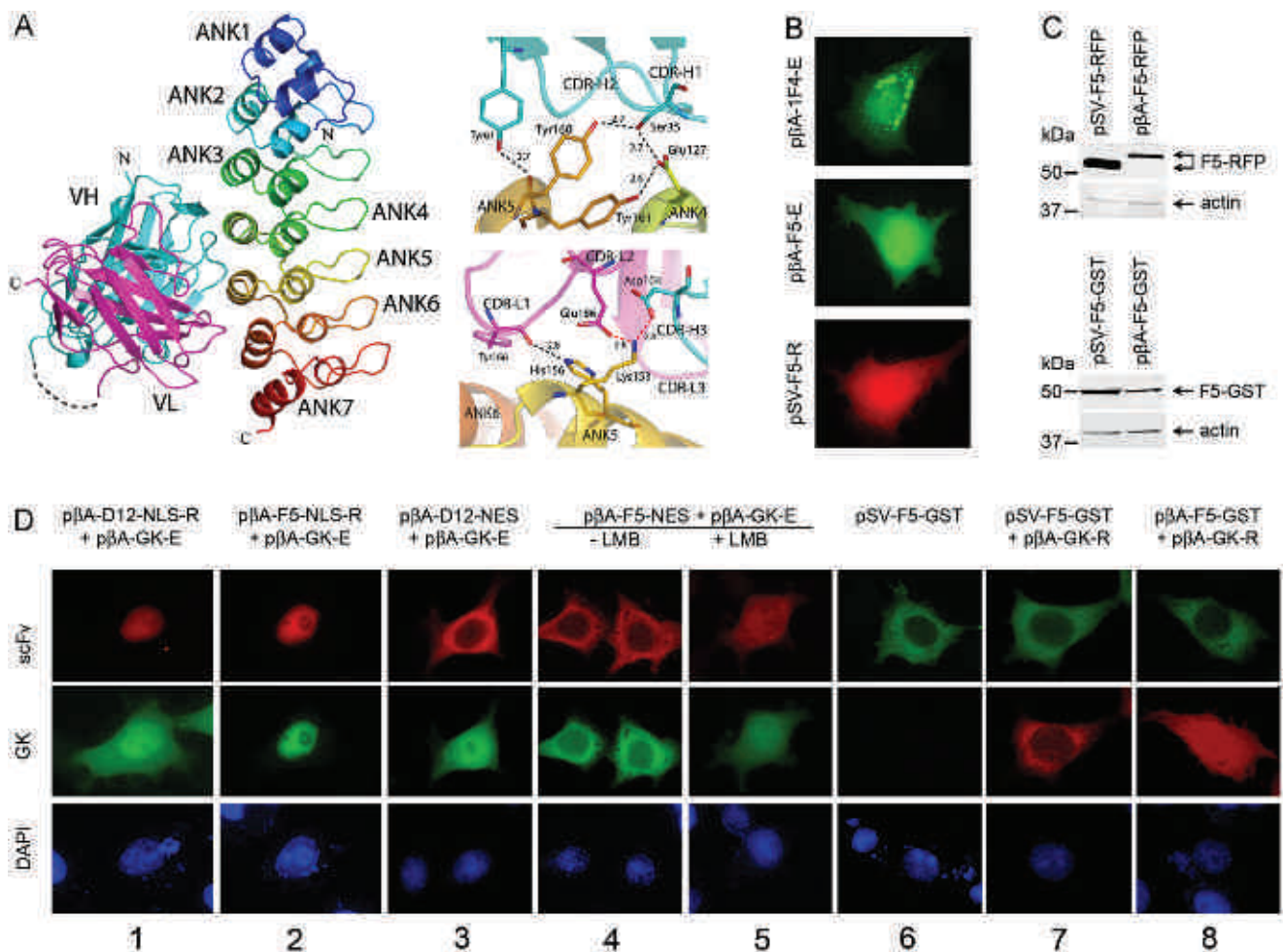


Fig. 1 – Analysis of the binding properties of scFv F5 *in vitro* and *in cellulo*. (A) 3D structure of the GK–F5 complex. Ribbon representation with each ANK of GK indicated by ANK1–7 (blue to red) and the VH and VL domains of scFv F5 shown in cyan and magenta, respectively. Dotted line represents the unstructured linker of F5. The right panel shows detailed views of the residues involved in the interactions between the epitope and the VH (upper) and VL (lower panel) domains. Hydrogen bonds and polar interactions are shown as dashed lines. (B) Expression of scFv F5 in HeLa cells. Representative images of cells transiently transfected with the indicated scFv constructs tagged with EGFP (green) or RFP (red) are shown. The poorly soluble scFv 1F4 was used as a reference [15]. Cells were fixed 48 h after transfection and the expressed scFvs were visualized using a fluorescent microscope. Magnification: $\times 630$. (C) Analysis of the expression of RFP- or GST-tagged F5. Whole cell extracts of 6×10^4 HeLa cells transfected with the indicated plasmids were subjected to SDS-PAGE and Western blotting. RFP-labelled F5 (upper panel) and GST-tagged F5 (lower panel) were detected with the anti-B10 antibody [37] and the anti-myc 9E10 antibody, respectively, followed by incubation with HRP-labelled goat anti-mouse immunoglobulins. The difference of migration on gel of the RFP-labelled fusions is due to the size of the linker in the construct. (D) Co-localisation of scFv F5 with GK in HeLa cells. The subcellular distributions of GK-EGFP or GK-RFP fusion proteins co-expressed with either NLS-, NES- or GST-tagged F5 were visualized using a fluorescent microscope as in (B). F5-GST was detected with the anti-myc 9E10 antibody and Alexa488-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins. The scFv D12 was used as a negative control. Nuclear export of the NES-tagged scFvs was inhibited by treating cells with LMB [37] shortly before fixation. Nuclei were stained with DAPI (blue). Magnification: $\times 630$.

that the binding of R19 and E21 to GK is sterically hindered by the presence of the S6 ATPase domain. Gel filtration was used to confirm that F5 and R19 bind to different regions of GK (Supplementary Fig. 1B). Attempts to solve the crystal structure of the GK–R19 complex to map the R19 epitope have been unsuccessful so far.

The intracellular behaviour of R19 and E21 was investigated as described above for F5. R19 and E21 fused to EGFP or RFP were solubly expressed in cells, although small aggregates of E21 were observed when the transfected cells were cultured for more than

48 h (Fig. 2C, panel 4). This suggests that R19 does not interfere with essential functions of the cell, as observed with F5. The intracellular binding capacity of R19 in the presence of co-expressed GK was investigated. Fluorescently-tagged GK was almost completely retargeted when co-transfected with fluorescently-tagged R19-NLS (Fig. 2C, panel 7). R19-GST, which cannot diffuse into the nucleus, co-localised with GK-NLS suggesting that close to 100% of the monovalent or bivalent R19 molecules were active. R19-NES did not promote the export of nuclear gankyrin, indicating that R19 differs from F5. These

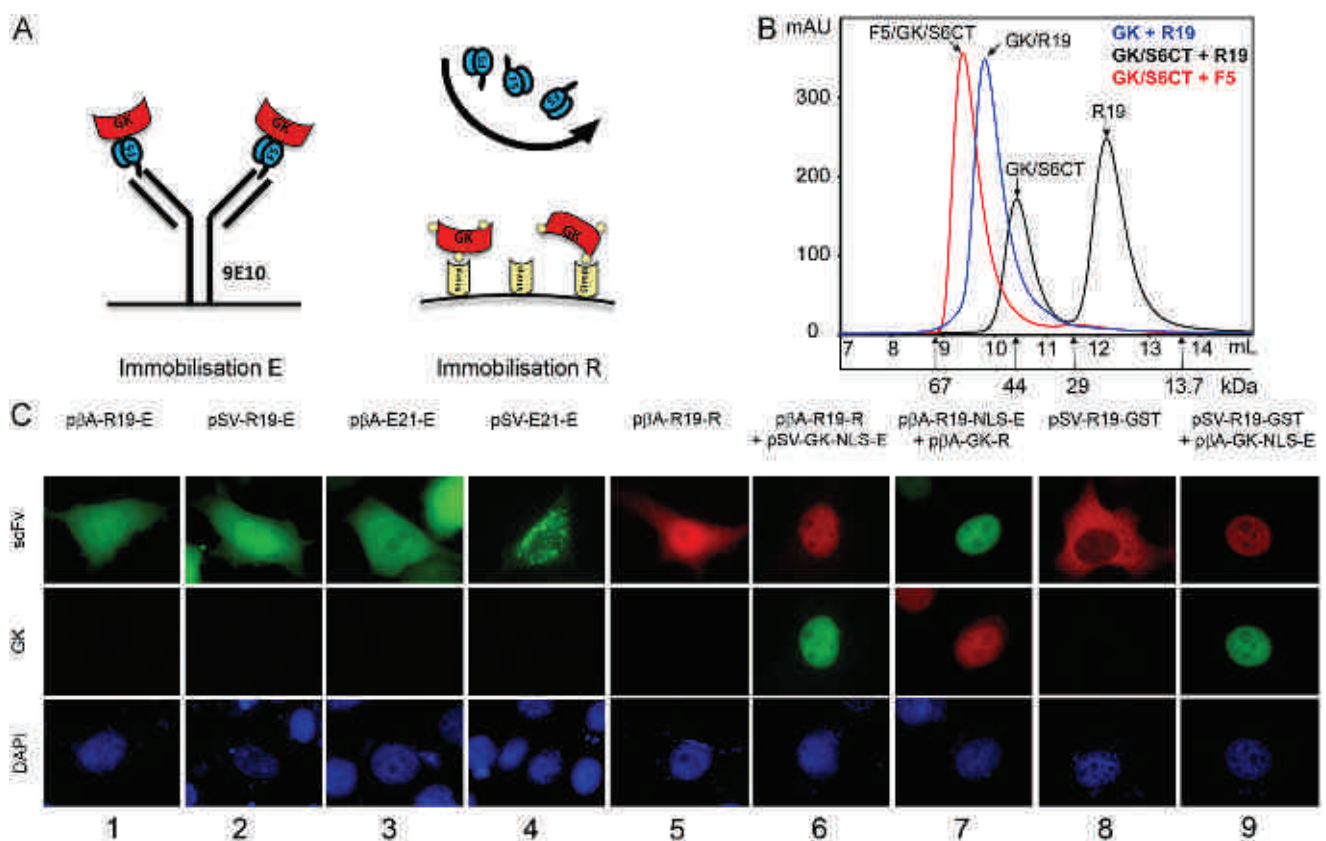


Fig. 2 – Selection and characterisation of scFvs that bind to GK in the presence of scFv F5. (A) Schematic representation of the two methods employed to immobilise GK on a solid support for phage selection. GK (red) was immobilised in complex with F5 (blue) using the anti-myc 9E10 antibody (immobilisation E) or biotinylated GK was bound to a plate by means of streptavidin (yellow) (immobilisation R). In the latter, an excess of pure F5 was added during the washing steps. (B) Gel filtration analyses of the complexes of scFv R19 with GK or with GK-S6CT (GK/S6CT). Monomeric scFv fractions were incubated with GK or with GK-S6CT at equimolar ratios for 30 min at room temperature before they were loaded on the column. Typical elution profiles of R19 with GK (blue) or R19 with GK-S6CT (black) are shown. The elution profile of F5 with GK-S6CT is shown in red. The column was calibrated with standard proteins (BSA, ovalbumin, carbonic anhydrase, ribonuclease A), which eluted at defined volumes as indicated by arrows. (C) Expression of scFv E21 and co-localisation of scFv R19 with GK in HeLa cells. EGFP- or RFP-labelled GK co-expressed with either NLS- or GST-tagged R19 were visualised by fluorescence microscopy as indicated in the legend of Fig. 1. R19-GST was detected with the anti-myc 9E10 antibody and Alexa568-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins. The plasmids used for co-transfection are indicated. Nuclei were stained with DAPI. Magnification: $\times 630$.

experiments show that the use of F5 in the phage display selection (Fig. 2A) allowed additional scFvs to be isolated, which are able to interact strongly with GK. Since R19 did not bind to the GK-S6CT complex, it is a candidate for dual scFv recognition of GK in combination with.

Detection of endogenous GK by FLIM-FRET

We have previously shown that EGFP and RFP are suitable FPs for imaging molecular interactions in living cells using FRET and FLIM microscopy [33]. Since numerous constructs of scFvs or GK fused to either EGFP or RFP were available, we tested if intracellular binding events could be observed using FLIM-FRET. Preliminary experiments were performed using F5, R19 and E21 fused to EGFP together with GK-NLS fused to RFP, as represented schematically in Fig. 3A (left). The mean EGFP lifetime in the absence of any transfer [40] (*i.e.* when scFvs were transfected alone) was approximately 2.6 ns (brownish-

yellow), and this decreased to approximately 2 ns (blue-green) when scFvs were co-transfected with RFP-GK-NLS (Fig. 3B and Table 1). This difference indicates that FRET occurred. FRET was essentially detected in the nucleus of the co-transfected cells, reflecting the nuclear localisation of the scFv-GK complexes and confirming that the majority of the expressed scFv molecules were active, as was previously observed in fixed cells. This indicates that binding of fluorescent scFvs to GK can be easily monitored in living cells using FLIM-FRET.

We next investigated whether dual binding of these fluorescent scFvs to GK can be observed using this method. This would allow unlabeled GK to be detected, as represented schematically in Fig. 3A. After co-transfection of various scFv constructs encoding either EGFP or RFP with HA-tagged GK [18], a strong FRET signal was observed between F5-NLS-RFP and EGFP-tagged R19 or E21 (Fig. 3C). The transfer efficiency was up to 24% (Table 1), a percentage comparable to that observed after co-transfection of

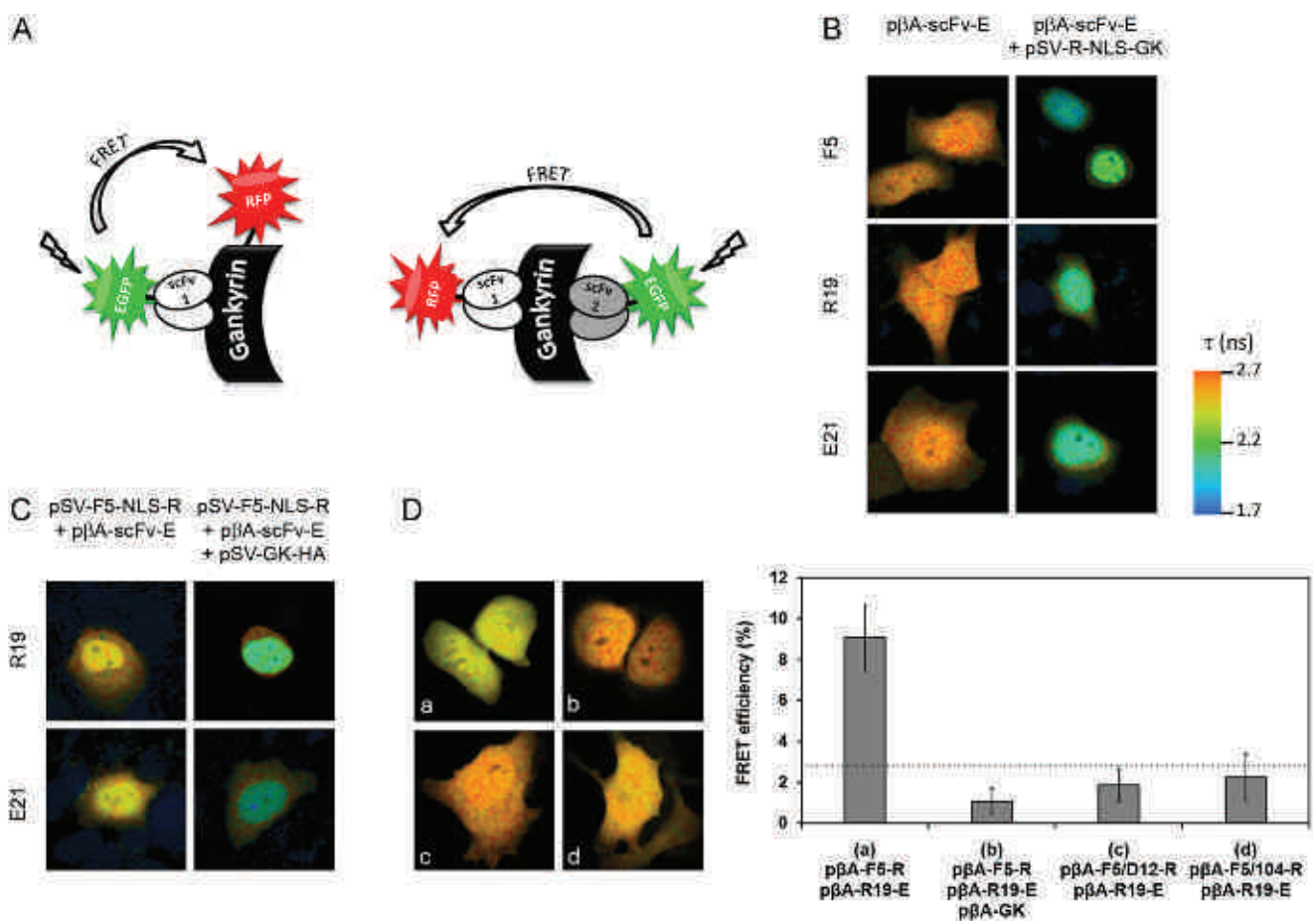


Fig. 3 – Analysis of selected scFvs by FLIM-FRET microscopy (A) Schematic representation of intermolecular FRET (white arrow) reflecting the interaction of EGFP-based donor molecules with RFP-labelled acceptor molecules. The cartoon shows FRET between a scFv and GK (left) or between two different scFvs (right). The spatial proximity of the labelled fusion proteins decreases the lifetime of EGFP fluorescence (B) FLIM-FRET analysis of the binding capacity of scFvs in HeLa cells. Cells were co-transfected with equimolar amounts of the indicated constructs and analysed by FLIM 48 h after transfection. EGFP fluorescence lifetime measurements are converted into images [33] with a colour scale ranging from blue (1.7 ns) to brownish-yellow (2.7 ns). The fluorescence lifetime of EGFP in the absence of a FRET acceptor was 2.7 ns. (C) FLIM-FRET analysis of fluorescent scFvs co-expressed with unlabelled GK and processed as in (B). Representative images of individual cells expressing R19-EGFP or E21-EGFP and RFP-labelled F5-NLS in the presence or absence of co-expressed HA-tagged GK are shown. (D) FLIM-FRET analysis of cells expressing R19-EGFP and either F5-RFP (a), F5/D12-RFP (c) or F5/104-RFP (d). The ratio of EGFP plasmid to RFP plasmid was 1:5. A representative image of cells co-expressing R19-EGFP, F5-RFP and untagged GK is shown in (b). The fluorescence lifetime of EGFP was recorded as in (B). The histogram on the right corresponds to the FRET efficiencies calculated from the data collected from approximately 25 measurements in each case ((a)–(d)). FRET is considered to be significant when the value is higher than 5% of efficiency (dotted line).

RFP-labelled gankyrin and the EGFP-labelled scFvs. This signal was not detected when F5 was not tagged with NLS, suggesting that the relocation of overexpressed GK to the nucleus facilitates the formation of complexes containing two scFv molecules and one GK molecule. Surprisingly, we also detected significant FRET when GK was not co-expressed, albeit at a lower level (8–9% of efficiency; Fig. 3C). Although this might be due to non-specific interactions between the two fluorescent scFvs in cells promoted by the overexpression of F5, such associations were not observed by gel filtration, even when both scFvs were present at high concentrations. Another possibility is that the system, which is extremely sensitive and relatively independent of changes in

probe concentration [26], is able to detect binding of the fluorescent scFvs to endogenous GK.

To test this hypothesis, we constructed two mutants of F5 that were unable to interact with GK, as probed by gel filtration (not shown), and analysed the FRET signal when these mutants were co-transfected with R19. In one mutant, the VL domain of F5 was replaced with that of another scFv, D12, creating the chimeric scFv F5/D12. In the other mutant, Asp104 in the CDR3 of the F5 VH domain, which is important for the interaction of F5 with GK (Fig. 1A), was replaced with an alanine residue to generate F5/104. Due to the high background of FRET observed with the vectors expressing the scFvs under the control of the SV40

Table 1 – FRET–FLIM measurements with individual cells 48 h after transfection.

Plasmids	Fluorescence lifetime (ns) ^a	Efficiency (%) ^b
pβA-F5-E+pSV-R-NLS-GK	2.10	20
pβA-R19-E+pSV-R-NLS-GK	2.00	23
pβA-E21-E+pSV-R-NLS-GK	1.90	26
pβA-G3-E+pSV-R-NLS-GK	1.76	38
pβA-E-S6CT+pSV-R-NLS-GK	1.70	34
pβA-D12-E+pSV-R-NLS-GK	2.40	8
pSV-F5-NLS-R+pβA-R19-E+pβA-GK	2.10	20
pSV-F5-NLS-R+pβA-R19-E	2.40	8
pSV-F5-NLS-R+pβA-E21-E+pβA-GK	2.00	24
pSV-F5-NLS-R+pβA-E21-E	2.38	9
pβA-F5-R+pβA-R19-E	2.35	9
pβA-F5/D12-R+pβA-R19-E	2.56	2
pβA-F5/104-R+pβA-R19-E	2.53	3
pβA-F5-R+pβA-F5-E	2.52	3
pβA-F5-E+pβA-R-S6CT	2.10	19
pβA-F5-E+pβA-R-S6CT+siRNA Neg	2.21	15
pβA-F5-E+pβA-R-S6CT+siRNA GK2	2.36	9
pβA-F5-R+pβA-R19-E+pβA-GK	2.55	2
pβA-F5-R+pβA-R19-E (in A3 or A5 cells)	2.58	1
pβA-F5-R+pβA-R19-E (in HEK or Huh7 cells)	2.35	9
pβA-G3-E+pβA-R-S6CT	2.15	17
pβA-G3-R+pβA-R19-V	2.40	11.5
pβA-G3-E+pβA-G3-R	2.55	2
pβA-G3-E+pβA-R-S6CT+siRNA Neg	2.13	18
pβA-G3-E+pβA-R-S6CT+siRNA GK2	2.42	7
pβA-G3-R+pβA-R19-E+siRNA Neg	2.34	10
pβA-G3-R+pβA-R19-E+siRNA GK2	2.44	6
pβA-G3-E+pβA-R-S6CT+pβA-GK-NLS	2.50	4
pβA-E-S6CT+pβA-R-S6CT	2.59	0.5

^a The indicated number in each case corresponds to the mean value of up to 40 EGFP lifetime measurements collected from 3 independent transfection experiments. Standard deviation of the measurements: 0.05 ns.

^b the percentage of FRET efficiency was calculated using the equation: $E = (1 - \tau/\tau_0) \times 100$, where τ is the lifetime of the donor in the presence of the acceptor and τ_0 is the lifetime of the donor in the absence of the acceptor. The energy transfer process is considered to be significant when the value of the efficiency percentage is above 5.

promoter, we used the pβA promoter-based constructs. When these mutants were transfected into cells, they were soluble and they were not relocalised to the nucleus in the presence of excess GK-NLS (Supplementary Fig. 4, panel 5 and 6, respectively). When FLIM–FRET was used to analyse cells co-transfected with one of these mutants and R19, only background levels of FRET were detected (efficiency was less than 5%) (Fig. 3D and Table 1).

By contrast, significant FRET was detected when wild-type F5 was used in place of the mutants with a mean efficiency of approximately 9%. Furthermore, the FRET signal was homogeneously detected throughout the cell and was identical to the expression pattern of GK in transfected cells (Fig. 1D, panel 1). The FRET signal was no more observed when F5 and R19 were co-transfected with a large excess of GK. This suggests that the formation of complexes containing two scFvs and one GK molecule only occurs when GK is at a very low concentration, which is true of endogenous GK in these cells.

The expression of GK is frequently increased in hepatocellular carcinomas, such as the HepG2 and Huh-7 cell lines [19,20]. We attempted to analyse the binding behaviour of F5 and R19 in these cell lines and determined if it differs from that observed in HeLa cells. Unfortunately, the transfection efficiency of the HepG2 cells was too low for accurate analysis by FLIM. However, FRET signal could be detected in Huh-7 cells after transfection of F5 and R19, and the fluorescence lifetime of EGFP was approximately 2.35 ns (9% of efficiency), which is almost identical to that observed in HeLa cells under similar conditions (Table 1). Western blot analysis of whole cell extracts confirmed that the expression levels of GK were similar in Huh-7 and HeLa cell lines (Supplementary Figure S5). Finally, we assessed whether the FRET signal generated by F5 and R19 was influenced by the expression level of GK. Stable cell lines overexpressing GK-NLS were generated by transfecting HeLa cells with a vector encoding GK-NLS and the neomycin resistance gene. After several weeks of selection with antibiotic G418, many colonies were analysed by staining with anti-GK polyclonal antibodies and two positive clones were identified (A3, A5). Interestingly, while HeLa cells and cells from a negative clone (N6) formed rounded colonies as expected, A3 and A5 cells were flat and spread over the surface of the dish and had distinct migration properties (Supplementary Fig. 6). This phenotype is similar to that observed *in vitro* following the expression of transforming factors and is termed “epithelial-to-mesenchymal transition” ([41]; F. Dantzer, personal communication). When A3 or A5 cells were analysed by FLIM–FRET following transfection with the fluorescent F5 and R19, no FRET signal was detected (1–2% of efficiency), whereas the FRET efficiency in the negative clone (N6) was similar to that observed in wild-type HeLa cells (Supplementary Fig. 6 and Table 1). These data indicate that the FRET signal is influenced by the level of GK and that the system can detect far lower levels of GK than can be detected using conventional antibodies.

Imaging endogenous GK with other pairs of binders

We decided to investigate whether other scFvs, apart from F5, R19 and E21, could be used to image endogenous GK by FLIM–FRET. GK was immobilised on magnetic beads either directly before or after biotinylation and, after several rounds of phage screening, we isolated two specific clones (scFvs G1 and G3) with CDR3 loops that were not homologous to those of F5, R19 and E21 (Supplementary Fig. 3). We subcloned the coding regions of G1 and G3 into different pβA-based vectors and analysed the localisation of GK after co-transfection with the NLS or NES-tagged scFvs. GK was completely re-localised to the nucleus or cytoplasm, respectively, when co-transfected with G3. This re-localisation was not as obvious when G1 was transfected instead of G3, suggesting that G1 and G3 bind GK differently. In

addition, GK was excluded from the nucleus when G3-GST was expressed (not shown), similar to the effect of F5-GST, indicating that G3 and F5 perform similarly in cells. Furthermore, G3 behaved similarly to F5 in the *in vitro* gel filtration assay. In particular, G3 stably interacted with the GK-S6CT complex (Supplementary Figure 1C), suggesting that the G3 epitope is not located on the concave side of GK.

As we observed that S6CT binds GK strongly *in vitro*, in agreement with Nakamura and co-authors [35], we investigated whether a S6CT fluorescent fusion protein could bind GK in living cells. Since tagged GK overexpressed in cultured cells is precipitated in a complex with co-transfected tagged S6 ATPase 6 [42], we expressed EGFP-S6CT or RFP-S6CT under the control of the β -actin promoter (Supplementary Fig. 2). Fluorescence microscopy revealed that both fusion proteins were homogeneously expressed in the cytoplasm and in the nucleus (Fig. 4B), although in some

cells they tended to accumulate in the nucleus. No aggregates were observed and cell morphology was not aberrant even 72 h after transfection, suggesting that almost all S6CT fusion molecules were soluble and did not affect the fundamental functions of the cell. EGFP-S6CT and RFP-S6CT were largely detected in the nucleus when co-transfected with GK-NLS, which was not the case when they were co-transfected with untagged GK (Fig. 4B). These data indicate that EGFP-S6CT and RFP-S6CT are soluble and interact with co-expressed GK in mammalian cells.

The binding of G3 and S6CT fusion proteins to GK was examined by FLIM-FRET in living cells. Nuclear FRET with efficiencies above 34% were observed when EGFP-labelled G3 or S6CT was co-transfected with GK-NLS fused to RFP (Fig. 4C and Table 1). These values are slightly higher than those obtained with F5, R19 or E21 under similar conditions, indicating that G3 and S6CT are suitable probes for FLIM-FRET. We then monitored

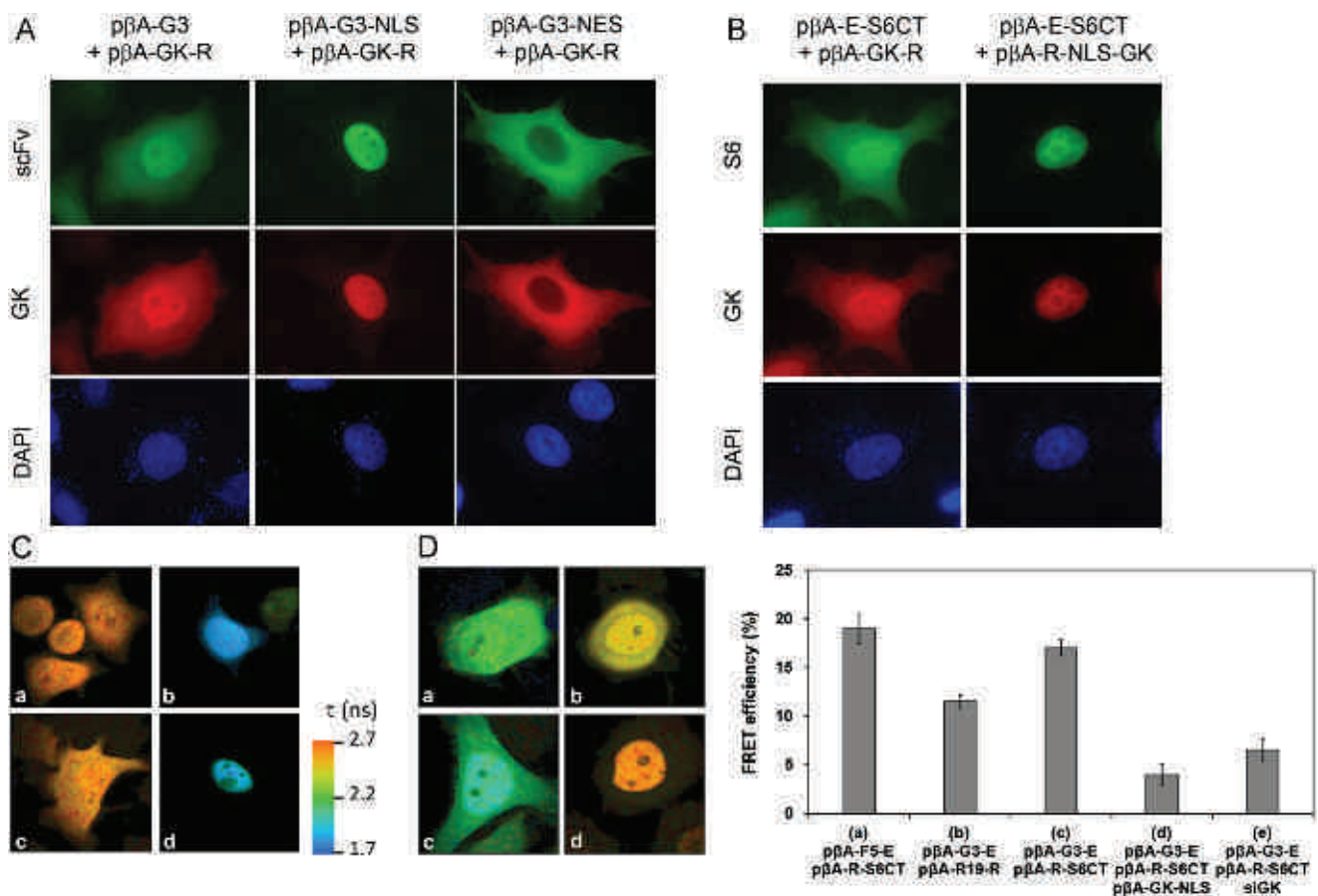


Fig. 4 – Analysis of the intracellular binding properties of G3 and S6CT to GK. (A) Co-localisation of G3 with GK in HeLa cells. The subcellular distribution of GK-RFP co-expressed with NLS-, NES- or myc-tagged G3 was visualised using a fluorescent microscope as described in the legend of Fig. 1. The ratio of the GK plasmid to scFv plasmid was 1:5. ScFvs were stained with the anti-myc 9E10 antibody and Alexa488-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins. Magnification: $\times 630$. (B) Co-localisation of S6CT with GK in HeLa cells. Cells were fixed 48 h after transfection. The ratio of S6CT plasmid to GK plasmid was 1:3. Nuclei were stained with DAPI. Magnification: $\times 630$. (C). FLIM-FRET analysis of G3 and S6CT to GK *in cellulo*. Cells were co-transfected with G3-EGFP ((a) and (b)) or EGFP-S6CT ((c) and (d)) with or without RFP-labelled GK-NLS. Representative images of cells observed by FLIM-FRET 48 h after transfection, with ((b) and (d)) or without ((a) and (b)) transfection of the GK plasmid are shown. EGFP fluorescence lifetime measurements were converted into images with a colour scale identical to that described in Fig. 3. (D) FLIM-FRET analysis of cells co-expressing F5-EGFP and RFP-S6CT (a), G3-EGFP and R19-RFP (b) or G3-EGFP and RFP-S6CT (c). Binding of G3-EGFP and RFP-S6CT to GK was valuated after co-transfection with GK-NLS (d) or siRNA-mediated depletion of GK (e). All measurements were performed under identical conditions. The histogram on the right corresponds to the FRET efficiencies (in %) calculated from the measurements collected in each case, as indicated in the legend of Fig. 3.

the expression of endogenous GK using G3 and S6CT fluorescent proteins in combination with each other, or in combination with the other intrabodies. Fig. 4D shows representative cells measured under comparable conditions. The FRET efficiency reached approximately 20% when fluorescent G3 and S6CT were co-transfected, indicating that when both these fusion proteins are bound to GK the average distance between the fluorophores is optimal for the specific detection of endogenous GK. A slightly weaker FRET efficiency was observed when cells were co-transfected with F5 and S6CT, whereas the FRET efficiency of the G3/R19 pair was similar to that of the F5/R19 pair (Fig. 4C and Table 1). As a control, we also co-transfected GK-NLS and found no more significant FRET signal in this case (Table 1). To demonstrate further that these measurements specifically reflect the detection of endogenous GK, we depleted GK using siRNA and transfected the fluorescent proteins that previously displayed the highest FRET efficiencies. Several siRNAs targeted against GK were tested and the one that reduced GK levels most efficiently according to Western blot and RT-PCR analyses (Supplementary Fig. 5) was selected (siGK2). Almost no FRET was detected when cells were transfected with G3/S6CT or G3/R19 after depletion of GK (Fig. 4C and Table 1). This demonstrates that the FRET signal measured with the various pairs of scFvs reflects the specific detection of endogenous GK in individual living cells.

Discussion

The ability of scFvs to bind specific protein antigens in the cytoplasm of mammalian cells is well established [43–45]. The binding of these so-called “intrabodies” to the antigen can be used to determine the localization of the protein of interest without perturbing its biological activity, but is dependent on both scFv and concentration. It is now evident that only a few scFvs fold correctly and are functional in the reducing conditions of the cell. We overcame this problem by selecting scFvs from an optimized intrabody library [29] and almost all of the selected scFvs used in this study accumulated homogeneously in the cell as expected. We did not find the classical intra-domain disulfide bridge within the VH domain of F5 in the F5–GK crystal structure, indicating that correct folding of the VH domain does not require a disulfide bridge, in agreement with the previously reported folding of scFvs with optimized scaffolds [10]. Nevertheless, it has been suggested that some of the scFvs issued from this library are mainly insoluble and accumulate in small aggregates when overexpressed in mammalian cells [15,46]. Whereas strong viral promoters have been previously used to control scFv expression, we used a weak cellular promoter and observed no aggregates after chemical transfection, even when transfected cells were transfected for a prolonged time. This suggests that the expression rate influences scFv solubility. The mild expression during 48 h in bacteria also enabled scFvs to be recovered at high yields (> 0.5 g/L culture; 19), meaning the bound epitopes *in vitro* could be precisely binned. The structure presented here is the first solved structure of a member of this intrabody library [29].

Our work was inspired by the PLA system, which allows specific antigens to be detected in crowded media such as the cell cytosol. In PLA, two or more antibodies bind to a protein of interest and generate a detectable and specific signal [24,47].

This system is becoming increasingly used because the binding of antibodies specific for different epitopes gives rise to an additive specificity effect. This is due to the fact that the background cross-reactivity signals of each polyreactive antibody are diluted out when the antibodies are used together [48,49]. Dual binding of fluorescently-labelled scFvs to an endogenous protein in a living cell allows FRET to be used and we have applied this approach to detect GK by FLIM microscopy [31,33]. The estimated distance between the fluorophores of two FP-labelled scFvs bound to endogenous GK is within the required proximity needed for efficient FRET measurement (<10 nm; 27). Although the FRET efficiency varied depending on the scFvs used, our results suggest that gankyrin is not in oligomeric form in the cell lines used, in agreement with that observed after overexpression in *E. coli*. This conclusion is supported by the observation that no FRET signal occurred when cells were co-transfected with the same scFv (F5 or G3) fused either to EGFP or RFP (Table 1). Since this was also the case when cells were co-transfected with S6CT fused to EGFP or RFP, it is likely that a large fraction of endogenous GK is monomeric in the cytoplasm and the nucleus and not bound through its concave side to proteasome particles. GK was homogeneously distributed throughout the cell, which does not match the reported granular and preferentially nuclear distribution of proteasomes in epithelial cells [50,51]. This homogenous distribution is consistent with the reported nucleocytoplasmic shuttling activity of GK [20] and its ability to diffuse passively from the cytoplasm into the nucleus, due to its small molecular size. We did not observe any phenotypic changes or cellular abnormalities following overexpression of S6CT, which binds to the concave face of GK with a higher affinity than several other cellular interactors [35,43]. S6CT could prevent binding of GK to the endogenous 19S particle and may therefore act as a dominant-negative mutant of the S6 ATPase. Since no adverse effects were observed following overexpression of S6CT, this indicates that GK is dispensable for proteasomal activity and hence for cell survival and proliferation, at least in HeLa cells. Using densitometric analysis of Western blots, we estimated that each analysed cell contained approximately 0.05 pg of GK. A similar quantity of GK was found in both Huh-7 and HEK cells (results not shown), suggesting that the expression level of GK remains comparable in various cell types. We were surprised that GK expression was not elevated in Huh-7 cells, since several studies have reported that this oncoprotein is overexpressed in liver-derived cell lines ([52] and refs therein). In fact, the detection of endogenous GK with our system was facilitated by the relatively low expression level of the protein. Indeed, when GK was overexpressed at levels in the range of 5 to 20 pg/cell (as calculated from the blots of whole cell extracts of HeLa cells transfected with the p β A-GK-NLS vector; data not shown), only background FRET signal was detected. Furthermore, all intrabodies were relocalized when GK-NLS was overexpressed (Fig. 4D and Supplementary Fig. 4), which suggests that intrabody binding sites provided by the overexpressed GK molecules were present in excess. The relatively low concentration of endogenous GK was critical for its visualization in this system. The concentration of endogenous GK seemed to favour the formation of a complex containing two scFvs or one scFv in combination with S6CT and one molecule of GK, which generated a FRET signal that could be detected by FLIM. It remains to be determined whether the differences in FRET efficiency observed with

various pairs of probes is linked to the proximity of the probes following binding to GK and/or the mean number of trimolecular complexes formed.

To our knowledge, this is the first example of the use of intrabodies specifically to detect an endogenous cellular protein in single cells by FLIM, which cannot be revealed using conventional antibodies. Since the FRET signal was recorded in living cells, it may be possible to study proteins of interest with this system by time-lapse microscopy. Preliminary results in our laboratory using surface plasmon resonance indicate that the affinities of the scFvs used in this study are between 10^6 and 10^8 M⁻¹, in agreement with previous studies [18]. This suggests that successful binding of an intrabody to an antigen that can be detected by FLIM-FRET only requires the intrabody to have a moderate affinity for the epitope. To be useable in this system, an intrabody must be soluble and must be expressed in cells at a concentration that exceeds that of the antigen by a factor of approximately 2–3 log. This technique is easily performed when the necessary equipment is available and is likely to have many applications for live-cell imaging. The technique may provide the basis of a reliable *in vivo* imaging system for studying the oligomerisation states and dynamics of proteins in living cells [53], a study that is not feasible using conventional cell staining methods.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

We thank Dr. J.L. Galzi for constant encouragement, Dr. M.H. Van Regenmortel for useful discussions and critical reading of the manuscript, A. Stoessel and L. Richert for excellent technical assistance, Prof. T. Baumert for the Huh-7 cell line, Dr. C. Romier for the pnCS plasmid, Dr. J. Fujita for the plasmid pCMV-HA-gankyrin, Dr. M. Oulad-Abdelghani for anti-tag immunoglobulins, P. Poussin-Courtmontagne and Y.Sato for the crystallisation and structure refinement and the beamline staff at the ESRF (Grenoble, France) for help during data collection. This work was supported by the Ligue Contre le Cancer (Comités du Bas-Rhin et du Haut-Rhin) and the Association de la Recherche contre le Cancer (ARC). AS was supported by a fellowship from the Conseil Régional d'Alsace and Merck Millipore (Molsheim, France).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.01.011>.

REFERENCES

- [1] A. Ibraheem, R.E. Campbell, Designs and applications of fluorescent protein-based biosensors, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 30–36.
- [2] J. Ellenberg, J. Lippincott-Schwartz, Dynamics and mobility of nuclear envelope proteins in interphase and mitotic cells revealed by green fluorescent protein chimeras, *Methods* 19 (1999) 362–372.
- [3] T.C. Voss, I.A. Demarco, R.N. Day, Quantitative imaging of protein interactions in the cell nucleus, *Biotechniques* 38 (2005) 413–434.
- [4] Y.M. Ramdhan, S. Polling, C. Chia, I.H.W. Ng, A.R. Ormsby, N.P. Croft, A.W. Purcell, M.A. Bogoyevitch, D.C.H. Ng, P.A. Gleeson, D.M. Hatters, Tracking protein aggregation and mislocalization in cells with flow cytometry, *Nat. Methods* 9 (2012) 467–470.
- [5] A.L. Marschall, A. Frenzel, T. Schirrmann, M. Schüngel, S. Dübel, Targeting antibodies to the cytoplasm, *MAbs* (2011) 3–16.
- [6] U. Rothbauer, K. Zolghadr, S. Tillib, D. Nowak, L. Shermelleh, A. Gahl, N. Backman, K. Conrath, S. Muyldermans, M.C. Cardoso, H. Leonhardt, Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies, *Nat. Methods* 3 (2006) 887–889.
- [7] T. Vercautse, E. Pardon, E. Vanstreels, J. Steyaert, D. Daelemans, An intrabody based on a llama single-domain antibody targeting the N-terminal alpha-helical multimerization domain of HIV-1 prevents viral production, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 21768–21780.
- [8] J.M. Lecerf, T.L. Shirley, Q. Zhu, A. Kasantsev, P. Amersdorfer, D.E. Housman, A. Messer, J.S. Houston, Human single-chain Fv intrabodies counteract *in situ* huntingtin aggregation in cellular models of Huntington's disease, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 4764–4769.
- [9] A. Cardinale, I. Filesi, S. Mattei, S. Biocca, Intracellular targeting and functional analysis of single-chain Fv fragments in mammalian cells, *Methods* 34 (2004) 171–178.
- [10] T. Tanaka, T.H. Rabbitts, Functional intracellular antibody fragments do not require invariant intra-domain disulfide bridges, *J. Mol. Biol.* 376 (2008) 749–757.
- [11] P. Zacchi, E. Dreosti, M. Visintin, M. Moretto-Zita, I. Marchionni, I. Cannistraci, Z. Kazap, H. Betz, A. Cattaneo, E. Cherubini, Gephyrin selective intrabodies as a new strategy for studying inhibitory receptor clustering, *J. Mol. Neurosci.* 34 (2008) 141–148.
- [12] L. Accardi, P. Di Bonito, Antibodies in single-chain format against tumour-associated antigens: present and future applications, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010) 1730–1755.
- [13] D.C. Butler, A. Messer, Bifunctional anti-huntingtin proteasome-directed intrabodies mediate efficient degradation of mutant huntingtin exon 1 protein fragments, *PLoS One* 6 (2012) e29199.
- [14] C. Nizak, S. Martin-Lluesma, S. Moutel, A. Roux, T.E. Kreis, B. Goud, F. Perez, Recombinant antibodies against subcellular fractions used to track endogenous golgi protein dynamics *in vivo*, *Traffic* 4 (2003) 739–753.
- [15] A.P. Sibling, J. Courtête, C.D. Muller, G. Zeder-Lutz, E. Weiss, Extended half-life upon binding of destabilized intrabodies allows specific detection of antigen in mammalian cells, *FEBS J* 272 (2005) 2878–2891.
- [16] E. Kvam, M.R. Sierks, C.B. Shoemaker, A. Messer, Physicochemical determinants of soluble intrabody expression in mammalian cell cytoplasm, *Protein Eng. Des. Sel.* 2 (2010) 489–498.
- [17] J. Ries, C. Kaplan, E. Platonova, H. Eghlidi, H. Ewers, A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies, *Nat. Methods* 9 (2012) 582–584.
- [18] D. Desplancq, A.S. Rinaldi, A. Stoessel, A.P. Sibling, D. Busso, M. Oulad-Abdelghani, M.H. van Regenmortel, E. Weiss, Single-chain Fv fragment antibodies selected from an intrabody library as effective mono- or bivalent reagents for *in vitro* protein detection, *J. Immunol. Methods* 369 (2011) 42–50.
- [19] H. Higashitsuji, H. Higashitsuji, Y. Liu, T. Masuda, T. Fujita, H.I. Abdel-Aziz, S. Kongkham, S. Dawson, R.J. Mayer, Y. Itoh, T. Sakurai, K. Itoh, J. Fujita, The oncoprotein gankyrin interacts with RelA and suppresses NF- κ B activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363 (2007) 879–884.

- [20] Y. Chen, H.H. Li, X.F. Wang, Y.B. Ren, L.W. Dong, S.H. Tang, S.Q. Liu, M.C. Wu, H.Y. Wang, Oncoprotein p28GANK binds to RelA and retains NF- κ B in the cytoplasm through nuclear export, *Cell Res.* 17 (2007) 1020–1029.
- [21] P. Iakova, L. Timchenko, N.A. Timchenko, Intracellular signaling and hepatocellular carcinoma, *Semin. Cancer Biol.* 21 (2011) 28–34.
- [22] S. Krzywda, A.M. Brzozowski, H. Higashitsuji, J. Fujita, R. Welchman, S. Dawson, R.J. Mayer, A.J. Wilkinson, The crystal structure of gankyrin, an oncoprotein found in complexes with cyclin-dependent kinase 4, a 19S proteasomal regulator, and the tumor suppressors Rb and p53, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 1541–1545.
- [23] B. Padmanabhan, N. Adachi, K. Kataoka, M. Horikoshi, Crystal structure of the homolog of the oncoprotein gankyrin, an interactor of Rb and CDK4/6, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 1546–1552.
- [24] I. Weibrecht, K.J. Leuchowius, C.M. Clausson, T. Conze, M. Jarvius, W.M. Howell, M. Kamali-Moghaddam, O. Söderberg, Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox, *Expert Rev. Proteomics* 7 (2010) 401–409.
- [25] K. Truong, M. Ikura, The use of FRET imaging microscopy to detect protein–protein interactions and protein conformational changes *in vivo*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2001) 573–578.
- [26] H. Wallrabe, A. Periasamy, Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy, *Curr. Opin. Biotechnol.* 16 (2005) 19–27.
- [27] Y. Sun, R.N. Day, A. Periasamy, Investigating protein–protein interactions in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy, *Nat. Protocols* 6 (2011) 1324–1340.
- [28] S. Padilla-Parra, M. Tramier, FRET microscopy in the living cell: different approaches, strengths and weaknesses, *Bioessays* 34 (2012) 369–376.
- [29] P. Philibert, A. Stoessel, W. Wang, A.P. Sibley, N. Bec, C. Larroque, J.G. Saven, J. Courtête, E. Weiss, P. Martineau, A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm, *BMC Biotechnol.* 7 (2007) 81.
- [30] G.I. Evan, G.K. Lewis, G. Ramsay, J.M. Bishop, Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product, *Mol. Cell. Biol.* 5 (1985) 3610–3615.
- [31] J. Courtête, A.P. Sibley, G. Zeder-Lutz, D. Dalkara, M. Oulad-Abdelghani, G. Zuber, E. Weiss, Suppression of cervical carcinoma cell growth by intracytoplasmic codelivery of anti-oncoprotein E6 antibody and small interfering RNA, *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 1728–35.
- [32] J.V. Fritz, P. Didier, J.-P. Clamme, E. Schaub, D. Muriaux, C. Cabanne, N. Morellet, S. Bouaziz, J.L. Darlix, Y. Mély, H. de Rocquigny, Direct Vpr–Vpr interaction in cells monitored by two photon fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence lifetime imaging, *Retrovirology* 5 (2008) 87.
- [33] K. Amari, E. Boutant, C. Hofmann, C. Schmitt-Keichinger, L. Fernandez-Calvino, P. Didier, A. Lerich, J. Mutterer, C.L. Thomas, M. Heinlein, Y. Mély, A.J. Maule, C. Ritzenthaler, A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins, *PLoS Pathog.* 6 (2010) e1001119.
- [34] Y. Sato, N. Ramalanjoana, T. Huet, N. potier, J. Osz, P. antony, C. Peluso-Iltis, E. Ennifer, Y. Mély, A. Dejaegere, D. Moras, N. Rochel, The phantom effect of the rexinoid LG100754: structural and functional insights, *PLoS One* 5 (2010) e15119.
- [35] Y. Nakamura, T. Umehara, A. Tanaka, M. Horikoshi, B. Padmanabhan, S. Yokoyama, Structural basis for the recognition between the regulatory particles Nas6 and Rpt3 of the yeast 26S proteasome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359 (2007) 503–509.
- [36] C. Giovane, G. Travé, A. Briones, B. Wasylyk, E. Weiss, Targeting of the N-terminal domain of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with monomeric scFvs blocks the E6-mediated degradation of cellular p53, *J. Mol. Recogn.* 12 (1999) 141–152.
- [37] A.P. Sibley, A. Nordhammer, M. Masson, P. Martineau, G. Travé, E. Weiss, Nucleocytoplasmic shuttling of antigen in mammalian cells conferred by a soluble *versus* insoluble single-chain antibody fragment equipped with import/export signals, *Exp. Cell Res.* 286 (2003) 276–283.
- [38] N. Kudo, B. Wolff, T. Sekimoto, E.P. Schreiner, Y. Yoneda, M. Yanagida, S. Horinouchi, M. Yoshida, Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1, *Exp. Cell Res.* 242 (1998) 540–547.
- [39] B. Chatton, A. Bahr, J. Acker, C. Keding, Eukaryotic GST fusion vector for the study of protein–protein associations *in vivo*: application to interaction of ATF α with Jun and Fos, *Biotechniques* 18 (1995) 142–145.
- [40] A. Esposito, C.P. Dohm, M. Bähr, F.S. Wouters, Unsupervised fluorescence lifetime imaging microscopy for high content and high throughput screening, *Mol. Cell Proteomics* 6 (2007) 1446–1454.
- [41] S. Floor, W. van Staveren, D. Larsimont, J.E. Dumont, C. Maenhaut, Cancer cells in epithelial–mesenchymal transition and tumor-propagating-cancer stem cells: distinct, overlapping or same populations, *Oncogene* 30 (2011) 4609–4621.
- [42] S. Dawson, S. Apcher, M. Mee, H. Higashitsuji, R. Baker, S. Uhle, W. Dubiel, J. Fujita, R.J. Mayer, Gankyrin is an ankyrin-repeat oncoprotein that interacts with CDK4 kinase and the S6 ATPase of the 26S proteasome, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 10893–10902.
- [43] B.R. Williams, Z. Zhu, Intrabody-based approaches to cancer therapy: status and prospects, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 1473–1480.
- [44] T. Bödicke, Blocking translocation of cell surface molecules from the ER to the cell surface by intracellular antibodies targeted to the ER, *J. Cell. Mol. Med.* 11 (2007) 54–70.
- [45] A.S. Lo, Q. Zhu, W.A. Marasco, Intracellular antibodies (intrabodies) and their therapeutic potential, *Handb. Exp. Pharmacol.* 181 (2008) 343–373.
- [46] L. Guglielmi, V. Denis, N. Vezzio-Vié, N. Bec, P. Dariavach, C. Larroque, P. Martineau, Selection for intrabody solubility in mammalian cells using GFP fusions, *Protein Eng. Des. Sel.* 24 (2011) 873–881.
- [47] G. Tavosidana, G. Ronquist, S. Darmanis, J. Yan, L. Carlsson, D. Wu, T. Conze, P. Ek, A. Semjonow, E. Eltze, A. Larsson, U.D. Landegren, M. Kamali-Moghaddam, Multiple recognition assay reveals proteasomes as promising plasma biomarkers for prostate cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (2011) 8809–8814.
- [48] F.F. Richards, W.H. Konigsberg, R.W. Rosenstein, J.M. Varga, On the specificity of antibodies, *Science* 187 (1975) 130–137.
- [49] M.H.V. Van Regenmortel, Basic research in HIV vaccinology is hampered by reductionist thinking, *Front Immunol.* 3 (2012) 1–19.
- [50] J.M. Peters, W.W. Franke, J.A. Kleinschmidt, Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 7709–7718.
- [51] A. Scharf, T.D. Rockel, A. von Mikecz, Localization of proteasomes and proteasomal proteolysis in the mammalian interphase cell nucleus by systematic application of immunocytochemistry, *Histochem. Cell Biol.* 127 (2007) 591–601.
- [52] A. Umemura, Y. Itoh, K. Yamaguchi, T. Nakajima, H. Higashitsuji, H. Ongue, M. Fukumoto, T. Okanou, J. Fujita, Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and insulin-like growth factor-binding protein 5 expression in human hepatocellular carcinoma, *Hepatology* 47 (2008) 493–502.
- [53] U. Schnell, F. Dijk, K.A. Sjollem, B.N.G. Giepmans, Immunolabeling artefacts and the need for live-cell imaging, *Nat. Methods* 9 (2012) 152–157.

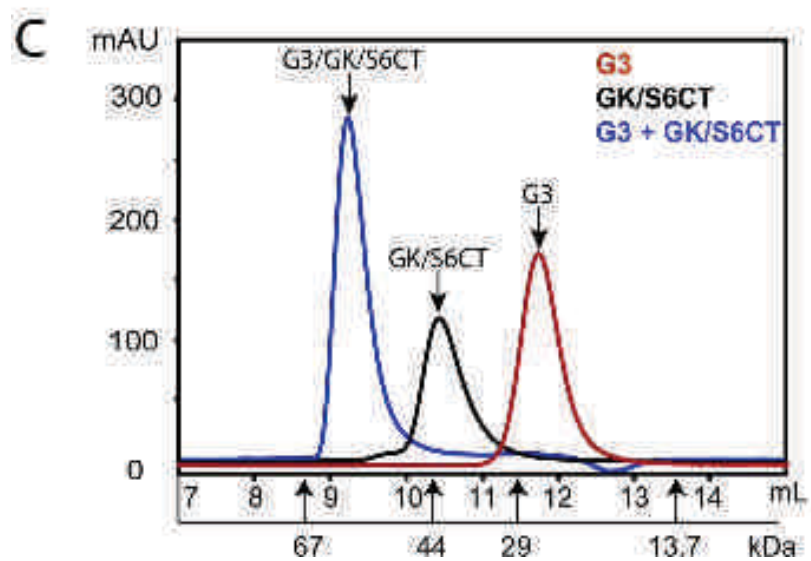
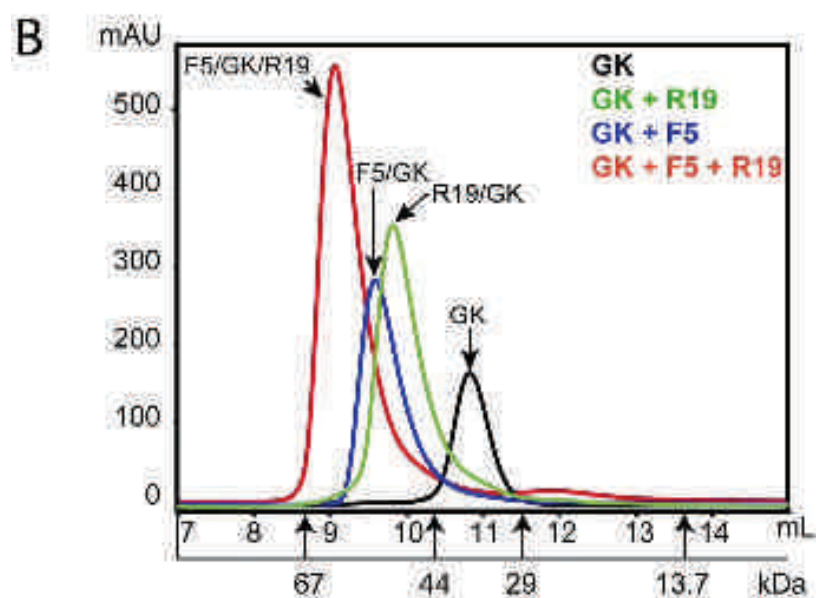
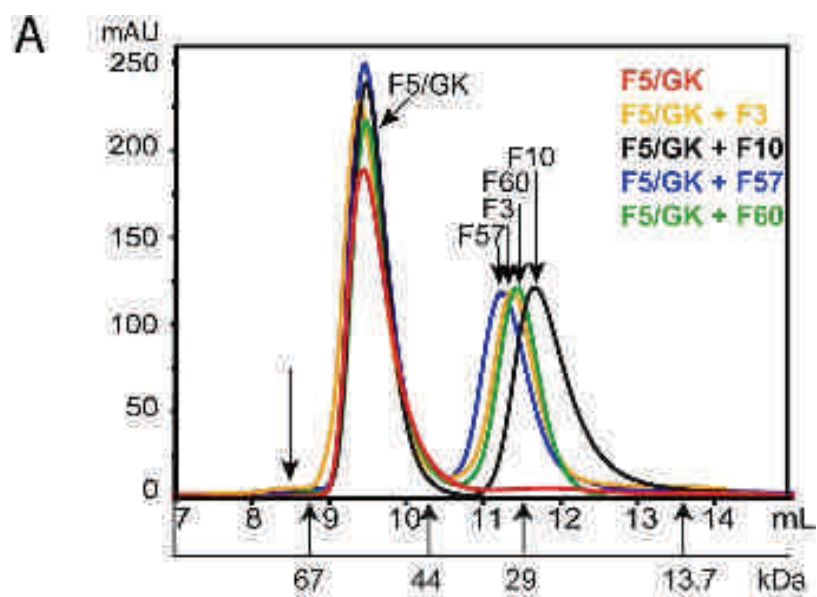


Fig. S1. Gel filtration analyses of the scFv–GK and scFv–GK–S6CT complexes. (A) The purified anti-gankyrin scFvs F3, F10, F57 or F60 (Desplancq et al., 2011) were incubated with pure GK, which had been preincubated with F5. All the scFvs were added to the GK/F5 complex at equimolar ratios. The graph shows a typical elution profile for each case. The position of the expected peak that corresponds to two scFvs bound to one GK molecule molecules is indicated (arrow). The molecular weight (in kDa) of the calibration markers is also indicated. (B) Purified scFvs F5 and R19 were mixed with pure GK and the complexes formed were analysed by gel filtration as described in A. When F5 and R19 were both added to GK, a typical peak corresponding to a tri-molecular complex was detected. (C) Assessment of the binding of scFv G3 to the GK/S6CT complex. Pure proteins were mixed and processed as in (A). Typical elution profiles of either G3 (red), the GK-S6CT complex (black) or the tri-molecular complex (blue) are shown.

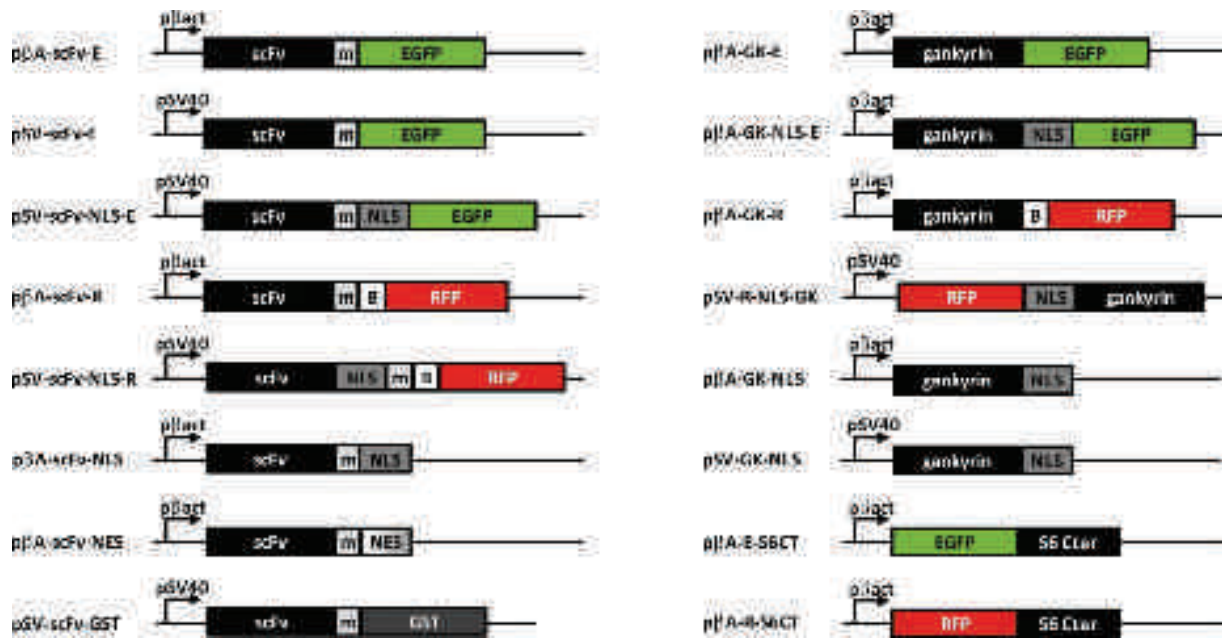


Fig. S2. Schematic illustration of the scFv, GK and S6CT plasmid constructs used in this study. The plasmids listed (names on the left) are all derivatives of either the pDRIVE-h β -actin or p513 vectors, which allow expression of proteins under the control of the β -actin promoter (p β A) or the SV40 early promoter (pSV), respectively. Tags used to identify the proteins (myc, B10, EGFP, RFP, GST) and tags used to direct proteins to a specific location (NLS, NES) were inserted in frame as indicated.

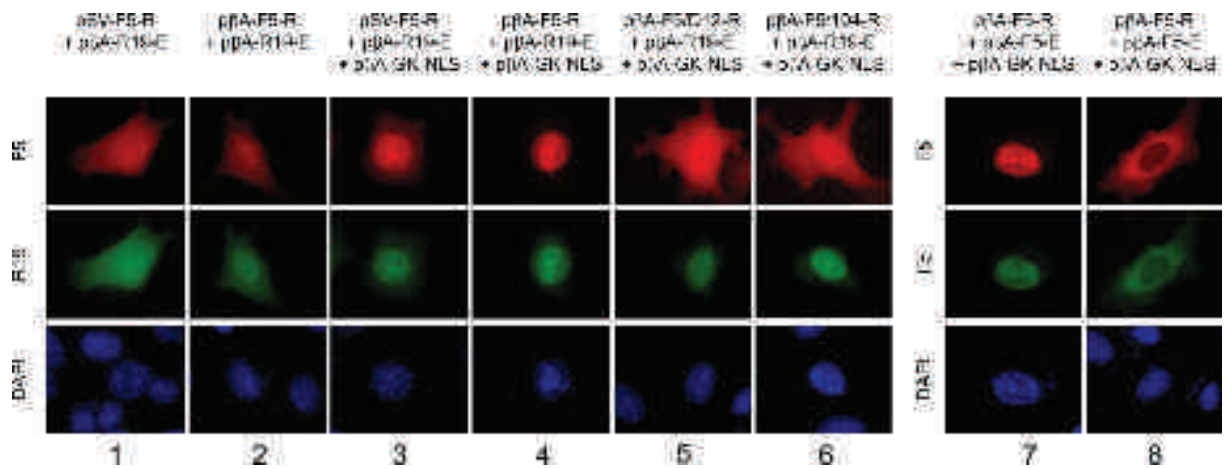


Fig. S4. Binding characteristics of the F5 and R19 co-expressed with GK. HeLa cells were co-transfected with the indicated constructs. Cells were fixed 48 h after transfection and were visualised using a fluorescence microscope. Representative images following co-expression of F5-RFP, R19-EGFP and GK-NLS are shown (panels 1 to 4). F5/D12 (panel 5) and F5/104 (panel 6) are mutants of F5 that did not bind to GK *in vitro*. The panels on the right [7] and [8] correspond to cells co-expressing F5-RFP and F5-EGFP. Nuclei were stained with DAPI. Magnification: $\times 630$.

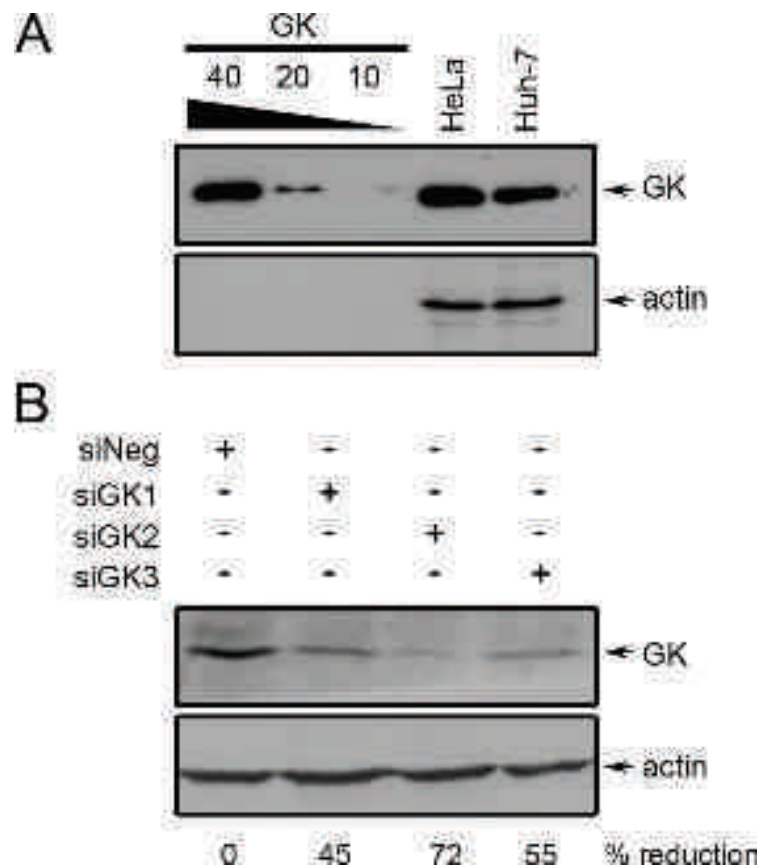


Fig. S5. Western blot analysis of GK in cancer cells. (A) Whole cell extracts of 10^6 HeLa or Huh-7 cells were subjected to SDS-PAGE and Western blotting. GK was detected using an anti-GK rabbit serum and HRP-labelled goat anti-rabbit immunoglobulins. Precise amounts of pure GK were run in parallel (numbers correspond to ng of GK). Anti-actin antibodies were used for loading control. (B) HeLa cells were treated with siRNA targeted against GK (siGK). Cells were lysed 48 h after transfection and extracts were analysed as described in (A). The numbers indicated below the blot correspond to the percentage of reduction in the level of GK mRNA, determined by RT-PCR.

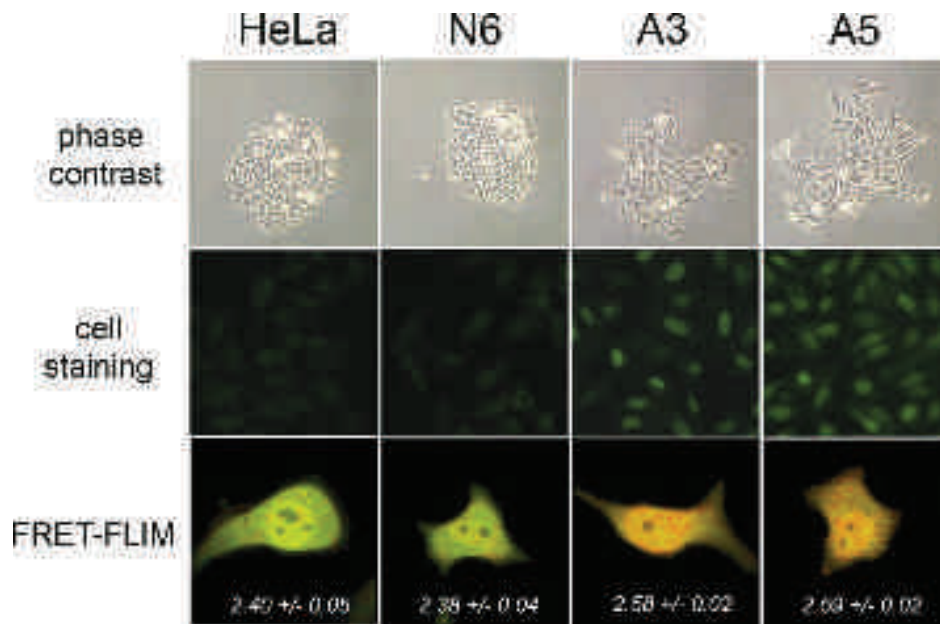


Fig. S6. FLIM–FRET analysis of stable cell lines overexpressing GK transfected with F5 and R19. The A3 and A5 cell lines were generated by transfection of pSV-GK-NLS-Neo followed by selection with G418. N6 cells correspond to a clone isolated during the selection that did not overexpress GK. Representative phase-contrast images of cell colonies are shown (upper row). Overexpressed GK was detected using an antiserum against GK and Alexa488-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins (middle row). Representative images of cells following FLIM–FRET analysis performed as described in [Fig. 3](#) are shown in the lower row. The mean EGFP lifetime (in ns) calculated from 25 measurements in each case is indicated. These values correspond to 8% of efficiency for the HeLa or N6 cells and 1% of efficiency for the A3 or A5 cells.

1.3. Conclusion

Pour favoriser la formation de complexes tri-moléculaires et pouvoir mesurer un signal de FRET, les scFv doivent être présents en large excès par rapport à l'antigène comme le suggère l'absence de signal lorsque la gankyrin est surexprimée. La détection d'une protéine intracellulaire par FLIM-FRET avec des scFv fluorescents est une méthode adaptée en particulier pour visualiser les protéines faiblement exprimées dans les cellules comme la gankyrin. Cette méthode est donc un plus par rapport aux techniques classiques d'immunomarquage qui ne sont pas assez sensibles pour détecter l'antigène lorsqu'il est présent en faible quantité dans la cellule.

Le système de détection repose sur l'association de deux scFv capables de se lier en même temps à leur antigène. Même si l'affinité des scFv pour leur cible est souvent un frein pour leur utilisation dans un contexte intracellulaire, le signal de FRET obtenu après la liaison de deux scFv à la gankyrin a permis de s'affranchir du bruit de fond engendré par les liaisons non-spécifiques de chaque fragment d'anticorps dans la cellule. Ce système d'imagerie ne nécessite pas une affinité très forte des scFv pour leur cible contrairement à d'autres applications comme l'interférence à la protéine où l'affinité est un paramètre clef.

L'obtention de deux scFv ciblant simultanément la gankyrin a nécessité de nombreux efforts de sélection et de caractérisation aussi bien *in vitro* que dans les cellules. Ceci nous a permis d'améliorer notre méthodologie pour isoler des scFv par phage-display en identifiant plusieurs paramètres critiques comme par exemple l'alternance des supports de présentations de l'antigène d'une part, mais aussi de construire une collection de vecteurs eucaryotes (fusion possible des scFv à l'eGFP, RFP, GST, séquences NLS ou NES, étiquettes myc ou B10) adaptés pour l'expression intracellulaire des scFv d'autre part.

A notre connaissance, c'est la seule méthode décrite qui permet de détecter des protéines endogènes faiblement exprimées dans les cellules vivantes. Notre méthode est inspirée du système PLA (Proximity Ligation Assay) qui est basé sur l'utilisation de deux ou plusieurs anticorps pour détecter un antigène (Söderberg et al., 2006). Ceci permet de s'affranchir du bruit de fond de chaque anticorps pour obtenir la meilleure spécificité possible.

2. Visualisation de PCNA à l'aide d'un intracorps bispécifique fluorescent dans les cellules vivantes

2.1. Introduction

Contrairement à la gankyrin qui est très faiblement exprimée dans les cellules HeLa (~0,05 pg par cellule), PCNA est présent en grande quantité dans le noyau des cellules en prolifération (~15 pg par cellule). Cette protéine nucléaire participe à des mécanismes comme la réplication ou la réparation de l'ADN, phénomènes directement observables dans les cellules par l'intermédiaire des fourches de réplication lors de la phase S du cycle cellulaire. En sus, PCNA est impliqué dans le mécanisme de synthèse translésionnelle qui est étudié dans notre équipe. Nous avons utilisé PCNA comme modèle afin de développer un réactif permettant de visualiser une protéine endogène à l'aide d'un intracorps fluorescent.

L'article n°2 détaille les étapes qui ont été nécessaires à l'obtention d'un réactif optimal pour le ciblage spécifique de PCNA dans les cellules vivantes. Cette étude apporte plusieurs innovations dans le domaine de l'ingénierie des anticorps recombinants, notamment l'application d'une nouvelle méthode de maturation d'affinité des anticorps et le développement d'un intracorps bispécifique.

2.2. Article n°2

Development of an optimal intrabody reagent to track endogenous PCNA in living cancer cells.

Guillaume Freund^a, Dominique Desplancq^a, Audrey Stoessel^a, Robin Weinsanto^a, Jérôme Wagner^a, Annie-Paule Sibler^a, Pierre Martineau^b, Etienne Weiss^a.

^a *Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, UMR 7242, CNRS/Université de Strasbourg, boulevard Sébastien Brant, Illkirch, France.*

^b *Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, U896, INSERM/Université Montpellier 1, Campus Val d'Aurelle, Montpellier, France.*

Development of intrabody-based reagents suitable for tracking endogenous PCNA in living cancer cells.

Guillaume Freund^a, Dominique Desplancq^a, Audrey Stoessel^a, Robin Weinsanto^a, Jérôme Wagner^a, Annie-Paule Sibler^a, Pierre Martineau^b, Etienne Weiss^{a*}.

^a *Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, UMR 7242, CNRS/Université de Strasbourg, boulevard Sébastien Brant, Illkirch, France.*

^b *Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, U896, INSERM/Université Montpellier 1, Campus Val d'Aurelle, Montpellier, France.*

*Corresponding author.

E-mail address: eweiss@unistra.fr

Abbreviations:

AID, activation-induced cytidine deaminase; CDR, complementarity-determining region; CSK, cytoskeletal; DAPI, 4',6'-diamidino-2 phenyleindole; eGFP, enhanced green fluorescent protein; Elg1, enhanced level of genomic instability protein 1; GST, glutathione S-transferase; IDCL, inter-domain connector loop; NHS, *N*-hydrosuccinimide; NLS, nuclear localization signal; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PIP, PCNA interacting peptide; RFC, replication factor C; RFP, red fluorescent protein; scFv, single-chain Fv; VH, variable heavy chain domain; VL, variable light chain domain.

ABSTRACT

Intrabodies, when expressed in cells after genetic fusion to fluorescent proteins, are powerful tools to study endogenous protein dynamics inside the cell. However, finding out the conditions for specific imaging and precise identification of the targeted antigen with intracellularly-expressed antibody fragments remains a challenge. Here, we describe the selection single-chain Fv (scFv) antibody fragments recognizing proliferating cell nuclear antigen (PCNA) that were stepwise modified to obtain intracellular reagents recognizing PCNA with high specificity in living cancer cells. After selection by phage display, the scFvs were tested first *in vitro* with fixed cells. Those binding specifically to PCNA when used as bivalent molecules were further subjected to *in vitro* affinity maturation to obtain anti-PCNA binders that were somewhat equivalent to conventional antibodies. By fusing to these molecules the C-terminal peptide of the p21 protein rendering them bispecific, we could accurately detect PCNA bound to chromatin in the cells. Finally, by the addition of eGFP linking together the scFvs and the peptide in the constructs, we obtained fluorescently-labelled intrabodies which allow to track PCNA in living cells following transfection. The approach described may be applicable to other scFvs that can be solubly expressed in cells for studying in real time the dynamics of a variety of endogenous proteins of biological importance in the nucleus.

Keywords:

Single-chain Fv, intrabodies, affinity maturation, bispecific molecules, PCNA, nuclear targeting, imaging in living cells.

INTRODUCTION

Recombinant antibody technology provides valuable tools to study protein dynamics and function in living cells. Indeed, antibodies can be expressed as “intrabodies” in the cytosol of mammalian cells after transfection of their coding sequence (Biocca et al., 1990). The single-chain Fragment variable (scFv) format is commonly used for such applications: it is formed by the fusion of the variable heavy and light chain of an antibody connected by a flexible linker (Cardinale et al., 2004). However, incorrect folding of antibody fragments in the reducing environment of the cytosol remains a major concern (Biocca et al., 1995; Kvam et al., 2010). We previously described the construction of a semi-synthetic scFv library based on the framework of a human scFv optimized for high level expression in the cytoplasm of *E. coli* and mammalian cells (Philibert et al., 2007). Antibody fragments selected from this library do not need disulfide bridge formation for stable folding and are thus fully soluble and active in the cytosol when expressed as intrabodies. Moreover, it has been found that soluble scFvs can be fused to fluorescent proteins such as enhanced green fluorescent protein (eGFP) or red fluorescent protein (RFP) thereby allowing direct visualization of intracellular antigens by fluorescence microscopy (Nizak et al., 2003). Such fluorescently-tagged recombinant antibodies have been used to study the dynamics of endogenous proteins in living cells (Rinaldi et al., 2013).

The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is a trimeric DNA sliding clamp essential for DNA replication, DNA repair and cell-cycle regulation (Moldovan et al., 2007). Located in the nucleus of proliferative cells, PCNA acts as a molecular platform for numerous proteins at the replication fork e.g. DNA polymerases δ and ϵ or DNA ligase I (Mailand et al., 2013). In addition, the expression level of PCNA is cell-cycle dependent and because of its essential role in DNA replication as a processivity factor, PCNA can be used as a marker of S-phase progression through the visualization of active replication factories (Mahler et al., 2012). Since PCNA supports tumor growth (Stoimenov and Helleday, 2009) and, more recently, is a crucial

factor displaying anti-apoptotic activity in inflammation processes (Witko-Sarsat et al., 2010; Bouayad et al., 2012), it is considered as a potential therapeutic target.

It has been found that only a small portion of PCNA expressed in the cells is involved in DNA replication and loaded onto the chromatin by the clamp-loader complex (RFC; Naryzhny, 2008). In addition, the number of PCNA molecules that remain bound to replicated DNA during the S phase is tightly regulated by the Elg1 protein (Shiomi and Nishitani, 2013). However, it is not well known how these “active” molecules of PCNA within the large pool of free PCNA in the nucleus are recruited at the DNA replication sites (foci) during fork progression, nor how PCNA gets into action in DNA repair following DNA damage after treatment of the dividing cells with genotoxic agents. Given the essential role of PCNA in these biological processes ensuring genome stability and its apparent dynamic behavior in the nucleus during the S phase and in response to stimuli (Essers et al., 2005), we thought that this protein may represent an interesting model system to follow its fate in the nucleus of living cells with intrabodies.

In this study, we describe the different steps that were necessary to obtain an optimal intrabody reagent that specifically binds to the chromatin bound PCNA molecules in the intracellular context. After *in vitro* selection by phage-display, the sorted anti-PCNA scFvs were fused to eGFP or Glutathione S-Transferase (GST) and extensively characterized both *in vitro* and in living cells. Within those that were found preferentially located in the nucleus, we engineered by *in vitro* affinity maturation the one that was able to recognize chromatin bound PCNA in fixed cells. By tagging this scFv with the C-terminal peptide of the p21 protein, thereby generating bispecific molecules, we obtained an intrabody-based reagent that was most adequate for monitoring with high precision biologically-engaged PCNA in the cells. The described strategy might be useful for the development of comparable reagents for the tracking of intracellular proteins in living cells.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

The construction of the plasmids pETOM-scFv (or scFv-GST), p β A-scFv-eGFP (or RFP) and p β A-Gankyrin-NLS-eGFP are described elsewhere (Desplancq et al., 2011; Rinaldi et al., 2013). For the construction of the p β A-PCNA-NLS-eGFP, the coding sequence of human PCNA was amplified by PCR with the following oligonucleotides 5'-GCGCGAGGTCTCCCATGTTCGAGGCGCGCCTGGTCCAGGG and 5'-GCGCGCACTAGTAGATCCTTCTTCATC and inserted into the *NcoI*- and *SpeI*-digested p β A-Gankyrin-NLS-eGFP in order to replace the coding sequence of gankyrin. p β A-scFv-pep10 and p β A-scFv-con1 were obtained by replacing the eGFP of the p β A-scFv-eGFP with annealed oligonucleotides encoding an in-frame fusion of the myc-tag and the pep10 (KRRQTSMTDFYHSKRRLIFS) or the con1 (SAVLQKKITDYFHPKK) peptide sequence (Mattock et al., 2001; Zheleva et al., 2000). To generate the p β A-eGFP-pep10 and p β A-eGFP-con1 plasmids, the coding region of the eGFP was PCR amplified with the following oligonucleotide primers 5'-GCGCGCCATCCATGGTGAGCAAGGGCCAGG and 5'-GGGCAAACACTAGTCTTGTACAGCTCGTC and inserted into p β A-scFv-pep10 and p β A-scFv-con1 that have been digested with *NcoI* and *SpeI*. All constructs were verified by sequencing and stored at -20°C.

Cell culture, transfection and siRNA

The HeLa, U2-OS, H1299 and HEK 293A cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies, Carlsbad, USA) and the MEL501 cell line was maintained in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Both media were supplemented with L-glutamine (2 mM), HEPES buffer (10 mM), gentamycin (10 μ g/mL) and 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum and the cells

were grown at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. 24 hours before transfection, 10⁵ cells were seeded in 12-well culture plates containing glass coverslips. Transient DNA transfection was performed using jetPEI (Polyplus Transfection, Illkirch, France) according to manufacturer's instructions. The siRNA against Elg1 (HSS129125) was purchased from Life Technologies. For the transfection with the Neon transfection system (Life Technologies, St Aubin, France), 1 µL siRNA (50 mM stock solution) was added to 10⁵ cells in R buffer (Life Technologies) and the mixture was processed in the electroporation device as recommended by the manufacturer.

Bio-panning by phage-display

Human recombinant PCNA was overexpressed and purified as previously described (Hishiki et al., 2008). ScFv-phages were selected according to Philibert et al., 2007, except that purified PCNA was immobilized on NHS-activated magnetic beads (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, USA) or on plates coated with rabbit polyclonal anti-PCNA antibodies (Eurogentec, Angers, France). For the first round of panning, about 1 µg of recombinant PCNA was bound to the beads and this amount was lowered to approximately 100 ng in the next rounds of selection. PCNA-depleted cell extracts were prepared as previously described (Janel-Bintz et al., 2012) and added to the phage solution for the second and third rounds of panning.

Expression and purification of scFv

After sub-cloning in the pETOM vector (Desplancq et al., 2011), scFvs and GST-tagged scFvs were expressed in *E.coli* BL21(DE3)pLysS cells by induction with IPTG (Philibert et al., 2007) or by auto-induction (Studier, 2005). The expressed molecules were purified as previously described (Desplancq et al., 2011).

Immunofluorescence experiments

40 hr post-transfection, the cells grown on coverslips were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde for 30 min and permeabilized with 0.2% Triton-X100 for 5 min after fixation. In some experiments, the cells were treated with CSK-100 modified buffer (100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 10 mM HEPES pH 6.8, 1 mM EGTA, 0.2% Triton X-100) supplemented with protease inhibitors (Complete EDTA-free; Roche Applied Science, Penzberg, Germany) prior to fixation. Following incubation with the scFv or scFv-GST proteins (2 µg/mL), the cells were extensively washed and anti-myc 9E10 monoclonal antibody followed by Alexa488 labelled anti-mouse immunoglobulins (Life Technologies) were added as described (Court ete et al., 2007). The coverslips were mounted with DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech, Birmingham, UK). The treated cells were analyzed by conventional fluorescence microscopy with a Leica DM5500 microscope equipped with FITC and Cy3 filters (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Images were collected with a 63 × or a 100 × objective and treated with Adobe Photoshop software.

Construction of the scFv P40 mutant library

Mutagenesis of the scFv P40 coding sequence was performed by incubating the pET-based construct with sodium bisulfite (Quiagen, Hilden, Germany), as recommended by the manufacturer. After incubation at 95°C, the deaminated DNA molecules were amplified by error-prone PCR and subcloned into the pCANTAB6 phagemid vector. The detailed protocol will be described elsewhere (Stoessel et al., in preparation). Screening of the mutant library by phage-display was done as described above, using 100 ng and 10 ng of PCNA in the first and second round of selection, respectively.

Immunoprecipitation experiments

The binding of the purified scFvs to native PCNA was assayed by immunoprecipitation of PCNA from extracts of HeLa cells prepared as described (Sibler et al., 2003). Briefly, myc-tagged scFvs were added to Protein A Sepharose magnetic beads (GE Healthcare) coated with 9E10 antibody. After overnight incubation at 4°C with varying amounts of extracts, the beads were washed with TBS containing 0.1% NP-40 and bound polypeptides were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting onto a nitrocellulose membrane (Millipore, Billerica, USA). The presence of PCNA was probed with the PC10 antibody (sc-56; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) and with infrared dye-coupled goat anti-mouse secondary antibodies (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA). Scanning was performed with the Odyssey imaging system (LI-COR Biosciences) at 700 and 800 nm, following manufacturer's instructions.

RESULTS

Selection of anti-PCNA scFvs.

In a previous work, we selected and analyzed the behavior of several scFvs able to detect endogenous gankyrin in living cancer cells (Rinaldi et al., 2013). These scFvs were obtained by screening a semi-synthetic human scFv library (library V1) designed for cytoplasmic expression of the encoded antibody fragments. A second scFv library (library V2) has recently been constructed by taking into account the sequence data of the antibody fragments isolated from the library V1 (Robin et al., manuscript in preparation). Here, we used both libraries (V1 and V2) for the screening of the scFvs by phage display. Two types of selection with pure recombinant human PCNA (Supplementary Figure 1) were performed: three rounds with PCNA coated on NHS Sepharose magnetic beads (selection B) or three rounds with PCNA either coated on beads (round 1 and 3) or immobilized on plastic by means of anti-PCNA polyclonal antibodies for the second round (selection P). The reactivity of the scFv-phages retained on the solid support after each round of panning was tested by phage-ELISA. As shown in Figure 1A, both approaches gave rise to the identification of specific binders that were detectable after two rounds of selection.

To analyze whether the selected scFvs expressed on the tip of the phages bind to intracellularly-expressed PCNA, we pooled the phages from the two third rounds and sub-cloned the scFv coding sequences in fusion with the red fluorescent protein (RFP) into a mammalian expression vector harboring the β -actin promoter (β A). We randomly picked 300 individual clones and co-transfected each of these p β A-scFv-RFP plasmids with p β A-PCNA-NLS-eGFP in HeLa cells. In this vector, we have added the NLS sequence of SV40 to the coding region of PCNA to relocalize into the nucleus all overexpressed PCNA molecules. Under these conditions, we found 10 scFvs that strictly co-localized with PCNA after co-transfection (Figure 1B). After DNA sequencing, only five unique sequences with distinct VH

and VL sequences were present within the 10 identified scFvs (Supplementary Figure 2). These five scFv clones, named P1, P18, P26, P40, P5 that were present in the nucleus only when co-expressed with PCNA-NLS (Supplementary Figure 3) were kept for further analysis.

Binding of selected scFvs to endogenous PCNA in cells.

To assess the binding capacity of the scFvs to endogenously-expressed PCNA in cells, we expressed the 5 scFvs either as mono- or bivalent reagents in *E. coli* (Supplementary Figure 4) and tested their reactivity by immunofluorescence in fixed HeLa cells. We have previously shown that such scFvs, when fused to glutathione S-transferase (GST), are produced as bivalent molecules with enhanced avidity (Desplancq et al., 2011). The scFv F5, which binds specifically to gankyrin (Rinaldi et al., 2013), was used as a negative control. In this test, the scFvs (Figure 2A) or scFv-GST fusion proteins (Figure 2B) were thus used as primary antibodies. In parallel, we also tested their performance for revealing PCNA after treatment of the cells with CSK buffer before fixation, which allows to wash out soluble PCNA. When used as scFvs without GST tag, P26 was the only one exhibiting a weak nuclear staining (Figure 2A), but it is worth mentioning that it has a tendency to form dimers, as observed by gel filtration (data not shown). However, endogenous PCNA was readily detectable with all the GST-tagged anti-PCNA scFvs, albeit at different levels. P26-GST and P40-GST presented less background than P1-, P18- and P51-GST and allowed to clearly identify the replication foci in the treated cells, as generally observed in S-phase with conventional antibodies. P40-GST was also able to detect chromatin-bound PCNA (i.e. in cells treated with CSK). These results suggest that the isolated scFvs, when used in monovalent form, do not remain bound to the antigen in this assay and need apparently to be in bivalent form to detect endogenous PCNA in fixed HeLa cells.

Since the aim here was to use the anti-PCNA scFvs in the intracellular context of living cells, we expressed them in HeLa cells as intrabodies with the eGFP as tag. After transfection of the corresponding p β A-derived vectors, all scFv-eGFP fusions were uniformly expressed throughout the cell, as observed for the scFv F5 (Figure 3A). Even when the amount of plasmidic DNA used in the transfection mixtures was reduced to decrease the number of copies taken up by the cells or when the cells transfected under standard conditions were examined shortly post-transfection, we could not clearly observe a preferential nuclear localization of the scFv-eGFP fusions (data not shown). We concluded that the isolated scFvs may not of sufficient affinity to be exclusively present in the nucleus under these conditions. Another possibility would be that they have no access to endogenous PCNA within the time frame of these experiments.

Having shown in a previous work that fusion scFv-GST fusions are also functional in mammalian cells (Rinaldi et al., 2013), we decided to test them in this format since due to their size (approximately 100 kDa) they cannot diffuse passively into the nucleus and those binding to neo-synthesized PCNA can reach the nuclear compartment. As shown in Figure 3B, most of them were found present in the cytoplasm and the nucleus, whereas the anti-gankyrin F5-GST that remained exclusively in the cytoplasm, as expected. Interestingly, the staining pattern of P26-GST was similar to that observed with the control, suggesting that its epitope may not being not accessible under these conditions. These results show that the scFv-GST format of P1, P18, P40 and P51, which strong binding to native PCNA contained in HeLa cell extracts was confirmed by immunoprecipitation (Supplementary Figure 5), are not adequate for imaging PCNA in living cells.

Affinity maturation of scFv P40.

Since the fusion of the scFvs to GST, which render them bivalent, was not beneficial for identifying PCNA in the cells, nor easily amenable to a fluorescent reagent allowing the tracking of PCNA in living cells, we decided to focus on the scFv that was readily functional *in vitro*, namely P40. Since avidity seemed to be of importance for specific detection of PCNA in cells with this scFv, we explored the possibility of improving its affinity by mutagenesis. In addition, P40 was well expressed in *E. coli*, thereby facilitating the analysis of the mutants. We generated a library of approximately 10^5 P40 variants using sodium bisulfite and error-prone PCR. This type of mutagenesis reproduces *in vitro* the mode of action of AID and DNA polymerase ϵ , which are the main enzymes involved in the antibody affinity maturation processes *in vivo*. The mutants were screened by phage-display and, as shown in Figure 1, after two rounds (R) of panning, we tested the bound scFv-phages by phage-ELISA (Figure 4A). Although R1 showed more signal than R2, both preparations were enriched phages with enhanced reactivity, as compared to the third round of phages selected from the V1 library.

DNA sequencing of a limited number of clones in the R1 and R2 preparations showed that only two scFvs that differ from P40 were selected. They were named P40M1 and P40M2 (Figure 4B). Compared to the parental P40, P40M1 harbors three residue substitutions L142Q, L186R and M187I, whereas P40M2, the most frequent mutant within those sequenced, contained only the two amino acid substitutions L142Q and L186R. These mutations are all located in the VL chain framework region. After subcloning in a pET vector and expression in *E. coli*, we found that these mutations do not affect the yield of the recovered scFvs (Supplementary Figure 6).

To examine whether these variants were of interest to detect PCNA present in the cells we tested them at first by immunofluorescence. As shown in Figure 4C, PCNA could be readily detected under these conditions with both mutants, indicating that the mutations were beneficial for the production of active scFvs usable for the *in vitro* binding to PCNA. When compared to

the parental scFv, with which almost no signal was observed, P40M1 seemed to be more efficient than P40M2. This confirmed the results obtained with the phage-ELISA analysis, since the R1 preparation was highly enriched in P40M1 phages as compared to R2 that contained almost only P40M2 phages. This also shows that sequential selection by phage display selects out scFvs that are expressed with a lesser efficiency in the bacterial system.

The performance of these mutants when used as intrabodies was investigated as described above for P40. P40M1 and P40M2, fused to either eGFP or GST, were found to be homogeneously expressed in the transfected cells (Figure 4D). However, no significant differences were observed between P40 and these two mutants, suggesting that the modifications did not influence the repartition of the expressed fusions. Thus, despite its *in vitro* higher reactivity to detect PCNA in fixed HeLa cells, P40M1 may not be of sufficient affinity to remain bound to PCNA for a prolonged period in the cells.

Design of peptide-conjugated intrabodies.

It has been reported that many interactors of PCNA harbors a region called PCNA Interaction Protein sequence (PIP-box; Mailand et al., 2013) and that several defined peptides corresponding to this region present in the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 protein, for instance, bind with high affinity to PCNA (Mattock et al., 2001). Since peptides can be easily linked to scFvs by genetic fusion, we tested whether such a complementary binding capacity could improve their behavior in the cells. The pep10 peptide corresponding to the residues 141-160 of p21 (Warbrick, 2006) was fused to the scFvs that were found of relevance in the GST approach and the resulting constructs were transfected in HeLa cells.

As shown in Figure 5A, P1-, P40-, P40M1-, P40M2-pep10 were essentially localized in the nucleus as opposed to F5-, P18- or P51-pep10, indicating that appending of pep10 re-localizes the P1, P40, P40M1 and P40M2 (not shown) into the nucleus and may significantly improve the specific binding to PCNA in the cells. Similar results were obtained with other cell

lines transfected with the p β A-P40-pep10 construct (Supplementary Figure 6). Of note, in some cells, when the P1-, P40- and P40M1-pep10 molecules were overexpressed, they were also present in the cytoplasm, suggesting that the expression levels are of relevance under these conditions. This underlines the importance of the β -actin promoter used in our constructs, which allows a moderate expression of the scFvs in the cells, as compared to that observed with the SV40 promoter (Rinaldi et al., 2013). It suggests that the amount of scFv-pep10 expressed in the cells represents a critical parameter that needs to be tightly controlled to visualize specifically PCNA.

Since P40 and P40M1 shared a comparable nuclear staining after transfection, we next examined whether a triple fusion scFv-eGFP-pep10 could allow direct identification of PCNA in living cells. Since it was not possible to express the P40-eGFP-pep10 fusion protein in the HeLa cells, we replaced pep10 by the peptide con1, a peptide with similar properties and coding for the PCNA-binding domain of both DNA ligase I and *Pogo* transposase (Zheleva et al., 2000). The exchange of pep10 with con1 allowed the detection of the triple fusions (scFv-eGFP-con1) in the cells. Interestingly, under these conditions we could clearly monitor a difference of staining with P40M1, as compared to P40 or the peptide con1 alone (Figure 5B). Indeed, whereas the signal observed with both P40-eGFP-con1 and eGFP-con1 molecules was relatively diffuse in the nuclei of the positive cells, that of P40M1-eGFP-con1 in a large part of the cells was speckled. This staining may correspond to the replication foci that can only be seen in S-phase following removal of the soluble PCNA. In addition, almost no fluorescence signal was present in the cytoplasm of the cells transfected with P40M1-eGFP-con1, suggesting that all molecules were active. This was not the case in the cells expressing P40-eGFP-con1 (Figure 5B). This different reactivity of P40M1 versus P40 allowing to visualize the replication foci was also observed in U2-OS cells following transfection with the relevant scFv-eGFP-con1 constructs (Supplementary Figure 8). Thus, improving the binding capacity of anti-PCNA

scFvs by rendering them specific was advantageous for the accurate visualization of PCNA in the nucleus.

Specific detection of chromatin-bound PCNA in living cells.

To confirm that P40M1-eGFP-con1 molecules bind to PCNA involved in replication, we used cells that were pre-treated with siRNA against the Elg1 protein. This protein regulates PCNA levels on chromatin and acts as an unloading factor (Shiomi and Nishitani, 2013). When its expression is severely inhibited, PCNA accumulates at discrete sites in the nucleus that correspond to replication foci. Of note, these subnuclear structures where PCNA is bound to chromatin can only be clearly observed in classical immunofluorescence experiments when the cells are subjected to Triton extraction before fixation (Figure 6, right panel). By using anti-Elg1 siRNA, we were interested to increase the PCNA on chromatin, thereby mimicking the detergent treatment. As shown in Figure 6 (left panel), we could readily detect PCNA accumulation on discrete sites in cells transfected with the scFv-eGFP-con1 plasmids. Since the percentage of cells with large speckles in the nucleus was significantly increased with P40M1-eGFP-con1 (21%), as compared to P40-eGFP-con1 (4%), it shows that the incorporated mutations into P40 modifies the binding properties in favor of the recognition of unloaded PCNA in the absence of Elg1. Alternatively, it could be that these molecules, due to their strong binding to PCNA, inhibit somehow the cell cycle progression of the transfected cells in S phase. Together, it shows that PCNA bound to chromatin at a defined cell stage can be easily detected with bispecific scFv-peptide fusion proteins in living cells.

DISCUSSION

We described here a novel application of scFvs selected from an intrabody library. After several steps of engineering of the scFvs initially selected by phage-display and further diversified with a novel method of *in vitro* affinity maturation which mimics the *in vivo* processes, we obtained fluorescently-labelled scFv-peptide reagents allowing the detection in real time of endogenously-expressed PCNA. The development of a recombinant intrabody-based reagent suited for imaging PCNA was a real challenge considering the numerous limits of the intrabody strategy. Indeed, their solubility in the intracellular context is of crucial importance for cell-imaging experiments. We have selected scFvs that do not require disulfide stable folding in order to make sure that the expressed molecules were active. In addition, the binding capacity of such of recombinant reagents is often questioned with regard to classical antibodies, especially when used for cell staining. We found that the scFv P40M was more efficient for the detection of PCNA in fixed HeLa cells than the PC10 mAb which is the reference to immunolabelling of PCNA as it is used in almost all PCNA-related studies showing immunofluorescence experiments (Waseem and Lane, 1990; Cazzalini et al., 2003; Punchihewa et al., 2012). Furthermore, the P40M-eGFP-con1 fusions were found to bind to endogenous PCNA after transfection and we have previously shown that PC10 mAb could not recognize its epitope on PCNA after transduction in living cells (Freund et al., 2013). Interestingly, we obtained the same type of result with the P26-GST molecules that were strictly located in the cytoplasm of the transfected cells, but able to detect PCNA in fixed cells. Thus PC10 mAb and the scFv P26 have no access to their epitope in the cytosol, suggesting that they may recognize another region of PCNA than the scFv P40.

Beyond solubility, another critical parameter for accurate binding of intrabodies to target is likely affinity. We have shown here an application of a new antibody affinity maturation method developed in our laboratory combining sodium bisulfite mutagenesis and error-prone PCR. Even if we performed only one round of mutagenesis, we were able to select

mutants (P40M1 and P40M2) that could detect PCNA when expressed in monovalent form, a condition that was not achievable with the parental scFv P40. The gain of affinity through this diversification in the framework region of the VL chain is not known, but it has already been shown that mutations which are not located in the CDR regions can improve not only the stability but also the affinity of defined antibodies (Wang et al., 2013; Rani et al., 2012; Fukunaga and Tsumoto, 2013). It is possible that the fusion of pep10 or con1 peptides to the anti-PCNA scFvs also led to a significant affinity increase of the tagged intrabodies. The dissociation constants of the peptides pep10 and con1 have been measured *in vitro* and are close to 100 nM (Zheleva et al., 2000). Their expression in cells when fused to eGFP seems to inhibit colony formation in tumor cell lines likely by interfering with PCNA natural interactions, but to our surprise no convincing micrograph indicating the cellular distribution of these overexpressed fusions was shown (Warbrick, 2006). In addition, in contrast to this study, we could not record any deleterious effect of these peptides on cell proliferation even after several days of incubation of the transfected cells. As PCNA is a trimeric protein, it will now be of interest to investigate whether P40 and pep10 (or con1) bind both to the same monomer or if each “arm” of our bi-specific intrabody-based reagent binds to a separate subunit within the same molecule of PCNA.

The study of intracellular proteins relied for too long on the use of overexpressed or truncated polypeptides leading to aggregation problems. Furthermore, classical immunofluorescence approaches are prone to artifacts mainly through the fixation and the permeabilization procedures of the cells. In agreement with Schnell et al., 2012, we think that live-cell imaging using validated tools will provide a more accurate view of the dynamics of endogenous proteins. The fact that PCNA could be readily detected and possibly tracked with a fluorescent intrabody-based reagent is reminiscent to that recently described as being a “Cell-Cycle Marker”, which consists of an anti-PCNA VHH fragment isolated from immunized camels fused to eGFP (Rothbauer et al., 2006; Burgess et al., 2012). We expect that the fusions

expressed in cells with our constructs may behave similarly and that especially P40M1-eGFP-con1 might be useful for live-cell imaging. In this context, we seek to test this reagent for the analysis of PCNA in real time after genotoxic stress or UV treatment of cancer cells. Since we found that the expression of the P40M1-eGFP-con1 fusions can promote the accumulation of cells arrested at a defined stage in S phase when the Elg1 protein is downregulated, the results described may provide a basis to develop an intrabody-based reagent that can interfere with the activity of PCNA in living cancer cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. J.L. Galzi and Dr. B. Chatton for constant encouragement, Dr. M.H. Van Regenmortel for useful discussions and critical reading of the manuscript, Dr. M. Oulad-Abdelghani for anti-tag immunoglobulins and Dr. M. Masson for the H1299 cell line. This work was supported by the Ligue contre le Cancer (CCIR-Grand-Est) and by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-12-RPIB-0012-04). GF was supported by a fellowship of the Direction Générale de l'Armement (DGA) and the Conseil Régional d'Alsace.

REFERENCES

- Biocca, S., Neuberger, M.S., and Cattaneo, A. (1990). Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells. *EMBO J.* **9**:101–108.
- Biocca, S., Ruberti, F., Tafani, M., Pierandrei-Amaldi, P., and Cattaneo, A. (1995). Redox state of single chain Fv fragments targeted to the Endoplasmic Reticulum, Cytosol and Mitochondria. *Nat. Biotechnol.* **13**:1110-1115.
- Bouayad, D., Pederzoli-Ribeil, M., Mocek, J., Candalh, C., Arlet, J.-B., Hermine, O., Reuter, N., Davezac, N., and Witko-Sarsat, V. (2012). Nuclear-to-cytoplasmic relocalization of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) during differentiation involves a chromosome region maintenance 1 (CRM1)-dependent export and is a prerequisite for PCNA antiapoptotic activity in mature neutrophils. *J. Biol. Chem.* **287**:33812–33825.
- Burgess, A., Lorca, T., and Castro, A. (2012). Quantitative live imaging of endogenous DNA replication in Mammalian cells. *PLoS One* **7**:e45726.
- Cardinale, A., Filesi, I., Mattei, S., and Biocca, S. (2004). Intracellular targeting and functional analysis of single-chain Fv fragments in mammalian cells. *Methods* **34**:171–178.
- Cazzalini, O., Perucca, P., Riva, F., Stivala, L.A., Bianchi, L., Vannini, V., Ducommun, B., and Prosperi, E. (2003). p21CDKN1A does not interfere with loading of PCNA at DNA replication sites, but inhibits subsequent binding of DNA polymerase delta at the G1/S phase transition. *Cell Cycle* **2**:596–603.
- Courtête, J., Sibler, A.-P., Zeder-Lutz, G., Dalkara, D., Oulad-Abdelghani, M., Zuber, G., and Weiss, E. (2007). Suppression of cervical carcinoma cell growth by intracytoplasmic codelivery of anti-oncoprotein E6 antibody and small interfering RNA. *Mol. Cancer Ther.* **6**:1728–1735.
- Desplancq, D., Rinaldi, A.-S., Stoessel, A., Sibler, A.-P., Busso, D., Oulad-Abdelghani, M., Van Regenmortel, M.H., and Weiss, E. (2011). Single-chain Fv fragment antibodies selected from an intrabody library as effective mono- or bivalent reagents for in vitro protein detection. *J. Immunol. Methods* **369**:42–50.

Essers, J., Theil, A.F., Cappellen, W.A. Van, Houtsmuller, A.B., Kanaar, R., and Vermeulen, W. (2005). Nuclear Dynamics of PCNA in DNA Replication and Repair. *Mol. Cell. Biol.* **25**:9350–9359.

Freund, G., Sibler, A.-P., Desplancq, D., Oulad-Abdelghani, M., Vigneron, M., Gannon, J., Van Regenmortel, M.H., and Weiss, E. (2013). Targeting endogenous nuclear antigens by electrotransfer of monoclonal antibodies in living cells. *mAbs* **5**:518–522.

Fukunaga, A., and Tsumoto, K. (2013). Improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions. *Protein Eng. Des. Sel.* **26**:773–780.

Hishiki, A., Shimizu, T., Serizawa, A., Ohmori, H., Sato, M., and Hashimoto, H. (2008). Crystallographic study of G178S mutant of human proliferating cell nuclear antigen. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **64**:819–821.

Janel-Bintz, R., Wagner, J., Haracska, L., Mah-Becherel, M.C.M., Bichara, M., Fuchs, R.P., and Cordonnier, A.M. (2012). Evidence for a Rad18-independent frameshift mutagenesis pathway in human cell-free extracts. *PLoS One* **7**: e36004.

Kvam, E., Sierks, M.R., Shoemaker, C.B., and Messer, A. (2010). Physico-chemical determinants of soluble intrabody expression in mammalian cell cytoplasm. *Protein Eng. Des. Sel.* **23**:489–498.

Mahler, M., Miyachi, K., Peebles, C., and Fritzler, M.J. (2012). The clinical significance of autoantibodies to the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Autoimmun. Rev.* **11**:771-775.

Mailand, N., Gibbs-Seymour, I., and Bekker-Jensen, S. (2013). Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**:269-282.

Mattock, H., Lane, D.P., and Warbrick, E. (2001). Inhibition of cell proliferation by the PCNA-binding region of p21 expressed as a GFP miniprotein. *Exp. Cell Res.* **265**:234–241.

Moldovan, G.-L., Pfander, B., and Jentsch, S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* **129**:665–679.

Naryzhny, S.N. (2008). Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**:3789–3808.

Nizak, C., Martin-Lluesma, S., Moutel, S., Roux, A., Kreis, T.E., Goud, B., and Perez, F. (2003). Recombinant antibodies against subcellular fractions used to track endogenous Golgi protein dynamics in vivo. *Traffic* **4**:739–753.

Philibert, P., Stoessel, A., Wang, W., Sibler, A.-P., Bec, N., Larroque, C., Saven, J.G., Courtête, J., Weiss, E., and Martineau, P. (2007). A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. *BMC Biotechnol.* **7**:81.

Punchihewa, C., Inoue, A., Hishiki, A., Fujikawa, Y., Connelly, M., Evison, B., Shao, Y., Heath, R., Kuraoka, I., Rodrigues, P., Hashimoto, H., Hawanishi, M., Sato, M., Yagi, T., and Fujii, N. (2012). Identification of small molecule proliferating cell nuclear antigen (PCNA) inhibitor that disrupts interactions with PIP-box proteins and inhibits DNA replication. *J. Biol. Chem.* **287**:14289–14300.

Rani, M., Bolles, M., Donaldson, E.F., Van Blarcom, T., Baric, R., Iverson, B., and Georgiou, G. (2012). Increased Antibody Affinity Confers Broad In Vitro Protection against Escape Mutants of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Virol.* **86**:9113–9121.

Rinaldi, A.-S., Freund, G., Desplancq, D., Sibler, A.-P., Baltzinger, M., Rochel, N., Mély, Y., Didier, P., and Weiss, E. (2013). The use of fluorescent intrabodies to detect endogenous gankyrin in living cancer cells. *Exp. Cell Res.* **319**:838–849.

Rothbauer, U., Zolghadr, K., Tillib, S., Nowak, D., Schermelleh, L., Gahl, A., Backmann, N., Conrath, K., Muyldermans, S., and Cardoso, M.C. (2006). Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat. Methods* **3**:887–889.

Schnell, U., Dijk, F., Sjollem, K.A., and Giepmans, B.N.G. (2012). Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging. *Nat. Methods* **9**:152–158.

Shiomi, Y., and Nishitani, H. (2013). Alternative replication factor C protein, Elg1, maintains chromosome stability by regulating PCNA levels on chromatin. *Genes Cells* **18**:946-959.

Sibler, A.-P., Nordhammer, A., Masson, M., Martineau, P., Travé, G., and Weiss, E. (2003). Nucleocytoplasmic shuttling of antigen in mammalian cells conferred by a soluble versus insoluble single-chain antibody fragment equipped with import/export signals. *Exp. Cell Res.* **286**:276–287.

Stoimenov, I., and Helleday, T. (2009). PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **37**:605–613.

Studier, F.W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**:207–234.

Wang, F., Sen, S., Zhang, Y., Ahmad, I., Zhu, X., Wilson, I.A., Smider, V.V., Magliery, T.J., and Schultz, P.G. (2013). Somatic hypermutation maintains antibody thermodynamic stability during affinity maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**:4261-4266.

Warbrick, E. (2006). A functional analysis of PCNA-binding peptides derived from protein sequence, interaction screening and rational design. *Oncogene* **25**:2850–2859.

Waseem, N.H., and Lane, D.P. (1990). Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J. Cell Sci.* **96**:121-129.

Witko-Sarsat, V., Mocek, J., Bouayad, D., Tamassia, N., Ribeil, J.-A., Candalh, C., Davezac, N., Reuter, N., Mouthon, L., Hermine, O., Pederzoli-Ribeil, M., and Cassatella, M.A. (2010). Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. *J. Exp. Med.* **207**:2631–2645.

Zheleva, D.I., Zhelev, N.Z., Fischer, P.M., Duff, S. V, Warbrick, E., Blake, D.G., and Lane, D.P. (2000). A quantitative study of the in vitro binding of the C-terminal domain of p21 to PCNA: affinity, stoichiometry, and thermodynamics. *Biochemistry* **39** :7388–7397.

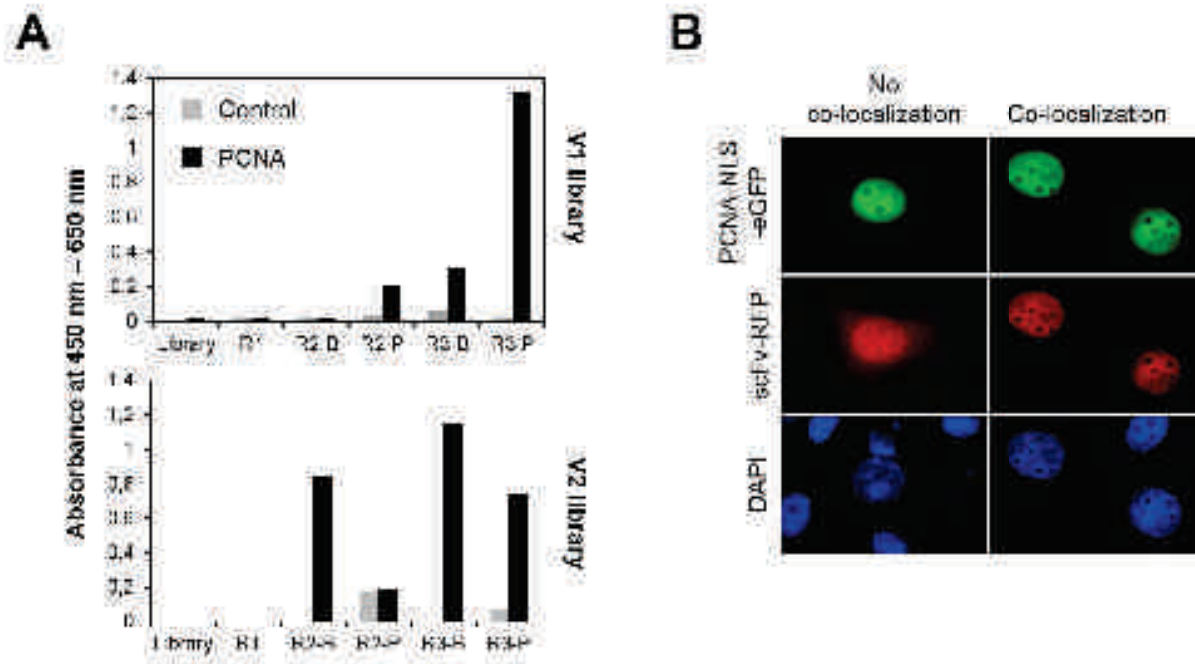


Figure 1. Phage-display selection of scFvs binding to human PCNA. (A) The enrichment of scFv-phages binding to recombinant human PCNA during the panning cycles was evaluated by polyclonal phage-ELISA. (B) Individual clones from the third round of selection (R3-B and R3-P) were cloned in the plasmid p β A-scFv-RFP and co-transfected with p β A-PCNA-NLS-eGFP in HeLa cells. The scFv-RFP fusions co-localizing with PCNA in the nuclei of HeLa cells were further characterized. The expressed polypeptides were visualized using a fluorescent microscope. Nuclei were stained with DAPI (blue). Magnification: $\times 630$.

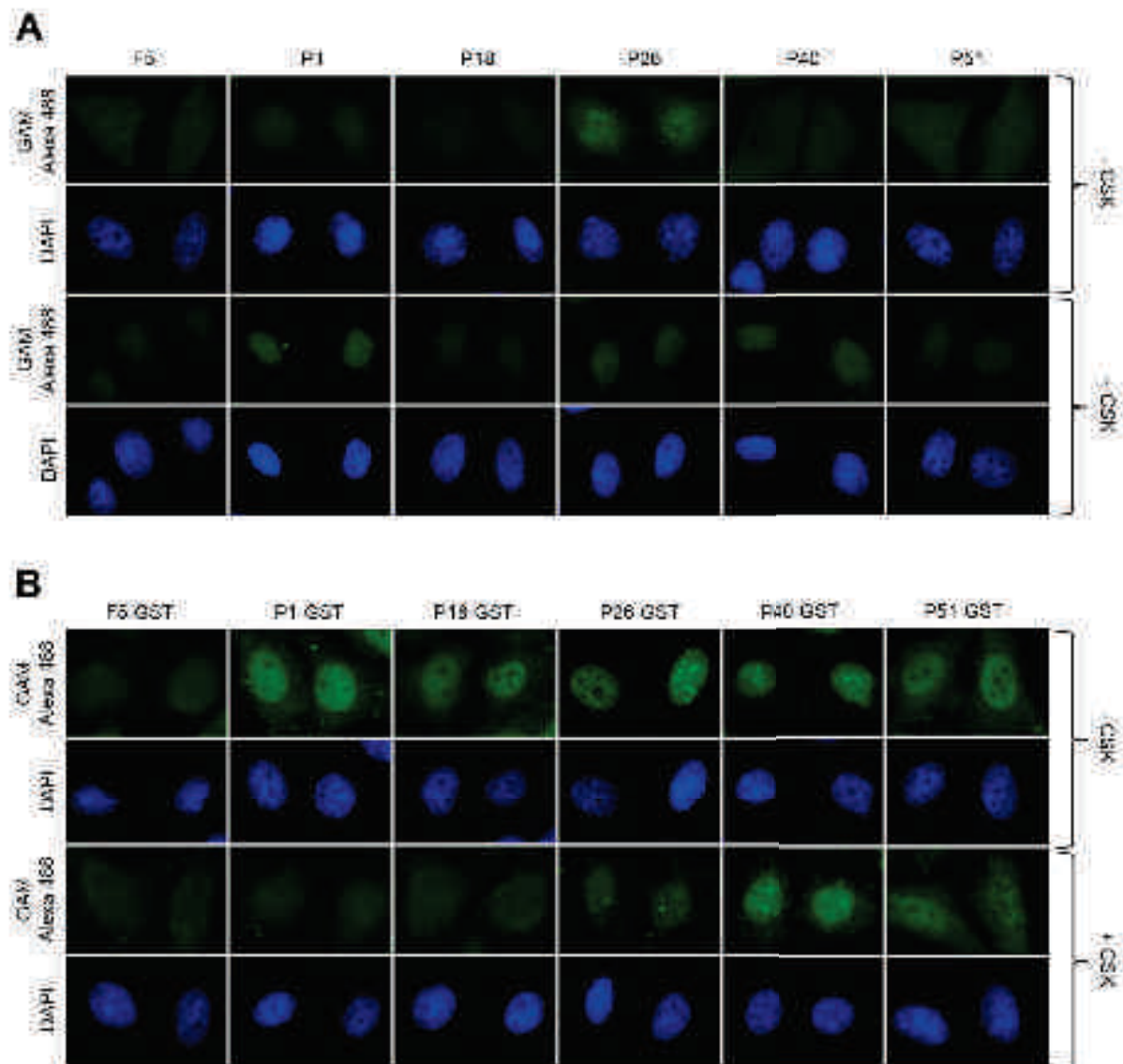


Figure 2. Detection of endogenously PCNA in fixed HeLa cells. Soluble proteins were removed by extraction with CSK buffer (+ CSK) or not (- CSK). After fixation, HeLa cells were incubated either with anti-PCNA scFvs (A) or scFv-GST proteins (B). The binding of the scFvs and scFv-GST proteins to endogenous PCNA was detected with the anti-myc 9E10 monoclonal antibody followed by Alexa488-labelled goat anti-mouse immunoglobulins. Nuclei were stained with DAPI (blue). Magnification: $\times 630$. All panels show typical cells that were micrographed with an exposure time of 1 sec.

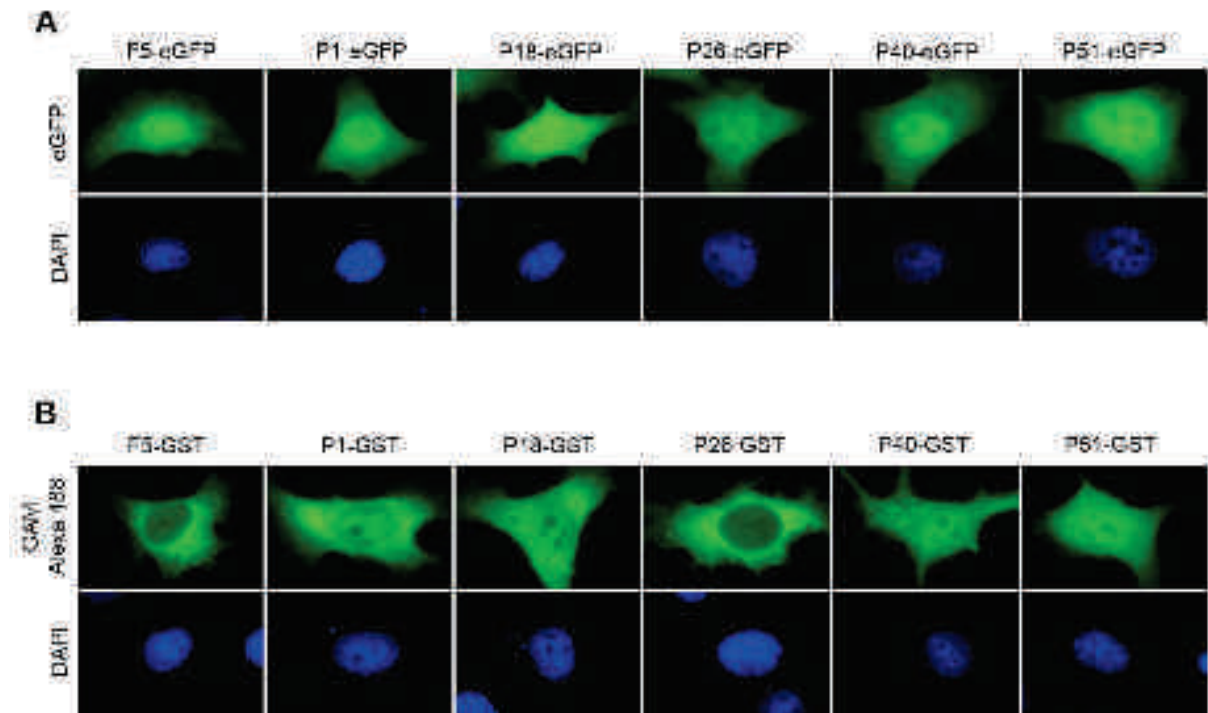


Figure 3. Characterization of anti-PCNA scFvs in HeLa cells. (A) Expression of eGFP-labelled anti-PCNA scFvs in HeLa cells. (B) Cellular distribution of the anti-PCNA GST-tagged scFvs revealed with anti-myc 9E10 antibody and Alexa488-conjugated goat anti-mouse immunoglobulins. Nuclei were stained with DAPI (blue). Magnification: $\times 630$. Exposure times are identical for all pictures. All micrographs were recorded with an exposure time of 1 sec.

and Alexa488-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins. Nuclei were stained with DAPI (blue). Magnification: $\times 630$. All micrographs were recorded with an exposure time of 1 sec.

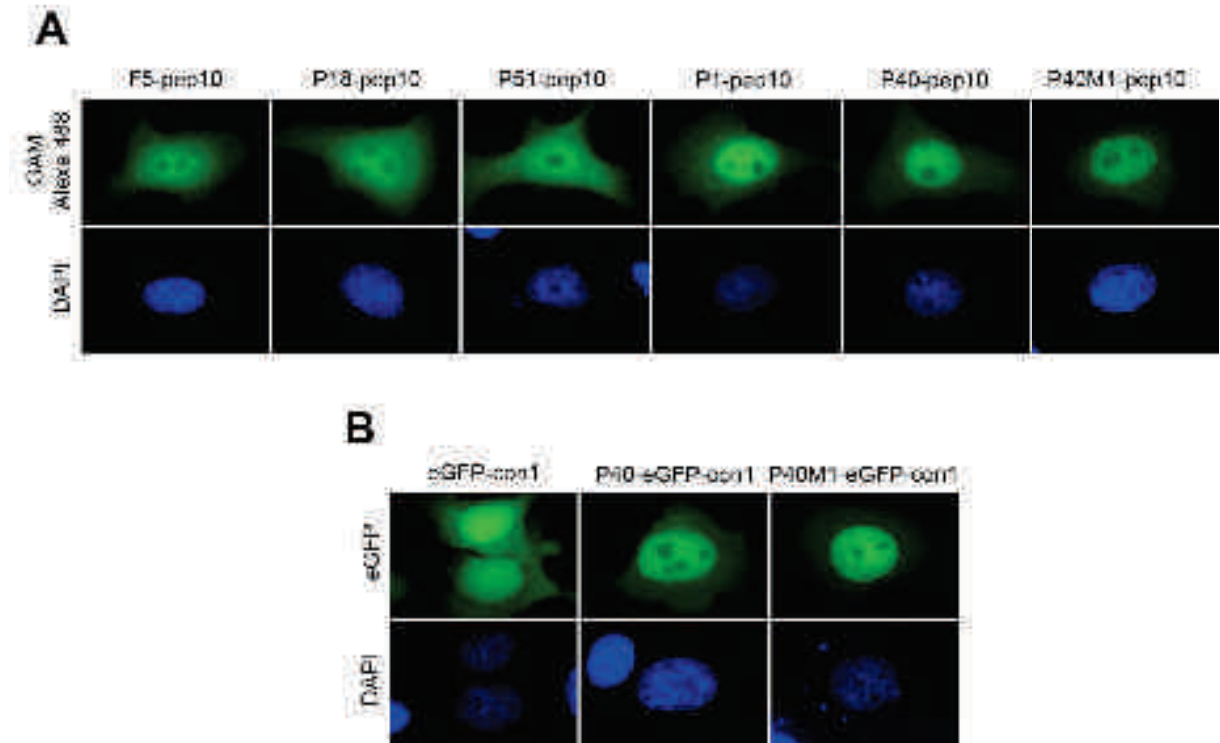


Figure 5. Cellular distribution of the anti-PCNA scFvs fused to the pep10 peptide. (A) The scFvs were fused to the carboxy-terminal peptide of p21 (pep10) and transfected in HeLa cells. After 48 hrs of incubation, the fusion proteins were detected with anti-myc 9E10 antibody and Alexa488-conjugated goat anti-mouse immunoglobulins. (B) HeLa cells were transfected either with eGFP-con1 alone or with scFvs P40 and P40M1 both fused to eGFP-con1. Nuclei were stained with DAPI (blue). Magnification: $\times 630$. The different panels show typical cells that were micrographed with an exposure time of 1 sec.

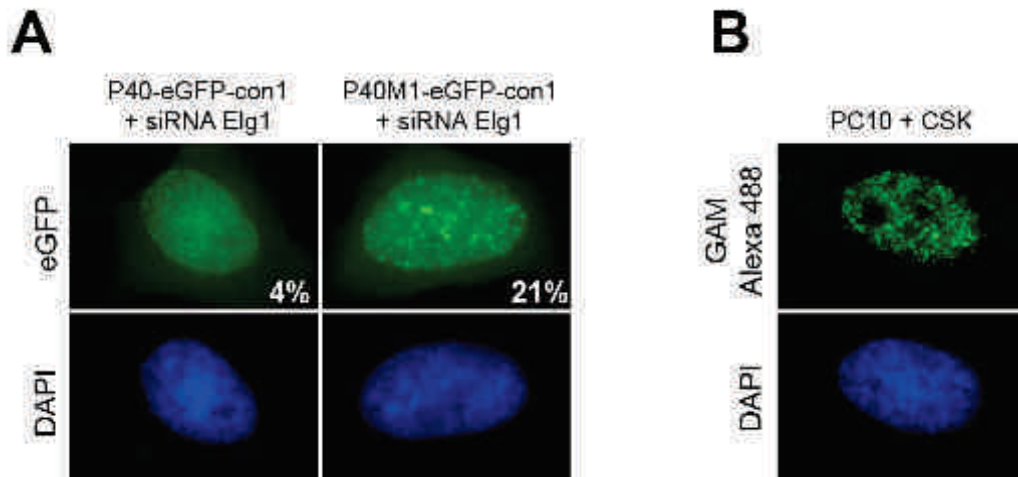


Figure 6. Targeting endogenous PCNA with bi-specific scFvs in HeLa cells. (A) The P40- and P40M1-eGFP-con1 constructs were co-transfected with siRNA targeting Elg1 in HeLa cells. The percentage of transfected cells exhibiting typical speckles was determined (number in the bottom right corner; 300 cells per condition were counted). (B) HeLa cells were extracted with CSK buffer and stained with the PC10 mAb followed by Alexa488-labeled anti-mouse immunoglobulins. Nuclei were stained with DAPI (blue). Magnification: $\times 630$. The different panels show typical cells that were micrographed with an exposure time of 1 sec.

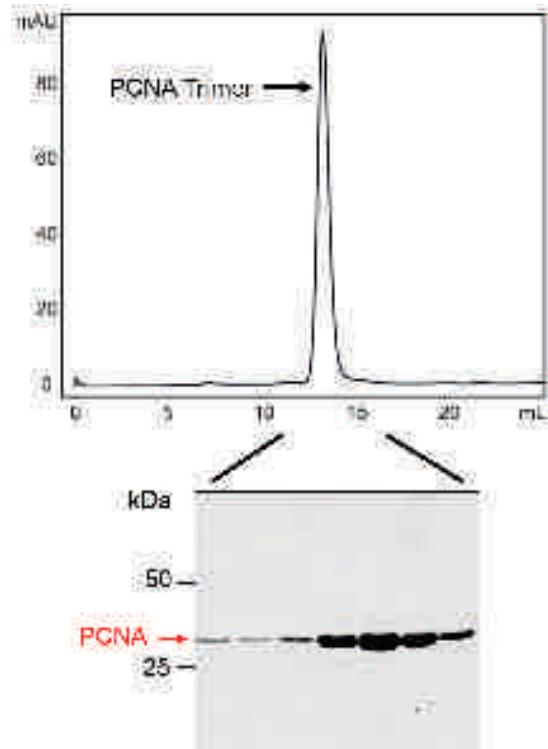


Figure S1. Purification of recombinant human PCNA. The upper panel shows the gel filtration analysis of purified human PCNA. Aliquots of the peak fractions corresponding to trimeric PCNA (12-14 mL of retention volume) were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie staining (lower panel).

scFv	CDR3-H	CDR3-L
F5	GVIDKFDY	ISYISSNTRL
P1	SSGYSGMDV	CSSYTYSTRV
P18	SSITIFGGGMDV	RMSKRFSTKWA
P26	YSGVEHLRWIPGLDH	HQYGIITPFT
P40	GRRTWLQQGYGFDH	LQSNGVPYT
P51	RAVWWLGIDAFDY	QQYSSSPRFT

Figure S2. CDR3 sequences of the scFvs used in the study. The scFv F5 binding to gankyrin was used as a negative control for the cells experiments. The five other scFvs (P1, P18, P26, P40, and P51) recognize specifically PCNA.

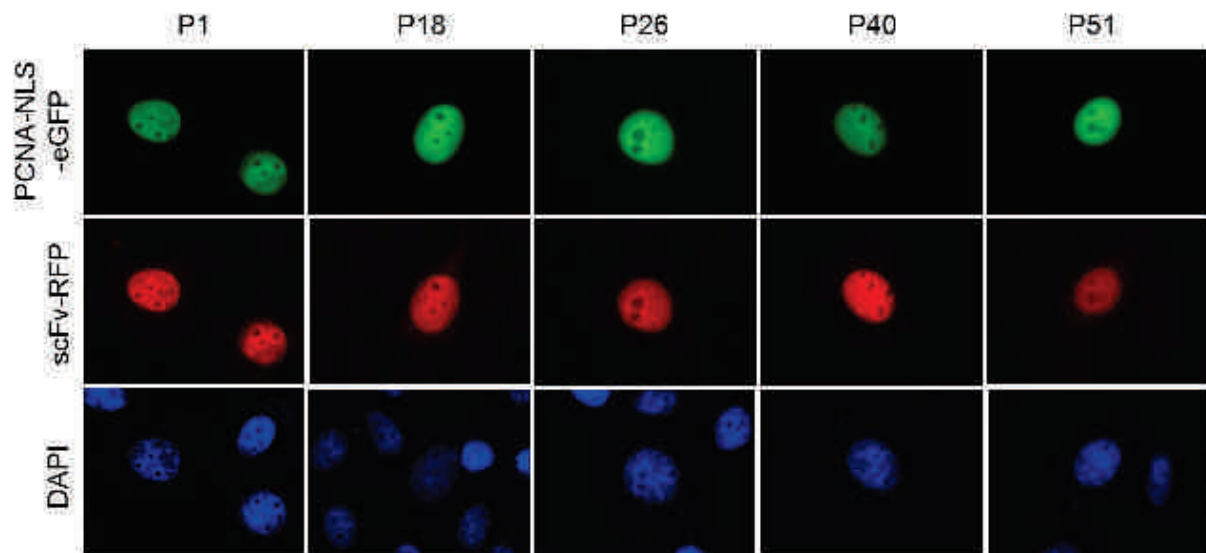


Figure S3. Selection of anti-PCNA intrabodies co-localizing with PCNA-NLS-eGFP in HeLa cells. The micrographs show the binding behavior of the five scFvs after co-expression with PCNA-NLS-eGFP. These were used throughout this study. Nuclei were stained with DAPI (blue). Magnification: $\times 400$. All micrographs were recorded with an exposure time of 1 sec.

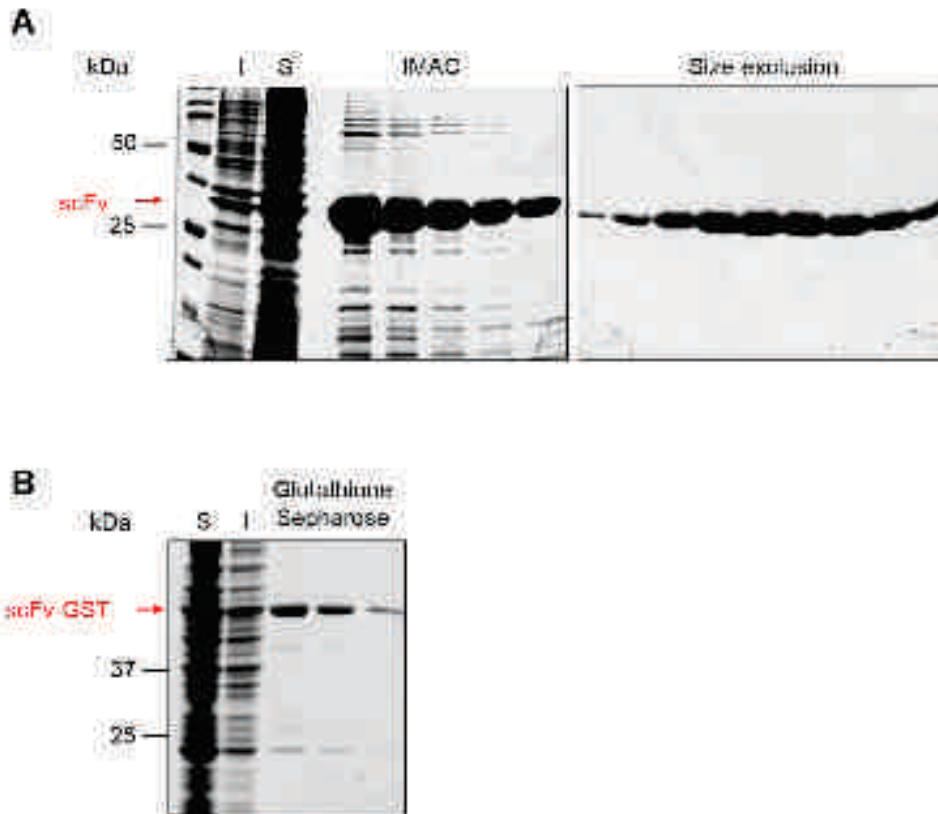


Figure S4. Analysis of purified scFv and scFv-GST fusion proteins. (A) Fractions of the purified scFvs obtained after IMAC and gel filtration were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie staining. (B) Fractions of purified scFv-GST recovered by affinity chromatography were also analyzed by SDS-PAGE. The gels shown correspond to the purification of the scFv P40 and P40-GST. S: soluble fraction; I: insoluble fraction.

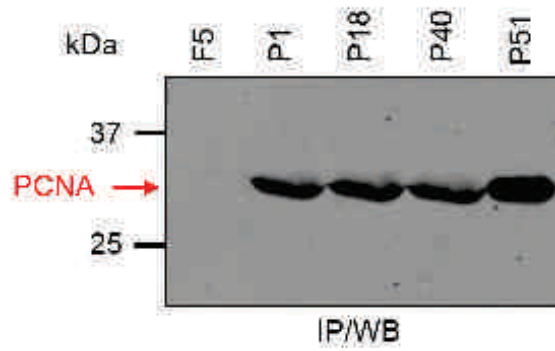


Figure S5. Immunoprecipitation of PCNA. Whole cell extracts were subjected to immunoprecipitation with the scFvs captured on magnetic beads. The bound complexes were analyzed by SDS-PAGE and western blotting. PCNA was revealed with PC10 antibody.

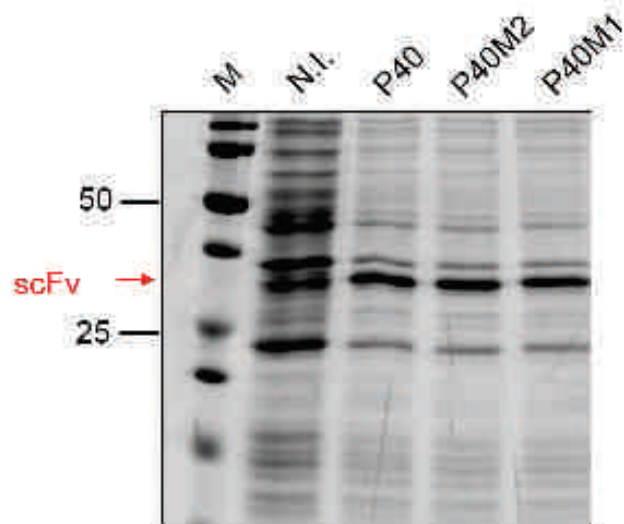


Figure S6. Expression levels of the scFvs P40, P40M1 and P40M2 in *E. coli*. Aliquots of induced and non-induced *E. coli* cells were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie staining. M: marker; N.I.: non-induced.

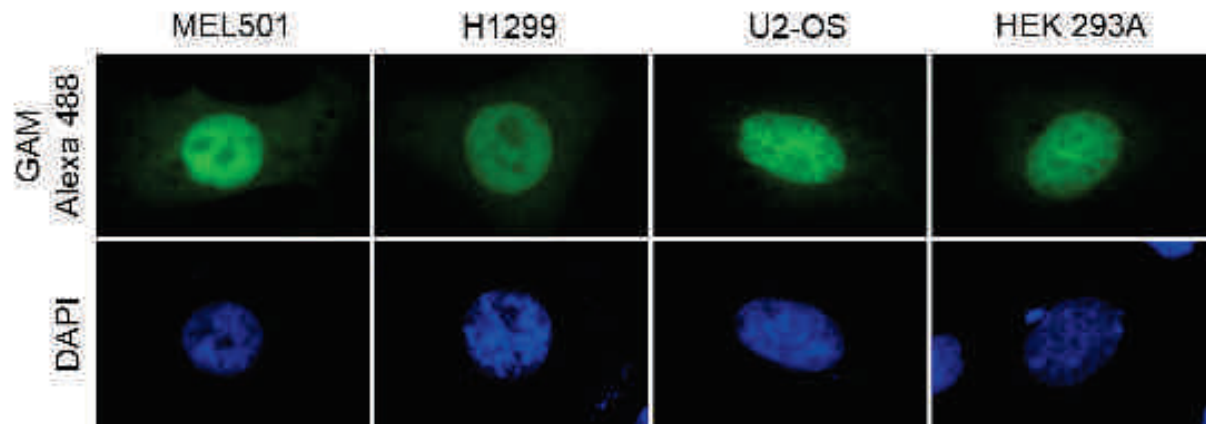


Figure S7. Cellular distribution of P40-pep10 fusion in different cancer cell lines. The micrographs show a typical cell observed after transfection of MEL501, H1299, U2-OS and HEK 293A cells. Nuclei were stained with DAPI (blue). Magnification: $\times 630$. All micrographs were recorded with an exposure time of 1 sec.

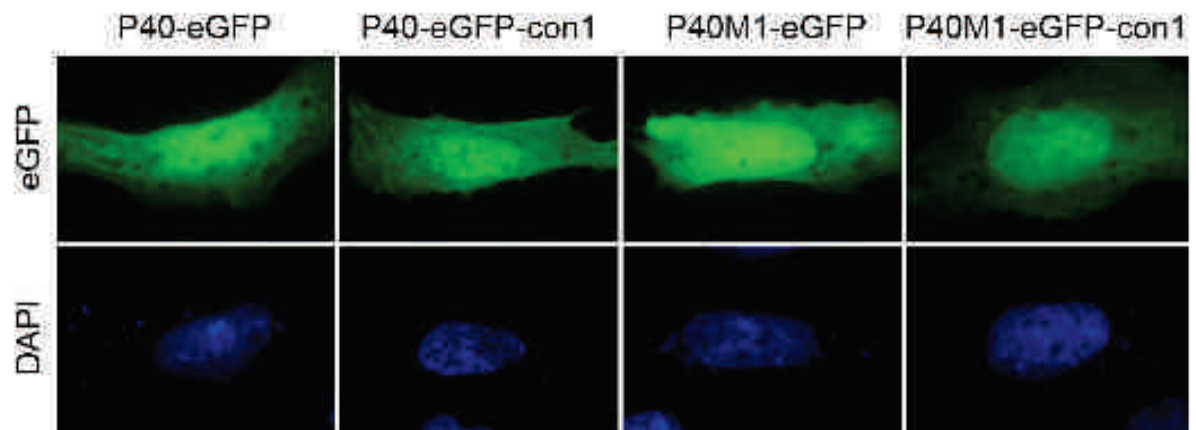


Figure S8. Cellular distribution of P40 and P40M1 in U2-OS cells. Nuclei were stained with DAPI (blue). Magnification: $\times 630$. All micrographs were recorded with an exposure time of 1 sec.

2.3. Conclusion

Les fragments d'anticorps exprimés dans le cytoplasme, encore appelés intracorps, représentent une approche attractive pour cibler des antigènes intracellulaires. Nous avons décrit dans cet article la méthodologie mise en œuvre pour développer un réactif capable de se lier spécifiquement à la protéine nucléaire PCNA et qui permet d'observer directement la dynamique endogène de PCNA. Cet intracorps se présente sous la forme d'une protéine de fusion formée par (1) le scFv P40M1 qui a été sélectionné par phage-display à partir d'une banque de scFv solubles, et qui a été amélioré par maturation d'affinité ; (2) la protéine fluorescente eGFP ; (3) le peptide con1 qui se lie au niveau de la région IDCL de PCNA (Zheleva et al., 2000). Nous avons observé que le réactif bispécifique P40M1-eGFP-con1 se lie à PCNA après transfert du matériel génétique dans les cellules vivantes.

Cette étude a également permis de valider une nouvelle méthode de maturation d'affinité des scFv basée sur la mutagenèse induite par le bisulfite de sodium et l'« error-prone » PCR (méthode détaillée dans le chapitre suivant et qui sera décrite dans un article en préparation). En effet, le scFv P40M1 a été isolé à partir d'une banque de mutants construite après diversification de la séquence codante du scFv P40. Il a notamment été observé que le scFv P40M1 détecte PCNA endogène dans des cellules fixées au contraire du scFv P40, ou encore de l'anticorps monoclonal de référence PC10 qui nécessite d'extraire les protéines solubles des cellules pour révéler PCNA en immunofluorescence. La capacité de liaison à PCNA du scFv P40M1 conjuguée à celle du peptide con1 a permis de cibler précisément PCNA dans un contexte intracellulaire.

A ce jour, il n'y a pas de scFv anti-PCNA décrit dans la littérature. Les scFv présentés dans cet article constituent donc les premiers exemples de scFv capables de se lier à PCNA dans les cellules. A terme, nous souhaitons développer un système d'imagerie de cellules vivantes et utiliser l'intracorps P40M1-eGFP-con1 pour visualiser PCNA en temps réel. Des expériences d'imagerie de type « time-lapse » à intervalle unique devraient nous permettre d'observer des événements dynamiques dans une cellule.

3. Développement d'un système de mutagenèse *in vitro* inspiré de la SHM

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que l'affinité est un paramètre critique pour la liaison d'un scFv à sa cible. Nous nous intéressons ici au développement d'un système de mutagenèse *in vitro* des scFv inspiré de l'hypermutation somatique des anticorps naturels.

3.1. Introduction

La mutagenèse (aléatoire ou non) est fréquemment utilisée pour générer de la diversité génétique afin de construire des banques de mutants. Ces banques permettent d'obtenir des variants aux propriétés désirées pour de nombreuses applications d'ingénierie des protéines comme par exemple l'étude structure-fonction d'une enzyme ou l'amélioration de l'affinité d'un anticorps (Wong et al., 2006).

Le développement d'un système de mutagenèse permettant de maturer l'affinité des scFvs a constitué une part importante des travaux réalisés au cours de cette thèse. A l'inverse des méthodes classiquement utilisées qui visent à diversifier les fragments d'anticorps aléatoirement comme le « DNA shuffling » par exemple (Rani et al., 2012), nous proposons ici une méthode qui s'inspire de ce qui se passe au cours de la SHM mise en place par le système immunitaire. L'enzyme AID, qui catalyse la désamination d'une cytosine en uracile, est à la base de ce mécanisme de mutagenèse. Le mésappariement qu'elle induit au niveau de l'ADN est « réparé » par une ADN polymérase infidèle, ce qui permet de diversifier la séquence codante des scFv traités. Ainsi, une banque de mutants peut être construite et criblée par phage-display afin de sélectionner des scFv dont les affinités pour l'antigène sont différentes.

Pour obtenir des scFv de meilleure affinité, nous avons initialement tenté d'utiliser les propriétés des activités enzymatiques à la base de la SHM en co-exprimant AID et une ADN polymérase translésionnelle procaryote dans un système de mutagenèse bactérien chez *E. coli*. Les essais de co-expression ont permis de montrer que les deux enzymes sont capables de muter de manière non aléatoire des gènes rapporteurs situés soit au niveau du chromosome bactérien ou sur un plasmide.

Malheureusement, nous n'avons pas pu trouver les conditions permettant d'obtenir une fréquence de mutagenèse et un spectre de mutations similaires à celles observées lors de l'hypermutation somatique sans affecter la viabilité des bactéries. C'est pour cette raison que nous avons opté pour un système *in vitro*.

3.2. Principe du système de diversification des scFv *in vitro*

Nous avons développé une stratégie de maturation d'affinité *in vitro* pour optimiser la capacité de liaison des scFv issus des banques combinatoires disponibles au laboratoire. A l'image de la réaction catalysée par AID, le bisulfite de sodium (NaHSO_3) provoque la désamination de cytosine en uracile au niveau de l'ADN. C'est un composé chimique utilisé en épigénétique pour mapper les cytosines méthylées (Huang et al., 2010). Nous avons associé ce composé à l'« error-prone » PCR (epPCR) afin de disposer d'un outil de diversification des scFv. Notre système *in vitro* nous permet donc en quelque sorte de « mimer » la SHM en l'appliquant à la séquence codante d'un scFv (Figure 21).

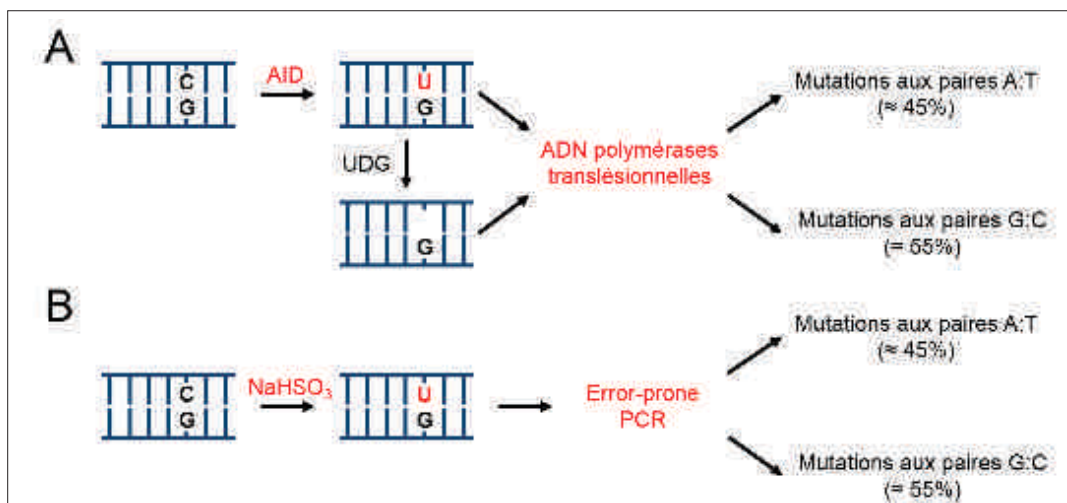
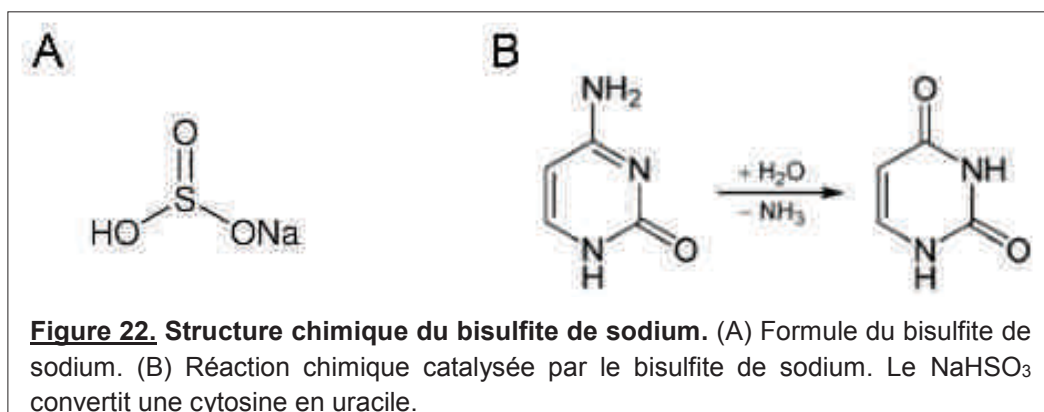


Figure 21. Représentation schématique du principe de l'hypermutation somatique et de la méthode de mutagenèse *in vitro*. (A) L'enzyme AID désamine une cytosine en uracile au niveau des régions variables des gènes des immunoglobulines. La lésion U:G qui en résulte est ensuite réparée grâce aux ADN polymérases translésionnelles après excision (ou non) de l'uracile par la protéine UDG. (B) La désamination d'une cytosine en uracile est induite par le traitement au bisulfite de sodium (NaHSO_3) et l'activité des ADN polymérases translésionnelles est remplacée par l'epPCR dans le système de mutagenèse *in vitro* proposé.

3.2.1. Traitement au bisulfite de sodium

Ce composé est généralement utilisé pour analyser la méthylation de l'ADN (Figure 22A). Le bisulfite de sodium désamine spécifiquement les cytosines (non méthylées) en uraciles (Figure 22B). Il a été observé qu'en fonction de la taille du fragment d'ADN muté, plusieurs heures d'incubation à 90°C sont nécessaires pour effectuer une conversion complète de toutes les cytosines en uraciles. La mutagenèse induite par le bisulfite est donc directement corrélée au temps d'incubation (Liu et al., 2009). Il est possible de moduler cette durée afin de contrôler la fréquence de mutations induites par le bisulfite de sodium sur une séquence d'ADN donnée.

En épigénétique, la cartographie des cytosines méthylées d'un fragment d'ADN s'effectue par séquençage après traitement au bisulfite de sodium. Dans notre système de diversification des scFv, l'amplification du segment d'ADN muté par le NaHSO₃ est remplacée par une réaction d'« error-prone » PCR qui permet, en sus des mutations induites par le bisulfite de sodium au niveau des cytosines (donc des paires C:G), d'introduire des erreurs aux paires de bases A:T.



3.2.2. PCR mutagène ou « error-prone » PCR

L'« error-prone » PCR est une méthode couramment utilisée en évolution moléculaire. Elle est basée sur l'utilisation d'ADN polymérases peu fidèles qui n'ont pas d'activité exonucléase 3'-5' pour amplifier un fragment d'ADN. Ces polymérases favorisent l'apparition de mésappariements au cours de la synthèse d'ADN. Il est possible de moduler le nombre et la nature des erreurs en changeant les conditions

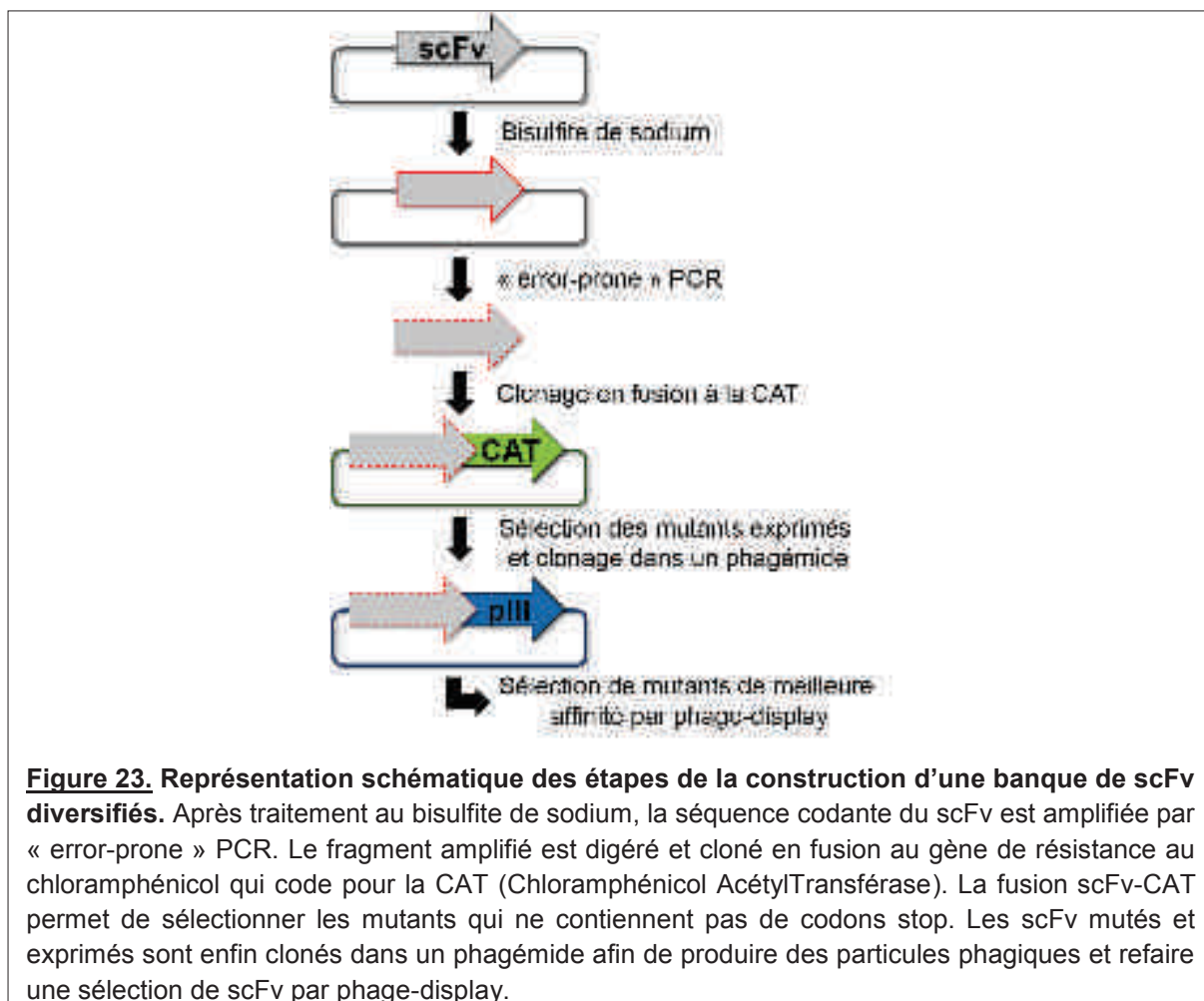
de la réaction de l'epPCR en ne respectant pas l'équimolarité des quatre désoxyribonucléotides ou en modifiant la nature des cations divalents utilisés. Ainsi, les ions magnésium Mg^{2+} nécessaires à l'activité des ADN polymérases dans la réaction de PCR peuvent être partiellement remplacés par des ions manganèse Mn^{2+} , ce qui entraîne une augmentation des erreurs au cours de la synthèse d'ADN et notamment aux paires de bases A:T. Nous avons observé qu'une concentration de 50 μM d'ions Mn^{2+} dans une réaction d'« error-prone » PCR induit l'apparition de plus de 70 % d'erreurs aux paires de bases A:T (Tableau 4). La proportion plus importante de mutations aux paires A:T permet de compenser les erreurs générées par le bisulfite de sodium au niveau des cytosines afin d'obtenir un équilibre semblable au spectre de mutagenèse de la SHM (Figure 21).

Cible A:T	72,1 %	Cible G:C	27,9 %
A:T → T:A	34,1 %	G:C → A:T	58,8 %
A:T → G:C	59,1 %	G:C → T:A	23,5 %
A:T → C:G	6,8 %	G:C → C:G	17,7 %

3.2.3. Sélection de scFv diversifiés

Le système de mutagenèse *in vitro* original qui repose sur la combinaison du traitement au bisulfite de sodium d'un fragment d'ADN combiné à une étape d'amplification par « error-prone » PCR a été utilisé pour diversifier la séquence codante de plusieurs scFv. Ceci permet de construire une banque de phages à partir de laquelle on peut sélectionner des mutants d'affinités différentes pour l'antigène. La procédure expérimentale mise en œuvre pour obtenir une banque de mutants est présentée schématiquement dans la Figure 23. Brièvement, le plasmide purifié contenant la séquence codante d'un scFv est incubé avec du bisulfite de sodium à 90°C afin de générer des mutations aux paires de bases G:C. La séquence du scFv ainsi altérée est amplifiée par « error-prone » PCR qui va introduire des erreurs préférentiellement aux paires A:T. Le fragment d'ADN est ensuite digéré par les enzymes de restriction *NcoI* et *NotI* et cloné dans un nouveau vecteur en fusion à la séquence codante de la Chloramphénicol AcétylTransférase (CAT), enzyme responsable de la résistance au chloramphénicol chez *E. coli*. Le vecteur d'origine

(pscFv Δ CAT) contient une version tronquée d'un scFv : la protéine de fusion scFv-CAT est produite uniquement si la séquence complète d'un scFv est insérée. Ceci permet de s'affranchir des scFv non exprimés en sélectionnant les bactéries transformées en présence de chloramphénicol. Enfin, les séquences diversifiées par mutagenèse sont clonées via les sites de restriction *NcoI* et *NotI* dans un phagémide afin de produire des particules phagiques après infection de bactéries *E. coli*. La banque de phages-scFv mutés est criblée par phage-display afin de sélectionner des mutants d'affinité améliorée.



Ce système de mutagenèse présente plusieurs avantages par rapport à l'epPCR seule ou à la technique de « DNA shuffling » qui sont classiquement utilisées pour maturer l'affinité des anticorps. En effet, la fréquence de mutagenèse peut être contrôlée en jouant sur les temps d'incubation avec le bisulfite de sodium et sur la concentration en ions Mn^{2+} dans la réaction d'« error-prone » PCR. En général, la principale limite de l'utilisation de l'epPCR pour maturer l'affinité des anticorps est sa faible fréquence de mutations. C'est pourquoi plusieurs « tours » de mutagenèse sont

bien souvent nécessaires pour obtenir le nombre de substitutions d'acides aminés souhaité. Dans notre cas, il apparaît que l'amplification d'une séquence d'ADN mutée par le NaHSO₃ permet d'augmenter cette fréquence de mutation puisque nous avons observé un taux de mutagenèse semblable à celui de la SHM naturelle qui est de l'ordre de 1 %. Ceci suggère que la présence d'uraciles ou d'intermédiaires de réaction favorise les erreurs de la *Taq* polymérase et ce phénomène est accentué en présence d'ions manganèse. Nous avons également observé que 100 % des séquences analysées par séquençage après mutagenèse que nous appelons « SHM-like » présentent au moins une mutation. De ce fait, l'association du bisulfite de sodium et de l'epPCR ne nécessite pas de réaliser plusieurs tours successifs de mutagenèse.

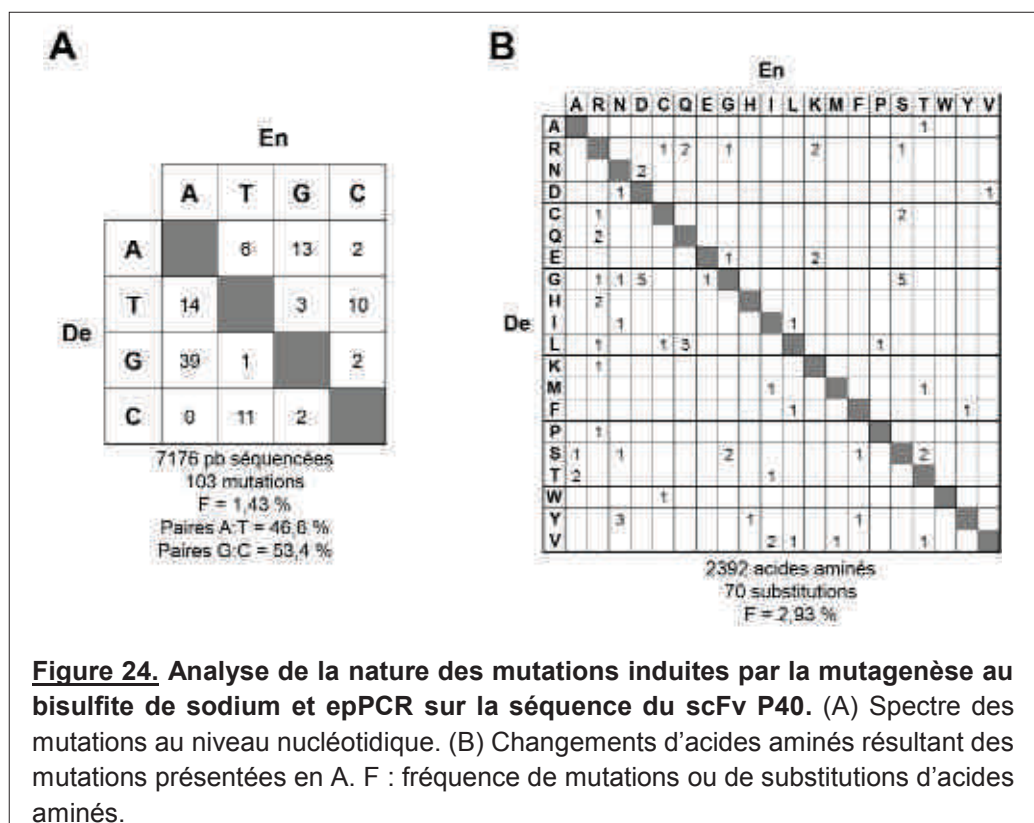
3.3. Applications

La méthode de diversification des scFv a été validée en l'appliquant à deux modèles. Une banque de variants de l'intracorp anti-PCNA P40 a été construite et nous avons isolé des mutants aux propriétés améliorées pour l'immunociblage intracellulaire de PCNA. Ces résultats sont présentés brièvement dans l'article n°2, mais détaillés de façon plus exhaustive ci-après. Nous avons également appliqué cette méthode à un groupe de scFv dirigés contre la région Fc d'immunoglobulines de lapin anti-bactéries (*E. coli* et *P. aeruginosa*) qui a été sélectionné et caractérisé dans notre laboratoire.

3.3.1. scFv anti-PCNA P40

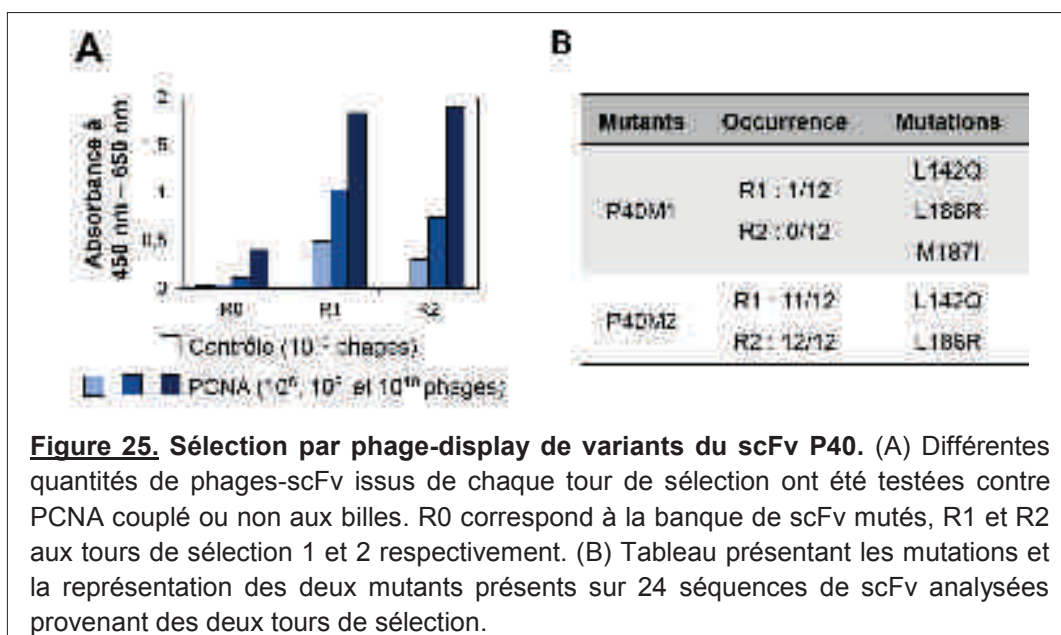
Parmi tous les scFv anti-PCNA présentés dans l'article n°2, le scFv P40 est le fragment d'anticorps le plus performant pour détecter PCNA endogène. En revanche, il n'est pas adapté en tant qu'intracorp pour visualiser PCNA dans des cellules vivantes. Nous avons voulu vérifier s'il est possible d'améliorer ce réactif en essayant d'augmenter son affinité. Ainsi, le scFv P40 a été choisi pour valider le système de mutagenèse « SHM-like ». Pour cela, le phagémide contenant la séquence codante du P40 a été traité au bisulfite de sodium pendant une, deux ou trois minutes à 90°C. Ces durées d'incubation permettent d'incorporer plusieurs niveaux de fréquence de mutations qui ont été analysés par séquençage (entre 10⁻³ et 10⁻² mutations par nucléotide). Des essais préliminaires ont montré qu'un traitement trop long au bisulfite

de sodium entraîne des difficultés pour l'amplification par epPCR du fragment d'ADN altéré. Les plasmides traités par les différentes conditions d'incubation sont ensuite regroupés. Après purification du vecteur, la séquence mutée du P40 a été amplifiée par epPCR puis clonée en fusion à la CAT dans un vecteur d'expression procaryote afin de sélectionner les mutants exprimés et d'estimer la proportion de clones sans codons stop (environ 14 %). Ce clonage a également permis d'évaluer le nombre de clones de la banque de variants du scFv P40 à environ 10^5 mutants. La nature des mutations a été analysée sur les séquences de 13 clones repiqués au hasard dans la population de mutants du P40 (Figure 24). Chaque séquence étudiée présente des erreurs et la fréquence de mutations au niveau nucléotidique est de 1,43 % soit 10,7 mutations par séquence codante de scFv en moyenne. Cette fréquence est du même ordre que celle de l'hypermutation somatique naturelle (0,1 à 1%) et correspond à 7,3 substitutions d'acides aminés par scFv.



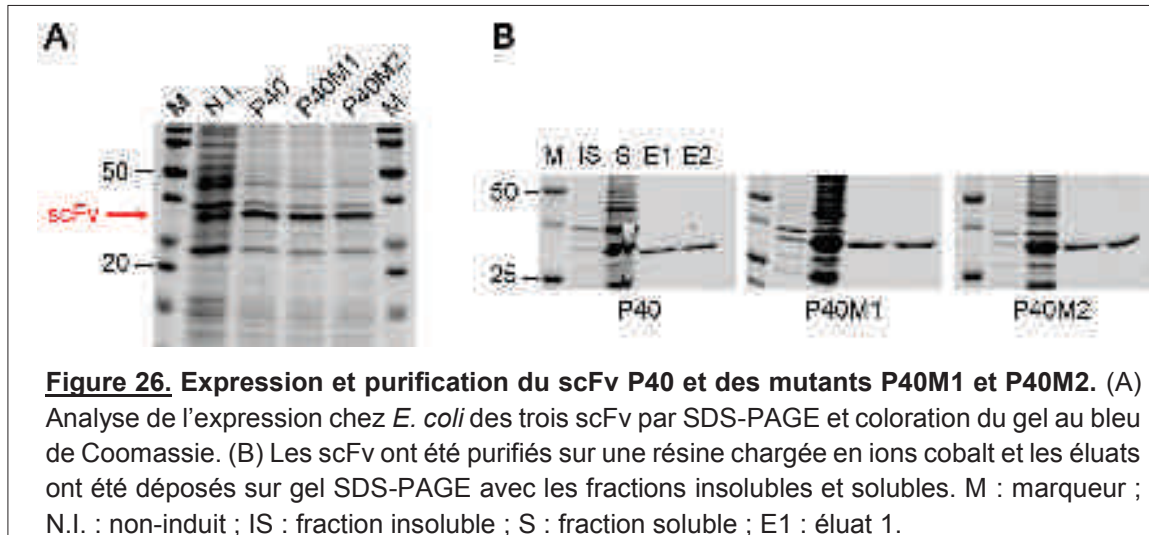
La banque de scFv mutés a ensuite été clonée dans le phagémide pour produire et titrer les phages-scFv. Deux tours de sélection par phage-display ont été effectués contre 100 ng (premier tour de sélection ; R1) et 10 ng (second tour de sélection 2 ; R2) de PCNA immobilisé sur des billes magnétiques. La réactivité de chaque tour de

sélection a été testée en phage-ELISA polyclonal et 12 clones par tour ont été séquencés afin d'étudier l'enrichissement significatif ou non d'un ou plusieurs clones (Figure 25). Les phages issus du premier tour de sélection ont montré une meilleure réactivité contre PCNA que ceux du R2. A partir des données de séquençage de 24 clones choisis aléatoirement, seuls deux mutants nommés P40M1 et P40M2 étaient présents dans les deux tours de sélection. La séquence du P40M1 n'a été retrouvée qu'une seule fois et ce dans le R1. Il est intéressant de noter que toutes les substitutions d'acides aminés observées sont situées dans la région charpente de la chaîne légère VL et non dans les CDR. Les substitutions d'acides aminés L142Q et L186R ont été retrouvées chez les deux mutants P40M1 et P40M2. Ceci suggère une importance particulière de ces acides aminés dans la liaison entre les scFv diversifiés et leur antigène puisque les fragments d'anticorps présentant ces mutations ont été spécifiquement sélectionnés par phage-display.



Pour vérifier que les scFv mutés sont actifs, les séquences codantes des scFv P40M1 et P40M2 ont été insérées dans un vecteur d'expression procaryote de type pET pour produire les protéines dans la souche d'*E. coli* BL21(DE3)pLysS. Après induction de l'expression des protéines à l'IPTG et lyse des bactéries, les scFv ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur une résine IMAC (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography). Le profil d'expression et de purification des scFv P40, P40M1 et P40M2 est similaire (Figure 26A et 26B). Les substitutions d'acides aminés

L142Q, L186R et M187I au niveau de la région charpente des scFv ne semblent pas affecter leur expression chez *E. coli* (Figure 26A). Les scFv purifiés ont été testés en tant que réactifs primaires pour détecter PCNA par immunofluorescence.



Le scFv P40 est capable de se lier à PCNA endogène dans des cellules HeLa fixées uniquement sous forme bivalente P40-GST (résultats décrits dans l'article n°2). En effet, la dimérisation des scFv permet d'augmenter leur affinité apparente par effet d'avidité (Desplancq et al., 2011). Pour tester la réactivité des mutants P40M1 et P40M2 par rapport à celle du scFv parental P40, nous avons vérifié s'ils sont capables sous forme monovalente de détecter PCNA par immunofluorescence (Figure 27). Contrairement au scFv P40, le scFv P40M1 (et dans une moindre mesure le scFv P40M2) est caractérisé par un marquage nucléaire qui correspond à la localisation typique de PCNA dans des cellules HeLa en prolifération. La réactivité des scFv P40M1 et P40M2 est donc supérieure à celle du scFv P40. La sensibilité de détection observée avec le scFv P40M1 et la protéine de fusion P40-GST est équivalente. Ceci suggère que l'affinité du scFv P40M1 est améliorée vis-à-vis du scFv P40. Des expériences d'ELISA compétitif ou de SPR (Surface Plasmon Resonance) doivent être conduites pour confirmer cette observation. L'impact de l'amélioration du scFv P40 sur la détection de PCNA endogène dans les cellules est décrit dans l'article n°2.

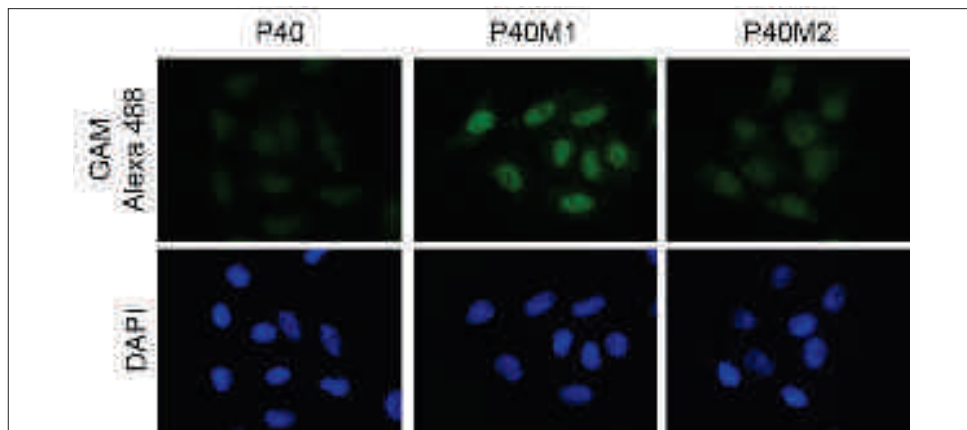


Figure 27. Détection de PCNA par immunofluorescence. Les scFv P40, P40M1 et P40M2 ont été incubés à une concentration de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ avec des cellules HeLa fixées, puis révélés avec un anticorps anti-myc de souris (dilution 1/3000) et un anticorps anti-souris couplé à un fluorophore Alexa 488 (dilution 1/3000). Les noyaux sont colorés au DAPI et les cellules sont observées en microscopie à fluorescence avec un grossissement de 630 \times .

Les résultats obtenus avec le scFv P40 comme modèle ont montré que le système de mutagenèse associant bisulfite de sodium et « error-prone » PCR permet de diversifier les séquences de fragments d'anticorps, et d'obtenir ainsi des mutants de capacité de liaison variable. Pour valider cette méthode, nous l'avons également appliquée à un mélange de scFv anti-immunoglobulines de lapin récemment isolés dans notre laboratoire.

3.3.2. scFv polyclonaux anti-IgG de lapin

Bien que mon activité au laboratoire soit centrée sur l'immunociblage intracellulaire, j'ai également participé au développement de réactifs destinés à des applications de diagnostic comme la détection de bactéries par immunofluorescence. En fait, de nombreux systèmes de détection reposent sur l'utilisation d'anticorps couplés à des marqueurs (enzyme ou fluorophore), mais le coût de génération de ces réactifs reste très élevé. Basée sur l'utilisation d'un anticorps primaire et d'un anticorps secondaire couplé à un fluorophore, l'immunofluorescence indirecte est une technique très utilisée en recherche fondamentale et dans le domaine du diagnostic. Ces réactifs sont en général des immunoglobulines conjuguées à des fluorophores de type FITC ou ses dérivés Alexa et DyLight.

Pour proposer une solution alternative aux anticorps secondaires obtenus à partir d'animaux immunisés et utilisables en immunofluorescence indirecte, des scFv

dirigés contre la région Fc des immunoglobulines de lapin ont été sélectionnés à partir de la banque de fragments d'anticorps disponible au laboratoire. Les détails de la sélection de scFv dirigés contre la région Fc d'IgG de lapin sont présentés dans un manuscrit en préparation. Brièvement, trois tours de sélection par phage-display ont été effectués, et l'ensemble des fragments d'anticorps du dernier tour ont été clonés en fusion à la GST et l'eGFP dans un vecteur d'expression procaryote de type pET. Au lieu de caractériser chaque scFv individuellement, nous avons opté pour une approche polyclonale afin d'obtenir la meilleure sensibilité de détection possible. Ainsi, nous souhaitons exploiter un réactif polyclonal recombinant original : scFv-GST-eGFP. La fusion à la GST permet d'obtenir une molécule bivalente dont l'affinité apparente est améliorée par rapport au scFv seul (Desplancq et al., 2011). L'eGFP quant à elle permet au polypeptide recombinant d'être détecté par microscopie à fluorescence sans couplage chimique d'un fluorophore. De plus, il est possible de remplacer l'eGFP par une autre protéine fluorescente comme la mCherry afin de rendre le système modulable et adaptable à différentes longueurs d'onde d'excitation pour la détection. Un autre avantage de ces protéines de fusion de type scFv-GST-eGFP est qu'elles peuvent être purifiées en une étape sur une résine de Glutathion Sepharose. Dans ce cas, le rendement de production chez *E. coli* est de l'ordre du milligramme par litre de culture bactérienne.

Pour tester l'efficacité de ce réactif recombinant, nous avons incubé des bactéries *E. coli* avec un anticorps polyclonal de lapin anti-*E. coli*, puis avec un anticorps anti-immunoglobuline de lapin fluorescent ou le réactif scFv-GST-eGFP (Figure 28). La protéine de fusion est fonctionnelle puisqu'elle permet de détecter les bactéries par immunofluorescence. Cependant, la sensibilité de détection obtenue avec les IgG marquées commerciales (GAR Alexa488 à 1 µg/mL) est supérieure puisqu'il est nécessaire d'incuber le réactif scFv-GST-eGFP à une concentration de 10 µg/mL pour obtenir un signal comparable. Nous avons donc décidé d'appliquer notre méthode de maturation d'affinité au groupe de scFv formant le réactif scFv-GST-eGFP et d'essayer de voir s'il est possible d'augmenter la sensibilité de détection de ce test grâce à une amélioration de l'affinité.

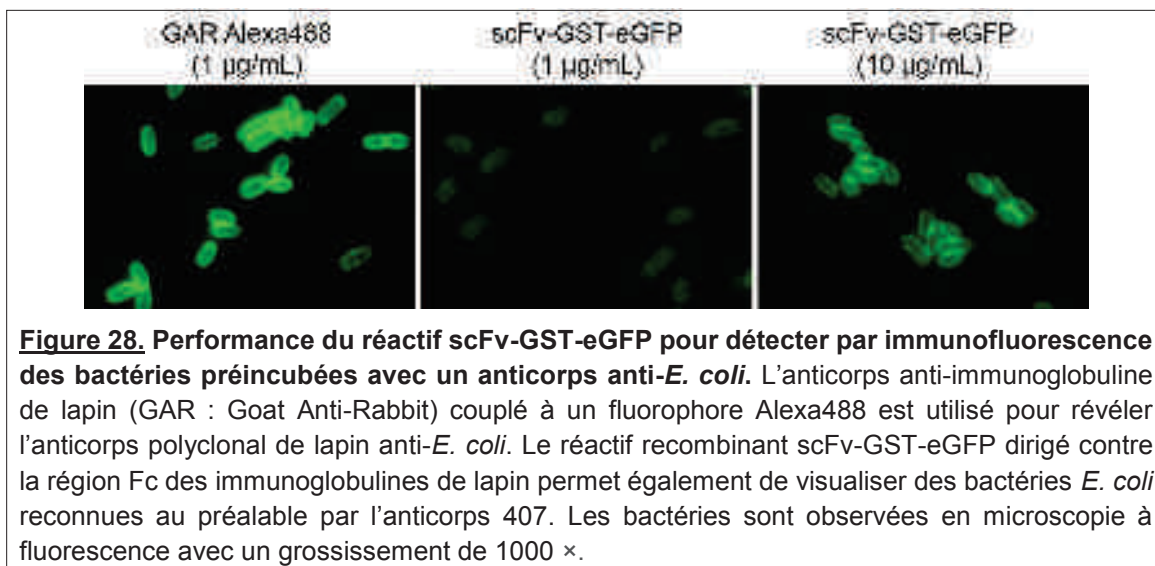
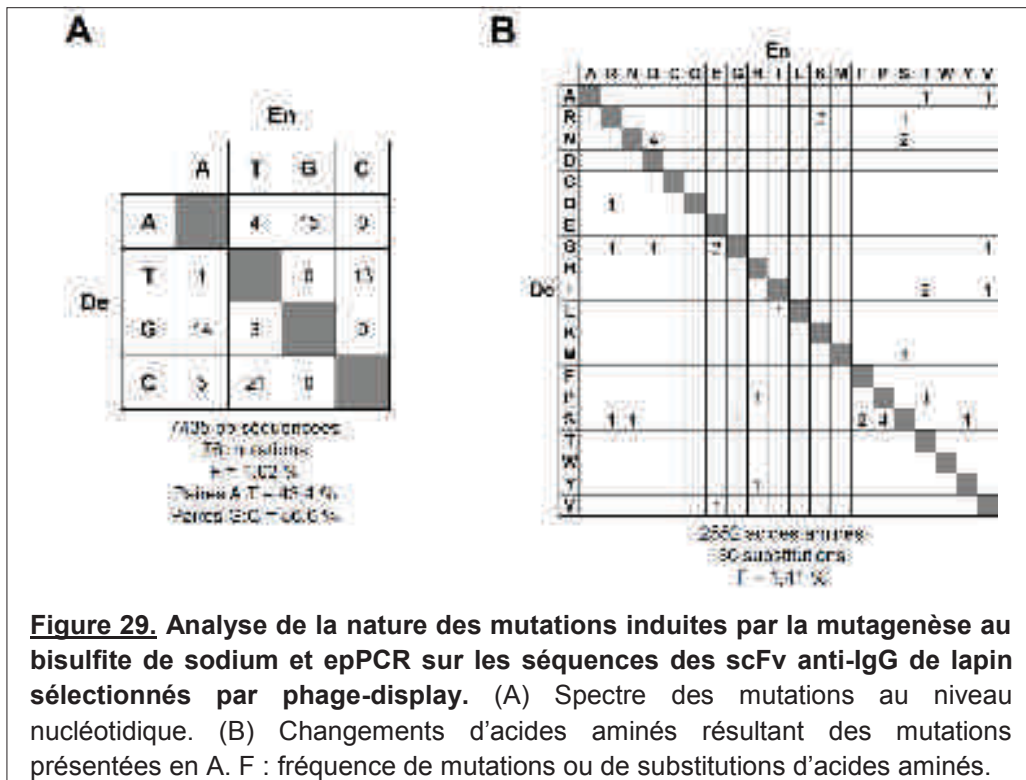


Figure 28. Performance du réactif scFv-GST-eGFP pour détecter par immunofluorescence des bactéries préincubées avec un anticorps anti-*E. coli*. L'anticorps anti-immunoglobuline de lapin (GAR : Goat Anti-Rabbit) couplé à un fluorophore Alexa488 est utilisé pour révéler l'anticorps polyclonal de lapin anti-*E. coli*. Le réactif recombinant scFv-GST-eGFP dirigé contre la région Fc des immunoglobulines de lapin permet également de visualiser des bactéries *E. coli* reconnues au préalable par l'anticorps 407. Les bactéries sont observées en microscopie à fluorescence avec un grossissement de 1000 ×.

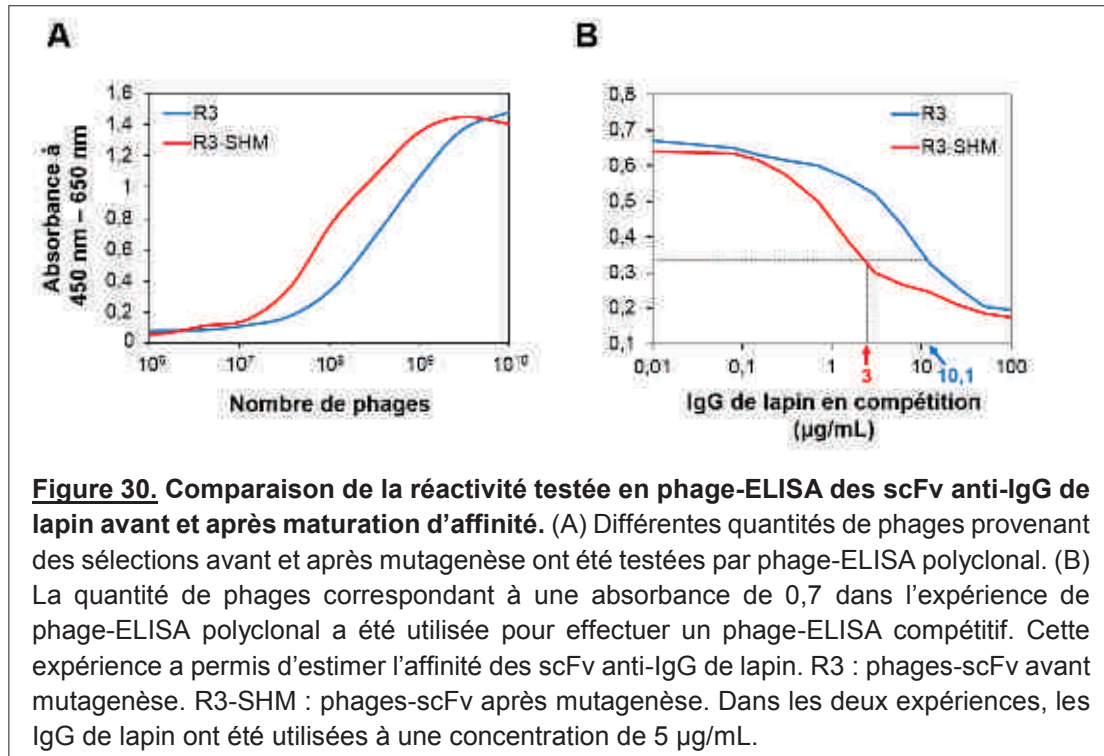
Les scFv polyclonaux anti-IgG de lapin présentés ci-dessus (nous les appellerons R3) ont été sélectionnés par phage-display à partir de la banque V1. Pour diversifier les séquences codantes des scFv R3, nous avons appliqué les mêmes conditions de mutagenèse que pour diversifier le scFv anti-PCNA P40 et ainsi construit une banque contenant environ 10^6 mutants de scFv anti-IgG de lapin. La fréquence de mutation de ces mutants est comparable à celle observée avec la banque de variants du scFv P40 (Figure 24). Enfin, trois tours de sélection par phage-display contre des immunoglobulines de lapin ont été réalisés. Les scFv isolés à partir de la banque de mutants de scFv anti-IgG de lapin ont été appelés R3-SHM.

Contrairement à l'approche entreprise avec le scFv anti-PCNA P40, nous n'avons pas caractérisé individuellement chaque mutant sélectionné. Le but était de vérifier s'il est possible d'améliorer le réactif scFv-GST-eGFP par maturation d'affinité du mélange des fragments d'anticorps qui le compose. Nous avons analysé par séquençage les séquences des scFv « R3-SHM » (Figure 29). 11 séquences mutées différentes ont été observées sur 30 séquences étudiées. La fréquence de mutations est de 1,02 % soit 6,9 erreurs par scFv au niveau nucléotidique. On note en moyenne 3,3 substitutions d'acides aminés par fragment d'anticorps situées principalement dans toutes les régions « framework » et dans la région CDR2 de la chaîne V_H .



La réactivité des phages-scFv R3 et R3-SHM a ensuite été testée en phage-ELISA, ce qui a permis d'évaluer le gain d'affinité après mutagenèse (Figure 30). Des immunoglobulines de lapin purifiées ont été adsorbées dans les puits d'une plaque de microtitration, puis incubées avec différentes quantités de phages-scFv révélés par un anticorps de souris anti-M13 couplé à l'HRP (HorseRadish Peroxidase). La quantité de phages nécessaire pour obtenir un signal comparable est inférieure pour les phages-scFv diversifiés que pour les phages-scFv originaux, ce qui suggère que la diversification par mutagenèse a permis d'améliorer la capacité de liaison des phages-scFv aux IgG de lapin immobilisées dans un puits (Figure 30A). Sur le graphique, la phase linéaire du signal correspond à la zone où les quantités de phages-scFv sont limitantes par rapport à l'antigène immobilisé (Figure 30A). En incubant une quantité limitante de phages-scFv R3 ou R3-SHM avec des concentrations croissantes d'IgG de lapin en solution, il est possible d'estimer l'affinité apparente des phages-scFv dans une expérience de phage-ELISA compétitif (Figure 30B). Dans ce cas, la concentration d'IgG de lapin nécessaire pour obtenir une diminution de 50 % du signal de liaison des phages-scFv à l'antigène immobilisé peut être considérée comme la constante d'affinité apparente. Cette valeur calculée des phages-scFv non diversifiés est de 67 nM (concentration molaire équivalente à 10,1 µg/mL). Celle obtenue avec les phages-scFv sélectionnés après mutagenèse est de 20 nM (concentration molaire équivalente

à 3 µg/mL). Ceci montre que la diversification des séquences des scFv a permis d'améliorer d'environ 3,3 fois leur affinité apparente pour les immunoglobulines de lapin en utilisant le phage-ELISA comme test.



Parallèlement à la maturation d'affinité du scFv anti-PCNA P40, les scFv anti-immunoglobuline de lapin ont également été améliorés grâce à la diversification au bisulfite de sodium et « error-prone » PCR, validant ainsi cette méthode de mutagenèse. Les résultats des expériences de phage-ELISA présentés ici sont préliminaires et au laboratoire, d'autres tests sont en cours pour confirmer si l'augmentation de l'affinité des scFv permet d'améliorer le réactif scFv-GST-eGFP pour visualiser des bactéries *E. coli* en immunofluorescence.

3.4. Discussion

La méthode de diversification des scFv a été validée en l'appliquant à deux modèles distincts. Concernant la banque de mutants du scFv P40, il aurait été intéressant de construire une banque plus large au départ (10^5 clones). En effet, nous avons constaté qu'un seul tour de sélection aurait été suffisant puisque (1) le R1 a présenté plus de signal que le R2 en phage-ELISA et (2) le clone P40M1 n'a pas été retrouvé dans la population du R2 analysée par séquençage. En revanche, trois tours de sélection ont été nécessaires pour observer une augmentation du signal en phage-ELISA à partir de la banque de variants des scFv anti-IgG de lapin qui contenait 10^6 clones (Stoessel et al., manuscrit en préparation). Ceci suggère que le nombre de clones d'une banque de mutants doit être le plus élevé possible afin de pouvoir sélectionner un grand nombre de mutants qui ont des affinités différentes pour la cible.

Indépendamment de la cible (PCNA ou IgG de lapin), tous les mutants qui ont été sélectionnés présentent des mutations aussi bien dans les régions FR que dans les CDR, comme lors de l'hypermutation somatique naturelle des anticorps (Teng & Papavasiliou, 2007). Nous n'avons pas observé de points chauds ou « hotspots » de mutagenèse sur les séquences de scFv mutés par le bisulfite de sodium et l'epPCR. Néanmoins, une très large proportion (82 %) des substitutions d'acides aminés observées sont situées dans la région charpente des scFv. Ceci n'est pas étonnant puisque de nombreuses études pointent l'importance de la région charpente dans la stabilité de la liaison d'un anticorps à son antigène et c'est pourquoi l'introduction de mutations dans les régions FR peut améliorer l'affinité d'un fragment d'anticorps pour sa cible (Wang et al., 2013 ; Fukunaga & Tsumoto, 2013). De plus, les mutants sélectionnés présentent moins de mutations que la fréquence d'erreurs de la banque de scFv mutés ($F = 1,43\%$), ce qui suggère qu'un trop grand nombre de mutations peut avoir un effet délétère sur l'expression des scFv chez *E. coli* et/ou affecte la capacité de liaison des fragments d'anticorps à leur cible. Pourtant, il a été démontré qu'une fréquence de mutations élevée permettait d'obtenir des scFv avec un gain d'affinité plus conséquent qu'avec une faible fréquence de mutations (Daugherty et al., 2000). Ceci souligne à nouveau l'importance de la taille de la banque de scFv utilisée pour la sélection puisque si la fréquence de mutations est élevée, le nombre de mutants avec une perte de fonction sera également considérable, d'où l'intérêt d'avoir la banque la plus large possible.

4. Vectorisation d'anticorps monoclonaux pour l'immunociblage analytique et fonctionnel de protéines intracellulaires dans les cellules cancéreuses vivantes

En sus du développement du système de mutagenèse imaginé pour améliorer les scFv ciblant PCNA, nous avons mis en place au laboratoire un programme de génération d'anticorps monoclonaux. Les avantages principaux de ces molécules sur les fragments d'anticorps sont principalement leur affinité pour leur cible et leur bivalence. Nous avons décidé de dérisquer le projet de sélection de scFv anti-PCNA en générant en parallèle des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre PCNA. Comme les anticorps monoclonaux ne peuvent pas être exprimés dans les cellules en tant qu'intracorps, il a fallu mettre au point un système de vectorisation efficace de ces molécules dans le compartiment intracellulaire pour pouvoir bénéficier des avantages des IgG obtenues après immunisation par rapport aux scFv contenus dans la banque naïve à disposition.

4.1. Introduction

Au laboratoire, il avait été montré qu'il est possible de vectoriser dans le cytoplasme de cellules transformées par le virus HPV16 un anticorps dirigé contre l'oncoprotéine E6 à l'aide de lipides cationiques (Courtête et al., 2007). En recherchant un système qui ne soit pas anticorps-dépendant comme les lipides, nous avons utilisé un appareil d'électroporation de matériel génétique et adapté les conditions de son utilisation à la transduction d'anticorps purifiés. La méthode ainsi mise au point a une efficacité maximale puisque 100 % des cellules traitées sont transduites avec 98 % de survie cellulaire après traitement. De plus, les anticorps sont actifs après transduction : malgré leur taille qui les empêche de diffuser au noyau, ils sont capables de cibler des antigènes nucléaires lorsque l'épitope reconnu est accessible au cours de la néo-synthèse dans le cytoplasme (mécanisme de co-transport de type « piggy-back »). Ainsi, la vectorisation d'un anticorps anti-ADN polymérase α bloquant entraîne l'arrêt de la division cellulaire et la mort par apoptose.

Nous avons ensuite appliqué cette technique à l'immunociblage de PCNA dans les cellules vivantes. Les conditions d'électroporation d'anticorps monoclonaux de souris dans les cellules en culture et l'application de cette technologie au ciblage de PCNA sont présentées dans l'article n°3.

4.2. Article n°3

Targeting endogenous nuclear antigens by electrotransfer of monoclonal antibodies in living cells.

Guillaume Freund^a, Annie-Paule Sibler^a, Dominique Desplancq^a, Mustapha Oulad-Abdelghani^b, Marc Vigneron^a, Julian Gannon^c, Marc H. Van Regenmortel^a, Etienne Weiss^a.

^a *Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, UMR 7242, CNRS/Université de Strasbourg, boulevard Sébastien Brant, Illkirch, France.*

^b *Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7104, CNRS/INSERM/Université de Strasbourg, rue Laurent Fries, Illkirch, France.*

^c *London Research Institute; Clare Hall Laboratories; South Mimms, UK.*

Targeting endogenous nuclear antigens by electrotransfer of monoclonal antibodies in living cells

Guillaume Freund,^{1†} Annie-Paule Sibler,^{1†} Dominique Desplancq,¹ Mustapha Oulad-Abdelghani,² Marc Vigneron,¹ Julian Gannon,³ Marc H. Van Regenmortel¹ and Etienne Weiss^{1,*}

¹Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg; UMR 7242; CNRS/Université de Strasbourg; Illkirch, France; ²Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire; UMR 7104; CNRS/INSERM/Université de Strasbourg; Illkirch, France; ³London Research Institute; Clare Hall Laboratories; South Mimms, UK

[†]These authors contributed equally to this work.

Keywords: monoclonal antibodies, intracellular delivery, electroporation, protein interference, intracellular imaging, living cells

Antibodies are valuable tools for functional studies *in vitro*, but their use in living cells remains challenging because they do not naturally cross the cell membrane. Here, we present a simple and highly efficient method for the intracytoplasmic delivery of any antibody into cultured cells. By following the fate of monoclonal antibodies that bind to nuclear antigens, it was possible to image endogenous targets and to show that inhibitory antibodies are able to induce cell growth suppression or cell death. Our electrotransfer system allowed the cancer cells we studied to be transduced without loss of viability and may have applications for a variety of intracellular immuno-interventions.

When antibodies specific for endogenous cellular proteins are introduced into intact mammalian cells, it becomes possible to study the functional activity of these proteins in their natural environment. Since antibodies are too large to diffuse passively into cells, several methods have been developed to introduce them into various cell types. Microneedle injection (microinjection) and osmotic lysis of pinocytotic vesicles were the first methods used to deliver antibodies in the cytoplasm of cultured cells.¹ Although both techniques showed that mature antibodies were stable and functionally active in the cytoplasm, the microinjection approach was too time-consuming when large numbers of cells had to be injected. Osmotic lysis of vesicles results in massive cell damage, requiring several days of incubation for cellular repair, which severely limits the readout assays when individual cells are observed microscopically. Proteins have also been introduced into eukaryotic cells using liposome-mediated delivery and fusion of red cell ghosts loaded with protein,² but this method was difficult to control. More recently, it was shown that a small subset of anti-DNA autoantibodies can penetrate into cells due to an unusual high frequency of basic residues in the CDRs, which favors their interaction with macromolecules at the surface of the cells.^{3,4} It is likely that these observations stimulated the development of synthetic vectors for delivering a larger fraction of antibodies into cells by protein transfection, *i.e.*, by so-called “profection,” an approach similar to that used for DNA and siRNA transfection. Such a direct delivery of proteins following *in vitro* association of protein and transfection reagent is

more challenging than DNA transfection since proteins vary in structure and charge much more than nucleic acids. Intracellular protein delivery by means of cationic polymers has also been reported,⁵ although most commercially-available protein transfection systems use lipid-based delivery agents.^{6,7} We previously tried to deliver neutralizing antibodies that recognize HPV16 E6 protein expressed in keratinocytes, using various cationic lipid formulations and found that only a few antibodies were able to interact with cationic lipids and could be successfully delivered to the cytoplasm.⁸ Depending on the formulation, only up to 30% of treated cells were positive, indicating that this approach was not sufficiently robust to allow antibody-mediated intracellular targeting.

An alternative delivery technique is electroporation, which utilizes a brief electric pulse of high field strength to create transient pores in the cell membrane. This technique has been used successfully for many years to introduce DNA and RNA in bacterial and yeast cells, but is rarely used for transfecting animal cells because of the very large number of cells that must be treated to recover enough viable cells. Although a few groups succeeded in delivering antibodies into mammalian cells by electroporation,^{9–11} the method has not been widely used for the intracellular transfer of proteins, possibly because there is no convenient way to distinguish viable from damaged cells after incorporation of the protein of interest.

There recently has been renewed interest in the electroporation of nucleic acids for delivering genes to mammalian cells that are

*Correspondence to: Etienne Weiss; Email: eweiss@unistra.fr
Submitted: 04/08/13; Revised: 05/17/13; Accepted: 05/18/13
<http://dx.doi.org/10.4161/mabs.25084>

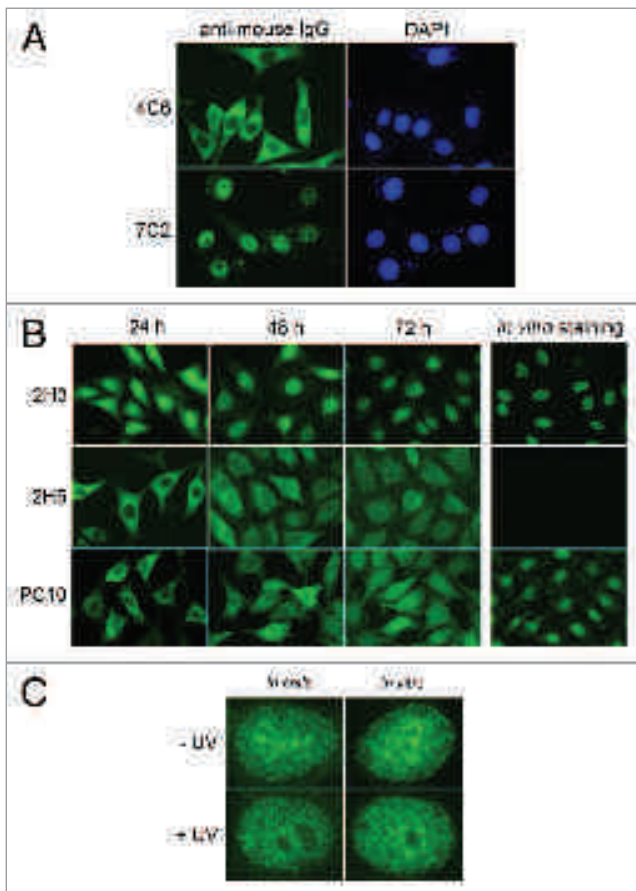


Figure 1. Intracellular localization of delivered antibodies as probed by immunofluorescence microscopy. **(A)** Micrographs show typical HeLa cells transfected with either 4C6 or 7C2 antibody. The delivered antibodies were revealed with Alexa 448-labeled goat anti-mouse immunoglobulins 24 h post-transduction. Both antibodies are IgG1 κ . Magnification: 630 \times . **(B)** The pictures correspond to typical fields of HeLa cells transfected with the indicated antibodies at 24, 48 and 72 h post-treatment. The delivered antibodies were revealed as in **(A)**. The panels on the right correspond to the staining by indirect immunofluorescence of HeLa cells incubated with the relevant antibody (in vitro staining). Magnification: 630 \times . **(C)** The pictures show typical nuclei of HeLa cells either transfected and fixed at 48 h post-treatment (in cells) or stained by indirect immunofluorescence (in vitro) with 2H3 antibody without (– UV) or with (+ UV) UVC irradiation 8 h before analysis. Magnification: 100 \times .

difficult to transfect with conventional synthetic vectors. Several companies currently propose improved devices for the electroporation of nucleic acids that achieve a high cell viability in a wide range of cell lines. To deliver antibodies into cells by electroporation, we used a device for gene transfection that does not involve classical cuvettes (Neon[®], Life Technologies) and adapted it to the electrotransfer of monoclonal antibodies (mAbs) to cultured cells. We show here that this method of intracytoplasmic delivery of antibodies retains a high degree of cell viability and is extremely effective for targeting endogenous nuclear proteins.

Initial experiments were done with two mAbs, 4C6 and 7C2, that bind to the HPV16 E6 oncoprotein⁸ and the C-terminal

domain of the RNA polymerase II largest subunit¹² (RNA Pol II), respectively. By varying several parameters of the electroporation protocol, we obtained optimal conditions for delivering the two mAbs to HeLa cells (Table S1). Their presence in the cells was revealed using a fluorescent anti-mouse antibody, 24 h post-treatment. As shown in Figure 1A, the 4C6 antibody was detected in the cell cytoplasm, indicating that the nuclear membrane had not been permeabilized by the electric shock, whereas the 7C2 antibody was found almost exclusively in the nucleus. This result suggests that the 7C2 antibody binds to de novo synthesized RNA Pol II in the cytoplasm and is translocated into the nucleus in a piggyback fashion with the nuclear enzyme.¹³ The same result was obtained with the 7G5 mAb that recognizes another epitope on the same RNA Pol II subunit (Fig. S1). These findings are in agreement with previous observations obtained after microinjection of the 3E9 antibody, which binds to native β -importin.¹⁴ Since HeLa cells do not contain HPV E6 protein, the 4C6 mAb remained in the cytoplasmic compartment, as expected. It should be noted that all treated cells were positive (compare DAPI and anti-mouse IgG staining in Fig. 1A) and that almost no floating dead cells were detectable 24 h post-treatment.

We recently isolated new mAbs against the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a nuclear protein involved in DNA replication and genome integrity surveillance. To demonstrate that these mAbs are useful for detecting endogenous nuclear proteins in living cells, we analyzed the behavior of two mAbs, 2H3 and 2H5, that bind in vitro exclusively to native and denatured PCNA, respectively (Fig. S2). Both antibodies, as well as the anti-PCNA reference mAb PC10,¹⁵ were transfected in HeLa cells and their presence was detected at different times post-treatment. After three days incubation, the 2H3 mAb exhibited a nuclear staining pattern indistinguishable from that observed when it was used as primary antibody to immunostain fixed cells in vitro (Fig. 1B). Since all 2H3 antibodies were located in the nucleus, this suggests that the corresponding PCNA epitope is accessible in the cytoplasm and that the antibodies, which are diluted after each cell division, remain fully active after several days of incubation. By contrast, the transfected 2H5 mAb was present essentially in the cytoplasmic compartment after 24 h and subsequently spread within the entire cell with no specific nuclear enrichment. Although mAb PC10 easily revealed the PCNA protein both by western blot (Fig. S2) and by conventional in vitro immunostaining (Fig. 1B), this antibody did not co-localize with PCNA in living cells after transduction, even after three days of incubation. This suggests that the PCNA epitope recognized by mAb PC10, which has been mapped precisely,¹⁶ is not accessible in the cellular context, in contrast to the one recognized by mAb 2H3. These results demonstrate that our procedure allowed antibodies to bind to the accessible epitopes of nuclear proteins in living cells. We also established that mAb 2H3 was successfully electrotransferred and specifically stained PCNA in other cell lines such as CaSki, H1299, MEL501 and U2OS (Fig. S3). We also investigated how UV irradiation of treated cells affected the nuclear pattern of PCNA revealed by antibodies. Since UV irradiation blocks cellular proliferation,¹⁷ the typical S phase

PCNA pattern obtained with transduced 2H3 disappeared while the nucleoli became clearly visible in nearly all UV-treated HeLa cells (Fig. S4). This UV-induced change was observed both by staining in the cells (after transduction) and after conventional immunostaining *in vitro* (Fig. 1C). The PCNA contained within replication/repair foci could therefore be precisely localized under physiological conditions using this mAb delivery system.

PCNA detection was facilitated by the fact that it is an abundant nuclear protein¹⁸ ($\sim 5 \times 10^5$ molecules per cell). To determine whether this “*in cellulo*” staining protocol could also be applied for targeting nuclear proteins that are less abundant, we decreased the amount of delivered antibodies and measured the amount of antibody remaining in the cells as a function of the amount added in the transduction mixture. Interestingly, the residual amount was proportional to the amount of antibody added (Fig. S5). We estimate that about 10^5 antibody molecules were present per cell when using 1 μg of mAb in the reaction mixture. The same result was obtained when we tested three different antibody preparations, indicating the general applicability of our protocol. When we used 2 μg of the 2H3 antibody (Fig. 1B), we found that nearly all molecules were translocated into the nucleus, in agreement with the conclusion that the PCNA in this case was in excess. It seems likely, therefore, that our protocol could be applied to the specific imaging of other nuclear proteins simply by adjusting the antibody concentration in the delivery mixture. Since 10^5 cells are able to integrate about 10^{10} antibody molecules, this represents a very low percentage of the antibody added in the reaction mixture ($\sim 4 \times 10^{12}$ molecules/ μg). When we tried to improve the delivery efficiency by increasing the number of electric pulses, we found that cell viability was severely impaired.

We used this new transfer method to assess the activity of several inhibitory mAbs delivered to living cells such as CaSki cells, which express the HPV16 E6 oncogene that mediates the degradation of the p53 protein. We have previously shown that the 4C6 mAb, when delivered in CaSki cells with cationic lipids, is able to inhibit the E6-mediated p53 degradation that contributes to cell growth arrest.⁸ Following electrotransfer of 4C6 in CaSki cells, we found that p53 levels, which were undetectable in untreated cells, were restored in all cells to the level observed after anti-E6 siRNA treatment (Fig. 2A). Since E6 is preferentially localized in the nucleus of cervical carcinoma cells,¹⁹ we chemically modified the 4C6 antibody to direct it to the nucleus after it entered the cell. This was done by conjugating a peptide corresponding to the SV40 nuclear localization signal (NLS) to the 4C6 mAb (4C6-NLS; Fig. S6). The 4C6-NLS conjugate accumulated exclusively in the nuclei and 48 h post-transduction, the p53 levels were slightly raised compared with what was observed with unmodified 4C6 (Fig. 2A), indicating that the antibodies that moved to the nucleus were still active. The biological effect of this procedure was confirmed by clonogenic assays (Fig. S7), indicating that it is possible to target a nuclear antigen.

To examine if the same effect occurred with other well-characterized inhibitory antibodies, we tested two validated mAbs, 4E9 and SJK132–20 (SJK132), that specifically bind to DNA polymerase α , a nuclear enzyme essential for the replication fork progression in mammalian cells. Both antibodies

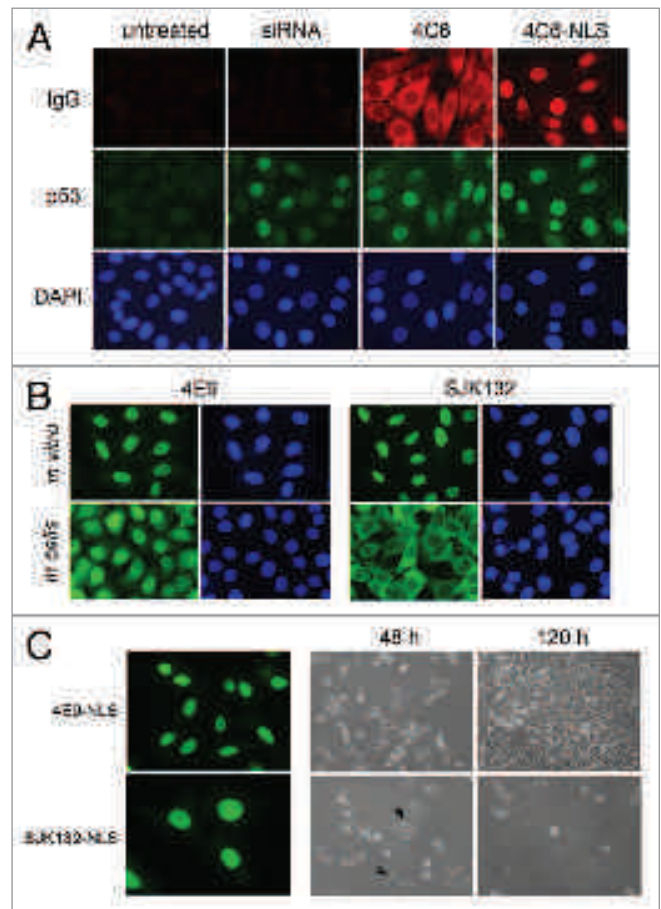


Figure 2. Biological effect of delivered anti-E6 and anti-DNA polymerase α antibodies. (A) Micrographs of typical CaSki cells following transfection with anti-E6 siRNA or transduction with 4C6 antibody. At 48 h post-treatment, the 4C6 antibodies were revealed with Alexa 568-labeled goat anti-mouse immunoglobulins, in parallel with p53 as indicated in the method section. Magnification: 630 \times . (B) Micrographs of HeLa cells either stained by indirect immunofluorescence (*in vitro*) or after transduction at 48 h (*in cells*) with the indicated antibody. The monoclonal antibodies were detected as indicated in the legend of Figure 1. Magnification: 630 \times . (C) The panels on the left represent typical HeLa cells after transduction of 4E9-NLS and SJK123-NLS conjugates and stained with Alexa 488-labeled goat anti-mouse immunoglobulins as in (B) (*in cells*). Magnification: 630 \times . The micrographs on the right represent typical fields of cells after 2 or 5 d post-treatment with each conjugate observed under the optical microscope. Typical enlarged nuclei are ticked with black arrows. Magnification: 200 \times .

allow the enzyme to be detected in the nucleus of HeLa cells (Fig. 2B; *in vitro*). Although both antibodies are able to immunoprecipitate DNA polymerase α from whole-cell extracts (E. Weiss, unpublished observation), only SJK132 was found to block DNA synthesis in an *in vitro* replication reaction assay.²⁰ After transducing both antibodies into HeLa cells, we found that after two days, mAb 4E9 was mainly localized in the nucleus whereas mAb SJK132 remained in the cytoplasm (Fig. 2B, *in cells*). In view of what we observed earlier with mAb PC10, we hypothesized that the epitope recognized by SJK132 in *de novo* synthesized DNA polymerase α might be masked in

the cytoplasm and becomes accessible only after the molecule reaches the nucleus. This possibility was tested by preparing NLS peptide-antibody conjugates (4E9-NLS and SJK132-NLS) to bring them closer to the polymerase antigen. At 24 h post-transduction, both 4E9-NLS and SJK-NLS were exclusively present in the nuclei of treated cells (Fig. 2C). However, whereas the cells transduced with 4E9-NLS were growing at the same constant rate as those containing 4E9 or SJK132, the cells treated with SJK132-NLS stopped growing shortly after incubation started. This was easily observed using an optical microscope. After 48 h, the average size of the nuclei of SJK132-NLS-treated cells had increased considerably compared with the nuclei of 4E9-NLS-treated cells (from 16 \pm 2 μ m to 25 \pm 3 μ m; Fig. 2C). This is similar to what is observed when hydroxyurea, a potent and selective inhibitor of replication, is added to cell culture medium.²¹ After prolonged incubation, nearly all SJK132-NLS-treated cells rounded up (Fig. S8) and became detached from the plastic. After four days incubation, there were almost no cells left on the dishes whereas cells transduced in parallel with 4E9-NLS were nearly confluent (Fig. 2C). Similar results were obtained with U2OS cells, which are p53-positive tumor cells (not shown). These findings show that our protocol makes it possible to target nuclear antigens with antibodies and that this can lead to cell death by apoptosis, if the antibody interferes with an essential biological activity. Our results also suggest that the active region of DNA polymerase α is not accessible to the SJK132 antibody following its de novo synthesis in the cytoplasm.

The present study shows that mAbs can be efficiently transduced into living cancer cells using an electroporation device initially designed for nucleic acid transfection. Since our protocol was successful with all the cells we used and allows all treated cells to be transduced, irrespective of the amount (μ g range) of antibody that was added in the electroporation mixture, we were able in all cases to ascertain the intracellular fate of the delivered antibodies. This is a major advantage compared with methods that use synthetic vectors such as cationic lipids, which make it difficult to control endosomal escape after endocytosis, that are likely to limit efficient delivery. It also suggests that the delivered antibodies remain stable in the dividing cells and are not subjected to proteolysis or degradation that would be easily detectable. To date, we have tested 17 different antibodies and five different cell lines and have not observed any difference in the transduction efficiency, suggesting that the method may be applicable to many commercially-available antibodies. Furthermore, since chemically modified antibody molecules can also be electrotransferred, the method may be useful for validating targets either with neutralizing antibodies or with antibody-drug conjugates that could allow the specific intracellular delivery of small molecules. Another possible application is the imaging of sites of endogenous nuclear proteins that are accessible in living cells, using fluorophore-labeled antibodies. Since we have shown that antibodies that inhibit the activity of an antigen in vitro often possess the same functional activity in living cells, it is also likely that the same approach could be used as a functional screening

test for isolating neutralizing antibodies able to bind to intracellular targets of therapeutic interest.

Materials and Methods

Generation and purification of anti-PCNA monoclonal antibodies. BALB/c mice were immunized with purified human PCNA protein overexpressed in BL21 cells. After 3 injections of 0.1 mg protein/mouse mixed with poly I-poly C polymer, the spleen cells of the responding animals were fused with SP2/0-Ag14. Growing clones were screened by ELISA using microtiter plates coated with pure PCNA protein (0.5 μ g/well) and by cell staining using fixed HeLa cells. The positive cultures were cloned twice in soft agar. All antibodies were purified from either ascitic fluid or hybridoma supernatant on Protein G Sepharose (GE Healthcare). They were subsequently dialysed against PBS and concentrated with centrifugal filtration units (Merck Millipore) to obtain antibody samples of 2–5 μ g/mL.

Preparation of antibody-NLS peptide conjugates. Purified antibody (1 mg) in PBS was incubated with a 20-fold molar excess of sulfo-succinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC; Thermo Scientific) for 1 h at room temperature. Excess crosslinker was removed using a Zeba Desalt spin column (2 ml; Thermo Scientific). The antibodies recovered in the flow-through were mixed with a 5- to 15-fold molar excess of the NLS-encoding synthetic peptide (CAGPKKRRKVED) containing a cysteine residue at the N-terminal end. After incubation for 1 h at room temperature, the antibody-NLS peptide conjugates were purified on desalting columns as described above and stored at 4°C at a concentration of 2 mg/mL.

Cell culture and electroporation. The HeLa, CaSki, Mel501 and U2OS cell lines were grown according to ATCC guidelines and maintained in Dulbecco's modified Eagle's tissue culture medium (DMEM; Life Technologies) supplemented with L-glutamine (2 mM), gentamicin (50 μ g/ml) and 10% heat-inactivated fetal calf serum at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Fresh cells were thawed from frozen stocks after 12 passages. Transduction experiments with purified mAbs were performed according to the Neon^R transfection system protocol (Life Technologies). Typically, 10⁵ cells in R buffer (provided in the kit) were mixed with 2–5 μ g of antibody in a total volume of 12 μ l. The mixture was then transferred in a Neon^R pipette tip chamber (10 μ l) and subjected to electroporation in the system pipette station by applying the following optimized parameters: 1550 V, 10 ms and 3 pulses. The treated samples were deposited into 24-well plates containing sterile glass coverslips in 500 μ l pre-warmed culture medium without the antibiotic. After incubation for 24 h at 37°C, the culture medium was replaced with complete medium. Where indicated, the cells were irradiated with 20 J/m² UVC 8 h before harvesting. For the electroporation of siRNA (final concentration 50 nmol/L), settings were 1005 V, 35 ms and 2 pulses.

Immunofluorescence microscopy. The electroporated cells were fixed at the indicated time with 4% paraformaldehyde (w/v) for 30 min and washed twice with PBS. After permeabilization

with 0.2% Triton X100 for 5 min, they were incubated for 1 h with AlexaFluor 488 or 568 labeled-anti-mouse immunoglobulins (Molecular Probes, Eugene). Following several washes with PBS, the coverslips were mounted with 4',6'-diamino-2 phenylindole (DAPI) Fluoromount-G (SouthernBiotech). Staining of the p53 protein was done with rabbit antiserum as previously described.⁸ The cells were imaged with a Leica DM5500 microscope equipped with FITC and Cy3 filters. Images were collected with a 63× or a 100× objective and analyzed with Photoshop software.

Western blot analysis. For the quantification of the delivered antibodies, cells were electroporated in the presence of varying amounts (0.5 to 5 μg) of antibody and incubated for 24 h in 24-well plates as above. Following recovery by trypsinization and counting, the cells were lysed in RIPA buffer and soluble extracts corresponding to 5×10^5 cells were analyzed by western blotting, in parallel with calibrated antibody preparations. The heavy chain content of these extracts was finally quantitated after incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse globulins and ECL reagent (GE Healthcare) and analysis with the ImageQuantLAS 4000 imager (GE Healthcare). The analysis of the binding activity of the anti-PCNA antibodies was essentially performed as above, except that extracts from untreated cells were used. The actin polypeptide was revealed with rabbit polyclonal antibody A206 (Sigma-Aldrich).

References

- Chakrabarti R, Wylie DE, Schuster SM. Transfer of monoclonal antibodies into mammalian cells by electroporation. *J Biol Chem* 1989; 264:15494-500; PMID:2768274
- Ozawa K, Hosoi T, Tsao CJ, Urabe A, Uchida T, Takaku F. Microinjection of macromolecules into leukemic cells by cell fusion technique: search for intracellular growth-suppressive factors. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 130:257-63; PMID:4040753; [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(85\)90410-3](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(85)90410-3)
- Avrameas A, Ternynck T, Nato F, Buttin G, Avrameas S. Polyreactive anti-DNA monoclonal antibodies and a derived peptide as vectors for the intracytoplasmic and intranuclear translocation of macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:5601-6; PMID:9576929; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.10.5601>
- Song YC, Sun GH, Lee TP, Huang JC, Yu CL, Chen CH, et al. Arginines in the CDR of anti-dsDNA autoantibodies facilitate cell internalization via electrostatic interactions. *Eur J Immunol* 2008; 38:3178-90; PMID:18991292; <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200838678>
- Futami M, Watanabe Y, Asama T, Murata H, Tada H, Kosaka M, et al. Uniformly cationized protein efficiently reaches the cytosol of mammalian cells. *Bioconjug Chem* 2012; 23:2025-31; PMID:22989361; <http://dx.doi.org/10.1021/bc300030d>
- Dalkara D, Zuber G, Behr JP. Intracytoplasmic delivery of anionic proteins. *Mol Ther* 2004; 9:964-9; PMID:15194063; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.03.007>
- Marschall AL, Frenzel A, Schirrmann T, Schüngel M, Dübel S. Targeting antibodies to the cytoplasm. *MAbs* 2011; 3:3-16; PMID:21099369; <http://dx.doi.org/10.4161/mabs.3.1.14110>
- Courtéte J, Sibling AP, Zeder-Lutz G, Dalkara D, Oulad-Abdelghani M, Zuber G, et al. Suppression of cervical carcinoma cell growth by intracytoplasmic codelivery of anti-oncoprotein E6 antibody and small interfering RNA. *Mol Cancer Ther* 2007; 6:1728-35; PMID:17575104; <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0808>
- Berglund DL, Starkey JR. Introduction of antibody into viable cells using electroporation. *Cytometry* 1991; 12:64-7; PMID:1999124; <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.990120109>
- Lukas J, Bartek J, Strauss M. Efficient transfer of antibodies into mammalian cells by electroporation. *J Immunol Methods* 1994; 170:255-9; PMID:8158003; [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90400-6](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(94)90400-6)
- Baron S, Poast J, Rizzo D, McFarland E, Kieff E. Electroporation of antibodies, DNA, and other macromolecules into cells: a highly efficient method. *J Immunol Methods* 2000; 242:115-26; PMID:10986394; [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00242-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00242-8)
- Puvion-Dutilleul F, Besse S, Diaz JJ, Kindbeiter K, Vigneron M, Warren SL, et al. Identification of transcription factories in nuclei of HeLa cells transiently expressing the Us11 gene of herpes simplex virus type 1. *Gene Expr* 1997; 6:315-32; PMID:9368102
- Thompson ME. BRCA1 16 years later: nuclear import and export processes. *FEBS J* 2010; 277:3072-8; PMID:20608972; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07733.x>
- Marg A, Meyer T, Vigneron M, Vinkemeier U. Microinjected antibodies interfere with protein nucleocytoplasmic shuttling by distinct molecular mechanisms. *Cytometry A* 2008; 73A:1128-40; PMID:18773464; <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20635>
- Waseem NH, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 1990; 96:121-9; PMID:1695635
- Roos G, Jiang Y, Landberg G, Nielsen NH, Zhang P, Lee MY. Determination of the epitope of an inhibitory antibody to proliferating cell nuclear antigen. *Exp Cell Res* 1996; 226:208-13; PMID:8660957; <http://dx.doi.org/10.1006/excr.1996.0220>
- Jiang K, Pereira E, Maxfield M, Russell B, Goudelock DM, Sanchez Y. Regulation of Chk1 includes chromatin association and 14-3-3 binding following phosphorylation on Ser-345. *J Biol Chem* 2003; 278:25207-17; PMID:12676962; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M300070200>
- Naryzhny SN. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:3789-808; PMID:18726183; <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-8305-x>
- Masson M, Hindelang C, Sibling AP, Schwalbach G, Travé G, Weiss E. Preferential nuclear localization of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein in cervical carcinoma cells. *J Gen Virol* 2003; 84:2099-104; PMID:12867640; <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.18961-0>
- Tanaka S, Hu SZ, Wang TS, Korn D. Preparation and preliminary characterization of monoclonal antibodies against human DNA polymerase alpha. *J Biol Chem* 1982; 257:8386-90; PMID:7085672
- Rybaczek D, Kowalewicz-Kulbat M. Premature chromosome condensation induced by caffeine, 2-aminopurine, staurosporine and sodium metavanadate in S-phase arrested HeLa cells is associated with a decrease in Chk1 phosphorylation, formation of phospho-H2AX and minor cytoskeletal rearrangements. *Histochem Cell Biol* 2011; 135:263-80; PMID:21347609; <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-011-0793-3>

Clonogenic survival assay. Clonogenic survival assays were done essentially as described.⁸ Briefly, CaSki cells were plated in triplicate in 12-well plates (10^5 cells/well) and, after 24 h, treated with siRNA (25 pmol) or antibody (3 μg) as described above. After 48 h of incubation at 37°C, the cells were harvested by trypsinization and 1/30 of the pooled cell suspension was replated in triplicate in 60 mm-diameter tissue culture dishes. After 6–7 d of incubation in complete medium, the growing cells were counted manually.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank J.L. Galzi and B. Chatton for constant encouragement, L. Tora for stimulating discussions and advice, A. Stoessel for excellent technical assistance, H. de Rocquigny for providing the synthetic NLS peptide. This work was supported by the Ligue contre le Cancer (Comités de la Marne et du Bas-Rhin). GF was supported by a fellowship of the Direction Générale de l'Armement (DGA) and the Conseil Régional d'Alsace.

Supplemental Materials

Supplemental materials may be downloaded here:

www.landesbioscience.com/journals/mabs/article/25084



Supplemental Material to:

**Guillaume Freund, Annie-Paule Sibler,
Dominique Desplancq, Mustapha Oulad-
Abdelghani, Marc Vigneron, Julian Gannon, Marc
H. Van Regenmortel and Etienne Weiss**

**Targeting endogenous nuclear antigens by electrotransfer
of monoclonal antibodies in living cells**

mAbs 2013; 5(4)

<http://dx.doi.org/10.4161/mabs.25084>

<http://www.landesbioscience.com/journals/mabs/article/25084/>

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table S1: Efficiency of the delivery of 4C6 and 7C2 antibodies to HeLa cells as a function of the electro-transfer parameters used. The parameters indicated in bold correspond to those used throughout the study.

Voltage (V)	Duration (in ms)	Number of pulses	Efficiency ^a	Viability ^b (%)
1005	10	3	-	100
1005	20	2	-	100
1005	35	2	+	90
1200	10	3	-	80
1200	20	2	+	80
1200	35	2	++	50
1400	10	3	+	80
1400	20	2	++	40
1400	35	2	++	10
1500	10	3	++	100
1550	10	3	+++	100
1600	10	3	+++	70
1600	20	2	+++	10
1600	35	1	+++	10

a: intensity of fluorescence expressed as the exposure time needed for distinct microscopic visualization of the intracytoplasmic antibodies after staining of the treated cells with Alexa 488-labelled goat anti-mouse immunoglobulins (- , no detection; +, 5 sec; ++, 2 sec; +++, 0.5 sec).

b: number of cells fixed to the plastic after 24 hr of incubation at 37°C divided by the number of cells in the electroporation mixture. Counting was performed in the presence of Trypan blue.

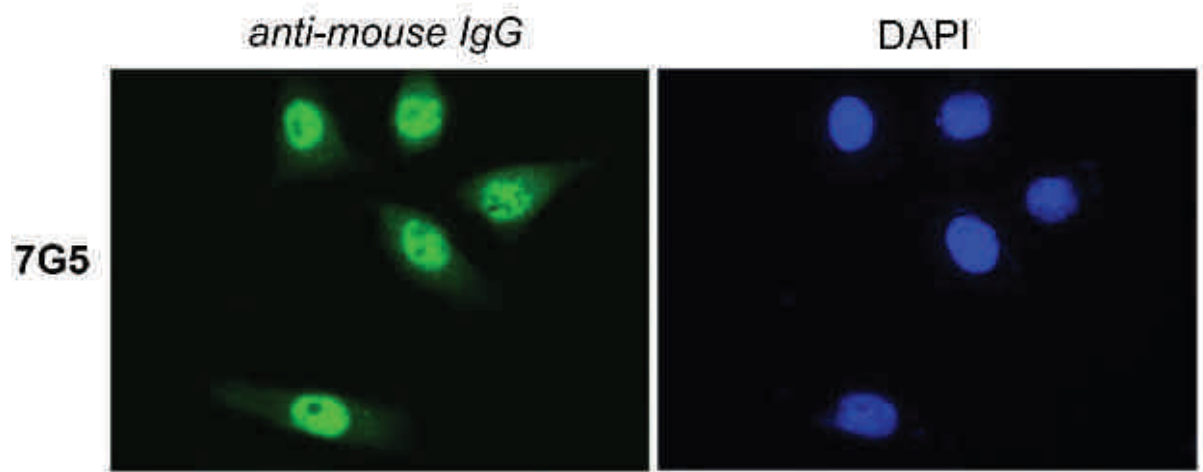


Figure S1: Localization of 7G5 antibody in HeLa cells 24 h post-transduction. The delivered antibodies were revealed with Alexa 488-labelled goat anti-mouse immunoglobulins (anti-mouse IgG) and the nuclei were counterstained with DAPI (DAPI).

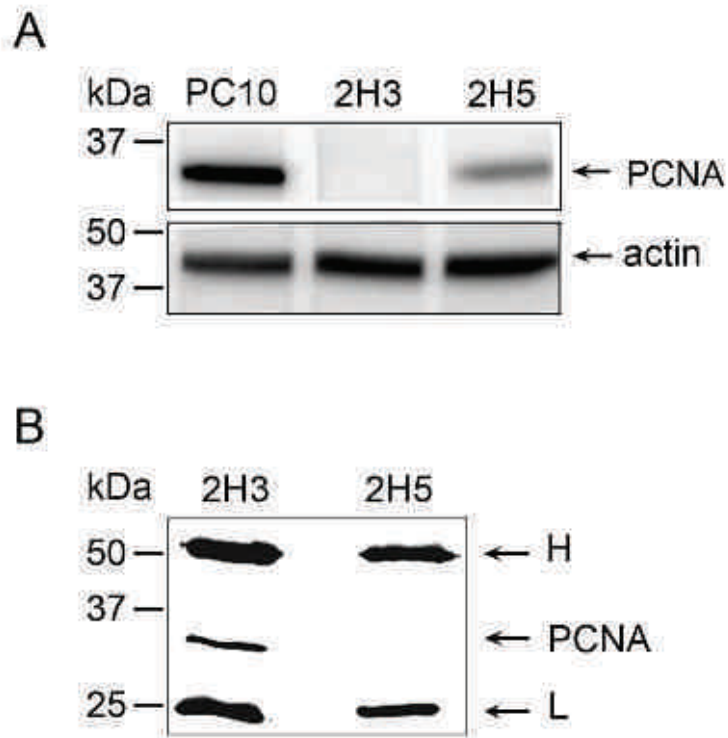


Figure S2: Comparison of the *in vitro* binding activities of the anti-PCNA antibodies. A. The upper panel shows the analysis by Western blotting of the binding of PC10, 2H3 and 2H5 antibodies following incubation with whole-cell extracts of HeLa cells (10 μ g) deposited on a SDS-gel. Anti-actin antibodies were used as loading control. B. The lower panel corresponds to a typical immunoprecipitation experiment of PCNA from whole-cell extracts (75 μ g) as in A using both 2H3 and 2H5 antibodies. H, heavy chain; L, light chain.

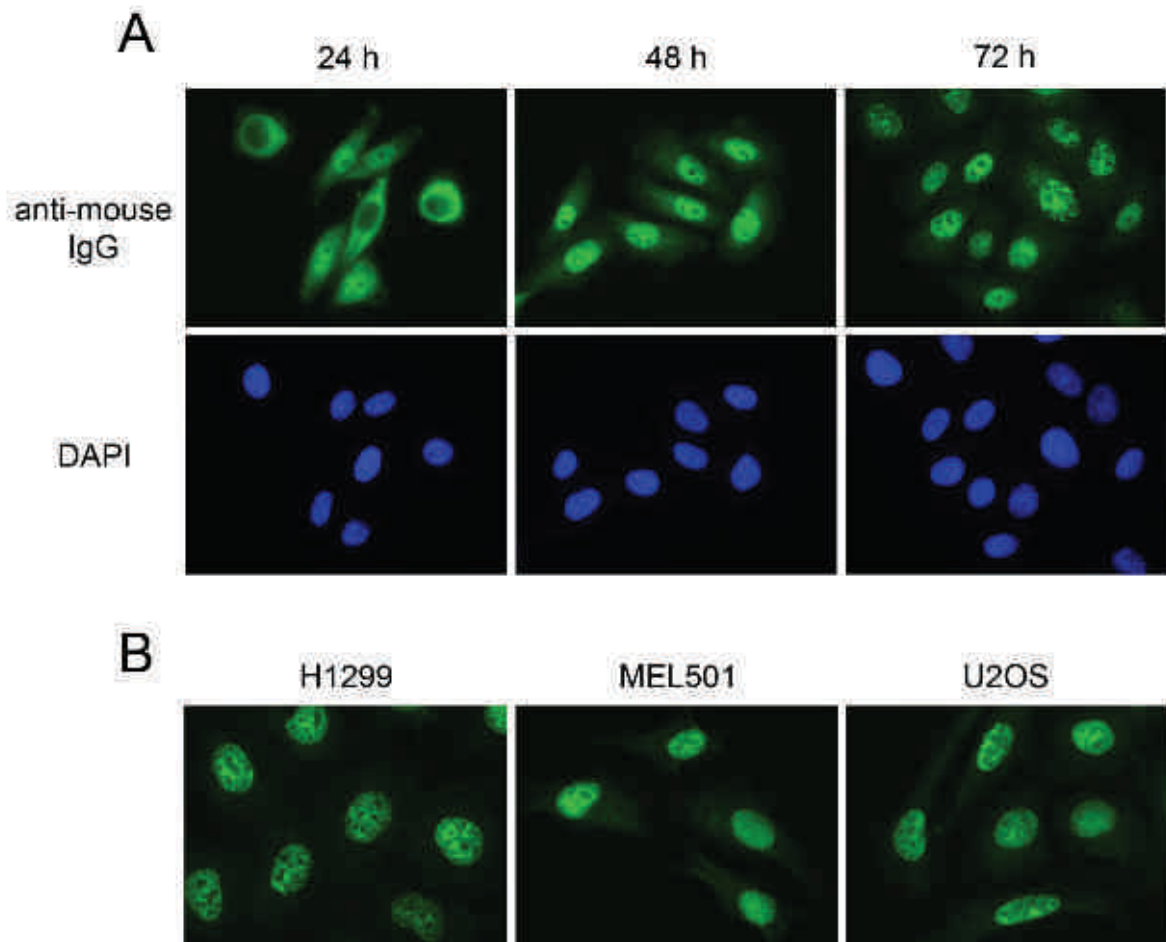


Figure S3: Localization of transduced 2H3 antibody in carcinoma cells. A. CaSki cells were subjected to electroporation in the presence of 2H3 antibody. The delivered antibodies were revealed with Alexa 488-labelled goat anti-mouse immunoglobulins (anti-mouse IgG) at 24, 48 and 72 h post-treatment. B. The same experiment was performed with H1299, Mel501 and U2OS cells. The pictures show typical fields of cells at 72 h post-treatment after revelation of the delivered 2H3 antibodies as in A.

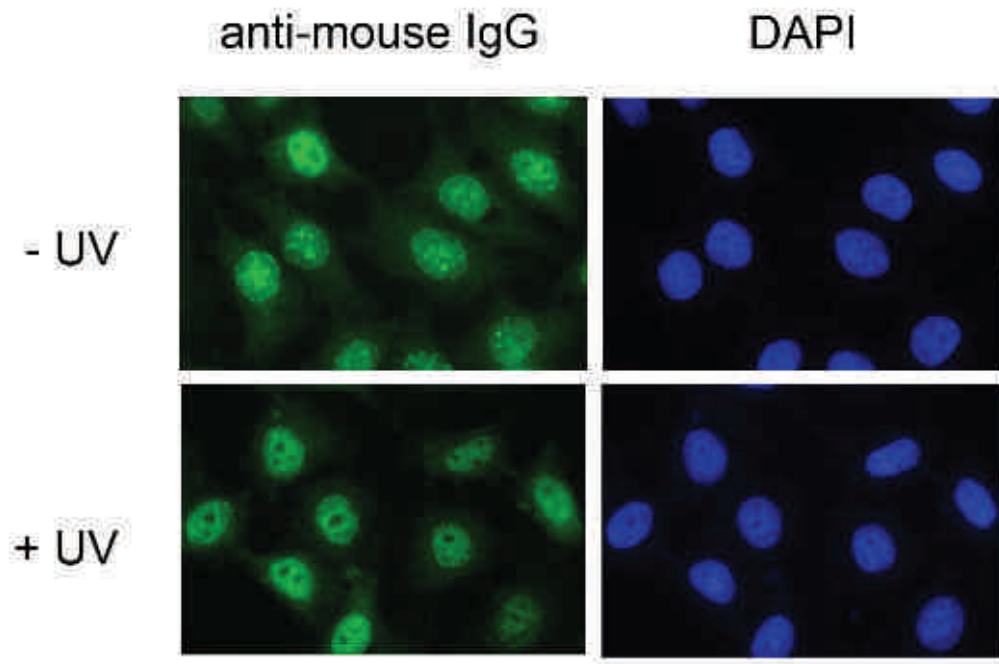


Figure S4: Nuclear distribution of 2H3 antibody following UV irradiation. HeLa cells were transduced with 2H3 antibody as indicated in the legend of Figure 1B. At 40 h post-treatment, cells were subjected to UV irradiation (see Methods section) and further incubated for 8 h. The pictures correspond to micrographs of cells with (+ UV) or without (- UV) irradiation after fixation and incubation with 488-labelled goat anti-mouse immunoglobulins (anti-mouse IgG). Counterstaining with DAPI is also shown.

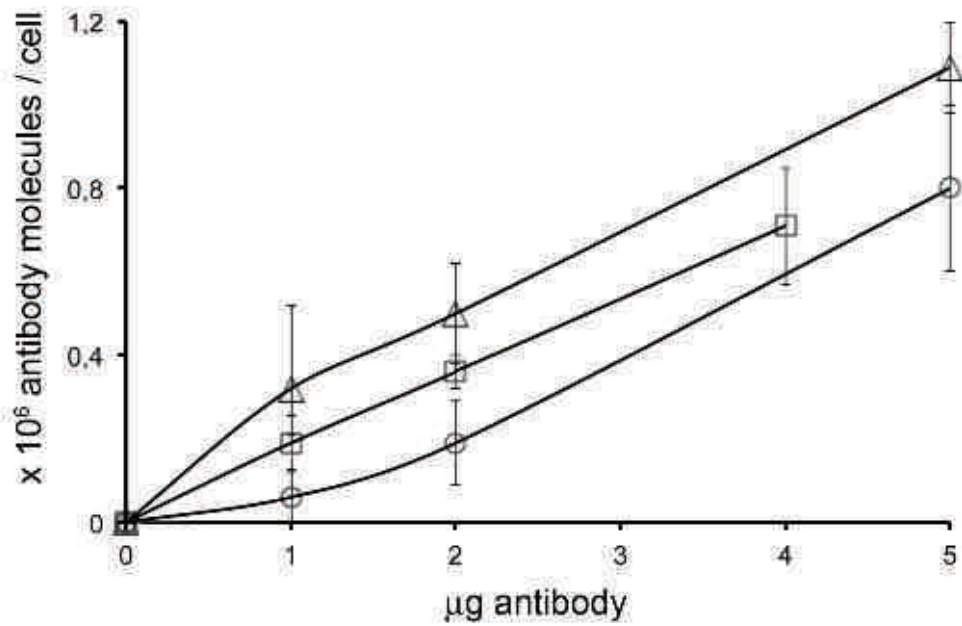


Figure S5: Analysis of the quantity of delivered antibody per cell. HeLa cells were transduced with the indicated amount (in μg) of 2H3 (squares), 4C6 (circles) and 2H5 (triangles) antibodies. 24 h post-treatment, the cells were harvested and counted. The amount of transduced antibodies in the corresponding soluble extracts was determined by Western blotting. Calibrated amounts of each antibody were run in parallel. The curves show the calculated number of antibody molecules per cell in each case.

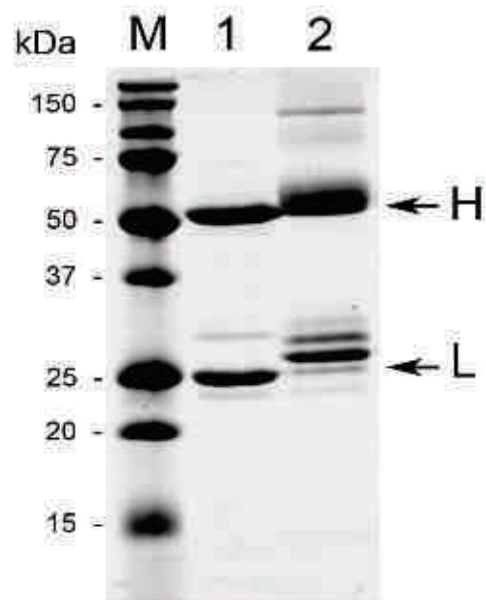


Figure S6: SDS-PAGE analysis of the 4C6 antibody-peptide conjugate. Activated 4C6 antibodies were mixed with NLS peptide (Materials and Methods section) and aliquots were subjected to analysis by SDS-PAGE. The picture shows a typical gel with 4C6 antibody alone (1) or with the 4C6-NLS conjugate (2) after Coomassie blue staining. Approximately 3 μ g of proteins were co-migrated with calibrated molecular weight markers (M).

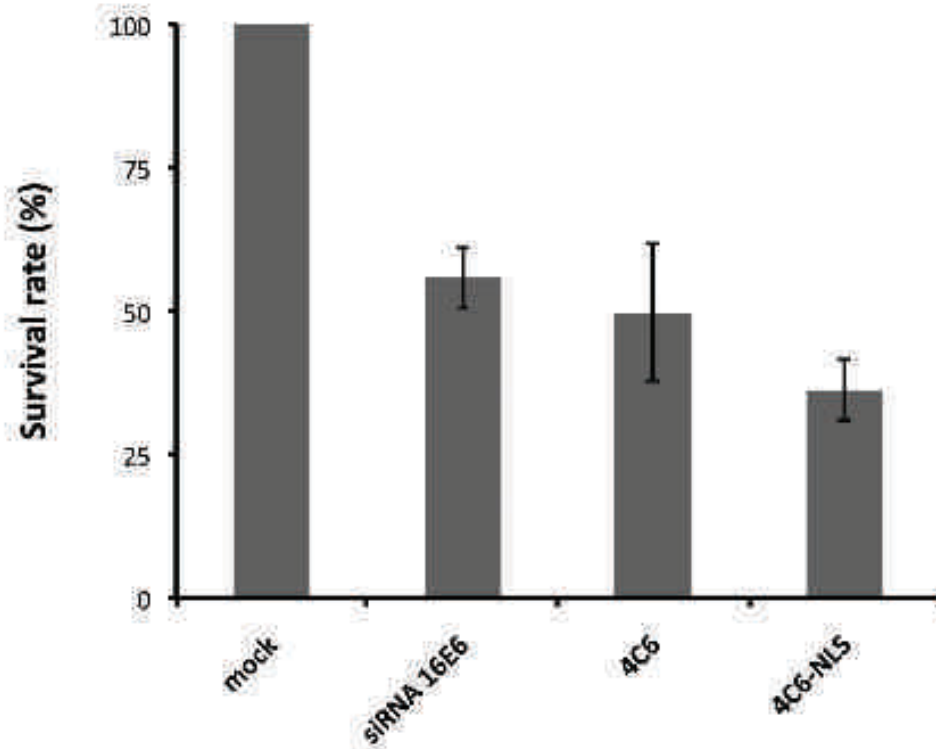


Figure S7: Clonogenic survival of CaSki cells treated with siRNA or 4C6 antibody. CaSki cells seeded in triplicate were either transfected with HPV16 E6-specific siRNA or transduced with 4C6 or 4C6-NLS. 48 h post-treatment, the cells were replated and the rescued cells were counted after 1 week of growth. Relative survival rates (in %) were obtained by dividing the cell counts in each case by that of cells subjected to electroporation without any additive (mock). The bars show mean values from 3 independent experiments.

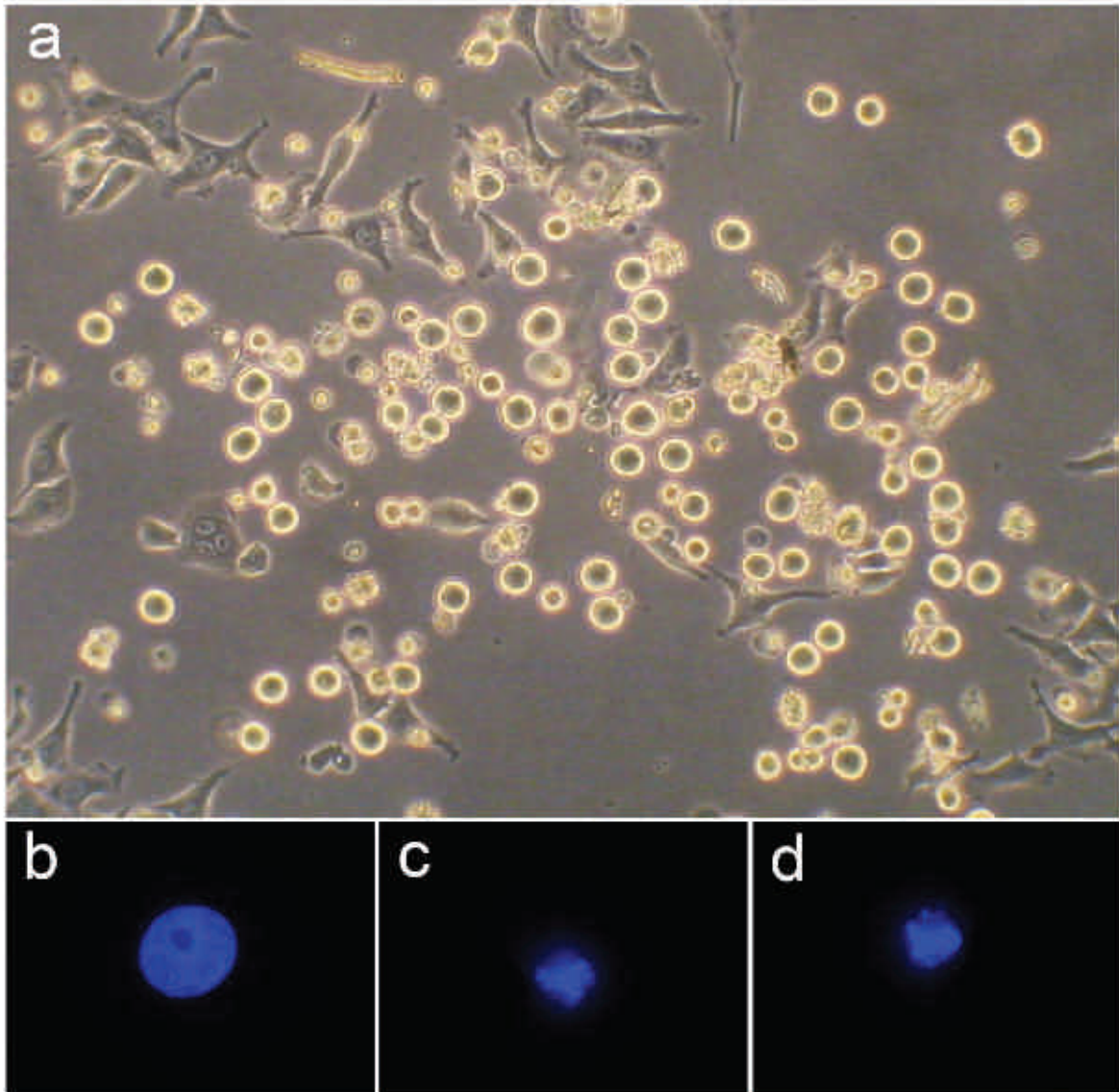


Figure S8: Phenotypic modification of the 4C6-NLS antibody-treated cells. (a) HeLa cells were transduced with SJK132-NLS conjugate as indicated in the legend of Figure 2C. The picture corresponds to a micrograph of the cells accumulating in the middle of the dish after 3 days of incubation. Magnification: x 200. (b-d) Nuclear shape of cells treated as in (a). The typical shrinkage of the nucleus of rounded cells is shown (c, d), as compared to that of a flat cell (b). Magnification: x 1000.

4.3. Conclusion

L'électroporation est une méthode efficace pour vectoriser des anticorps monoclonaux dans le cytoplasme de cellules en culture. En effet, tous les anticorps testés ont été transduits avec succès dans le compartiment intracellulaire de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. Cette méthode représente un outil sans équivalent à l'heure actuelle pour l'immunociblage analytique et fonctionnel. Nous avons montré qu'il est possible d'induire un changement phénotypique des cellules cancéreuses après électroporation d'anticorps neutralisants qui vont atteindre et bloquer leurs cibles intracellulaires. La simplicité de mise en œuvre de l'électroporation d'anticorps nous permet d'envisager des applications à grande échelle pour identifier et valider aisément de nouvelles cibles d'intérêt thérapeutiques. Ceci ouvre également de nouvelles perspectives en termes de criblage à haut débit de petites molécules chimiques qui ciblent les mêmes protéines et reproduisent le même effet dans les cellules que les anticorps électroporés.

En revanche, cette technologie semble difficilement applicable en tant que telle à la thérapie. Le traitement des tumeurs accessibles pourrait constituer l'une des seules applications thérapeutiques envisageables. De plus, la quantité finie d'anticorps vectorisée dans le cytoplasme est un frein pour interférer efficacement avec l'activité d'une protéine qui est présente en grand nombre de copies dans la cellule et/ou de courte demi-vie.

A court terme, nous envisageons d'utiliser l'électroporation pour vectoriser des anticorps marqués dans le cytoplasme et ainsi développer l'analyse en temps réel par vidéo-microscopie d'antigènes intracellulaires. En particulier, l'efficacité et la non-toxicité de l'électroporation associées à la performance des anticorps couplés à des fluorophores devraient nous permettre d'étudier le transport au noyau de PCNA qui est dépourvu de séquence NLS. De plus, contrairement aux intracorps anti-PCNA que nous avons isolé et dont le niveau d'expression est difficilement contrôlable dans la cellule, la quantité d'anticorps électroporée peut être ajustée par rapport à la cible (voire article n°3, figure supplémentaire n°5). Un ratio anticorps électroporé / antigène proche de un devrait ainsi favoriser l'imagerie spécifique de la protéine ciblée.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'immunociblage intracellulaire est une stratégie qui permet de perturber, neutraliser et donc étudier l'activité d'une protéine intracellulaire. Les travaux réalisés au cours de cette thèse illustrent avec plusieurs approches l'efficacité des anticorps et leurs applications potentielles dans un contexte intracellulaire. Les anticorps et leurs fragments dérivés sont donc des outils de choix pour cibler efficacement des protéines dans les cellules, mais il est nécessaire de les caractériser et de les valider de manière extensive pour les utiliser à cette fin.

Immuno-intervention intracellulaire

PCNA et la gankyrin sont des facteurs impliqués respectivement dans la prolifération des cellules tumorales et dans la cancérogenèse. Ce sont deux cibles thérapeutiques potentielles clairement identifiées, et il serait intéressant de disposer d'inhibiteurs de ces protéines permettant d'induire un changement phénotypique des cellules cancéreuses traitées (Tan et al., 2012 ; Meng et al., 2010). Nous avons un anticorps monoclonal de souris et plusieurs scFv capables de se lier à PCNA ainsi que trois scFv ciblant spécifiquement la gankyrin dans les cellules vivantes. Les expériences réalisées à ce jour indiquent qu'aucun de ces réactifs ne semble affecter l'activité de PCNA et de la gankyrin *per se* dans les conditions testées. En revanche, nous avons montré que la vectorisation d'un anticorps bloquant dirigé contre la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase α entraîne la mort cellulaire dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses. Ce résultat a permis de valider le concept d'immuno-intervention intracellulaire et montre que les anticorps peuvent être utilisés pour identifier et valider des cibles d'intérêt thérapeutique dans les cellules. Les anticorps ou scFv non bloquants dirigés contre PCNA et la gankyrin peuvent être utilisés sous la forme d'anticorps marqués ou d'intracorps fluorescents pour suivre la dynamique endogène de PCNA ou de la gankyrin dans les cellules vivantes.

Imagerie des protéines endogènes

Au-delà de l'immunociblage fonctionnel qui consiste à interférer avec des interactions protéine-protéine dans un but thérapeutique, il est nécessaire pour la recherche fondamentale de développer des solutions afin de visualiser en temps réel la localisation des protéines intracellulaires dans les cellules vivantes. En effet, les techniques d'immunofluorescence utilisées classiquement pour observer des antigènes dans des cellules fixées ne reflètent pas forcément la situation *in vivo*, notamment à cause de phénomènes de relocalisation des protéines qui peuvent être causés par la fixation et/ou la perméabilisation des cellules (Schnell et al., 2012). La fusion génétique d'un polypeptide à une protéine fluorescente permet déjà d'observer directement sa dynamique intracellulaire, par expression transitoire ou par expression continue après sélection de lignées stables. Néanmoins, la taille de la protéine fluorescente, la possibilité qu'elle puisse interférer avec la fonction de la protéine d'intérêt et la surexpression non constitutive de la protéine de fusion sont plusieurs facteurs qui limitent l'utilisation de ces systèmes (Giepmans et al., 2006). Dans le cas particulier de PCNA, il a été montré que la dynamique de la protéine de fusion GFP-PCNA au cours du cycle cellulaire est différente de celle de PCNA endogène, ce qui souligne l'importance de l'étude des protéines natives dans un contexte de cellules vivantes (Burgess et al., 2012).

Etude de PCNA

Cette étude a été abordée en exploitant deux types de molécules : les scFv et les anticorps monoclonaux. En ce qui concerne les scFv, nous avons mis au point un réactif bispécifique (P40-eGFP-con1) que nous souhaitons maintenant exploiter afin de visualiser en temps réel la localisation de PCNA par vidéo-microscopie. Cet intracorp devrait nous permettre d'étudier par exemple l'import au noyau de PCNA ou encore la dynamique de PCNA après un stress génotoxique. En effet, lorsque les cellules en culture sont irradiées aux UV, nous avons montré que l'organisation spatiale de PCNA dans le noyau est modifiée probablement en raison du recrutement de la protéine au niveau des sites de réparation de l'ADN. A terme, il devrait donc être possible d'observer directement la dynamique de PCNA lors de ces événements de réparation.

En parallèle, il serait judicieux de compléter la caractérisation des intracorps anti-PCNA en produisant les protéines de fusion P40-pep10 ou P40-con1 sous forme recombinante chez *E. coli* afin de vérifier l'éventuel gain d'affinité de ces molécules bispécifiques par rapport aux scFv seuls. Nous souhaitons aussi cartographier l'épitope du scFv P40 afin de déterminer si le scFv et peptide pep10 (ou con1) se lie sur le même monomère de PCNA (dans ce cas les épitopes reconnus sont distincts) ou si chaque entité de l'anticorps bispécifique se lie à un monomère différent. Enfin, il a été décrit que le peptide pep10 affecte la viabilité des cellules en culture mais nous n'avons pas constaté d'effet délétère induit par l'intracorps bispécifique anti-PCNA sur la prolifération cellulaire (Mattock et al., 2001 ; Warbrick, 2006). Il serait pertinent d'étudier plus en détail l'effet potentiel sur les cellules de la protéine de fusion P40-eGFP-con1 en conduisant des tests de viabilité.

PCNA a également été étudié en utilisant des anticorps monoclonaux de souris dont le premier a été l'anticorps 2H3. En sus de cet anticorps, nous avons isolé de nouveaux anticorps monoclonaux dirigés contre PCNA. Des expériences préliminaires ont montré que ces anticorps sont capables : (1) d'induire la mort cellulaire de cellules en culture après transduction par électroporation, cet effet étant amplifié par co-traitement avec un siRNA anti-PCNA ; (2) d'inhiber la monoubiquitinylation de PCNA *in vitro*. Ces premières observations nécessitent d'être confirmées, mais elles constituent déjà un nouvel exemple d'immuno-intervention intracellulaire. Comme ces anticorps peuvent être vectorisés par électroporation pour tester s'ils empêchent la formation de PCNA monoubiquitinylé dans les cellules, ils ouvrent la voie à une preuve de concept innovant : l'interférence à la modification post-traductionnelle.

Perspectives de la vectorisation d'anticorps monoclonaux

Nous avons décrit au cours de cette thèse plusieurs stratégies pour cibler et visualiser des antigènes intracellulaires à l'aide d'anticorps complets ou de fragments d'anticorps recombinants. La vectorisation par électroporation est un moyen sans équivalent à l'heure actuelle pour délivrer des anticorps dans le compartiment intracellulaire. Comme nous l'avons évoqué précédemment, cette technique est difficilement applicable en tant que telle à la thérapie. En revanche, elle offre un large éventail d'applications, notamment dans le cadre de l'imagerie puisque nous avons observé lors d'expériences préliminaires que des anticorps marqués avec des

fluorophores sont actifs après vectorisation dans les cellules. Mais cette technique peut aussi être exploitée pour valider des cibles d'intérêt thérapeutique. En effet, si un anticorps bloquant est capable d'induire un changement phénotypique des cellules traitées, l'identification de l'épitope reconnu sur la protéine cible par résolution de la structure du complexe anticorps-antigène permettrait d'orienter le criblage de petites molécules chimiques présentant le même effet que l'anticorps bloquant. Elles sont évidemment plus adaptées à la thérapie grâce à leur masse moléculaire qui leur permet de diffuser librement dans la cellule par rapport aux anticorps monoclonaux murins que nous utilisons. Au-delà de leur taille importante, ils nécessiteraient également d'être humanisés avant de penser à une éventuelle application thérapeutique. Actuellement, les deux principales limites de l'utilisation des anticorps monoclonaux en clinique sont justement leur pénétration difficile dans les tumeurs solides et leur coût élevé de production. C'est dans ce sens que les fragments d'anticorps de type scFv, qui ont une taille environ six fois plus petite que celle des IgG, sont considérés comme une alternative possible aux anticorps conventionnels.

Ingénierie des fragments d'anticorps

De nombreuses études démontrent l'intérêt d'utiliser des scFv pour traiter différentes pathologies (Miller & Messer, 2005 ; Crépin et al., 2010), mais aucun fragment d'anticorps de ce format n'a été validé pour la thérapie à ce jour. Plusieurs fragments d'anticorps de type scFv sont actuellement en phase d'essais cliniques, les antigènes ciblés étant exclusivement extracellulaires. Les scFv présentent plusieurs avantages par rapport aux anticorps thérapeutiques. Ils disposent d'une faible demi-vie qui leur permettent d'être éliminés rapidement de l'organisme (ceci est particulièrement important pour l'imagerie *in vivo* effectuée avec des fragments d'anticorps marqués radioactivement). Les scFv pénètrent plus efficacement les tissus par rapport aux anticorps complets et ne sont pas immunogènes lorsqu'ils sont sélectionnés à partir de banques combinatoires humaines. En outre, ils peuvent être aisément modifiés par fusion génétique afin de les multimériser ou de développer des réactifs bispécifiques pour améliorer leurs caractéristiques pharmaco-cinétiques et/ou leur capacité de liaison.

L'étude des fragments d'anticorps destinés à être employés dans les cellules a permis de mettre en évidence des limites à leur emploi dans cette perspective. En effet, ce travail a montré que les scFv sélectionnés ne semblent pas assez affins pour se lier efficacement à une protéine intracellulaire. Il apparaît que l'affinité est un paramètre critique pour l'activité de liaison des anticorps en général, en particulier lorsqu'ils sont utilisés dans un contexte intracellulaire (Griffin et al., 2006). Aussi, nous avons imaginé un système très simple de mutagenèse *in vitro* qui mime l'hypermutation somatique *in vivo* pour obtenir des mutants de scFv dont l'affinité est augmentée. Nous avons obtenu des résultats encourageants sur les deux modèles testés : le scFv anti-PCNA P40 et les scFv polyclonaux anti-immunoglobulines de lapin. Mais il est indispensable de compléter cette étude en calculant le gain d'affinité des scFv diversifiés à l'aide de méthodes biophysiques quantitatives comme la SPR. La stratégie globale de maturation d'affinité *in vitro* pourrait aussi être repensée. Ainsi, il serait judicieux d'alterner les procédés de mutagenèse et de sélection, c'est-à-dire construire une première banque de mutants et effectuer un tour de sélection par phage-display, puis refaire une banque à partir des phages-scFv isolés et ainsi de suite. Ceci permettrait d'enrichir graduellement la population de phages-scFv spécifiques de l'antigène en faisant des cycles de mutation-sélection, un peu à la manière de ce qui se passe dans les centres germinatifs des ganglions lymphatiques lors de la sélection des anticorps naturels. Il serait également pertinent de faire la sélection de scFv par phage-display à 37°C puisqu'ils sont destinés à être utilisés dans le compartiment intracellulaire.

En conclusion, il a été montré que l'affinité des scFv est essentielle pour inhiber la fonction d'un antigène intracellulaire (Lobato & Rabbitts, 2004). Ainsi, nous souhaitons continuer à tirer profit de ces biomolécules en insistant sur l'amélioration de l'affinité pour tenter d'interférer efficacement au niveau des interfaces protéine-protéine dans les cellules.

L'ensemble des travaux de thèse présentés ici ont permis d'établir les bases de plusieurs stratégies innovantes d'immunociblage intracellulaire et de mettre en lumière l'importance des différentes étapes de validation d'anticorps ou de fragments dérivés utilisés comme anticorps intracellulaires. La vectorisation d'anticorps complets par électroporation, le développement d'un intracorps bispécifique original et la mise au point d'une méthode de mutagenèse inspirée de l'hypermutation somatique constituent les principales innovations apportées par cette thèse dans le domaine de la recherche technologique en biotechnologie.

Il est maintenant possible de délivrer efficacement des anticorps complets dans le compartiment intracellulaire grâce à l'électroporation. Ces anticorps proviennent d'animaux immunisés et disposent donc d'une haute affinité pour l'antigène, et nous avons déjà décrit plusieurs exemples d'immuno-intervention intracellulaire avec des anticorps monoclonaux. Même si, à court terme, nous continuerons d'exploiter les scFv et les anticorps monoclonaux en parallèle en raison de leurs caractéristiques complémentaires, il serait pertinent à l'avenir de miser sur les anticorps complets pour cibler des antigènes intracellulaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Actis, M., Inoue, A., Evison, B., Perry, S., Punchihewa, C., and Fujii, N. (2013). Small molecule inhibitors of PCNA/PIP-box interaction suppress translesion DNA synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21, 1972-1977.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: Garland Science. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>

Amstutz, P., Forrer, P., Zahnd, C., and Plückthun, A. (2001). *In vitro* display technologies: novel developments and applications. *Current Opinion in Biotechnology* 12, 400-405.

Anderson, D.C., Nichols, E., Manger, R., Woodle, D., Barry, M., and Fritzberg, A.R. (1993). Tumor cell retention of antibody Fab fragments is enhanced by an attached HIV TAT protein-derived peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 194, 876-884.

Baert, F., Noman, N., Vermeire, S., Van Assche, G., D'Haens, G., Carbonez, A., and Rutgeerts, P. (2003). Influence of Immunogenicity on the Long-Term Efficacy of Infliximab in Crohn's Disease. *The New England Journal of Medicine* 348, 601-608.

Berglund, D.L., and Starkey, J.R. (1991). Introduction of antibody into viable cells using electroporation. *Cytometry* 12, 64-67.

Biocca, S., Neuberger, M.S., and Cattaneo, A (1990). Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells. *The EMBO Journal* 9, 101-108.

Biocca, S., Ruberti, F., Tafani, M., Pierandrei-Amaldi, P., and Cattaneo, A. (1995). Redox state of single chain Fv fragments targeted to the Endoplasmic Reticulum, Cytosol and Mitochondria. *Nature Biotechnology* 13, 1110-1115.

Blundell, T.L., Sibanda, B.L., Montalvão, R.W., Brewerton, S., Chelliah, V., Worth, C.L., Harmer, N.J., Davies, O., and Burke, D. (2006). Structural biology and bioinformatics in drug design: opportunities and challenges for target identification and lead discovery. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 361, 413–423.

Boder, E.T., and Wittrup, K.D. (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature Biotechnology* 15, 553–557.

Böldicke, T. (2007). Blocking translocation of cell surface molecules from the ER to the cell surface by intracellular antibodies targeted to the ER. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11, 54–70.

Bratkovič, T. (2009). Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67, 749–767.

Bruning, J.B., and Shamo, Y. (2004). Structural and Thermodynamic Analysis of Human PCNA with Peptides Derived from DNA Polymerase- δ p66 Subunit and Flap Endonuclease-1. *Structure* 12, 2209–2219.

Burton, D.R., Barbas, C.F., Persson, M.A., Koenig, S., Chanock, R.M., and Lerner, R.A. (1991). A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 10134–10137.

Caffrey, D.R., Zhao, J., Song, Z., Schaffer, M.E., Haney, S.A., Subramanian, R.R., Seymour, A.B., and Hughes, J.D. (2011). siRNA off-target effects can be reduced at concentrations that match their individual potency. *PLoS One* 6, e21503.

Caron de Fromentel, C., Gruel, N., Venot, C., Debussche, L., Conseiller, E., Dureuil, C., Teillaud, J.L., Tocque, B., and Bracco, L. (1999). Restoration of transcriptional activity of p53 mutants in human tumour cells by intracellular expression of anti-p53 single chain Fv fragments. *Oncogene* 18, 551–557.

Carter, P.J. (2006). Potent antibody therapeutics by design. *Nature Reviews Immunology* 6, 343-357.

Cazzalini, O., Perucca, P., Riva, F., Stivala, L.A., Bianchi, L., Vannini, V., Ducommun, B., and Prosperi, E. (2003). p21CDKN1A does not interfere with loading of PCNA at DNA replication sites, but inhibits subsequent binding of DNA polymerase delta at the G1/S phase transition. *Cell Cycle* 2, 596–603.

Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., and Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology* 157, 220–233.

Chao, G., Lau, W.L., Hackel, B.J., Sazinsky, S.L., Lippow, S.M., and Wittrup, K.D. (2006). Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *Nature Protocols* 1, 755–768.

Chen, J., Bozza, W., and Zhuang, Z. (2011). Ubiquitination of PCNA and Its Essential Role in Eukaryotic Translesion Synthesis. *Cell Biochemistry and Biophysics* 60, 47-60.

Chen, B., and Erlanger, B.F. (2002). Intracellular delivery of monoclonal antibodies. *Immunology Letters* 84, 63–67.

Chiang, W.C., Geel, T.M., Altintas, M.M., Sever, S., Ruiters, M.H.J., and Reiser, J. (2010). Establishment of protein delivery systems targeting podocytes. *PLoS One* 5, e11837.

Chiara, A. De, Pederzoli-Ribeil, M., Burgel, P.-R., Danel, C., and Witko-Sarsat, V. (2012). Targeting cytosolic proliferating cell nuclear antigen in neutrophil-dominated inflammation. *Frontiers in Immunology* 3, 311.

Cohen-Saidon, C., Nechushtan, H., Kahlon, S., Livni, N., Nissim, A., and Razin, E. (2003). A novel strategy using single-chain antibody to show the importance of Bcl-2 in mast cell survival. *Blood* 102, 2506–2512.

Courtête, J., Sibler, A.-P., Zeder-Lutz, G., Dalkara, D., Oulad-Abdelghani, M., Zuber, G., and Weiss, E. (2007). Suppression of cervical carcinoma cell growth by intracytoplasmic codelivery of anti-oncoprotein E6 antibody and small interfering RNA. *Molecular Cancer Therapeutics* 6, 1728–1735.

Crépin, R., Goenaga, A.-L., Jullienne, B., Bougherara, H., Legay, C., Benihoud, K., Marks, J.D., and Poul, M.-A. (2010). Development of human single-chain antibodies to the transferrin receptor that effectively antagonize the growth of leukemias and lymphomas. *Cancer Research* 70, 5497–5506.

Dalkara, D., Zuber, G., and Behr, J.-P. (2004). Intracytoplasmic delivery of anionic proteins. *Molecular Therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy* 9, 964–969.

Daugherty, P.S., Chen, G., Iverson, B.L., and Georgiou, G. (2000). Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2029–2034.

De Biasio, A., Campos-Olivas, R., Sánchez, R., López-Alonso, J.P., Pantoja-Uceda, D., Merino, N., Villate, M., Martin-Garcia, J.M., Castillo, F., Luque, I., et al. (2012). Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Interactions in Solution Studied by NMR. *PLoS One* 7, e48390.

Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili, A., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2007). DNA polymerase eta is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 17–23.

Desplancq, D., King, D.J., Lawson, A.D., and Moutain A. (1994). Multimerization behavior of single chain Fv variants for the tumour-binding antibody B72.3. *Protein Engineering* 7, 1027-1033.

Desplancq, D., Rinaldi, A.-S., Hörzer, H., Ho, Y., Nierengarten, H., Atkinson, R.A., Kieffer, B., and Weiss, E. (2008). Automated overexpression and isotopic labelling of biologically active oncoproteins in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 51, 53–61.

Desplancq, D., Rinaldi, A.-S., Stoessel, A., Sibler, A.-P., Busso, D., Oulad-Abdelghani, M., Van Regenmortel, M.H., and Weiss, E. (2011). Single-chain Fv fragment antibodies selected from an intrabody library as effective mono- or bivalent reagents for in vitro protein detection. *Journal of Immunological Methods* 369, 42–50.

Doerner, A., Rhiel, L., Zielonka, S., and Kolmar, H. (2013). Therapeutic antibody engineering by high efficiency cell screening. *FEBS Letters*. *In press*.

Doles, J., Oliver, T.G., Cameron, E.R., Hsu, G., Jacks, T., and Walker, G.C. (2010). Suppression of Rev3, the catalytic subunit of Pol ζ , sensitizes drug-resistant lung tumors to chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 20786-20791.

Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R., and Brock, R. (2007). A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* 8, 848–866.

Dumoulin, M., Conrath, K., Meirhaeghe, A.V.A.N., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L.G.J., Muyldermans, S., Wyns, L., and Matagne, A. (2002). Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Science* 11, 500–515.

Ewert, S., Honegger, A., and Plückthun, A. (2004). Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods* 34, 184–199.

Finlay, W.J., Cunningham, O., Lambert, M.A., Darmanin-Sheehan, A., Liu, X., Fennell, B.J., Mahon, C.M., Cummins, E., Wade, J.M., O'Sullivan, C.M., Yang Tan, X., Piche, N., Pittman, D.D., Paulsen, J., Tchistiakova, L., Kodangattil, S., Gill, D., and Hufton, S.E. (2009). Affinity maturation of a humanized rat antibody for anti-RAGE therapy: comprehensive mutagenesis reveals a high level of mutational plasticity both inside and outside the complementarity-determining regions. *Journal of Molecular Biology* 388, 541–558.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Fischer, P.M. (2007). Cellular uptake mechanisms and potential therapeutic utility of peptidic cell delivery vectors: progress 2001-2006. *Medicinal Research Reviews* 27, 755–795.

Foote, J. and Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *Journal of Molecular Biology* 224, 487-499.

Fransson, J., Teplyakov, A., Raghunathan, G., Chi, E., Cordier, W., Dinh, T., Feng, Y., Giles-Komar, J., Gilliland, G., Lollo, B., Malia, T.J., Nishioka, W., Obmolova, G., Zhao, S., Zhao, Y., Swanson, R.V., and Almagro, J.C. (2010). Human framework adaptation of a mouse anti-human IL-13 antibody. *Journal of Molecular Biology* 398, 214–231.

Friedberg, E.C., Wagner, R., and Radman, M. (2002). Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science* 296, 1627–1630.

Fu, X.-Y., Wang, H.-Y., Tan, L., Liu, S.-Q., Cao, H.-F., and Wu, M.-C. (2002). Overexpression of p28/gankyrin in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *World Journal of Gastroenterology* 8, 638–643.

Fukunaga, A., and Tsumoto, K. (2013). Improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions. *Protein Engineering, Design and Selection* 26, 773-780.

Futami, M., Watanabe, Y., Asama, T., Murata, H., Tada, H., Kosaka, M., Yamada, H., and Futami, J. (2012). Uniformly cationized protein efficiently reaches the cytosol of mammalian cells. *Bioconjugate Chemistry* 23, 2025–2031.

Gali, H., Juhasz, S., Morocz, M., Hajdu, I., Fatyol, K., Szukacsov, V., Burkovics, P., and Haracska, L. (2012). Role of SUMO modification of human PCNA at stalled replication fork. *Nucleic Acids Research* 40, 6049-6059.

Gibson, T.J., Seiler, M. and Veitia, R.A. (2013). The transience of transient overexpression. *Nature Methods* 10, 715-721.

Gilljam, K.M., Feyzi, E., A.A.S., P.A., Sousa, M.M.L., Müller, R., Vågbø, C.B., Catterall, T.C., Liabakk, N.B., Slupphaug, G., Drabløs, F., Krokan, H.E., and Otterlei, M. (2009). Identification of a novel, widespread, and functionally important PCNA-binding motif. *The Journal of Cell Biology* 186, 645–654.

Griffin, H., Elston, R., Jackson, D., Ansell, K., Coleman, M., Winter, G., and Doorbar, J. (2006). Inhibition of papillomavirus protein function in cervical cancer cells by intrabody targeting. *Journal of Molecular Biology* 355, 360–378.

Griffiths, A D., Malmqvist, M., Marks, J.D., Bye, J.M., Embleton, M.J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K.P., Gorick, B.D., and Hughes-Jones, N.C. (1993). Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *The EMBO Journal* 12, 725–734.

Gulbis, J.M., Kelman, Z., Hurwitz, J., Donnell, M.O., and Kuriyan, J. (1996). Structure of the C-Terminal Region Complexed with Human PCNA. *Cell* 87, 297–306.

Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hammers, C., Bajyana Songa, E., Bendahman, N., and Hammers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446-448.

Hanes, J., and Plückthun, A. (1997). *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 4937–4942.

Hedglin, M., Perumal, S.K., Hu, Z., and Benkovic, S. (2013). Stepwise assembly of the human replicative polymerase holoenzyme. *eLife* 2, e00278–e00278.

Higashitsuji, H., Itoh, K., Nagao, T., Dawson, S., Nonoguchi, K., Kido, T., Mayer, R.J., Aii, S., and Fujita, J. (2000). Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nature Medicine* 6, 96–99.

Higashitsuji, H., Liu, Y., Mayer, R.J., and Fujita, J. (2005). The Oncoprotein Gankyrin Negatively Regulates Both p53 and RB by Enhancing Proteasomal Degradation. *Cell Cycle* 4, 1335–1337.

Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P., and Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Research* 19, 4133–4137.

Hoogenboom, H.R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnology* 23, 1105–1116.

Hoogenboom, H.R., and Winter, G. (1992). By-passing immunization: Human antibodies from synthetic repertoires of germline V_H gene segments rearranged *in vitro*. *Journal of Molecular Biology* 227, 381–388.

Huang, Y., Pastor, W. A, Shen, Y., Tahiliani, M., Liu, D.R., and Rao, A. (2010). The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PLoS One* 5, e8888.

Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotný, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Brucoleri, R.E., Haber, E., and Crea, R. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *85*, 5879–5883.

Imai, K., and Takaoka, A. (2006). Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nature Reviews. Cancer* *6*, 714–727.

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2001). *Immunobiology*, 5th edition. New York: Garland Science. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10757/>

Johnston, J. a, Ward, C.L., and Kopito, R.R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *The Journal of Cell Biology* *143*, 1883–1898.

Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., and Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* *321*, 522-525.

Kaneko, T., Hamazaki, J., Iemura, S.-I., Sasaki, K., Furuyama, K., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2009). Assembly pathway of the Mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones. *Cell* *137*, 914–925.

Kehoe, J.W., and Kay, B.K. (2005). Filamentous phage display in the new millennium. *Chemical Reviews* *105*, 4056–4072.

Kelloff, G.J., Krohn, K.A., Larson, S.M., Weissleder, R., Mankoff, D.A., Hoffman, J.M., Link, J.M., Guyton, K.Z., Eckelman, W.C., Scher, H.I., O’Shaughnessy, J., Cheson, B.D., Sigman, C.C., Tatum, J.L., Mills, G.Q., Sullivan, D.C., and Woodcock, J. (2005). The progress and promise of molecular imaging probes in oncologic drug development. *Clinical Cancer Research* *11*, 7967–7985.

Kelman, Z., and O'Donnell, M. (1995). Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps. *Nucleic Acids Research* 23, 3613–3620.

Khalil, I.A., Kogure, K., Akita, H., and Harashima, H. (2006). Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery. *Pharmacological Reviews* 58, 32–45.

Kirchmaier, A.L. (2011). Ub-family modifications at the replication fork: Regulating PCNA-interacting components. *FEBS Letters* 585, 2920–2928.

Kierny, M.R., Cunningham, T.D., and Kay, B.K. (2012). Detection of biomarkers using recombinant antibodies coupled to nanostructured platforms. *Nano Reviews* 3, 17240. Available from: <http://dx.doi.org/10.3402/nano.v3i0.17240>

Köhler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.

Kretzschmar, T., and Geiser, M. (1995). Evaluation of antibodies fused to minor coat protein III and major coat protein VIII of bacteriophage M13. *Gene* 155, 61–65.

Kvam, E., Sierks, M.R., Shoemaker, C.B., and Messer, A. (2010). Physico-chemical determinants of soluble intrabody expression in mammalian cell cytoplasm. *Protein Engineering, Design & Selection* 23, 489–498.

Langerak, P., Nygren, A.O.H., Krijger, P.H.L., van den Berk, P.C.M., and Jacobs, H. (2007). A/T mutagenesis in hypermutated immunoglobulin genes strongly depends on PCNAK164 modification. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 1989–1998.

Lehmann, A.R., Niimi, A., Ogi, T., Brown, S., Sabbioneda, S., Wing, J.F., Kannouche, P.L., and Green, C.M. (2007). Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair* 6, 891–899.

Li, H., Xiaoyong, F., Chen, Y., Hong, Y., Tan, Y., Cao, H., Wu, M., and Wang, H. (2008). Use of Adenovirus-delivered siRNA to target oncoprotein p28^{GANK} in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 128, 2029-2041.

Li, Z., Woo, C.J., Iglesias-Ussel, M.D., Ronai, D., and Scharff, M.D. (2004). The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes & Development* 18, 1–11.

Lim, K.J., Sung, B.H., Shin, J.R., Lee, Y.W., Kim, D.J., Yang, K.S., and Kim, S.C. (2013). A cancer specific cell-penetrating peptide, BR2, for the efficient delivery of an scFv into cancer cells. *PloS One* 8, e66084.

Liu, P., Hong, Y., Lin, Y., Fu, X., Lin, L., Li, C., Meng, X., and Liu, Z. (2009). A frequency-controlled random mutagenesis method for GC-rich genes. *Analytical Biochemistry* 388, 356–358.

Lo, S.Y., and Zhu, Q., and Marasco, W.A. (2008). Intracellular antibodies (intrabodies) and their therapeutic potential. *Handbook of Experimental Pharmacology* 181, 343–373.

Lo, Y.-H., Ho, P.-C., Chen, M.-S., Hugo, E., Ben-Jonathan, N., and Wang, S.-C. (2013). Phosphorylation at tyrosine 114 of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) is required for adipogenesis in response to high fat diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 430, 43–48.

Lobato, M.N., and Rabbitts, T.H. (2004). Intracellular Antibodies as Specific Reagents for Functional Ablation: Future Therapeutic Molecules. *Current Molecular Medicine* 4, 519-528.

LoBuglio, A.F., Wheeler, R.H., Trang, J., Haynes, A., Rogers, K., Harvey, E.B., Sun, L., Ghrayeb, J., and Khazaeli, M.B. (1989). Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 4220–4224.

Lonberg, N. (2005). Human antibodies from transgenic animals. *Nature Biotechnology* 23, 1117–1125.

Longerich, S., Basu, U., Alt, F., and Storb, U. (2006). AID in somatic hypermutation and class switch recombination. *Current Opinion in Immunology* 18, 164–174.

Lukas, J., Bartek, J., and Strauss, M. (1994). Efficient transfer of antibodies into mammalian cells by electroporation. *Journal of Immunological Methods* 170, 255-259.

Luo, J., Solimini, N.L., and Elledge, S.J. (2009). Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136, 823–837.

Madsen, P., Nielsen, S., and Celis, J.E. (1986). Monoclonal antibody specific for human nuclear proteins IEF 8Z30 and 8Z31 accumulates in the nucleus a few hours after cytoplasmic microinjection of cells expressing these proteins. *The Journal of Cell Biology* 103, 2083-2089.

Maga, G., and Hübscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *The Journal of Cell Science* 116, 3051-3060.

Mahler, M., Miyachi, K., Peebles, C., and Fritzler, M.J. (2012). The clinical significance of autoantibodies to the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Autoimmunity Reviews* 11, 771-775.

Makowski, L. (1994). Phage display: structure, assembly and engineering of filamentous bacteriophage M13. *Current Opinion in Structural Biology* 4, 225–230.

Marg, A., Meyer, T., Vigneron, M., and Vinkemeier, U. (2008). Microinjected antibodies interfere with protein nucleocytoplasmic shuttling by distinct molecular mechanisms. *Cytometry. Part A : the Journal of the International Society for Analytical Cytology* 73A, 1128–1140.

- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., and Winter, G. (1992). Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 16007-16010.
- Marschall, A.L.J., Frenzel, A., Schirrmann, T., Schüngel, M., and Dubel, S. (2011). Targeting antibodies to the cytoplasm. *MAbs* 3, 3–16.
- Martineau, P., Jones, P., and Winter, G. (1998). Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *Journal of Molecular Biology* 280, 117–127.
- Mayer, M., Kies, U., Kammermeier, R., and Buchner, J. (2000). BiP and PDI cooperate in the oxidative folding of antibodies *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 29421–29425.
- McCulloch, S.D., and Kunkel, T. (2008). The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Research* 18, 148–161.
- Mead, D.A., and Kemper, B. (1988). Chimeric single-stranded DNA phage-plasmid cloning vectors. *Biotechnology* 10, 85-102.
- Meng, Y., He, L., Guo, X., Tang, S., Zhao, X., Du, R., Jin, J., Bi, Q., Li, H., Nie, Y., Liu, J., and Fan, D. (2010). Gankyrin promotes the proliferation of human pancreatic cancer. *Cancer Letters* 297, 9–17.
- Miller, T.W., and Messer, A. (2005). Intrabody applications in neurological disorders: progress and future prospects. *Molecular Therapy* 12, 394–401.
- Moldovan, G.-L., Pfander, B., and Jentsch, S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129, 665–679.
- Monnier, P., Vigouroux, R., and Tassew, N. (2013). *In Vivo* Applications of Single Chain Fv (Variable Domain) (scFv) Fragments. *Antibodies* 2, 193-208.

Montrose, K., Yang, Y., Sun, X., Wiles, S., and Krissansen, G.W. (2013). Xentry, a new class of cell-penetrating peptide uniquely equipped for delivery of drugs. *Scientific Reports* 3, 1661.

Morgan, D.O., and Roth, R.A. (1988). Analysis of intracellular protein function by antibody injection. *Immunology today* 9, 84-88.

Müller, R., Misund, K., Holien, T., Bachke, S., Gilljam, K.M., Våtsveen, T.K., Rø, T.B., Bellacchio, E., Sundan, A., and Otterlei, M. (2013). Targeting proliferating cell nuclear antigen and its protein interactions induces apoptosis in multiple myeloma cells. *PLoS One* 8, e70430.

Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 18470–18476.

Nakamura, Y., Nakano, K., Umehara, T., Kimura, M., Hayashizaki, Y., Tanaka, A., Horikoshi, M., Padmanabhan, B., and Yokoyama, S. (2007). Structure of the oncoprotein gankyrin in complex with S6 ATPase of the 26S proteasome. *Structure* 15, 179–189.

Naryzhny, S.N. (2008). Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 3789–3808.

Nizak, C., Martin-Lluesma, S., Moutel, S., Roux, A., Kreis, T.E., Goud, B., and Perez, F. (2003). Recombinant antibodies against subcellular fractions used to track endogenous Golgi protein dynamics *in vivo*. *Traffic* 4, 739–753.

Ortiz, C.M., Ito, T., Tanaka, E., Tsunoda, S., Nagayama, S., Sakai, Y., Higashitsuji, H., Fujita, J., and Shimada, Y. (2008). Gankyrin oncoprotein overexpression as a critical factor for tumor growth in human esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. *International Journal of Cancer* 122, 325–332.

Pérez-Martínez, D., Tanaka, T., and Rabbitts, T.H. (2010). Intracellular antibodies and cancer: New technologies offer therapeutic opportunities. *BioEssays* 32, 589–598.

Punchihewa, C., Inoue, A., Hishiki, A., Fujikawa, Y., Connelly, M., Evison, B., Shao, Y., Heath, R., Kuraoka, I., Rodrigues, P., Hashimoto, H., Kawanishi, M., Sato, M., Yagi, T., and Fujii, N. (2012). Identification of small molecule proliferating cell nuclear antigen (PCNA) inhibitor that disrupts interactions with PIP-box proteins and inhibits DNA replication. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 14289–14300.

Rani, M., Bolles, M., Donaldson, E.F., Van Blarcom, T., Baric, R., Iverson, B., and Georgiou, G. (2012). Increased Antibody Affinity Confers Broad *In Vitro* Protection against Escape Mutants of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Journal of Virology* 86, 9113–9121.

Rejman, J., Bragonzi, A., and Conese, M. (2005). Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Molecular Therapy* 12, 468–474.

Richardson, J.H., Sodroski, J.G., Waldmann, T. a, and Marasco, W. a (1995). Phenotypic knockout of the high-affinity human interleukin 2 receptor by intracellular single-chain antibodies against the alpha subunit of the receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 3137–3141.

Rothbauer, U., Zolghadr, K., Tillib, S., Nowak, D., Schermelleh, L., Gahl, A., Backmann, N., Conrath, K., Muyldermans, S., and Cardoso, M.C. (2006). Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nature Methods* 3, 887–889.

Schramm, S.-J., and Mann, G.J. (2011). Melanoma prognosis: a REMARK-based systematic review and bioinformatic analysis of immunohistochemical and gene microarray studies. *Molecular Cancer Therapeutics* 10, 1520–1528.

Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, 41–52.

Scott, A.M., Wolchok, J.D., and Old, L.J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* 12, 278–287.

Seki, M., Gearhart, P.J., and Wood, R.D. (2005). DNA polymerases and somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *EMBO Reports* 6, 1143–1148.

Shiomi, Y., and Nishitani, H. (2013). Alternative replication factor C protein, Elg1, maintains chromosome stability by regulating PCNA levels on chromatin. *Genes to Cells* 18, 946-959.

Sibler, A.-P., Courtête, J., Muller, C.D., Zeder-Lutz, G., and Weiss, E. (2005). Extended half-life upon binding of destabilized intrabodies allows specific detection of antigen in mammalian cells. *The FEBS Journal* 272, 2878–2891.

Sibler, A.-P., Nordhammer, A., Masson, M., Martineau, P., Travé, G., and Weiss, E. (2003). Nucleocytoplasmic shuttling of antigen in mammalian cells conferred by a soluble versus insoluble single-chain antibody fragment equipped with import/export signals. *Experimental Cell Research* 286, 276–287.

Silacci, M., Brack, S., Schirru, G., Mårlind, J., Ettore, A., Merlo, A., Viti, F., and Neri, D. (2005). Design, construction, and characterization of a large synthetic human antibody phage display library. *Proteomics* 5, 2340–2350.

Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315–1317.

Sohail, A. (2003). Human activation-induced cytidine deaminase causes transcription-dependent, strand-biased C to U deaminations. *Nucleic Acids Research* 31, 2990-2994.

Stocks, M. (2005). Intrabodies as drug discovery tools and therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology* 9, 359–365.

Tan, Z., Wortman, M., Dillehay, K.L., Seibel, W.L., Evelyn, C.R., Smith, S.J., Malkas, L.H., Zheng, Y., Lu, S., and Dong, Z. (2012). Small Molecule Targeting of PCNA Chromatin Association Inhibits Tumor Cell Growth. *Molecular Pharmacology* 81, 811-819.

Tanaka, T., Lobato, M.N., and Rabbitts, T.H. (2003). Single Domain Intracellular Antibodies: A Minimal Fragment For Direct *In Vivo* Selection of Antigen-specific Intrabodies. *Journal of Molecular Biology* 331, 1109–1120.

Teng, G., and Papavasiliou, F.N. (2007). Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annual Reviews of Genetics* 41, 107-120.

Togtema, M., Pichardo, S., Jackson, R., Lambert, P.F., Curiel, L., and Zehbe, I. (2012). Sonoporation delivery of monoclonal antibodies against human papillomavirus 16 E6 restores p53 expression in transformed cervical keratinocytes. *PLoS One* 7, e50730.

Ulrich, H.D., and Takahashi, T. (2013). Readers of PCNA modifications. *Chromosoma* 122, 259-274.

Van Blarcom, T.J., Sofer-Podesta, C., Ang, J., Boyer, J.L., Crystal, R.G., and Georgiou, G. (2010). Affinity maturation of an anti-V antigen IgG expressed *in situ* through adenovirus gene delivery confers enhanced protection against *Yersinia pestis* challenge. *Gene Therapy* 17, 913-921.

Van der Gun, B.T.F., Monami, A., Laarmann, S., Raskó, T., Slaska-Kiss, K., Weinhold, E., Wasserkort, R., de Leij, L.F.M.H., Ruiters, M.H.J., Kiss, A., and McLaughlin, P.M.J. (2007). Serum insensitive, intranuclear protein delivery by the multipurpose cationic lipid SAINT-2. *Journal of Controlled Release* 123, 228–238.

Vincke, C., Loris, R., Saerens, D., Martinez-Rodriguez, S., Muyldermans, S., and Conrath, K. (2009). General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 3273–3284.

Wang, S.-C., Nakajima, Y., Yu, Y.-L., Xia, W., Chen, C.-T., Yang, C.-C., McIntush, E.W., Li, L.-Y., Hawke, D.H., Kobayashi, R., and Hung, M.C. (2006). Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nature Cell Biology* 8, 1359–1368.

Wang, F., Sen, S., Zhang, Y., Ahmad, I., Zhu, X., Wilson, I. A., Smider, V. V, Magliery, T.J., and Schultz, P.G. (2013). Somatic hypermutation maintains antibody thermodynamic stability during affinity maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 4261-4266.

Weisser, N.E., and Hall, J.C. (2009). Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnology Advances* 27, 502–520.

Williams, A.F., and Barclay, A.N. (1988). The immunoglobulin superfamily: domains for cell surface recognition. *Annual reviews of Immunology* 6, 381-405.

Witko-Sarsat, V., Mocek, J., Bouayad, D., Tamassia, N., Ribeil, J.-A., Candalh, C., Davezac, N., Reuter, N., Mouthon, L., Hermine, O., Pederzoli-Ribeil, M., and Cassatella, M.A. (2010). Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. *The Journal of Experimental Medicine* 207, 2631–2645.

Wong, T.S., Zhurina, D., and Schwaneberg, U. (2006). The diversity challenge in directed protein evolution. *Combinatorial Chemistry and high throughput screening* 9, 271-288.

Wörn, A., and Plückthun, A. (1998). Mutual stabilization of VL and VH in single-chain antibody fragments, investigated with mutants engineered for stability. *Biochemistry* 37, 13120–13127.

Xie, K., Doles, J., Hemann, M.T., and Walker, G.C. (2010). Error-prone translesion synthesis mediates acquired chemoresistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 20792-20797.

Xu, H., Zhang, P., Liu, L., and Lee, M.Y. (2001). A novel PCNA-binding motif identified by the panning of a random peptide display library. *Biochemistry* *40*, 4512–4520.

Yao, N.Y., and O'Donnell, M. (2010). SnapShot: The replisome. *Cell* *141*, 1088.

Yu, Y., Cai, J., Tu, B., Wu, L., Zhao, Y., Liu, X., Li, L., Michael, A., Feng, J., He, Q., Yang, Y., Wang, H., Sekiguchi, M., and Zhu, W.G. (2009). Proliferating Cell Nuclear Antigen Is Protected from Degradation by Forming a Complex with MutT Homolog2. *The Journal of Biological Chemistry* *284*, 19310–19320.

Zhang, P., Zhang, S.J., Zhang, Z., Woessner, J.F., and Lee, M.Y. (1995). Expression and physicochemical characterization of human proliferating cell nuclear antigen. *Biochemistry* *34*, 10703–10712.

Zhang, J., Tanha, J., Hiramata, T., Khieu, N.H., To, R., Tong-Sevinc, H., Stone, E., Brisson, J.-R., and Roger MacKenzie, C. (2004). Pentamerization of Single-domain Antibodies from Phage Libraries: A Novel Strategy for the Rapid Generation of High-avidity Antibody Reagents. *Journal of Molecular Biology* *335*, 49–56.

Zhang, Y., Zhang, Y., Bryant, J., Charles, A., Boado, R.J., and Pardridge, W.M. (2004). Intravenous RNA Interference Gene Therapy Targeting the Human Epidermal Growth Factor Receptor Prolongs Survival in Intracranial Brain Cancer Intravenous RNA Interference Gene Therapy Targeting the Human Epidermal Growth Factor Receptor Prolongs Survival. *Clinical Cancer Research* *10*, 3667–3677.

Zhang, Z., Zhang, S., Hua, S., Lin, S., Wang, X., Wu, L., Lee, Y.C., and Lee, M.Y.W. (2012). Structure of monoubiquitinated PCNA - Implications for DNA polymerase switching and Okazaki fragment maturation. *Cell Cycle* *11*, 2128–2136.

Zhao, H., Lo, Y., and Ma, L. (2011). Targeting Tyrosine Phosphorylation of PCNA Inhibits Prostate Cancer Growth. *Molecular Cancer Therapeutics* *10*, 29–36.



Guillaume FREUND

Sélection et caractérisation d'anticorps et de fragments d'anticorps pour l'immunociblage intracellulaire

Résumé

Les anticorps thérapeutiques sont des molécules de choix pour le traitement standard de nombreuses formes de cancers. Leur application est à ce jour restreinte au compartiment extracellulaire à cause de leur taille trop importante qui les empêche de traverser la membrane cellulaire. Comme la plupart des cibles thérapeutiques du cancer semblent être situées dans le milieu intracellulaire, ce serait un plus de pouvoir exploiter les propriétés des anticorps dans les cellules pour étudier et perturber l'activité de ces cibles. Néanmoins, l'utilisation des anticorps dans le milieu intracellulaire constitue un véritable challenge, notamment à cause de la membrane cellulaire et de l'environnement réducteur du cytoplasme. L'ensemble des travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont permis d'établir les bases de plusieurs stratégies innovantes d'immunociblage intracellulaire et de mettre en lumière l'importance des différentes étapes de validation d'anticorps ou de fragments dérivés utilisés comme anticorps intracellulaires. La vectorisation d'anticorps complets par électroporation, le développement d'un intracorps bispécifique original anti-PCNA et la mise au point d'une méthode de mutagenèse inspirée de l'hypermutation somatique constituent les principales avancées apportées par ce travail dans le domaine de la recherche technologique en immunobiotechnologie.

Mots clés : anticorps, scFv, intracorps, PCNA, gankyrin, immunociblage intracellulaire, maturation d'affinité, imagerie de cellules vivantes.

Résumé en anglais

Therapeutic antibodies are interesting molecules used to treat numerous pathologies such as cancer. Because of their size, their application is currently limited to the extracellular space. Indeed, antibodies cannot cross the cell membrane. Almost all therapeutic targets in cancer seem to be located inside cells, it would be beneficial to take advantage of antibodies in cells in order to neutralize the activity of these targets. The use of antibodies inside the cells is a real challenge, because of the cell membrane and the reducing environment of the cytoplasm. Several strategies of intracellular immunotargeting are presented in this thesis.

Keywords : antibody, scFv, intrabody, PCNA, gankyrin, intracellular immunotargeting, affinity maturation, live-cell imaging.