



**HAL**  
open science

# Développement et caractérisation d'outils immunologiques dirigés contre des récepteurs membranaires d'intérêt thérapeutique

Lucie Hartmann

► **To cite this version:**

Lucie Hartmann. Développement et caractérisation d'outils immunologiques dirigés contre des récepteurs membranaires d'intérêt thérapeutique. Biotechnologies. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ017 . tel-02337079

**HAL Id: tel-02337079**

**<https://theses.hal.science/tel-02337079>**

Submitted on 29 Oct 2019

**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.

# *Développement et caractérisation d'outils immunologiques dirigés contre des récepteurs membranaires d'intérêt thérapeutique*

*Lucie Hartmann*



*Université de Strasbourg, mai 2019*



**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**

**Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR 7242 CNRS  
Plateforme IMPReSs & Équipe RCPG, Douleur et Inflammation**

**THÈSE** présentée par :

**Lucie HARTMANN**

soutenue le 16 mai 2019

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

Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Développement et caractérisation  
d'outils immunologiques dirigés  
contre des récepteurs membranaires  
d'intérêt thérapeutique**

**THÈSE dirigée par :**  
Dr WAGNER Renaud

Ingénieur de Recherche CNRS, BSC, UMR7242, Strasbourg

**RAPPORTEURS :**  
Dr MIROUX Bruno  
Dr KNIAZEFF Julie

Directeur de Recherches INSERM, IBPC, UMR7099, Paris  
Chargée de Recherches CNRS, IGF, UMR5203, Montpellier

**EXAMINATEUR INTERNE :**  
Dr RITZENTHALER Christophe

Directeur de Recherches CNRS, IBMP, UPR2357, Strasbourg

---

**MEMBRES INVITÉS :**  
Dr LEBON Guillaume  
Dr BOUTIN Jean  
Dr FERRY Gilles

Chargé de Recherches CNRS, IGF, UMR5203, Montpellier  
Directeur de la Prospective, IdR Servier, Suresnes  
Responsable Biotechnologie, IdR Servier, Croissy-sur-Seine



Il faut « *frotter et limer sa cervelle contre celle d'autrui* »  
pour créer l'étincelle qui apporte la lumière.

*Montaigne*

*L'erreur n'annule pas la valeur de l'effort accompli.*

*Proverbe africain*



# Préface

Tous les organismes, qu'ils soient uni- ou pluricellulaires, ont la nécessité vitale de recueillir et d'échanger des informations avec le milieu environnant. Les acteurs de ce dialogue permanent entre le cytosol et le milieu extracellulaire sont des protéines enchâssées dans la membrane cellulaire, telles que les transporteurs membranaires, les canaux ioniques, les récepteurs à activité enzymatique, ou encore les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG).

Ces derniers, également appelés « récepteurs à sept domaines transmembranaires » (7TM) à cause de leur topologie commune, forment de loin et sans équivoque la plus grande famille de récepteurs. Depuis leur découverte dans les années 1970, l'intérêt de la communauté scientifique pour ce groupe n'a cessé de croître. Comme un témoignage du rôle clef qu'ont joué ces protéines dans l'Évolution, des homologues ont été identifiés parmi tous les règnes du vivant, des procaryotes aux eucaryotes supérieures, de manière totalement ubiquitaire. On en retrouve également dans certains génomes viraux<sup>1</sup>.

L'importance capitale de ces récepteurs est également illustrée par l'extrême variété physique et chimique de leurs ligands, incluant des photons, des ions, des molécules odorantes et gustatives, des vitamines, des hormones, des protéines, des neurotransmetteurs, mais également un grand nombre de métabolites intermédiaires<sup>2</sup>.

Chez l'Homme, on recense aujourd'hui plus de 800 RCPG différents<sup>3</sup>, et les gènes qui les codent représentent environ 2 % du génome<sup>4</sup>. Ces statistiques font de cette famille la plus grande parmi l'ensemble des protéines membranaires.

Dans ce contexte, il est facile de concevoir que les RCPG soient impliqués dans la régulation de la quasi-totalité des processus cellulaires, et que leur étude représente un enjeu scientifique majeur, tant en recherche fondamentale que thérapeutique. Certaines statistiques illustrent facilement ce propos : d'après des données collectées en 2015 par la FDA (*Food and Drug Administration*), les RCPG représentent à eux seuls 12 % de l'ensemble des cibles thérapeutiques chez l'Homme, et 33 % des médicaments sur le marché agissent sur cette classe de protéines<sup>5</sup>.





# Table des matières

Table des abréviations.....	7
Table des figures .....	11
Table des tableaux .....	13
Table des figures annexes.....	13
Introduction bibliographique .....	15
<b>1. Les Récepteurs Couplés aux Protéines G</b> .....	<b>17</b>
1.1. Généralités .....	17
1.2. Mode d'action .....	23
1.3. Les RCPG comme cible thérapeutique .....	26
1.4. Études moléculaires des RCPG .....	27
<b>2. Anticorps et RCPG</b> .....	<b>35</b>
2.1. Généralités structurales et fonctionnelles sur les anticorps conventionnels.....	35
2.2. Des outils utiles dans différents champs d'application .....	37
2.3. Les nanobodies, des fragments d'anticorps à haut potentiel .....	41
2.4. Les stratégies d'immunisation et leurs limites.....	50
<b>3. Le vecteur dérivé du Virus de la Forêt de Semliki (SFV)</b> .....	<b>53</b>
3.1. Le SFV, un virus du genre <i>alphavirus</i> .....	53
3.2. Les vecteurs d'expression dérivés.....	59
3.3. Applications décrites .....	62
<b>4. Description du projet</b> .....	<b>65</b>
4.1. En quelques mots .....	65
4.2. Les récepteurs cibles.....	65
4.3. La stratégie mise en œuvre.....	75
Matériel et Méthodes .....	<b>79</b>
<b>1. Préparation et manipulation des RCPG</b> .....	<b>81</b>
1.1. Clonage et expression dans la levure <i>Pichia pastoris</i> .....	81
1.2. Préparations membranaires .....	82
1.3. Purification .....	82
1.4. Reconstitution en nanodisques lipidiques.....	84
<b>2. Manipulation du système viral SFV</b> .....	<b>89</b>
2.1. Culture cellulaire.....	89
2.2. Production de virus recombinants .....	90
2.3. Caractérisation des virions .....	91
<b>3. Génération et criblage d'anticorps</b> .....	<b>94</b>
3.1. Immunisations.....	94
3.2. Techniques spécifiques aux nanobodies.....	95
3.3. Méthode immuno-enzymatique (ELISA) .....	101

<b>4. Techniques d'analyse.....</b>	<b>102</b>
4.1. Quantification des protéines.....	102
4.2. Électrophorèse.....	103
4.3. Tests de liaison de radioligand .....	104
4.4. Microscopie électronique à transmission .....	107
<b>CHAPITRE 1 Mise en place et caractérisation des outils moléculaires.....</b>	<b>109</b>
<b>1. Le récepteur de l'adénosine A<sub>2A</sub>.....</b>	<b>111</b>
1.1. Constructions recombinantes du récepteur AA <sub>2A</sub> et clonage dans la levure.....	111
1.2. Préparations membranaires de levures surexprimant différentes versions du récepteur AA <sub>2A</sub> .....	113
1.3. Le récepteur AA <sub>2A</sub> purifié en détergents .....	115
1.4. La reconstitution du récepteur AA <sub>2A</sub> en nanodisques lipidiques .....	117
1.5. Étude fonctionnelle et stabilité des objets purifiés .....	119
<b>2. Le récepteur de la mélatonine MT<sub>1</sub> .....</b>	<b>123</b>
2.1. Construction recombinante du récepteur MT <sub>1</sub> et clonage dans la levure.....	123
2.2. Préparations membranaires de levures surexprimant le récepteur MT <sub>1</sub> .....	125
2.3. Le récepteur MT <sub>1</sub> purifié en détergents .....	125
2.4. La reconstitution du récepteur MT <sub>1</sub> en nanodisques lipidiques .....	127
2.5. Étude fonctionnelle des objets purifiés.....	129
<b>3. Développement d'une approche de purification alternative : solubilisation des récepteurs à partir de cellules entières de levures .....</b>	<b>131</b>
<b>4. Les particules virales SFV recombinantes .....</b>	<b>133</b>
4.1. Mise en place du système avec une construction contrôle codant pour une protéine fluorescente .....	133
4.2. Production de particules virales codant pour les récepteurs d'intérêt .....	135
4.3. Stabilité des particules virales à -80°C.....	137
4.4. Purification des particules virales synthétisées .....	139
<b>5. Discussion des résultats.....</b>	<b>140</b>
5.1. Récepteurs purifiés et nanodisques lipidiques .....	140
5.2. Les particules virales .....	141
<b>CHAPITRE 2 Anticorps polyclonaux de souris .....</b>	<b>145</b>
<b>1. Preuve de concept : utilisation d'une construction contrôle .....</b>	<b>147</b>
1.1. Les protocoles d'immunisation mis en œuvre.....	147
1.2. Détection locale de la surexpression du récepteur .....	149
1.3. Caractérisation des échantillons sériques .....	149
1.4. Étude de la spécificité des anticorps générés par Western Blot.....	151
<b>2. Génération d'anticorps polyclonaux de souris dirigés contre les récepteurs d'intérêt.....</b>	<b>153</b>
2.1. Procédure d'immunisation.....	153
2.2. Campagne d'immunisation ciblée contre le récepteur AA <sub>2A</sub> .....	153
2.3. Campagne ciblée contre le récepteur MT <sub>1</sub> .....	159

<b>3. Discussion des résultats.....</b>	<b>161</b>
3.1. La surexpression locale des récepteurs d'intérêt.....	161
3.2. Comparaison de plusieurs procédés d'immunisation .....	162
3.3. La spécificité des anticorps générés.....	163
3.4. Le cas du récepteur MT <sub>1</sub> .....	163
3.5. Observation générale.....	164
<b>CHAPITRE 3 Génération et criblage de fragments d'anticorps de camélidés</b>	
<b>ou V<sub>H</sub>H .....</b>	<b>167</b>
<b>1. Immunisation et développement de la réponse immunitaire.....</b>	<b>169</b>
1.1. Cinétique de la procédure.....	169
1.2. Caractérisation des échantillons sériques .....	169
<b>2. Sélection des V<sub>H</sub>H.....</b>	<b>171</b>
2.1. Criblage de la banque de V <sub>H</sub> H par phage display .....	173
2.2. Criblage de clones individuels.....	177
2.3. Sélection et séquençage des clones d'intérêt.....	179
<b>3. Caractérisation de trois candidats nanobodies identifiés.....</b>	<b>181</b>
3.1. Production et purification .....	181
3.2. Caractérisation de l'interaction avec le récepteur cible.....	183
<b>4. Discussion des résultats.....</b>	<b>185</b>
4.1. La caractérisation du sérum de l'animal immunisé .....	185
4.2. Le criblage de la banque et la sélection de clones individuels.....	185
4.3. Perspectives générales .....	187
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>189</b>
<b>Annexes, Tableaux et Figures .....</b>	<b>193</b>
Annexe 1. Caractérisation des différentes formes du récepteur AA <sub>2A</sub> _MP2 par spectrométrie de masse .....	194
Annexe 2. Analyse de cellules HEK fluorescentes par cytométrie en flux .....	195
Annexe 3. Courbes de saturation des antigènes mis en jeu dans les tests ELISA.....	196
Annexe 4. Alignements des séquences des récepteurs AA <sub>2A</sub> et MT <sub>1</sub> et de leurs homologues .....	197
<b>Annexes, Publications Scientifiques.....</b>	<b>201</b>
Publication 1. Expression of Eukaryotic Membrane Proteins in <i>Pichia pastoris</i> .....	203
Publication 2. Direct Extraction and Purification from Protoplasts.....	205
Publication 3. Ultra-Miniaturized Weak Affinity Chromatography for Ligand Identification of Nanodiscs-Solubilized G-Protein Coupled Receptors.....	207
<b>Bibliographie.....</b>	<b>209</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>227</b>



# Table des abréviations

7TM : Sept domaines TransMembranaires

$A_{260}$  : Absorbance à 260 nm

$A_{280}$  : Absorbance à 280 nm

AA<sub>2A</sub> : Récepteur de l'Adénosine A<sub>2A</sub>

ADCC : Cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps

(*Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity*)

ADCP : Phagocytose médiée par les anticorps (*Antibody Dependent Cellular Phagocytosis*)

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ADP : Adénosine DiPhosphate

AMP : Adénosine MonoPhosphate

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

APS : Persulfate d'ammonium (*Ammonium PerSulfate*)

ARN : Acide RiboNucléique

ARNt : Acide RuboNucléique de transfert

ATP : Adénosine TriPhosphate

BCA : Dosage des protéines basé sur une réaction à l'acide bicinchonique

(*BiCinchoninic acid Assay*)

BHK : Lignée cellulaire issue de reins de bébé hamster (*Baby Hamster Kidney*)

BMGY : Milieu tamponné à base de glycérol (*Buffered Glycerol-Complex Medium*)

BMMY : Milieu tamponné à base de méthanol (*Buffered Methanol-Complex Medium*)

BRET : Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence

(*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*)

BSA : Albumine de sérum bovin (*Bovine Serum Albumine*)

CDC : Cytotoxicité médiée par le système du complément

(*Complement Dependant Cytotoxicity*)

CDR : Région de détermination de la complémentarité (*Complementary Determining Region*)

C<sub>H</sub> : Domaine constant de la chaîne lourde d'un anticorps (*Heavy Constant*)

CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate

CHS : Cholesteryl HemiSuccinate

C<sub>L</sub> : Domaine constant de la chaîne légère d'un anticorps (*Light Constant*)

CMC : Concentration Micellaire Critique

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

$C_t$  : Cycle de seuil

DDM : *n*-DoDécyl  $\beta$ -D-Maltoside

DM : Décyl  $\beta$ -D-Maltopyranoside

DMEM : Milieu de Eagle modifié par Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

dNTPs : Désoxyribonucléotides

DO<sub>600</sub> : Densité Optique à 600 nm

DTT : DiThioThréitol  
 ECL : Boucle extra-cellulaire (*Extra Cellular Loop*)  
 EDTA : Acide ÉthylèneDiamineTétraAcétique  
 eGFP : Version améliorée de la protéine fluorescente verte  
 (*enhanced Green Fluorescent Protein*)  
 ELISA : Méthode immuno-enzymatique (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*)  
 Fab : Fragment de liaison à l'antigène (*Fragment antigen-binding*)  
 F<sub>C</sub> : Fragment Cristallisable  
 FDA : Food and Drug Administration  
 Fos14 : Fos-Choline-14 ou n-Tetradecylphosphocholine  
 FR : Région charpente (*FRamework*)  
 FRET : Transfert d'énergie par résonance de type Förster  
 (*Förster Resonance Energy Transfer*)  
 FSC : Forward SCatter  
 F<sub>V</sub> : Fragment Variable  
 GABA<sub>B</sub>R : Récepteur GABAergique de type B  
 GDP : Guanosine DiPhosphate  
 GIRK : Canaux potassiques rectifiants entrants couplés aux protéines G  
 (*G-Protein Coupled Inwardly-Rectifying Potassium Channel*)  
 GPS : Site de clivage protéolytique associé aux RCPCG  
 (*G Protein Coupled Receptor Proteolytic Site*)  
 GRK : Kinase associée aux RCPCG (*GPCR Associated Kinase*)  
 GTP : Guanosine TriPhosphate  
 HA : Hémagglutinine  
 hcAbs : Anticorps à chaîne unique (*heavy-chain Anti bodies*)  
 HEK : Cellules rénales embryonnaires humaines (*Human Embryonic Kidney*)  
 HEPES acide 4-(2-HydroxyÉthyl)-1-Pipérazine Éthane Sulfonique  
 HNB : Tampon HEPES NaCl BSA  
 HRP : Peroxydase du raifort (*Horseradish Peroxydase*)  
 ICL : Boucle intra-cellulaire (*Intra Cellular Loop*)  
 Ig : Immunoglobuline  
 IPTG : IsoPropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside  
 K<sub>D</sub> : Constante de dissociation  
 K<sub>i</sub> : Constante d'inhibition  
 kinases ERK : Kinases régulées par un signal extracellulaire  
 (*Extracellular signal Regulated Kinases*)  
 KP<sub>i</sub> : Tampon phosphate  
 LB : Bouillon lysogénique (*Lysogeny Broth*)  
 LCP : Phase lipidique cubique (*Lipidic Cubic Phase*)  
 LMNG : Lauryl Maltose Neopentyl Glycol ou 2,2-didecylpropane-1,3-bis-β -D-maltopyranoside  
 mAb : Anticorps monoclonal (*monoclonal Antibody*)  
 MAP-kinases : Kinases activées par des agents mitogènes (*Mitogen Activated Protein Kinases*)  
 MEM : Milieu essentiel minimum (*Minimum Essential Medium*)  
 MePNet : Groupement d'étude des protéines membranaires (*Membrane Protein Network*)

MET : Microscopie Électronique en Transmission  
 mGluR : Récepteur Métabotrope au Glutamate  
 MOI : Multiplicité d'infection (*Multiplicity Of Infection*)  
 MSP : Protéine d'échafaudage membranaire (*Membrane Scaffold Protein*)  
 MT<sub>1</sub> : Récepteur de la Mélatonine de type 1  
 NIH : *National Institutes of Health*  
 PBS : Tampon phosphate salin (*Phosphate Buffer Saline*)  
 PBST : Tampon salin phosphate additionné de tween (*Phosphate Buffer Saline Tween*)  
 PEG : PolyÉthylèneGlycol  
 PEI : PolyÉthylèneImine  
 PMSF : Fluorure de PhénylMéthylSulfonyle  
 poly(A) : Poly-Adénosine  
 POPC : PhOsPhatidylCholine  
 POPG : Phosphatidylglycérol  
 qPCR : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative  
 (*quantitative Polymerase Chain Reaction*)  
 RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G  
 Rho-GEF : Facteurs d'échange de nucléotides guanyliques de la GTPase Rho  
 (*Rho GTP Exchange Factor*)  
 RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
 RMN-STD : Résonance magnétique nucléaire de différence de transfert de saturation  
 (*Saturation-Transfer Difference Nuclear Magnetic Resonance*)  
 RT-qPCR : Transcription réverse couplée à une réaction de polymérisation en chaîne  
 quantitative (*Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*)  
 scFv : Fragment variable à chaîne unique (*Single-chain variable Fragment*)  
 SCN : Noyau SupraChiasmatisque  
 SDS : Sodium Dodécyl Sulfate  
 SDS-PAGE : Électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide  
 (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)  
 SFV : Virus de la Forêt de Semliki (*Semliki Forest Virus*)  
 SIN : Virus Sindbis  
 SMA : (Copolymère de) styrène et d'acide maléique (*Styrene-Maleic Acid*)  
 SPA : Analyse de proximité par scintillation (*Scintillation Proximity Assay*)  
 SPR : Résonance plasmonique de surface (*Surface Plasmon Resonance*)  
 SSC : Side Scatter  
 TB : Bouillon Terrific (*Terrific Broth*)  
 TE : Tampon Tris, EDTA  
 TEMED : TÉtraMéthylÉthylèneDiamine  
 TES : Tampon Tris, EDTA, Sucrose  
 TEV : Virus de la gravure du tabac (*Tobacco Etch Virus*)  
 TLR : Récepteur de type Toll (*Toll Like Receptor*)  
 T<sub>m</sub> : Température de semi-dénaturation  
 TM : Domaine TransMembranaire  
 TMB : 3,3',5,5'-TétraMéthylBenzidine



TNE : Tampon Tris, NaCl, EDTA  
TNG : Tampon Tris, NaCl, Glycérol  
TNGE : Tampon Tris, NaCl, Glycérol, EDTA  
TS : Tampon Tris, Sucrose  
UPR : Réponse liée à l'accumulation de protéines mal repliées (*Unfolded Protein Response*)  
VEE : Virus de l'Encéphalite Équine Vénézuélienne  
V<sub>H</sub> : Domaine variable de la chaîne lourde d'un anticorps (*Heavy Variable*)  
V<sub>H</sub>H : Domaine variable des anticorps à chaîne unique de camélidés  
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine  
V<sub>L</sub> : Domaine variable de la chaîne légère d'un anticorps (*Light Variable*)  
YNB : Base levure-azote (*Yeast Nitrogen Base*)  
YPG : Milieu extrait de levures, peptone, glucose (*Yeast Peptone Glucose*)

# Table des figures

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique de la structure conservée des RCPG .....	18
<b>Figure 2</b> : Transduction du signal médié par les RCPG .....	22
<b>Figure 3</b> : Nombre cumulé de structures de récepteurs uniques résolues disponibles .....	26
<b>Figure 4</b> : Solubilisation d'une protéine membranaire à l'aide de détergents .....	30
<b>Figure 5</b> : Modèle de la rhodopsine bactérienne reconstituée dans un nanodisque .....	32
<b>Figure 6</b> : Structure typique d'un anticorps de type IgG .....	36
<b>Figure 7</b> : Représentation schématique de différents formats de fragments d'anticorps .....	39
<b>Figure 8</b> : Comparaison de la structure des anticorps conventionnels et des anticorps à chaîne unique .....	41
<b>Figure 9</b> : Représentation schématique du domaine V <sub>H</sub> H d'un anticorps à chaîne unique ..	42
<b>Figure 10</b> : Structures tridimensionnelles du lysozyme de poulet en complexe avec son substrat enzymatique et des fragments d'anticorps .....	44
<b>Figure 11</b> : Complexe entre le récepteur $\beta_2$ -adrénergique et le nanobody Nb80 .....	44
<b>Figure 12</b> : Représentation des étapes clés du clonage d'une banque de V <sub>H</sub> H au sein d'un phagemide codant pour le bactériophage M13 .....	48
<b>Figure 13</b> : Représentation schématique d'un cycle de phage display .....	48
<b>Figure 14</b> : Cycle viral du SFV, et plus généralement des alphavirus .....	54
<b>Figure 15</b> : Organisation du génome du SFV et réplication virale .....	56
<b>Figure 16</b> : Production de particules SFV recombinantes <i>in cellulo</i> .....	58
<b>Figure 17</b> : Structures de l'adénosine et de la caféine .....	66
<b>Figure 18</b> : Dendrogramme présentant le degré d'identité de séquence entre plusieurs homologues de récepteurs de l'adénosine provenant de différentes espèces .....	66
<b>Figure 19</b> : Structure du récepteur AA <sub>2A</sub> en interaction avec le Fab2838 .....	70
<b>Figure 20</b> : Structure de la mélatonine .....	70
<b>Figure 21</b> : Représentation schématique de la séquence protéique et de la structure secondaire du récepteur MT <sub>1</sub> humain .....	72
<b>Figure 22</b> : Analyse Western Blot des préparations membranaires de levure exprimant différentes versions recombinantes du récepteur AA <sub>2A</sub> .....	112
<b>Figure 23</b> : Affinité de liaison de ligands antagonistes et agonistes sur des préparations membranaires de levure exprimant le récepteur AA <sub>2A</sub> _MP3 .....	112
<b>Figure 24</b> : Purification du récepteur AA <sub>2A</sub> _MP2 .....	114
<b>Figure 25</b> : Purification du récepteur AA <sub>2A</sub> _MP3 .....	114
<b>Figure 26</b> : Reconstitution du récepteur AA <sub>2A</sub> en nanodisques lipidiques .....	116
<b>Figure 27</b> : Image de MET du récepteur AA <sub>2A</sub> _MP3 reconstitué en nanodisques .....	118
<b>Figure 28</b> : Caractérisation pharmacologique du récepteur AA <sub>2A</sub> _MP3 purifié en DDM ..	118
<b>Figure 29</b> : Caractérisation pharmacologique des nanodisques AA <sub>2A</sub> _MP3 .....	118
<b>Figure 30</b> : Stabilité du récepteur AA <sub>2A</sub> purifié en détergent et reconstitué en nanodisques lipidiques à température ambiante .....	120
<b>Figure 31</b> : Étude de la stabilité des nanodisques AA <sub>2A</sub> _MP3 à -80°C .....	122
<b>Figure 32</b> : Analyse Western Blot des préparations membranaires de levure exprimant le récepteur recombinant MT <sub>1</sub> _MP2 .....	122
<b>Figure 33</b> : Purification du récepteur MT <sub>1</sub> _MP2 .....	124

<b>Figure 34</b> : Reconstitution du récepteur MT <sub>1</sub> _MP2 en nanodisques lipidiques .....	126
<b>Figure 35</b> : Caractérisation pharmacologique du récepteur MT <sub>1</sub> _MP2 .....	128
<b>Figure 36</b> : Observation de cellules HEK et BHK-21 infectées par des virus SFV-eGFP .	132
<b>Figure 37</b> : Infection de cellules HEK par trois lots de virus SFV-eGFP .....	132
<b>Figure 38</b> : Courbes de saturation de radioligand sur préparations membranaires de cellules HEK infectées par des virions SFV-AA <sub>2A</sub> 2gC, SFV-AA <sub>2A</sub> et SFV-MT <sub>1</sub> .....	136
<b>Figure 39</b> : Analyse Western Blot des préparations membranaires de cellules HEK infectées par des virus SFV-AA <sub>2A</sub> 2gC.....	136
<b>Figure 40</b> : Courbes de saturation de radioligand sur des préparations membranaires de cellules HEK infectées par des virions SFV-MT <sub>1</sub> stockés à -80°C pendant 20 mois .....	137
<b>Figure 41</b> : Analyse de virus SFV-eGFP purifié.....	138
<b>Figure 42</b> : Cinétique d'injections de la campagne d'immunisation de souris avec des virus recombinants SFV-AA <sub>2A</sub> 2gC.....	146
<b>Figure 43</b> : Détection de la surexpression du récepteur AA <sub>2A</sub> .....	148
<b>Figure 44</b> : Détection d'anticorps spécifiques au récepteur AA <sub>2A</sub> dans le sérum des souris inoculées avec du virus SFV-AA <sub>2A</sub> 2gC.....	148
<b>Figure 45</b> : Caractérisation de l'immunoréactivité du sérum polyclonal par Western Blot	150
<b>Figure 46</b> : Cinétique d'injections de la campagne d'immunisation de souris avec des virus recombinants SFV-AA <sub>2A</sub> et SFV-MT <sub>1</sub> .....	152
<b>Figure 47</b> : Détection de la surexpression du récepteur AA <sub>2A</sub> .....	152
<b>Figure 48</b> : Détection d'anticorps spécifiques au récepteur AA <sub>2A</sub> dans le sérum des souris inoculées avec du virus SFV-AA <sub>2A</sub> .....	154
<b>Figure 49</b> : Détection d'anticorps spécifiques au récepteur AA <sub>2A</sub> dans le sérum des souris inoculées avec du virus SFV-AA <sub>2A</sub> par un test ELISA sur billes magnétiques.....	154
<b>Figure 50</b> : Titration du sérum final de la souris 1 .....	156
<b>Figure 51</b> : Détection de la surexpression du récepteur MT <sub>1</sub> .....	158
<b>Figure 52</b> : Détection d'anticorps spécifiques au récepteur MT <sub>1</sub> dans le sérum des souris inoculées avec des SFV recombinants (ELISA sur préparations membranaires).....	160
<b>Figure 53</b> : Détection d'anticorps spécifiques au récepteur MT <sub>1</sub> dans le sérum des souris inoculées avec des SFV recombinants (ELISA sur récepteur purifié) .....	160
<b>Figure 54</b> : Cinétique d'injections de la campagne d'immunisation d'un alpaga avec des virus recombinants SFV-AA <sub>2A</sub> .....	168
<b>Figure 55</b> : Titration du sérum final de l'alpaga.....	168
<b>Figure 56</b> : Procédure de phage display avec des nanodisques .....	171
<b>Figure 57</b> : Phage display mettant en jeu des nanodisques lipidiques AA <sub>2A</sub> _MP3 .....	172
<b>Figure 58</b> : Phage display mettant en jeu du récepteur AA <sub>2A</sub> _MP2 purifié en détergents et immobilisé sur des billes magnétiques.....	174
<b>Figure 59</b> : Criblage par phage display mettant en jeu du récepteur AA <sub>2A</sub> _MP2 purifié en détergents et immobilisé au fond d'une plaque ELISA.....	174
<b>Figure 60</b> : Visualisation d'un enrichissement.....	176
<b>Figure 61</b> : Évaluation de la spécificité des V <sub>H</sub> H individuels sélectionnés par test ELISA	176
<b>Figure 62</b> : Analyse SDS-PAGE des V <sub>H</sub> H 1, 2 et 3 purifiés.....	180
<b>Figure 63</b> : Évaluation de l'interaction des V <sub>H</sub> H purifiés avec le récepteur AA <sub>2A</sub> .....	182

# Table des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Catalogue des constructions de MSP disponibles .....	32
<b>Tableau 2</b> : Lignées cellulaires et cultures primaires infectées par des particules SFV .....	61
<b>Tableau 3</b> : Oligonucléotides utilisés pour la titration des virus recombinants .....	92
<b>Tableau 4</b> : Liste des anticorps courants et dilutions d'usage .....	101
<b>Tableau 5</b> : Coefficients d'extinction molaire et masse molaire des protéines courantes ...	103
<b>Tableau 6</b> : Composition des tampons de liaison .....	104
<b>Tableau 7</b> : Construits recombinants de la protéine AA <sub>2A</sub> exprimée dans la levure.....	110
<b>Tableau 8</b> : Ligands spécifiques au récepteur de l'adénosine A <sub>2A</sub> utilisés dans l'étude.....	112
<b>Tableau 9</b> : Affinité du récepteur AA <sub>2A</sub> _MP3 purifié en détergents et reconstitué en nanodisques lipidiques pour le [ <sup>3</sup> H]-ZM-241385, et nombre total de sites de liaison.....	120
<b>Tableau 10</b> : Affinité du récepteur AA <sub>2A</sub> _MP3 purifié en détergents et reconstitué en nanodisques lipidiques pour différents ligands.....	120
<b>Tableau 11</b> : Construit recombinant de la protéines MT <sub>1</sub> exprimée dans la levure.....	122
<b>Tableau 12</b> : Construits des protéines d'intérêt clonées dans les vecteurs SFV .....	132
<b>Tableau 13</b> : Titres des lots de virus recombinants synthétisés .....	136
<b>Tableau 14</b> : Titration des sera finaux des souris 1, 2 et 4.....	156
<b>Tableau 15</b> : Conditions expérimentales finales du phage display mettant en jeu des nanodisques AA <sub>2A</sub> _MP3 immobilisés sur des billes magnétiques.....	172
<b>Tableau 16</b> : Variations des conditions expérimentales du phage display mettant en jeu des nanodisques AA <sub>2A</sub> _MP3 immobilisés sur des billes magnétiques.....	172
<b>Tableau 17</b> : Conditions expérimentales du phage display mettant en jeu du récepteur AA <sub>2A</sub> _MP2 immobilisé sur des billes magnétiques.....	174
<b>Tableau 18</b> : Conditions expérimentales du phage display mettant en jeu du récepteur AA <sub>2A</sub> _MP2 immobilisé au fond d'une plaque ELISA.....	174
<b>Tableau 19</b> : Caractéristiques des trois V <sub>H</sub> H sélectionnés suite au criblage de la banque .	178

# Table des figures annexes

<b>Figure annexe 1</b> : Analyse peptidique du récepteur AA <sub>2A</sub> _MP2 purifié en détergents par spectrométrie de masse .....	194
<b>Figure annexe 2</b> : Courbe de saturation du récepteur AA <sub>2A</sub> _MP3 en test ELISA .....	196
<b>Figure annexe 3</b> : Courbe de saturation du récepteur MT <sub>1</sub> _MP2 en test ELISA.....	196
<b>Figure annexe 4</b> : Comparaison des séquences protéiques des récepteurs AA <sub>2A</sub> humain, murin et d'alpaga .....	197
<b>Figure annexe 5</b> : Comparaison des séquences protéiques des récepteurs MT <sub>1</sub> humain, murin et d'alpaga .....	198



# Introduction bibliographique

*Je voudrais vivre pour étudier, non pas étudier pour vivre.*

*Francis Bacon*



# 1. Les Récepteurs Couplés aux Protéines G

## 1.1. Généralités

### 1.1.1. Un peu d'histoire

La théorie de l'existence de « récepteurs membranaires » a émergé au début des années 1900, notamment avec les travaux du physiologiste britannique John Newport Langley. C'est suite à ses expériences, basées sur l'étude de l'effet d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs cholinergiques et adrénergiques sur la contraction musculaire, qu'il a mis en évidence l'existence d'une « substance réceptive ». D'après ses observations, celle-ci permettait aux tissus de fournir une réponse spécifique aux composés mis en jeu<sup>6-9</sup>.

Cette théorie a été étoffée pendant près de 50 ans par de nombreux physiologistes et pharmacologistes. Ils ont développé, entre autres, les notions de dose-réponse, d'affinité et d'efficacité, pour donner naissance à la pharmacologie classique des récepteurs telle que nous la connaissons aujourd'hui<sup>10</sup>.

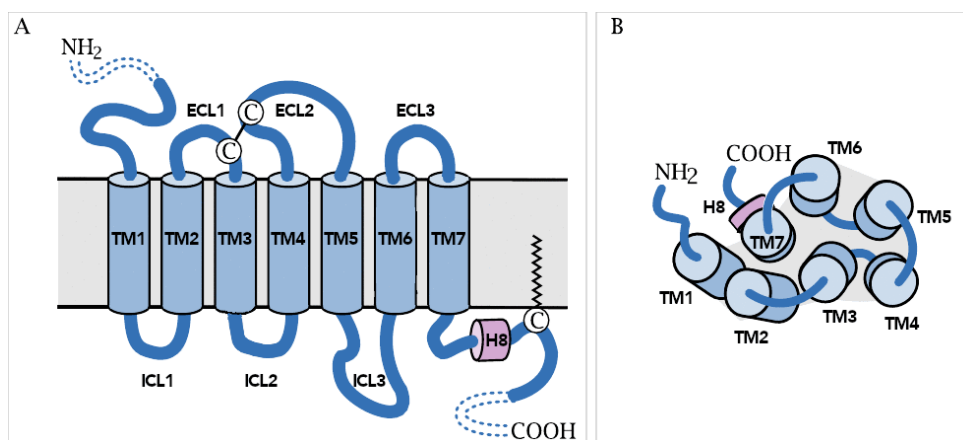
Dans les années 1960-1970, le travail conjoint des pharmacologistes et des biochimistes a permis de mettre en évidence les premiers acteurs des voies de transduction du signal. C'est à cette période qu'ont été découvertes la protéine  $G_s$ <sup>11</sup>, l'adénylate cyclase, l'Adénosine Monophosphate cyclique (AMPc)<sup>12</sup> ainsi que la première protéine kinase AMPc dépendante<sup>13</sup>. Ces avancées ont permis de reconstituer la première cascade métabolique responsable de la transduction d'un signal de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, ouvrant le champ de l'étude des récepteurs membranaires à l'échelle cellulaire.

Malgré tout, l'existence même de récepteurs en tant qu'entité moléculaire est restée très controversée jusqu'aux années 1970. C'est avec le développement des tests de liaison de radioligand d'une part, et des méthodes de purification des récepteurs d'autre part<sup>14-16</sup>, que l'étude moléculaire des récepteurs a réellement pris son essor. Le récepteur nicotinique de l'acétylcholine ainsi que celui de la rhodopsine ont été les premiers récepteurs modèles de ces études moléculaires, notamment grâce à leur présence en abondance dans des échantillons biologiques. Le clonage du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique en 1986<sup>17</sup> a marqué un autre grand tournant dans l'étude moléculaire des RCPG. En effet, la découverte des fortes analogies entre la rhodopsine — dont la séquence protéique a été déterminée en 1982<sup>18</sup> — et le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, ainsi que le clonage d'autres récepteurs présentant les mêmes analogies, a permis d'identifier les sept domaines transmembranaires comme un marqueur clef de ce type de protéines, fondant ainsi la superfamille des récepteurs à 7TM<sup>19</sup>. A partir de là, tous les candidats présentant sept séquences de 25 à 35 résidus consécutifs ayant un haut degré théorique d'hydrophobicité ont rejoint leurs rangs, et le groupe s'est agrandi de manière exponentielle<sup>20</sup>. Le deuxième critère d'appartenance à cette famille est la capacité des



protéines à transmettre un signal par le biais des protéines G. Cette aptitude est néanmoins plus délicate à mettre en évidence, et reste encore aujourd'hui à démontrer pour de nombreux candidats.

Une fois les séquences génétiques connues, la génération et l'étude de récepteurs chimériques et de mutants ponctuels a permis de progresser vers la compréhension du mode d'action des RCPG et d'élucider les premières relations structure-fonction<sup>21</sup>.



**Figure 1 : Représentation schématique de la structure conservée des RCPG.**  
**A : Représentation planaire.** L'extrémité amino-terminale (-NH<sub>2</sub>) extracellulaire précède les sept hélices transmembranaires (TM1 à TM7), reliées par trois boucles extracellulaires (ECL1 à ECL3) et trois boucles intracellulaires (ICL1 à 3). Un pont disulfure conservé peut relier les boucles ECL1 et ECL2. La courte hélice intracellulaire H8 précède souvent un domaine d'ancrage à la membrane, localisé du côté de l'extrémité carboxy-terminale (-COOH). **B : Vue du dessus (face extracellulaire).** Les TM sont organisés de manière circulaire dans la membrane, en suivant une répartition anti-horaire. La cavité formée entre les hélices comporte, pour beaucoup de récepteurs, le site de liaison du ligand.  
 Figure adaptée de Palmer *et al.*<sup>22</sup>

### 1.1.2. Généralités structurales

Malgré leur grande diversité fonctionnelle, les RCPG partagent des caractéristiques structurales fortes. Ils sont constitués d'une extrémité N-terminale extracellulaire, d'un domaine central comprenant les sept segments transmembranaires (communément appelés TM1 à 7), et d'une extrémité C-terminale intracellulaire. Comme présenté en **Figure 1**, les hélices transmembranaires s'organisent de manière antihoraire<sup>23</sup> — du point de vue extracellulaire — et sont reliées par trois boucles extracellulaires (ECL1 à 3) et trois boucles intracellulaires (ICL1 à 3). Deux cystéines hautement conservées dans les boucles ECL1 et ECL2 permettent la formation d'un pont disulfure ayant un rôle stabilisant.

Un huitième domaine  $\alpha$ -hélical (appelé hélice H8) localisé après le TM7, du côté C-terminal, est orienté parallèlement la surface interne de la membrane. Il est fréquemment suivi par un domaine de palmitoylation qui permet un ancrage supplémentaire à la membrane<sup>24</sup>.

### 1.1.3. Classification<sup>3</sup>

Historiquement, différents systèmes de classification ont été utilisés pour rassembler les RCPG en sous-familles et ainsi mieux les appréhender. Le système le plus ancien et le plus consensuel a été proposé par Kolakowski en 1994<sup>25</sup> et se base sur des homologies de séquence pour regrouper l'ensemble des récepteurs connus — qu'ils soient propres aux vertébrés ou aux invertébrés — en six classes, indexées de A à F.

L'accumulation de données structurales, fonctionnelles et phylogénétiques a donné lieu à différentes variantes et enrichissements de ce système de classification<sup>3,26</sup>. Cependant, quel que soit le système considéré, les principaux regroupements décrits ci-dessous restent notablement conservés.

#### ***Classe A : Les récepteurs « Rhodopsin-like »***

Cette classe, très largement majoritaire, comprend plus de 90 % des RCPG, avec des spécificités de ligands extrêmement variées. Elle peut être sous-divisée en quatre groupes en suivant des considérations phylogénétiques. Ceux-ci sont respectivement nommés  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ .

De manière non exhaustive, on y retrouve les récepteurs de l'odorat et de la vision ; mais aussi des récepteurs peptidiques, aminergiques et purinergiques, les récepteurs des chimiokines ou encore les récepteurs des glycoprotéines.

Les récepteurs de la mélatonine et de l'adénosine font partie de cette classe, et plus spécifiquement du groupe  $\alpha$ .

En conséquence de cette grande diversité, ce groupe est également celui qui compte le plus grand nombre de récepteurs ciblés par des molécules thérapeutiques<sup>27</sup>.

Les premiers modèles structuraux de RCPG ont été établis à partir de récepteurs de classe A, avec d'abord le récepteur à la rhodopsine bovine en 2000<sup>23</sup>, puis le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique en 2007<sup>28,29</sup>. La plupart des récepteurs de cette classe présentent des extrémités N-terminale et C-terminale courtes, aussi les différences majoritaires résident dans les TM<sup>30</sup>.

### ***Classe B : les récepteurs à la sécrétine et les récepteurs d'adhésion***<sup>30,31</sup>

La sous-famille des récepteurs à la sécrétine, nommée suite à l'identification de son premier membre — à savoir le récepteur de la sécrétine SCTR du rat —, est composée de 15 récepteurs humains. Leur principal point commun est leur domaine de liaison hormonal extracellulaire. D'une taille d'environ 120 acides aminés, ce domaine lie des hormones peptidiques, et sa stabilité est principalement garantie par trois ponts disulfures hautement conservés. C'est également dans sa séquence protéique que résident les principales différences entre les 15 récepteurs de la sous-famille.

Les récepteurs d'adhésion constituent la deuxième plus grande famille de RCPG chez l'Homme, avec 33 membres. Ils présentent certaines similarités de séquence avec les récepteurs à la sécrétine qui justifient leur regroupement au sein de la même classe, mais diffèrent sur des critères phylogénétiques. La grande majorité de ces récepteurs sont encore orphelins, cependant les quelques ligands endogènes identifiés sont des molécules de la matrice extracellulaire. Leur longue extrémité N-terminale, très variable d'un récepteur à l'autre, comprend à sa base un site d'auto-clivage protéolytique (nommé GPS pour *G-Protein Coupled Receptor Proteolytic Site*). La coupure a lieu au moment de la maturation du récepteur dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi, et permet d'obtenir deux sous-unités liées de manière non covalente. La partie extracellulaire du récepteur a également la propriété d'être hautement glycosylée, ce qui permet la formation de structures rigides et proéminentes à la surface de la membrane plasmique.

### ***Classe C : les récepteurs du glutamate***

La classe C est composée de 22 récepteurs, dont les plus connus sont les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) et les récepteurs gabaergiques de type B (GABA<sub>B</sub>R). Cette famille contient également des récepteurs calciques ainsi que des récepteurs des phéromones, ces derniers étant très représentés chez les rongeurs.

Le domaine de fixation au ligand, situé du côté N-terminal, est particulièrement proéminent (avec une taille d'environ 600 résidus). Il est constitué de deux lobes, et séparé de la partie transmembranaire par une région charnière riche en cystéines. Le mécanisme de liaison a été comparé à celui de la Vénus attrape-mouche<sup>a</sup> : le ligand se fixe dans une cavité formée par le rapprochement des deux lobes, ce qui permet l'activation du récepteur.

---

<sup>a</sup> En anglais *Venus flytrap mechanism*, en référence à la plante carnivore *Dionaea muscipula*

L'autre caractéristique particulière de certains récepteurs de classe C est leur dimérisation obligatoire<sup>32</sup>. L'étude de ce phénomène a conduit à beaucoup d'hypothèses portant également sur les récepteurs des autres classes.

***Classe D : les récepteurs fongiques des phéromones sexuelles***

Cette famille de récepteurs, propre au règne fongique, est sous-divisée en deux sous-familles, Ste2 et Ste3, qui ont entre elles peu de similarités structurales. Ses membres sont notamment impliqués dans les mécanismes de reproduction sexuée des levures et champignons<sup>33</sup>.

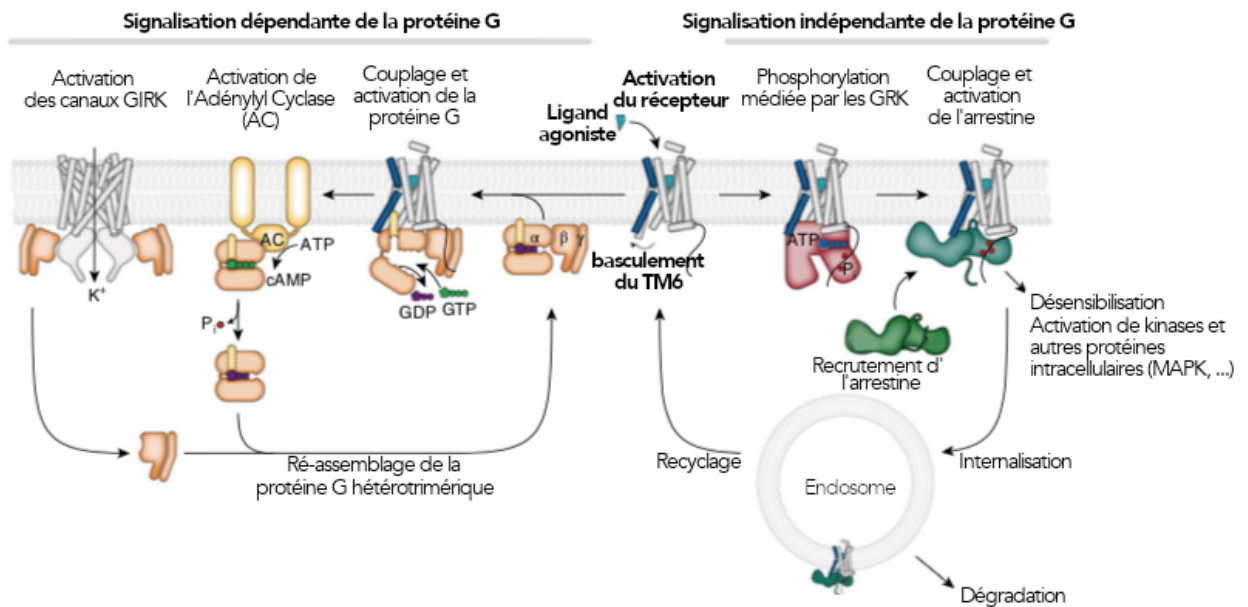
***Classe E : les récepteurs de l'AMPC***

Les récepteurs de l'AMPC font partie des RCPG ancestraux. Ils sont retrouvés chez les amibes et d'autres organismes unicellulaires comme les alvéolés, ainsi que dans le règne fongique et chez certaines plantes. Ils ont été perdus au cours de l'évolution et sont totalement absents chez les vertébrés<sup>34</sup>.

***Classe F : les récepteurs Frizzled et Smoothened***

Les 10 récepteurs Frizzled humains ont été identifiés par homologie au récepteur Frizzled de la drosophile, impliqué dans les mécanismes de polarité planaire mis en jeu au cours du développement<sup>35</sup>. Leurs ligands endogènes sont les glycoprotéines sécrétées de la famille Wnt. Le récepteur Smoothened, quant à lui, est activé indirectement par les protéines de la famille Hedgehog, qui se lient à la protéine transmembranaire Patched. On retrouve chez ces récepteurs les cystéines conservées dans les boucles ECL1 et ECL2. Leur extrémité N-terminale, d'une longueur de 200 à 320 acides aminés, contient un domaine de liaison au ligand. D'autres sites de fixation sont formés au niveau des boucles extracellulaires entre les TM.

Ces récepteurs sont notamment la cible du Vantictumab, un anticorps monoclonal qui a démontré son efficacité dans les thérapies anti-cancéreuses jusqu'en phase clinique 1b<sup>36</sup>. L'abandon du développement clinique en 2017 est à attribuer à un choix stratégique des sociétés porteuses, OncoMed Pharmaceuticals et Bayer.



**Figure 2 : Transduction du signal médié par les RCPG.** Les récepteurs régulent de nombreuses cascades de signalisation dépendantes ou non de la protéine G. La liaison d'un ligand agoniste active le récepteur en induisant de nombreux changements conformationnels, dont un mouvement extérieur du TM6 (en bleu). Le récepteur activé peut se lier à de nombreux partenaires intracellulaires tels que les protéines G (en orange), les GRK (en rouge) et les arrestines (inactives en vert, actives en bleu-vert). Le couplage d'une protéine G hétérotrimérique au récepteur engendre son activation qui se traduit par un échange de nucléotide (GDP pour GTP), puis une dissociation de la protéine G en sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$ . Toutes deux peuvent réguler différents effecteurs intracellulaires : activation de l'adénylyl cyclase par  $G\alpha$  (AC, en jaune), interaction avec les canaux GIRK par  $G\beta\gamma$  (en gris). La phosphorylation du GTP en GDP et la réassociation de la protéine G hétérotrimérique met fin au cycle de signalisation. L'activation du récepteur peut aussi conduire à sa phosphorylation par les GRK et au recrutement de l'arrestine. Le couplage de l'arrestine au récepteur conduit à son internalisation ainsi qu'à l'activation d'autres effecteurs intracellulaires comme les MAP kinases. Figure adaptée de Hilger *et al.*<sup>37</sup>

## 1.2. Mode d'action

### 1.2.1. Mécanisme d'activation

La fixation d'un ligand sur son récepteur engendre de multiples réorganisations conformationnelles des segments transmembranaires.

Lors de l'activation du récepteur, les modifications les plus conservées découlent d'un basculement du TM6 vers l'extérieur. Cela permet de démasquer une poche de liaison du côté cytosolique, la rendant accessible aux acteurs cellulaires de la transduction du signal.

L'accumulation des données biophysiques et structurales nous permet aujourd'hui de ne plus envisager l'activation des RCPG comme un simple état bimodal *on-off*, mais plutôt comme un système complexe au sein duquel coexistent de manière dynamique de nombreux états conformationnels distincts. Les ligands sont capables de réguler l'activité du récepteur en favorisant la stabilisation d'un état conformationnel donné. Cela permet d'une part de moduler le niveau de réponse, et d'autre part d'engendrer une signalisation biaisée, c'est-à-dire d'activer une des voies de signalisation de manière privilégiée<sup>37</sup>.

Les différents ligands sont qualifiés en fonction de leur efficacité, c'est-à-dire du type et de l'intensité de la réponse engendrée par leur fixation. Ainsi, un agoniste complet conduit à l'activation totale d'une voie de signalisation donnée, par opposition à un agoniste partiel. La fixation d'un antagoniste n'a aucun effet sur l'activité basale de son récepteur. Un antagoniste inverse, quant à lui, diminue son activité constitutive. Enfin, un ligand dit « biaisé » est capable d'activer préférentiellement une voie de signalisation donnée, ce qui permet d'obtenir une réponse cellulaire distincte de celle induite par un ligand de référence, en général le ligand endogène du récepteur<sup>38</sup>.

Cependant, la stabilisation de la conformation pleinement active du récepteur requiert également le couplage d'un partenaire intracellulaire, qui va jouer le rôle de transducteur du signal. Il en existe trois grands groupes : les protéines G, les arrestines, et les kinases associées aux RCPG (GRK) (**Figure 2**).

### 1.2.2. Signalisation médiée par l'activation de la protéine G

La cascade de signalisation « classique » des RCPG est médiée par l'activation de la protéine G. Elle aboutit à un signal intracellulaire faisant intervenir une cascade de phosphorylation protéique et/ou à une régulation des concentrations ioniques de la cellule.

La protéine G est composée de trois sous-unités,  $G\alpha$ ,  $G\beta$  et  $G\gamma$ . La sous-unité  $G\alpha$  a elle-même un effet allostérique positif sur la liaison du ligand au récepteur<sup>39</sup>. Chez l'Homme, il existe 21 sous-unités  $\alpha$ , six sous-unités  $\beta$  et 13 sous-unités  $\gamma$ . Cette variété

permet la formation d'un grand nombre de combinaisons, ce qui contribue à expliquer la complexité et la diversité des cascades de signalisation qui en découlent<sup>40</sup>.

Dans son état inactif, la sous-unité  $G\alpha$ , qui comprend un domaine GTPasique, est liée à une molécule de GDP (guanosine diphosphate), ce qui permet son association avec un dimère  $G\beta\gamma$ . L'interaction de cet hétérotrimère inactif avec un récepteur activé entraîne une accélération de la dissociation du GDP, rapidement remplacé par une molécule de GTP (guanosine triphosphate), présent en grande concentration dans le milieu cellulaire. S'en suit une modification conformationnelle au sein de la sous-unité  $G\alpha$ . Celle-ci provoque la dissociation de la protéine G, avec le monomère  $G\alpha$ -GTP d'une part et le dimère  $G\beta\gamma$  d'autre part, permettant à chacun d'interagir avec des messagers cellulaires secondaires.

Les protéines G ont été regroupées en quatre grandes familles d'après des données d'homologie de leur sous-unité  $\alpha$ , qui vont de pair avec une fonction principale de l'effecteur. Les protéines  $G\alpha_{i/o}$  sont connues pour inhiber l'adénylate cyclase, diminuant ainsi la concentration cytosolique d'AMPc, tandis que les  $G\alpha_s$  l'activent. Les protéines  $G\alpha_{q/11}$  activent la phospholipase C, ce qui conduit à l'augmentation de la concentration cellulaire en ions calcium via les messagers secondaires  $PIP_2$  et  $IP_3$ . Enfin, les  $G\alpha_{12/13}$  activent les facteurs d'échange de nucléotides guanyliques de la GTPase Rho (Rho-GEF). En d'autres termes, elles favorisent la dissociation du GDP, et donc l'activation de la GTPase concernée. La famille des GTPase Rho joue un rôle clef dans la régulation de la dynamique des réseaux d'actine.

Le dimère  $G\beta\gamma$  peut recruter les GRK à la membrane plasmique, ou directement moduler l'activité de canaux ioniques, kinases ou phospholipases. Son importance peut notamment être soulignée au sein du système nerveux central, où son interaction avec les canaux potassiques GIRK (Canaux potassiques rectifiants entrants couplés aux protéines G) est cruciale pour la transmission synaptique<sup>41</sup>.

Le cycle d'activation de la protéine G se clôture avec l'hydrolyse du GTP en GDP, ce qui permet la réassociation du monomère  $G\alpha$ -GDP inactif avec un dimère  $G\beta\gamma$ .

### 1.2.3. Signalisation médiée par les GRK et les arrestines

Chez les mammifères, la famille des GRK compte sept isoformes, respectivement nommées GRK1 à 7. Les processus conduisant à leur activation ne sont pas clairement élucidés, et ne sont pas toujours directement dépendants des protéines G. L'activation des GRK conduit à leur recrutement à la membrane plasmique via leur extrémité C-terminale. Elles peuvent alors phosphoryler un RCPG activé par un ligand agoniste au niveau de l'ICL3 ou de l'extrémité carboxy-terminale. Cette phosphorylation permet la liaison du récepteur à la  $\beta$ -arrestine.

Il existe quatre isoformes d'arrestines. L'arrestine-1 et l'arrestine-4 sont strictement impliquées dans la vision, et donc principalement exprimées dans l'œil. L'arrestine-2 et l'arrestine-3, plus connues sous les noms de  $\beta$ -arrestine1 et  $\beta$ -arrestine2, sont ubiquitaires. Ces protéines sont de véritables plateformes de signalisation, capables d'interagir avec de nombreuses protéines intracellulaires (telles que des kinases, des GTPases, des facteurs d'échange de nucléotides guanyliques, des ubiquitine ligases, des phosphodiesterases et des facteurs de transcriptions)<sup>42</sup>. Pour n'en citer qu'une, l'activation des voies de signalisation impliquant des MAP-kinases (pour *Mitogen Activated Protein Kinases*), dont le groupe de kinases ERK (pour *Extracellular-signal-Regulated Kinase*), notamment impliquée dans la mitose cellulaire, peut être médiée par la  $\beta$ -arrestine.

Les ligands des RCPG sont capables de favoriser sélectivement le recrutement d'un type de partenaire intracellulaire (protéine G ou  $\beta$ -arrestine). L'aptitude de la  $\beta$ -arrestine à rassembler les RCPG activés par un ligand agoniste et des complexes de signalisation fait naître une voie alternative de transduction du signal, pouvant être indépendante des protéines G<sup>43</sup>.

#### 1.2.4. Régulation de l'activité des RCPG

Avant d'être identifiées comme des actrices à part entière de la signalisation des RCPG, les GRK et l'arrestine ont tout d'abord été caractérisées pour leur rôle central dans la régulation de l'activité des récepteurs.

En effet, la phosphorylation des RCPG par les GRK et la liaison de l'arrestine conduit à leur désensibilisation, c'est-à-dire à la dissociation de la protéine G hétérotrimérique. Dans certains cas, la désensibilisation peut être médiée par les GRK mais sans passer par l'intermédiaire d'une phosphorylation<sup>44</sup>.

D'autre part, les  $\beta$ -arrestine1 et 2 favorisent l'internalisation des récepteurs par endocytose via leur interaction spécifique avec la clathrine. Ce phénomène est renforcé par la capacité des arrestines à interagir avec l'ubiquitine ligase, elle-même impliquée dans la régulation de l'endocytose par vésicules de clathrine. Une fois les récepteurs internalisés, ils peuvent être déphosphorylés et recyclés vers la membrane plasmique, ou dirigés vers les lysosomes où ils seront dégradés.

La compartimentalisation des différents effecteurs joue également un rôle important dans la régulation spatio-temporelle du signal généré par un RCPG donné.

Enfin, les RCPG peuvent également s'associer en homo ou hétéromères. Cette complexation peut représenter un mode d'activation alternatif d'un récepteur, ou au contraire être nécessaire à sa fonction, comme c'est le cas pour les RCPG de classe C. Ces complexes se comportent alors comme des nouvelles structures moléculaires,



modulant le profil pharmacologique et/ou la signalisation des récepteurs individuels dans un contexte donné<sup>45</sup>.

### 1.3. Les RCPG comme cible thérapeutique

Outre le rôle charnière qu'ils occupent dans de nombreux processus cellulaires, la localisation membranaire des RCPG les rend facilement accessible aux hormones et petites molécules circulantes, ce qui en fait des cibles thérapeutiques de choix. De plus, la spécificité tissulaire de l'expression de certains récepteurs offre la possibilité de mettre en place des stratégies thérapeutique sélectives<sup>46</sup>.

En termes de chiffres, sur les 800 RCPG humains identifiés, environ 370 peuvent être considérés comme des cibles thérapeutiques potentielles (ce qui exclut les récepteurs sensoriels et olfactifs, dont les dysfonctionnements peuvent plus difficilement être reliés à un phénotype pathologique). Aujourd'hui, environ 40 de ces récepteurs, appartenant aux classes A, B et C, sont la cible de médicaments commercialisés. Sur les quelques 300 restants, environ la moitié sont encore orphelins, et ne font pas partie des grands clusters phylogénétiques, ce qui rend l'identification de leurs ligands plus difficile<sup>30</sup>.

Ainsi, l'étude des RCPG, notamment à l'échelle moléculaire, présente un grand intérêt pour la biologie fondamentale et la compréhension de nombreux mécanismes physiologiques, et détient un grand potentiel en matière de santé publique.

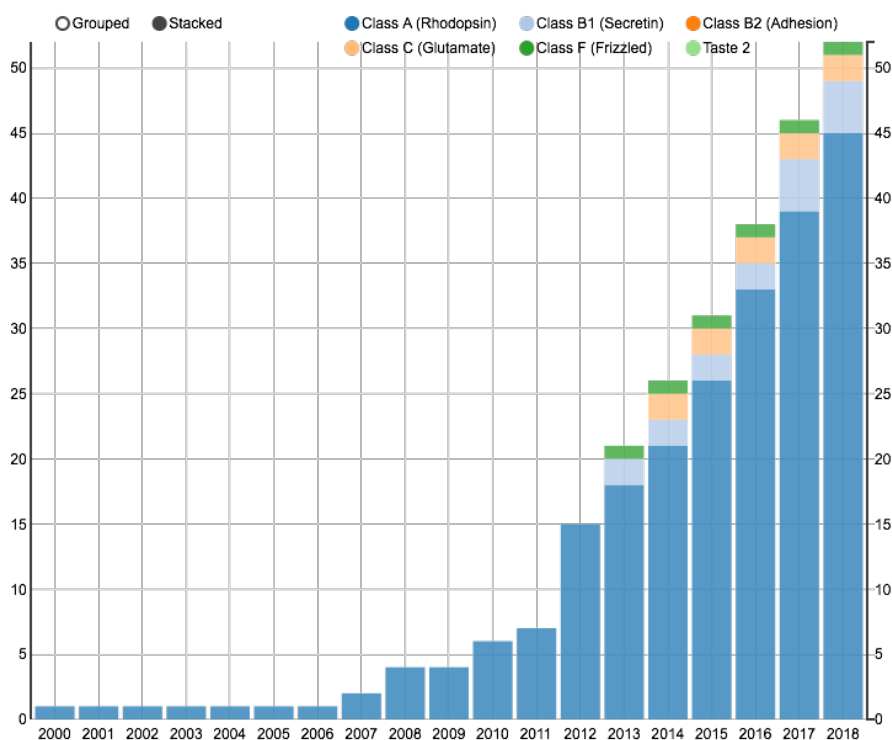


Figure 3 : Nombre cumulé de structures de récepteurs uniques résolues disponibles, groupées par classes<sup>47</sup>.

## 1.4. Études moléculaires des RCPG

### 1.4.1. Intérêts et challenges des études *in vitro*, et plus spécifiquement des études structurales

Les études *in vitro*, basées sur l'utilisation de matériel protéique purifié, permettent de simplifier le système d'étude et d'apporter des informations complémentaires aux tests effectués à l'aide de systèmes plus intégrés. Elles ouvrent de nouvelles voies pour l'identification de partenaires d'interaction ou la détermination du comportement des récepteurs dans différents environnements modèles.

D'autre part, les études structurales des récepteurs sont nécessaires pour permettre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régissant la signalisation cellulaire. Elles offrent également de nouvelles perspectives pour les approches rationnelles de conception de médicaments, plus largement connues sous le nom anglophone *structure-based drug design*.

Ce type d'études est rendu particulièrement ardu par (*i*) le faible taux d'expression de ces protéines dans les tissus natifs ou les systèmes hétérologues — le cas de la rhodopsine étant particulièrement exceptionnel —, (*ii*) la forte flexibilité des récepteurs et (*iii*) leur manque de stabilité en solution<sup>48</sup>.

Plusieurs approches visant à stabiliser les récepteurs ont fait leur preuve pour faciliter leur cristallisation. Parmi elles, on peut citer l'ajout de domaines de fusion comme le lysozyme T4<sup>49</sup> ou l'apocytochrome b562RIL<sup>50</sup>, ainsi que l'emploi de ligands<sup>51</sup> ou d'anticorps<sup>52</sup> fortement sélectifs et affins durant les processus de purification et/ou de cristallisation. La mutagenèse des récepteurs selon différentes stratégies (comme par exemple la mutagenèse systématique des alanines<sup>53</sup> ou l'ajout de ponts disulfures<sup>54</sup>) a également été employée avec succès dans le but d'augmenter leur thermostabilité.

Outre l'amélioration de la qualité des échantillons purifiés, de nombreux progrès et développements dans les techniques de biologie structurale utilisées ont pu être observées ces dernières années, avec par exemple l'essor de la cristallisation en Phase Lipidique Cubique (LCP) — également appelée cristallisation *in meso* —, ou la cristallisation de bicelles.

L'application conjointe de ces nouvelles méthodes et stratégies a permis une augmentation exponentielle du nombre de structures de RCPG résolues<sup>55</sup> (**Figure 3**). Aujourd'hui, on dispose de la structure de 46 récepteurs uniques, et l'ensemble des classes des récepteurs humains est représenté, excepté les récepteurs d'adhésion et les récepteurs gustatifs de type T2R<sup>56</sup>.

En 2011, le groupe de Brian Kobilka a proposé la première structure d'un récepteur activé par son ligand et couplé à la protéine G<sub>s</sub><sup>57</sup>. Ces travaux ont signé une grande avancée dans l'histoire de la cristallographie des protéines membranaires, et ont précédé d'autres études structurales d'ampleur sur les complexes de signalisation<sup>58</sup>. La cryo-

microscopie électronique a également prouvé à plusieurs reprises son efficacité dans la résolution de RCPG en complexe avec des acteurs intracellulaire<sup>59</sup>.

Cependant, ces études en sont encore à leurs débuts. A titre d'exemple, seuls 18 récepteurs ont été cristallisés dans leur forme active, et quatre structures uniques de complexes récepteur – protéine G ont été résolues<sup>47</sup>.

Enfin, des progrès techniques récents en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) permettent de collecter des données toujours plus précises sur des récepteurs en solution, capitales pour mieux comprendre la dynamique de ces protéines<sup>59</sup>.

#### 1.4.2. Un système de surexpression de choix : la levure *Pichia pastoris*

Une des grandes limites à l'étude moléculaire des RCPG réside dans la difficulté de surexprimer ces protéines. En effet, cette étape, loin d'être triviale, peut aboutir à de faibles rendements, des phénomènes d'agrégation, un mauvais repliement ou encore une toxicité cellulaire, l'ensemble de ces situations étant bien souvent liées entre elles.

Plusieurs systèmes d'expression ont démontré leur efficacité pour produire des RCPG de manière hétérologue, chacun présentant un certain nombre d'avantages et d'inconvénients. Les cellules d'insectes Sf9 et Sf21, dérivées du papillon *Spodoptera frugiperda*, ont notamment été largement utilisées. L'expression de protéines hétérologues est induite suite à l'infection des cellules par un baculovirus recombinant. La plupart des structures de récepteurs résolues à ce jour l'ont été grâce à ce système d'expression, ce qui se justifie par des rendements élevés ainsi qu'une grande richesse de modifications post-traductionnelles possibles<sup>60</sup>.

La levure *Pichia pastoris* est également un organisme d'expression particulièrement intéressant pour les nombreux avantages qu'il combine. Les levures sont des eucaryotes unicellulaires. Comme les bactéries, elles peuvent être manipulées aisément d'un point de vue génétique, possèdent un temps de génération court et peuvent facilement être cultivées en grands volumes, dans des milieux simples et peu coûteux. Elles possèdent également toute la machinerie cellulaire des eucaryotes, ce qui leur permet d'effectuer la plupart des modifications post-traductionnelles<sup>61,62</sup>.

Contrairement à sa cousine *Saccharomyces cerevisiae*, dont l'utilisation est plus répandue, *Pichia pastoris* est une des rares levures ayant développé un métabolisme spécifique d'utilisation du méthanol. Lorsque les sources de carbones préférentielles telles que le glucose ou le glycérol viennent à manquer, la présence de méthanol dans le milieu stimule très fortement l'expression des gènes codant pour les alcool oxydases 1 et 2. Ces enzymes sont impliquées dans la dégradation du méthanol pour produire de l'énergie et de la biomasse. Les promoteurs  $P_{AOX1}$  et  $P_{AOX2}$ , qui contrôlent l'expression de ces enzymes, présentent le double avantage d'être très finement régulés par les sources de carbone disponibles et d'engendrer des taux d'expression exceptionnels une

fois activés. Ils ont donc été détournés pour produire des protéines hétérologues, et l'efficacité du système n'est plus à prouver. On a rapporté l'expression concluante de plus de 500 candidats<sup>63</sup>, dont 70 en quantités industrielles<sup>64</sup>. Concernant le domaine plus spécifique des protéines membranaires, ce système s'est montré particulièrement polyvalent en permettant de produire de nombreuses protéines eucaryotes présentant des organisations structurales très variées, et en conduisant à la résolution de leur structure<sup>65</sup>. On peut par exemple citer la glycoprotéine P, qui appartient à la famille des transporteurs ABC ; la monoamine oxydase B, une protéine de la membrane mitochondriale ; le récepteur de l'adénosine A<sub>2A</sub> ou le récepteur de l'histamine H1, tous deux des RCPG ; plusieurs aquaporines ; et enfin des canaux potassiques et calciques<sup>66</sup>.

Toutefois, cette description avantageuse se doit d'être modérée par certains inconvénients. En effet, si *Pichia pastoris* est capable de glycosyler les protéines produites<sup>67</sup>, les motifs glycosidiques greffés restent simples, ce qui peut être critique pour la fonctionnalité de certaines protéines membranaires mammifères. De plus, les glycosylations greffées du côté amino-terminal sont régulièrement variables. Ce manque d'homogénéité est parfois préjudiciable pour certaines applications, dont les études structurales<sup>68</sup>.

Les différences observées dans la composition lipidique de la membrane plasmique, qui diffère de celle des eucaryotes supérieurs, peut également altérer le taux d'expression, le repliement et la fonctionnalité des protéines d'intérêt exprimées<sup>69</sup>.

Pour finir, en sa qualité de levure bourgeonnante, *Pichia pastoris* est entourée par une épaisse paroi cellulaire qui d'une part peut perturber l'expression protéique, et qui d'autre part complexifie la lyse cellulaire et l'isolement de la fraction membranaire contenant les protéines d'intérêt<sup>70</sup>.

#### 1.4.3. Étapes clés pour l'étude des RCPG en solution, et outils biochimiques disponibles

##### ***Lyse cellulaire et préparation de la fraction membranaire chez la levure***

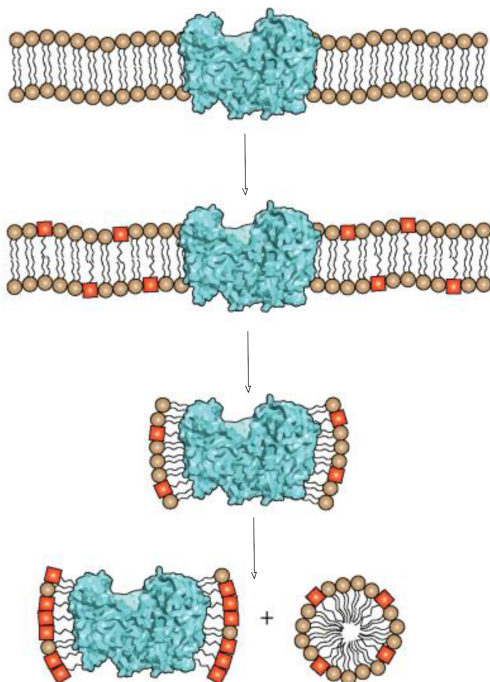
La purification de protéines membranaires exprimées dans un système hétérologue est très souvent précédée par une étape d'isolement de la fraction membranaire de l'échantillon. Cette phase permet principalement de s'affranchir des contaminants intracellulaires pour faciliter la purification et limiter la dégradation protéolytique. Elle consiste tout d'abord à lyser les cellules, puis à culoter les fragments de membrane par ultracentrifugation.

L'épaisse paroi cellulaire qui entoure les levures est principalement constituée par un enchevêtrement de peptidoglycanes<sup>71</sup>, et rend les cellules hautement résistantes aux techniques de lyse par sonication ou choc thermique traditionnellement utilisées pour les cellules bactériennes. Il est donc nécessaire d'avoir recours à des méthodes de lyse plus agressives<sup>72</sup>. La lyse mécanique impliquant l'agitation des cellules en présence de microbilles de verre est une technique efficace et compatible avec des volumes d'échantillons très variables. Certains appareils de laboratoire sont spécialement conçus pour optimiser l'agitation et permettent d'obtenir facilement des résultats robustes et reproductibles<sup>65</sup>.

Une technique alternative consiste à utiliser des mélanges enzymatiques comme la zymolyase, l'hélicase ou la lyticase afin de dégrader la paroi cellulaire. Les protoplastes obtenus sont alors beaucoup plus fragiles. Dans ces conditions, la membrane plasmique est également directement accessible aux détergents, et il est possible de solubiliser directement les protéines membranaires en s'affranchissant de l'étape de préparations membranaires<sup>73</sup>.

#### ***La purification des RCPG à l'aide de détergents***

La première étape nécessaire à l'étude des RCPG en solution consiste à les extraire de la bicouche lipidique dans laquelle ils sont enchâssés. Cette phase de solubilisation est traditionnellement réalisée à l'aide de petites molécules amphiphiles, les détergents. Leur rôle dans la purification est particulièrement critique, car ils doivent mimer l'environnement amphipathique d'une bicouche lipidique, tout en maintenant la structure de la protéine membranaire ainsi isolée dans un état physiologiquement pertinent.



**Figure 4 : Solubilisation d'une protéine membranaire à l'aide de détergents.** La concentration en détergent (molécules rouges) est augmentée jusqu'à ce que la protéine membranaire (représentée en bleu) soit extraite de la bicouche lipidique (en marron). On observe alors la présence de complexes protéine membranaire/détergents, accompagnés de lipides résiduels, et de micelles libres constituées de détergents et de molécules lipidiques. Figure extraite de Stetsenko *et al.*<sup>74</sup>

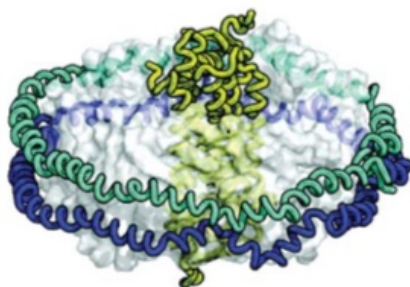
Le choix du détergent utilisé pour l'étape de solubilisation et les étapes de purification qui la suivent, ainsi que sa concentration, sont donc déterminants pour parvenir à obtenir une protéine pure et active. De plus, tous les détergents ne sont pas compatibles avec l'ensemble des approches biophysiques et des techniques de cristallisation des protéines. En effet, la taille de la micelle de détergents entourant la protéine membranaire est critique pour la formation de contacts cristallins, ou l'interaction du récepteur avec ses ligands. Le devenir des échantillons purifiés doit donc également être pris en compte<sup>75</sup>.

Le pouvoir solubilisant des détergents est inhérent à leur constitution. En effet, malgré la grande diversité structurale qui existe au sein de cette famille, toutes ces molécules possèdent une tête polaire hydrophile, et une chaîne carbonée hydrophobe. Ils sont classés en trois groupes selon la nature de leur tête polaire : ionique (cationique ou anionique), non ionique, ou zwitterionique.

En solution, à partir d'une certaine concentration, les monomères de détergents s'auto-associent pour former des micelles. On appelle cette limite la Concentration Micellaire Critique (CMC). Elle est propre à chaque détergent, et dépend à la fois de la longueur de la queue hydrophobe et de la nature de la tête hydrophile. Elle varie également avec la température, la force ionique ou le pH du tampon. Cette grandeur est particulièrement importante pour les applications qui nous intéressent, car c'est au-delà de celle-ci que les détergents deviennent capables de solubiliser des lipides et autres molécules hydrophobes ou amphipathiques, en les englobant dans des micelles mixtes ou dans des agrégats micellaires. Les interactions des molécules de détergents avec les zones hydrophobes des protéines membranaires permettent la formation de complexes protéines/détergents solubles<sup>76</sup> (**Figure 4**).

L'étude des propriétés des détergents et de leur capacité à maintenir la stabilité des protéines membranaires a fait émerger plusieurs règles générales de classification. Ainsi, les détergents dits *forts* (*harsh* en anglais) sont réputés susceptibles de dénaturer la structure protéique, contrairement aux détergents *doux* (ou *mild*). Cependant, ces règles ne suffisent pas à déterminer avec certitude le détergent le plus approprié à la purification d'une protéine, et la méthode empirique reste encore aujourd'hui la meilleure<sup>75</sup>.

Les détergents dérivés de maltose ou de glucose, et plus particulièrement le *n*-dodécyl  $\beta$ -D-maltoside ou DDM (avec une chaîne apolaire longue de 12 atomes de carbone), ainsi que son petit frère le décyl  $\beta$ -D-maltopyranoside ou DM (dont la chaîne carbonée comprend 10 atomes de carbone), sont sans aucun doute les plus utilisés pour la purification et la cristallisation des RCPG<sup>77</sup>. Le développement plus récent des détergents amphiphiles de la série des Maltose Néopentyl Glycol comme le LMNG (Lauryl Maltose Néopentyl Glycol), dont la structure est organisée autour d'un carbone quaternaire central, a également ouvert de nouvelles possibilités dans ce domaine<sup>78</sup>.



**Figure 5 : Modèle représentant une molécule de rhodopsine bactérienne reconstituée dans un nanodisque.** La protéine membranaire (en vert) est enchâssée dans un disque de bicouche lipidique (en gris). Deux molécules de protéine MSP (en bleu et en vert) entourent et stabilisent cette structure. Figure extraite de Borch *et al.*<sup>79</sup>, elle-même adaptée du modèle présenté par Nath *et al.*<sup>80</sup>

**Tableau 1 : Catalogue des constructions de MSP disponibles.** Traduit de Ritchie *et al.*<sup>81</sup>

Protéine	N-ter	Taille du disque (nm)	MW	$\epsilon_{280}$	Caractéristiques
MSP1*	FX	9.7 <sup>a</sup> /9.8 <sup>b</sup>	24608	23950	MSP1 d'origine (Apo A-1 humaine avec une délétion 1-43)
MSP1TEV	TEV	9.7 <sup>a</sup> /10 <sup>b</sup>	25947	26930	MSP1 avec un tag 7-his amovible
MSP1D1*	TEV	9.5 <sup>a</sup> /9.7 <sup>b</sup>	24662	21430	MSP1TEV avec une délétion 1-11
MSPD1 D73C	TEV	9.6 <sup>a</sup>	24650	21430	MSP1D1 avec un résidu cystéine dans l'hélice 2 (numérotation des résidus de l'Apo A-1)
MSP1D1(-)	TEV	9.6 <sup>a</sup> /9.6 <sup>b</sup>	22044	18450	MSP1D1 sans tag 7-his
MSP1E1*	FX	10.4 <sup>a</sup> /10.6 <sup>b</sup>	27494	32430	MSP1 étendue, répétition de l'hélice 4
MSP1E1D1	TEV	10.5 <sup>a</sup>	27547	29910	MSP1D1 étendue, répétition de l'hélice 4
MSP1E2*	FX	11.1 <sup>a</sup> /11.9 <sup>b</sup>	30049	32430	MSP1 étendue, répétition des hélices 4 et 5
MSP1E2D1	TEV	11.1 <sup>a</sup>	30103	29910	MSP1D1 étendue, répétition des hélices 4 et 5
MSP1E3*	FX	12.1 <sup>a</sup> /12.9 <sup>b</sup>	32546	32430	MSP1 étendue, répétition des hélices 4, 5 et 6
MSP1E3D1*	TEV	12.1 <sup>a</sup>	32600	29910	MSP1D1 étendue, répétition des hélices 4, 5 et 6
MSP1E3D1 D73C	TEV	12.0 <sup>a</sup>	32588	29910	MSP1E3D1 avec un résidu cystéine dans l'hélice 2 (numérotation des résidus de l'Apo A-1)
MSP1D1-22	TEV	9.4 <sup>a</sup>	23404	21430	MSP1TEV avec une délétion 1-22
MSP1D1-33	TEV	9.0 <sup>a</sup>	22055	15930	MSP1TEV avec une délétion 1-33
MSP1D1-44	TEV	8.6 <sup>a</sup>	20765	15930	MSP1TEV avec une délétion 1-44
MSP2	FX	9.5 <sup>a</sup>	48020	47900	Fusion de deux MSP1 avec un linker GT
MSP2N2	TEV	15.0 <sup>a</sup> /16.5 <sup>b</sup>	45541	39430	Fusion de MSP1D1-11 et MSP1D1-22 avec un linker GT
MSP2N3	TEV	15.2 <sup>a</sup> /17 <sup>b</sup>	46125	39430	Fusion de MSP1D1-11 et MSP1D1-17 avec un linker GT
MSP1FC	TEV	9.7 <sup>a</sup>	25714	22400	MSP1D1 avec une étiquette FLAG en C-terminal
MSP1FN	TEVF	9.6 <sup>a</sup>	25714	22400	MSP1D1 avec une étiquette FLAG en N-terminal

\*le plasmide est disponible chez Addgene ([www.addgene.org](http://www.addgene.org))

FX = GHHHHHHHIEGR ; TEV = GHHHHHHHDYDIPTTENLYFQG ; TEVF = GHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGSYKDDDDDKG

<sup>a</sup>Diamètre hydrodynamique de Stokes, déterminé par chromatographie d'exclusion stérique (Denisov *et al.*<sup>82</sup>)

<sup>b</sup>Diamètre du nanodisque déterminé par SAXS (Denisov *et al.*<sup>82</sup>)

Outre le choix du détergent, le contrôle de sa concentration en solution est capital pour assurer la reproductibilité des analyses fonctionnelles et structurales. En effet, les micelles de détergents présentes en excès dans le milieu ont une fâcheuse tendance à interférer avec de nombreuses techniques d'analyse de par leurs propriétés optiques, leur capacité à partitionner les autres substrats et composants du milieu, leur haute aptitude à s'ioniser, etc. Ceci est malheureusement loin d'être trivial compte tenu du manque de connaissances détaillées concernant le comportement des détergents autour des protéines membranaires, notamment lors des étapes de concentration. La mise au point de nouvelles techniques de quantification, qui ne requièrent pas l'utilisation de détergents radio-marqués, permet également de progresser vers une utilisation plus maîtrisée de ces molécules<sup>83</sup>.

Malgré ces nombreux progrès techniques, le détergent ou le mélange de détergents idéal pour purifier une protéine membranaire et conserver son activité reste un Graal bien difficile à dénicher pour de nouvelles cibles. La présence des lipides voisins est une condition *sine qua non* à la fonctionnalité de nombreuses protéines membranaires, ce qui n'est pas toujours compatible avec l'usage de détergents suffisamment déstabilisants pour extraire les protéines des membranes. De plus, l'absence de pression latérale dans les micelles, importante pour maintenir la structure tridimensionnelle des protéines, ainsi que la labilité des interactions protéine/détergent, sont fréquemment à l'origine d'une déstabilisation rapide des échantillons purifiés. C'est pourquoi d'autres stratégies, consistant souvent à substituer le détergent par d'autres molécules, ont été développées.

### ***Les nanodisques comme outil de stabilisation des RCPG purifiés***

Plusieurs de ces approches consistent à reconstituer la protéine d'intérêt dans une membrane artificielle après sa purification. Ces techniques incluent notamment les liposomes, les bicelles, ou les nanodisques lipidiques.

Ces derniers ont été décrits en premier lieu par Stephen G. Sligar et ses collaborateurs en 2002<sup>84</sup>. Le nanodisque est constitué d'une bicouche lipidique, dans laquelle peut être enchâssée une protéine membranaire, ceinturée par deux exemplaires d'une protéine d'échafaudage appelée MSP (pour *Membrane Scaffold Protein*). La **Figure 5** représente un modèle de la particule qui en résulte.

La MSP est elle-même dérivée de l'apolipoprotéine A-I, une protéine sérique humaine chargée d'assurer la cohésion et la solubilisation des lipoprotéines dans le sang en formant une interface amphiphile entre les lipides et l'eau<sup>85</sup>.

Les disques peuvent être obtenus en mélangeant la MSP avec des protéines membranaires solubilisées en détergent et des lipides choisis. S'en suit une étape d'élimination des détergents par dialyse ou adsorption sur des microbilles de polystyrène (plus couramment désignées par leur nom commercial *Bio-Beads®*). Cette phase va conduire à l'interaction spontanée des zones hydrophobes de la protéine avec



les phospholipides et à la formation de bicouches lipidiques discoïdales, dont le diamètre est contrôlé par la longueur de la MSP. Il existe aujourd'hui une large boîte à outils de MSP disponibles, de tailles variables, et fusionnées ou non à des étiquettes d'affinité (**Tableau 1**). Cela permet la formation de nanodisques contenant des protéines membranaires ayant des topologies ou des états oligomériques variés.

Les particules obtenues après purification sont stables en milieux aqueux, monodisperses, et permettent d'étudier les protéines membranaires qu'elles contiennent dans un contexte lipidique, proche de leur environnement physiologique. Plusieurs études ont mis en avant la stabilité et la fonctionnalité des protéines reconstituées dans de tels objets en comparaison à un environnement à base de détergents, y compris pour des RCPG<sup>86-89</sup>.

Les exemples d'applications compatibles avec les nanodisques lipidiques sont nombreux et ne cessent de se multiplier, que ce soit pour les études structurales des protéines par Microscopie Électronique en Transmission (MET) ou RMN, ou dans le cadre d'analyses fonctionnelles telles que la liaison de petites molécules ou de protéines (décrit de manière extensive par Denisov et ses collaborateurs<sup>90</sup>).

Cette approche n'est toutefois pas facile à mettre en place pour toutes les cibles. En effet, le ratio molaire entre les lipides, la protéine en détergent et la MSP mis en jeu durant la reconstitution doit être finement contrôlé et optimisé pour éviter l'agrégation de l'échantillon et maximiser le taux de protéines incorporées. Le deuxième inconvénient majeur réside dans le grand nombre d'étapes à parcourir. Chaque phase est, sans grande surprise, accompagnée d'une perte plus ou moins importante en quantité et en activité de la protéine d'intérêt.

## 2. Anticorps et RCPG

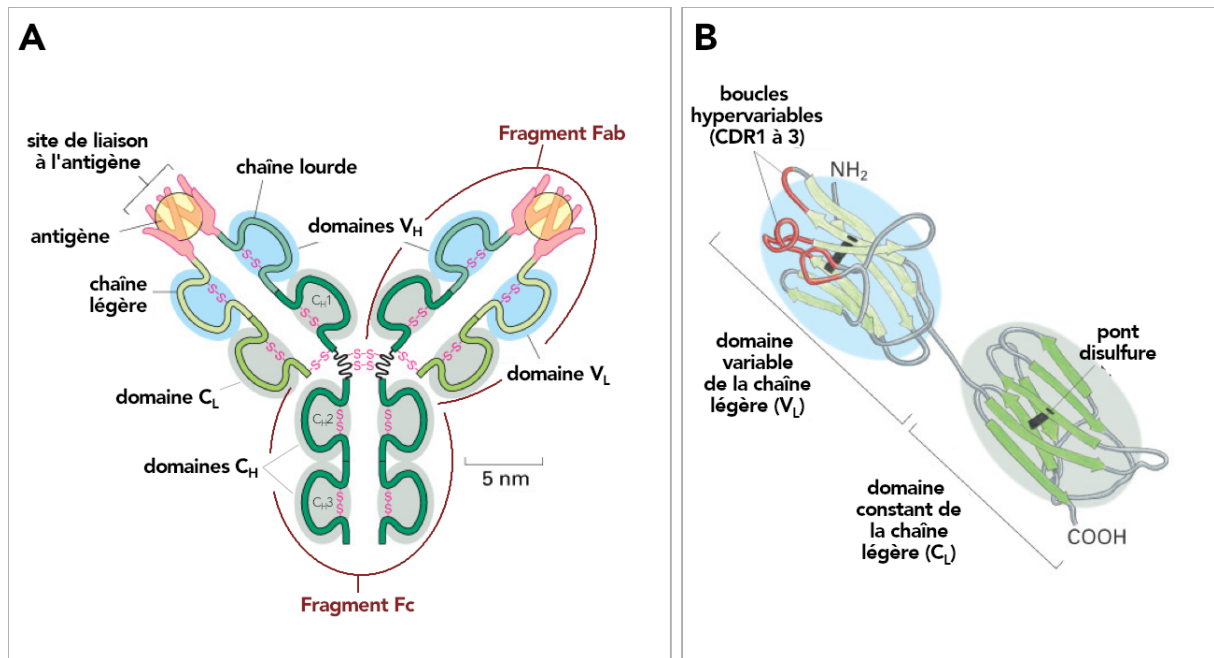
### 2.1. Généralités structurales et fonctionnelles sur les anticorps conventionnels

La superfamille des Immunoglobulines (Ig) regroupe un ensemble de glycoprotéines impliquées dans les phénomènes de reconnaissance, de liaison et d'adhésion cellulaire. Elle comprend les différents isotypes d'anticorps, mais également les molécules de présentation des antigènes (les Complexes Majeurs d'Histocompatibilité (CMH) de classe I et II), et de nombreux récepteurs présents à la surface des cellules du système immunitaire (comme les co-récepteurs CD4 et CD8 des lymphocytes T), entre autres. Les protéines de cette famille sont toutes caractérisées par la présence d'au moins un domaine « immunoglobuline ». Long de 70 à 130 acides aminés, celui-ci est formé de deux feuillets bêta antiparallèles qui se superposent à la manière d'un sandwich. Cette structure secondaire caractéristique est stabilisée par des interactions hydrophobes ainsi que par un pont disulfure très conservé<sup>91</sup>.

Les anticorps sont eux-mêmes composés d'un ensemble de domaines Ig répartis sur deux chaînes lourdes (notées  $H$  pour *heavy*) et deux chaînes légères (notées  $L$  pour *light*) identiques entre elles, et reliées par des ponts disulfures. Chaque chaîne lourde comprend trois (ou quatre) domaines Ig constants ( $C_{H1}$  à 4) et un domaine variable ( $V_H$ ), tandis que chaque chaîne légère comprend un domaine constant ( $C_L$ ) et un domaine variable ( $V_L$ ). L'anticorps monomérique entier présente alors une structure caractéristique en forme de « Y », et possède une masse d'environ 150 kDa. Les domaines constants  $C_{H2}$  et  $C_{H3}$  appariés forment le Fragment Cristallisable ou  $F_C$ . Les domaines  $C_L$  et  $V_L$  de la chaîne légère, ainsi que les domaines  $C_{H1}$  et  $V_H$  de la chaîne lourde, forment le Fragment de liaison à l'antigène ou Fab (pour *Fragment antigen-binding*). Les deux Fab de l'anticorps sont reliés au  $F_C$  par une région charnière qui lui octroie une grande flexibilité dans l'espace. L'ensemble des domaines variables  $V_L$  et  $V_H$  constitue également le Fragment Variable ou  $F_V$  de l'anticorps.

La séquence et la structure du  $F_C$  de l'anticorps détermine l'isotype de celui-ci, et avec lui sa fonction effectrice. En effet, en se liant avec différents acteurs du système immunitaire, le  $F_C$  est capable d'activer des voies cytotoxiques dépendantes de cellules immunitaires (on parle alors d'ADCC pour *Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity* ou d'ADCP pour *Antibody Dependent Cellular Phagocytosis*) ou de recruter le système du complément (CDC pour *Complement Dependant Cytotoxicity*).

Chez l'Homme, il existe cinq isotypes d'anticorps (respectivement nommés IgG, IgA, IgM, IgE, et IgD) ayant des rôles spécifiques et complémentaires au cours de la réponse immunitaire. Leur séquence leur confère des propriétés d'oligomérisation différentes, mais ils partagent tous la structure en « Y » décrite plus haut. Les IgG sont la classe d'immunoglobulines la plus représentée dans le sérum des mammifères.



**Figure 6 : Structure typique d'un anticorps de type IgG. A : vue globale.** L'anticorps est composé d'un appariement de deux chaînes lourdes (vert foncé) et de deux chaînes légères (vert clair). Les deux chaînes lourdes sont composées de trois domaines constants  $C_{H1}$  à  $C_{H3}$  et d'un domaine variable  $V_H$ , tandis que les chaînes légères sont composées d'un domaine constant  $C_L$  et d'un domaine variable  $V_L$  (les domaines constants sont identifiés par un halo vert, les domaines variables par un halo bleu). Le site de liaison à l'antigène est formé par les deux fragments variables  $V_L$  et  $V_H$ . Un anticorps est donc bivalent pour son antigène. L'ensemble  $V_H$ ,  $V_L$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_L$  constitue un Fab. Les quatre domaines  $C_{H2}$  et  $C_{H3}$  constituent le Fc. **B : vue détaillée de la chaîne légère.** Chaque domaine Ig est stabilisé par un pont disulfure hautement conservé. Le paratope, lieu d'interaction avec l'épitope de l'antigène, est formé par les trois boucles hypervariables CDR1 à 3. Figure adaptée de l'ouvrage *Essential Cell Biology*<sup>92</sup>

Ils sont très stables en solution et faciles à purifier, ce qui explique leur utilisation prépondérante pour de nombreuses applications biotechnologiques.

Le  $F_V$  de l'anticorps, quant à lui, lui confère sa spécificité antigénique. Les deux domaines  $V_H$  et  $V_L$  constituant le  $F_V$  peuvent être eux-mêmes décomposés en six boucles hypervariables ( $CDR_H1$  à 3 et  $CDR_L1$  à 3) que séparent des régions charpentes (FR). Les six CDR, souvent stabilisées dans l'espace au moyen d'interactions non covalentes, forment le paratope, lieu de l'interaction de l'anticorps avec l'épitope d'un antigène. Comme leur nom l'indique, les régions hypervariables sont très peu conservées entre les anticorps, et c'est en cette variabilité que réside le secret de la spécificité anticorps-antigène<sup>93</sup>. La structure typique d'un anticorps est représentée dans la **Figure 6**.

## 2.2. Des outils utiles dans différents champs d'application

### 2.2.1. La naissance et le développement des anticorps thérapeutiques

Les premières utilisations d'anticorps dans un but thérapeutique remontent aux années 1890. A cette époque, les physiologistes français Charles Richet et Jules Héricourt parviennent à immuniser des lapins contre des staphylocoques en leur injectant le sérum d'un chien infecté. Un peu plus tard, le physiologiste allemand Emil von Behring, en collaboration avec le médecin japonais Kitasato Shibasaburō, font des découvertes similaires à travers leurs travaux sur les antitoxines de la diphtérie et du tétanos, posant ainsi les bases de la sérothérapie. Ce fut une véritable révolution thérapeutique et médicale, pour laquelle le professeur von Behring sera récompensé par le premier prix Nobel de physiologie ou médecine en 1901<sup>94</sup>.

Un deuxième bond phénoménal fut franchi en 1975, avec les travaux de César Milstein et Georges Köhler. Ils développèrent une technique de production d'anticorps monoclonaux de souris (ou mAb, pour *monoclonal Antibodies*) *in vitro*, à partir de cellules hybrides résultant de la fusion entre des lymphocytes B murins et un myélome de la même espèce<sup>95</sup>.

C'est grâce à cette technique qu'est développé le premier anticorps monoclonal thérapeutique murin mis sur le marché en 1986 : le Muromonab, dirigé contre le récepteur CD3 des lymphocytes T et utilisé pour ses propriétés anti-inflammatoires afin de lutter contre le rejet de greffe d'organes<sup>96</sup>.

Cependant, le nombre important d'effets secondaires dus à l'immunogénicité des anticorps de souris a rapidement conduit à la modification des anticorps thérapeutiques pour donner naissance aux anticorps chimériques (constitués d'une combinaison de fragments humains et murins) puis aux anticorps humanisés. D'autres approches permettent également d'obtenir des anticorps humains, totalement transparents pour le système immunitaire<sup>97</sup>. En 2015, la part de marché des anticorps monoclonaux thérapeutiques était estimée à environ 80 milliards de dollars pour 58 anticorps validés

par la FDA et disponibles sur le marché<sup>98</sup>. En 2018, le nombre d'anticorps disponibles est passé à 80<sup>99</sup>.

### 2.2.2. Anticorps thérapeutiques et RCPG

Aujourd'hui, la plupart des ligands développés pour cibler les RCPG sont des molécules chimiques ou des peptides de faible poids moléculaire. Cependant, ces stratégies présentent des limites, comme en témoigne la large majorité de récepteurs pour lesquels on ne dispose encore d'aucun ligand.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux permet de pallier différentes difficultés rencontrées dans le cas de petites molécules chimiques<sup>100</sup>.

Tout d'abord, ils ont un temps de demi-vie plus élevé dans le sérum (environ 20 jours pour les IgG) et leurs propriétés pharmacocinétiques sont moins variables d'un patient à l'autre. De plus, dans le cadre d'une utilisation thérapeutique, les propriétés de cytotoxicité et de phagocytose médiées par le F<sub>C</sub> des anticorps peuvent être particulièrement avantageuses.

D'autre part, les anticorps sont majoritairement exclus du système nerveux central. En effet, on estime à seulement 0,1 % la quantité d'anticorps circulant qui traversent la barrière hémato-encéphalique<sup>101</sup>. Cette caractéristique est avantageuse lorsque l'on souhaite cibler uniquement les récepteurs périphériques afin de limiter des effets secondaires potentiels. Cela peut par exemple s'avérer utile pour cibler les récepteurs histaminiques périphériques impliqués dans les réactions allergiques sans entraîner d'effet sédatif<sup>102</sup>, ou encore les récepteurs cannabinoïdes pour traiter l'obésité<sup>103</sup> ou la douleur<sup>104</sup>.

De plus, les anticorps monoclonaux interagissent avec des épitopes allostériques localisés à la surface extracellulaire des récepteurs, contrairement aux ligands chimiques qui sont le plus souvent conçus pour reconnaître le site de liaison orthostérique. Ce dernier étant hautement conservé entre les récepteurs d'une même famille, l'utilisation d'anticorps monoclonaux peut permettre de résoudre certains problèmes de sélectivité. Il convient toutefois de rester prudent, car la structure tridimensionnelle des RCPG reste proche malgré les différences de séquence au sein des boucles extra-cellulaires, et il n'est pas rare d'observer une réactivité croisée des anticorps pour différents récepteurs<sup>105</sup>.

Le Mogamulizumab, un anticorps monoclonal ciblant le récepteur CCR4, est pour l'instant le seul anticorps thérapeutique anti-RCPG disponible sur le marché<sup>106</sup>. Utilisé pour éliminer les cellules tumorales, son F<sub>C</sub> a été conçu pour augmenter la fonction ADCC. De nombreux programmes de recherche visent à augmenter le nombre d'anticorps disponibles, et ces efforts portent leurs fruits : en 2017, 57 mAbs faisaient l'objet d'études précliniques, et 39 étaient en développement clinique<sup>107</sup>. Les principaux

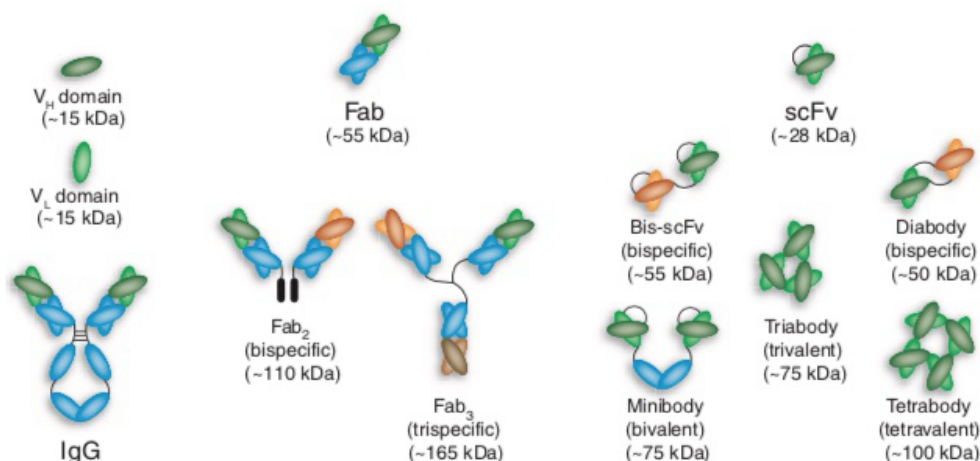
RCPG ciblés sont les récepteurs aux chimiokines (CCR5, CXCR4 et CCR2), mais également certains récepteurs de la famille Frizzled (FZD7, FZD8 et FZD10), entre autres.

### 2.2.3. Les fragments d'anticorps conventionnels<sup>108</sup>

Dans certains cas, la longue demie-vie des anticorps et les effets cytotoxiques qu'ils engendrent sont superflus, voire totalement indésirables. Or ceux-ci sont principalement médiés par le F<sub>C</sub> de l'anticorps. Il est alors possible de s'en affranchir et de travailler uniquement avec le fragment responsable de la liaison à l'antigène, à savoir le Fab ou le F<sub>V</sub>.

La première option consiste à utiliser un clivage enzymatique. La papaine permet, en hydrolysant l'anticorps au-delà de la région charnière, de générer deux Fab monovalents et un F<sub>C</sub>. La pepsine, quant à elle, conserve un fragment bivalent appelé F(ab)<sub>2</sub>.

De tels fragments peuvent également être obtenus par ingénierie génétique (**Figure 7**). Les scFv (pour *single-chain variable Fragment*) correspondent aux domaines variables V<sub>H</sub> et V<sub>L</sub> reliés par une chaîne polypeptidique flexible. Ils conservent les propriétés de liaison à l'antigène de l'IgG dont ils sont issus, tout en présentant une meilleure pénétration dans les tissus. Leur élimination sanguine est cependant beaucoup plus rapide.



**Figure 7 : Représentation schématique de différents formats de fragments d'anticorps.** Les Fab correspondent au fragment variable de l'anticorps, additionné des domaines CH1. Ceux-ci peuvent être combinés par génie génétique pour former des objets bi- ou tri-spécifiques (Fab<sub>2</sub> et Fab<sub>3</sub>). Les scFv sont formés par la fusion artificielle des domaines variables V<sub>H</sub> et V<sub>L</sub>. Plusieurs combinaisons de scFv permettent de former des objets multivalents. Les tailles données en kDa sont indicatives. Figure extraite de la revue écrite par Holliger *et al.*<sup>108</sup>

Ils peuvent être combinés à volonté dans le but de former des objets multivalents. Cette stratégie permet d'augmenter l'affinité fonctionnelle — ou avidité — de l'anticorps pour sa cible, tout en diminuant la vitesse de dissociation.

D'autre part, la combinaison de plusieurs scFv permet de générer des objets multispécifiques. Un « diabody » peut être conçu pour se lier à des épitopes adjacents sur le même antigène, ce qui augmente son avidité et sa spécificité pour sa cible. Une deuxième approche consiste à composer un objet capable de se lier à plusieurs antigènes différents, par exemple dans le but de recruter d'autres acteurs cellulaires.

Cinq Fab thérapeutiques étaient disponibles sur le marché en 2015, et de nombreux autres sont en cours de développement clinique.

#### 2.2.4. Des propriétés utiles dans d'autres champs d'application

La zone d'interaction des anticorps avec leur récepteur cible leur confère des propriétés potentiellement plus complètes et complexes que celles d'un ligand chimique. En effet, les anticorps sont souvent capables de stabiliser différentes conformations des RCPG, et ainsi de modifier finement leurs propriétés de signalisation.

A titre d'exemple, un anticorps monoclonal peut d'une part favoriser l'état inactif du récepteur en stabilisant sa conformation ou en empêchant la fixation du ligand orthostérique. D'autre part, il est à même de favoriser l'activation du récepteur, soit en l'absence de ligand, soit en augmentant encore la stabilité de la conformation du récepteur lié à un ligand agoniste. Enfin, il est en mesure d'engendrer l'internalisation du récepteur, ou de favoriser son homo ou hétéro-dimérisation. La stabilisation de conformations intermédiaires du récepteur est également susceptible de conduire à une signalisation biaisée<sup>107</sup>.

Outre les applications thérapeutiques potentielles, ces propriétés trouvent également leur utilité dans d'autres domaines.

Tout d'abord, l'utilisation de fragments d'anticorps a permis la cristallisation et l'étude structurale de nombreux récepteurs<sup>109</sup>, en commençant par le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique en 2007<sup>29</sup>.

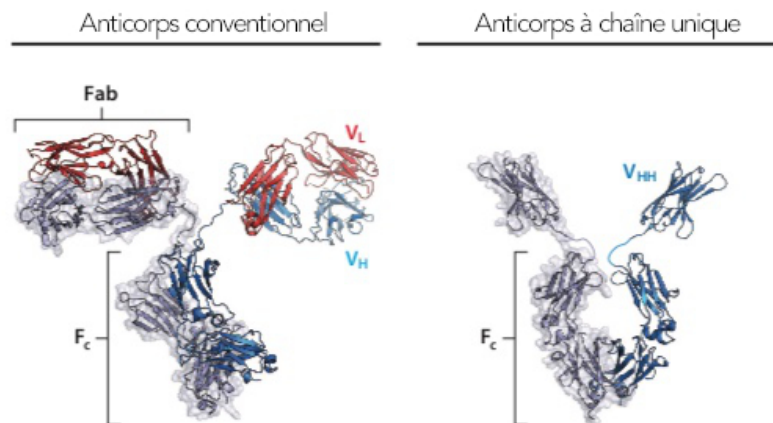
Ils ont également été brillamment utilisés pour étudier les mécanismes d'activation et explorer les états conformationnels des RCPG sous forme native, présentant un net avantage par rapport aux techniques de transfert de fluorescence comme le FRET ou le BRET<sup>110</sup>.

Enfin, un anticorps capable de reconnaître un état conformationnel donné est un compétiteur de choix pour une campagne de criblage de ligand, ou pour la caractérisation pharmacologique d'un ligand sélectif<sup>111</sup>.

## 2.3. Les nanobodies, des fragments d'anticorps à haut potentiel

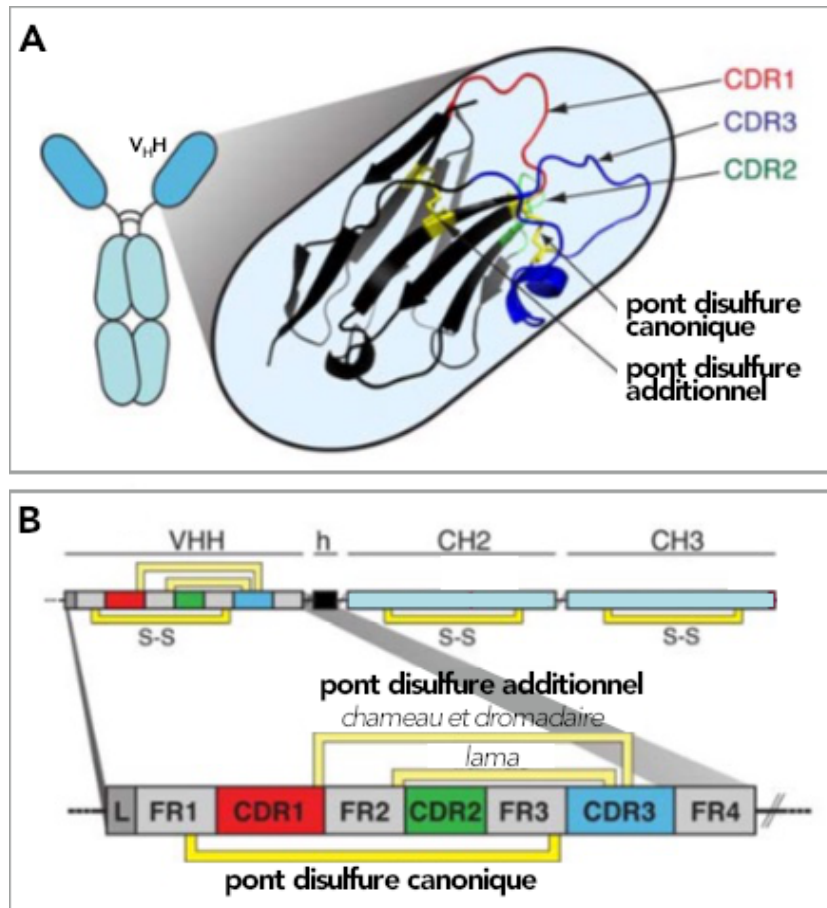
### 2.3.1. Définition<sup>112</sup>

La structure globale des anticorps, décrite plus haut, est remarquablement bien conservée parmi les mammifères. En 1993, cependant, un autre type d'anticorps fonctionnels a été identifié en abondance dans le sérum de dromadaire (*Camelus dromedarius*). Ceux-ci sont constitués uniquement d'un appariement de deux chaînes lourdes et dépourvu de chaînes légères, pour une masse molaire d'environ 100 kDa<sup>113</sup> (**Figure 8**). Cette classe d'anticorps à chaîne unique (hcAbs pour *heavy chain antibodies* en anglais) est présente chez tous les animaux appartenant à la famille des camélidés. Les espèces vivantes de cette famille sont classés en deux sous-groupes : les camélidés dits « de l'ancien monde », à savoir le dromadaire (*Camelus dromedarius*) et le chameau (*Camelus bactrianus*) ; et les camélidés dits « du nouveau monde », que sont le lama (*Lama glama*), l'alpaga (*Lama pacos*), le guanaco (*Lama guanicoe*) et la vignogne (*Vicugna vicugna*). Ces anticorps sont présents en supplément des autres isotypes d'anticorps conventionnels, et contribuent pleinement à la réponse immunitaire de ces animaux.



**Figure 8 : Comparaison de la structure des anticorps conventionnels et des anticorps à chaîne unique.** Contrairement aux anticorps conventionnels, le fragment des anticorps à chaîne lourde responsable de la liaison à l'antigène est constitué d'un seul domaine Ig variable, appelé V<sub>H</sub>H. Figure adaptée de Manglik *et al.*<sup>114</sup>





**Figure 9 : Représentation schématique du domaine V<sub>H</sub>H d'un anticorps à chaîne unique.**  
**A : Représentation structurale.** Les trois boucles hypervariables (CDR1, 2 et 3), représentées en couleurs, sont responsables de la liaison à l'antigène. La boucle CDR3, particulièrement étendue, permet au paratope d'adopter une large variété de conformations tridimensionnelles. Elle est fréquemment stabilisée par un pont disulfure additionnel, représenté en jaune, formé avec la boucle CDR1 ou la fin de la région FR2. Tous les V<sub>H</sub>H présentent également un pont disulfure conservé entre les régions FR1 et FR3. **B : Représentation de la séquence.** S-S : pont disulfure. h : région charnière. Figure adaptée de Wesolowski *et al.*<sup>115</sup>

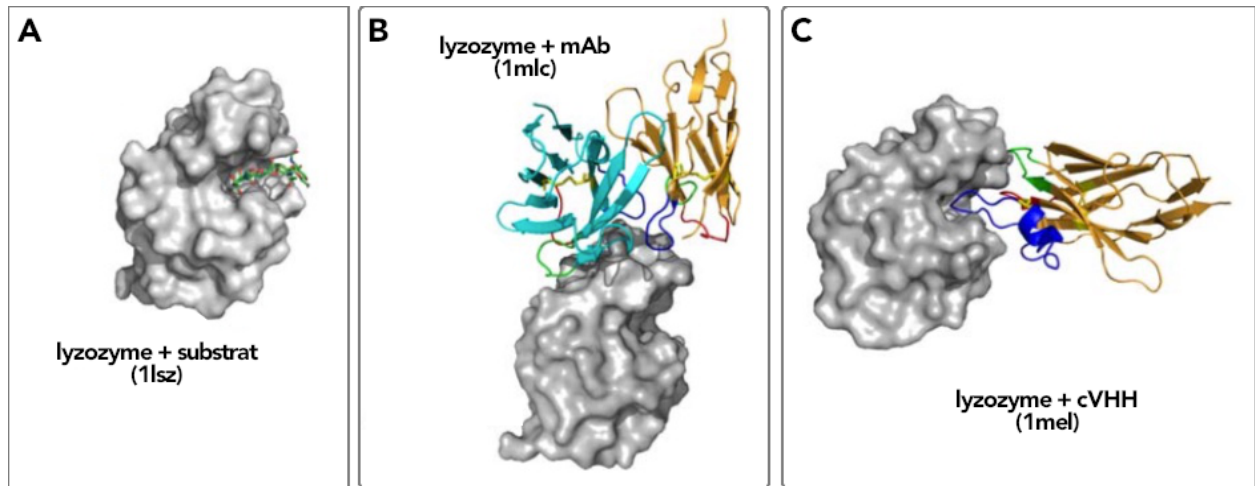
Chaque chaîne est constituée de seulement deux domaines Ig constants (contre trois à quatre pour les anticorps conventionnels), les domaines C<sub>H2</sub> et C<sub>H3</sub>, et d'un domaine variable appelé V<sub>H</sub>H. Le domaine C<sub>H1</sub> est, quant à lui, clivé au cours de l'épissage de l'ARN (Acide Ribonucléique) messenger. La partie variable de l'anticorps est donc directement reliée au domaine C<sub>H2</sub> via une région charnière. La taille de la région charnière permet de regrouper les anticorps à chaîne unique en plusieurs sous-types (respectivement nommés IgG2a, IgG2b, IgG2c et IgG3), qui ne sont pas tous représentés chez toutes les espèces<sup>116</sup>. En moyenne, les anticorps à chaîne unique représentent 50% des anticorps circulant pour les camélidés de l'ancien monde, contre 30% pour les camélidés du nouveau monde.

Le domaine variable V<sub>H</sub>H de ces anticorps peut être exprimé de manière recombinante afin d'obtenir des anticorps à domaine unique : les nanobodies. Avec une taille d'environ 15 kDa, ils correspondent au plus petit fragment de liaison à un antigène à la fois intégral et dérivé d'un anticorps fonctionnel.

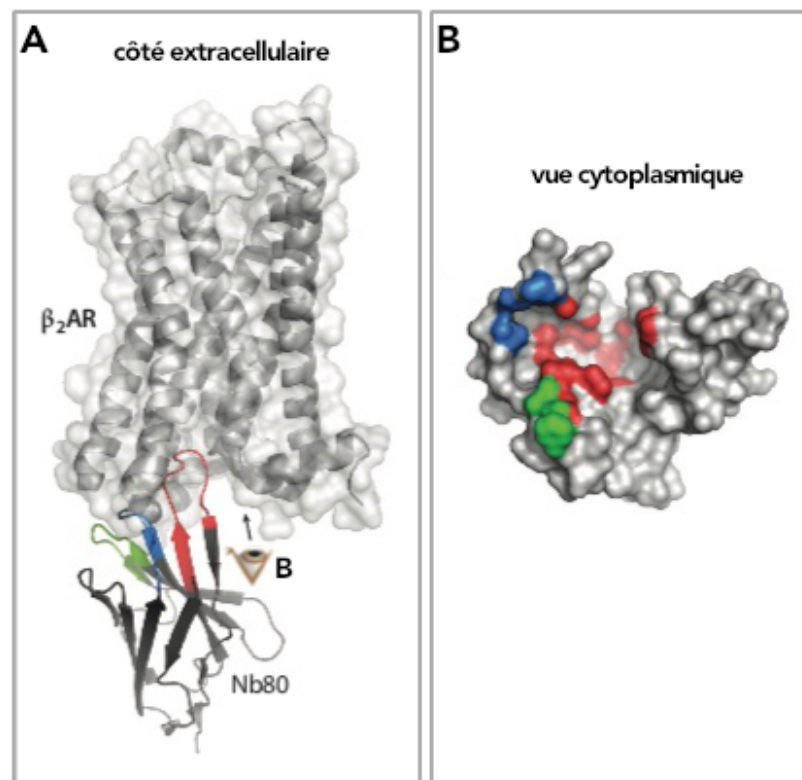
### 2.3.2. Particularités de séquence et de structure

En comparaison aux F<sub>V</sub> des anticorps conventionnels, les nanobodies présentent également l'avantage d'être hautement solubles. Ceci s'explique par la présence de plus de résidus hydrophiles dans leur séquence, probablement pour pallier l'absence de chaîne légère.

De plus, la boucle hypervariable CDR3 est en général plus étendue (18 résidus chez le dromadaire contre 11 dans le domaine V<sub>H</sub> de souris, par exemple). On y retrouve très fréquemment un résidu cystéine, qui peut alors former un pont disulfure stabilisant avec la boucle CDR1 ou la région FR2 (**Figure 9**). Ces caractéristiques, associées à d'autres mutations, permettent aux CDR des nanobodies d'adopter un large panel de conformations tridimensionnelles, et donc de cibler une grande variété d'épitopes<sup>117</sup>.



**Figure 10 : Structure tridimensionnelle du lysozyme de poulet en complexe avec (A) son substrat enzymatique, (B) les domaines  $V_L$  et  $V_H$  d'un anticorps monoclonal de souris et (C) un  $V_{HH}$  inhibiteur.** Les codes PDB de chaque structure sont indiqués entre parenthèses. Les boucles CDR1 sont représentées en rouge, CDR2 en vert et CDR3 en bleu, les ponts disulfures figurent en jaune. Le mAb interagit avec la surface extérieure de l'enzyme, tandis que la boucle CDR3 du  $V_{HH}$  s'étend jusque dans son site actif. Figure adaptée de Wesolowski *et al.*<sup>115</sup>, images générées à l'aide du programme PyMOL.



**Figure 11 : Complexe entre le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique et le nanobody Nb80<sup>118</sup>.** **A :** La surface convexe formée par le paratope du nanobody lui permet de se lier dans des cavités antigéniques, localisées du côté cytoplasmique du récepteur sous sa forme active. **B :** Représentation de l'épitope vu du côté cytoplasmique (œil symbolisé sur le panel A). Chaque CDR du nanobody se lie à des régions différentes de l'épitope, rassemblées par la conformation tridimensionnelle du récepteur, mais discontinues sur sa séquence. Figure adaptée de Manglik *et al.*<sup>114</sup>

### 2.3.3. Nanobodies et RCPG<sup>119</sup>

C'est ainsi que le paratope des nanobodies est entre autres capable de former une surface protubérante, qui lui permet d'accéder à des épitopes enfouis, inaccessibles aux anticorps conventionnels<sup>120,121</sup>. Dans le cas du lysozyme par exemple, le paratope d'un nanobody est capable de pénétrer jusque dans le site actif de l'enzyme (**Figure 10**). La surface de contact entre le nanobody et son antigène est alors aussi étendue qu'elle le serait avec le F<sub>V</sub> d'un anticorps conventionnel, et ce malgré l'absence d'un deuxième domaine Ig<sup>122</sup>.

Pour les protéines membranaires en général, et les RCPG en particulier, cette propriété est particulièrement intéressante. Elle permet aux nanobodies de reconnaître des épitopes proches du site orthostérique, ce qui leur confère un grand potentiel de spécificité et de sélectivité.

Dans un objectif thérapeutique, plusieurs nanobodies ciblant les récepteurs aux chimiokines CXCR2<sup>123</sup>, CXCR4<sup>124</sup> et CXCR7<sup>125</sup> ont été identifiés. Ces récepteurs sont respectivement connus pour être impliqués dans les mécanismes inflammatoires, le processus d'infection du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), et le développement tumoral, ce qui en fait des cibles de choix. Un candidat nanobody inhibiteur de CXCR4 a été porté jusqu'en phase clinique par la société Ablynx<sup>126</sup>. A cause de leur petite taille, les nanobodies sont, tout comme les fragments d'anticorps, rapidement éliminés de l'organisme. Différentes approches telles que la PEGylation<sup>127</sup>, la multimérisation<sup>128</sup> ou la fusion à un F<sub>C</sub><sup>129</sup>, permettent d'augmenter ce temps de demi-vie en cas de besoin.

Les nanobodies ciblant les RCPG sont également très prisés comme outils de recherche, en tant que chaperones de cristallisation par exemple. En effet, ils ont permis les premières co-cristallisations et résolutions de structures de RCPG sous leur forme active<sup>118,130,131</sup> (**Figure 11**), ce qui représentait un défi particulièrement important étant donné le manque de stabilité de ce type de conformations<sup>114</sup>. Les nanobodies utilisés stabilisent le récepteur en mimant l'action de la protéine G, augmentant ainsi l'affinité du récepteur pour son ligand agoniste. Un nanobody a également permis de résoudre la structure du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique lié à la protéine G en stabilisant l'hétérotrimère G $\alpha_s$ <sup>57</sup>.

Nombre de ces nanobodies stabilisants sont donc des modulateurs allostériques qui, en dehors des expériences de cristallogénèse, ont donné lieu à d'importantes avancées dans la compréhension des mécanismes d'activation des RCPG<sup>132</sup>.

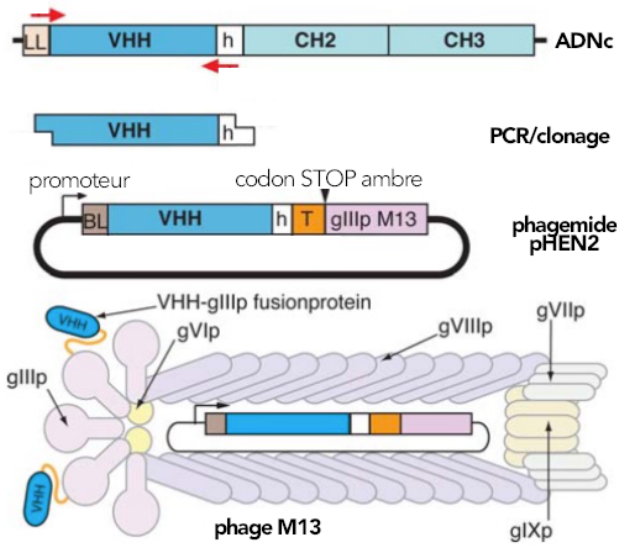
Enfin, leur petite taille associée à leur capacité à reconnaître une conformation spécifique en fait également des biosenseurs très puissants utilisables *in cellulo*. Ces « intrabodies » peuvent alors être mis à profit pour suivre la localisation des récepteurs, ou moduler les voies de signalisation qui y sont associées<sup>133,134</sup>.



#### 2.3.4. Production hétérologue et avantages biotechnologiques

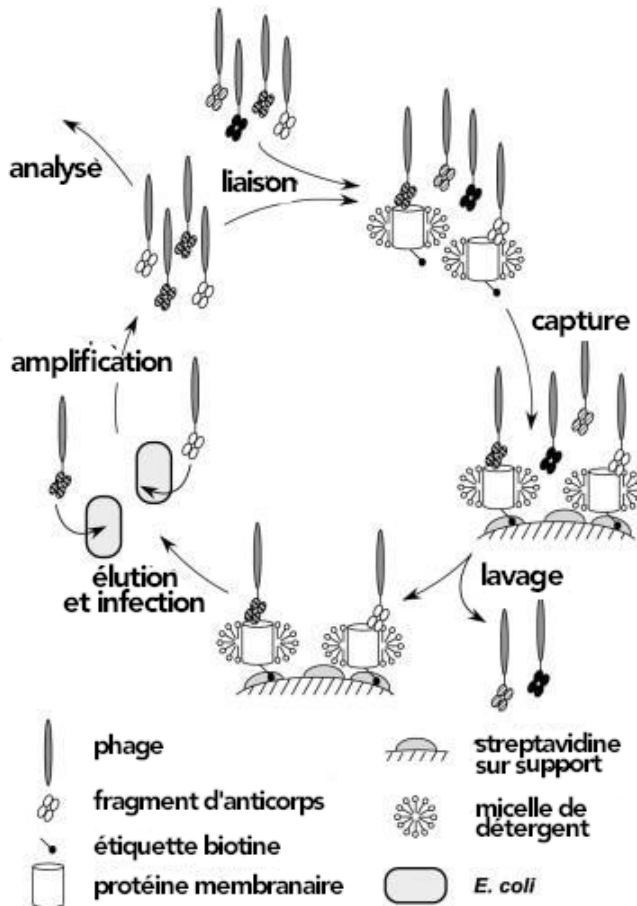
Les caractéristiques biochimiques des nanobodies s'avèrent particulièrement avantageuses pour leur production hétérologue. Ils sont de nature monomérique et ne requièrent aucune modification post-traductionnelle (en dehors du pont disulfure). Ils peuvent donc facilement être exprimés en grande quantité au moyen de systèmes d'expression peu coûteux tels que la bactérie *Escherichia coli*<sup>135</sup> ou les levures *Saccharomyces cerevisiae*<sup>136</sup> et *Pichia pastoris*<sup>137</sup>. D'autre part, contrairement aux fragments d'anticorps conventionnels, qui présentent fréquemment un important degré d'hydrophobicité et tendent facilement à l'agrégation, les nanobodies sont des protéines hautement solubles et très stables : leur température de dénaturation avoisine souvent les 60-80°C, et ils possèdent une forte capacité de renaturation<sup>138,139</sup>.

Par ailleurs, les nanobodies étant constitués d'un domaine unique, codé par un seul fragment génétique, le clonage d'une banque à partir de d'ADN complémentaire (ADNc) issus des lymphocytes B d'un animal immunisé suit un processus simple et linéaire<sup>140</sup>. La banque ainsi constituée conserve toute la diversité et la fonctionnalité des anticorps produits par l'animal.



**Figure 12 : Représentation des étapes clés du clonage d'une banque de V<sub>H</sub>H au sein d'un phagemide codant pour le bactériophage M13.** Les séquences codant pour le répertoire de V<sub>H</sub>H sont amplifiées par PCR, au moyen d'amorces spécifiques à la séquence *leader* (LL) en amont et à la région charnière (h) en aval. L'ADN matrice est l'ADNc généré à partir de l'ARN extrait des lymphocytes d'un animal immunisé, purifiés d'un échantillon sanguin. Les produits de PCR sont clonés dans un phagemide, sous le contrôle d'un promoteur bactérien inductible (flèche), en aval d'une séquence d'adressage périplasmique (BL pour *Bacterial Leader peptide*) et en amont d'une ou plusieurs étiquettes d'affinité (T). Un codon stop ambre (séquence nucléotidique TAG) sépare la séquence

du V<sub>H</sub>H de celle de la protéine g3 (gIIIp), protéine de capsid mineure du phage M13. Ces vecteurs sont destinés à être exprimés par une souche bactérienne *E. coli* suppressive de codon ambre, comme la souche TG1. L'infection de la banque bactérienne avec un phage auxiliaire permettra la production d'une banque de phages recombinants, chacun présentant un V<sub>H</sub>H à son extrémité, en fusion avec la protéine g3. Les fragments d'anticorps d'intérêt pourront ensuite être sélectionnés par la technique dite du phage display. Figure traduite de Wesolowski *et al.*<sup>115</sup>



**Figure 13 : Représentation schématique d'un cycle de phage display.** Une banque de fragments d'anticorps clonés dans un phagemide et exprimés à la surface du bactériophage M13 est mise au contact de la protéine cible. Ici, la cible est une protéine membranaire purifiée dans des micelles de détergents et capturée sur une surface via une interaction streptavidine-biotine. Les phages présentant un V<sub>H</sub>H ayant une affinité pour la cible s'y lient, et une étape de lavage permet d'éliminer les phages liés de manière non spécifique. Les phages restants sont élués de la surface (classiquement grâce à un saut de pH) puis utilisés pour infecter des bactéries. Ceux-ci sont ensuite amplifiés pour constituer une sous-librairie, qui pourra être utilisée pour un autre cycle de sélection. La procédure comporte en général trois à cinq cycles de sélection, suite auxquels les clones individuels sont analysés pour déterminer la séquence des V<sub>H</sub>H sélectionnés. Figure traduite de Röthlisberger *et al.*<sup>141</sup>

### 2.3.5. Méthodes de criblage

Différentes approches permettant de sélectionner des V<sub>H</sub>H de haute affinité pour un antigène ont fait leurs preuves<sup>142</sup>, la méthode du *phage display* étant à ce jour la plus populaire et la plus éprouvée, tant grâce à sa robustesse qu'à son aspect hautement versatile.

Celle-ci consiste à fusionner les séquences codant pour les fragments d'anticorps à l'extrémité de la protéine de surface d'un bactériophage comme le phage M13 (**Figure 12**). S'en suit un processus de sélection durant lequel la banque de phage sera mise en contact avec l'antigène, celui-ci pouvant être présenté sous un grand nombre de formats<sup>143</sup> (purifié et adsorbé à une surface, mais également sous forme de cellules entières ou de préparations membranaires recombinantes). À la fin d'un cycle de sélection, seuls les phages recombinants capables de se lier à l'antigène sont conservés et amplifiés. La réalisation de plusieurs cycles de sélection successifs permet d'enrichir la banque en phages fusionnés à des nanobodies de haute affinité pour la cible. Ces différentes étapes sont représentées schématiquement dans la **Figure 13**.

La quantité d'antigène requise pour le processus de sélection est relativement faible (de l'ordre d'une centaine de microgrammes de protéines purifiées), mais la qualité et la conformation de l'antigène tout au long du criblage est critique pour sélectionner des fragments d'anticorps pertinents. En comparaison avec la sélection et la production d'anticorps monoclonaux au moyen d'hybridomes, qui est un processus long de plusieurs mois, la technique du phage display peut être mise en œuvre en quelques semaines. La modification des conditions de sélection et des moyens de présentation de l'antigène permet d'orienter facilement la spécificité des anticorps criblés. Cependant, il est nécessaire de travailler avec une préparation antigénique de qualité, soluble et stable durant toute l'étape de criblage. Ce critère n'est pas anodin dans le cas des RCPG, réputés pour être peu stables en solution.

D'autres méthodes de criblage plus originales ont également été utilisées avec succès. On peut par exemple citer les approches de *yeast display*<sup>144,145</sup> et de *bacterial display*<sup>146</sup>, exploitant respectivement des cellules de levures et des cellules bactériennes comme plateforme de présentation des fragments d'anticorps.



## 2.4. Les stratégies d'immunisation et leurs limites

Le principal défi à relever pour générer des anticorps spécifiques de RCPG, et susceptibles d'avoir une activité régulatrice, réside dans l'obtention d'antigène homogène, fonctionnel, et en quantité suffisante pour procéder à l'immunisation d'animaux. L'antigène idéal doit être à la fois pur, actif, identique à la version native du récepteur, contenir toutes les modifications post-traductionnelles et présenter tous les épitopes extracellulaires. En pratique, on ne parvient souvent à remplir qu'une partie de ces critères. Pour ce faire, différents types de préparations antigéniques ont été éprouvés<sup>107</sup>.

### 2.4.1. Récepteurs purifiés

L'utilisation d'une préparation de récepteurs natifs purifiés et pleinement fonctionnels se rapproche de la solution idéale, mais elle reste malheureusement très difficile à obtenir pour la majorité des cibles. De plus, le récepteur oscille naturellement entre différentes conformations, et certaines d'entre elles ne seront adoptées que très transitoirement.

La mutation du récepteur, ou l'ajout de ligands, dans le but de faciliter la purification, ou de stabiliser une conformation donnée, sont des stratégies prometteuses, mais qui doivent être envisagées avec prudence. En effet, il est important de ne pas modifier ou masquer les épitopes potentiels. Ainsi, la mutation des sites de glycosylation ou la modification de l'extrémité N-terminale, qui sont des opérations effectuées couramment pour permettre la cristallisation des récepteurs, sont souvent incompatibles avec la génération d'anticorps.

Le choix du détergent utilisé pour la purification est également critique : il est nécessaire d'avoir recours à un détergent à chaîne carbonée courte, afin de ne pas masquer des épitopes, tout en s'assurant que celui-ci est capable de maintenir la conformation du récepteur. De plus, lors de l'immunisation, le détergent sera inévitablement dilué en-dessous de sa CMC, ce qui diminue fortement la durée de vie du récepteur sous sa forme active.

Afin de s'affranchir du détergent, il est également possible d'avoir recours à d'autres molécules, comme les amphipols<sup>147</sup> ou les copolymères SMA (pour *Styrene Maleic Acid*)<sup>148</sup>, ou de reconstituer le récepteur en nanodisques lipidiques, comme détaillé plus haut dans cette introduction. Ces approches présentent plusieurs avantages : en ce qui concerne les polymères SMA et les nanodisques, le récepteur sera présenté dans son environnement naturel, entouré de lipides. Ces objets sont en outre plus stables en solution. Mais pour nombre de ces stratégies, une première étape de purification du récepteur en détergents est nécessaire, et les quantités obtenues sont souvent incompatibles avec celles requises par une campagne d'immunisation.

#### 2.4.2. Cellules entières ou préparations membranaires recombinantes

Surexprimés à la surface de cellules recombinantes, les récepteurs présentent l'avantage d'être dans leur environnement naturel, entourés de lipides. La principale limite de cette approche réside dans le niveau d'expression : si celui-ci est trop faible, l'immunisation générera une quantité importante d'anticorps non spécifiques, et des étapes de contre-sélection seront probablement nécessaires durant le processus de criblage.

La préparation antigénique peut alors être injectée sous forme de cellules entières, ou de préparations membranaires. Cette dernière solution permet d'enrichir la préparation en récepteur d'intérêt.

#### 2.4.3. Pseudo-particules virales

Une approche alternative consiste à utiliser la capacité naturelle des virus à bourgeonner. Ainsi, la co-expression d'un RCPG et de la protéine virale Gag va conduire à la formation de particules non infectieuses, issues de la membrane de la cellule hôte, et présentant le récepteur d'intérêt à leur surface. Ces pseudo-particules virales, également appelées lipoparticules, peuvent être utilisées en tant qu'immunogènes, mais également dans le processus de criblage par phage display<sup>149</sup>.

#### 2.4.4. Peptides

L'utilisation de peptides synthétiques, générés à partir des séquences codant pour les boucles extracellulaires des RCPG, est sans nul doute l'approche la moins coûteuse. Dans certains cas comme celui des récepteurs des chimiokines, dont l'extrémité N-terminale est impliquée dans la liaison au ligand, cette stratégie peut permettre d'obtenir des anticorps ayant une activité fonctionnelle<sup>150</sup>. Cependant, les peptides n'étant pas structurés dans l'espace, elle n'est pas généralisable à tous les RCPG.

#### 2.4.1. Immunisation génétique

L'immunisation d'un animal avec un fragment d'ADN (Acide Désoxyribonucléique) codant pour le récepteur d'intérêt présente un double avantage évident : elle ne requière pas de purification de protéine, et le récepteur cible est exprimé par l'hôte lui-même, ce qui permet de s'affranchir des questions de modifications post-traductionnelles. La principale difficulté rencontrée concerne le niveau d'expression, qui peut être faible, ce qui limite le niveau de la réponse immunitaire engendrée. Ce problème peut être limité en utilisant des adjuvants<sup>151,152</sup>.

En dépit des progrès récents dans les approches d'immunisation et de criblages des anticorps, le nombre d'anticorps spécifique des RCPG disponibles reste faible. Comme souligné précédemment, la majorité des récepteurs sont encore impossibles à purifier, ou difficiles à exprimer dans des systèmes hétérologues. Pour faire progresser ce domaine, il semble donc important de développer des approches d'immunisation alternatives, permettant d'éviter l'utilisation de protéines purifiées, tout en maximisant la réponse immunitaire.

### 3. Le vecteur dérivé du Virus de la Forêt de Semliki (SFV)

#### 3.1. Le SFV, un virus du genre *alphavirus*

##### 3.1.1. Classification et tropisme du virus

Les alphavirus sont des virus enveloppés appartenant à la famille des *Togaviridae*, stockant leur information génétique sous forme d'ARN simple brin. Ce genre recense au moins 26 virus, les plus connus et étudiés étant le virus du Chikungunya, les virus des encéphalites équine, le virus de la Forêt de Semliki ou encore le virus Sindbis (SIN), largement utilisé comme modèle d'étude en laboratoire. Tous les alphavirus sont capables d'infecter de nombreux vertébrés, allant du petit rongeur jusqu'à l'Homme, et la plupart d'entre eux se répliquent également chez les arthropodes hématophages — principalement les moustiques —, qui constituent alors un réservoir naturel ainsi qu'un vecteur d'infection. Cette caractéristique permet également de les qualifier d'Arbovirus (pour *Arthropod Borne Viruses*).

La plupart du temps, les hôtes vertébrés naturels de ces virus sont des animaux sauvages de différentes espèces ou des oiseaux, et l'Homme n'est pas impliqué dans le cycle zoonotique, le virus du Chikungunya faisant exception à cette règle. Toutefois, plusieurs épisodes d'infection humaines ont déjà été observés, causant des fièvres, des arthralgies ou encore une atteinte du système nerveux central (encéphalite) pouvant s'avérer mortelle<sup>153</sup>.

Le virus de la Forêt de Semliki (SFV) doit son nom à la forêt ougandaise dans laquelle il a été isolé en 1945<sup>154</sup>. Abrité naturellement par les oiseaux, les signalements de son implication dans une endémie chez l'Homme restent extrêmement rares<sup>155</sup>.

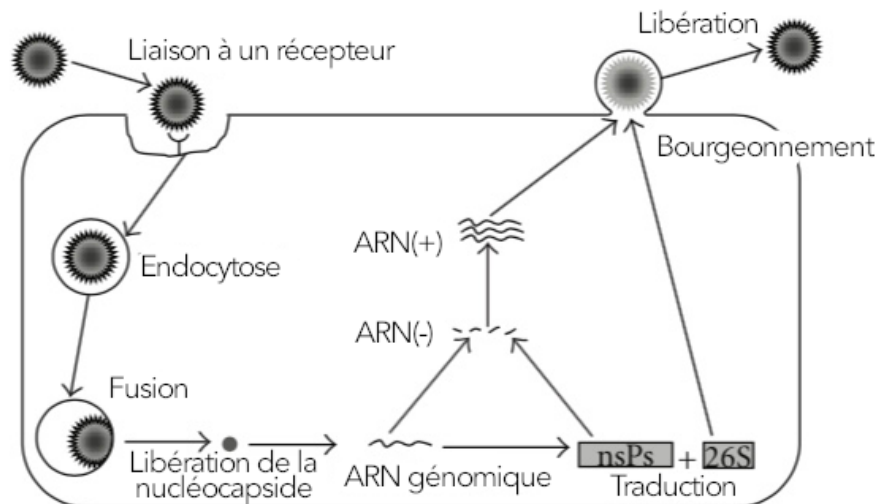
Chez l'organisme hôte, on observe une répllication des particules virales dans de nombreux types cellulaires, à savoir les cellules neuronales et gliales, les muscles lisses et striés, les cellules lymphoïdes, les cellules synoviales, et le tissu adipeux brun, avec toutefois un neurotropisme plus ou moins marqué en fonction des souches virales<sup>156</sup>.

Dans les années 1990, le génome de ce virus a été modifié dans le but d'en faire un système d'expression<sup>157</sup>, peu après ceux du SIN<sup>158</sup> et du virus de l'Encéphalite Équine Vénézuélienne<sup>159</sup> (VEE).

##### 3.1.2. Structure et organisation du génome

Le SFV est une particule sphérique ayant un diamètre compris entre 65 et 70 nm. La nucléocapside, de forme icosahédrique, est constituée d'une protéine de capsid unique. Elle est enveloppée par une bicouche lipidique provenant de la cellule infectée, et décorée par les glycoprotéines virales E1 et E2, organisées en trimères d'hétérodimères. Ces complexes sont organisés de manière uniforme sur toute la surface de la particule virale, et sont impliqués dans le mécanisme d'infection. La nucléocapside renferme

l'ARN viral simple brin, dont la taille est comprise entre 11 et 12 kb. Celui-ci est de polarité positive, ce qui signifie qu'il peut être directement pris en charge par la machinerie de la cellule hôte pour être traduit en protéines virales. Son extrémité 5' est surmontée d'une coiffe méthylée, et son extrémité 3' est polyadénylée (queue poly(A)). Le génome viral contient deux cadres de lecture ouverts. Le premier, qui représente environ 75 % de la longueur du génome, code pour les protéines non structurales (nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4). Celles-ci forment le complexe de réplication, chargé de la transcription et de la réplication de l'ARN viral. Le second cadre de lecture est exprimé sous le contrôle d'un promoteur sous-génomique fort, le promoteur 26S. Il code pour les protéines structurales du virus, à savoir la protéine de capsid, la glycoprotéine p62 (ou E2E3), la protéine p6 et la glycoprotéine E1<sup>160</sup>.



**Figure 14 : Cycle viral du SFV, et plus généralement des alphavirus.** L'entrée du virus dans la cellule est médiée par sa liaison à un récepteur membranaire, qui engendre une endocytose dans des vésicules à manteau de clathrine. La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale provoque le relargage de la nucléocapside dans le cytoplasme. Celle-ci se désassemble pour libérer l'ARN génomique, qui sera d'une part traduit en protéines non structurales (nsPs), et d'autre part répliqué, avec la production d'un ARN(-) intermédiaire. L'ARN(-) sert également de matrice pour la production d'un ARN(+) sous-génomique, l'ARN 26S (26S), qui code pour les protéines structurales du virus. L'ARN génomique transcrit est encapsidé par les protéines de structure néosynthétisées, ce qui conduit au bourgeonnement et à la libération de nouveaux virions. Figure traduite de Leung *et al.*<sup>161</sup>

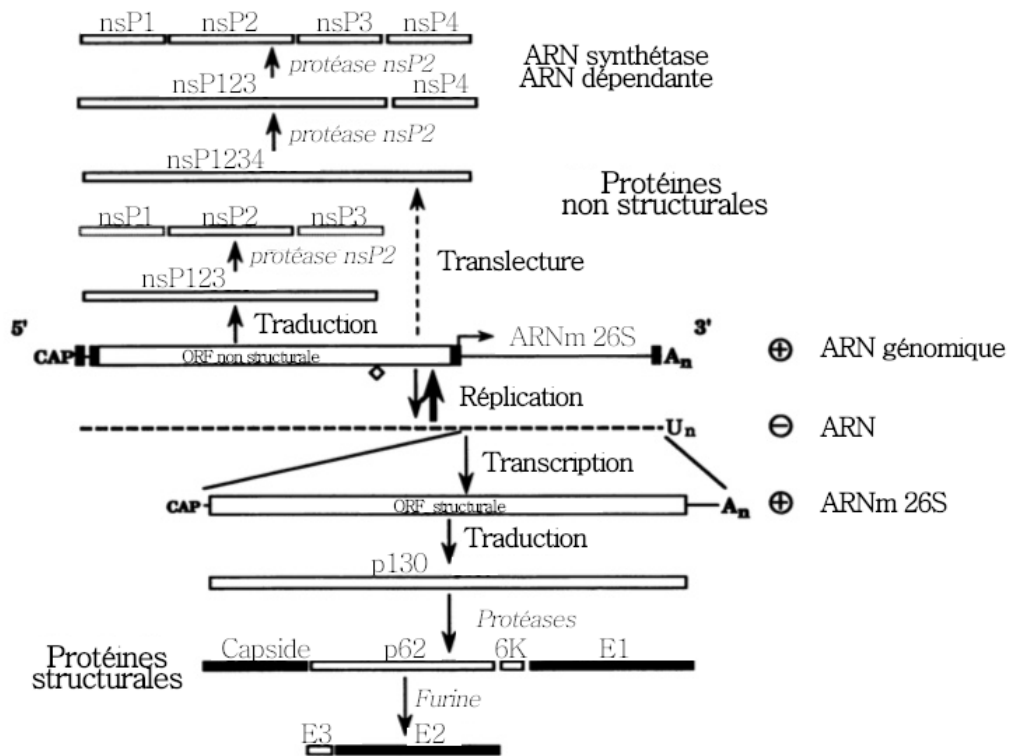
### 3.1.3. Mécanisme d'infection et cycle de réplication virale

Les alphavirus sont capables d'infecter un très grand nombre d'espèces, et le SFV ne fait pas exception à la règle. *In vitro*, ce virus est en effet capable d'infecter une grande variété de types cellulaires de différentes origines<sup>162</sup>. Une des explications proposées pour expliquer ce large spectre d'hôtes serait la capacité du virus à se lier à différents récepteurs cellulaires ou facteurs d'adhésion via le dimère E1-E2, parmi lesquels le récepteur à la laminine, le CMH de classe I, l'intégrine  $\alpha 1\beta 1$  ou encore l'héparane sulfate présent à la surface des cellules<sup>163</sup>.

Le virus est ensuite endocyté par l'intermédiaire de vésicules à manteau de clathrine. Le pH acide des vésicules permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale de la cellule, ce qui conduit à la libération de l'ARN génomique dans le cytoplasme. Cet ARN, également appelé ARN(+)<sub>42S</sub>, est ensuite pris en charge par les ribosomes. Les protéines non structurales du virus sont traduites en premier, sous forme d'une polyprotéine nsP1234. La protéine nsP2 possède une activité protéasique qui permet de libérer la protéine nsP4. Le complexe protéique nsP123-nsP4, associé à d'autres acteurs cellulaires, constitue l'ARN synthétase ARN dépendante, qui permet alors de synthétiser un brin d'ARN de polarité négative à partir de l'ARN(+)<sub>42S</sub> génomique. Cet ARN(-) sert de matrice pour la synthèse de deux ARN de polarité positive, à savoir un nouvel ARN(+)<sub>42S</sub>, destiné à être encapsidé dans un nouveau virion, et un ARN sous-génomique produit à partir du promoteur sous-génomique 26S, appelé ARN(+)<sub>26S</sub>.

La polyprotéine nsP123 est progressivement digérée par nsP2, donnant naissance à plusieurs intermédiaires protéiques avant l'apparition des protéines non structurales matures individuelles, à savoir nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4. Chaque protéine non structurale a un rôle bien précis à jouer dans les processus de transcription et de réplication de l'ARN viral, et la cinétique de production de chaque intermédiaire a son importance. Elle permet notamment une régulation très fine de la synthèse des ARN viraux. Dans la phase précoce d'infection, le cycle de transcription s'oriente principalement vers la synthèse d'ARN(-) matrice puis d'ARN(+)<sub>42S</sub> génomique, les ARN(+)<sub>26S</sub> sous-génomiques ne seront synthétisés que dans une phase plus tardive.

La traduction de l'ARN(+)<sub>26S</sub> conduit à la synthèse des protéines structurales du virus. Les glycoprotéines d'enveloppe, p62 et E1, dimérisent au cours de leur adressage vers la membrane plasmique. La protéine p62 est clivée par une protéase de la cellule hôte (la furine) pour former les deux protéines E2 et E3. En parallèle, on observe une très forte expression de la protéine de capsid. D'une part, celle-ci s'associe avec une molécule d'ARN(+)<sub>42S</sub> via le site d'encapsidation, ce qui constitue un point de nucléation probablement nécessaire à l'auto-assemblage de la nucléocapside.



**Figure 15 : Organisation du génome du SFV et répllication virale.** L'ARN(+) génomique 42S est représenté au centre. Il comporte un cadre de lecture ouvert traduit en une polyprotéine non structurale nsP1234, dont le clivage protéolytique donnera naissance aux protéines nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4. La traduction de la protéine nsP4 a lieu grâce à un phénomène de translecture d'un codon stop opale (séquence UGA), représenté par un losange. Le complexe nsP4-nsP123, associé à d'autres acteurs cellulaires, constitue l'ARN polymérase ARN dépendante, qui prend en charge la répllication de l'ARN génomique, *via* la synthèse d'une molécule d'ARN(-) complémentaire. Les protéines structurales sont issues de la traduction d'un ARN sous-génomique, l'ARN(+)-26S. Le clivage post-traductionnel de la polyprotéine structurale p130 conduit à la formation de la protéine de capsid, la protéine p62, la protéine 6K et la glycoprotéine E1. La protéine p62 est finalement clivée au cours de sa maturation dans le réticulum endoplasmique de la cellule hôte pour donner les glycoprotéines E2 et E3. Les protéines présentes dans le virion sont grisées. Figure adaptée de Strauss *et al.*<sup>156</sup>

D'autre part, les protéines de capsid interagissent avec les dimères E1-E2, plus précisément avec le domaine C-terminal de la protéine E2, permettant ainsi la fusion des nucléocapsides avec la membrane plasmique et le bourgeonnement de nouvelles particules virales enveloppées à la surface de la cellule infectée (mécanisme détaillé dans la revue de Strauss *et al.*<sup>156</sup>). Les grandes étapes du cycle de vie du virus sont schématisées dans la **Figure 14**, tandis que la **Figure 15** apporte une vision plus détaillée au niveau génomique.

#### 3.1.4. Impact de l'infection sur la cellule hôte

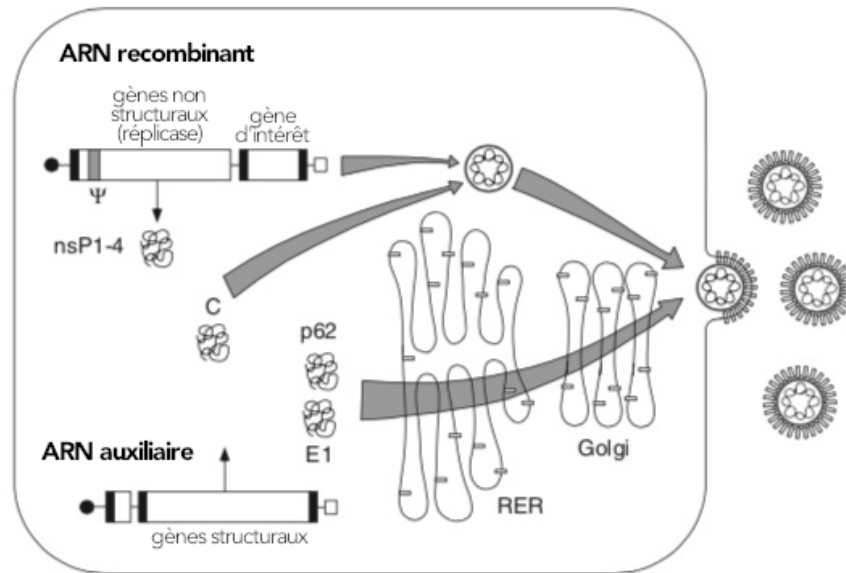
La réplication des alphavirus n'entraîne pas d'effet délétère lorsqu'elle a lieu dans des cellules d'insectes, mais elle conduit à l'apoptose des cellules mammifères<sup>164</sup>.

Chez ces hôtes, entre quatre et six heures post-infection, la production de virions augmente rapidement jusqu'à atteindre un plateau de 2000 virions par cellules infectées et par heure<sup>156</sup>. Ce relargage massif de particules virales cause des dommages irrémediables à la membrane plasmique, induisant rapidement la lyse des cellules infectées.

De plus, il a été démontré que la protéine nsP2, localisée en partie dans le noyau de la cellule hôte<sup>165</sup>, était responsable de l'activation de voies apoptotiques, notamment via la protéine p53<sup>166</sup>. Dans le système nerveux central, l'infection engendre en outre la surexpression des récepteurs TLR (pour *Toll Like Receptor*), capables de stimuler le système immunitaire inné<sup>167</sup>.

Enfin, environ trois heures après infection, on observe une inhibition de la synthèse des protéines endogènes de la cellule hôte, ce qui permet à celle-ci de se consacrer entièrement à la production de protéines virales<sup>168</sup>.





**Figure 16 : Représentation schématique de la production de particules SFV recombinantes *in cellulo*.** Les ARN recombinants et auxiliaires sont co-transfectés dans une lignée cellulaire, en général des cellules BHK-21. La réplicase virale, codée par l'ARN recombinant, amplifie les deux molécules d'ARN. La protéine de capsid (C) empaquète uniquement l'ARN recombinant dans les nucléocapsides néoformées, car seul celui-ci comporte le signal d'encapsidation ( $\Psi$ , séquence grisée). L'assemblage et le bourgeonnement des nouvelles particules virales a lieu au niveau de la membrane plasmique. Les séquences noires représentent les séquences d'interaction avec la réplicase virale. Les ARN viraux sont coiffés par une guanosine méthylée en 5' (cercles noirs) et comportent une queue poly(A) en 3' (carrés blancs). Figure traduite de Liljeström *et al.*<sup>169</sup>

## 3.2. Les vecteurs d'expression dérivés

### 3.2.1. Étapes du développement et fonctionnement du système

Bien que le cycle viral naturel débute par la liaison et l'endocytose d'une particule infectieuse à une cellule cible, l'introduction directe d'ARN génomique dans la cellule par électroporation permet également de donner lieu à une infection et à la production de nouvelles particules virales<sup>170</sup>. Cette caractéristique a été exploitée dans le but de développer des vecteurs d'expression dérivés des génomes alphaviraux.

En 1991, l'équipe de Henrik Garoff a développé les premiers vecteurs dérivés du réplicon du SFV, basés sur l'ADN complémentaire du génome de la souche SFV4 du virus<sup>157</sup>.

Pour ce faire, une cassette de clonage a été insérée en lieu et place des séquences codant pour les protéines structurales du virus. Les séquences codant pour les protéines non structurales (c'est-à-dire le complexe de réplication viral) ont été conservées et placées sous le contrôle du promoteur eucaryote SP6. Le vecteur contient également des courtes régions conservées aux extrémités 5' et 3' du génome viral, nécessaires à la réplication de l'ARN. Le transgène est donc cloné à la place des gènes structuraux du virus, sous le contrôle du promoteur sous-génomique 26S. L'ARN recombinant obtenu après transcription *in vitro* du vecteur est introduit dans une lignée cellulaire par transfection. Il induit alors une forte surexpression du transgène, associée à une inhibition de l'expression des gènes de la cellule hôte. La surexpression observée est d'autant plus forte que l'ARN recombinant est autorépliatif.

Pour augmenter l'efficacité de transfection, notamment lors d'approches *in vivo*, il peut être intéressant de procéder à l'encapsidation de l'ARN recombinant au sein de nouvelles particules virales. Cette étape requiert l'utilisation conjointe d'un vecteur auxiliaire (ou vecteur *helper*). Le premier vecteur développé, appelé pSFV-Helper1, contient les séquences 5' et 3' nécessaires à la réplication, ainsi que les gènes structuraux du virus, sous le contrôle du promoteur viral 26S. Seule une partie des gènes non structuraux, comprenant également la région d'encapsidation localisée à la fin du gène nsP1, est supprimée. Après transcription *in vitro*, lorsque les deux ARN (ARN recombinant et ARN auxiliaire) sont co-transfectés dans la cellule hôte, ceux-ci sont transcrits et répliqués grâce aux protéines codées par l'ARN recombinant, tandis que l'ARN auxiliaire fournit les protéines structurales permettant la synthèse de nouveaux virions. Ce dernier étant dépourvu de séquence d'encapsidation, seuls des virus contenant l'ARN recombinant seront synthétisés (**Figure 16**).

Les particules virales recombinantes peuvent alors être utilisées pour infecter de nouvelles cellules, dans lesquelles elles induiront uniquement l'expression de la protéine d'intérêt. Dépourvues de séquences codant pour les gènes structuraux, elles sont qualifiées de « défectives », et ne sont pas capables à elles seules de conduire à la synthèse de nouveaux virions.

Dans le but d'augmenter le niveau de biosécurité, et d'éviter la formation inopportune de particules virales répliquatives par recombinaison génétique, une nouvelle version de vecteur auxiliaire a vu le jour<sup>171</sup>. Le vecteur pSFV-Helper2 comprend une mutation au niveau du gène codant pour la protéine p62. Comme expliqué précédemment, celle-ci est normalement clivée pendant sa maturation pour former les deux glycoprotéines virales E2 et E3. Ce clivage n'est pas nécessaire à la formation de nouveaux virions, par contre les virions présentant à leur surface une protéine p62 non mature ne sont pas infectieux<sup>172,173</sup>. Le site de clivage codé par le pSFV-Helper2 a été modifié pour pouvoir être digéré *a posteriori* par la chymotrypsine. Les particules virales recombinantes néo-synthétisées peuvent donc être activées à volonté par traitement enzymatique, par exemple juste avant d'être utilisées pour un nouveau cycle d'infection.

Aux États-Unis, ce système a été approuvé en 1993 par le comité de sécurité du NIH (*National Institutes of Health*) pour être utilisé dans un laboratoire de niveau de confinement 2<sup>169,174</sup>. En France, il convient de travailler avec ces vecteurs dans un laboratoire de type L2<sup>175</sup>, tandis qu'un laboratoire L1 est suffisant en Allemagne<sup>176</sup> et en Suisse<sup>177</sup>. Le pSFV-Helper2 est encore largement utilisé à ce jour, bien que de nouvelles solutions impliquant l'utilisation de deux plasmides auxiliaires différents aient été développées depuis, dans le but de limiter encore les risques de recombinaison<sup>178</sup>.

Pour s'affranchir de l'étape de transcription *in vitro*, il est également possible d'utiliser le système sous forme d'un vecteur d'ADN, plus stable et moins coûteux à produire qu'un d'ARN nu. Ces plasmides, communément appelés *DNA/RNA layered vectors* en anglais, contiennent la séquence d'ADNc du réplicon viral, placée sous le contrôle d'un promoteur eucaryote, le promoteur CMV<sup>179,180</sup>.

### 3.2.2. Avantages notables et limites

L'efficacité du système a d'abord été éprouvée pour produire la  $\beta$ -galactosidase bactérienne. Les cellules infectées par les particules virales recombinantes surexpriment la protéine d'intérêt jusqu'à 75 heures après infection, à un niveau pouvant atteindre 25 % du contenu protéique cellulaire total<sup>157</sup>. Ces hauts niveaux d'expression protéique sont, comme évoqué précédemment, dus à l'exploitation des signaux de transcription et de répllication du virus. De plus, les molécules d'ARN recombinant sont répliquées et exprimées dans le cytoplasme de la cellule hôte, et ce par le complexe de répllication viral, encodé par l'ARN lui-même. Cette stratégie permet de s'affranchir des limitations rencontrées en cas d'expression nucléaire des gènes (lors du transport ou de l'épissage de l'ARN par exemple).

Par ailleurs, le procédé d'obtention des virus recombinants est simple et rapide à mettre en œuvre : après quelques étapes de clonage standard, une électroporation unique permet d'obtenir en 24 heures un stock de virions présentant un titre de  $10^9$  à  $10^{10}$

particules par millilitre de milieu de culture. Aucune étape d'amplification ou de sélection des cellules transfectées n'est requise<sup>169</sup>.

L'efficacité du système est toutefois hautement dépendante de l'efficacité de la transfection des ARN. L'électroporation permet d'obtenir des taux de transfection très élevés, à condition d'en optimiser finement les paramètres en fonction de la lignée cellulaire utilisée. La transfection médiée par des liposomes, avec un agent commercial comme la Lipofectamine®, peut également être envisagée.

Les particules virales obtenues étant non-réplicatives, elles ne peuvent pas être titrées à l'aide des méthodes traditionnelles, basées sur la quantification des plages de lyse générées par une dilution donnée du stock viral. Une méthode de titration alternative repose sur la quantification absolue des molécules d'ARN recombinantes par RT-qPCR (Transcription Réverse couplée à une PCR quantitative)<sup>181</sup>.

Enfin, le spectre d'hôte du SFV est large, et les particules virales recombinantes sont capables d'induire la surexpression d'une protéine d'intérêt dans la grande majorité des lignées cellulaires eucaryotes utilisées à ce jour (**Tableau 2**). La lignée BHK-21, une lignée de fibroblastes issue de reins de bébé hamster, est retrouvée très couramment, et permet également de supporter la synthèse des particules virales recombinantes.

**Tableau 2 : Lignées cellulaires et cultures primaires infectées avec succès par des particules SFV recombinantes, et autres vecteurs alphavirus.** Tableau traduit de Lundstrom *et al.*<sup>182</sup>

Type cellulaire	Vecteur	Référence
BHK-21 ( <i>baby hamster kidney</i> ), cellules rénales de bébé hamster	SFV, SIN	Liljeström <i>et al.</i> <sup>157</sup>
CEF, ( <i>chicken embryo fibroblast</i> ), fibroblastes embryonnaires de poulet	SIN	Xiong <i>et al.</i> <sup>158</sup>
CHO-K1, ( <i>Chinese hamster ovary</i> ), cellules ovariennes de hamster chinois	SFV	Lundstrom <i>et al.</i> <sup>183</sup>
C6, gliome de rat	SFV	Lundstrom, <i>personal comm.</i>
C6/36, <i>Aedes albopictus</i> , cellules de moustique tigre	SIN	Olson <i>et al.</i> <sup>184</sup>
COS M6, cellules rénales de singe vert	SFV	Blasey <i>et al.</i> <sup>185</sup>
COS-7, cellules rénales de singe vert	SFV	Liljeström <i>et al.</i> <sup>157</sup>
HeLa, carcinome épithélial humain	SFV	Liljeström <i>et al.</i> <sup>157</sup>
HPF, culture primaire de fibroblastes humain	SFV	Liljeström <i>et al.</i> <sup>157</sup>
HEK293, cellules rénales embryonnaires humaines	SFV	Lundstrom, <i>personal comm.</i>
293(EBNA), lignée issue des HEK293	SFV	Lundstrom, <i>personal comm.</i>
HOS, sarcome ostéogénique humain	SFV	Liljeström <i>et al.</i> <sup>157</sup>
Hybridome 179	SFV	Blasey <i>et al.</i> <sup>185</sup>
MDCK, cellules rénales canines	SFV	Olkkonen <i>et al.</i> <sup>186</sup>
MME ( <i>mouse mammary epithelial</i> ), cellules épithéliales mammaires de souris	SFV	Olkkonen <i>et al.</i> <sup>186</sup>
MOLT-4, leucémie lymphoblastique	SFV	Paul <i>et al.</i> <sup>187</sup>
NIE 115, neuroblastome de souris	SFV	Blasey <i>et al.</i> <sup>185</sup>
NIH-3T3, cellules embryonnaires de souris	SFV	Liljeström <i>et al.</i> <sup>157</sup>
NT2N, neurones de rat	SFV	Cook <i>et al.</i> <sup>188</sup>
OLF, épithélium olfactif de souris	SFV	Monastyrskaja <i>et al.</i> <sup>189</sup>
PCN ( <i>primary rat cortical neurons</i> ), culture primaire de neurones corticaux de rat	SFV	Lundstrom, <i>personal comm.</i>
Raji, lymphome de Burkitt humain	SFV	Blasey <i>et al.</i> <sup>185</sup>
RHN, neurones de l'hippocampe de rat	SFV	Olkkonen <i>et al.</i> <sup>186</sup>
RIN, cellules tumorales pancréatiques de rat	SFV	Lundstrom <i>et al.</i> <sup>190</sup>
RPM18226, myélome humain	SFV	Blasey <i>et al.</i> <sup>185</sup>
SCG ( <i>superior cervical ganglion</i> ), cellules du ganglion cervical supérieur	SFV	Ulmanen <i>et al.</i> <sup>191</sup>
SL3, <i>Drosophila melanogaster</i> , cellules de drosophile	SFV	Schlaeger, <i>personal comm.</i>
TK6, lymphoblaste humain	SFV	Blasey <i>et al.</i> <sup>185</sup>
V79, fibroblastes pulmonaires de hamster	SFV	Lundstrom, <i>personal comm.</i>

### 3.3. Applications décrites

#### 3.3.1. Surexpression hétérologue de protéines, en particulier membranaires

Outre l'expression de protéines solubles, les vecteurs SFV ont également été largement utilisés pour la production de protéines. De nombreuses classes de protéines membranaires peuvent notamment être citées, tels que les canaux ioniques (*e.g.* le canal potassique K<sub>V</sub>1.1), les récepteurs ionotropiques (*e.g.* le récepteur 5-HT<sub>3</sub> de la sérotonine), des transporteurs de typologies variées (*e.g.* le transporteur de la dopamine)<sup>192</sup>, ou encore des glycoprotéines virales (*e.g.* glycoprotéine du virus de la rage)<sup>193</sup>. Mais la famille membranaire la plus ciblée dans ces études d'expression est sans nul doute celle des RCPG.

En 2006, des recherches effectuées dans le cadre du programme européen « MePNet » ont comparé trois systèmes d'expression pour la production d'une centaine de RCPG. 95 % des récepteurs ciblés par l'étude ont pu être exprimés dans des cellules mammifères infectées par des particules virales SFV recombinantes, dont 70 % présentant des niveaux d'expression compatibles avec des études de biologie structurale. De plus, l'activité de fixation de ligand radioactif de 41 de ces récepteurs a pu être évaluée, et celle-ci ne s'est avérée négative que dans un seul cas<sup>194,195</sup>.

#### 3.3.2. Transfert de gènes, notamment dans les cellules neuronales

La version sauvage du vecteur SFV étant cytotoxique, l'expression transgénique qu'elle engendre est hautement transitoire. Des versions modifiées du vecteur SFV, présentant une cytotoxicité réduite, ont été mises au point<sup>196</sup>. Ces vecteurs présentent deux mutations ponctuelles au sein du gène codant pour la protéine nsP2, ce qui permet d'une part d'augmenter le niveau d'expression du transgène et la durée de vie des cellules infectées, et d'autre part de mieux préserver leur morphologie et l'expression des protéines endogènes. Ils sont également adaptés à la co-expression de plusieurs cibles exprimées par des particules virales distinctes.

L'injection de particules virales recombinantes codant pour des protéines reportrices dans des tranches d'hippocampe en culture a permis de mettre en évidence l'infection préférentielle des cellules neuronales par rapport aux autres types cellulaires représentés<sup>197</sup>. Sur la base de cette caractéristique, également confirmée *in vivo*<sup>198</sup>, le système SFV a été utilisé en neurobiologie comme vecteur de transfert de gènes<sup>188,199-201</sup>.

### 3.3.3. Thérapie génique et vaccinale

La vaccination prophylactique contre une maladie infectieuse repose sur l'induction d'une réponse immunitaire humorale, médiée par les cellules B plasmiques productrices d'anticorps, pour prévenir l'infection. L'immunisation thérapeutique, visant à éliminer des cellules tumorales ou des cellules infectées, requiert quant à elle l'activation de cellules T cytotoxiques capables de reconnaître spécifiquement les cellules indésirables. La mise en place de ces deux processus sollicite à la fois l'activation des lymphocytes T auxiliaires et des cellules présentatrices d'antigène, en particulier les cellules dendritiques.

Tous les vecteurs alphaviraux, dont le vecteur SFV, sont capables d'induire une réponse immunitaire à la fois cellulaire et humorale, ce qui les rend très attractifs pour développer des approches d'immunisation. Le développement d'une réponse immunitaire efficace serait principalement rendu possible par la synthèse de chimiokines — comme l'interféron de type I — stimulant le recrutement de cellules immunocompétentes, et l'entrée en apoptose des cellules infectées. Les corps apoptotiques sont ensuite pris en charge par les cellules présentatrices d'antigène (mécanisme de *cross-priming*)<sup>202</sup>.

Enfin, l'Homme ne possède en général pas d'anticorps neutralisant dirigés contre le SFV, qui pourraient diminuer l'efficacité de l'immunisation. Il a en outre été démontré chez la souris que l'intensité de la réponse immunitaire n'était pas altérée par des injections répétées du vecteur<sup>203</sup>.

#### ***Thérapie anticancéreuse***

Grâce à ces différentes propriétés, les vecteurs SFV semblent capables de rompre la tolérance de l'organisme vis-à-vis des cellules cancéreuses, et de rendre son efficacité au système immunitaire pour éliminer les cellules tumorales<sup>204</sup>.

Une approche d'administration intéressante, utilisée dans le cadre d'un essai clinique<sup>205</sup>, consiste à encapsuler les particules virales recombinantes dans des liposomes. Cette stratégie permet d'une part de réduire la reconnaissance du virus par le système immunitaire et donc d'augmenter sa persistance dans l'organisme, et d'autre part de mieux cibler les cellules cancéreuses en limitant le tropisme neuronal naturel du virus.

#### ***Développement de vaccins contre les maladies infectieuses***

Plusieurs antigènes viraux ont été exprimés dans le cadre de stratégies vaccinales. On peut citer les exemples de la grippe<sup>203</sup>, du VIH<sup>206</sup>, du papillomavirus humain<sup>207</sup>, de la rage<sup>208</sup> ou encore de l'hépatite C<sup>209</sup>. Certains antigènes bactériens (*Chlamydia pneumoniae*<sup>210</sup>) ou parasitaires (*Plasmodium falciparum*<sup>211</sup>) ont également fait l'objet d'études<sup>212</sup>. Les différentes campagnes d'immunisation ont ciblé plusieurs espèces animales, parmi lesquelles des souris, cochons d'Inde, singes et poussins.

Dans la grande majorité des cas, l'administration du vecteur génère une réponse immunitaire cellulaire dirigée contre les antigènes d'intérêt, ce qui suffit à conférer une protection vaccinale suffisante. La réponse immunitaire humorale, quant à elle, n'est pas détectée systématiquement. Elle semble dépendre de l'antigène, de son mode de présentation, ainsi que de la voie d'injection. En 2004, une étude sur la malaria visait spécifiquement à induire la production d'anticorps perturbant la formation des rosaces<sup>a</sup>. Un vecteur SFV a pu répondre avantageusement à cette problématique. Celui-ci codait pour l'antigène d'intérêt fusionné à un domaine transmembranaire, permettant ainsi sa présentation à la surface des cellules infectées, c'est-à-dire de la même manière que sur les érythrocytes infectés par le parasite<sup>211</sup>.

### 3.3.4. Génération d'anticorps

Deux études conduites en 1999 font référence à l'utilisation d'un vecteur SFV recombinant pour l'obtention d'anticorps monoclonaux utilisables à des fins thérapeutiques ou diagnostiques.

La première ciblait les protéines du prion<sup>214</sup>. La procédure d'immunisation, combinant l'injection directe d'un vecteur d'ADN à des particules virales recombinantes, a permis d'obtenir un grand nombre d'anticorps monoclonaux spécifiques d'épitopes linéaires et conformationnels de la protéine d'intérêt.

La seconde étude ciblait la glycoprotéine d'enveloppe du VIH de type 1<sup>215</sup>. L'administration du vecteur sous forme d'ARN nu a permis la génération d'une réponse humorale chez la majorité des souris injectées. Un anticorps monoclonal spécifique de la protéine gp41 — une des sous-unités de la protéine d'enveloppe du virus — a pu être isolé.

---

<sup>a</sup> Les érythrocytes sains s'organisent autour des érythrocytes infectés par le parasite pour former des agrégats volumineux appelés rosaces. Celles-ci, en obstruant les vaisseaux sanguins, contribuent fortement à la pathophysiologie de la forme sévère de la malaria<sup>213</sup>.

## 4. Description du projet

### 4.1. En quelques mots

Comme nous avons pu le mettre en évidence dans les parties précédentes, le développement d'outils anticorps est capital pour permettre l'évolution de la recherche sur les RCPG.

La mise au point d'une méthode d'immunisation innovante, ne requérant pas l'utilisation d'antigènes purifiés, pourrait permettre d'étudier les nombreux récepteurs pour lesquels les outils biotechnologiques manquent encore, et d'ouvrir la voie au développement de nouvelles molécules thérapeutiques.

Dans ce contexte, les vecteurs dérivés du système SFV nous semblent tout à fait appropriés. Capables d'induire une réponse immunitaire cellulaire et humorale suite à l'immunisation d'un animal contre une cible membranaire, ils sont susceptibles de conduire à la génération d'anticorps spécifiques aux RCPG. La fabrication de tels vecteurs se limitant à des techniques de biologie moléculaire, les cibles les plus délicates à exprimer de manière hétérologue pourraient également être traitées. De plus, grâce au large spectre d'hôte du virus, il est envisageable de tester cette approche sur différentes espèces animales, y compris appartenant à la famille des camélidés, afin de sélectionner des nanobodies.

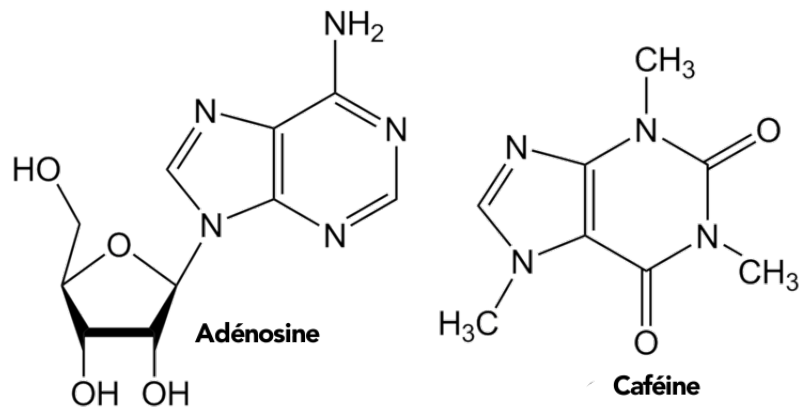
### 4.2. Les récepteurs cibles

Cette étude a été menée en parallèle sur deux récepteurs cibles, appartenant tous deux à la classe A. En plus d'être la classe la plus représentée de la famille, elle comporte également des récepteurs hautement compacts, présentant une surface réduite au solvant, et communément considérés comme étant faiblement immunogènes.

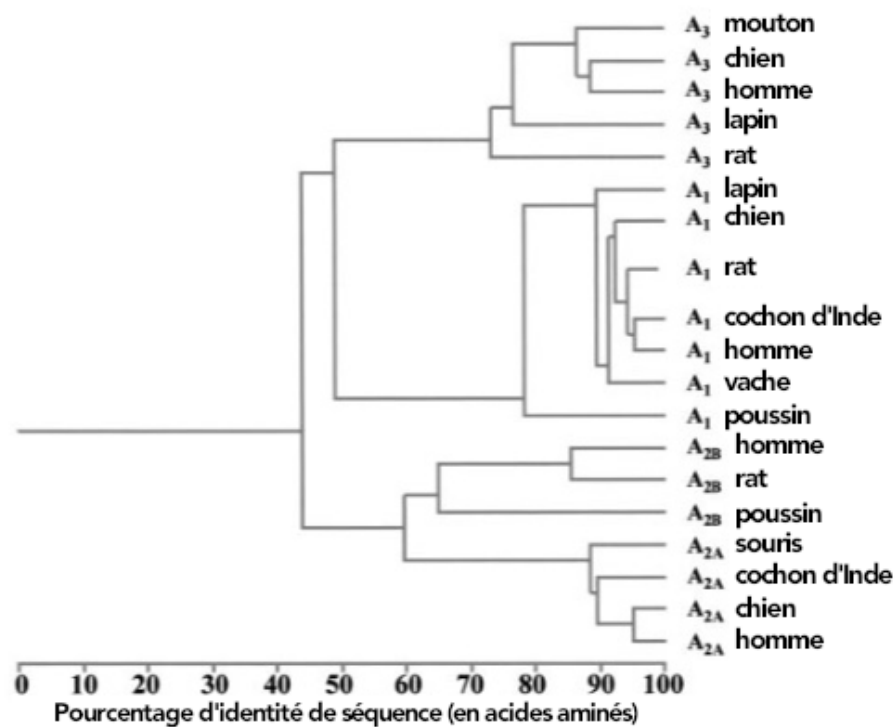
Le premier est le récepteur de l'Adénosine A<sub>2A</sub> (AA<sub>2A</sub>, également appelé A<sub>2A</sub>R, ADORA2 ou ADORA2A dans la littérature). Celui-ci est une cible thérapeutique largement étudiée depuis les années 1980, ce qui lui a valu d'être au cœur de nombreuses études publiées dans la littérature, y compris *in vitro*.

Le second récepteur modèle choisi est le récepteur de la Mélatonine de type 1 (MT<sub>1</sub>). Celui-ci présente un intérêt thérapeutique important, néanmoins le nombre d'outils biochimiques disponibles pour son analyse est plus restreint, et le développement d'anticorps spécifiques serait fortement favorable à son étude.





**Figure 17 : Structures de l'adénosine et de la caféine**, ligands respectivement agonistes et antagonistes des récepteurs de l'adénosine. L'adénosine est formée par l'association d'une adénine et d'un ribose, reliés par une liaison N-glucosidine. La caféine fait partie de la famille des méthylxantines.



**Figure 18 : Dendrogramme** présentant le degré d'identité de séquence entre plusieurs homologues de récepteurs de l'adénosine provenant de différentes espèces. Figure traduite de Fredholm *et al.*<sup>216</sup>, elle-même générée à partir des données de la GPCRdb<sup>217</sup>

#### 4.2.1. Le récepteur de l'adénosine A<sub>2A</sub>

##### *L'adénosine...*

L'adénosine est un nucléoside, formé par l'association d'une base azotée adénine et d'un ribose, reliés par une liaison N-glycosidique (**Figure 17**).

On la retrouve dans l'organisme sous différentes formes. Associée à des groupements phosphate (on parle alors d'Adénosine Mono-, Di- ou Triphosphate, respectivement abrégées AMP, ADP et ATP), elle constitue une réserve d'énergie indispensable au métabolisme cellulaire. Elle participe à la formation des acides nucléiques qui composent l'ADN et l'ARN. Enfin, elle joue un rôle clef de second messenger sous forme d'AMPc.

Dans des conditions normales, l'adénosine est formée continuellement de manière intra- et extracellulaire. L'adénosine extracellulaire provient principalement de l'hydrolyse des molécules d'ATP, tandis que la production d'adénosine intracellulaire est médiée par la déphosphorylation de l'AMP ou l'hydrolyse de la S-adenosyl-homocystéine.

La concentration d'adénosine circulante est maintenue constante grâce à l'action conjointe de différents transporteurs. Elle remplit en général une fonction cytoprotectrice et voit sa concentration augmenter dramatiquement — jusqu'à un facteur 100 — en conditions de stress oxydatif ou d'ischémie. Elle est également impliquée dans le développement de la réponse anti-inflammatoire et dans les mécanismes d'angiogenèse<sup>216,218</sup>. Son action dans ces nombreux processus physiologiques est en partie médiée par ses récepteurs.

##### *...et ses récepteurs*

L'adénosine compte quatre récepteurs appartenant à la famille des RCPG, respectivement nommés A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> et A<sub>3</sub>, pour lesquels elle remplit la fonction d'agoniste complet. Leur classification initiale est basée sur leur réponse pharmacologique suite à l'administration de molécules agonistes (analogues de l'adénosine) et antagoniste (caféine et autres méthylxantines, en **Figure 17**)<sup>219</sup>.

Ces récepteurs sont très conservés parmi les mammifères. A titre d'exemple, le pourcentage d'homologie de séquence protéique entre les récepteurs AA<sub>2A</sub> de souris, de cochon d'Inde, de chien et d'Homme est de l'ordre de 90 % à 95 % (**Figure 18**).

Ils sont retrouvés de manière plutôt ubiquitaire, à des niveaux variables en fonction des tissus. Le récepteur AA<sub>2A</sub> est très fortement exprimé dans le système nerveux central, au niveau du striatum et du bulbe olfactif. On le retrouve également dans de nombreux organes périphériques. Il est présent en quantité dans la rate, le thymus, les cellules leucocytaires et les plaquettes sanguines, ainsi que dans le cœur, les poumons et les vaisseaux sanguins, à un niveau intermédiaire<sup>216</sup>.

### ***Le récepteur AA<sub>2A</sub> : signalisation et particularités structurales***

Dans le système périphérique, le récepteur AA<sub>2A</sub> est couplé à la protéine G<sub>s</sub>, et son activation conduit principalement à une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc. Dans le striatum, où son niveau d'expression est le plus élevé, il est couplé à la protéine G<sub>olf</sub>, qui a une activité effectrice similaire à G<sub>s</sub><sup>220,221</sup>.

Ce récepteur présente également la particularité d'avoir une longue extrémité C-terminale, de 122 acides aminés dans sa version humaine (contre 35 à 40 résidus pour les autres sous-types de ce récepteur). Cette région, prédite comme hautement flexible, ne semble pas impliquée dans le couplage à la protéine G. Elle est toutefois capable d'interagir avec un large éventail de protéines accessoires<sup>222</sup>.

Plusieurs études ont mis en évidence la capacité du récepteur à former des homodimères ou homotrimères *in vivo*, sans pour autant percer à jour le rôle fonctionnel précis de telles structures<sup>223,224</sup>. Des hétérodimères du récepteur AA<sub>2A</sub> avec le récepteur de l'adénosine A<sub>1</sub><sup>225</sup>, le récepteur cannabinoïde CB<sub>1</sub><sup>226</sup> et le récepteur de la dopamine D<sub>2</sub><sup>227</sup> ont également été rapportés, cette dernière combinaison étant sans nul doute la plus étudiée.

### ***Le récepteur AA<sub>2A</sub> comme cible thérapeutique***

L'implication du récepteur dans de nombreuses fonctions biologiques et physiologiques le désigne comme une cible thérapeutique de choix pour le traitement de différentes pathologies, et des molécules agonistes et antagonistes ont été développées en ce sens depuis les années 1980<sup>228</sup>.

A titre d'exemple et de manière non exhaustive, les agonistes spécifiques peuvent être utilisés pour leur pouvoir vasodilatateur et administrés préalablement à une scintigraphie myocardique, pour leur pouvoir anti-inflammatoire, pour la réduction des douleurs neuropathiques, dans le cas de maladies cardiovasculaires<sup>229</sup> ou dans le traitement des ulcères. Les antagonistes, quant à eux, sont particulièrement étudiés dans le cadre du traitement de la maladie de Parkinson et autres atteintes du système nerveux central<sup>230</sup>, et ont fait l'objet de plusieurs essais cliniques. D'autres travaux mettent en évidence l'efficacité des protocoles d'immunothérapie anticancéreuse combinant l'administration d'inhibiteurs<sup>231</sup>. Enfin, les modulateurs pharmacologiques du récepteur AA<sub>2A</sub> sont capables de réguler le rythme cardiaque et la pression sanguine en conditions de stress cellulaire, et ont donc un potentiel thérapeutique intéressant dans le traitement des maladies cardiovasculaires<sup>229</sup>.

### ***Le récepteur AA<sub>2A</sub> comme modèle d'étude***

La structure du récepteur a été résolue en 2008<sup>232</sup>, peu après celles des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques. Il fait donc partie des premiers RCPG étudiés par cristallographie aux rayons X, et a grandement contribué à la compréhension des mécanismes régissant l'activation des RCPG.

L'étude *in vitro* de ce récepteur fait l'objet de nombreuses références dans la littérature. En effet, plusieurs systèmes hétérologues sont en mesure de l'exprimer en quantité compatible avec des approches de purification (principalement les levures *Saccharomyces cerevisiae*<sup>233</sup> et *Pichia pastoris*, et les cellules d'insectes Sf9<sup>232</sup>). Des détergents dérivés de maltosides (DM<sup>234</sup> ou DDM<sup>235</sup>) ou des polymères<sup>236</sup> permettent de l'isoler tout en préservant l'activité de fixation de ligand. Enfin, il a également été reconstitué avec succès dans des nanodisques lipidiques<sup>87</sup> et des liposomes<sup>237</sup>.

Cette grande variété d'outils biochimiques en fait un candidat RCPG de choix pour l'adaptation de méthodes biophysiques aux contraintes allant de pair avec l'étude des protéines membranaires en solution. Il a par exemple permis de développer récemment des approches impliquant la Résonance Plasmonique de Surface (SPR)<sup>88</sup> ou le criblage de fragments par RMN-STD (Résonance Magnétique Nucléaire de Différence de Transfert de Saturation)<sup>238</sup>.

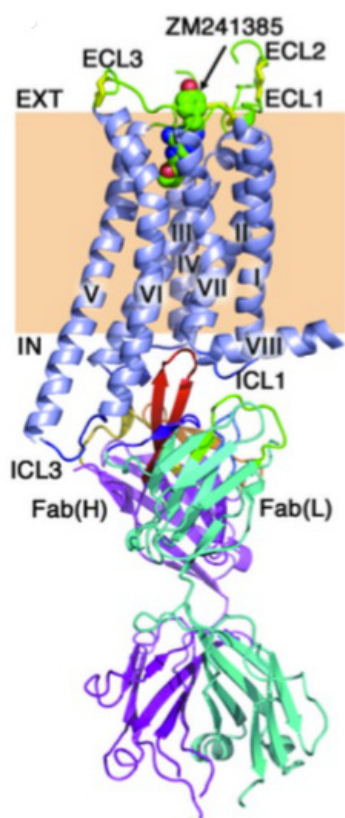
### ***Les outils anticorps disponibles***

On trouve facilement de nombreux anticorps commerciaux dirigés contre ce récepteur<sup>239</sup>. Monoclonaux, polyclonaux, générés au moyen de peptides ou de récepteur purifié, le choix ne manque pas, même si la réactivité des références vendues est en général faiblement caractérisée.

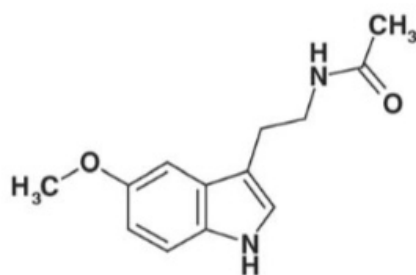
fee

Enfin, deux études récentes décrivent plusieurs nanobodies spécifiques du récepteur, sélectionnés grâce à une approche de *yeast display*. Dans un cas, la banque criblée est d'origine synthétique<sup>241</sup>. Dans l'autre, celle-ci a été obtenue suite à l'immunisation d'un lama avec des récepteurs purifiés et reconstitués en protéoliposomes<sup>145</sup>.

L'immunogénicité du récepteur AA<sub>2A</sub> semble donc suffisante pour engendrer une réponse immunitaire humorale chez la souris et chez le lama, ce qui en fait un modèle intéressant pour le développement et la validation d'une approche d'immunisation innovante.



**Figure 19 : Structure du récepteur  $AA_{2A}$  en interaction avec le Fab2838, en présence de l'antagoniste ZM-241385.** Le récepteur est représenté en bleu-gris, la chaîne légère du Fab (Fab(L)) en cyan et la chaîne lourde (Fab(H)) en violet. Chaque CDR est également représenté dans une couleur différente. Les trois ponts disulfures des boucles extracellulaires figurent en jaune. Le ligand antagoniste, lié dans sa poche de fixation, est illustré par une représentation sphérique. Figure extraite de Hino *et al.*<sup>237</sup>



**Figure 20 : Structure de la mélatonine (N-acetyl-5-methoxytryptamine).** Cette neurohormone est composée d'une fonction amine branchée sur un cycle indole. Hardeland *et al.*<sup>242</sup>

#### 4.2.2. Le récepteur de la Mélatonine de type 1

##### *La mélatonine...*

La mélatonine, de son nom chimique N-acetyl-5-methoxytryptamine, est une neurohormone commune à tous les vertébrés. Elle est synthétisée au cours de la nuit par la glande pinéale, chez les espèces diurnes comme nocturnes<sup>243</sup>. Sa sécrétion est régulée sur un rythme cyclique d'environ 24 heures par la succession des jours et des nuits et la variation de leurs durées. Le centre de contrôle de cette horloge circadienne se trouve dans le Noyau Suprachiasmatique (SCN) de l'hypothalamus, qui reçoit les informations lumineuses captées par la rétine via la voie rétino-hypothalamique, et les relaye à la glande pinéale en empruntant un trajet multi-synaptique<sup>244</sup>.

La mélatonine, représentée en **Figure 20**, est composée d'une fonction amine branchée sur un cycle indole. Ces deux groupements confèrent à la molécule une nature amphiphile qui lui permet de circuler dans les fluides organiques et de traverser toutes les membranes cellulaires<sup>242</sup>.

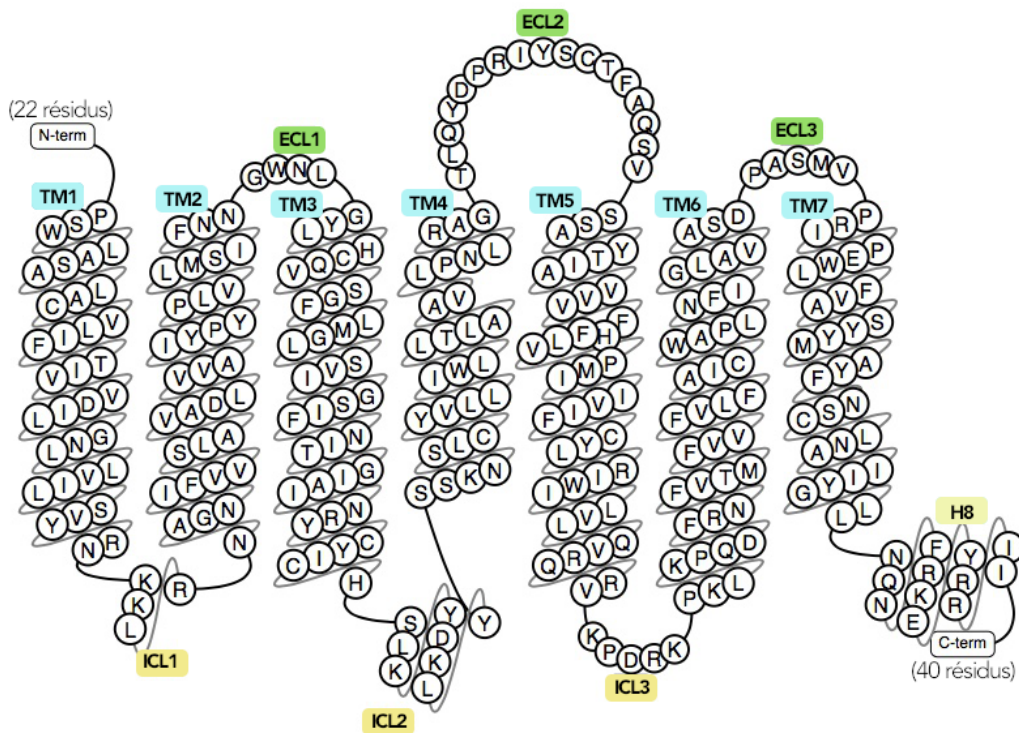
En conséquence, elle n'est pas stockée après sa synthèse, et passe directement dans le sang et le liquide cérébro-spinal. Les informations concernant la photopériode sont ainsi relayées rapidement aux organes et structures dotés de récepteurs spécifiques.

Outre cette fonction bien connue de régulation des rythmes biologiques, la mélatonine possède également un effet immunomodulateur<sup>245</sup>, qui se traduit notamment par l'activation des cellules du système immunitaire et la production de cytokines, ainsi que par une action anti-apoptotique. D'autre part, on lui attribue un effet anti-inflammatoire, médié en particulier par une dérégulation de l'enzyme COX-2. Ces actions sur le système immunitaire contribueraient à expliquer ses vertus antitumorales, mises en évidence par plusieurs études<sup>246</sup>.

De plus, la mélatonine possède un fort effet antioxydant, qui joue notamment un rôle important dans la neuroprotection. Celui-ci s'explique d'une part par sa capacité à interagir avec les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote ainsi que les radicaux libres, et d'autre part par l'activation d'enzymes anti-oxydantes et la dérégulation d'enzymes pro-oxydantes<sup>247</sup>.

##### *... et ses récepteurs*

Chez l'Homme et l'ensemble des mammifères, la mélatonine compte deux récepteurs spécifiques appartenant à la famille des RCPG, les récepteurs MT<sub>1</sub> (Mel<sub>1A</sub>) et MT<sub>2</sub> (Mel<sub>1B</sub>)<sup>248</sup>. Ils présentent une homologie de séquence de l'ordre 55 %, qui s'élève à 70 % pour les segments transmembranaires<sup>249</sup>. Un troisième site de fixation de la mélatonine, initialement nommé MT<sub>3</sub>, a perdu sa nomenclature lorsqu'il a été localisé sur une enzyme cytosolique : la Quinone Réductase 2 (QR2)<sup>250</sup>.



**Figure 21 : Représentation schématique de la séquence protéique et de la structure secondaire du récepteur MT<sub>1</sub> humain.** Les domaines transmembranaires, annotés en bleu, sont séparés par six courtes boucles extracellulaires (annotées en vert) et intracellulaires (annotées en jaune). L'extrémité extracellulaire N-terminale est longue de 22 résidus. L'extrémité C-terminale, quant à elle, est longue de 40 résidus en aval de l'hélice H8. La position des différents domaines est prédite sur la base de la séquence protéique (données structurales non disponibles). Figure adaptée du diagramme disponible sur la GPCRdb<sup>251</sup>

Ces récepteurs sont exprimés dans différents tissus de l'organisme, tant au niveau central que périphérique. Ils ont tous deux été retrouvés dans le cerveau (cervelet, hippocampe, hypothalamus, hypophyse, SCN), la rétine, le système cardiovasculaire (vaisseaux sanguins périphériques, aorte et cœur), le système immunitaire, les organes génitaux (testicules, ovaires), les glandes mammaires, les reins et la peau. Le récepteur MT<sub>1</sub> a également été localisé dans le foie, la vésicule biliaire, le cortex surrénalien, le pancréas et la rate. Le récepteur MT<sub>2</sub> a quant à lui été détecté dans les tissus adipeux, les poumons, le tube digestif et le duodénum<sup>252,253</sup>.

### ***Le récepteur MT<sub>1</sub> : signalisation et particularités structurales***

Le récepteur MT<sub>1</sub> humain est composé de 350 acides aminés (**Figure 21**). On retrouve dans sa séquence plusieurs motifs conservés partagés avec le récepteur MT<sub>2</sub>, tels que le motif NRY dans le TM3, qui diffère légèrement de celui retrouvé chez les autres RCPG de classe A (DRY). Il présente une haute affinité pour la mélatonine, avec une constante de dissociation à l'équilibre ( $K_D$ ) d'environ 20 à 40 pmol.L<sup>-1</sup>. La boucle ECL2 serait impliquée dans la stabilisation de la conformation active du récepteur. Cette présomption nécessite cependant des données structurales, non disponibles à ce jour, pour être confirmée<sup>254</sup>.

Le récepteur MT<sub>1</sub> est principalement couplé à la protéine G<sub>i</sub>, dont l'activation conduit à l'inhibition de la formation d'AMPc, et dans une moindre mesure à la protéine G<sub>q/11</sub>, qui active la phospholipase C<sup>249</sup>.

Des études de BRET ont révélé l'existence *in cellulo* d'homodimères MT<sub>1</sub>-MT<sub>1</sub> et d'hétérodimères MT<sub>1</sub>-MT<sub>2</sub>, dont la formation est indépendante de la présence de ligand<sup>255,256</sup>. Si l'existence *in vivo* d'homodimères reste à démontrer, les hétérodimères MT<sub>1</sub>-MT<sub>2</sub> ont quant à eux une réalité fonctionnelle : leur présence dans la rétine de rat permet aux animaux d'être plus sensibles à la lumière durant la nuit<sup>257</sup>. Le récepteur orphelin GPR50 est également capable d'interagir avec le récepteur MT<sub>1</sub> et inhibe l'activation de ce dernier ainsi que son couplage à la protéine G<sup>258</sup>. Ces deux récepteurs étant connus pour être co-exprimés dans les yeux, les testicules, et plusieurs régions du cerveau, GPR50 est susceptible d'avoir une fonction régulatrice sur le récepteur MT<sub>1</sub> *in vivo*.

De nombreux autres couplages et interactions, conduisant à l'activation de voies de signalisation extrêmement variées, ont pu être observés. La sélection de l'une ou l'autre voie est hautement dépendante du contexte cellulaire, autrement dit du niveau d'expression des molécules de signalisation dans les différents tissus. Les mécanismes de signalisation biaisée du récepteur MT<sub>1</sub> et de son homologue MT<sub>2</sub> sont donc déterminants pour que ceux-ci puissent remplir toutes leurs fonctions physiologiques<sup>259</sup>.



### ***Le potentiel thérapeutique des récepteurs à la mélatonine***

La mélatonine (commercialisée sous le nom Circadin®) et plusieurs de ses analogues — à savoir le ramelteon (*i.e.* Rozerem®), l'agomelatine (*i.e.* Valdoxan®) et le tasimelteon (*i.e.* Hetlioz®) — sont actuellement utilisés cliniquement. Ces composés sont des agonistes non sélectifs des récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> et modulent le rythme circadien et les fonctions neuroendocrines<sup>260</sup>.

L'administration de mélatonine favorise le sommeil indépendamment de l'heure de la journée, décalant ainsi le rythme circadien. Les agonistes des récepteurs mélatoninergiques sont donc indiqués dans le traitement des affections du sommeil et des syndromes qui y sont en général associés, comme les troubles de l'humeur et la dépression<sup>261</sup>. Le récepteur MT<sub>2</sub> notamment apparaît comme une cible de choix pour le développement de nouveaux anti-dépresseurs<sup>262</sup>.

D'autre part, une partie de l'effet neuroprotecteur de la mélatonine est médiée par l'activation de ses récepteurs. Ceux-ci pourraient alors être ciblés dans le but de contrecarrer le stress oxydatif généré par les processus neuroinflammatoires rencontrés dans le cas de la maladie de Huntington<sup>263</sup>, ou lors d'un choc ischémique<sup>264</sup>.

L'utilisation d'agonistes du récepteur MT<sub>1</sub> représente également un intérêt potentiel pour le traitement des cancers du sein ou de la prostate, dans lesquels ils ont un effet oncostatique<sup>265</sup>.

Des molécules antagonistes des récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> permettraient quant à elles d'améliorer les performances d'apprentissage et de mémorisation. Un tel traitement s'avère prometteur dans la médication des symptômes liées à la démence, en particulier dans le cas de la maladie d'Alzheimer<sup>266</sup>.

Dans des modèles animaux d'addiction, le blocage des récepteurs mélatoninergiques permet d'inhiber les symptômes d'hyperlocomotion<sup>267</sup> et le phénomène de récompense<sup>268</sup>. Des antagonistes pourraient donc également être utilisés dans le traitement de la dépendance.

Les traitements actuellement disponibles sur le marché ciblent indifféremment les récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub>. Le développement de nouveaux agonistes et antagonistes sélectifs est important pour affiner les thérapies et améliorer leur efficacité.

### ***Bilan des études in vitro***

Une étude effectuée en 2014 au laboratoire<sup>269,270</sup> décrit un protocole robuste de surexpression du récepteur MT<sub>1</sub> au moyen du système d'expression *Pichia pastoris*. Celui-ci peut ensuite être purifié dans un mélange de détergents constitué de CHAPS et de Fos-Choline-14 (Fos14) tout en conservant partiellement une activité de fixation de ligand. Le récepteur purifié a également été reconstitué avec succès en nanodisques lipidiques.

D'autre part, le récepteur surexprimé en cellules mammifères a pu être extrait des membranes et purifié à l'aide d'un polymère SMA, ce qui permet de s'affranchir de la présence de détergents<sup>271</sup>.

Toutefois, il est important de souligner que les rendements obtenus pour l'ensemble de ces approches moléculaires ne sont pour l'instant pas compatibles avec la majorité des techniques biophysiques, ce qui contribue à expliquer l'absence de données structurales et le faible nombre d'études *in vitro* publiées sur ce récepteur.

### ***Les outils anticorps disponibles***

A ce jour, plusieurs travaux rapportent l'usage de différents anticorps polyclonaux spécifiques du récepteur MT<sub>1</sub>, générés chez le lapin ou la poule à l'aide de peptides mimant le domaine C-terminal du récepteur. Ces anticorps reconnaissent spécifiquement la version humaine du récepteur endogène ou recombinant<sup>272-274</sup>, et certains présentent une réaction croisée pour le récepteur de rat. Le premier anticorps monoclonal de souris, généré à l'aide du même fragment peptidique, a été décrit très récemment, et reconnaît la version native et recombinante du récepteur murin<sup>275</sup>.

Dans une autre étude, un mélange polyclonal a été généré suite à l'immunisation de souris avec des cellules recombinantes exprimant la version humaine du récepteur. Les échantillons sériques caractérisés présentent une réactivité pour les versions humaines et murines du récepteur<sup>276</sup>.

Toutefois, aucun anticorps ou fragment d'anticorps capable de moduler l'activité du récepteur n'a pu être développé, *a fortiori* car les anticorps les plus caractérisés à ce jour ont été générés avec un fragment du récepteur, et non avec le récepteur complet. Les récepteurs mélatoninergiques, et le récepteur MT<sub>1</sub> en particulier, font donc partie des RCPG pour lesquels les études *in vitro* ainsi que la génération d'anticorps spécifiques représentent encore de nombreux défis.

## 4.3. La stratégie mise en œuvre

### 4.3.1. Déroulement et outils mis en place

#### ***Principe général***

L'immunisation d'un animal avec des particules virales SFV recombinantes, codant pour un récepteur d'intérêt, conduirait à l'infection des cellules de l'hôte et donc à la surexpression de cette protéine à leur surface. Exprimée par des cellules mammifères, elle bénéficierait de toute la machinerie cellulaire nécessaire à sa maturation. D'autre part, la forte surexpression associée à l'infection virale augmenteraient la probabilité de génération d'une réponse immunitaire, et ce malgré la faible immunogénicité des RCPG cibles.

La mise en œuvre de ce projet s'est déroulée en trois phases consécutives, introduites ci-après et développées dans les trois grands chapitres de ce manuscrit.

### ***Développement des outils***

La première phase du projet a été consacrée à la mise au point des différents outils moléculaires requis, et donc en premier lieu des particules virales SFV recombinantes constituant l'immunogène.

Le système SFV a précédemment été utilisé au laboratoire pour l'expression de protéines membranaires, tout d'abord dans le cadre du programme européen MePNet évoqué plus haut<sup>194</sup>, puis lors d'un travail de thèse<sup>277</sup>. La soutenance de la thèse, en 2009, a cependant signé la clôture de l'étude, et avec elle la perte des mains expertes dans la manipulation de ces outils. Pour le projet qui nous concerne, la remise en fonction de ce système a été possible grâce à une période de formation au laboratoire d'Immunologie Virale de l'Institut Butantan à São Paulo, sous la direction du docteur Renato Mancini Astray.

Des particules virales codant respectivement pour les récepteurs AA<sub>2A</sub> et MT<sub>1</sub> ont été produites et caractérisées au laboratoire.

Les campagnes d'immunisation peuvent être réalisées grâce aux seules particules virales recombinantes, mais il est toutefois nécessaire d'avoir accès à une source stable et robuste de récepteur cible pour sélectionner et caractériser les anticorps produits. Le cœur de l'expertise du laboratoire réside dans un grand savoir-faire pour la production et la purification de RCPG, c'est pourquoi nous avons choisi de travailler avec les récepteurs sous forme purifiée, exprimés à l'aide de la levure *Pichia pastoris*. Ce système est exploité en routine au laboratoire depuis plusieurs années (***Publication 1***, page 203).

Les récepteurs isolés en détergent étant fortement instables, nous avons développé un protocole de reconstitution en nanodisques lipidiques. La stabilité et la fonctionnalité de ces objets ont été caractérisées de manière extensive par différents tests biochimiques et pharmacologiques.

### ***Génération d'anticorps polyclonaux de souris***

Les particules virales recombinantes synthétisées ont été utilisées pour immuniser des souris. Une première campagne d'immunisation mettant en jeu des virus codant pour le récepteur AA<sub>2A</sub> fusionné à des étiquettes d'affinité, nous a permis de valider l'approche et de comparer plusieurs protocoles d'immunisation. Lors d'une seconde campagne, la procédure la plus efficace a été mise en œuvre pour immuniser deux cohortes d'animaux, chacune avec les particules virales codant pour un des récepteurs sauvages. La réactivité des échantillons sériques polyclonaux obtenus a finalement été caractérisée.

Les expériences d'immunisation ont été réalisées en collaboration avec l'Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques de Strasbourg, dirigé par le professeur Thomas Baumert, grâce au travail du docteur Laurent Mailly.

### ***Génération et criblage d'anticorps de camélidés***

Les virions codant pour le récepteur AA<sub>2A</sub> sauvage ont également été utilisés pour immuniser un alpaga. Une banque de phages recombinants a été clonée à partir des cellules lymphocytaires de l'animal. Ces manipulations ont pu être réalisées grâce au concours du professeur Serge Muyldermans, directeur du groupe d'Immunologie Moléculaire et Cellulaire (Vrije Universiteit Brussel), et au travail du docteur Cécile Vincke.

La banque a ensuite été criblée au laboratoire par la technique du phage display, implémentée pour l'occasion. Les phages sélectionnés ont ensuite été exprimés dans un système bactérien pour permettre leur purification et la caractérisation de leur interaction avec la cible.



## Matériel et Méthodes

*Enseigner, ce n'est pas remplir un vase, c'est allumer un feu.*

*Montaigne*



# 1. Préparation et manipulation des RCPG

## 1.1. Clonage et expression dans la levure *Pichia pastoris*

Les séquences codant pour les protéines d'intérêt ont été préalablement clonées par restriction dans des plasmides dérivés du vecteur commercial pPIC9K (*Invitrogen*), selon les procédures décrites en détail dans une publication<sup>278</sup>. La souche de levure *Pichia pastoris* SMD1163 (*his4*, *pep4*, *prb1*)<sup>a</sup> a été transformée de manière stable, et des clones recombinants présentant un niveau d'expression satisfaisant ont été sélectionnés. La procédure de sélection, basée sur un double critère de résistance à la généticine et de restauration de l'auxotrophie pour l'histidine, est décrite extensivement dans la **Publication 1** (page 203). Les clones recombinants ont été stockés à -80°C dans un milieu YPG (10 g.L<sup>-1</sup> extrait de levure, 20 g.L<sup>-1</sup> peptone, 20 g.L<sup>-1</sup> glucose) additionné de 20 % (v/v) de glycérol.

Les clones sont déstockés par étalement sur un milieu gélosé YPG agar (10 g.L<sup>-1</sup> extrait de levure, 20 g.L<sup>-1</sup> peptone, 20 g.L<sup>-1</sup> glucose, 20 g.L<sup>-1</sup> agar), puis la boîte est incubée à 30°C pendant 24 heures. Une colonie isolée est ensuite repiquée sur milieu gélosé YPG agar additionné de 50 µg.mL<sup>-1</sup> de généticine. Les cellules récoltées après 24 à 48 heures d'incubation à 30°C sont utilisées pour inoculer 200 mL de milieu BMGY (10 g.L<sup>-1</sup> extrait de levure, 20 g.L<sup>-1</sup> peptone, 13.4 g.L<sup>-1</sup> source d'azote YNB sans acides aminés, 10 % (v/v) glycérol, 0.1 M tampon phosphate KPi à pH 6). La préculture est ensemencée dans un erlenmeyer à ailettes et incubée pendant la nuit à 30°C et sous agitation (220 rpm). Elle est ensuite diluée avec du milieu BMGY stérile pour atteindre une densité optique à 600 nm ( $DO_{600}$ ) de 1, et replacée sous incubation à 30°C et 600 rpm. Après 4 à 6 heures de croissance, lorsque la  $DO_{600}$  est comprise entre 4 et 5, les levures sont stérilement récoltées par centrifugation (5 min, 4000 g, température ambiante). Pour permettre l'induction de l'expression protéique, le culot cellulaire est resuspendu dans le même volume de milieu BMMY (10 g.L<sup>-1</sup> extrait de levure, 20 g.L<sup>-1</sup> peptone, 13.4 g.L<sup>-1</sup> YNB, 0.5 % (v/v) méthanol, 0.1 M tampon phosphate KPi à pH 6, 0.4 mg.L<sup>-1</sup> biotine, 2.5 % (v/v) DMSO) additionné d'un ligand antagoniste du récepteur d'intérêt (1 µM ZM-241385 (*Tocris*) pour AA<sub>2A</sub> et 1 µM D600 (*Sigma-Aldrich*) pour MT<sub>1</sub>). La culture est incubée sous agitation (220 rpm) pendant 18 heures à 22°C. Les cellules sont récoltées par centrifugation (5 min, 4000 g, 4°C) et lavées une fois dans du tampon PBS (1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Chaque culot sec issu de 500 mL de culture est stocké dans un tube de 50 mL et conservé à -80°C ou utilisé directement pour l'étape de préparations membranaires.

---

<sup>a</sup> Cette souche présente une mutation dans le gène codant pour l'histidinol déshydrogénase (génotype *his4*), qui la rend auxotrophe pour l'histidine. Elle est également déficiente pour les protéases endogènes codées par les gènes *PEP4* et *PRB1*



## 1.2. Préparations membranaires

Toute la procédure est réalisée dans la glace.

Un culot de cellules issu de 500 mL de culture est resuspendu dans 40 mL de tampon de lyse TNGE froid (50 mM Tris HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl, 10 % (v/v) glycérol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF). La suspension cellulaire est équitablement répartie dans deux tubes de 50 mL. Chaque tube est additionné de 10 mL de microbilles de verre d'environ 0.5 mm de diamètre (*Sigma-Aldrich*).

Les cellules sont lysées mécaniquement dans un appareil d'agitation dédié (Fastprep 24, *MP Biomedicals*), avec 3 cycles de 40 secondes d'agitation à vitesse maximale, entrecoupés de 40 secondes de refroidissement dans la glace. Le lysat est récolté par centrifugation (5 min, 4000 g, 4°C). Le culot, constitué des gros débris cellulaires et des cellules non lysées, est resuspendu avec 20 mL de tampon TNGE froid et soumis à la même procédure de cassage. Au total, 3 cycles de cassage sont réalisés. Les lysats sont rassemblés puis centrifugés 5 minutes à 4000 g et 4°C pour éliminer les éventuelles billes et cellules non lysées.

Le surnageant est ultracentrifugé pendant 30 minutes à 100,000 g et 4°C. Cette étape permet de culoter la fraction membranaire. Celle-ci est resuspendue dans un tampon TNGE froid (50 mM Tris HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl, 10 % (v/v) glycérol, 1 mM PMSF), à raison de 15 mL de tampon pour un culot de cellules lysées issu de 500 mL de culture. La suspension est homogénéisée au potter et stockée à -80°C. Les proportions de tampon indiquées permettent d'obtenir une suspension dont la concentration en protéines totale s'approche de 10 g.L<sup>-1</sup>.

## 1.3. Purification

La solubilisation et la purification des RCPG sont réalisées sur la base de procédures préalablement développées au laboratoire<sup>269</sup>.

Les récepteurs sont purifiés dans des micelles mixtes de détergent et de CHS (Cholesteryl HemiSuccinate) (*Anatrace*) dans un ratio massique 10:1. Pour des raisons pratiques, le pourcentage indiqué dans les paragraphes suivants — et dans l'ensemble du manuscrit — correspond à celui du détergent, à savoir le DDM (*Anatrace*) pour le récepteur AA<sub>2A</sub>, et la Fos14 (*Anatrace*) et le CHAPS (*Sigma-Aldrich*) pour le récepteur MT<sub>1</sub>.

Un ligand antagoniste spécifique à chaque récepteur est ajouté aux tampons de purification et sert d'agent stabilisant. Les ligands choisis, à savoir le DPCPX (*Tocris*) pour le récepteur AA<sub>2A</sub> et le D600 (Methoxyverapamil hydrochloride, *Sigma-Aldrich*) pour le récepteur MT<sub>1</sub>, ont une affinité inférieure à celle de ceux utilisés dans les tests pharmacologiques mis en œuvre sur les récepteurs purifiés.

### 1.3.1. Solubilisation

Les préparations membranaires recombinantes sont diluées dans un tampon de solubilisation (50 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl, cocktail d'inhibiteurs de protéases (cOmplete™ EDTA-free, *Roche*) à raison d'une pastille pour 100 mL de tampon, 0.5 mM EDTA, ligand, détergent), de sorte à atteindre une concentration finale en protéines membranaires de 2 g.L<sup>-1</sup>.

Pour le récepteur AA<sub>2A</sub>, le tampon de solubilisation contient 1 μM de DPCPX et 0.5 % (m/v) de DDM/CHS. Le tampon de solubilisation du récepteur MT<sub>1</sub> contient quant à lui 5 μM de D600, 0.25 % (m/v) de Fos14/CHS et 0.1 % (m/v) de CHAPS/CHS.

La suspension est incubée pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation douce puis clarifiée par ultracentrifugation (30 min, 100,000 g, 4°C). Le surnageant contenant les protéines solubilisées est additionné de 25 mM d'imidazole de haute qualité (Référence I0250, *Sigma-Aldrich*) puis filtré à 0.45 μm.

### 1.3.2. Chromatographie d'affinité au nickel

Les récepteurs d'intérêt sont purifiés sur une colonne de nickel (HisTrap™ HP 1 mL, *GE Healthcare*) montée en série sur un automate de purification (Äkta pure, *GE Healthcare*). La résine est préalablement équilibrée avec un tampon de purification A (50 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl, 25 mM imidazole, 1 μM ligand, détergent). Les tampons de purification du récepteur AA<sub>2A</sub> contiennent 0.05 % (m/v) de DDM/CHS, tandis que ceux du récepteur MT<sub>1</sub> contiennent 0.1 % (m/v) de Fos14/CHS et 0.1 % (m/v) de CHAPS/CHS.

Le solubilisé est chargé sur la colonne à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>, puis la colonne est lavée avec 20 mL de tampon A. Les protéines sont éluées par un gradient de 0 à 100 % de tampon d'éluion B (50 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, 1 μM ligand, détergent) étalé sur 25 mL. Des fractions de 0.5 mL sont récoltées par l'automate tout au long de l'étape d'éluion, et l'absorbance à 280 nm ( $A_{280}$ ) est suivie en continu en sortie de colonne.

Les fractions d'intérêt sont rassemblées et, si nécessaire, concentrées par filtration centrifuge (Vivaspin®, seuil de coupure 30 kDa, *Sartorius*). Pour limiter l'agrégation des protéines, les cycles de centrifugation sont réalisés à une vitesse maximale de 1500 g.

### 1.3.3. Chromatographie d'exclusion stérique

Les échantillons concentrés sont ensuite purifiés par chromatographie d'exclusion stérique sur résine Superdex® 200 (colonne 10/300 GL ou Hiload® 16/600 pg, *GE Healthcare*), à l'aide d'un automate de purification (Äkta FPLC, *GE Healthcare*).

La colonne est préalablement équilibrée en tampon de gel filtration. Le tampon de purification du récepteur AA<sub>2A</sub> est composé de 50 mM d'HEPES à pH 7.4, 150 mM de NaCl, 0.02 % (m/v) de DDM/CHS, 1 µM de DPCPX. Le récepteur MT<sub>1</sub> est purifié avec un tampon contenant 50 mM d'HEPES à pH 7.4, 500 mM de NaCl, 0.1 % (m/v) de Fos14/CHS, 0.1 % (m/v) de CHAPS/CHS et 1 µM de D600.

L'échantillon injecté est élué à un débit de 0.3 mL.min<sup>-1</sup>. Des fractions de 0.5 mL sont récoltées par l'automate tout au long de l'éluion, et l' $A_{280}$  est suivie en continu en sortie de colonne.

## 1.4. Reconstitution en nanodisques lipidiques

### 1.4.1. Production et purification de la protéase du virus de la gravure du tabac (TEV)

Le laboratoire dispose d'un vecteur bactérien dérivé de la série des pET et codant pour une version optimisée de la protéase TEV, fusionnée à une étiquette polyhistidine du côté N-terminal. Cette version comporte notamment la mutation S219V, qui permet d'éviter l'auto-protéolyse de la protéine, augmentant ainsi sa stabilité et son efficacité<sup>279</sup>.

La protéase est produite à l'aide des bactéries *E. coli* BL21(DE3) dans un milieu LB riche (10 g.L<sup>-1</sup> peptone, 5 g.L<sup>-1</sup> extrait de levure, 10 g.L<sup>-1</sup> NaCl). Après une phase de culture à 37°C et 220 rpm jusqu'à une  $DO_{600}$  d'environ 0.6, la production de protéine est induite par l'ajout de 0.5 mM d'IPTG et la culture est poursuivie pendant la nuit à 16°C et 220 rpm. Les cellules sont récoltées par centrifugation.

Les bactéries sont resuspendues dans un tampon de lyse (20 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, 2 mM DTT, 0.1 mg.mL<sup>-1</sup> lysozyme, 5 % (v/v) glycérol) à raison de 10 mL de tampon par gramme de cellules (poids humide), et traitées par sonication (dans la glace, 3 cycles de 60 × 1 s, 70 % d'amplitude ; Digital Sonifier 250 Cell Disruptor, *Branson*). Le lysat cellulaire, après clarification par ultracentrifugation (30 min, 100,000 g, 4°C), est purifié par chromatographie d'affinité au nickel. La colonne est préalablement équilibrée en tampon de purification (20 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1 mM DTT). Après élimination des contaminants par un lavage avec 1 M de NaCl, la protéine est éluée avec un palier de 500 mM d'imidazole. La pureté de la protéine est affinée par une étape de polissage sur une colonne de gel filtration (Hiload® 16/600 Superdex® 200 pg, *GE Healthcare*).

La protéase TEV est finalement concentrée à 1 g.L<sup>-1</sup> (Vivaspin®, seuil de coupure de 10 kDa, *Sartorius*). Son tampon de stockage est composé de 25 mM Tris HCl pH 7.4, 75 mM NaCl, 2.5 mM DTT et 50 % (v/v) glycérol. Des aliquotes individuels sont congelés instantanément dans l'azote liquide puis stockés à -80°C.

#### 1.4.2. Production et purification de la protéine MSP1E3D1

##### ***Expression et purification***

Le plasmide pET28 codant pour la protéine MSP1E3D1, développé par Ilia G. Denisov et ses collaborateurs<sup>280</sup> a été obtenu chez Addgene. La protéine est produite à l'aide des bactéries *E. coli* BL21(DE3), et purifiée selon les procédures décrites dans la littérature<sup>81,84</sup>.

Brièvement, les cellules sont cultivées en milieu TB riche (12 g.L<sup>-1</sup> tryptone, 24 g.L<sup>-1</sup> extrait de levure, 9.4 g.L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.2 g.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 % (v/v) glycérol) à 37°C et 220 rpm jusqu'à atteindre une  $DO_{600}$  d'environ 0.6. La production de protéine d'intérêt est induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG et conduite à 16°C et 220 rpm pendant 4 heures. Les cellules sont récoltées par centrifugation. Le culot cellulaire est resuspendu dans un tampon de lyse (20 mM tampon phosphate pH 7.3, 1 mM PMSF, 1 % Triton X-100, cocktail d'inhibiteurs de protéases) à raison de 10 mL de tampon par gramme de cellules (poids humide), et traité par sonication (dans la glace, 6 cycles de 30 × 1 s, 70 % d'amplitude ; Digital Sonifier 250 Cell Disruptor, *Branson*). Le lysat cellulaire, après clarification par ultracentrifugation (20 min, 23,000 g, 4°C), est d'abord purifié sur une colonne d'affinité au nickel (HisTrap™ HP 5 mL, *GE Healthcare*). L'imidazole est éliminé par un passage de l'échantillon purifié sur une colonne de dessalage (HiTrap™ Desalting 5 mL, *GE Healthcare*). L'étiquette polyhistidine de la protéine est clivée par une incubation pendant la nuit avec la protéase TEV, en respectant un ratio massique TEV:MSP1E3D1 de 1:10. La protéine débarrassée de son étiquette d'affinité est purifiée par chromatographie d'affinité au nickel négative, et donc récupérée directement en sortie de colonne.

La protéine MSP1E3D1 est concentrée entre 50 µM et 100 µM (Vivaspin®, seuil de coupure de 10 kDa, *Sartorius*) et stockée dans un tampon contenant 20 mM de Tris HCl à pH 7.4, 100 mM de NaCl et 0.5 mM d'EDTA. Des aliquotes individuels sont congelés instantanément dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

##### ***Biotinylation de la MSP1E3D1***

Le protocole de biotinylation *in vitro* suivi et décrit ci-après est basé sur une procédure publiée par Pawel K. Dominik et ses collaborateurs<sup>281</sup>.

Le tampon Tris étant incompatible avec l'utilisation du réactif de biotinylation, à cause de la présence d'amines primaires, la MSP1E3D1 destinée à être biotinylée est dialysée (Slide-A-Lyzer™, seuil de coupure de 10 kDa, *Pierce*) contre un tampon composé de

20 mM d'HEPES à pH 7.4, 100 mM de NaCl et 0.5 mM d'EDTA après l'étape de chromatographie d'affinité négative.

La protéine est incubée avec le réactif de biotinylation (EZ-Link™ NHS-PEG4-Biotin, *Thermo Scientific*) en respectant un ratio molaire MSP1E3D1:biotine de 1:5. Le réactif en poudre est directement ajouté à la solution protéique, et le mélange est incubé une heure à température ambiante sous agitation. L'ajout de 5 mM de Tris HCl à pH 7.4 permet de stopper la réaction.

La protéine marquée est séparée de l'excès de réactif par une étape de dessalage (HiTrap™ Desalting 5 mL, *GE Healthcare*) en utilisant le tampon de stockage final (20 mM Tris HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA). La protéine est finalement concentrée entre 50 et 100  $\mu$ M et stockée à  $-80^{\circ}\text{C}$  après congélation dans l'azote liquide.

#### 1.4.3. Préparation des lipides

Les lipides phosphatidylcholine (POPC) et phosphatidylglycérol (POPG) (*Avanti Polar Lipids*) sont achetés sous forme de suspension à 25 ou 50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans du chloroforme. Ils sont prélevés au moyen d'une microseringue en verre (*Hamilton*) et mélangés dans un ratio molaire POPC:POPG de 3:2 dans un tube à hémolyse en verre. Le chloroforme est évaporé sous flux d'argon jusqu'à former un film lipidique. Les traces éventuelles de solvant sont éliminées par une incubation pendant la nuit sous une cloche à vide à l'abri de la lumière.

Le film lipidique est solubilisé à 24 mM (concentration de lipides totaux) dans une solution de sodium cholate à 48 mM pour le récepteur AA<sub>2A</sub> ou les nanodisques vides, ou dans une solution de CHAPS à 2 % (m/v) pour le récepteur MT<sub>1</sub>.

Plusieurs minutes d'incubation du tube dans un bain à sonication permettent d'obtenir facilement une solution homogène et totalement limpide. Celle-ci est utilisée immédiatement pour l'étape de reconstitution ou aliquotée et stockée à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.4.4. Formation des nanodisques

##### ***Reconstitution des RCPG d'intérêt***

Sauf précision contraire, toutes les étapes d'incubation sont effectuées sur la glace.

Les quantités requises de chaque composant du disque (lipides, MSP1E3D1 et récepteur) sont calculées en fonction de la quantité de récepteur purifié mise en jeu, et dans le respect d'un ratio molaire récepteur:MSP:lipides de 1:10:700 pour les nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 et de 0.8:10:700 pour les nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP2 et MT<sub>1</sub>\_MP2.

Pour assurer la solubilité du récepteur et des lipides, les concentrations de chaque détergent ne doivent jamais être inférieures à leur CMC. Du détergent est donc ajouté

à partir d'une solution stock concentrée pour contrebalancer la dilution induite par l'assemblage. Lors de la reconstitution du récepteur AA<sub>2A</sub>, la concentration de cholate est maintenue à 0.6 % (m/v), et celle de DDM à 0.017 % (m/v). Lors de la reconstitution du récepteur MT<sub>1</sub>, seule la concentration de CHAPS est maintenue à 0.5 % (m/v). La CMC très basse de la Fos14 la rend particulièrement difficile à éliminer et elle n'est donc jamais ajoutée à l'échantillon en cours de reconstitution.

Les lipides, la protéine échafaudage MSP1E3D1 et le détergent additionnel sont combinés et incubés pendant 30 minutes. Le récepteur est ensuite ajouté au mélange précédent, accompagné de 2.5 µM de ligand antagoniste (DPCPX pour le récepteur AA<sub>2A</sub>, et D600 pour le récepteur MT<sub>1</sub>). Le milieu de reconstitution est incubé pendant une heure pour permettre la formation spontanée des nanodisques.

#### ***Adsorption du détergent, nanodisques AA<sub>2A</sub>***

Le mélange est ensuite additionné de microbilles de polystyrène (Bio-beads<sup>TM</sup> SM-2 Resin, *Bio Rad*) à raison de 0.25 g par millilitre de milieu de reconstitution. Les billes sont préalablement rincées dans un grand volume de méthanol, rincées à l'eau ultrapure et séchées sur un fritté. Le mélange est incubé en chambre froide pendant la nuit sur un agitateur rotatif.

Le surnageant contenant un mélange de nanodisques vides et de nanodisques pleins est récupéré à l'aide d'une seringue et filtré à 0.22 µm.

#### ***Adsorption du détergent, nanodisques MT<sub>1</sub>***

Le mélange de reconstitution est additionné de  $\gamma$ -cyclodextrine (*Sigma-Aldrich*) dans un ratio molaire  $\gamma$ -cyclodextrine:CHAPS de 2:1, et de heptakis- $\beta$ -cyclodextrine (*Sigma-Aldrich*) dans un ratio molaire heptakis- $\beta$ -cyclodextrine:Fos14 de 2:1. Les cyclodextrines sont ajoutées directement sous forme de poudre à l'échantillon. La quantité requise est divisée par trois. Chaque ajout est suivi de 15 minutes d'incubation à température ambiante sur un agitateur rotatif.

L'échantillon est ensuite dialysé (Slide-A-Lyzer<sup>TM</sup>, seuil de coupure de 10 kDa, *Pierce*) contre 2 L de tampon de dialyse froid (50 mM Tris HCl pH 8, 300 mM NaCl, 1 µM D600) pendant la nuit à 4°C.

En sortie de dialyse, l'échantillon est transféré dans un tube et additionné de microbilles de polystyrène, à raison de 0.5 g de billes par millilitre d'échantillon. Le mélange est incubé pendant 4 heures à température ambiante sur un agitateur rotatif.

Le surnageant contenant un mélange de nanodisques vides et de nanodisques pleins est récupéré à l'aide d'une seringue et filtré avec un seuil de coupure de 0.22 µm.

#### ***Nanodisques vides***

Sur la base d'une procédure décrite dans la littérature<sup>81</sup>, les préparations de nanodisques vides sont réalisées avec un ratio molaire lipide:MSP1E3D1 de 1:130.

Le milieu de reconstitution, constitué des lipides, de la MSP1E3D1 et du détergent additionnel, est incubé pendant une heure avant ajout de microbilles de polystyrène, à raison de 0.25 g de billes par millilitre d'échantillon. Le mélange est ensuite incubé pendant la nuit à 4°C sur un agitateur rotatif.

Le surnageant contenant les nanodisques vides est récupéré à l'aide d'une seringue et filtré avec un seuil de coupure de 0.22 µm. Celui-ci est concentré par filtration centrifuge (Vivaspin®, seuil de coupure de 50 kDa, *Sartorius*) sans excéder une vitesse de rotation de 1000 g.

#### 1.4.5. Purification des nanodisques

##### ***Chromatographie d'affinité au nickel***

Le mélange de reconstitution filtré est injecté à 0.5 mL.min<sup>-1</sup> sur une colonne de nickel (HisTrap™ HP 1 mL, *GE Healthcare*) montée en série sur un automate de purification (Äkta pure, *GE Healthcare*). La résine est préalablement équilibrée avec un tampon de purification (50 mM HEPES pH 7.4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole). Les nanodisques pleins sont retenus sur la résine via l'étiquette polyhistidine des récepteurs qu'ils contiennent.

Après un lavage de la colonne avec 20 mL de tampon de purification, les nanodisques sont élués avec un palier du même tampon contenant 500 mM d'imidazole. Le pic d'éluion est automatiquement détecté et collecté par l'automate, qui effectue également un suivi continu de l' $A_{280}$  en sortie de colonne. Ce type de collecte permet de minimiser le volume d'échantillon et d'éviter une étape de concentration.

##### ***Chromatographie d'exclusion stérique***

Les nanodisques sont ensuite purifiés par chromatographie d'exclusion stérique sur résine Superdex® 200 (colonne 10/300, *GE Healthcare*), à l'aide d'un automate de purification (Äkta FPLC, *GE Healthcare*).

La colonne est préalablement équilibrée en tampon de gel filtration (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl). L'échantillon injecté est élué à un débit de 0.3 mL.min<sup>-1</sup>. Des fractions de 0.5 mL sont récoltées par l'automate tout au long de l'éluion, et l' $A_{280}$  est suivie en continu en sortie de colonne.

Les fractions correspondant aux nanodisques sont rassemblées et éventuellement concentrées par filtration centrifuge (Vivaspin®, seuil de coupure de 50 kDa, *Sartorius*) sans excéder une vitesse de rotation de 1000 g.

## 2. Manipulation du système viral SFV

### 2.1. Culture cellulaire

Sauf indication contraire, toutes les étapes de manipulation des cellules sont effectuées dans des conditions de stérilité, et les milieux utilisés sont préalablement préchauffés à 37°C.

#### 2.1.1. Milieux de culture

##### **Cellules BHK-21**

Les cellules BHK-21 adhérentes sont cultivées dans un milieu DMEM High Glucose (4.5 g.L<sup>-1</sup> glucose, L-glutamine (+), *Gibco*<sup>TM</sup>) additionné de 5 % (v/v) de sérum de veau foetal (*Gibco*<sup>TM</sup>), 100 UI.mL<sup>-1</sup> de pénicilline et 100 µg.mL<sup>-1</sup> de streptomycine.

##### **Cellules HEK**

Les cellules HEK adhérentes sont cultivées dans un milieu MEM (6 g.L<sup>-1</sup> glucose, 3.7 g.L<sup>-1</sup> bicarbonate de sodium, L-glutamine (-), *Gibco*<sup>TM</sup>) additionné de 10 % (v/v) de sérum de veau foetal, 2 mM de L-glutamine, 100 UI.mL<sup>-1</sup> de pénicilline et 100 µg.mL<sup>-1</sup> de streptomycine.

#### 2.1.2. Conditions de culture et de passage

Les cellules BHK-21 sont habituellement diluées au 50<sup>ème</sup> à raison de deux fois par semaine. Les cellules HEK sont quant à elles diluées au quart à la même fréquence. Pour ce faire, après un rinçage au PBS, elles sont décollées par une courte incubation dans 0.25 % (m/v) de trypsine (*Gibco*<sup>TM</sup>), puis reprises dans le volume adéquat de milieu de culture. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère saturée à 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### 2.1.3. Quantification

Les cellules en suspension peuvent être quantifiées par une mesure de turbidimétrie à 600 nm, à l'aide des deux corrélations suivantes, établies par des courbes de calibration réalisées au laboratoire :

$$\text{Cellules BHK-21 :} \quad C = \frac{DO_{600} - 0,0015}{0,5633} * 10^6 \text{ cellules.mL}^{-1}$$

$$\text{Cellules HEK :} \quad C = DO_{600} * 1,4 * 10^6 \text{ cellules.mL}^{-1}$$



## 2.2. Production de virus recombinants

### 2.2.1. Vecteurs viraux

Les expériences sont réalisées à l'aide du plasmide auxiliaire pSFV-helper2, développé par Peter Berglund et ses collaborateurs<sup>171</sup>.

Plusieurs vecteurs pSFV recombinants, dérivés des vecteurs développés au laboratoire dans le cadre du projet MePNet<sup>194</sup>, sont utilisés. Le récepteur AA<sub>2A</sub> cloné dans le vecteur pSFV2genC est alors fusionné à plusieurs étiquettes d'affinité. Les récepteurs AA<sub>2A</sub> et MT<sub>1</sub> sont également clonés dans un vecteur pSFV sous leur forme sauvage. Enfin, le vecteur pSFV-eGFP code pour une version recombinante de la protéine fluorescente verte eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*). Les constructions protéiques détaillées sont présentées dans le **Tableau 12**.

### 2.2.2. Production en cellules BHK-21

#### ***Préparation des ARN***

Les plasmides pSFV-helper2 et pSFV recombinant sont respectivement linéarisés par les enzymes de restriction *BcuI* et *NruI* (*Thermo Scientific<sup>TM</sup>*). Le produit de digestion est ensuite purifié au phénol chloroforme et précipité à l'acétate d'ammonium. L'ADN ainsi préparé est alors transcrit *in vitro* (kit MEGAscript<sup>TM</sup> SP6, *Invitrogen<sup>TM</sup>*) en suivant la procédure recommandée par le fabricant (1250 ng d'ADN pour 2  $\mu$ L d'enzyme SP6, dans un volume final de 20  $\mu$ L). La transcription est effectuée en présence de 40 U d'inhibiteur de RNase (RiboLock RNase inhibitor, *Thermo Scientific<sup>TM</sup>*) et de 0.5 mM d'analogue de coiffe (G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog, *New England Biolabs*). L'ADN matrice est finalement éliminé par un traitement avec 2 U de DNase (TURBO<sup>TM</sup> DNase, *Invitrogen<sup>TM</sup>*) pendant 15 minutes à 37°C. Les ARN sont stockés à 4°C jusqu'à la transfection.

#### ***Transfection des cellules***

Les cellules sontensemencées moins de 48 heures à l'avance et de sorte à ne pas excéder 80 % de confluence au moment de la transfection.

Après un rinçage au PBS, elles sont décollées par une courte incubation dans la trypsine et resuspendues dans un petit volume de milieu de culture.  $8 \times 10^6$  cellules sont centrifugées (5 min, 800 g) puis resuspendues dans 800  $\mu$ L de PBS. La suspension cellulaire est additionnée de 40  $\mu$ L d'ARN recombinant (issu de la transcription *in vitro* de 2500 ng d'ADN linéarisé) et de 20  $\mu$ L d'ARN auxiliaire (transcription *in vitro* de 1250 ng d'ADN linéarisé) et transférée dans une cuvette d'électroporation de 0.4 cm (*Eurogentec*).

Les cellules sont soumises à deux cycles consécutifs d'électroporation à 850 V, 25  $\mu\text{F}$  et  $\infty \Omega$  dans un GenePulser® 1 (*Bio Rad*). Elles sont ensuite rapidement resuspendues dans 12 mL de milieu de culture puis incubées 24 à 48 heures à 37°C et 5 % de  $\text{CO}_2$ .

### 2.2.3. Purification et stockage

Le surnageant de culture contenant les particules virales est récolté après environ 36 heures d'incubation et filtré avec un seuil de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millex-GP, membrane PES, *Millipore*) pour éliminer les débris cellulaires.

Les virus destinés à être utilisés pour une immunisation sont incubés avec 1:20 de leur volume de résine Capto™ Core 700 (*GE Healthcare*) pendant 45 minutes à température ambiante sur un agitateur rotatif. La résine est préalablement équilibrée en tampon TNE (50 mM Tris HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA). Le cycle de purification est répété une deuxième fois avec de la résine fraîche. L'échantillon purifié est ensuite filtré avec un seuil de 0.22  $\mu\text{m}$ .

Les lots de virus filtré sont aliquotés puis congelés à -80°C.

### 2.2.4. Procédure d'activation

Avant d'être utilisés pour une infection, les virus recombinants sont activés par une incubation avec 1.6  $\text{mg.mL}^{-1}$  d' $\alpha$ -chymotrypsine (*Sigma-Aldrich*) pendant 30 minutes à température ambiante. L' $\alpha$ -chymotrypsine est inactivée par l'ajout de 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  d'aprotinine (*Thermo Scientific™*). Le mélange est incubé 5 minutes à température ambiante.

## 2.3. Caractérisation des virions

### 2.3.1. Titration par RT-qPCR

Le protocole de titration suivi est basé sur une procédure publiée<sup>181</sup>. Les manipulations sont effectuées dans un environnement contrôlé pour éviter la contamination des échantillons par des RNases.

#### ***Extraction de l'ARN***

L'ARN contenu dans un aliquote de 140  $\mu\text{L}$  de virus recombinant est extrait à l'aide d'un kit QIAamp Viral RNA (*Qiagen*), en suivant la procédure recommandée par le fabricant. L'ARN est élué dans 80  $\mu\text{L}$  du tampon AVE fourni.

Les éventuelles molécules d'ADN contaminantes sont dégradées par un traitement avec 6 U de DNase I (*Thermo Scientific™*) pendant 30 minutes à 37°C. L'enzyme est inactivée par une incubation en présence de 1 mM d'EDTA pendant 10 minutes à 65°C, dans un volume final de 110  $\mu\text{L}$ .

### ***Préparation de l'ADNc***

12  $\mu\text{L}$  des ARN ainsi traités sont rétro-transcrits par 200 U d'enzyme M-MLV (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), en présence de 0.5 mM de dNTPs, 0.25  $\mu\text{M}$  d'oligonucléotide antisens R-E-2 (**Tableau 3**) et 10 mM de DTT. Le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 50 minutes puis l'enzyme est inactivée par un chauffage de 15 minutes à 70°C.

**Tableau 3** : Oligonucléotides utilisés pour la titration des virus recombinants

Nom	Gène	Séquence	Utilisation
R-E-2	nsP1-4 (SFV)	5'-AGCTCCACGTCATCATTGAG-3'	Transcription réverse
F-I-2	nsP1-4 (SFV)	5'-ACAGACTGTCACTGAGCAG-3'	PCR quantitative, oligonucléotide sens
R-I-2	nsP1-4 (SFV)	5'-TCTCTGCAGTAGATGGTCAC-3'	PCR quantitative, oligonucléotide antisens

### ***PCR quantitative (qPCR)***

La qPCR est réalisée à partir de 0.3  $\mu\text{L}$  d'ADNc et à l'aide du kit KAPA SYBR® FAST (*Kapa Biosystems*), en présence de 0.2  $\mu\text{M}$  des oligonucléotides F-I-2 et R-I-2 (**Tableau 3**) et dans un volume total de 15  $\mu\text{L}$ . Les échantillons sont répartis dans une plaque 96-puits scellée et incubés dans un thermocycleur StepOne<sup>TM</sup> (*Applied Biosystems*). Après une dénaturation initiale de 10 minutes à 95°C, 40 cycles d'amplification sont effectués (15 s à 95°C, 15 s à 53°C, 15 s à 60°C), suivis d'une dénaturation finale de 5 secondes à 95°C. La fluorescence est mesurée pour chaque cycle à 60°C, pendant l'étape d'amplification. La courbe de fusion (entre 60 et 95°C) de chaque échantillon est ensuite déterminée afin de vérifier la spécificité de la réaction : le fragment amplifié attendu, d'une taille de 145 pb, présente une température de semi-dénaturation ( $T_m$ ) d'environ 84°C. Les échantillons sont analysés en triplicata.

L'amplification d'une courbe d'étalonnage réalisée en parallèle permet de quantifier les échantillons de manière absolue. La gamme est constituée de plusieurs dilutions décimales du vecteur pSFV-eGFP linéarisé par l'enzyme *NruI* (7 dilutions de  $6 \times 10^7$  à  $6 \times 10^1$  copies). Chaque dilution est analysée en triplicata.

Les résultats sont exploités à l'aide du logiciel StepOne<sup>TM</sup>. La ligne de seuil ( $C_t$  threshold) est fixée manuellement à 0.2, au milieu de la phase exponentielle d'amplification, et son intersection avec chaque courbe d'amplification permet de déterminer le cycle de seuil  $C_t$ . La validité de la gamme étalon est assurée par trois critères, à savoir (i) une pente comprise entre -3.7 et -3.3, (ii) un coefficient de détermination  $R^2$  supérieur à 0.98 et (iii) une efficacité d'amplification supérieure à 90 %.

### ***Détermination de la concentration virale***

La concentration virale est déterminée à partir du nombre de copies d'ARN quantifiées par RT-qPCR. À ce résultat est appliqué un facteur de correction de 4.6, qui permet de prendre en compte les volumes d'échantillon mis en jeu à chaque étape. Le titre est exprimé en nombre de copies d'ARN par microlitre d'échantillon.

#### 2.3.2. Infection de cellules en culture

##### ***Infection***

Les cellules BHK-21 ou HEK sontensemencées le jour précédant l'expérience de sorte à atteindre 80 à 90 % de confluence au moment de l'infection. Une plaque supplémentaire, destinée à la quantification des cellules, estensemencée dans les mêmes conditions.

Les cellules sont rincées dans du PBS puis recouvertes de milieu DMEM (BHK-21) ou MEM (HEK) sans sérum ni antibiotique. Le nombre de cellules par puits est dénombré sur la plaque contrôle, ce qui permet de mettre en jeu un ratio  $\frac{\text{virus}}{\text{cellules}}$  précis. Ce ratio correspond à la Multiplicité d'Infection ou MOI (*Multiplicity Of Infection*). La quantité requise de virus activé est ajoutée dans le milieu. Les cellules sont alors incubées pendant deux heures sous agitation douce à température ambiante. Du milieu de culture contenant sérum et antibiotiques est ensuite ajouté, puis les cellules sont incubées 24 heures à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>.

##### ***Préparations membranaires de cellules mammifères***

24 heures après infection, les cellules sont rincées et décollées avec du versène (PBS, 5 mM EDTA) puis culotées par centrifugation (5 min, 800 g). Le culot cellulaire est resuspendu dans du tampon TNGE froid (50 mM Tris HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl, 10 % (v/v) glycérol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF), à raison de 3 mL de tampon pour environ  $1 \times 10^7$  cellules infectées, puis lysé dans un homogénéiseur de Dounce, avec 20 allers-retours de piston dans la glace. Une première centrifugation à basse vitesse (10 min, 4°C, 1500 g) permet d'éliminer les cellules non lysées et les gros débris cellulaires. Le surnageant est ensuite ultracentrifugé (30 min, 4°C, 100,000 g) et le culot membranaire résultant est homogénéisé au potter dans 200 µL de tampon TNG (50 mM Tris HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl, 10 % (v/v) glycérol, 1 mM PMSF). Les préparations membranaires sont stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

##### ***Analyse de la fluorescence par cytométrie en flux***

24 heures après infection, les cellules sont rincées et décollées avec du versène. La suspension cellulaire est filtrée à travers un carré de toile à bluter en nylon (Nitex 80 µm, Sefar).

Les cellules fluorescentes sont injectées sur un cytomètre FACSCalibur™ (*BD Biosciences*). Les propriétés de morphologie (à savoir la taille, reflétée par le paramètre FSC, et la granularité, reflétée par le paramètre SSC) et de fluorescence (eGFP) des cellules sont examinées sur un total de 20,000 évènements par analyse.

Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel BD CellQuest™ Pro.

### ***Visualisation des cellules fluorescentes au microscope***

Les cellules fluorescentes vivantes sont imagées 24 heures après infection dans un incubateur relié à un dispositif d'imagerie en temps réel (IncuCyte®, *Sartorius*). Les cellules sont visualisées en lumière transmise et en fluorescence verte pour chaque condition.

## **3. Génération et criblage d'anticorps**

### **3.1. Immunisations**

#### **3.1.1. Souris**

L'élevage des souris et les procédures d'immunisation sont réalisés par le docteur Laurent Mailly au sein de l'animalerie de l'Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques (*Strasbourg*).

Des souris Balb/c et C57/bl6 femelles, âgées respectivement de 7 et 9 semaines, proviennent de chez Janvier Labs. Les animaux sont placés dans des cages par groupe de trois, sur une armoire ventilée, et sont observés quotidiennement pour surveiller l'éventuelle apparition de signes de souffrance.

Les animaux sont immunisés avec des particules virales recombinantes préalablement activées *in vitro*, selon la procédure décrite dans le paragraphe 2.2.4. Les injections sont réalisées par voie intrapéritonéale, intramusculaire au niveau de la patte postérieure, ou intraveineuse au niveau du sinus rétro-orbitaire<sup>282</sup>. Les injections intrapéritonéales et intramusculaires sont effectuées sur les animaux vigiles avec un virus dilué dans respectivement 200 µL et 50 µL de PBS. Pour les injections intraveineuses, les animaux sont endormis à l'isoflurane et anesthésiés localement par application de collyre à la tétracaïne. Le virus est dilué dans 100 µL de PBS.

Au cours du protocole d'immunisation, plusieurs prélèvements sanguins sont effectués au niveau de la veine mandibulaire des animaux. Ceux-ci sont préalablement anesthésiés à l'isoflurane. Le prélèvement, réalisé à l'aide d'un capillaire à hématocrite, n'excède pas 180 µL. Le prélèvement terminal est effectué par ponction intracardiaque des animaux sous anesthésie gazeuse et permet de récupérer 1 à 1.5 mL de sang. Les souris sont ensuite mises à mort par dislocation cervicale.

Le sérum issu des échantillons sanguin est récupéré par centrifugation (5 min, 400 g) et stocké à -80°C.

Les cinétiques exactes des prélèvements et injections pratiquées pour chaque protocole sont décrites dans la partie *Résultats* correspondante.

### 3.1.2. Alpaga

L'élevage et l'immunisation des alpagas sont réalisés par l'équipe du laboratoire d'Immunologie Moléculaire et Cellulaire (*Vrije Universiteit Brussel*).

Brièvement, un alpaga est immunisé par quatre injections intradermales de  $10^9$  particules virales préalablement activées *in vitro*. La répartition des administrations est présentée de manière détaillée dans la partie *Résultats* correspondante. Les virus, dilués dans un volume final de 1 mL, sont additionnés du même volume d'adjuvant de GERBU avant injection.

Quatre jours après la dernière administration, environ 50 mL de sang sont prélevés à partir de la veine jugulaire de l'animal. L'échantillon sanguin est récolté dans un tube de collecte adapté, contenant de l'anticoagulant et permettant de réaliser et stocker le prélèvement sous vide. Le sang est traité directement au laboratoire pour la récupération du sérum et la construction de la banque.

## 3.2. Techniques spécifiques aux nanobodies

### 3.2.1. Clonage de la banque de phages

Le clonage de la banque est effectué au sein du laboratoire bruxellois, par les soins du docteur Cécile Vincke. Les séquences codantes des  $V_{\text{HH}}$  sont insérées dans le phagemide pMECS-GG au moyen d'un clonage Golden Gate. La procédure est décrite de manière détaillée dans une publication<sup>283</sup>.

Brièvement, une préparation d'ARN total est réalisée à partir des lymphocytes isolés de l'échantillon sanguin, puis celui-ci est rétrotranscrit en ADNc. Les séquences codant pour les  $V_{\text{HH}}$  sont amplifiées par deux PCR consécutives, permettant également d'introduire le site de restriction *SapI* de part et d'autre.

Le plasmide pMECS-GG est un phagemide dérivé du vecteur pMECS<sup>284</sup>. Les  $V_{\text{HH}}$  sont clonés en aval d'une séquence signal *pelB*. Celle-ci correspond aux 22 premiers acides aminés de la pectate lyase B de la bactérie *Erwinia carotovora*, et permet l'adressage de la protéine au périplasme. Le  $V_{\text{HH}}$  est suivi par une étiquette Hémagglutinine (HA) utilisée classiquement pour l'immunodétection, et une étiquette hexahistidine permettant sa purification. Un codon stop ambre (séquence TAG) le sépare de la séquence du gène *III* du bactériophage M13. Celui-ci code pour la protéine de capsid

mineure p3 du bactériophage. De plus, le gène de résistance au chloramphénicol et le gène codant pour la toxine CcdB sont insérés dans la cassette de clonage, entre deux sites de restriction *SapI*. Le clonage est réalisé grâce à une digestion du plasmide et de l'insert par l'enzyme *SapI*, suivie par une incubation avec la T4 DNA ligase. La séquence du V<sub>H</sub>H est finalement intégrée dans le vecteur en amont du site de restriction *NotI*. Du même coup, le gène toxique *CcdB* est éliminé, permettant ainsi une sélection positive des transformants.

La banque générée est introduite dans des cellules *E. coli* TG1 électrocompétentes. Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu gélosé sélectif LB agar additionné de 100 µg.mL<sup>-1</sup> d'ampicilline et 2 % (m/v) de glucose. Après une nuit d'incubation à 37°C, les colonies sont raclées et resuspendues dans un volume final de 20 mL de milieu LB. La banque est additionnée de 15 % (v/v) de glycérol et stockée à -80°C sous forme d'aliquotes individuels.

En parallèle, des dilutions décimales des transformants sont étalées sur des boîtes rondes de milieu gélosé sélectif. Le dénombrement des colonies permet d'estimer la taille de la banque, généralement comprise entre 10<sup>7</sup> et 10<sup>9</sup> clones individuels. La présence et la taille de l'insert sont par ailleurs vérifiées par PCR.

### 3.2.2. Criblage de la banque par phage display

La procédure de phage display mise en place au laboratoire se base majoritairement sur un protocole publié par nos collaborateurs bruxellois<sup>284</sup>, et sur une procédure décrite par Pawel K. Dominik et ses collaborateurs<sup>281</sup>.

#### ***Préparation de la cible***

La protéine cible biotinylée est incubée avec des billes magnétiques streptavidine (Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles, *Promega*) préalablement équilibrées en tampon HNB (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % (m/v) BSA). Le mélange est placé sous agitation douce à température ambiante pendant 30 minutes. Les billes sont sédimentées grâce à un portoir magnétique (MagRack™ 6, *GE Healthcare*) puis rincées avec trois volumes de tampon HNB. Les éventuels sites streptavidine excédentaires sont bloqués grâce à une incubation avec du tampon HNB additionné de 5 mM de biotine, suivie de trois lavages en tampon HNB.

Lors d'une adsorption sur une surface plastique, une plaque 96 puits à forte adsorption (MaxiSorp® flat bottom, *Nunc*) est saturée avec 0.1 µg de streptavidine (*Sigma*) par puits, dans 100 µL de tampon d'adsorption (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.8), pendant trois heures à température ambiante. Après trois lavages au PBS, les sites non spécifiques sont bloqués par deux heures d'incubation en tampon de blocage (PSB, 3 % (m/v) BSA). La plaque est lavée une fois au PBS. La cible diluée en tampon

HNB est ensuite capturée par une incubation minimale de deux heures à température. Les protéines non adsorbées sont lavées par trois rinçages au PBS.

Pour l'ensemble du phage display, lorsque la cible est une protéine purifiée en détergents, les tampons HNB et PBS sont additionnés de 0.02 % (v/v) de DDM/CHS.

### ***Amplification de la banque***

100  $\mu$ L de la banque bactérienne sont utilisés pour ensemercer 100 mL de milieu 2 $\times$ TY (16 g.L<sup>-1</sup> peptone, 10 g.L<sup>-1</sup> extrait de levure, 5 g.L<sup>-1</sup> NaCl) additionné de 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> d'ampicilline et de 1 % (m/v) de glucose. La culture est incubée sous agitation (220 rpm) à 37°C jusqu'à atteindre une  $DO_{600}$  comprise entre 0.8 et 1, puis environ 10<sup>12</sup> phages auxiliaires M13KO7 y sont ajoutés. Les cellules sont incubées pendant 20 à 30 minutes à température ambiante, sans agitation, pour permettre l'infection. Après une étape de centrifugation (10 min, 1500 g, 4°C), le culot cellulaire est resuspendu dans 100 mL de milieu 2 $\times$ TY contenant de l'ampicilline (100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) et de la kanamycine (70  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>). L'utilisation combinée de ces deux antibiotiques permet de sélectionner les bactéries contenant un plasmide pMECS-GG et infectées par le phage auxiliaire. La culture est incubée pendant la nuit à 37°C et sous agitation (220 rpm).

### ***Précipitation des phages***

Les cellules mises en culture la veille sont centrifugées (30 min, 2200 g, 4°C). Les phages contenus dans le surnageant sont précipités par addition de 20 % (v/v) de tampon PEG/NaCl (20 % (m/v) PEG 6000, 2.5 M NaCl), suivie de 30 minutes d'incubation sur glace. Les phages sont finalement culotés par centrifugation (30 min, 2200 g, 4°C). Après élimination du surnageant, le culot est resuspendu délicatement dans 1 mL de PBS stérile. Les résidus bactériens sont finalement culottés par deux minutes de centrifugation à vitesse maximale dans une centrifugeuse de paillasse. La concentration de phages peut être estimée par une mesure d'absorbance à 260 nm ( $A_{260}$ ) en utilisant la corrélation suivante :

$$A_{260} = 1 \Leftrightarrow 3 \times 10^{10} \text{ particules.mL}^{-1}$$

### ***Sélection***

La protéine cible est préparée selon la méthode choisie. En parallèle, un échantillon exempt d'antigène est préparé dans les mêmes conditions pour une sélection négative. Dans le cas d'une sélection sur nanodisques, des nanodisques vides biotinylés sont adsorbés. Pour une protéine purifiée en détergent, la sélection négative est simplement faite sur le support en présence de tampon.

10<sup>11</sup> phages dilués dans un volume de 100  $\mu$ L de tampon HNB sont ajoutés à la cible. Le mélange est incubé une heure à température ambiante. Le surnageant est éliminé et les phages non spécifiques sont éliminés par plusieurs lavages. Les conditions de lavage utilisées pour chaque expérience de criblage sont détaillées dans la partie *Résultats* correspondante.



Les phages spécifiques sont enfin élués. Dans le cas d'une sélection sur nanodisques, l'élué est réalisé par l'ajout de 200  $\mu\text{L}$  de Fos-Choline-12 à 1 % (m/v) (*Anatrace*). Pour les protéines en détergents, un saut de pH est effectué avec 100  $\mu\text{L}$  de triéthylamine à 100 mM. Après 10 minutes d'incubation, le pH basique est neutralisé par 100  $\mu\text{L}$  de Tris HCl pH 7.4 à 1 M.

### ***Culture des bactéries E. coli TG1***

Les bactéries *E. coli* TG1 sont mises en culture à partir d'un stock glycérol sur un milieu gélosé minimum (7.476 g.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O, 3 g.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g.L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 0.5 g.L<sup>-1</sup> NaCl, 16 g.L<sup>-1</sup> agar, 0.1 M MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  vitamine B1, 0.2 g.L<sup>-1</sup> glucose). Après incubation de la boîte 24 à 48 heures à 37°C, une colonie isolée est utilisée pour inoculer 10 mL de milieu LB. La culture est incubée à 37°C sous agitation (220 rpm) jusqu'à la phase exponentielle de croissance, atteinte lorsque la  $DO_{600}$  est comprise entre 0.8 et 1. Les cellules sont alors dans un état optimal pour être infectées par des phages.

### ***Visualisation de l'enrichissement***

Les phages élués sont dilués en cascade (10<sup>-1</sup> à 10<sup>-7</sup>) en PBS. 10  $\mu\text{L}$  de chaque dilution sont utilisés pour infecter 90  $\mu\text{L}$  de cellules *E. coli* TG1 en phase exponentielle de croissance, dans une plaque 96 puits. La plaque est incubée 30 minutes à 37°C, sans agitation, pour permettre l'infection.

Une boîte carrée de milieu LB gélosé additionné de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  d'ampicilline et 1 % (m/v) de glucose est ensuite striée avec 10  $\mu\text{L}$  de chaque dilution de cellules infectées. Les dilutions correspondant à la sélection « positive » et à la sélection « négative » sont striées en vis-à-vis. La boîte est incubée pendant la nuit à 37°C pour permettre la croissance des colonies. Le nombre de colonies reflète la quantité de phages sélectionnés dans chaque cas.

### ***Amplification des phages sélectionnés***

180  $\mu\text{L}$  de phages élués (dans la sélection positive uniquement) sont utilisés pour infecter 2 mL de cellules *E. coli* TG1 en phase exponentielle de croissance. Les cellules sont incubées 30 à 60 minutes à 37°C, sans agitation, pour permettre l'infection. Puis la culture est additionnée de 8 mL de milieu 2×TY additionné d'ampicilline (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) et de 1 % (m/v) de glucose et incubée 30 min à 37°C sous agitation (220 rpm).

La production de phages est induite par l'ajout d'environ 10<sup>7</sup> phages auxiliaires M13KO7. La culture est incubée pendant 20 minutes à température ambiante, sans agitation, puis les cellules sont récoltées par centrifugation (10 min, 1500 g) et le culot est repris dans 100 mL de milieu 2×TY additionné d'ampicilline (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) et de kanamycine (70  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). La culture est incubée pendant la nuit à 37°C sous agitation (220 rpm).

Les phages sont précipités de la même manière que ceux de la banque initiale (voir paragraphe *Précipitation des phages*) et utilisés pour un nouveau cycle de sélection.

### 3.2.3. Production de clones individuels en petits volumes

#### ***Expression en plaques 96 puits***

L'expression des V<sub>H</sub>H en petit volume est réalisée directement à partir des cellules *E. coli* TG1 sélectionnées dans la banque.

Les clones sélectionnés par phage display sont utilisés pour inoculer 100 µL de milieu LB additionné de 100 µg.mL<sup>-1</sup> d'ampicilline et de 2 % (m/v) de glucose, dans une plaque 96 puits à fonds ronds. Celle-ci est recouverte d'un film semi-perméable et incubée pendant la nuit à 37°C et sous agitation (220 rpm).

Le lendemain, 10 µL cette préculture sont utilisés pour ensemercer 1 mL de milieu 2×TY additionné de 100 µg.mL<sup>-1</sup> d'ampicilline et de 0.1 % (m/v) de glucose, dans une plaque 96 puits à puits profonds et à fond conique. Celle-ci est recouverte d'un film semi-perméable et incubée à 37°C et sous agitation (220 rpm) jusqu'à atteindre une *DO*<sub>600</sub> de 1. La production de V<sub>H</sub>H est induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG. Les cultures sont incubées à 37°C pendant trois à cinq heures. Puis les cellules sont culotées par centrifugation (20 min, 3000 g, 4°C). Le surnageant est éliminé et la plaque est conservée pendant la nuit à -20°C.

#### ***Extraits périplasmiques***

La plaque est décongelée à température ambiante pendant 20 min. Puis chaque puits est additionné de 100 µL de PBS, et homogénéisé jusqu'à resuspension complète du culot. La plaque est centrifugée pendant 20 minutes à 3000 g et 4°C. Le surnageant, qui constitue l'extrait périplasmique, est transféré précautionneusement dans une plaque 96 puits. S'ils ne sont pas utilisés dans la journée, les extraits sont stockés à -20°C.

### 3.2.4. Séquençage de clones individuels

Les clones d'intérêt sont utilisés pour inoculer 3 mL de milieu LB additionné de 100 µg.mL<sup>-1</sup> d'ampicilline. Les cultures sont incubées pendant la nuit à 37°C sous agitation (220 rpm). Une préparation d'ADN plasmidique est réalisée à partir de chaque préculture à l'aide d'un kit NucleoSpin® Plasmid EasyPure (*Machery-Nagel*) en suivant les recommandations du fabricant. L'ADN est élué avec 50 µL de tampon TE (10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA) et stocké à -20°C.

Les plasmides sont séquencés par la société Eurofins Genomics avec l'amorce MP57fwd (5'-TTATGCTTCCGGCTCGTATG-3').

### 3.2.5. Production et purification de V<sub>H</sub>H en gros volume

#### ***Transformation***

Pour une expression en gros volume, le plasmide codant pour le V<sub>H</sub>H d'intérêt est introduit par choc thermique (30 s à 42°C, 3 min dans la glace) dans une souche de bactérie *E. coli* non suppressive, WK6 ou BL21. Les transformants sont sélectionnés sur un milieu LB agar additionné de 100 µg.mL<sup>-1</sup> d'ampicilline.

#### ***Expression***

Le clone est d'abord cultivé dans 15 mL de milieu LB en présence de 100 µg.mL<sup>-1</sup> d'ampicilline pendant la nuit à 37°C et 220 rpm d'agitation. 1 mL de cette préculture est utilisé pour ensemercer 330 mL de milieu de culture (TB, 100 µg.mL<sup>-1</sup> ampicilline, 0.1 % (m/v) glucose, 2 mM MgCl<sub>2</sub>). La culture est incubée à 37°C sous agitation (220 rpm) jusqu'à atteindre une  $DO_{600}$  d'environ 0.6, puis l'expression du V<sub>H</sub>H est induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG. La culture est poursuivie pendant la nuit à 28°C et 220 rpm d'agitation. Les cellules récoltées par centrifugation (15 min, 3000 g, 4°C) sont rincées (Tris HCl 50 mM à pH 8), puis les culots secs sont stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

#### ***Extrait périplasmique***

Après décongélation, le culot cellulaire est resuspendu dans du tampon TES (0.5 M sucrose, 0.2 M Tris HCl pH 8, 0.5 mM EDTA), à raison de 1 mL de tampon pour un culot issu de 100 mL de culture. Le mélange est incubé une heure sous agitation (220 rpm) à 4°C. L'ajout de 2 mL de tampon TES/4 (125 mM sucrose, 50 mM Tris HCl pH 8, 0.125 mM EDTA) permet de réaliser le choc osmotique nécessaire à l'extraction périplasmique. Le mélange est incubé deux heures sous agitation (220 rpm) à 4°C, puis 10 mM de MgCl<sub>2</sub> sont y sont ajoutés. L'extrait périplasmique est finalement clarifié par centrifugation (30 min, 7000 g, 4°C).

Deux cycles successifs d'extraction sont réalisés, et les deux surnageants sont rassemblés pour l'étape de purification.

#### ***Purification***

L'extrait périplasmique est mis en contact avec 1 mL de résine de nickel (Ni-NTA agarose, *Qiagen*) préalablement équilibrée (25 mM Tris HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 10 mM imidazole). Le mélange est incubé pendant la nuit à 4°C sur un agitateur rotatif.

La résine est ensuite coulée dans une colonne à usage unique, puis lavée successivement avec 50 mL de tampon de lavage 1 (25 mM Tris HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 25 mM imidazole) et 2 (25 mM Tris HCl pH 7.4, 1 M NaCl). Le V<sub>H</sub>H est élué par l'ajout de 5 mL de tampon d'éluion (25 mM Tris HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 250 mM imidazole).

L'éluion est chargée dans son intégralité sur une colonne de gel filtration préparative (Superdex® 200 Hiload® 16/600 pg, *GE Healthcare*) préalablement équilibrée en

tampon de gel filtration (50 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl). La purification, réalisée à l'aide d'un automate de purification (Äkta pure, *GE Healthcare*), est conduite à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Des fractions de 1 mL sont récoltées par l'automate tout au long de l'élution, et l' $A_{280}$  est suivie en continu en sortie de colonne. Le V<sub>H</sub>H est élué aux alentours de 100 mL. Les fractions d'élution correspondant au pic sont rassemblées et additionnées de 5 % (v/v) de glycérol avant d'être congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C.

### 3.3. Méthode immuno-enzymatique (ELISA)

Tableau 4 : Liste des anticorps courants et dilutions d'usage

Nom	Référence	Fournisseur	Dilution
Anti-FLAG	Mouse monoclonal Anti-FLAG® M2	<i>Sigma-Aldrich</i>	1:2000
Anti-HA	Mouse monoclonal Anti-HA tag antibody, clone 16B12	<i>Abcam</i>	1:2000
Anti-V <sub>H</sub> H	Rabbit polyclonal Anti-V <sub>H</sub> H antibody	<i>S. Muyldermans's lab</i>	1:10,000
Anti-souris-HRP	HRP rabbit IGG anti-mouse IGG + IGM (H+L)	<i>Interchim</i>	1:10,000
Anti-souris-Dylight488	Goat ant-mouse antibody DyLight® 488 Conjugated	<i>Bethyl Laboratories</i>	1:10,000
Avidine-HRP	ExtrAvidin®-Peroxidase	<i>Sigma-Aldrich</i>	1:10,000

Une plaque 96 puits à forte adsorption (MaxiSorp® flat bottom, *Nunc*) est saturée avec 0.1 µg de streptavidine (*Sigma*) par puits, dans 100 µL de tampon d'adsorption (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.8), pendant trois heures à température ambiante. Après trois lavages au PBS, les sites non spécifiques sont bloqués par deux heures d'incubation en tampon de blocage (PSB, 3 % (m/v) BSA). La plaque est lavée une fois au PBS.

L'antigène, constitué de récepteur purifié en détergents ou reconstitué en nanodisques, ou de préparations membranaires recombinantes, est dilué dans tampon de blocage et capturé par une incubation d'au moins deux heures à température ambiante. La plaque est lavée trois fois avec du PBS.

L'anticorps primaire (anticorps anti-FLAG (**Tableau 4**), V<sub>H</sub>H ou sérum) est dilué dans du tampon de blocage et distribué dans la plaque, puis incubé au moins deux heures à température ambiante. La plaque est lavée trois fois avec du PBS.

Certains tests requièrent l'utilisation d'un anticorps secondaire intermédiaire (anticorps anti-HA ou anti-V<sub>H</sub>H, **Tableau 4**). Celui-ci est dilué dans du tampon de blocage et incubé dans la plaque pendant deux heures à température ambiante. La plaque est ensuite lavée trois fois avec du PBS.

L'anticorps final, couplé à la peroxydase de raifort (HRP), est dilué dans du tampon de blocage et incubé dans la plaque pendant deux heures à température ambiante. La plaque est ensuite lavée trois fois avec du PBS.

La révélation de la HRP est effectuée par l'ajout de 100 µL de solution TMB (*Sigma*). Une fois la couleur bleue suffisamment développée, après incubation de la plaque à

température ambiante (entre quelques minutes et une heure), la réaction est arrêtée par 100  $\mu\text{L}$  d'HCl 1 M.

Pour la lecture, effectuée sur un lecteur de microplaques, le bruit de fond mesuré à 650 nm est retranché du signal brut mesuré à 450 nm.

Lorsque l'antigène est constitué de protéines purifiées en détergent, le même détergent est ajouté à l'ensemble des tampons utilisés, y compris le tampon de lavage (AA<sub>2A</sub> : 0.02 % DDM/CHS ; MT<sub>1</sub> : 0.005 % Fos14/CHS, 0.1 % CHAPS/CHS).

A part pour l'anticorps final, toutes les étapes d'incubation peuvent être remplacées par une nuit à 4°C. Les incubations sont effectuées sous agitation modérée sur un agitateur à plaques (320 rpm).

## 4. Techniques d'analyse

### 4.1. Quantification des protéines

#### 4.1.1. Dosage des protéines basé sur une réaction à l'Acide Bicinchonique (BCA)

La concentration protéique des préparations membranaires est déterminée par un dosage colorimétrique avec un kit commercial (BCA Protein Assay Kit, *Pierce*). L'échantillon, dilué dans du tampon TNG, est dosé en regard d'une gamme étalon de BSA (7 points de 20  $\mu\text{g}$  à 0.3125  $\mu\text{g}$  de protéine, dilutions de 2 en 2). 200  $\mu\text{L}$  de mélange de réactif est ajouté à 25  $\mu\text{L}$  d'échantillon dilué. Les échantillons et les points de la gamme étalon sont dosés en triplicata et répartis dans une plaque 96 puits. Celle-ci est incubée pendant 30 minutes à 37°C avant lecture de l'absorbance à 265 nm dans un lecteur de microplaques.

#### 4.1.2. Mesure de l'absorbance à 280 nm ( $A_{280}$ )

Les protéines purifiées et les nanodisques lipidiques sont dosés par lecture de l'absorbance à 280 nm à l'aide d'un NanoDrop<sup>TM</sup> 2000 (*Thermo Scientific<sup>TM</sup>*). La concentration massique et molaire est déduite grâce à la loi de Beer-Lambert :

$$\begin{aligned} A_{280} &= \varepsilon \times l \times C \\ A_{280} &= \varepsilon \times l \times \frac{\rho}{M} \end{aligned}$$

$A_{280}$  : absorbance à 280 nm  
 $\varepsilon$  : coefficient d'extinction molaire ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )  
 $l$  : longueur du trajet optique (cm)  
 $C$  : concentration molaire ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )  
 $\rho$  : concentration massique ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )  
 $M$  : masse molaire ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

Le coefficient d'extinction molaire des protéines et leur masse molaire sont déterminés à partir de leurs séquences (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Coefficient d'extinction molaire et masse molaire des protéines couramment utilisées

	Protéine	Coefficient d'extinction molaire $\epsilon$ (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	Masse molaire $M$ (g.mol <sup>-1</sup> )
Protéines purifiées	AA <sub>2A</sub> _MP2	59,360	58,880
	AA <sub>2A</sub> _MP3	57,870	48,980
	MT <sub>1</sub> _MP2	69,790	52,810
	MSP1E3D1	26,930	30,000
	TEV	32,220	26,850
Nanodisques	Vides	53,860	60,000
	AA <sub>2A</sub> _MP2	113,220	118,880
	AA <sub>2A</sub> _MP3	111,730	108,980
	MT <sub>1</sub> _MP2	69,790	52,810

## 4.2. Électrophorèse

### 4.2.1. Électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les échantillons protéiques sont dilués dans un volume de tampon de charge (100 mM Tris HCl pH 6.8, 25 % glycérol, 8 % SDS, 0.2 g.L<sup>-1</sup> bleu brillant de Coomassie G250, 200 mM DTT) et chargés sur un gel de polyacrylamide Tris-tricine à 10 % (gel de séparation: 10 % acrylamide 19:1, 1 M Tris HCl pH 8.45, 0.1 % SDS, 0.1 % (m/v) APS, 0.06 % (v/v) TEMED ; gel de concentration : 6 % acrylamide 19:1, 0.8 M Tris HCl pH 8.45, 0.08 % SDS, 0.15 % (m/v) APS, 0.01 % (v/v) TEMED). Les protéines sont séparées grâce à l'application d'un courant électrique (100 V) pendant environ une heure dans un tampon de migration Tris-tricine (100 mM Tris HCl pH 8.3, 100 mM tricine, 0.1 % SDS). Un marqueur de poids moléculaire coloré est déposé en parallèle des échantillons (PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder, *Thermo Scientific*<sup>TM</sup>).

Les protéines sont ensuite colorées au bleu de Coomassie (Quick Coomassie Stain, *Generon*), ou transférées sur une membrane de nitrocellulose pour être révélées par immunodétection.

### 4.2.2. Immunodétection par Western Blot

#### **Transfert**

Le transfert des protéines du gel sur la membrane de nitrocellulose (0.45  $\mu$ m Protran, *Amersham*) s'effectue par l'application d'un courant de 100 V pendant une heure et demie dans un tampon Tris-glycine (25 mM Tris base, 200 mM glycine, 0.02 % SDS, 20 % éthanol).

## ***Immunodétection***

Après une heure d'incubation dans un tampon de blocage (PBS, 0.02 % Tween 80, 5 % (m/v) lait), la membrane est incubée pendant une heure avec l'anticorps primaire anti-FLAG (**Tableau 4**) dilué dans le tampon de blocage.

Après trois lavages de cinq minutes dans du tampon PBST (PBS, 0.02 % Tween 80), la membrane est incubée pendant une heure avec l'anticorps secondaire anti-souris (**Tableau 4**) dilué dans du tampon de blocage. L'anticorps secondaire est couplé soit à la HRP, soit au fluorochrome DyLight® 488.

Les protéines biotinylées sont révélées grâce à une heure d'incubation avec de l'avidine-HRP (**Tableau 4**) diluée dans du tampon de blocage.

La membrane est lavée trois fois dans du tampon PBST avant d'être visualisée. Les biomolécules couplées à la HRP sont révélées par chimioluminescence (kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, *Thermo Scientific™*) et visualisées sur une caméra CCD (ImageQuant LAS 4000, *GE Healthcare*). L'anticorps secondaire couplé au fluorochrome est visualisé sur un scanner Odyssey (*Li-Cor*).

## 4.1. Tests de liaison de radioligand

### 4.1.1. Courbes de saturation

**Tableau 6 : Composition des tampons de liaison**

<b>Protéine</b>	<b>Composition du tampon de liaison</b>
AA <sub>2A</sub> purifié en DDM	50 mM Tris HCl pH 7.4, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EDTA, 0.01 % DDM/CHS
MT <sub>1</sub> purifié en Fos14/CHAPS	50 mM Tris HCl pH 7.4, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EDTA, 0.1 % CHAPS/CHS
Nanodisques AA <sub>2A</sub>	50 mM Tris HCl pH 7.4, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EDTA
Nanodisques MT <sub>1</sub>	50 mM Tris HCl pH 7.4, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EDTA
Homogénat de muscle AA <sub>2A</sub>	50 mM Tris HCl pH 7.4, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EDTA
Homogénat de muscle MT <sub>1</sub>	50 mM Tris HCl pH 7.4, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EDTA

100 ng de récepteur purifié en détergents ou reconstitué en nanodisques ou 10 µg de préparations membranaires sont dilués avec du tampon de liaison (**Tableau 6**) en présence de ligand spécifique, dans un volume réactionnel final de 100 µL. Pour le récepteur AA<sub>2A</sub>, une gamme de sept concentrations de l'antagoniste ZM-241385 est réalisée. Ces concentrations sont atteintes par un mélange de ligand marqué au tritium (ART0884, *Hartmann Analytic*) et de ligand froid (*Tocris*), dans un ratio molaire de 1:10. Pour le récepteur MT<sub>1</sub>, cinq concentrations de l'agoniste [<sup>3</sup>H]-mélatonine ([O-methyl-<sup>3</sup>H]-melatonin, *Perkin Elmer*) sont testées. La liaison non spécifique est déterminée en parallèle en présence d'une concentration importante de ligand non radiomarqué (10 µM de ZM-241385 pour le récepteur AA<sub>2A</sub> et 20 µM de mélatonine pour le récepteur MT<sub>1</sub>), et ce pour chaque point de la gamme.

Chaque échantillon est testé en duplicata dans une plaque 96 puits à puits profonds. La plaque est incubée à température ambiante et sous agitation (300 rpm) pour

atteindre l'équilibre réactionnel, pendant une heure pour le récepteur AA<sub>2A</sub> et deux heures pour le récepteur MT<sub>1</sub>.

Les protéines purifiées uniquement sont ensuite précipitées par ajout de 200 µL de γ-globuline bovine à 0,1 % (m/v) et 200 µL de PEG 6000 à 25% (m/v). Les deux solutions sont préalablement refroidies dans la glace afin de limiter le déplacement de l'équilibre réactionnel.

La plaque est filtrée au moyen d'un appareil de filtration de microplaques (Unifilter-96 Cell Harvester, *Packard*) sur un filtre de fibre de verre GF/B en format 96 puits (96-well UniFilter GF/B plates, *Perkin Elmer*), préalablement saturé au PEI (0.3 % (m/v) PEI, 50 mM Tris HCl pH 7.4). Après filtration de l'échantillon, la plaque est lavée à trois reprises avec du tampon de lavage froid (50 mM Tris HCl pH 7.4). Pour les protéines purifiées, celui-ci est additionné de 8 % (m/v) de PEG 6000.

Après séchage de la plaque à température ambiante, 30 µL de cocktail de scintillation (Microscint 20, *Perkin Elmer*) sont ajoutés par puits et, après une heure d'incubation à l'obscurité, la radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation TopCount (*Perkin Elmer*).

Les données sont analysées à l'aide du logiciel Prism 7 (*GraphPad*) et ajustées à une hyperbole à un site de liaison :

$$Y = \frac{B_{max} * X}{K_D + X}$$

$B_{max}$  : nombre total de sites de liaison (pmol.mg<sup>-1</sup>)  
 $K_D$  : constante de dissociation à l'équilibre (mol.L<sup>-1</sup>)

#### 4.1.2. Courbes de déplacement

De la même manière, les courbes de déplacement de radioligand réalisées sur le récepteur AA<sub>2A</sub> mettent en jeu 100 ng de récepteur purifié en détergents ou reconstitué en nanodisques ou 10 µg de préparations membranaires recombinantes, et 5 nM du radioligand [<sup>3</sup>H]-ZM-241385. Le radioligand est mis en compétition avec une gamme de concentrations de ligand froid. Plusieurs ligands spécifiques du récepteur sont testés, à savoir l'adénosine, le XAC, le ZM-241385, le CGS-15943 et le DPCPX. Le reste de la procédure suit un protocole identique à celui décrit pour les courbes de saturation (*paragraphe 4.1.1*).

Les données sont analysées à l'aide du logiciel Prism 7 (*GraphPad*). Les constantes d'inhibition à l'équilibre ( $K_i$ ) sont calculées grâce à l'équation de Cheng-Prussow<sup>285</sup> :

$$K_i = \frac{IC50}{1 + \frac{[RL]}{K_D}}$$

$K_i$  : constante d'inhibition à l'équilibre du compétiteur (mol.L<sup>-1</sup>)  
 $IC50$  : concentration inhibitrice médiane (mol.L<sup>-1</sup>)  
 $[RL]$  : concentration de radioligand mise en jeu (mol.L<sup>-1</sup>)  
 $K_D$  : constante de dissociation à l'équilibre du radioligand (mol.L<sup>-1</sup>)



#### 4.1.3. Analyse de Proximité par Scintillation (SPA)

La procédure d'analyse de la stabilité du récepteur AA<sub>2A</sub> par test SPA s'inspire d'une étude publiée dans la littérature<sup>86</sup>. Brièvement, le test met en jeu (i) 100 ng de récepteur purifié en détergents ou reconstitué en nanodisques, (ii) 60 ng de nanodisques vides biotinylés, ou (iii) 10 µg de préparations membranaires recombinantes. Ces échantillons protéiques sont immobilisés sur 10 µL de billes yttrium silicate SPA couvertes de streptavidine (Streptavidin-Coated Yttrium Silicate SPA Beads, *Perkin Elmer*). Les échantillons sont dilués dans du tampon de liaison (**Tableau 6**) et incubés avec les billes pendant 30 minutes à température ambiante sur un agitateur rotatif. Ils sont ensuite distribués en triplicata dans une plaque 96 puits à fond surélevé opaque (ProxiPlate-96, *Perkin Elmer*) et mis en présence de 25 nM de l'antagoniste [<sup>3</sup>H]-ZM-241385, dans un volume final de 100 µL. La liaison non spécifique est déterminée en parallèle en présence de 10 µM de ZM-241385 non radioactif. La plaque est scellée et placée dans un compteur à scintillation TopCount (*Perkin Elmer*) à température ambiante. Le signal est mesuré une fois par heure pendant 48 heures. À la fin de l'expérience et avant la dernière mesure de la plaque, les protéines sont dénaturées par l'ajout de 5 µL de SDS 20 % par puits.

#### 4.1.4. Tests de liaison de radioligand sur les homogénats de muscles

##### ***Homogénats***

Les fragments de muscles prélevés sont additionnés de tampon de lyse (50 mM Tris HCl pH 7.4), à raison de 12 mL par gramme de tissu. La lyse s'effectue à l'aide d'un homogénéiseur Ultra Turrax® (*IKA*). Le tube est maintenu dans la glace.

Le lysat est ultracentrifugé pendant 30 minutes à 4°C et 100,000 g. Le culot est repris au potter dans 1 mL de tampon TS (50 mM Tris HCl pH 7.4, 0.32 M sucrose). Des aliquotes individuels sont stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

##### ***Test de liaison de radioligand***

100 µg d'homogénat sont dilués dans du tampon de liaison (**Tableau 6**) et mis en présence de 10 nM de radioligand ([<sup>3</sup>H]-ZM-241385 pour AA<sub>2A</sub> ou [<sup>3</sup>H]-mélatonine pour MT<sub>1</sub>) dans un volume final de 300 µL. La liaison non spécifique est déterminée en parallèle en présence de 10 µM du même ligand non radiomarqué. Les mesures sont effectuées en triplicata.

Les échantillons sont incubés à température ambiante (une heure pour AA<sub>2A</sub>, deux heures pour MT<sub>1</sub>) sous agitation (50 rpm) pour atteindre l'équilibre réactionnel, puis ils sont filtrés à l'aide d'un Harvester *Brandel*, sur une membrane de fibre de verre GF/C (*Perkin Elmer*), préalablement saturée au PEI (0.3 % PEI, 50 mM Tris HCl pH 7.4). Après passage de l'échantillon, les filtres sont lavés quatre fois avec 3 mL de tampon de lavage (50 mM Tris HCl pH 7.4). Ils sont ensuite incubés dans des fioles de

comptage en présence de 3 mL de liquide scintillant (Ultima Gold<sup>TM</sup> MV, *Perkin Elmer*) pendant une heure à l'obscurité. Les fioles sont comptées dans un compteur à scintillation Tri-Carb (*Packard*).

## 4.2. Microscopie électronique à transmission

Les échantillons à analyser sont confiés à la plateforme de microscopie électronique de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (*IGBMC, Illkirch*).

Brièvement, l'échantillon est adsorbé sur une grille de microscopie couverte d'un film de carbone et coloré négativement avec 2 % (m/v) d'acétate d'uranyle. La grille est observée sur un microscope électronique à transmission (TEM CM 120, *Philips*), équipé d'un filament LaB<sub>6</sub>, en utilisant une tension de 120 kV. Les images sont enregistrées sur une caméra CCD (modèle 794, *Gatan*).



# CHAPITRE 1

## Mise en place et caractérisation des outils moléculaires

*Celui qui déplace une montagne  
commence par déplacer de petites pierres*

*Confucius*

**Tableau 7 : Représentation schématique des construits recombinants de la protéine AA<sub>2A</sub> exprimée dans la levure *Pichia pastoris*.**  $\alpha$ -ss : séquence de sécrétion du facteur  $\alpha$  de la levure *Saccharomyces cerevisiae* ; FLAG : étiquette FLAG (séquence DYKDDDDKD) ; 10HIS : étiquette décahistidine ; TEV : site de clivage de la protéase TEV (séquence ENLYFQG, clivage entre les deux résidus soulignés) ; BIOTAG : domaine de biotinylation. La taille de la protéine est indiquée dans la dernière colonne. Entre parenthèses est indiquée, pour information, la taille totale comprenant le facteur de sécrétion  $\alpha$ .

Nom	Protéine recombinante	Taille (kDa)
AA2A_MP2		58.9 (67.8)
AA2A_MP3		48.7 (57.6)

## 1. Le récepteur de l'adénosine A<sub>2A</sub>

Le récepteur AA<sub>2A</sub> fait partie des récepteurs modèles couramment utilisés, et l'optimisation de ses conditions de production et de purification ont fait l'objet de plusieurs publications<sup>73,278,286</sup>.

### 1.1. Constructions recombinantes du récepteur AA<sub>2A</sub> et clonage dans la levure

La construction recombinante de ce récepteur disponible d'emblée au laboratoire est dénommée AA<sub>2A</sub>\_MP2 (**Tableau 7**). Le récepteur est fusionné du côté N-terminal à une étiquette FLAG et une étiquette décahistidine, permettant respectivement son immunodétection et sa purification par chromatographie d'affinité. Du côté C-terminal, le récepteur est fusionné à un domaine de biotinylation. Celui-ci est long d'une centaine d'acides aminés et correspond au domaine de biotinylation de la transcarboxylase de la bactérie *Propionibacterium shermanii*. Il est reconnu par la biotine ligase endogène de la levure et permet le marquage *in vivo* du récepteur<sup>287</sup>. L'extrémité N-terminale de la construction est précédée par la séquence de sécrétion du facteur  $\alpha$  de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Clivé de manière endogène par la protéase KEX2 au cours de la maturation protéique dans l'appareil de Golgi, il améliore l'adressage des RCPG à la membrane plasmique. Il n'est donc pas présent sur la protéine mature et correctement adressée. Enfin, de part et d'autre du récepteur, des sites de clivage de la protéase TEV permettent, en cas de besoin, de se débarrasser des différentes étiquettes de fusion après les étapes de purification.

Cette construction a été conçue pour augmenter au maximum le taux d'expression de récepteur fonctionnel dans la levure<sup>195,278</sup>. Elle est clonée dans un vecteur d'expression pPIC9K (le vecteur résultant est alors appelé pPIC9K\_MP2), sous le contrôle du promoteur P<sub>AOX1</sub> inductible au méthanol. Grâce à la présence de sites de restriction astucieusement disposés, il est possible de substituer très facilement le récepteur par un autre, ce qui permet de bénéficier des mêmes étiquettes de fusions.

Pour les besoins du projet, une deuxième construction recombinante, dénommée AA<sub>2A</sub>\_MP3, est générée (**Tableau 7**). L'extrémité N-terminale est en tous points identique à la version AA<sub>2A</sub>\_MP2, mais aucune étiquette n'est fusionnée du côté C-terminal. Grâce à l'absence du domaine de biotinylation sur le récepteur, des nanodisques lipidiques AA<sub>2A</sub>\_MP3 peuvent être immobilisés sur une surface via la protéine d'échafaudage MSP, elle-même biotinylable, tout en laissant un libre accès aux deux faces du disque (**Figure 56**).

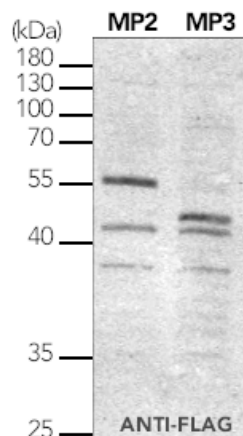
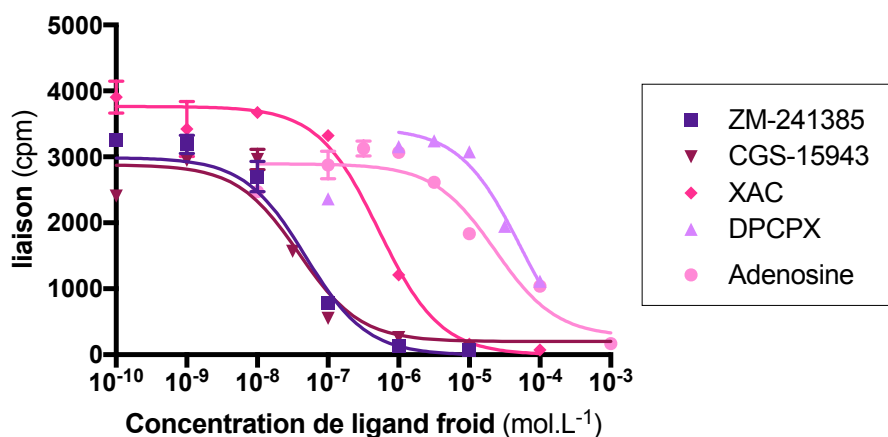


Figure 22 : Analyse Western Blot des préparations membranaires de levure exprimant différentes versions recombinantes du récepteur AA<sub>2A</sub>. Immunodétection avec un anticorps primaire anti-FLAG. Migration de 5 µg de protéines totales par piste.

Tableau 8 : Ligands spécifiques au récepteur de l'adénosine A<sub>2A</sub> utilisés dans l'étude

Abréviation	Nom chimique
CGS-15943	5-amino-9-chloro-2-(2-furyl)-[1,2,4]-triazolo[1,5-c]quinazoline
DPCPX	1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine
XAC	xanthine amine congener; 8-[4-[[[(2-aminoethyl)amino]-carbonyl]methyl]oxy]phenyl]-1,3-dipropylxanthine
ZM-241385	4-(2-[7-amino-2-[2-furyl]-[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-yl-amino]ethyl)phenol



Ligand	$K_i$ sur préparations memb. de <i>P. pastoris</i> mol.L <sup>-1</sup>	$K_i$ littérature Fredholm et al. <sup>216</sup> mol.L <sup>-1</sup>
ZM-241385	$4.5 \times 10^{-8}$	$8 \times 10^{-8}$
CGS-15943	$3.6 \times 10^{-8}$	$4.2 \times 10^{-9}$
XAC	$4.9 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-9}$
DPCPX	$5.0 \times 10^{-5}$	$1.29 \times 10^{-7}$
Adénosine	$2.1 \times 10^{-5}$	$1.8 \times 10^{-7}$

Figure 23 : Affinité de liaison de ligands antagonistes et agonistes sur des préparations membranaires de levure exprimant le récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP3. Coefficients d'inhibition ( $K_i$ ) déterminés au moyen d'un test de compétition entre 2 nM de radioligand tritié [<sup>3</sup>H]-ZM-241385 et des concentrations croissantes de ligand froid.

La construction AA<sub>2A</sub>\_MP3 est clonée dans un vecteur d'expression pPIC9K (le vecteur modifié est alors appelé pPIC9K\_MP3), en faisant appel à la même stratégie de restriction permettant une substitution facile du récepteur.

Des clones de levure exprimant les deux versions du récepteur de manière stable sont obtenus par transformation intégrative. Pour chaque construit, un clone présentant un haut niveau d'expression membranaire est sélectionné et glycérolé pour être stocké à long terme à -80°C.

Lors des phases de production, les levures sont d'abord cultivées à 30°C en présence de glycérol, ce qui permet d'augmenter la biomasse. Elles sont ensuite placées en conditions d'expression dans un milieu contenant du méthanol et additionné de 1 µM de ligand antagoniste ZM-241385, 2.5% de DMSO et 0.4 mg.L<sup>-1</sup> de biotine pendant 18 heures à 22°C avant d'être récoltées. Un litre de culture permet de récolter environ 10 g de cellules (poids humide du culot).

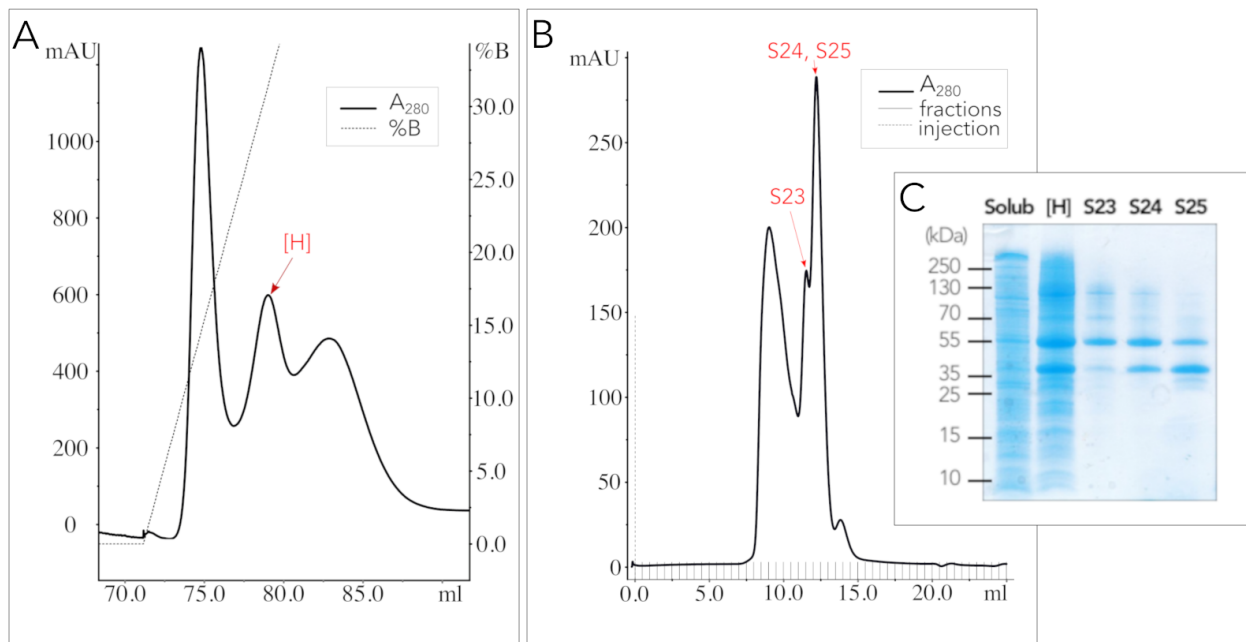
## 1.2. Préparations membranaires de levures surexprimant différentes versions du récepteur AA<sub>2A</sub>

Une étape de lyse mécanique des culots cellulaires et d'ultracentrifugation permet de séparer la fraction membranaire de la fraction cytoplasmique. Le traitement de 10 g de cellules (issues d'environ un litre de culture) génère 300 à 500 mg de préparations membranaires (quantité exprimée en protéines totales, mesurée par un dosage BCA).

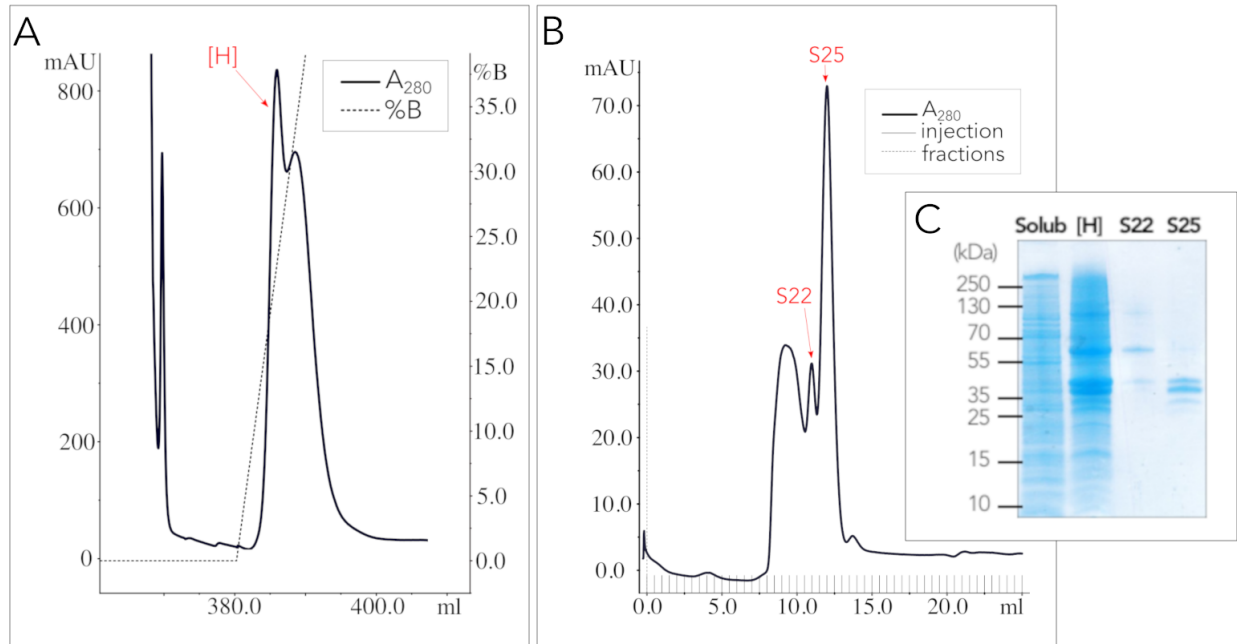
L'immunodétection du récepteur par son extrémité N-terminale, au moyen d'un anticorps anti-FLAG, permet de révéler la présence de deux espèces majoritaires pour chacun des construits (**Figure 22**). Pour la construction AA<sub>2A</sub>\_MP2, on détecte une bande vers 55 kDa, correspondant à la forme complète du récepteur (taille théorique de 58.9 kDa). La plus haute forme de la construction AA<sub>2A</sub>\_MP3 migre à environ 48 kDa, ce qui correspond à la taille théorique complète attendue (48.7 kDa). Les deux construits présentent également une bande au-dessus de 40 kDa, qui correspond à une forme tronquée du récepteur du côté C-terminal. Sa hauteur de migration, identique pour les deux construits, nous laisse penser qu'il s'agit d'un variant d'expression propre à la séquence de l'extrémité carboxy-terminale du récepteur. Une caractérisation fine de la troncature par spectrométrie de masse est présentée en **Annexe 1**. Les bandes minoritaires visibles sous 40 kDa correspondent vraisemblablement à des produits de dégradation.

La fonctionnalité des récepteurs produits est évaluée au moyen de tests de fixation de radioligand à l'équilibre (**Figure 23**). L'affinité de chaque ligand (**Tableau 8**) testé pour le récepteur est représentée par le coefficient d'inhibition  $K_i$ . Elle est, notamment pour le XAC, le DPCPX et l'adénosine, plus faible que celle retrouvée dans la littérature.





**Figure 24 : Purification du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2.** (A) Chromatogramme d'élution de la colonne d'affinité au nickel au moyen d'un gradient de tampon B (%B) contenant de l'imidazole. Les fractions d'élution du deuxième pic sont rassemblées pour former le « pool H » (noté [H]). (B) Chromatogramme de gel filtration de [H]. Les fractions analysées (S23, S24 et S25) sont indiquées en rouge. (C) Analyse SDS-PAGE des fractions d'intérêt. Coloration des protéines totales au bleu de Coomassie. Migration de 10 µL d'échantillon par piste. Solub : solubilisé chargé sur colonne d'affinité.



**Figure 25 : Purification du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP3.** (A) Chromatogramme d'élution de la colonne d'affinité au nickel au moyen d'un gradient de tampon B (%B) contenant de l'imidazole. Les fractions d'élution du premier pic sont rassemblées pour former le « pool H » (noté [H]). (B) Chromatogramme de gel filtration de [H]. Les fractions analysées (S22 et S25) sont indiquées en rouge. (C) Analyse SDS-PAGE des fractions d'intérêt. Coloration des protéines totales au bleu de Coomassie. Migration de 10 µL d'échantillon par piste. Solub : solubilisé chargé sur colonne d'affinité.

Toutefois, ces ligands ont tous été testés dans des cellules mammifères en culture, et la modification significative de l'environnement membranaire et cellulaire du récepteur dans les cellules de levure<sup>270</sup>, ainsi que la variation des conditions expérimentales du test, peuvent expliquer ces différences.

### 1.3. Le récepteur AA<sub>2A</sub> purifié en détergents

Les protéines sont d'abord solubilisées dans un mélange de DDM et de CHS, puis le récepteur est purifié selon un protocole en deux étapes. Une chromatographie d'affinité au nickel permet de retenir le récepteur via l'étiquette polyhistidine, puis un polissage sur une colonne de gel filtration sépare les espèces purifiées en fonction de leur taille. Les espèces de plus haut poids moléculaire, correspondant souvent au récepteur sous une forme agrégée et non fonctionnelle, sont alors éliminées. Seules les fractions correspondant au récepteur sous une forme monomérique sont conservées.

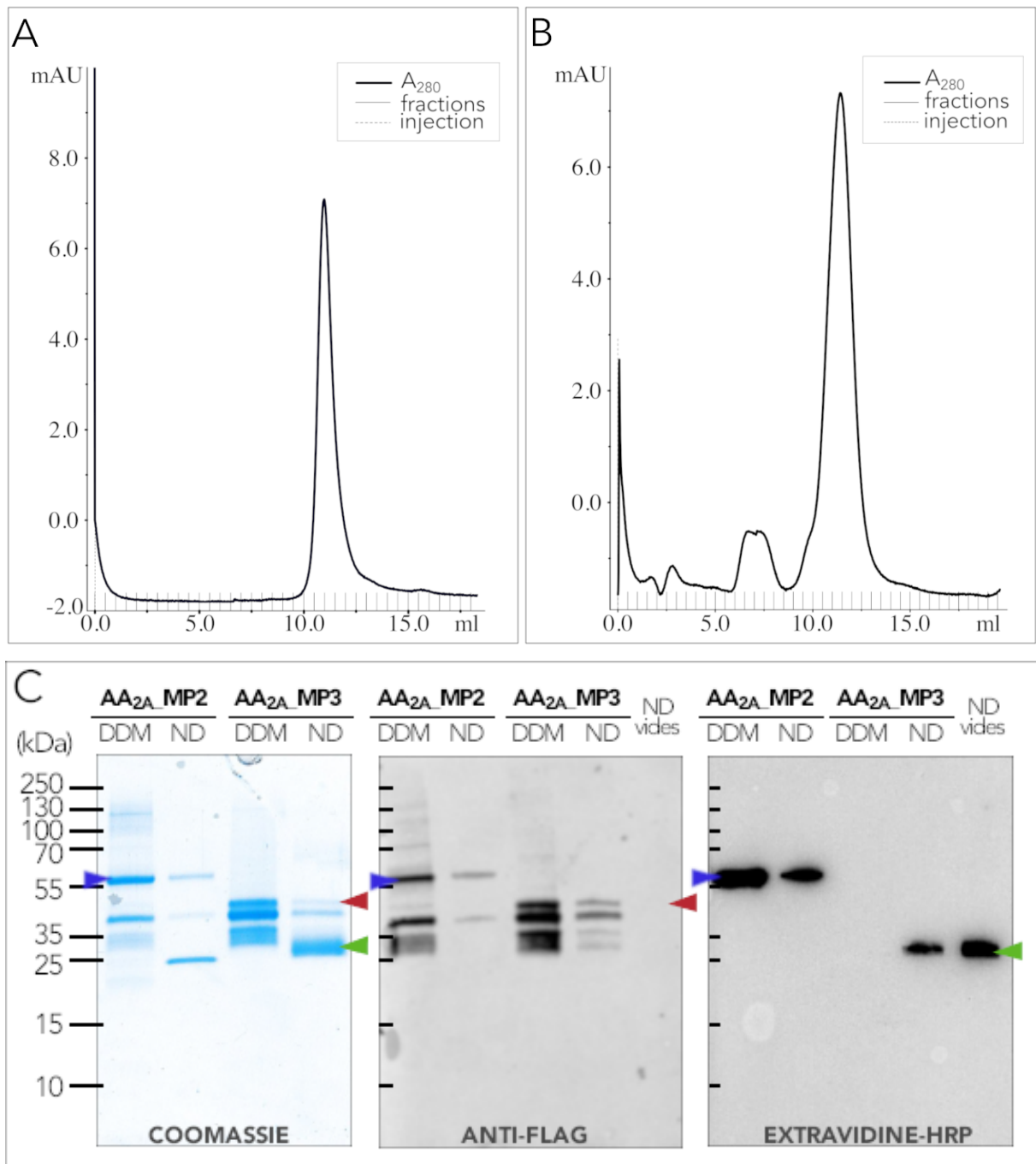
#### ***Récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2***

L'échantillon solubilisé dans un mélange DDM/CHS est chargé sur une colonne d'affinité au nickel. L'élution par un gradient continu de tampon contenant de l'imidazole permet de séparer trois espèces ayant une affinité différente avec la résine (**Figure 24A**). Le premier pic est composé principalement de protéines contaminantes. Les deux autres contiennent le récepteur d'intérêt, mais avec une très forte proportion de protéines sous forme agrégée et non fonctionnelle dans le dernier pic (*données non illustrées*). Les fractions constituant le pic central sont rassemblées pour former le « pool H » (noté [H]), qui sera injecté sur une colonne de gel filtration (**Figure 24B**). Cette chromatographie d'exclusion de taille révèle un premier pic dont le volume d'élution correspond au volume mort de la colonne (environ 8 mL), et qui contient des contaminants de haut poids moléculaire ainsi que le récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 sous forme d'agrégats ou d'oligomères. Le second pic, élué à un volume d'environ 12 mL, correspond au récepteur sous forme monomérique entouré de sa micelle de détergents. L'analyse SDS-PAGE des fractions qui le composent (**Figure 24C**) permet de révéler la présence de la forme complète du récepteur (migration vers 55 kDa) dans l'épaule précédant le pic (fraction S23), suivi d'un mélange des formes complètes et tronquées dans le pic majoritaire (fractions S24 et S25). Le taux de pureté de la protéine AA<sub>2A</sub>\_MP2 est supérieur à 90 %.

La solubilisation de 200 mg de préparations membranaires permet d'obtenir environ 150 µg de récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 purifié sous sa forme complète (fraction S23).

#### ***Récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP3***

La purification du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP3 suit la même procédure. Deux espèces partiellement séparées sont mises en évidence par la chromatographie d'affinité (**Figure 25A**). Le pic majoritaire contient le récepteur fonctionnel, tandis que



**Figure 26 : Reconstitution des récepteurs AA<sub>2A</sub>\_MP2 et AA<sub>2A</sub>\_MP3 en nanodisques lipidiques. Chromatogrammes d'éluion de gel filtration des nanodisques (A) AA<sub>2A</sub>\_MP2 et (B) AA<sub>2A</sub>\_MP3. (C) Analyse SDS-PAGE des récepteurs purifiés en détergents (DDM) et reconstitués en nanodisques (ND). ND vides : nanodisques sans récepteur, MSP1E3D1-biotine. *Panel de gauche* : migration de 10  $\mu$ L d'échantillon par piste sur un gel coloré au bleu de Coomassie. *Panel central et panel de droite* : migration de 2  $\mu$ L d'échantillon par piste, immunodétection avec un anticorps anti-FLAG (*centre*) et de l'extravidine-HRP (*droite*). La hauteur de migration du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 est signalée par des flèches bleues, du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP3 par des flèches rouges et de la MSP1E3D1 par des flèches vertes.**

les espèces oligomériques et agrégées se retrouvent dans l'épaulement qui le suit. Les fractions constituant le premier pic sont rassemblées pour former le « pool H » ([H]). Sa purification sur colonne de gel filtration (**Figure 25B**) révèle trois pics. Le premier, élué proche du volume mort de la colonne, correspond aux oligomères et agrégats non fonctionnels. L'analyse SDS-PAGE (**Figure 25C**) met en évidence la présence du récepteur sous ses formes complètes et tronquées dans le troisième pic, qui est également le pic majoritaire. Le taux de pureté obtenu est supérieur à 90 %.

La solubilisation de 200 mg de préparations membranaires permet d'obtenir environ 200 µg de récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP3 purifié (rassemblement des fractions S24 à S26, correspondant au pic majoritaire issu de gel filtration).

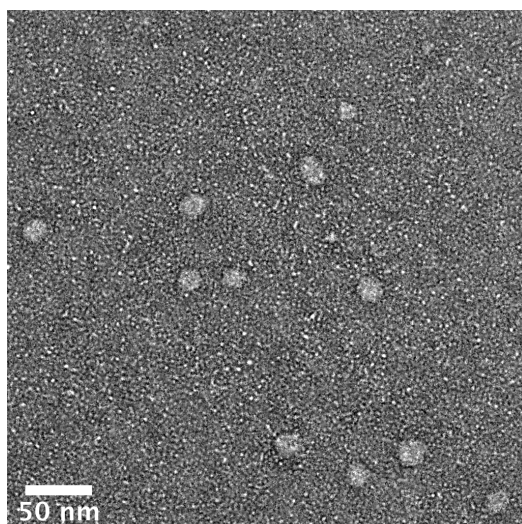
#### 1.4. La reconstitution du récepteur AA<sub>2A</sub> en nanodisques lipidiques

Le récepteur purifié est reconstitué dans des nanodisques lipidiques ceinturés par la protéine MSP1E3D1, avec un mélange de POPC et de POPG dans un ratio molaire 3:2, en présence de CHS. Les différents composants sont assemblés en suivant les proportions molaires récepteur:MSP:lipides de 1:10:700, préalablement décrites dans la littérature<sup>87</sup>. Les molécules de détergent sont ensuite adsorbées sur des microbilles de polystyrène, ce qui permet la formation spontanée d'un mélange de nanodisques vides et de nanodisques contenant le récepteur d'intérêt. Les nanodisques pleins sont purifiés grâce à une chromatographie d'affinité mettant en jeu l'étiquette polyhistidine du récepteur, suivie d'une étape de polissage sur colonne de gel filtration.

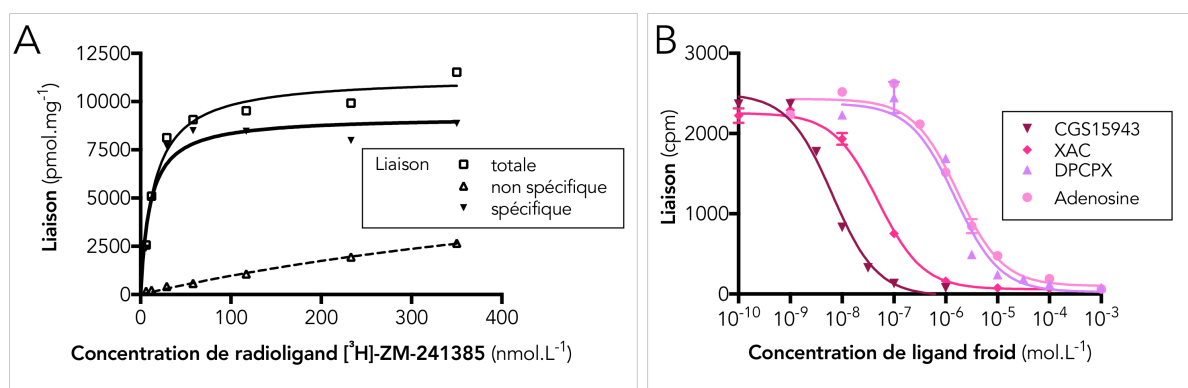
##### *Récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2*

La séparation des nanodisques sur colonne de gel filtration résulte en une espèce monodisperse éluée à un volume de 12 mL (**Figure 26A**). L'analyse SDS-PAGE révèle la présence du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 et de la protéine d'échafaudage MSP1E3D1 (**Figure 26C**, piste 2). Celle-ci, d'une taille théorique de 30 kDa, migre entre 25 et 35 kDa sur le gel (symbolisé par les flèches vertes). Le récepteur est quant à lui présent majoritairement sous sa forme complète, qui se matérialise par une bande à 55 kDa (flèches bleues) visible à la fois en révélation anti-FLAG (étiquette côté N-terminal) et extravidine-HRP (molécule de biotine du côté C-terminal). La seconde bande, au-dessus de 35 kDa, visible uniquement en révélation anti-FLAG, correspond à la forme tronquée du récepteur du côté C-terminal. On peut également noter, dans la préparation analysée, la présence de formes dégradées du récepteur, particulièrement visibles sur l'échantillon purifié en détergents.

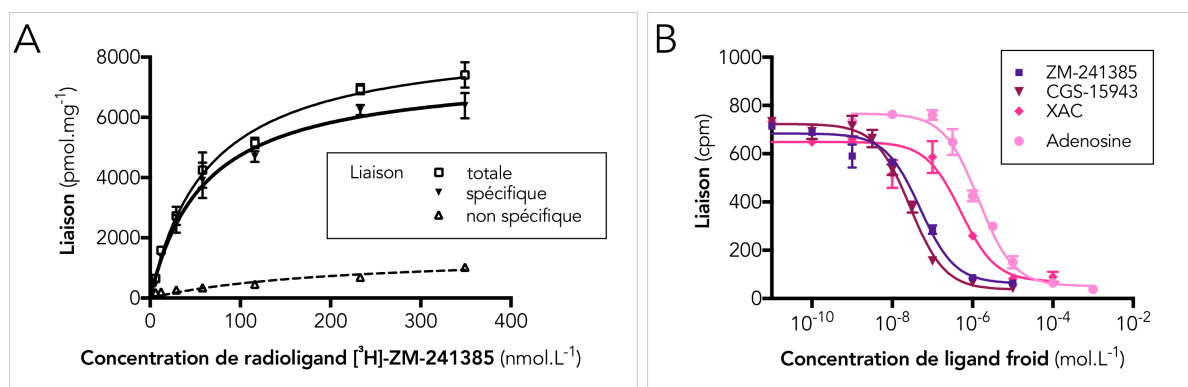
La procédure permet de reconstituer 5 à 10 % des récepteurs mis en jeux en nanodisques. Ce rendement a pu être maximisé en modifiant le mode de calcul du ratio récepteur:MSP:lipides utilisé pour la reconstitution. En effet, la séquence de



**Figure 27** : Image de microscopie électronique à coloration négative du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP3 reconstitué en nanodisques. Dilution d'un échantillon de nanodisques à 0.2 ng/ $\mu$ L (concentration en récepteur), et analyse après coloration à l'acétate d'uranyle. Les particules observées ont un diamètre moyen de 14 nm.



**Figure 28** : Caractérisation pharmacologique du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP3 purifié en DDM par tests de fixation de radioligand à l'équilibre. (A) Courbe de saturation du [<sup>3</sup>H]-ZM-241385. Liaison exprimée en pmol de ligand par mg de récepteur purifié. (B) **Compétition** entre 2 nM de [<sup>3</sup>H]-ZM-241385 et des concentrations croissantes de ligand froid.



**Figure 29** : Caractérisation pharmacologique des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 par tests de fixation de radioligand à l'équilibre. (A) Courbe de saturation du [<sup>3</sup>H]-ZM-241385. Liaison exprimée en pmol de ligand par mg de récepteur reconstitué en nanodisques. (B) **Compétition** entre 2 nM de [<sup>3</sup>H]-ZM-241385 et des concentrations croissantes de ligand froid.

biotinylation du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 représente un fragment long de 10 kDa du côté C-terminal, qui n'occupe pas d'espace dans la bicouche lipidique. Les proportions récepteur:MSP:lipides ont donc été recalculées en omettant la taille du biotag dans la détermination de la masse moléculaire du récepteur, ce qui équivaut à un ratio 0.83:10:700.

### ***Récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP3***

Pour pouvoir immobiliser les nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 sur une surface via une interaction streptavidine-biotine, la MSP1E3D1 utilisée pour la reconstitution est biotinylée chimiquement après sa purification à l'aide d'un réactif NHS-PEG4-biotine. Celui-ci réagit avec les amines primaires libres.

Le protocole de reconstitution en nanodisques permet d'obtenir une espèce majoritairement monodisperse sur colonne de gel filtration, éluée à un volume d'environ 12 mL (**Figure 26B**). L'analyse SDS-PAGE des fractions qui la composent (**Figure 26C**) met en évidence la présence des deux formes du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP3, révélées grâce à un anticorps anti-FLAG et indiquées par les flèches rouges, et de la protéine MSP1E3D1, marquée par une révélation à l'extravidine-HRP (flèches vertes). Là encore, la préparation analysée contient également des formes dégradées du récepteur, surtout visibles sur l'échantillon purifié en détergents.

L'observation des nanodisques purifiés au microscope électronique à transmission suite à une coloration négative de l'échantillon (**Figure 27**) confirme l'homogénéité de la préparation. Les particules circulaires visualisées ont un diamètre moyen de 14 nm, ce qui se rapproche de la taille attendue, soit 12.1 nm avec la version MSP1E3D1 de la protéine d'échafaudage (**Tableau 1**).

Le rendement de reconstitution a pu être augmenté jusqu'à atteindre 40 %, notamment en diminuant la quantité de microbilles de polystyrène utilisée lors de l'étape d'adsorption.

## 1.5. Étude fonctionnelle et stabilité des objets purifiés

Les nanodisques destinés à être utilisés pour les étapes de sélection des anticorps étant les nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3, qui peuvent être immobilisés sur une surface par l'intermédiaire de la protéine échafaudage biotinylée, seuls les résultats de caractérisation fonctionnelle les concernant sont présentés dans ce manuscrit.

### ***Caractérisation pharmacologique***

La fonctionnalité du récepteur fraîchement purifié en détergents et reconstitué en nanodisques lipidiques est évaluée au moyen de tests de fixation de radioligand à l'équilibre.

Tableau 9 : Affinité du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP3 purifié en détergents et reconstitué en nanodisques lipidiques pour le [<sup>3</sup>H]-ZM-241385, et nombre total de sites de liaison.  $K_D$  et  $B_{max}$  extraits des courbes de saturation.

Saturation [ <sup>3</sup> H]-ZM-241385	AA <sub>2A</sub> _MP3 en DDM (n=4)	Nanodisques AA <sub>2A</sub> _MP3 (n=4)
$K_D$ (nmol.L <sup>-1</sup> )	Entre 11 ± 3 et 54 ± 17 ( $K_D$ moyen = 26)	Entre 9 ± 2 et 60 ± 7 ( $K_D$ moyen = 33)
$B_{max}$ (pmol.mg <sup>-1</sup> )	Entre 4400 ± 800 et 9200 ± 500 ( $B_{max}$ moyen = 7400)	Entre 2800 ± 200 et 7600 ± 300 ( $B_{max}$ moyen = 5300)

Tableau 10 : Affinité du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP3 purifié en détergents et reconstitué en nanodisques lipidiques pour différents ligands agonistes et antagonistes, exprimée sous forme de coefficients d'inhibition ( $K_i$ ).

Ligand	AA <sub>2A</sub> _MP3 en DDM $K_i$ en mol.L <sup>-1</sup> (n=2)	Nanodisques AA <sub>2A</sub> _MP3 $K_i$ en mol.L <sup>-1</sup> (n=1)	$K_i$ littérature Fredholm et al. <sup>216</sup> mol.L <sup>-1</sup>
ZM-241385	$4.7 \times 10^{-8}$	$4.8 \times 10^{-8}$	$8 \times 10^{-8}$
CGS-15943	$5.5 \times 10^{-9}$	$2.7 \times 10^{-8}$	$4.2 \times 10^{-9}$
XAC	$2.7 \times 10^{-8}$	$5.0 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-9}$
DPCPX	$1.2 \times 10^{-6}$	/	$1.29 \times 10^{-7}$
Adénosine	$1.6 \times 10^{-6}$	$1.4 \times 10^{-6}$	$1.8 \times 10^{-7}$

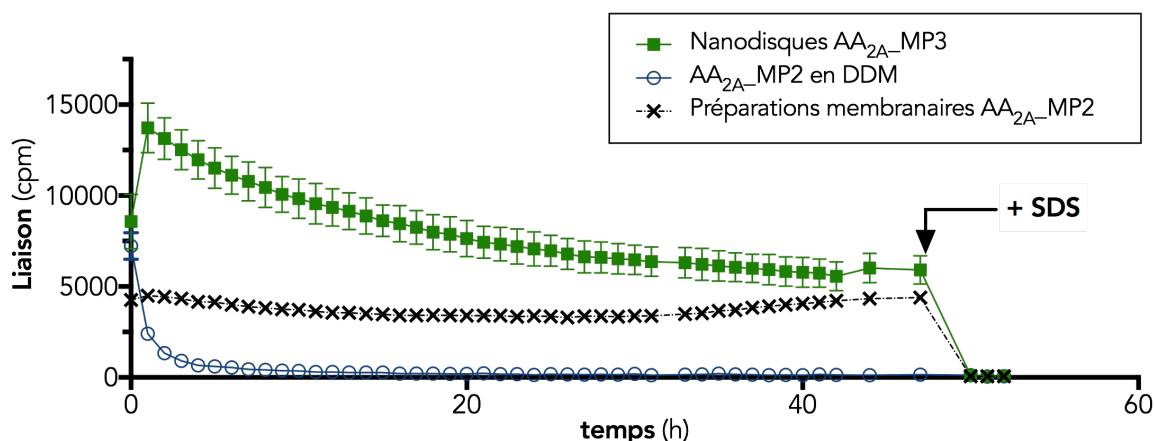


Figure 30 : Stabilité du récepteur AA<sub>2A</sub> purifié en détergents et reconstitué en nanodisques lipidiques à température ambiante, déterminée par une analyse de proximité par scintillation (SPA). L'échantillon est adsorbé sur des billes SPA en yttrium silicate recouvertes de streptavidine et mis en présence de 25 nM de [<sup>3</sup>H]-ZM-241385. Après 48 heures d'incubation à température ambiante, l'ajout de SDS 20% permet de dénaturer les récepteurs encore fonctionnels. Des préparations membranaires AA<sub>2A</sub>\_MP2 sont utilisées comme contrôle positif, des nanodisques vides comme contrôle négatif.

La constante de dissociation reflétant l'affinité du récepteur pour l'antagoniste ZM-241385 ainsi que le nombre de sites de liaison sont déterminés à l'aide de courbes de saturation du radioligand (**Figure 28A** et **Figure 29A**).

Les constantes extraites de plusieurs expériences individuelles ont été moyennées et sont présentées dans le **Tableau 9**. L'affinité mesurée du [<sup>3</sup>H]-ZM-241385 pour le récepteur est d'environ 30 nM, ce qui est du même ordre de grandeur que les données publiées dans la littérature (12 nM sur un récepteur purifié pour Magnani *et al.*<sup>288</sup>). Le  $B_{max}$  peut atteindre, en fonction des lots, 7600 (nanodisques) et 9200 (DDM) pmol de radioligand fixé par milligramme de récepteur.

L'affinité de plusieurs autres ligands est déterminée au moyen de tests de compétition, mettant en jeu une concentration fixe de radioligand chassée par des concentrations croissantes de ligand non radiomarké (**Figure 28B** et **Figure 29B**). Les constantes d'inhibition ( $K_i$ ) extraites de ces expériences, présentées dans le **Tableau 10**, sont similaires pour le récepteur purifié en DDM et reconstitué en nanodisques. On peut toutefois noter une affinité plus faible des nanodisques pour le XAC et le CGS-15943. Une optimisation plus fine de la composition de la bicouche lipidique pourrait être envisagée pour améliorer ces constantes de liaison, et se rapprocher également de celles décrites dans la littérature.

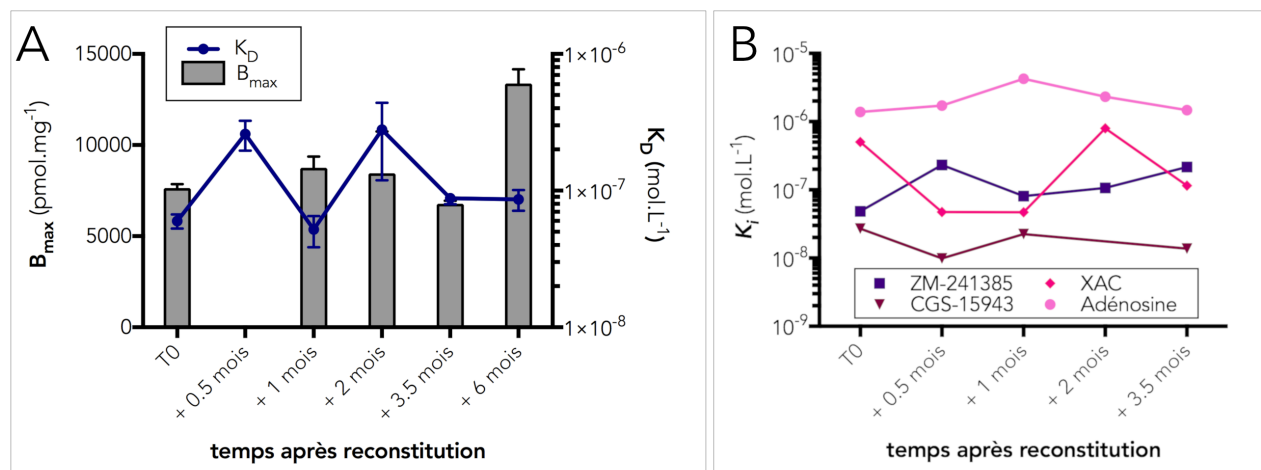
### ***Stabilité des objets purifiés à température ambiante***

La stabilité des échantillons purifiés à température ambiante est caractérisée grâce à un test SPA, dont les résultats sont présentés en **Figure 30**.

Cette méthode consiste à immobiliser les récepteurs sur des billes recouvertes de streptavidine. Les nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 sont donc immobilisés via la MSP1E3D1, tandis que les récepteurs AA<sub>2A</sub>\_MP2 peuvent être retenus par l'étiquette biotine à leur extrémité C-terminale. Les billes jouent le rôle de cocktail scintillant, et émettent un signal lorsqu'une molécule de radioligand en est suffisamment proche, c'est-à-dire lorsqu'elle est liée au récepteur. La dénaturation des récepteurs entraîne la perte de la liaison et donc la décroissance du signal. Le suivi cinétique de la scintillation permet ainsi d'évaluer la stabilité du récepteur dans les conditions du test.

Le signal est mesuré à intervalles réguliers pendant 48 heures. Le bruit de fond mesuré sur des nanodisques vides est retranché du signal total. Des préparations membranaires exprimant le récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 sont utilisées comme contrôle positif, et présentent une liaison constante et stable durant toute la durée de l'expérience. Pour les nanodisques, le signal augmente jusqu'à atteindre son maximum une heure après le début de l'incubation, ce qui correspond à la cinétique de liaison du ligand au récepteur. Il décroît ensuite progressivement pour atteindre 40 % de son maximum après 48 heures. La liaison du radioligand sur le récepteur purifié en détergents décroît quant à

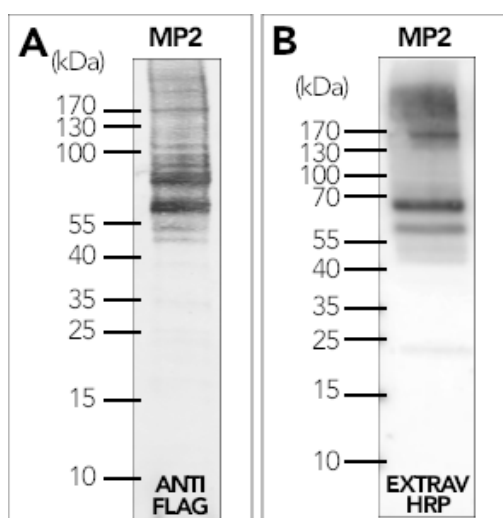




**Figure 31 :** Étude de la stabilité des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 à -80°C. (A) Évolution de la constante de dissociation ( $K_D$ ) et du nombre de sites de liaison ( $B_{max}$ ) du [<sup>3</sup>H]-ZM-241385. Données extraites des courbes de saturation. (B) Évolution des constantes d'inhibition ( $K_i$ ) de différents ligands pour le récepteur reconstitué en nanodisques. Données extraites des tests de compétition.

**Tableau 11 :** Représentation schématique du construit recombinant de la protéine MT<sub>1</sub> exprimée dans la levure *Pichia pastoris*.  $\alpha$ -ss : facteur de sécrétion  $\alpha$  de la levure *Saccharomyces cerevisiae* ; FLAG : étiquette FLAG (séquence DYKDDDDK) ; 10HIS : étiquette décahistidine ; TEV : site de clivage de la protéase TEV (séquence ENLYFQG, clivage entre les deux résidus soulignés) ; BIOTAG : domaine de biotinylation. La taille de la protéine est indiquée dans la dernière colonne. Entre parenthèses est indiquée, pour information, la taille totale comprenant le facteur de sécrétion  $\alpha$ .

Nom	Protéine recombinante	Taille (kDa)
MT1_MP2		52.8 (61.7)



**Figure 32 :** Analyse Western Blot des préparations membranaires de levure exprimant le récepteur recombinant MT<sub>1</sub>\_MP2. Migration de 10  $\mu$ g de protéines totales par piste. (A) Immunodétection avec un anticorps primaire anti-FLAG. (B) Révélation de la biotine avec de l'extravidine-HRP.

elle de manière exponentielle dès le début du test, pour atteindre son minimum dès cinq heures d'incubation. Après 48 heures d'incubation, l'ajout de SDS dénature les récepteurs fonctionnels restants, ce qui se matérialise par une décroissance rapide du signal à zéro, y compris pour le contrôle positif.

Dans les conditions testées, les nanodisques sont donc plus adaptés à une utilisation prolongée à température ambiante.

### ***Stabilité des nanodisques à la congélation***

Une fois purifiés et concentrés, les nanodisques sont congelés rapidement dans l'azote liquide et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Leur stabilité au stockage prolongé est évaluée grâce à des tests de liaison de radioligand en point final, répétés à différents intervalles sur un même lot d'échantillon. Les résultats présentés en **Figure 31** démontrent que les nanodisques peuvent être conservés jusqu'à six mois sans observer de décroissance significative de la capacité de liaison du récepteur, ni d'impact sur les constantes d'affinité.

De plus, la variabilité des données reflète la variabilité intrinsèque des expériences de liaison de radioligand. Ainsi, dans les conditions expérimentales utilisées, une variation d'une puissance de dix sur une constante d'affinité ou d'inhibition ne peut pas être interprétée comme significative.

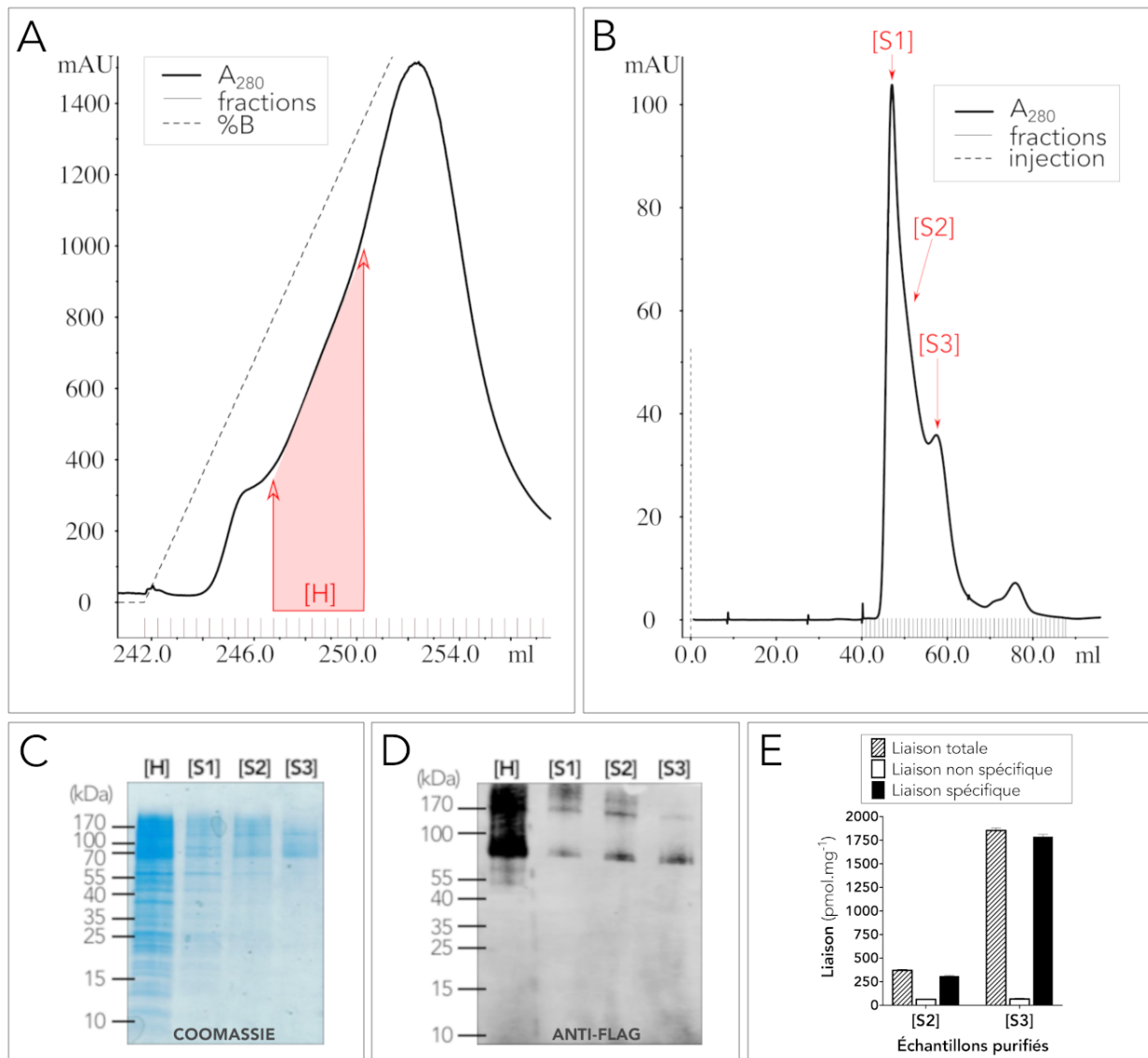
## **2. Le récepteur de la mélatonine MT<sub>1</sub>**

Pour le récepteur MT<sub>1</sub>, comme évoqué dans les chapitres précédents, des procédures d'expression et de purification ont notamment été explorées au cours d'un travail de thèse, et ont fait l'objet de deux publications au laboratoire<sup>269-271</sup>.

### **2.1. Construction recombinante du récepteur MT<sub>1</sub> et clonage dans la levure**

Un clone de levure exprimant le construit MT<sub>1</sub>\_MP2 était disponible d'emblée au laboratoire. La protéine recombinante, décrite dans le **Tableau 11**, est construite sur le même schéma de fusion que la protéine AA<sub>2A</sub>\_MP2, avec une étiquette FLAG et décahistidine du côté N-terminal, et une séquence de biotinylation du côté C-terminal. Le récepteur est bordé par des séquences de clivage de la protéase TEV. La protéine de fusion fait une taille de 52.8 kDa.

Pour permettre, dans la même optique que pour le récepteur AA<sub>2A</sub>, de former des nanodisques marqués à la biotine sur la protéine échafaudage, le récepteur MT<sub>1</sub> a également été cloné dans le vecteur MP3 (sans séquence de biotinylation du côté C-terminal). Cependant, malgré plusieurs campagnes de transformation de levures, aucun clone recombinant exprimant le récepteur à un niveau significatif n'a pu être sélectionné.



**Figure 33 : Purification du récepteur MT<sub>1</sub>\_MP2. (A) Chromatogramme d'élution de la colonne d'affinité au nickel au moyen d'un gradient de tampon B (%B) contenant de l'imidazole. Les fractions d'élution de l'épaulement central sont rassemblées pour former le « pool H » (noté [H], en rouge). (B) Chromatogramme de gel filtration de [H]. Les fractions sont rassemblées pour former les groupes [S1], [S2] et [S3], indiqués en rouge. (C et D) Analyse SDS-PAGE des fractions d'intérêt. (C) Coloration des protéines totales au bleu de Coomassie, migration de 10 µL d'échantillon par piste. (D) Immunodétection du récepteur MT<sub>1</sub> par un anticorps anti-FLAG, migration de 5 µL d'échantillon par piste. (E) Test de liaison de radioligand en point final, activité de liaison des groupes de fractions finales purifiées testée en présence de 50 nM de [<sup>3</sup>H]-mélatonine.**

La phase de bioproduction est effectuée selon le protocole classique, avec une première étape de production de biomasse en glycérol à 30°C, suivie d'une étape d'induction de l'expression protéique dans un milieu contenant du méthanol et additionné de 1  $\mu\text{M}$  de ligand antagoniste D600, 2.5% de DMSO et 0.4  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de biotine. Les cellules sont récoltées après 18 heures d'induction à 22°C. Un litre de culture permet de récolter environ 10 g de cellules (poids humide du culot).

## 2.2. Préparations membranaires de levures surexprimant le récepteur $\text{MT}_1$

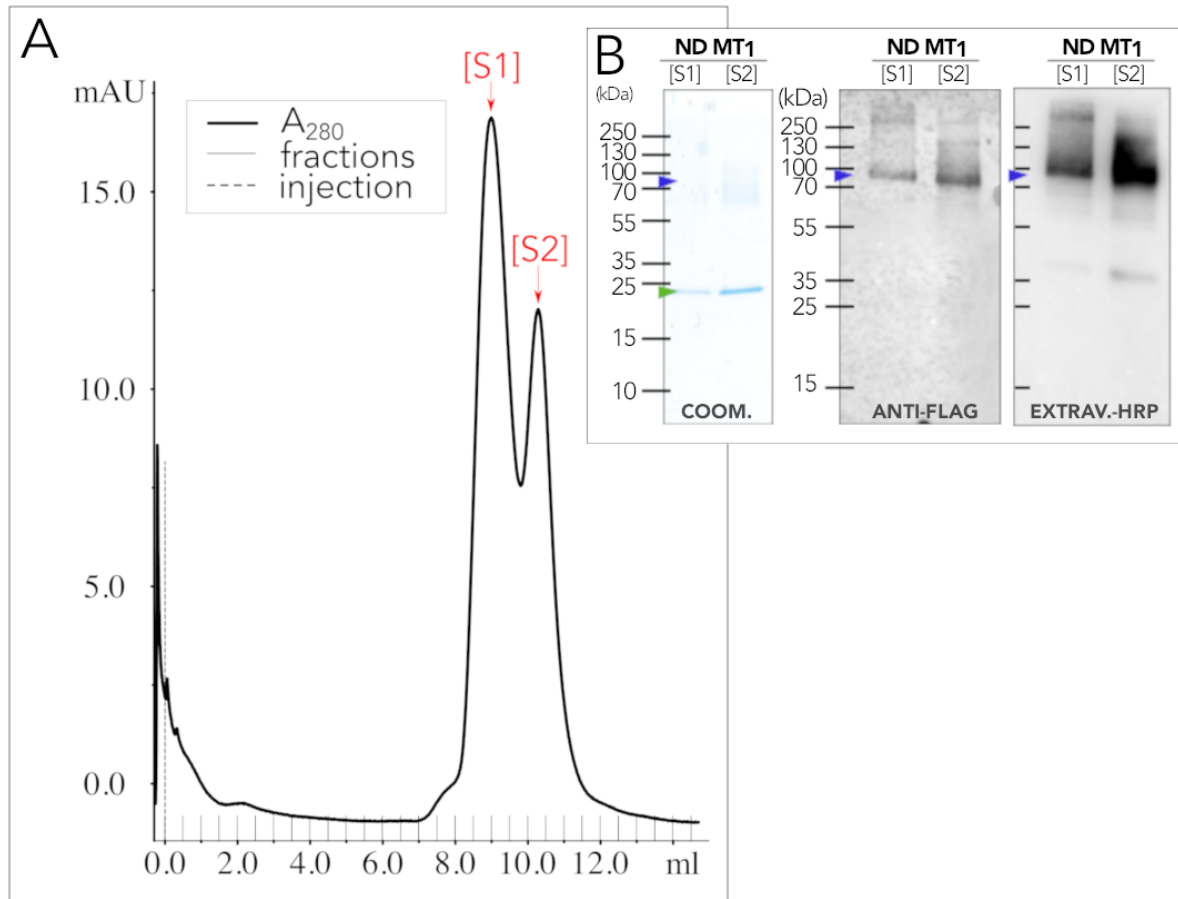
La lyse de 10 g de cellules (issues d'environ un litre de culture) conduit à l'obtention de 300 à 500 mg de préparations membranaires (quantité exprimée en protéines totales, mesurée par un dosage BCA).

L'immunodétection de l'extrémité N-terminale du récepteur au moyen d'un anticorps anti-FLAG (**Figure 32A**), et de la biotine localisée du côté C-terminal (**Figure 32B**), révèle deux espèces majoritaires. Leur poids moléculaire apparent, situé entre 60 et 70 kDa, se rapproche de la taille théorique attendue pour la protéine complète (52.8 kDa). La différence de hauteur de migration peut s'expliquer par la variation du profil de glycosylation de la protéine. On note également la présence d'espèces immunoréactives de haut poids moléculaire. Celles-ci sont couramment observées pour les protéines membranaires, et correspondent en général à des formes oligomériques ou agrégées du récepteur d'intérêt non résolues par le SDS.

## 2.3. Le récepteur $\text{MT}_1$ purifié en détergents

Les préparations membranaires sont d'abord solubilisées dans un mélange de Fos14 et de CHAPS, en présence de CHS. Le récepteur est ensuite purifié grâce à un protocole en deux étapes : une chromatographie d'affinité au nickel, suivie d'une séparation sur colonne de gel filtration.

L'élution de la colonne d'affinité à l'aide d'un gradient continu d'imidazole sépare grossièrement plusieurs espèces. Le chromatogramme présenté sur le panel **A** de la **Figure 33** peut en effet être décomposé en un pic majoritaire précédé de deux épaulements. La majorité du récepteur sous forme monomérique est contenue dans le second épaulement. Les fractions correspondantes (annotées [H] en rouge) sont alors rassemblées et concentrées pour pouvoir être injectées sur une colonne de gel filtration.



**Figure 34 : Reconstitution du récepteur MT<sub>1</sub>\_MP2 en nanodisques lipidiques. (A) Chromatogramme d'éluion de gel filtration des nanodisques.** Les fractions d'éluion correspondant à chaque pic sont rassemblées pour former les groupes [S1] et [S2], indiqués en rouge. **(B) Analyse SDS-PAGE des nanodisques purifiés.** *Panel de gauche* : migration de 10  $\mu$ L d'échantillon par piste sur un gel coloré au bleu de Coomassie. *Panel central et panel de droite* : migration de 5  $\mu$ L d'échantillon par piste, immunodétection avec un anticorps anti-FLAG (*centre*) et de l'extravidine-HRP (*droite*). Les bandes correspondant au récepteur MT<sub>1</sub>\_MP2 sont signalées par des flèches bleues et celles de la MSP1E3D1 par des flèches vertes.

Le chromatogramme d'élution de cette dernière (**Figure 33B**) peut à nouveau être décomposé en trois parties. Le volume d'élution du pic majoritaire (groupe de fractions noté [S1]) correspond au volume mort de la colonne et donc à des espèces oligomériques ou agrégées. Un second pic, non entièrement résolu mais qui se distingue clairement, est élué aux environs de 60 mL et annoté [S3]. Les espèces [S1] et [S3] sont séparées par un épaulement, regroupé ici sous le nom de [S2]. La protéine MT<sub>1</sub> est présente dans ces trois groupes (**Figure 33C et D**), mais le groupe [S3] est celui qui comporte le plus de récepteurs capables de fixer la mélatonine (**Figure 33E**).

On peut également noter que sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (**Figure 33C**), le récepteur purifié a un aspect particulièrement flou, ce qui rend difficile l'estimation d'un degré de pureté.

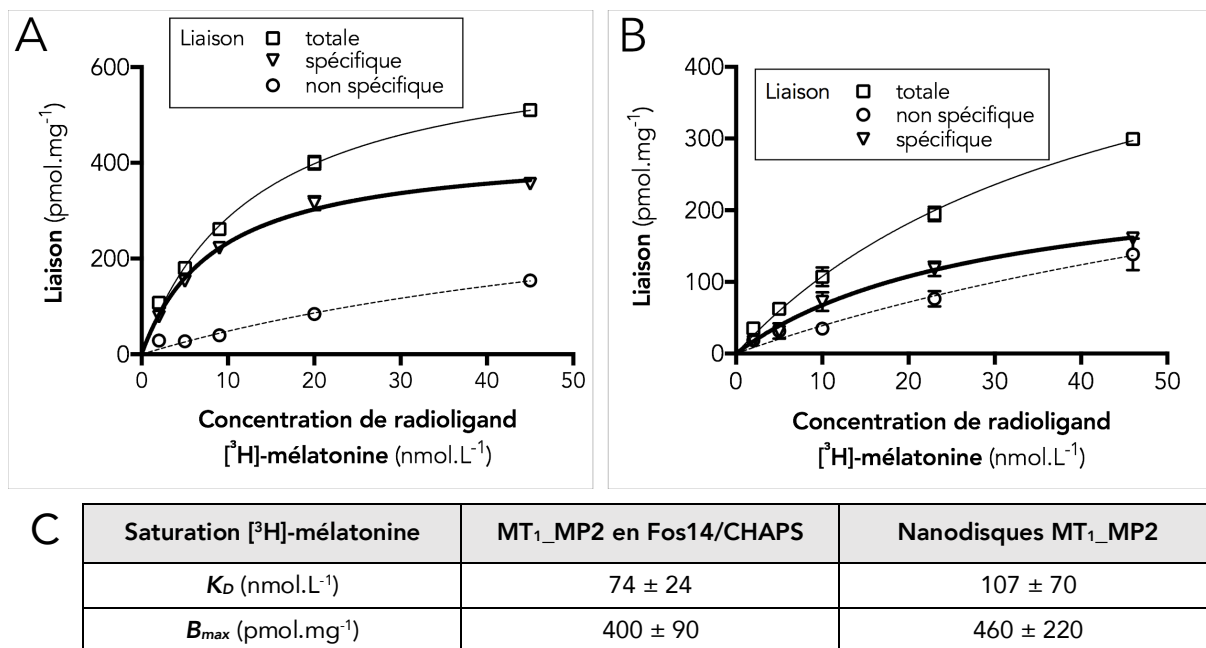
La purification de 535 mg de préparations membranaires permet d'obtenir 240 µg de récepteur MT<sub>1</sub> purifié.

## 2.4. La reconstitution du récepteur MT<sub>1</sub> en nanodisques lipidiques

Les premiers essais de reconstitution du récepteur MT<sub>1</sub> en nanodisques ont été conduits par Christel Logez dans le cadre de sa thèse<sup>270</sup>, et toutes les optimisations ont été réalisées par Lydia Caro, alors post-doctorante au laboratoire.

Le récepteur purifié sous sa forme monomérique et active (groupe [S3]), est reconstitué en nanodisques lipidiques ceinturés par la protéine MSP1E3D1, avec un mélange de POPC et de POPG dans un ratio molaire 3:2, en présence de CHS. Les différents composants sont assemblés en suivant les proportions molaires récepteur:MSP:lipides de 1:10:700. Le récepteur étant particulièrement sensible à la dénaturation, les lipides sont solubilisés dans du CHAPS afin d'éviter l'introduction d'un nouveau détergent. D'autre part, l'incubation prolongée du récepteur avec des microbilles de polystyrène encourage fortement son agrégation et diminue le rendement de reconstitution. De plus, la Fos14 possède une CMC faible, de l'ordre de 0.0046%, ce qui la rend particulièrement délicate à éliminer. L'étape d'adsorption des molécules de détergents a donc nécessité de nombreux ajustements.

Le mélange récepteur:MSP:lipides est tout d'abord mis en présence de  $\gamma$ -cyclodextrine (ratio molaire  $\gamma$ -cyclodextrine:CHAPS de 2:1) et de heptakis- $\beta$ -cyclodextrine (ratio molaire heptakis- $\beta$ -cyclodextrine:Fos14 de 2:1). Les cyclodextrines ont une affinité sélective pour les détergents et peuvent être utilisées pour capturer spécifiquement les molécules de détergents dans une préparation protéique<sup>289,290</sup>. Elles sont additionnées sous forme de poudre directement dans l'échantillon liquide, en trois ajouts successifs, chacun étant suivi de 15 minutes d'incubation à température ambiante. Les complexes cyclodextrine-détergents sont ensuite éliminés grâce à une étape de dialyse contre un



**Figure 35** : Caractérisation pharmacologique du récepteur MT<sub>1</sub>\_MP2 par des tests de fixation de radioligand à l'équilibre. Courbes de saturation de la [<sup>3</sup>H]-mélatonine sur le récepteur (A) purifié en Fos14/CHAPS et (B) reconstitué en nanodisques. Liaison exprimée en pmol de ligand par mg de récepteur purifié. (C) Constant de dissociation ( $K_D$ ) et nombre total de sites de liaison ( $B_{max}$ ) de la [<sup>3</sup>H]-mélatonine. Données extraites des courbes de saturation.

tampon exempt de détergent, effectuée pendant la nuit à 4°C. Une étape finale de quatre heures d'incubation (à 4°C) avec des microbilles de polystyrène permet d'éliminer les molécules de détergents résiduelles.

Les nanodisques pleins contenus dans l'échantillon sont d'abord purifiés par une chromatographie d'affinité au nickel, durant laquelle le récepteur MT<sub>1</sub> est retenu via l'étiquette décahistidine. Ils sont ensuite injectés sur une colonne de gel filtration. Le chromatogramme d'élution de celle-ci est présenté en **Figure 34A**. Deux pics contenant le récepteur d'intérêt et la protéine MSP1E3D1 (**Figure 34B**) sont élués. Le volume d'élution nous indique cependant que le pic noté [S1] correspond à des espèces de plus haut poids moléculaire que les nanodisques attendus. Seul le pic noté [S2] est donc conservé.

La procédure décrite ci-dessus permet de reconstituer 2 à 3 % des récepteurs mis en jeu en nanodisques.

## 2.5. Étude fonctionnelle des objets purifiés

La capacité du récepteur MT<sub>1</sub> purifié en Fos14/CHAPS et reconstitué en nanodisques à fixer la mélatonine est évaluée par un test de fixation de radioligand à l'équilibre. Les courbes de saturation de la [<sup>3</sup>H]-mélatonine sont présentées en **Figure 35**. Le ligand présente une affinité similaire pour le récepteur dans les deux cas, avec un  $K_D$  environnant la centaine de nanomoles par litre.





### 3. Développement d'une approche de purification alternative : solubilisation des récepteurs à partir de cellules entières de levures

Un problème récurrent observé lors de la purification de protéines membranaires, et de RCPG en particulier, est l'agrégation de la majeure partie de la protéine d'intérêt.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'origine de ce phénomène. D'une part, les procédures de lyse cellulaire, nécessaires à la préparation de la fraction membranaire, sont souvent génératrices de chaleur ou de forces de cisaillement pouvant être dommageables pour l'intégrité des protéines. D'autre part, la surexpression peut engendrer une certaine surcharge des machineries cellulaires et être à l'origine d'un mauvais repliement des protéines synthétisées. Celles-ci seront alors stockées dans les compartiments intracellulaires avant d'être dégradées<sup>291,292</sup>. Or, le protocole de préparations membranaires couramment utilisé permet d'isoler l'ensemble des membranes de la cellule, issu de tous les compartiments cellulaires. Il n'est donc pas surprenant que la population de protéines extraite et purifiée à partir de cet échantillon souffre d'une certaine hétérogénéité.

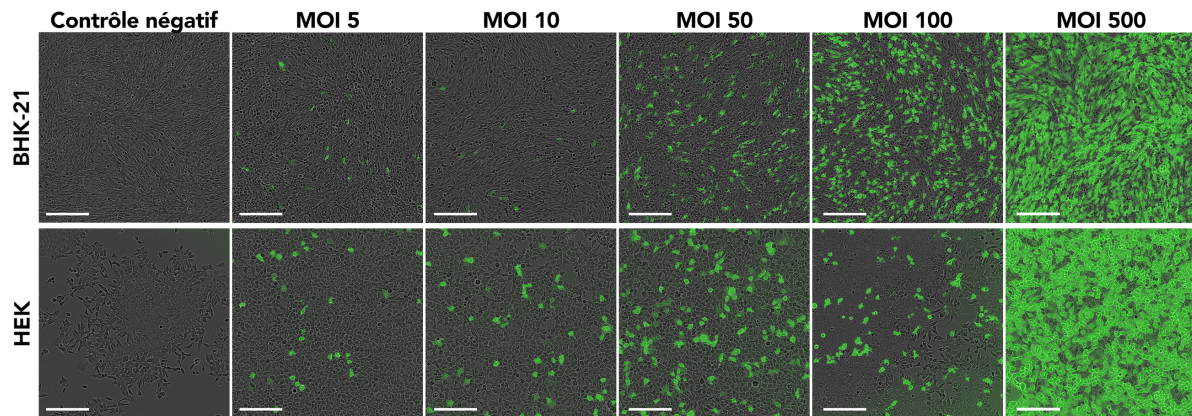
Pour limiter ces phénomènes, une méthode de purification alternative est mise au point au laboratoire. Celle-ci consiste à solubiliser les protéines directement à partir des cellules entières de levures, préalablement soumises à un traitement enzymatique destiné à dégrader la paroi cellulaire. Ce traitement est indispensable pour rendre la membrane plasmique accessible aux molécules de détergents. L'objectif de cette approche est d'extraire préférentiellement les protéines membranaires correctement repliées qui ont été adressées à la membrane plasmique. Cette stratégie permet à la fois de s'affranchir de l'étape de préparations membranaires, et d'augmenter l'homogénéité des protéines purifiées pour plusieurs cibles testées.

Le protocole développé a été décrit dans un chapitre de la série *Methods in Molecular Biology* et constitue la **Publication 2** en annexe de ce manuscrit (*page 205*).

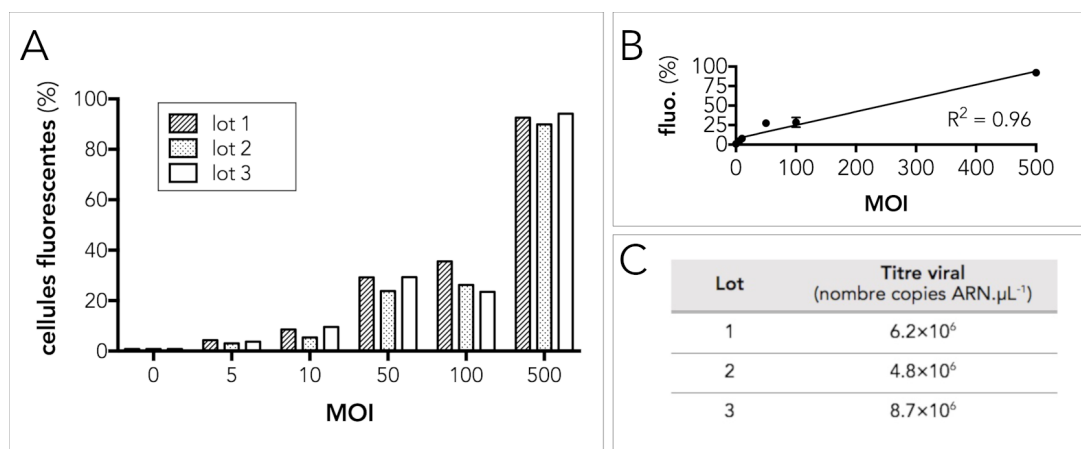
Les premiers essais ont été effectués sur les récepteurs AA<sub>2A</sub> et MT<sub>1</sub>. Cependant, pour ces cibles, le traitement enzymatique utilisé pour débarrasser les cellules de leur paroi conduit également à un clivage systématique et spécifique de l'extrémité carboxy-terminale des protéines d'intérêt, incompatible avec leur utilisation pour le criblage et la sélection d'anticorps. Les essais ont donc été interrompus et ne sont pas décrits plus en détails dans ce manuscrit. D'autres protéines membranaires ont cependant pu être purifiées grâce à cette procédure sans être clivées. L'approche est donc aujourd'hui utilisée en routine au laboratoire.

**Tableau 12 : Représentation schématique des construits des protéines d'intérêt clonés dans les vecteurs SFV destinés à la production de particules virales recombinantes.** HA-ss : séquence signal du gène de l'hémagglutinine du virus influenza ; FLAG : étiquette FLAG (séquence DYKDDDDK) ; TEV : site de clivage de la protéase TEV (séquence ENLYFQG, clivage entre les deux résidus soulignés) ; 10HIS : étiquette décahistidine ; BIOTAG : domaine de biotinylation. La taille de la protéine est indiquée dans la dernière colonne. Entre parenthèses est indiquée, pour information, la taille totale comprenant la séquence signal.

Nom	Protéine recombinante	Taille (kDa)
eGFP_SFV	N-ter — (1.6 kDa) HA-ss — FLAG — (26.4 kDa) eGFP — TEV — TEV — (8.8 kDa) 10HIS — BIOTAG — C-ter	40.0 (41.6)
AA <sub>2A</sub> _SFV2gC	N-ter — HA-ss — FLAG — TEV — AA <sub>2A</sub> — TEV — 10HIS — BIOTAG — C-ter	58.1 (59.7)
AA <sub>2A</sub> _SFV	N-ter — HA-ss — AA <sub>2A</sub> — C-ter	44.9 (46.5)
MT <sub>1</sub> _SFV	N-ter — HA-ss — MT <sub>1</sub> — C-ter	39.6 (41.2)



**Figure 36 : Observation de cellules HEK et BHK-21 infectées par des virus SFV-eGFP.** Cellules imagées dans un incubateur IncuCyte® 24 heures après infection. Quantité de virus utilisée pour l'infection exprimée en MOI. Échelle : 200 µm.



**Figure 37 : Infection de cellules HEK par trois lots de virus SFV-eGFP.** (A) Représentation du pourcentage de cellules fluorescentes, déterminé par cytométrie en flux 24 heures après infection, en fonction de la quantité de virus utilisée, exprimée en MOI. (B) Régression linéaire du pourcentage de cellules fluorescentes en fonction de la MOI. (C) Titres des lots de virus utilisés, déterminés par RT-qPCR.

## 4. Les particules virales SFV recombinantes

### 4.1. Mise en place du système avec une construction contrôle codant pour une protéine fluorescente

L'utilisation d'un vecteur viral outil codant pour l'eGFP permet de produire les premiers lots de virus et de suivre facilement l'expression protéique engendrée par l'infection, facilitant ainsi la prise en main de la technique.

La version de l'eGFP utilisée, représentée schématiquement dans le **Tableau 12**, est exprimée en fusion avec une étiquette FLAG (côté N-ter), une étiquette décahistidine et une séquence de biotinylation (côté C-ter).

Les virions recombinants produits, désignés par l'acronyme SFV-eGFP, sont utilisés pour infecter des cellules en culture. Des cellules BHK-21 d'une part et HEK d'autre part sont infectées avec une gamme de MOI, et observées au microscope à épifluorescence 24 heures après infection (**Figure 36**). Cette expérience confirme la capacité des virions synthétisés à induire la surexpression d'eGFP.

La part de cellules fluorescentes est quantifiée par cytométrie en flux, 24 heures après infection (**Annexe 2**). Le taux d'infection est corrélé linéairement avec la MOI (**Figure 37A et B**), et atteint 100 % pour une MOI d'environ 500.

Pour mettre à l'épreuve la robustesse du procédé, plusieurs lots de virus sont produits et caractérisés de manière indépendante. Les titres, déterminés par RT-qPCR, sont du même ordre de grandeur (**Figure 37C**). De plus, les taux d'infection obtenus pour chaque lot de virus sont similaires (**Figure 37B**).



## 4.2. Production de particules virales codant pour les récepteurs d'intérêt

Trois vecteurs SFV codant pour la version humaine des récepteurs cibles sont utilisés. Les constructions protéiques correspondantes sont décrites dans le **Tableau 12**.

Le vecteur codant pour la protéine AA<sub>2A</sub>\_SFV2gC est issu du projet MePNet<sup>194</sup> et comprend une étiquette FLAG en N-ter du récepteur ainsi qu'une étiquette décahistidine et une séquence de biotinylation en C-ter. Le récepteur est également flanqué de deux sites de clivage de la protéase TEV. La présence de la séquence signal HA à l'extrémité amino-terminale de la construction permet d'augmenter les rendements d'expression en améliorant l'adressage des protéines à la membrane plasmique.

Les récepteurs MT<sub>1</sub> et AA<sub>2A</sub> sont également clonés dans un vecteur SFV sous leur forme sauvage, sans aucune étiquette de fusion, uniquement précédés de la même séquence signal HA (protéines MT<sub>1</sub>\_SFV et AA<sub>2A</sub>\_SFV).

Un lot de virus est produit avec chaque vecteur, en quantité suffisante pour être titré, caractérisé *in cellulo*, puis utilisé lors des campagnes d'immunisation. Les virions recombinants sont respectivement désignés par les acronymes SFV-AA<sub>2A</sub>2gC, SFV-AA<sub>2A</sub> et SFV-MT<sub>1</sub> en fonction de la construction protéique qu'ils codent. Ces lots sont titrés par RT-qPCR (**Tableau 13**). Les concentrations obtenues pour les virions codant pour les récepteurs membranaires sont plus faibles que les lots SFV-eGFP préalablement caractérisés (**Figure 37C**). Cela peut s'expliquer par une éventuelle toxicité de la surexpression de protéines membranaires par rapport à une protéine soluble comme l'eGFP. En effet, lors du processus de production de virus, les cellules BHK-21 co-transfectées avec l'ARN recombinant et l'ARN auxiliaire synthétisent les particules virales, et présentent également un niveau d'expression important de la protéine d'intérêt.

La capacité d'infection des particules virales est testée sur des cellules HEK en culture. Celles-ci sont récoltées 24 heures après infection avec une MOI de 100, et l'expression des récepteurs membranaires est évaluée par des tests de saturation de radioligand (**Figure 38**).

Les membranes de cellules exprimant le récepteur AA<sub>2A</sub> présentent un nombre de sites de liaison qui s'élève à environ 20 picomoles par milligramme de protéines totales. A titre comparatif, celui-ci est d'environ 76 pmol.mg<sup>-1</sup> pour des préparations membranaires de levures *Pichia pastoris* recombinantes<sup>278</sup>, et de 0.5 pmol.mg<sup>-1</sup> pour une lignée de cellules CHO recombinante<sup>293</sup>. La constante d'affinité mesurée, de l'ordre du nanomolaire, est proche des données disponibles dans la littérature (de 0.46 nM<sup>278</sup> à 10.55 nM<sup>269</sup> chez *Pichia pastoris*, 1.62 nM pour des cellules CHO<sup>293</sup>). Le récepteur

Tableau 13 : Titres des lots de virus recombinants synthétisés utilisés pour les immunisations. Mesurés par RT-qPCR.

Virus	Titre viral (nombre copies ARN.μL <sup>-1</sup> )
SFV-AA <sub>2A</sub> 2gC	1.1×10 <sup>6</sup>
SFV-AA <sub>2A</sub>	1.0×10 <sup>6</sup>
SFV-MT <sub>1</sub>	4.2×10 <sup>5</sup>

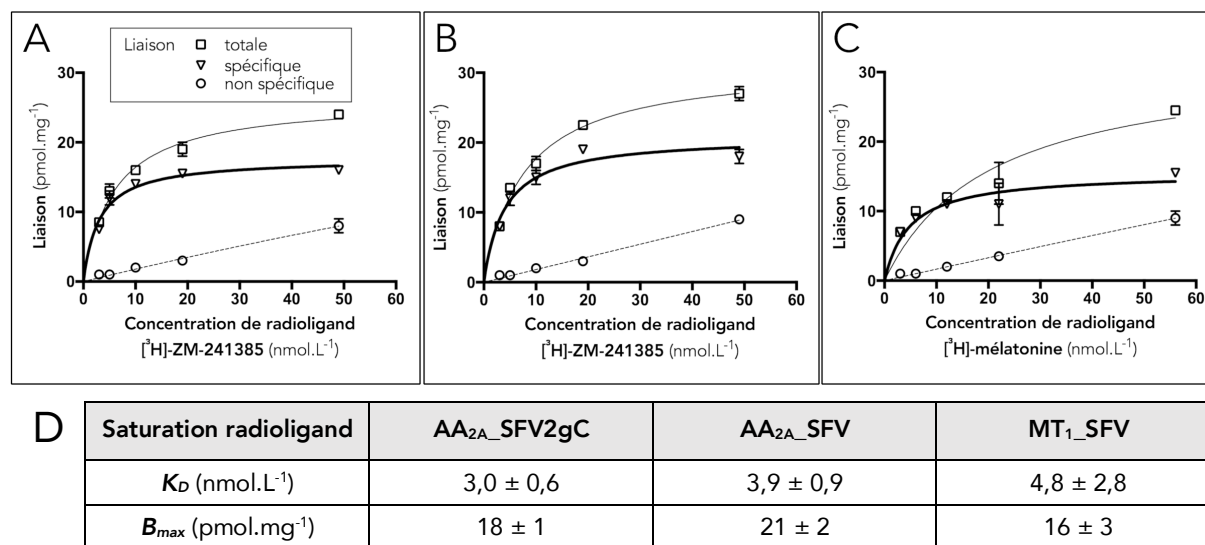


Figure 38 : Courbes de saturation de radioligand sur préparations membranaires de cellules HEK infectées par des virions (A) SFV-AA<sub>2A</sub>2gC, (B) SFV-AA<sub>2A</sub> et (C) SFV-MT<sub>1</sub>. Infection de cellules en culture avec une MOI de 100. Cellules récoltées et lysées 24 heures après infection. Mise en jeu de 10 μg de préparations membranaires par point. (D) Affinité ( $K_D$ ) nombre total de sites de liaison ( $B_{max}$ ) du radioligand. Données extraites des courbes de saturation.

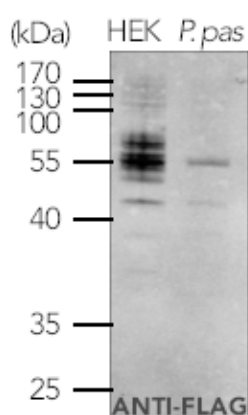


Figure 39 : Analyse Western Blot des préparations membranaires de cellules HEK infectées par des virus SFV-AA<sub>2A</sub>2gC. Immunodétection avec un anticorps primaire anti-FLAG. Migration d'environ 10 μg de protéines totales par piste. Contrôle positif (piste 2) : préparations membranaires de levures exprimant le récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2.

AA<sub>2A</sub>\_SFV2gC est également immunodéecté dans les membranes avec un anticorps anti-FLAG (**Figure 39**).

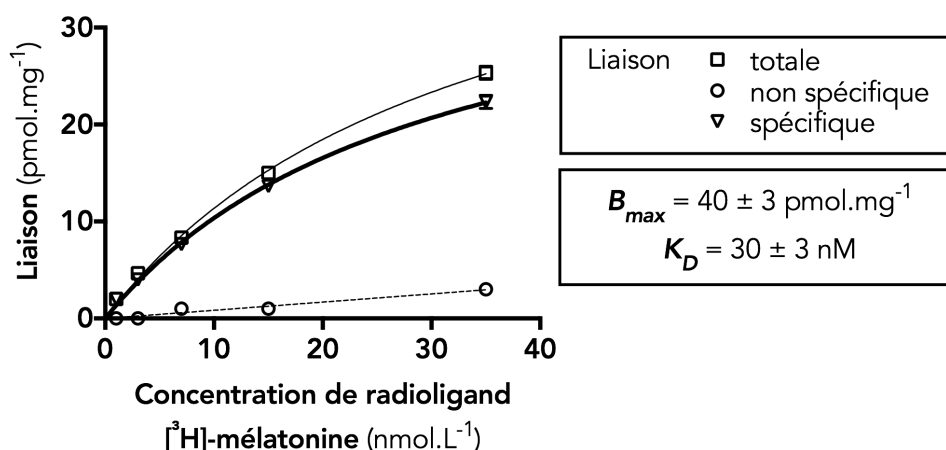
Les membranes de cellules HEK infectées par les virions SFV-MT<sub>1</sub> présentent un  $B_{max}$  de 16 pmol.mg<sup>-1</sup>, équivalent à celui obtenu pour des membranes de levures *Pichia pastoris* recombinantes<sup>270</sup>. Le  $K_D$  obtenu, de l'ordre de la dizaine de nanomolaire, est toutefois plus élevé que celui décrit dans des lignées de cellules mammifères recombinantes, pour lesquels il est plutôt subnanomolaire<sup>294</sup>.

Les lots de virus produits permettent donc bien d'induire la surexpression de récepteurs fonctionnels à la surface de cellules mammifères.

### 4.3. Stabilité des particules virales à -80°C

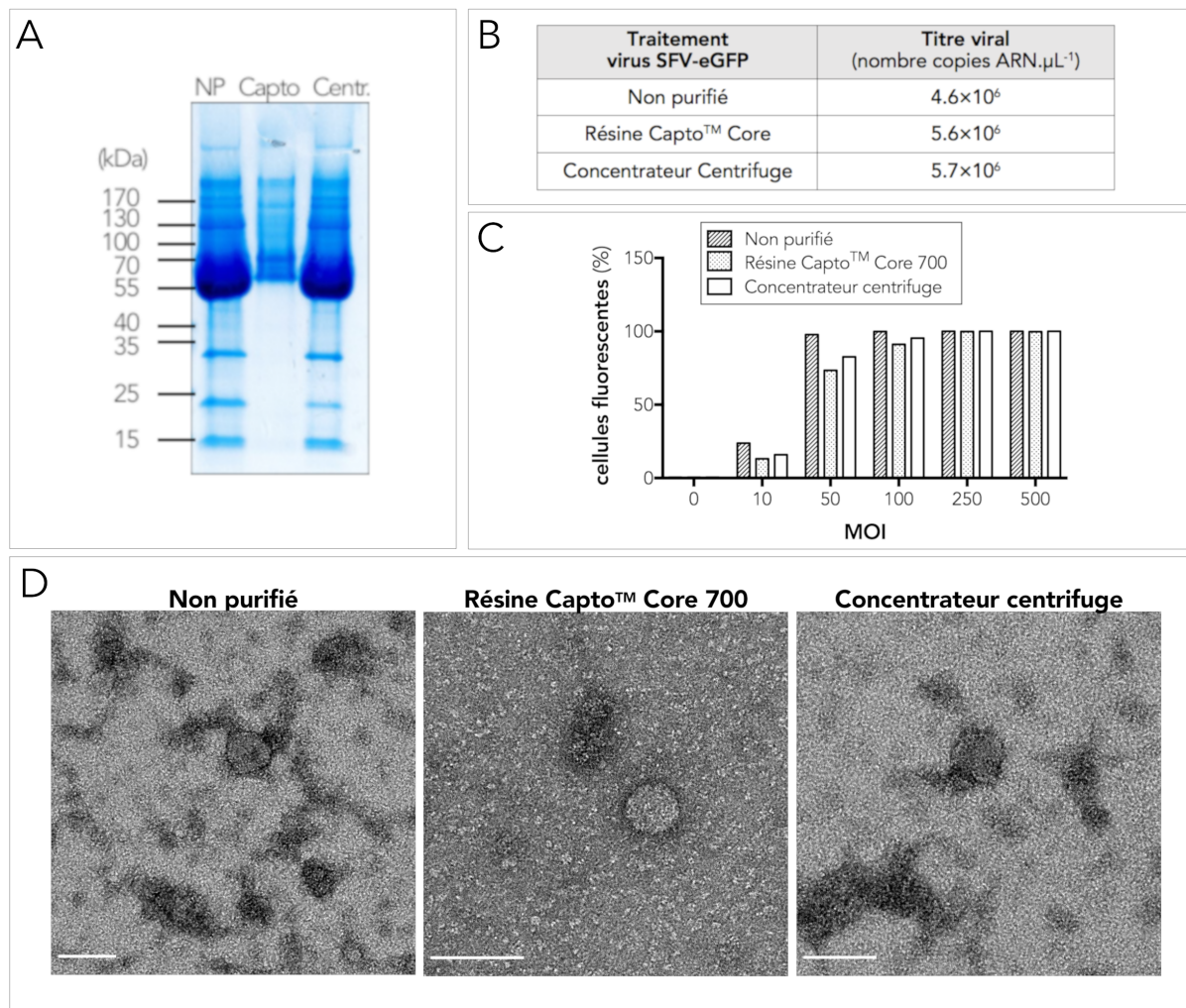
Vingt mois après leur synthèse, des virions SFV-MT<sub>1</sub>, stockés à -80°C, sont utilisés pour infecter des cellules HEK en culture avec une MOI de 100. Cette nouvelle infection permet d'engendrer la surexpression du récepteur dans la membrane des cellules à hauteur de 40 pmol de récepteur par milligramme de protéines membranaires totales. L'affinité du récepteur synthétisé pour la mélatonine est de 30 nmol.L<sup>-1</sup> (**Figure 40**).

Les particules virales recombinantes synthétisées sont donc hautement stables à -80°C dans les conditions de stockage mises en œuvre, et peuvent être utilisées à long terme pour les procédures d'immunisation sans crainte de dégradation.



**Figure 40** : Courbes de saturation de radioligand sur des préparations membranaires de cellules HEK infectées par des virions SFV-MT<sub>1</sub> stockés à -80°C pendant 20 mois. Infection de cellules en culture avec une MOI de 100. Cellules récoltées et lysées 24 heures après infection. Mise en jeu de 10 µg de préparations membranaires par point.





**Figure 41** : Analyse de virus SFV-eGFP purifié par un passage sur résine Capto™ Core 700 ou par des lavages sur un concentrateur centrifuge. **(A)** Analyse sur un gel coloré au bleu de Coomassie. Migration de 10 μL de virus. *NP* : non purifié. *Capto* : purification sur résine Capto™ Core 700. *Centr.* : concentrateur centrifuge. **(B)** Titration par RT-qPCR. **(C)** Infection de cellules HEK en culture. Cellules récoltées 24 heures après infection et fluorescence analysée par cytométrie en flux. **(D)** Image de microscopie électronique à transmission d'une coloration négative des virions. Analyse de 5 μL d'échantillon non dilué après coloration à l'acétate d'uranyle. Échelle : 100 nm.

#### 4.4. Purification des particules virales synthétisées

Les particules virales étant destinées à être injectées à des animaux, nous avons souhaité mettre au point une procédure de purification de celles-ci, afin d'éliminer les différents déchets et métabolites présents dans le milieu de culture et présentant une toxicité potentielle. Deux approches différentes sont comparées.

D'une part, sur la base d'un protocole décrit par Kenneth Lundstrom en 2012<sup>295</sup>, un aliquote de 1 mL de virus SFV-eGFP est soumis à trois rinçages successifs en tampon TNE, sur un concentrateur centrifuge ayant un seuil de coupure de 100 kDa. L'objectif est d'éliminer les contaminants d'une taille inférieure à ce seuil dans la fraction éluée, et de récupérer le virus purifié dans le rétentat.

D'autre part, un aliquote similaire est mis en contact avec de la résine d'inclusion Capto<sup>TM</sup> Core 700. Cette résine commerciale, spécialement conçue pour la purification de virus ou d'autres grosses biomolécules, a la capacité de retenir toutes les espèces d'une taille inférieure à sa porosité, qui est de 700 kDa. De plus, chaque bille possède un cœur constitué de ligands octylamines, hydrophobe et positivement chargé, qui permet d'améliorer l'élimination de petits contaminants grâce à une adsorption de haute affinité au cœur de la résine. La suspension virale est soumise à deux incubations successives de 45 minutes avec la résine préalablement équilibrée en tampon TNE, selon un ratio d'un volume de résine pour vingt volumes de virus.

Ces deux procédures n'ont d'impact significatif ni sur le titre viral mesuré par RT-qPCR (**Figure 41B**), ni sur la capacité d'infection du virus, comme le montrent les données de fluorescence de cellules HEK infectées par différentes concentrations virales (**Figure 41C**). Cependant, l'analyse des échantillons purifiés sur un gel d'acrylamide dénaturant coloré au bleu de Coomassie (**Figure 41A**) et par microscopie électronique (**Figure 41D**) montre clairement que, dans les conditions testées, la résine d'inclusion est plus efficace pour éliminer des contaminants et décomplexer l'échantillon.

Ce protocole de purification avec la résine d'inclusion Capto<sup>TM</sup> Core 700 est donc conservé et mis en œuvre pour les lots de virus destinés à l'immunisation d'animaux.

## 5. Discussion des résultats

### 5.1. Récepteurs purifiés et nanodisques lipidiques

#### 5.1.1. Le récepteur de l'adénosine A<sub>2A</sub>

L'utilisation du système d'expression *Pichia pastoris* permet d'obtenir aisément une quantité satisfaisante (plusieurs centaines de microgrammes) de récepteur AA<sub>2A</sub> purifié en DDM, pour les deux constructions testées. Dans les deux cas, la levure synthétise un variant d'expression clivé du côté carboxy-terminal, qui est co-purifié avec la forme complète. Une caractérisation pharmacologique fine des deux versions, précédemment conduite au laboratoire<sup>269</sup>, indique que la troncature n'altère pas la capacité du récepteur à lier ses ligands. Par la suite, le récepteur purifié peut être reconstitué en nanodisques lipidiques avec un rendement satisfaisant.

Le nombre de sites de liaison présent dans les deux types d'échantillon, estimé au moyen de courbes de saturation, peut atteindre respectivement 7600 (nanodisques) et 9200 (DDM) picomoles par milligramme de récepteur. La masse molaire du récepteur étant de 48,700 g.mol<sup>-1</sup>, le  $B_{max}$  théorique d'un échantillon composé à 100 % de récepteurs capables de fixer un ligand s'élève à 20,500 pmol.mg<sup>-1</sup>. Les échantillons purifiés contiendraient donc au maximum 37 % (nanodisques) et 45 % (DDM) de protéines actives.

Par ailleurs, la fonctionnalité de nanodisques préparés selon la même procédure a été testée avec d'autres approches, notamment en chromatographie de faible affinité miniaturisée ou nanoWAC (**Publication 3, page 207**), et par SPR au laboratoire (données non publiées). Ces deux stratégies mettent en évidence que plus de 90 % des récepteurs présents dans l'échantillon sont capables de fixer un ligand.

Il est donc important de souligner que les résultats obtenus lors des tests de liaison de radioligand correspondent toujours à une estimation *a minima*. En effet, le protocole expérimental comprend une phase de précipitation puis de filtration des protéines. En dépit des précautions expérimentales prises pour limiter le déplacement de l'équilibre réactionnel, ce dernier ne peut pas être garanti, et la probabilité de la perte d'une partie de l'échantillon à travers le filtre n'est pas négligeable.

Enfin, le test SPA mené permet de mettre en évidence que le récepteur en nanodisques, *a fortiori* lorsqu'il est fixé sur des billes, est stable plus longtemps que son homologue en détergents. Des résultats similaires ont été obtenus pour le récepteur opioïdérique  $\kappa$ <sup>86</sup>. Les tests ELISA et les étapes de criblage par phage display, nécessaires à la détection et à la sélection d'anticorps spécifiques, impliquent plusieurs heures d'incubation à température ambiante. La robustesse des nanodisques constitue donc un avantage indéniable à leur utilisation dans ces cas de figure.

Les approches mises au point permettent donc de disposer de matériel hautement qualitatif pour la détection et le criblage des anticorps générés.

### 5.1.2. Le récepteur de la mélatonine MT<sub>1</sub>

Le récepteur MT<sub>1</sub> peut également être obtenu sous forme purifiée. Toutefois, malgré les optimisations intentées, les rendements obtenus pour la reconstitution du récepteur en nanodisques lipidiques demeurent faibles, et sont réhivitoires à leur utilisation dans des tests ELISA répétés par exemple. D'autre part, la caractérisation pharmacologique de ces objets permet d'estimer le nombre de sites de liaison à 400 à 500 picomoles par milligramme de récepteur. La masse molaire du récepteur étant de 52,800 g.mol<sup>-1</sup>, le  $B_{max}$  théorique d'un échantillon contenant 100 % de récepteurs actifs s'élève à 37,880 pmol.mg<sup>-1</sup>. Dans les conditions expérimentales décrites, seul 1 % de la population de récepteurs purifiée conserve son activité de fixation de la mélatonine.

Là encore, il faut garder à l'esprit que le test de liaison de radioligand mis en œuvre constitue une appréciation *a minima* du nombre de sites de liaison. Il serait intéressant de caractériser ces objets en utilisant la technique de nanoWAC, peu consommatrice en échantillon, afin d'avoir des données comparatives. Cette technique pourrait également permettre de tester plusieurs ligands différents.

À la lumière des données de fonctionnalité collectées, il apparaît que la reconstitution du récepteur en nanodisques ne permet pas d'augmenter la proportion de récepteur actif, et tend à diminuer l'affinité de celui-ci pour la mélatonine. La nature des lipides environnants étant d'une grande importance pour la fonctionnalité de nombreux RCPG<sup>69</sup>, la modification de la constitution de la bicouche phospholipidique pourrait permettre d'améliorer la conformation du récepteur. Il a notamment été démontré que la mélatonine interagissait directement avec le cholestérol<sup>296</sup>, et que la présence ou l'absence de ce lipide pouvait être à l'origine de différences d'affinité du récepteur pour plusieurs ligands<sup>270</sup>.

## 5.2. Les particules virales

Le système de production de particules virales SFV mis en place est robuste et reproductible pour les trois constructions virales testées. Les particules virales recombinantes peuvent être conservées jusqu'à 20 mois à -80°C sans observer de décroissance significative de leur capacité d'infection.

D'autre part, elles sont capables d'induire une forte surexpression des récepteurs recombinants sur une culture de cellules mammifères infectées. Les tests de liaison de radioligand indiquent la présence de récepteurs fonctionnels à la membrane plasmique. Le nombre de site de liaison observé est similaire à celui des membranes *Pichia pastoris*

recombinantes, et 10 à 20 fois supérieur à celui traditionnellement obtenu pour des lignées de cellules mammifères<sup>293,294</sup>.

Nous pouvons cependant noter que le récepteur MT<sub>1</sub> synthétisé présente une affinité réduite pour la mélatonine en comparaison aux valeurs retrouvées dans la littérature<sup>294</sup>.

La surexpression de protéines membranaires à l'aide d'un promoteur fort conduit à leur accumulation dans le réticulum endoplasmique, et engendre un stress cellulaire. Celui-ci induit notamment la réponse UPR (*Unfolded Protein Response*), et entraîne l'agrégation des protéines<sup>297</sup>. D'autre part, la saturation des machineries cellulaires est fortement susceptible de conduire à l'expression de récepteurs mal repliés<sup>298</sup>. Plusieurs études ayant pour objet l'expression de protéines membranaires à l'aide du système SFV mettent d'ailleurs en évidence que seule une faible proportion des protéines exprimée est correctement repliée et fonctionnelle<sup>299</sup>. Ces éléments pourraient expliquer la baisse de l'affinité observée vis-à-vis du récepteur MT<sub>1</sub>.

Nous ne pouvons pas exclure qu'un tel phénomène puisse également se produire chez l'animal immunisé, ce qui pourrait impacter la réponse immunitaire engendrée ainsi que la spécificité des anticorps synthétisés par son système immunitaire.





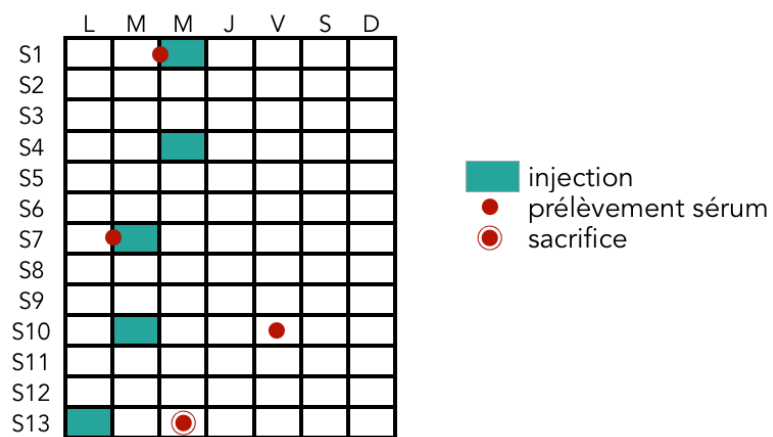
## CHAPITRE 2

### Anticorps polyclonaux de souris

*Se réunir est un début ; rester ensemble est un progrès ;  
travailler ensemble est la réussite.*

*Henry Ford*





**Figure 42 : Répartition des injections et prélèvements pour la campagne d'immunisation de souris avec des virus recombinants SFV-AA<sub>2A</sub>2gC.** 5 injections et 4 prélèvements répartis sur une durée totale de 13 semaines (S1 à S13). En S1 et S7, les prélèvements sont réalisés antérieurement à l'injection. Injections 1 à 3 : 10<sup>7</sup> particules virales. Injections 4 et 5 : 10<sup>6</sup> particules virales. L, M, M... à D : jours de la semaine

## 1. Preuve de concept : utilisation d'une construction contrôle

La version AA<sub>2A</sub>\_SFV2gC du récepteur AA<sub>2A</sub>, codée par les particules virales recombinantes du même nom, est fusionnée à plusieurs étiquettes d'affinité. Celles-ci ont le double avantage de stimuler la réponse immunitaire et de faciliter la détection du récepteur exprimé dans les cellules cibles. Ces virions sont donc utilisés lors d'une première campagne d'immunisation dans le but de valider l'approche et de comparer plusieurs procédures.

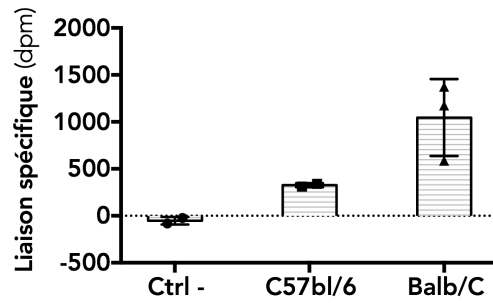
### 1.1. Les protocoles d'immunisation mis en œuvre

Sur la base de l'analyse bibliographique de plusieurs études mettant en œuvre le système SFV dans le cadre d'approches vaccinales<sup>300-306</sup>, différentes conditions expérimentales sont sélectionnées pour être comparées.

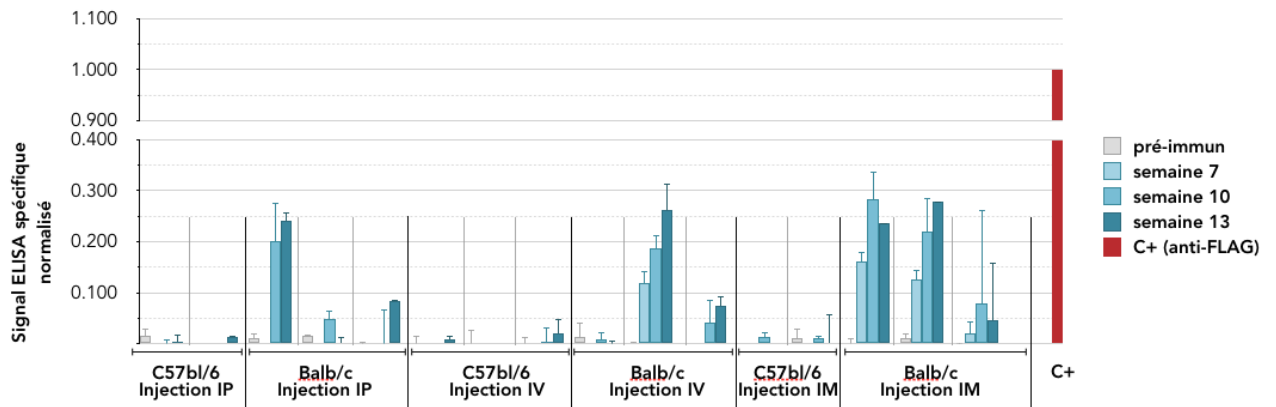
Des souris Balb/c âgées de sept semaines et des souris C57/Bl6 âgées de neuf semaines, des femelles dans les deux cas, sont inoculées avec des virus SFV-AA<sub>2A</sub>2gC préalablement activés *in vitro*. Trois voies d'injection sont testées pour chaque fond génétique : intraveineuse, intramusculaire et intrapéritonéale. Le traitement est appliqué à trois animaux par condition.

Plusieurs injections sont réalisées, réparties régulièrement sur une durée de 13 semaines (**Figure 42**). 10<sup>7</sup> particules virales activées sont administrées lors des trois premières injections. Deux souris sont décédées 48 heures après la troisième injection : toutes deux de fond génétique C57/bl6, l'une a été traitée par voie intrapéritonéale, l'autre par voie intramusculaire. Par crainte d'une réaction due à l'injection d'une trop grande quantité de virus, la dose est diminuée à 10<sup>6</sup> particules virales pour les deux injections suivantes.

La procédure est accompagnée de plusieurs prélèvements sanguins. Un prélèvement initial, avant la première injection, sert de contrôle pré-immun. Les deux prélèvements suivants, respectivement avant la troisième injection et le troisième jour après la quatrième injection, permettent de suivre l'évolution de la réponse immunitaire dirigée contre le récepteur au moyen de tests ELISA. L'euthanasie des animaux est réalisée le 2<sup>ème</sup> jour après la dernière injection et s'accompagne d'un prélèvement sanguin total (environ 1 mL de sang). Pour les six souris traitées par voie intramusculaire, une dissection du fragment musculaire ayant reçu l'injection est également réalisée. Le muscle d'une souris de chaque fond génétique traitée par voie intraveineuse est prélevé en guise de contrôle négatif.



**Figure 43** : Détection de la surexpression du récepteur  $AA_{2A}$  dans le muscle des souris traitées par voie intramusculaire par test de liaison de radioligand. (n = 2). Mise en jeu de 100  $\mu$ g d'homogénat de muscle et de 10 nM de  $[^3H]$ -ZM-241385. Contrôle négatif (Ctrl -) : deux souris traitées par voie intraveineuse. Les barres de l'histogramme représentent la moyenne des trois souris du même groupe, chaque souris étant figurée par un point individuel.



**Figure 44** : Détection d'anticorps spécifiques au récepteur  $AA_{2A}$  dans le sérum des souris inoculées avec du virus SFV- $AA_{2A}2gC$  tout au long de la procédure d'immunisation par un test ELISA. Antigène : 0.8 pmol de nanodisques  $AA_{2A}$ \_MP3 biotinylés par puits, adsorbés via une liaison streptavidine-biotine. Sera dilués au 1000<sup>ème</sup> en PBS. Soustraction du bruit de fond correspondant au signal sur des nanodisques vides biotinylés. Normalisation des résultats par rapport au contrôle positif : détection des nanodisques avec un anticorps anti-FLAG.

## 1.2. Détection locale de la surexpression du récepteur

La stratégie d'immunisation déployée se base sur le postulat que les particules virales SFV recombinantes injectées à l'animal sont capables d'engendrer la surexpression du récepteur par les cellules infectées. L'investigation de cette surexpression a pour but de valider cette hypothèse.

Un homogénat des fragments musculaires récoltés est réalisé et mis en jeu lors d'un test de liaison de radioligand spécifique au récepteur AA<sub>2A</sub> (**Figure 43**). Ce test met en évidence la liaison spécifique du radioligand dans les muscles des souris traitées par voie intramusculaire par rapport à celles traitées par voie intraveineuse, et ce pour les deux fonds génétiques. Ces résultats indiquent que l'administration de virus SFV-AA<sub>2A</sub>2gC conduit bien à une infection locale des cellules qui se traduit par la surexpression du récepteur d'intérêt. On observe néanmoins une meilleure réponse chez les souris Balb/c.

Cet élément constitue la première preuve tangible du bien-fondé de l'approche mise en œuvre.

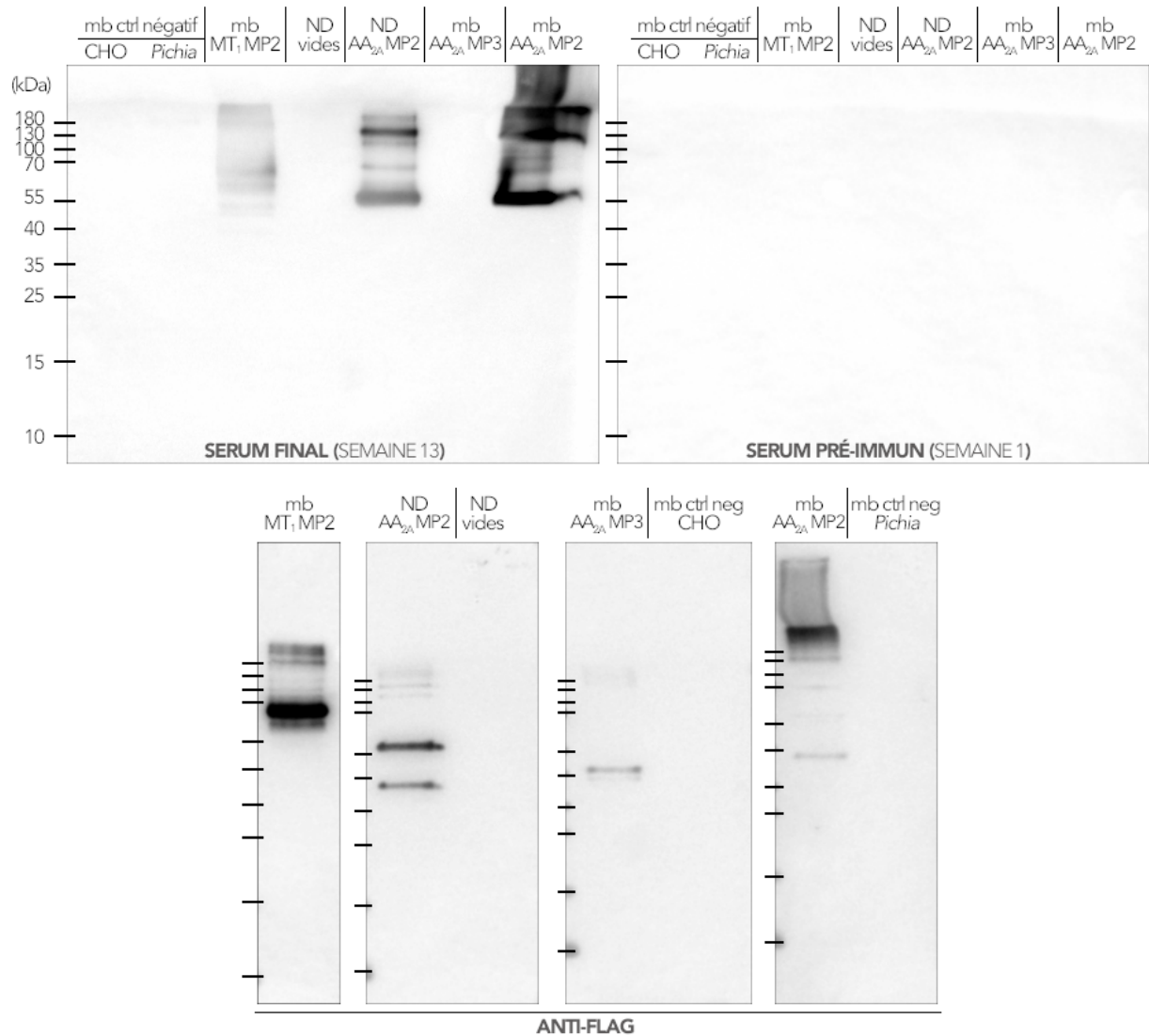
## 1.3. Caractérisation des échantillons sériques

L'évolution de la réponse immunitaire humorale spécifique au récepteur AA<sub>2A</sub> au long du protocole d'immunisation est suivie par test ELISA (**Figure 44**). Les différents prélèvements sériques sont mis au contact d'une quantité saturante de nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 biotinylés (**Annexe 3**), immobilisés au fond d'une plaque 96-puits recouverte de streptavidine. La réponse non spécifique, mesurée dans des puits contenant des nanodisques vides biotinylés, est soustraite de la réponse totale afin de donner le signal ELISA relatif spécifique au récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP3.

Ce test met en évidence l'apparition d'anticorps spécifiques chez plusieurs individus, notamment une des souris Balb/c traitée par voie intrapéritonéale, une des souris Balb/c traitée par voie intraveineuse et deux des souris Balb/c traitées par voie intramusculaire. Le fond génétique Balb/c semble donc plus adapté à l'approche envisagée, constat renforcé par le décès de deux souris C57/bl6 au cours de la procédure. D'autre part, l'injection par voie intramusculaire est celle qui présente le taux de réussite le plus important chez ces souris.

Compte tenu de ces résultats, la campagne d'immunisation mettant en jeu la version sauvage des récepteurs est par la suite réalisée sur des souris Balb/c, avec une administration intramusculaire du virus.

Ces résultats mettent également en exergue l'existence d'une importante variabilité inter-individuelle, et ce quel que soit le protocole considéré.



**Figure 45 : Caractérisation de l'immunoréactivité du sérum polyclonal par Western Blot.** Sérum polyclonal d'une souris inoculée avec du virus SFV-AA<sub>2A</sub>2gC par voie intramusculaire. Dilution 1/1000. Dépôt de 10 µg de préparations membranaires (échantillons « mb »), 40 pmol de nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP2 (ND AA<sub>2A</sub>\_MP2) ou 20 pmol de nanodisques vides (ND vides). CHO : membranes de cellules CHO exprimant le récepteur NPFFR1 (un RCPG totalement étranger à l'étude). *Pichia* : membranes de levures *P. pastoris* SMD1163 non transformées.

Lors des campagnes suivantes, le nombre d'animaux par cohorte est donc augmenté à cinq pour maximiser les chances de d'obtenir des anticorps polyclonaux spécifiques.

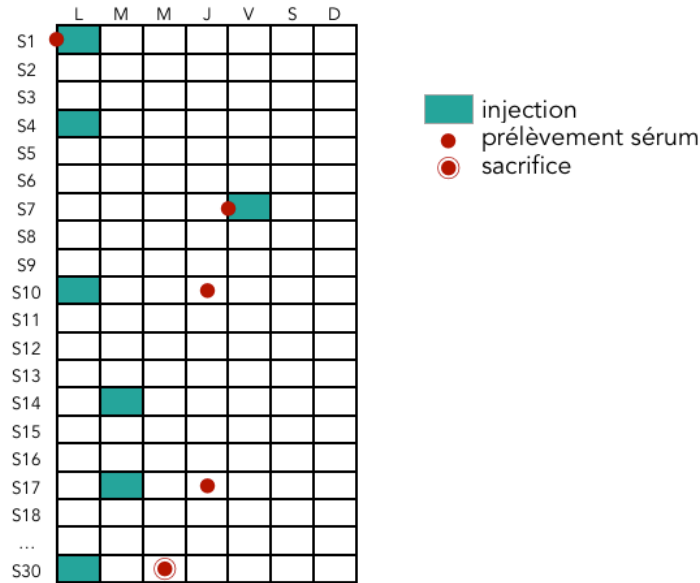
#### 1.4. Étude de la spécificité des anticorps générés par Western Blot

L'immunoréactivité des sera des trois souris Balb/c traitées par voie intramusculaire est caractérisée par Western Blot. Ce test s'avère négatif pour deux individus sur trois (données non illustrées). Les résultats des échantillons sériques provenant de la troisième souris du groupe sont présentés dans la **Figure 45**.

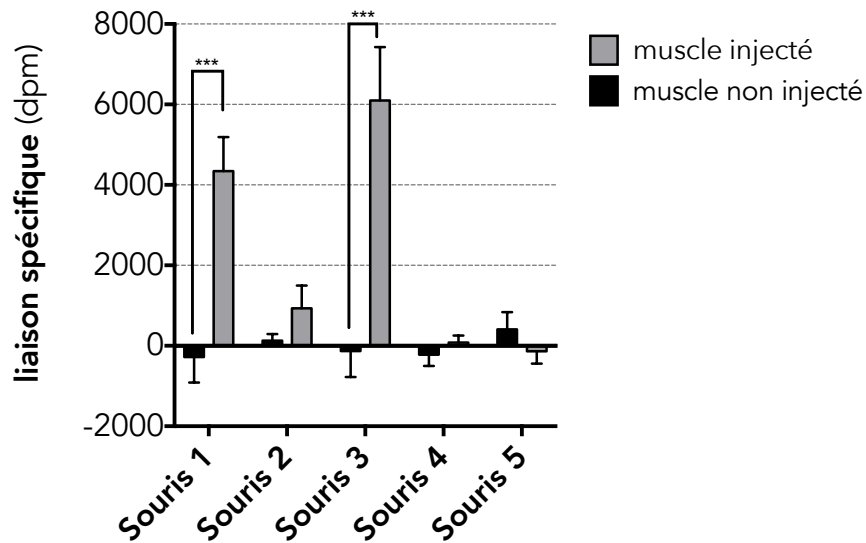
Après immunisation, le sérum présente une immunoréactivité contre des préparations membranaires surexprimant le récepteur MT<sub>1</sub>\_MP2. Le sérum contient également des anticorps dirigés contre la version AA<sub>2A</sub>\_MP2 du récepteur, sous forme de préparations membranaires ou reconstitué en nanodisques lipidiques. Il n'est cependant pas immunoréactif contre la version AA<sub>2A</sub>\_MP3 du récepteur. Aucun signal non spécifique n'est détecté dans les pistes des préparations membranaires contrôle ou des nanodisques vides.

Les protéines AA<sub>2A</sub>\_MP2 et MT<sub>1</sub>\_MP2 présentent toutes deux une séquence de biotinylation du côté C-terminal, absente de la construction AA<sub>2A</sub>\_MP3. Celle-ci est également présente chez le récepteur AA<sub>2A</sub>\_SFV2gC codé par les virions utilisés pour l'immunisation. Ces résultats indiquent donc qu'une fraction des anticorps générés chez l'animal sont dirigés contre la séquence de biotinylation, et ne sont pas spécifiques du récepteur. Cependant, les tests ELISA réalisés précédemment mettent en jeu le récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP3 sous forme de nanodisques, qui est lui exempt de séquence de biotinylation. Les anticorps du sérum à l'origine du signal observé en Western Blot ne sont donc pas ceux qui génèrent une réponse dans le test ELISA.

Cette expérience souligne l'importance d'utiliser des virus codant pour la version sauvage des récepteurs afin de limiter la génération d'anticorps non spécifiques due à la présence d'étiquettes de fusion hautement immunogènes.



**Figure 46 : Répartition des injections et prélèvements pour la campagne d'immunisation de souris avec des virus recombinants SFV-AA<sub>2A</sub> et SFV-MT<sub>1</sub>.** 7 injections et 5 prélèvements répartis sur une durée totale de 30 semaines (S1 à S30). En S1 et S7, les prélèvements sont réalisés antérieurement à l'injection. Injections 1 à 3 : 10<sup>7</sup> particules virales. Injections 4 à 7 : 10<sup>6</sup> particules virales. L, M, M... à D : jours de la semaine



**Figure 47 : Détection de la surexpression du récepteur AA<sub>2A</sub> dans le muscle des souris traitées par voie intramusculaire par test de liaison de radioligand.** Mise en jeu de 100 µg d'homogénat de muscle et de 12 nM de [<sup>3</sup>H]-ZM-241385. Analyse statistique : analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs. \*\*\* : p < 0.001

## 2. Génération d'anticorps polyclonaux de souris dirigés contre les récepteurs d'intérêt

### 2.1. Procédure d'immunisation

La seconde campagne d'immunisation menée met en jeu les virus recombinants SFV-AA<sub>2A</sub> et SFV-MT<sub>1</sub>.

Chaque virus est administré à une cohorte de cinq souris Balb/c femelles âgées de sept semaines. Le virus, préalablement activé *in vitro*, est injecté par voie intramusculaire.

La **Figure 46** détaille la répartition chronologique des sept injections réalisées, sur une durée de 30 semaines. Lors des trois premières injections, 10<sup>7</sup> particules virales activées sont administrées. La dose est diminuée à 10<sup>6</sup> particules virales activées pour les quatre injections suivantes.

Plusieurs prélèvements sanguins sont réalisés tout au long de la procédure, afin de suivre l'évolution de la réponse immunitaire. Le premier prélèvement, ou prélèvement pré-immun, est effectué avant la première injection et sert de contrôle. Les trois prélèvements suivants ont lieu respectivement juste avant la troisième injection, 72 heures après la quatrième injection et 48 heures après la sixième injection. La dernière injection a lieu 13 semaines après la sixième. Nous avons souhaité, avec ce temps de repos, permettre une meilleure maturation de la réponse immunitaire, et ainsi maximiser les chances d'obtenir des anticorps de haute affinité<sup>307</sup>.

L'euthanasie des animaux est réalisée le deuxième jour après la dernière injection et s'accompagne d'un prélèvement sanguin total, ainsi que de la dissection du tissu musculaire de la patte injectée et de la patte non injectée pour chaque souris.

Les résultats se rapportant aux deux cohortes de souris sont détaillés séparément dans les deux parties suivantes.

### 2.2. Campagne d'immunisation ciblée contre le récepteur AA<sub>2A</sub>

#### 2.2.1. Détection locale de la surexpression du récepteur

La surexpression du récepteur AA<sub>2A</sub> induite par l'infection virale est évaluée au moyen d'un test de liaison de radioligand mettant en jeu un homogénat des fragments musculaires prélevés. Les résultats, présentés en **Figure 47**, mettent en évidence une nette surexpression du récepteur dans le muscle injecté par rapport au muscle contrôle, chez deux des souris de la cohorte (la souris 1 et la souris 3).



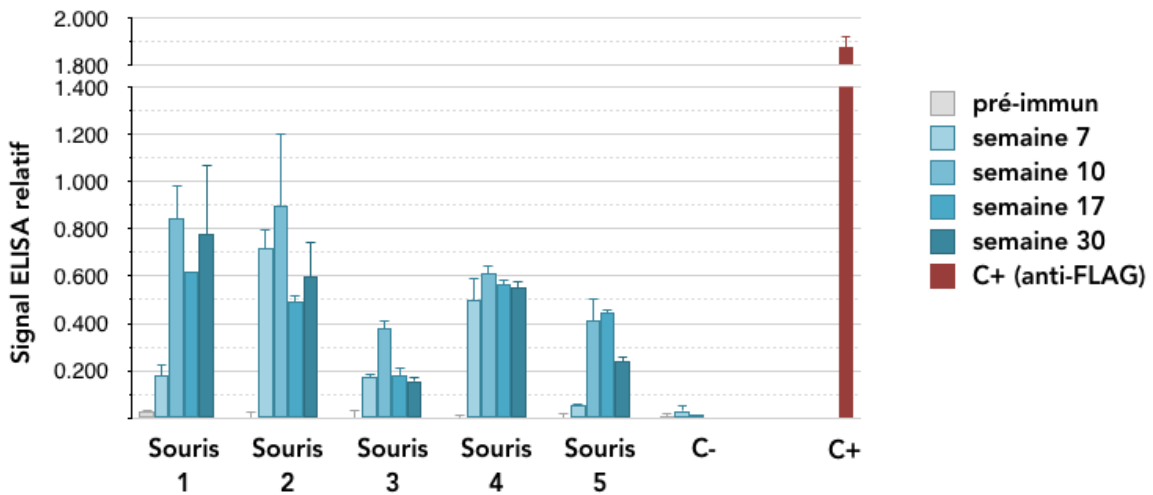


Figure 48 : Détection d'anticorps spécifiques au récepteur AA<sub>2A</sub> dans le sérum des souris inoculées avec du virus SFV-AA<sub>2A</sub> tout au long de la procédure d'immunisation par un test ELISA. Antigène : 0.8 pmol de nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 biotinylés par puits, adsorbés via une liaison streptavidine-biotine. Sera dilués au 1000<sup>ème</sup> en PBS. Soustraction du bruit de fond correspondant au signal sur des nanodisques vides biotinylés. C- : souris A immunisée avec du virus SFV-MT<sub>1</sub>. C+ : détection des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 avec un anticorps anti-FLAG

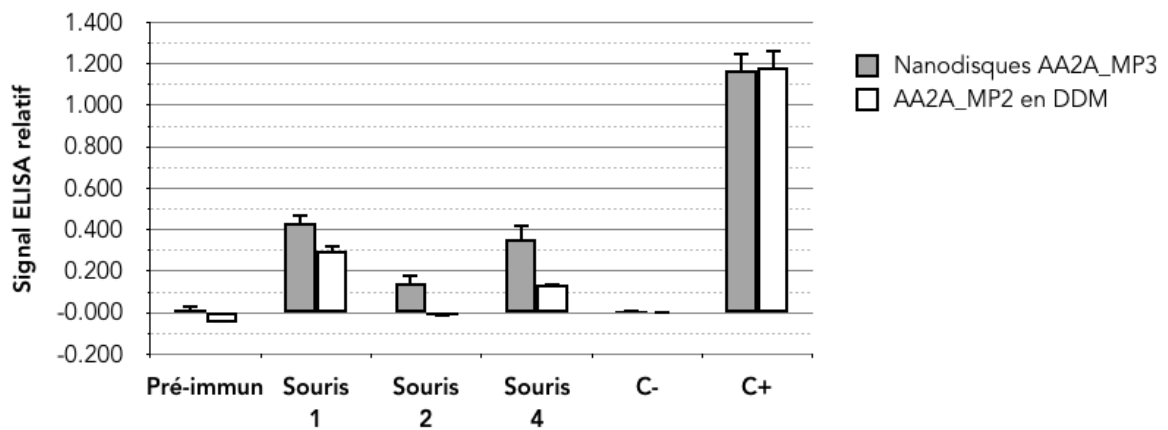


Figure 49 : Détection d'anticorps spécifiques au récepteur AA<sub>2A</sub> dans le sérum des souris inoculées avec du virus SFV-AA<sub>2A</sub> par un test ELISA sur billes magnétiques. Antigène : 25 pmol de nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 biotinylés ou de récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 purifié en DDM adsorbés sur 40 µL de billes magnétiques streptavidine. Pré-immun : prélèvement pré-immun de la souris 1. Souris 1, 2 et 4 : sera finaux (semaine 30). Sera dilués au 500<sup>ème</sup>. Soustraction du bruit de fond correspondant au signal sur des nanodisques vides biotinylés ou sur des billes sans antigène. C- : sérum final de la souris A immunisée avec du virus SFV-MT<sub>1</sub>. C+ : détection du récepteur AA<sub>2A</sub> avec un anticorps anti-FLAG (dilution 1/1000).

La souris 2 présente une tendance similaire, qui n'est toutefois pas assez marquée pour être statistiquement significative. Aucune surexpression n'est détectée au moyen de ce test chez les souris 4 et 5.

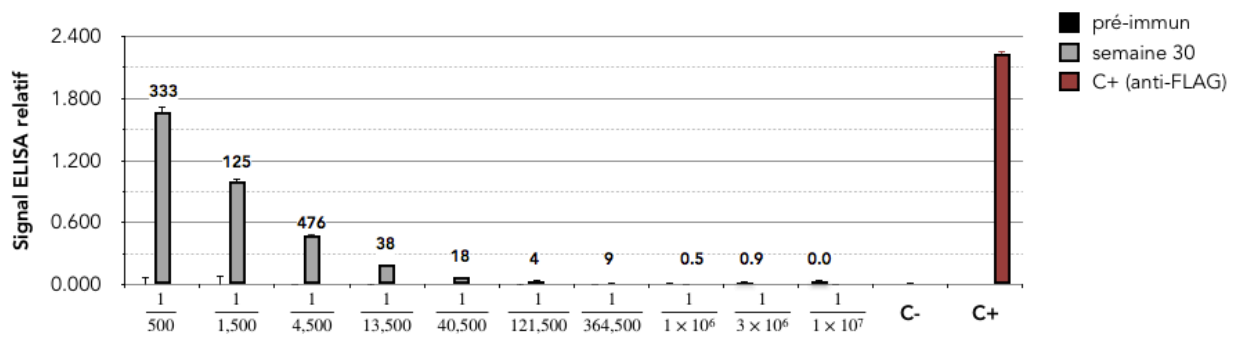
Conformément à nos attentes, l'administration de particules virales SFV recombinantes induit la surexpression du récepteur d'intérêt au niveau local, autour du site d'injection. Cependant, ces résultats mettent également en évidence l'existence d'une forte variabilité inter-individuelle quant à la réponse des animaux.

### 2.2.2. Caractérisation des échantillons sériques

Les anticorps capables de reconnaître le récepteur AA<sub>2A</sub> sous sa forme native sont détectés avec un test ELISA.

Dans un premier format, tous les échantillons sériques sont incubés avec des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 biotinylés immobilisés sur une plaque 96-puits préalablement recouverte de streptavidine. Le signal non spécifique, déterminé avec des nanodisques vides biotinylés, est soustrait des résultats bruts afin de donner le signal relatif présenté dans la **Figure 48**. Les résultats indiquent que toutes les souris immunisées développent une réponse immunitaire humorale spécifique au récepteur. Cela est confirmé par l'absence de signal dans le contrôle négatif, pour lequel les échantillons sériques d'une souris immunisée avec des virions SFV-MT<sub>1</sub> sont analysés. On peut noter que l'intensité de la réponse varie d'une souris à l'autre, le signal le plus important étant observé chez les souris 1, 2 et 4. De plus, pour tous les individus, le signal atteint un plateau dès le prélèvement de la semaine 10, après la quatrième injection de virus (**Figure 46**). Pour ce récepteur, la prolongation du protocole d'immunisation ne semble pas augmenter la quantité d'anticorps spécifiques présente dans le sérum des animaux.

Dans le but de valider ces résultats, un second format de test ELISA est mis en œuvre (**Figure 49**). Des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 et du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 purifié en DDM sont immobilisés sur des billes magnétiques streptavidine. Les sera finaux des souris 1, 2 et 4 sont incubés avec ces antigènes. Le signal relatif représenté correspond aux résultats bruts desquels est retranché le signal non spécifique, déterminé respectivement avec des nanodisques vides biotinylés ou avec des billes seules. Le sérum pré-immun de la souris 1 ainsi que le sérum final d'une souris immunisée par le virus SFV-MT<sub>1</sub> sont utilisés comme contrôles négatifs. La détection du récepteur immobilisé au moyen d'un anticorps anti-FLAG conduit à l'obtention d'un signal similaire pour les deux types d'antigènes. La réponse obtenue sur les nanodisques est positive pour les trois souris testées. L'utilisation de récepteur purifié en détergents ne permet de détecter une réponse que pour les souris 1 et 4, celle-ci étant systématiquement plus faible que pour les nanodisques. Ces résultats soulignent le fait que la conformation du



**Figure 50 : Titration du sérum final (prélevé à la semaine 30) de la souris 1 par test ELISA.** Antigène : 0.8 pmol de nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 biotinylés par puits, adsorbés via une liaison streptavidine-biotine. Gamme de dilutions des échantillons sériques en PBS. Soustraction du bruit de fond correspondant au signal sur des nanodisques vides biotinylés. C- : contrôle en absence d'antigène. C+ : détection des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 avec un anticorps anti-FLAG. Étiquette des données : ratio signal semaine 30 *vs* pré-immun. Le titre correspond à la dernière dilution pour laquelle ce ratio est supérieur à 2 (ici  $\frac{1}{364,500}$ ).

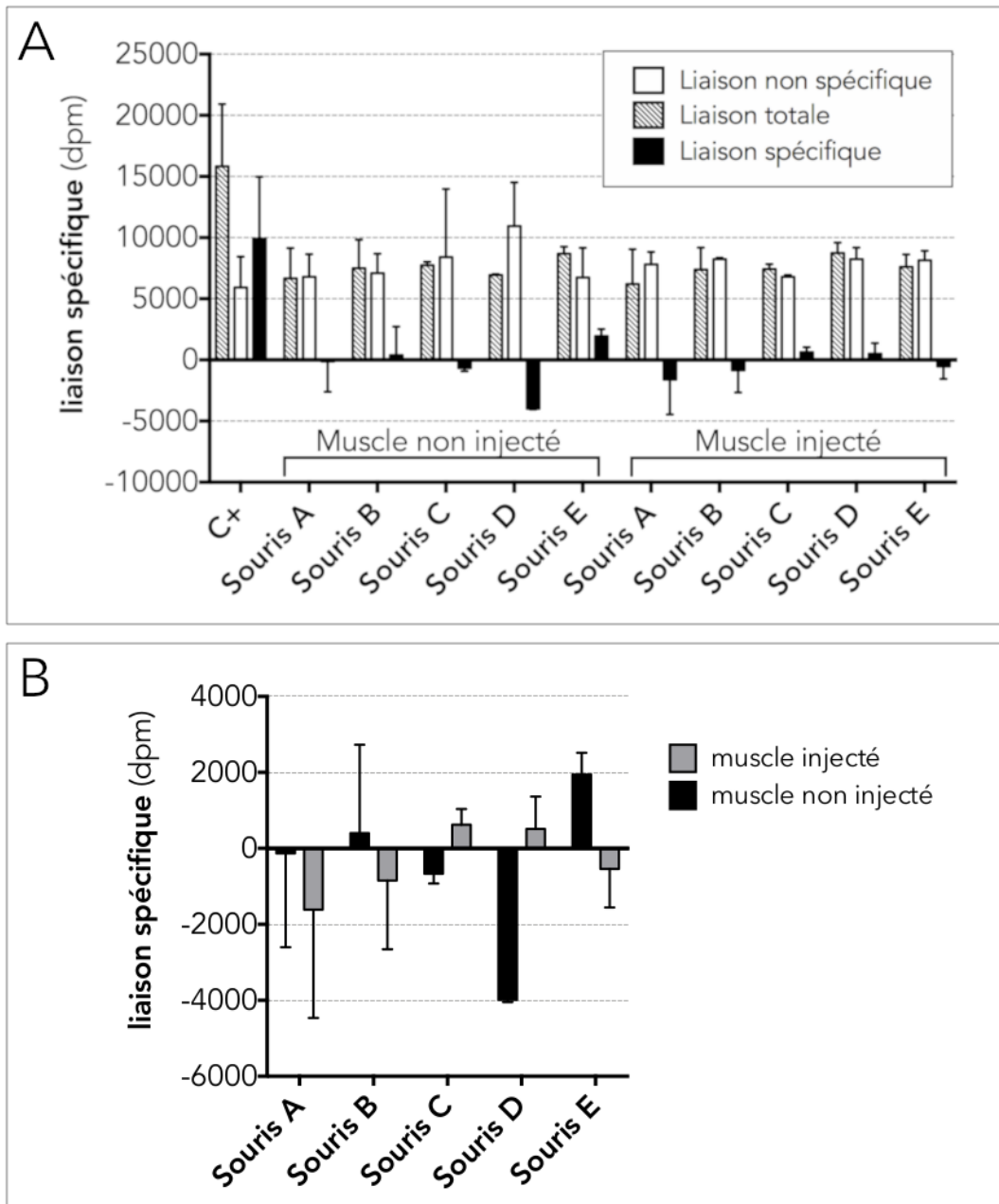
**Tableau 14 : Titration des sera finaux des souris 1, 2 et 4.** Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites pour la Figure 50.

Souris	Titre du sérum (semaine 30)
1	$\frac{1}{364,500}$
2	$\frac{1}{121,500}$
4	$\frac{1}{121,500}$

récepteur en nanodisques et en détergents est probablement différente, et que le récepteur en nanodisques est susceptible d'être plus proche d'une conformation native.

Le titre des trois sera les plus prometteurs est déterminé au moyen d'un test ELISA sur plaque 96-puits mettant en jeu une quantité fixe saturante de nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 et une gamme de dilutions du sérum. Le titre correspond à la dernière dilution pour laquelle la réponse obtenue sur les nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 est au moins deux fois supérieure à celle obtenue sur les nanodisques vides. La **Figure 50** présente, en guise d'exemple, la réponse détaillée obtenue pour le sérum final de la souris 1.

Les souris 1, 2 et 4 présentent un titre hautement similaire, qui correspond à deux dilutions successives de la gamme testée (**Tableau 14**). Il est de l'ordre de  $1 \times 10^{-5}$ .



**Figure 51 : Détection de la surexpression du récepteur MT<sub>1</sub> dans les muscles des souris traitées par test de liaison de radioligand.** Mise en jeu de 100 µg d'homogénat de muscle et de 13 nM de [<sup>3</sup>H]-mélatonine. (A) Représentation graphique du signal de liaison totale, non spécifique et spécifique pour chaque homogénat de muscle testé. C+ : contrôle positif, 50 µg de préparations membranaires de levures *Pichia pastoris* exprimant le récepteur MT<sub>1</sub>\_MP2 (B) Représentation du signal de liaison spécifique pour chaque souris immunisée

## 2.3. Campagne ciblée contre le récepteur MT<sub>1</sub>

### 2.3.1. Détection locale de la surexpression du récepteur

De la même manière que pour le récepteur AA<sub>2A</sub>, un homogénat des fragments musculaires des souris A à E, immunisées avec le virus SFV-MT<sub>1</sub>, est mis en jeu dans un test de liaison de radioligand afin de détecter la surexpression du récepteur.

Dans les conditions expérimentales mises en œuvre, l'intensité du signal de liaison non spécifique est du même ordre de grandeur que le signal total pour tous les échantillons testés (**Figure 51A**). Cela engendre un signal spécifique négatif pour plusieurs échantillons. Le test ne permet donc pas de détecter le récepteur de manière cohérente et significative dans le muscle injecté par rapport au muscle non injecté (**Figure 52B**). On peut noter que le signal non spécifique est également élevé pour le contrôle positif, constitué de préparations membranaires de levures *Pichia pastoris* exprimant le récepteur MT<sub>1</sub>\_MP2. Une optimisation des conditions expérimentales mises en œuvre, telles que l'augmentation du nombre et/ou de la nature des lavages du filtre, pourrait permettre d'augmenter le rapport signal sur bruit et d'améliorer la finesse de la détection.

### 2.3.2. Caractérisation des échantillons sériques

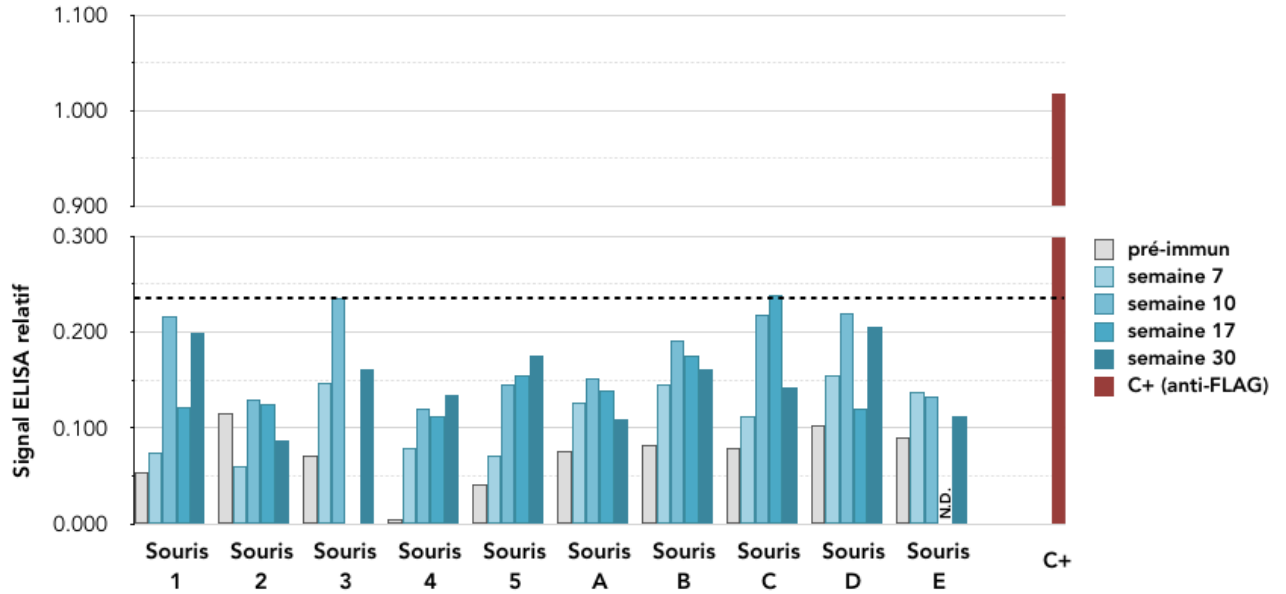
Les prélèvements sériques sont mis en jeu dans un test ELISA dans le but de détecter les anticorps capables de reconnaître le récepteur MT<sub>1</sub>. Ceux des souris 1 à 5, immunisées avec les virus SFV-AA<sub>2A</sub>, servent de contrôle négatif.

Deux types d'antigènes sont immobilisés sur une plaque 96-puits préalablement recouverte de streptavidine : des préparations membranaires de levures (**Figure 52**) ou du récepteur purifié en détergents (**Figure 53**).

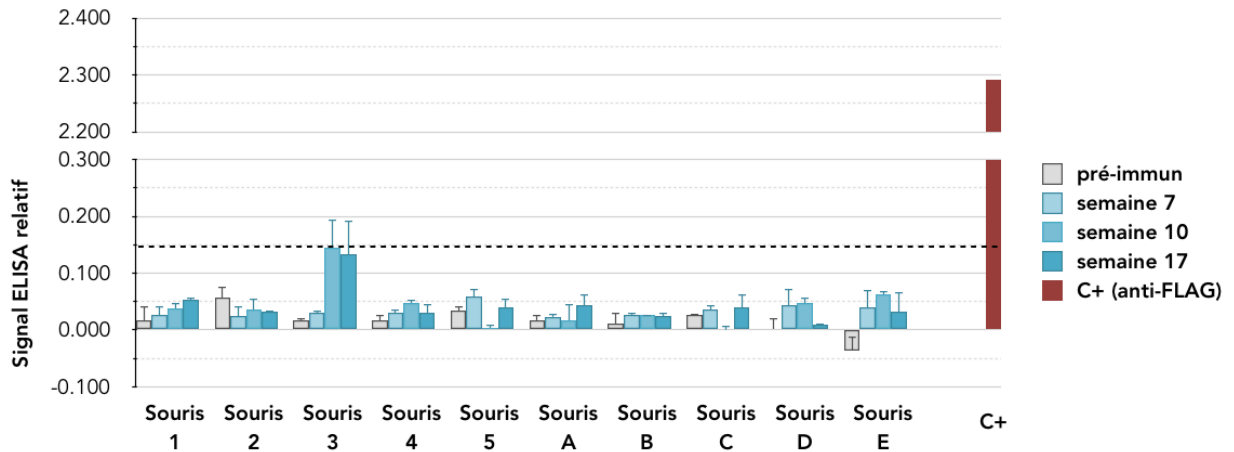
Dans le premier test, le signal non spécifique est mesuré sur des préparations membranaires de levures *Pichia pastoris* sauvages. Celui-ci est soustrait du signal obtenu sur les préparations membranaires surexprimant le récepteur MT<sub>1</sub>\_MP2 pour donner un signal relatif. Aucun sérum des souris A à E ne présente de signal plus important que les souris témoin 1 à 5. La quantité de préparations membranaires immobilisée sur la plaque est choisie de telle sorte à être saturante (**Annexe 3**).

Le second format de test met en jeu du récepteur MT<sub>1</sub>\_MP2 purifié dans un mélange de Fos14 et de CHAPS. Le bruit de fond est ici déterminé sur des puits sans antigène. Ici encore, le signal obtenu pour les prélèvements sériques d'intérêt est toujours inférieur à celui des souris témoin.

Au vu de ces résultats, la procédure d'immunisation mise en œuvre ne semble pas avoir généré la production d'anticorps spécifiques au récepteur d'intérêt.



**Figure 52** : Détection d'anticorps spécifiques au récepteur MT<sub>1</sub> dans le sérum des souris inoculées avec des SFV recombinants tout au long de la procédure d'immunisation par un test ELISA sur des préparations membranaires recombinantes. Antigène : 200 ng (quantité de protéines totales) de préparations membranaires *Pichia pastoris* MT<sub>1</sub>\_MP2 par puits, adsorbés via une liaison streptavidine-biotine. Sera dilués au 500<sup>ème</sup> en PBS. Soustraction du bruit de fond correspondant au signal sur des préparations membranaires de levures *Pichia pastoris* SMD1163 non transformées. Souris 1 à 5 immunisées avec du virus SFV-AA<sub>2A</sub>. Souris A à E immunisées avec du virus SFV-MT<sub>1</sub>. C+ : détection du récepteur MT<sub>1</sub>\_MP2 avec un anticorps anti-FLAG. La ligne horizontale symbolise le seuil de réponse spécifique au récepteur MT<sub>1</sub> (signal maximum pour les souris 1 à 5).



**Figure 53** : Détection d'anticorps spécifiques au récepteur MT<sub>1</sub> dans le sérum des souris inoculées avec des SFV recombinants tout au long de la procédure d'immunisation par un test ELISA sur du récepteur purifié. Antigène : 40 ng de récepteur MT<sub>1</sub>\_MP2 purifié en Fos14/CHAPS par puits, adsorbés via une liaison streptavidine-biotine. Sera dilués au 1000<sup>ème</sup> en PBS. Soustraction du bruit de fond correspondant au signal sur des puits sans antigène. Souris 1 à 5 immunisées avec du virus SFV-AA<sub>2A</sub>. Souris A à E immunisées avec du virus SFV-MT<sub>1</sub>. C+ : détection du récepteur MT<sub>1</sub>\_MP2 avec un anticorps anti-FLAG. La ligne horizontale symbolise le seuil de réponse spécifique au récepteur MT<sub>1</sub> (signal maximum pour les souris 1 à 5).

### 3. Discussion des résultats

L'objectif de ce premier axe du projet est de mettre en œuvre l'approche d'immunisation pour générer des anticorps polyclonaux. Le choix s'est porté sur la souris pour plusieurs raisons. D'une part, les coûts d'élevage et de maintenance de ce petit animal sont faibles (en comparaison au lapin par exemple), ce qui permet d'envisager facilement une mise en parallèle de plusieurs conditions expérimentales. D'autre part, plusieurs études font usage du système SFV chez la souris, principalement dans un cadre vaccinal<sup>308</sup>, constituant ainsi une base non négligeable de conditions de référence. Enfin, en cas de développement d'une réponse immunitaire prometteuse, la sélection d'anticorps monoclonaux peut facilement être envisagée.

#### 3.1. La surexpression locale des récepteurs d'intérêt

La surexpression des récepteurs d'intérêt par les cellules cibles constitue une condition primordiale au développement d'une réponse immunitaire spécifique. La détection de cette surexpression dans les tissus injectés est donc la première preuve tangible du bien-fondé de l'approche d'immunisation mise en œuvre.

Les résultats obtenus révèlent l'existence d'une grande variabilité inter-individuelle dans les réponses obtenues. Celle-ci est d'autant plus marquée lors de l'immunisation contre la version sauvage du récepteur AA<sub>2A</sub>, pour laquelle seules deux souris sur cinq présentent une surexpression significative.

L'existence d'un lien entre la surexpression du récepteur et le taux d'anticorps spécifiques détecté dans le sérum n'est toutefois pas évidente. En effet, lors de la campagne d'immunisation dirigée contre le récepteur étiqueté, la souris présentant le plus faible niveau d'expression est également celle pour laquelle la réponse humorale spécifique est la moins élevée (**Figure 43** et **Figure 44**, résultats non détaillés par individu). Cependant, dans le cas de l'immunisation contre la version sauvage du récepteur, ces deux paramètres ne sont pas corrélés.

Les particules virales administrées sont susceptibles d'infecter les cellules cibles localisées autour du point d'injection, mais également de migrer directement vers les ganglions lymphatiques<sup>309,310</sup>, où elles pourront induire l'expression du récepteur d'intérêt. En 2015, Stephanie Van de Wall et ses collaborateurs<sup>302</sup> ont détecté, par bioluminescence, l'expression de la luciférase induite par des particules SFV recombinantes dans le muscle et les ganglions lymphatiques, suite à une administration intramusculaire.

L'utilisation de constructions codant pour des récepteurs fusionnés à une luciférase pourrait permettre de mieux comprendre le devenir des particules virales administrées à la souris en suivant plus finement l'expression du transgène.



## 3.1. Comparaison de plusieurs procédés d'immunisation

### 3.1.1. La question du fond génétique

Les souris C57/bl6<sup>301-303,305</sup> et Balb/c<sup>208,300,306</sup> sont les plus fréquemment utilisés dans les études publiées mettant en œuvre le système SFV, avec un choix prédominant pour des souris femelles. L'influence du genre sur l'efficacité de la réponse vaccinale a d'ailleurs été investiguée dans le cas du virus influenza, et une réponse plus importante des femelles par rapport aux mâles a été mise en évidence<sup>311</sup>.

Les résultats de notre étude révèlent une très forte supériorité de la réponse immunitaire humorale chez les souris Balb/c, tandis qu'aucune des souris C57/bl6 immunisées ne semble avoir développé d'anticorps spécifiques. Plusieurs références font état d'une influence de la nature du fond génétique sur la réponse immunitaire<sup>312,313</sup>, qui semble être variable selon l'antigène considéré. Dans notre cas, la différence de réponse peut être mise en relation avec la détection d'une expression du récepteur plus faible chez ce deuxième fond génétique.

### 3.1.2. Le choix de la voie d'immunisation

Parmi les trois voies d'immunisation testées, la voie intramusculaire génère la réponse humorale la plus importante, suivie de près par la voie intraveineuse. Ces résultats peuvent être comparés avec ceux d'une étude menée en 2004<sup>314</sup>. Des particules virales SFV y ont été mises en œuvre dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse, et ces deux mêmes voies d'injection se sont révélées plus prometteuses que les injections intrapéritonéales ou sous-cutanées. Il faut cependant noter que seule la réponse immunitaire cellulaire était alors investiguée.

Quelques années plus tard, la même équipe a mis en évidence que l'administration de particules virales SFV de manière intradermale, grâce à un dispositif de tatouage, engendrait une réponse plus élevée ou du moins comparable à la voie intramusculaire<sup>302</sup>. En effet, la peau est un organe riche en cellules présentatrices d'antigènes. De plus, l'utilisation de cette voie d'administration pour des particules virales permet une importante migration de celles-ci vers les ganglions lymphatiques<sup>310</sup>, ce qui est associé à une forte réponse immunitaire à la fois cellulaire et humorale<sup>315,316</sup>. L'injection intradermale des particules virales pourrait donc être considérée comme une perspective d'amélioration du protocole mis au point.

### 3.1.3. Le nombre d'injections

Le prélèvement terminal de sérum est effectué après cinq à sept injections de particules virales. Pour toutes les souris répondant positivement, la quantité d'anticorps

spécifiques présente dans le sérum augmente nettement jusqu'à la quatrième injection (semaine 10), puis tend à se stabiliser, ce qui est confirmé lors de la campagne d'immunisation par les virus SFV-AA<sub>2A</sub>. Toutefois, on admet communément que le rôle de la maturation de la réponse immunitaire est de sélectionner les anticorps de meilleure affinité<sup>307</sup>, et non d'augmenter leur quantité dans le sérum. Une procédure d'immunisation respectant un long temps de repos avant l'injection finale et le sacrifice des animaux, tel qu'il a été pratiqué ici, pourrait donc trouver tout son sens dans le cadre de développement d'anticorps monoclonaux.

### 3.2. La spécificité des anticorps générés

La campagne d'immunisation « contrôle », mettant en jeu une version étiquetée du récepteur AA<sub>2A</sub>, conduit au développement d'anticorps capables de reconnaître d'une part la version native du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP3, présentée sous forme de nanodisques lipidiques lors du test ELISA, et d'autre part les versions dénaturées des récepteurs AA<sub>2A</sub>\_MP2 (dans sa forme complète uniquement) et MT<sub>1</sub>\_MP2, séparées sur un gel dénaturant. Ces résultats semblent indiquer que le sérum polyclonal contient à la fois des anticorps conformationnels spécifiques au récepteur AA<sub>2A</sub>, et des anticorps dirigés contre un épitope linéaire de la séquence de biotinylation partagé par tous les récepteurs « MP2 ».

Les anticorps générés dans la campagne dirigée contre le récepteur AA<sub>2A</sub> sauvage présentent une réactivité robuste contre le récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP3 en nanodisques lipidiques dans un format ELISA. Les sera polyclonaux ne montrent cependant aucune réactivité vis-à-vis du récepteur déposé sur un gel dénaturant (résultats non montrés). Une caractérisation de ces échantillons à l'aide d'autres approches est nécessaire pour confirmer leur spécificité. Le clonage du récepteur AA<sub>2A</sub> en fusion avec une protéine fluorescente, dans un vecteur permettant l'expression en cellules mammifères, est actuellement en cours au laboratoire. Cette nouvelle construction permettra la réalisation d'expériences d'immunohistochimie.

### 3.3. Le cas du récepteur MT<sub>1</sub>

La campagne d'immunisation dirigée contre le récepteur MT<sub>1</sub> ne permet ni d'induire la surexpression locale du récepteur, ni de générer des anticorps spécifiques détectables avec les essais mis en œuvre. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce revers.

Tout d'abord, comme présenté précédemment, il n'est pas exclu que l'absence de détection du récepteur dans les tissus musculaires soit inhérente au test de liaison de radioligand mis en œuvre. L'optimisation du test, l'utilisation d'un autre radioligand,

ou le recours à une technique de bioluminescence, pourraient permettre d'affiner la détection.

D'autre part, le récepteur  $MT_1$  est un RCPG délicat à exprimer dans un système hétérologue<sup>270</sup>, et malgré la capacité avérée des particules SFV à induire son expression fonctionnelle à la surface de cellules en culture, les expériences menées ont également mis en évidence une affinité du récepteur vis-à-vis de la mélatonine 100 fois plus faible que celle qui a pu être observée sur des cellules mammifères recombinantes<sup>294</sup>. Il est donc possible que le récepteur soit synthétisé chez la souris sous une forme non ou partiellement repliée, de telle sorte qu'il ne puisse pas reconnaître son ligand.

Enfin, la mise au point de la procédure d'immunisation a été ciblée sur le récepteur  $AA_{2A}$ , et les paramètres sélectionnés (fond génétique, voie d'immunisation et quantité de particules virales administrée) peuvent ne pas être adaptés au récepteur  $MT_1$ .

La faible immunogénicité du récepteur peut également être mise en cause pour expliquer l'absence de développement d'une réaction immunitaire spécifique. La co-administration d'adjuvant peut être envisagée afin d'augmenter les chances de réponse. Dans deux études faisant usage de SFV, une souche atténuée de salmonelle<sup>317</sup> ou une préparation inactivée du virus influenza<sup>305</sup> ont été employées dans ce but.

### 3.4. Observation générale

La spécificité « anti-tag » des anticorps obtenus lors de la campagne d'immunisation « contrôle » souligne également l'absolue nécessité d'utiliser des récepteurs sauvages lors des immunisations, *a fortiori* lorsqu'on se destine à travailler directement avec le sérum polyclonal.

Dans le domaine des anticorps dirigés contre les RCPG, les anticorps faussement spécifiques font légion<sup>105,318</sup>, et la caractérisation exhaustive d'un sérum polyclonal est nécessaire pour permettre son utilisation dans le cadre d'approches plus exploratoires. Cependant, dans ce cas, le faible volume de sérum récolté chez la souris peut s'avérer rapidement limitant. La génération d'anticorps monoclonaux de souris prend alors tout son sens.



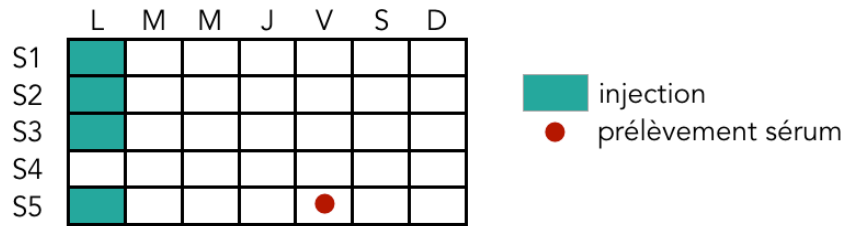


## CHAPITRE 3

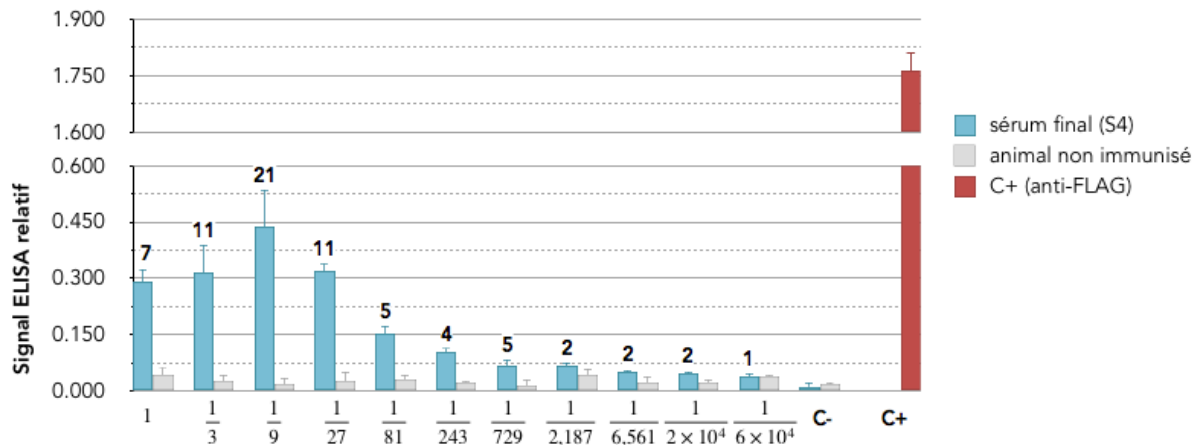
# Génération et criblage de fragments d'anticorps de camélidés ou V<sub>H</sub>H

*Optimist: Someone who figures that taking a step backward after  
taking a step forward is not a disaster, it's a cha-cha.*

*Robert Brault*



**Figure 54 : Répartition des injections et prélèvements pour la campagne d'immunisation d'un alpaga avec des virus recombinants SFV-AA<sub>2A</sub>.** 4 injections intradermales de 10<sup>9</sup> particules virales, réparties sur 5 semaines (S1 à S5). L, M, M... à D : jours de la semaine



**Figure 55 : Titration du sérum final (prélevé à la semaine 4) de l'alpaga par test ELISA.** Antigène : 0.8 pmol de nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 biotinylés par puits, adsorbés via une liaison streptavidine-biotine. Gamme de dilutions des échantillons sériques en PBS. Soustraction du bruit de fond correspondant au signal sur des nanodisques vides biotinylés. C- : contrôle en absence d'antigène. C+ : détection des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 avec un anticorps anti-FLAG. Étiquette des données : ratio signal sérum final *vs* animal non immunisé. Le titre correspond à la dernière dilution pour laquelle ce ratio est strictement supérieur à 2 (ici  $\frac{1}{729}$ ).

## 1. Immunisation et développement de la réponse immunitaire

L'utilisation de SFV n'ayant jamais été décrite chez l'alpaga, la procédure d'immunisation mise en œuvre se base sur la cinétique habituellement pratiquée par nos collaborateurs bruxellois<sup>284</sup>, avec toutefois un nombre restreint d'injections pour cette première tentative.

### 1.1. Cinétique de la procédure

Un alpaga est immunisé à quatre reprises avec  $10^9$  virus SFV-AA<sub>2A</sub> préalablement activés *in vitro*. Cette quantité correspond au volume maximum injectable. La cinétique des injections est présentée en **Figure 54**. Un prélèvement sanguin est effectué quatre jours après la dernière injection.

### 1.2. Caractérisation des échantillons sériques

Le sérum dérivé du prélèvement sanguin terminal est analysé par test ELISA, dans le but d'investiguer la présence d'anticorps spécifiques au récepteur AA<sub>2A</sub> (**Figure 55**).

Une gamme de dilutions du sérum est mise en présence d'une quantité saturante de nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3. Le bruit de fond, déterminé sur des nanodisques vides biotinylés, est soustrait de la réponse totale pour donner le signal ELISA relatif présenté sur l'histogramme. La même expérience est réalisée en parallèle sur un sérum non relevant, provenant d'un autre animal non immunisé.

Ce test révèle la présence d'anticorps spécifiques au récepteur AA<sub>2A</sub> dans le sérum de l'alpaga immunisé et indique donc le développement d'une réponse immunitaire humorale spécifique suite à l'administration de SFV recombinants. Le titre du sérum d'intérêt correspond à la dernière dilution pour laquelle la réponse relative obtenue est deux fois supérieure à celle du sérum non relevant, c'est-à-dire  $\frac{1}{729}$ .



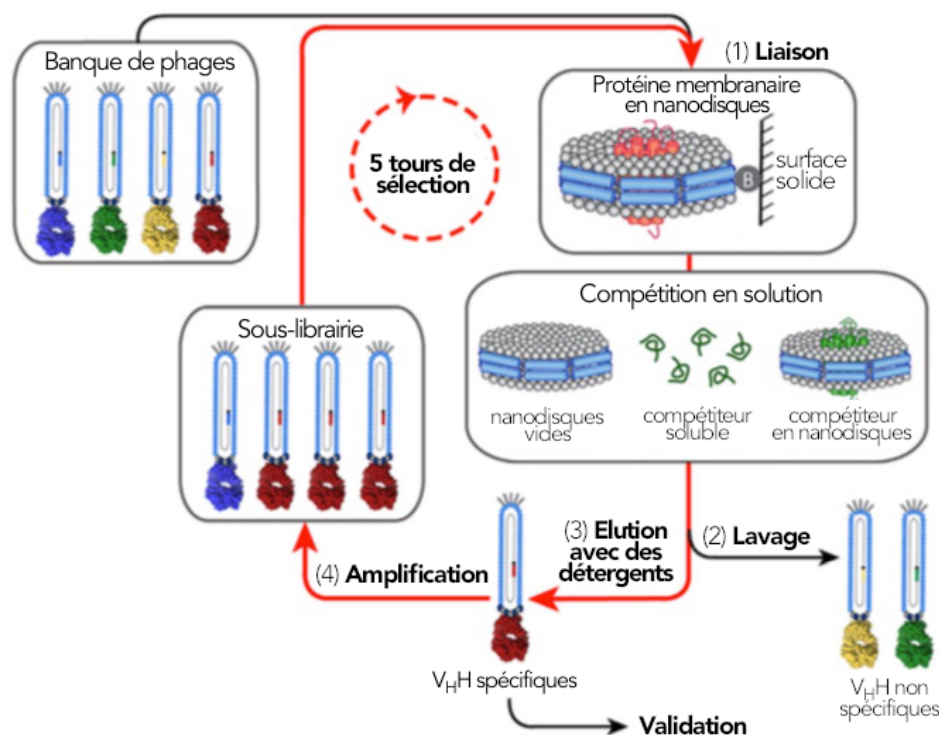


## 2. Sélection des V<sub>H</sub>H

L'ARN total extrait des lymphocytes circulants est rétrotranscrit en ADNc, puis les séquences codantes des V<sub>H</sub>H sont amplifiées par PCR et clonées dans le phagemide pMECS-GG. Elles sont insérées en amont du gène *III* du bactériophage M13, en fusion avec une étiquette HA et une étiquette hexahistidine du côté C-terminal.

La transformation de la souche bactérienne *E. coli* TG1<sup>a</sup> avec les vecteurs résultants permet d'obtenir une banque de 2×10<sup>8</sup> clones uniques. L'infection des transformants avec le phage auxiliaire M13KO7 conduit à la synthèse et au relargage d'une librairie de phages recombinants présentant chacun à leur extrémité un V<sub>H</sub>H<sup>319</sup>.

La banque de phages ainsi générée est criblée grâce à la technique du phage display en utilisant plusieurs formats d'antigènes, présentés dans le paragraphe suivant.



**Figure 56** : Représentation schématique d'une procédure de phage display avec des protéines membranaires en nanodisques, publiée par Dominik *et al.*<sup>320</sup>. Les nanodisques contenant la protéine d'intérêt sont immobilisés via une interaction streptavidine-biotine (notée B), en présence de différents types de compétiteurs en solution. Les étapes de lavage permettent d'éliminer les V<sub>H</sub>H non spécifiques. Les V<sub>H</sub>H spécifiques sont élués au moyen de détergents, qui déstabilisent les nanodisques. Une étape d'amplification en bactéries *E. coli* permet de générer une sous-librairie qui pourra être utilisée pour le cycle de sélection suivant. Les cycles sont répétés avec une diminution progressive de la quantité de cible mise en jeu.

<sup>a</sup> Le gène codant pour le V<sub>H</sub>H est séparé du gène *III* par un codon stop ambre (séquence UAG). La souche *E. coli* TG1 code pour un ARNt (ARN de transfert) suppresseur de ce codon, dont la traduction conduit alors à l'incorporation d'un acide glutamique.

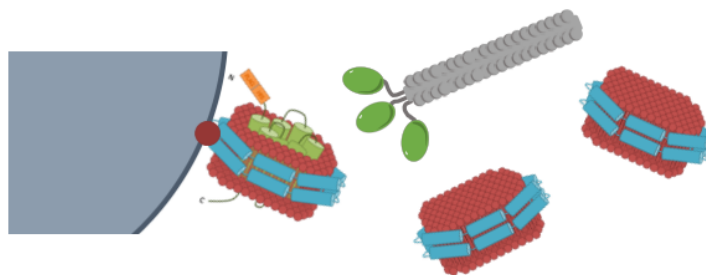


Figure 57 : Criblage par phage display mettant en jeu des nanodisques lipidiques AA<sub>2A</sub>\_MP3 biotinylés immobilisés sur des billes magnétiques. Des nanodisques vides en solution sont utilisés comme compétiteurs.

Tableau 15 : Conditions expérimentales finales du phage display mettant en jeu des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 immobilisés sur des billes magnétiques

Cycle de sélection	Volume de billes	Quantité de nanodisques AA <sub>2A</sub> _MP3 (sélection)	Volume total	Quantité de nanodisques vides en solution (compétition)	Nombre de lavages
Déplétion	250 µL	125 pmol (ND vides)	250 µL		
1	250 µL	125 pmol	250 µL	625 pmol	3
2	80 µL	40 pmol	100 µL	200 pmol	3
3	40 µL	20 pmol	100 µL	200 pmol	3
4	20 µL	10 pmol	100 µL	100 pmol	3

Tableau 16 : Variations des conditions expérimentales du phage display mettant en jeu des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 immobilisés sur des billes magnétiques. La capacité des billes, fournie par le fabricant, correspond à des pmol de fluorescéine pour les billes *Pierce*<sup>TM</sup>, des pmol de biotine pour les billes *Ademtech* et des nmol d'oligo(dT) pour les billes *Promega*. Excès de nanodisques vides utilisé comme compétiteur durant la phase de sélection et durant les lavages (sauf spécification contraire).

Expérience de criblage	Nombre de cycles	Billes magnétiques streptavidine (capacité) Ø diamètre	Concentrations de nanodisques AA <sub>2A</sub> _MP3 (sélection)	Excès de nanodisques vides (compétition)	Lavages
1	3	<i>Pierce</i> <sup>TM</sup> Streptavidin Magnetic Beads (3500 pmol.mg <sup>-1</sup> ) Ø 1 µm	30 nM – 20 nM 24 pmol – 13 pmol	2 ×	7 à 10 × PBS seul
2	5	<i>Ademtech</i> Bio – Adembeads Streptavidin (600 pmol.mg <sup>-1</sup> ) Ø 200 nm	80 nM – 6 nM 65 pmol – 5 pmol	5 ×	3 × compétiteur
3	6	<i>Promega</i> Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles (0.75-1.25 nmol.mg <sup>-1</sup> ) Ø 1 µm	500 nM – 40 nM 125 pmol – 4 pmol	5 × à 10 ×	3 × compétiteur
4	5		500 nM - 40 nm 125 pmol – 4 pmol	10 ×	6 × compétiteur
5	4		500 nM – 100 nM 125 pmol – 10 pmol	5 × à 10 ×	3 × compétiteur

## 2.1. Criblage de la banque de V<sub>H</sub>H par phage display

### 2.1.1. Nanodisques lipidiques immobilisés sur des billes magnétiques

La première approche s'appuie sur un protocole de criblage publié par Dominik *et al.*<sup>320</sup> schématisé en **Figure 56**, et met en jeu des protéines membranaires reconstituées en nanodisques lipidiques.

Des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 sont adsorbés sur des billes magnétiques recouvertes de streptavidine via les groupements biotines présents sur la protéine d'échafaudage (**Figure 57**). L'utilisation de nanodisques proscrivant l'usage de détergents, les phages non spécifiques sont éliminés grâce à la présence d'un excès de nanodisques vides lors de l'étape de liaison ainsi que durant les lavages.

Au total, cinq expériences complètes de criblage de la banque sont réalisées en utilisant cette stratégie.

Les conditions utilisées lors du dernier criblage (**Tableau 15**) sont les suivantes : après une première étape de déplétion de la banque en présence de nanodisques vides biotinylés et immobilisés sur des billes magnétiques, quatre cycles de sélection successifs sont effectués. A chaque cycle, la rigueur de la sélection est augmentée grâce à une diminution de la quantité de billes et donc de nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 mise en jeu, ainsi qu'à une augmentation de la quantité de nanodisques vides utilisés comme compétiteurs.

Une sélection négative est réalisée en parallèle et dans les mêmes conditions sur un échantillon exempt de récepteur, constitué de nanodisques vides biotinylés immobilisés sur des billes.

Les expériences de criblage antérieures ont toutes fait l'objet d'optimisations des conditions expérimentales, détaillées dans le **Tableau 16**. Les modifications mises en œuvre poursuivent le double objectif de conserver le maximum de phages spécifiques lors des premiers cycles de sélection, en augmentant la quantité d'antigène présentée, tout en accroissant progressivement la sélection grâce aux lavages et à la présence de compétiteur.

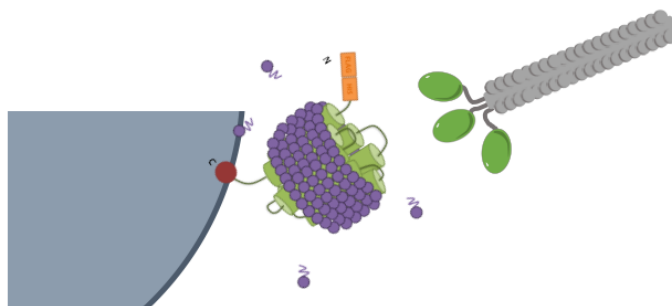


Figure 58 : Criblage par phage display mettant en jeu du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 purifié en détergents et immobilisé sur des billes magnétiques.

Tableau 17 : Conditions expérimentales du phage display mettant en jeu du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 immobilisé sur des billes magnétiques

Cycle de sélection	Volume de billes	Quantité de récepteur AA <sub>2A</sub> _MP2 en DDM (sélection)	Volume total	Nombre de lavages
1	250 µL	250 pmol	250 µL	5
2	80 µL	80 pmol	100 µL	5
3	40 µL	40 pmol	100 µL	10

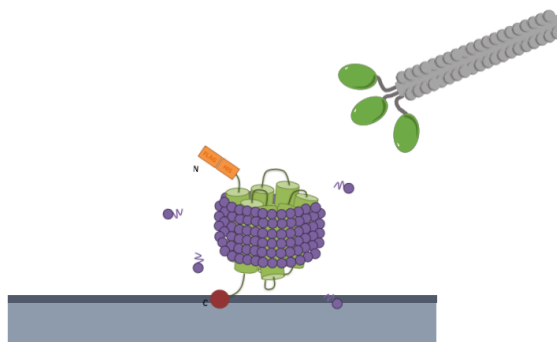


Figure 59 : Criblage par phage display mettant en jeu du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 purifié en détergents et immobilisé au fond d'une plaque ELISA.

Tableau 18 : Conditions expérimentales du phage display mettant en jeu du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 immobilisé au fond d'une plaque ELISA

Cycle de sélection	Quantité de récepteur AA <sub>2A</sub> _MP2 en DDM (sélection)	Volume total	Nombre de lavages
1	1.7 pmol	100 µL	10
2	1.7 pmol	100 µL	15
3	1.7 pmol	100 µL	20
4	1.7 pmol	100 µL	20

### 2.1.2. Récepteurs purifiés en détergents et immobilisés sur des billes magnétiques

Dans une seconde approche, le récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 purifié en DDM est immobilisé sur des billes magnétiques streptavidine via la biotine de son extrémité carboxy-terminale (**Figure 58**). L'ensemble de la sélection est effectué en présence de 0.02 % de DDM/CHS. Le détergent est dans ce cas indispensable au maintien du récepteur purifié en solution, et permet également l'élimination des phages non spécifiques lors des lavages.

Cette stratégie est utilisée pour une expérience complète de criblage.

La banque est cette fois traitée sans déplétion préalable et enrichie au cours de trois cycles de sélection consécutifs. Chaque cycle met en jeu une quantité décroissante de billes et donc de récepteur purifié, et le nombre de lavages est progressivement augmenté (**Tableau 17**).

Une sélection négative est réalisée en parallèle et dans les mêmes conditions sur un échantillon exempt de récepteur, constitué uniquement de billes streptavidine.

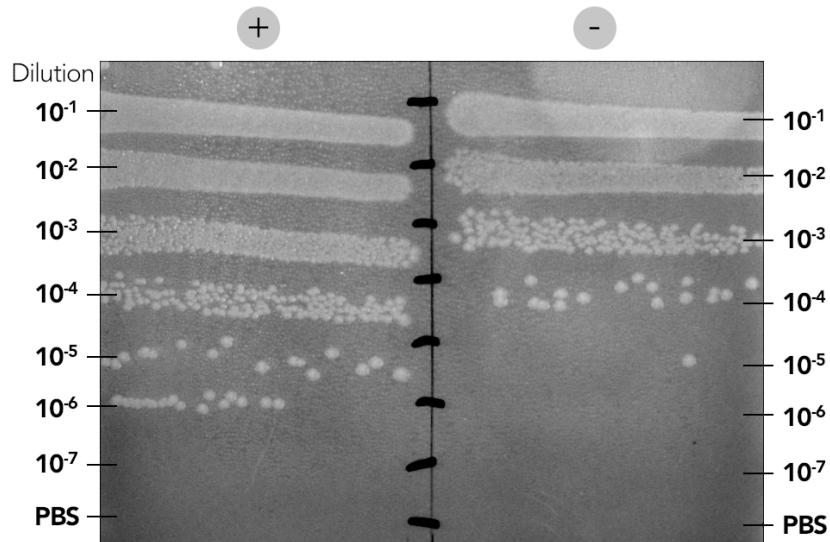
### 2.1.3. Récepteurs purifiés en détergents et immobilisés sur un support

La dernière approche met en jeu le récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 purifié en DDM et immobilisé au fond d'une plaque ELISA préalablement recouverte de streptavidine (**Figure 59**). De la même manière que pour l'approche précédente, l'ensemble de la sélection est réalisé en présence de 0.02 % de DDM/CHS.

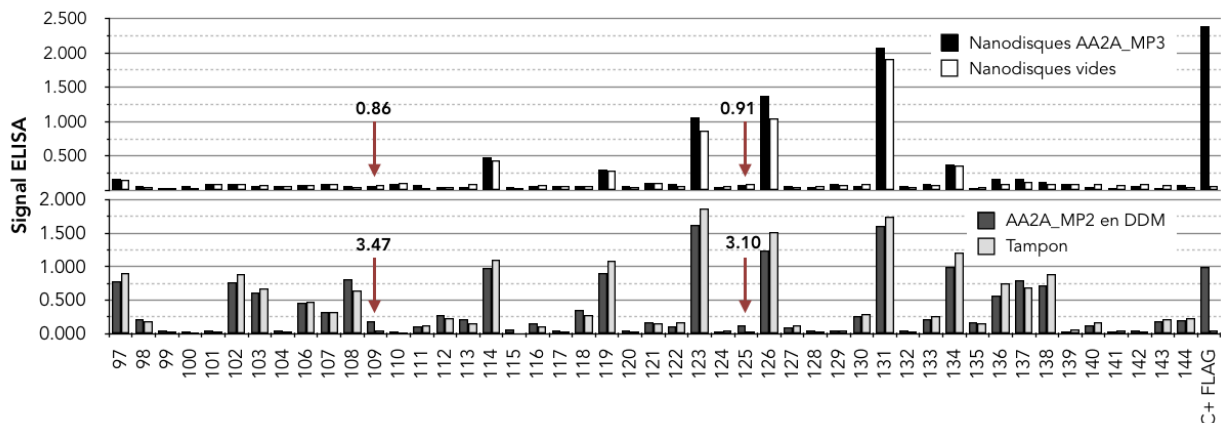
Cette stratégie est utilisée lors d'une expérience complète de criblage de la banque.

La quantité de récepteur adsorbée au fond de chaque puits est saturante. Celle-ci étant considérablement plus faible que la quantité présentée par les billes, elle est conservée pour les quatre cycles de sélection consécutifs effectués. Le nombre de lavage est progressivement augmenté afin de permettre une élimination efficace des phages non spécifiques (**Tableau 18**).

Une sélection négative est réalisée en parallèle et dans les mêmes conditions sur un puits vide, couvert de streptavidine mais en l'absence de récepteur.



**Figure 60 : Visualisation d'un enrichissement.** Étalement de 10 µL de bactéries infectées par les phages sélectionnés en présence (+) ou en absence (-) de récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 purifié en détergents et immobilisé sur des billes magnétiques, après le troisième cycle de sélection.



**Figure 61 : Évaluation de la spécificité des V<sub>H</sub>H individuels sélectionnés par test ELISA.** Clones 97 à 144 sélectionnés à l'aide de récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 purifié en détergents et immobilisé sur des billes magnétiques, après le troisième cycle de sélection. *Graphe du dessus* : 0.8 pmol de nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 biotinylés (signal total) ou 0.8 pmol de nanodisques vides biotinylés (signal non spécifique) par puits. *Graphe du dessous* : 1.2 pmol de récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 purifié en DDM (signal total) par puits, ou le même volume de tampon sans antigène (signal non spécifique). Extraits périplasmiques contenant les V<sub>H</sub>H exprimés dilués au 5<sup>ème</sup> en PBS. Anticorps secondaire anti-HA révélé avec un anticorps tertiaire anti-souris-HRP. C+ : détection des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 avec un anticorps anti-FLAG. Les clones indiqués par des flèches présentent un ratio  $\frac{\text{signal total}}{\text{signal non spécifique}}$  (chiffre surmontant la flèche) supérieur à 2 lorsque le test ELISA est pratiqué sur du récepteur en DDM et sont donc envoyés au séquençage.

## 2.2. Criblage de clones individuels

### 2.2.1. Visualisation de l'enrichissement et repiquage des clones individuels

Après chaque cycle, les phages élués lors de la sélection positive (en présence de récepteur) et négative (en absence de récepteur) sont utilisés pour infecter des cellules *E. coli* TG1. L'étalement de dilutions décimales des cellules infectées permet de visualiser le nombre de clones sélectionnés dans chaque cas. La différence entre la sélection positive et négative reflète le niveau d'enrichissement de la banque en  $V_{\text{HH}}$  capables de se lier à la cible.

La **Figure 60** présente, en guise d'exemple, l'enrichissement observé après le troisième cycle de sélection de la banque sur du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 purifié en DDM et immobilisé sur des billes magnétiques (condition présentée dans le paragraphe 2.1.2). Dans ce cas, la banque est enrichie d'un facteur 100.

Après un enrichissement positif, plusieurs dizaines de clones individuels sélectionnés sont repiqués et cultivés individuellement dans 1 mL de milieu 2×TY, dans un format 96-puits. L'expression périplasmique du  $V_{\text{HH}}$  est induite par l'ajout d'IPTG. La spécificité de chaque  $V_{\text{HH}}$  vis-à-vis du récepteur AA<sub>2A</sub> est ensuite testée sur les extraits périplasmiques.

### 2.2.2. Évaluation de la spécificité des $V_{\text{HH}}$ par test ELISA

Au total, sur l'ensemble des expériences de criblage, 355 clones individuels sont exprimés en petit volume et testés au format ELISA.

Du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 purifié en DDM ou des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 sont immobilisés au fond d'une plaque ELISA préalablement recouverte de streptavidine. Les extraits périplasmiques contenant une petite quantité de  $V_{\text{HH}}$  sélectionnés par phage display sont ensuite mis en jeu. La présence de nanobodies spécifiques est révélée avec l'aide d'un anticorps secondaire anti-HA. La mesure est réalisée en parallèle sur des puits saturés de nanodisques vides biotinylés ou sur des puits vides afin de mesurer l'interaction non spécifique. Les  $V_{\text{HH}}$  présentant un signal spécifique environ deux fois<sup>a</sup> supérieur au signal non spécifique sont considérés comme positifs et séquencés.

La **Figure 61** expose un exemple représentatif de résultats obtenu pour 47 clones individuels sélectionnés après un phage display sur des récepteurs purifiés en DDM et immobilisés sur des billes magnétiques (condition présentée dans le paragraphe 2.1.2).

---

<sup>a</sup> Ce seuil est ajusté en fonction des résultats. Il est diminué si aucun des clones testés ne présente un ratio de spécificité supérieur à 2. De manière générale, dans les tests réalisés et comme c'est le cas pour l'exemple présenté en **Figure 61**, les ratios sont plus élevés lorsque le test ELISA est effectué sur du récepteur purifié en DDM que sur des nanodisques.



**Tableau 19 : Caractéristiques des trois V<sub>H</sub>H sélectionnés suite au criblage de la banque de phages.** Les zones grisées dans les séquences correspondent aux régions hypervariables CDR1, 2 et 3. Les V<sub>H</sub>H sont fusionnés en C-terminal avec une étiquette HA (en vert) et une étiquette hexahistidine (en orange). Le ratio indiqué dans la dernière colonne correspond au rapport  $\frac{\text{signal total}}{\text{signal non spécifique}}$  obtenu lors du test ELISA de pré-criblage des clones individuels (cf **Figure 61**), réalisé sur du récepteur reconstitué en nanodisques (ND) ou purifié en détergents (DDM).

# V <sub>H</sub> H	Condition de criblage	Séquence protéique	Ratio de spécificité ELISA	Taille théorique (kDa)
1	Nanodisques et billes magnétiques	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFSSYAMG WFRQAPGKEREFVAAISWISGSTAYADSVKGRFTISR NAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCKMGTYTVDYD GQGTQVTSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH	1.33 (ND)	15.1
2	DDM et billes magnétiques	QVQLQESGGGSVQPGGSLTLCVASGRMFRINTMG WYRQTPGKQRELVAISRIGNTNYADSVKGRFTISR NGKNTVYLQMNSLSPEDTAIYYCNARDLLSASRDFW GQGTQVTSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH	1.35 (ND)	15.1
3		(MA)QVQLQESGGGLVHPAGSLTLCVSGGFAFSTHA MNWYRQAPGKERELIAQIARDPGSTTYADSVKGRFLIS RDNAKNTLFLQMNSLTPEDTAVYYCNIGRLSRRNYW GQGTQVTSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH	0.86 (ND) 3.47 (DDM)	15.3

Dans ce cas, seuls deux clones, numérotés 109 et 125, sont positifs. Ils présentent un ratio  $\frac{\text{signal total}}{\text{signal non spécifique}}$  supérieur à deux lorsque le test ELISA est réalisé sur du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 purifié en DDM. Cependant, sur les nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3, le ratio est inférieur à un. Une préparation plasmidique est réalisée à partir de ces clones et envoyée au séquençage.

Sur les 355 V<sub>H</sub>H testés en ELISA, 18 sont séquencés.

## 2.3. Sélection et séquençage des clones d'intérêt

### 2.3.1. Bilan général

Sur les 18 clones séquencés, 15 comportent des mutations ponctuelles ou étendues conduisant à la synthèse d'une séquence fortement tronquée, et donc non pertinente. Les trois clones restants, renommés respectivement V<sub>H</sub>H 1, 2 et 3, sont conservés pour être étudiés plus finement.

La forte occurrence de séquences tronquées est susceptible d'être le témoin d'une mauvaise qualité de la banque due à un dysfonctionnement lors des étapes de clonage. Afin d'éliminer cette hypothèse, dix clones individuels sélectionnés au hasard dans la banque non enrichie sont envoyés au séquençage. Aucune mutation délétère n'est retrouvée dans les séquences obtenues. La sélection de clones tronqués est donc vraisemblablement inhérente à la cible plutôt qu'à la banque.

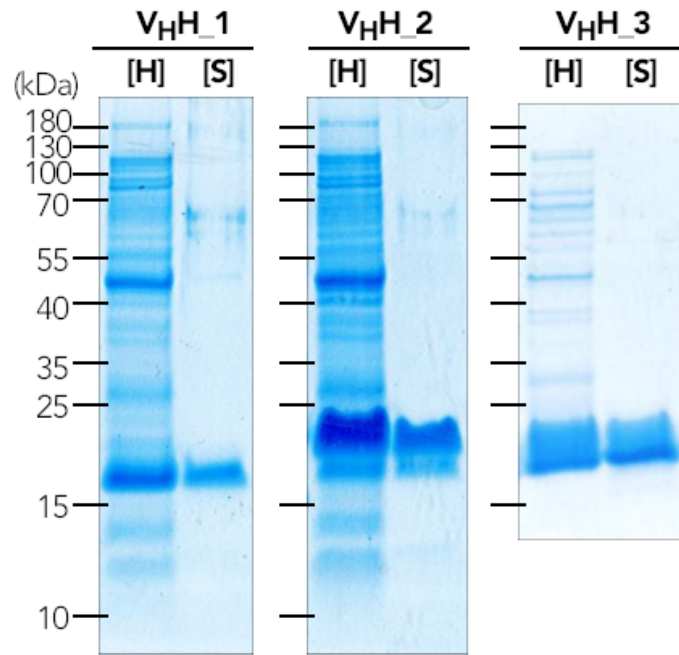
### 2.3.2. Sélection et séquençage des V<sub>H</sub>H 1, 2 et 3

#### *Présentation des trois V<sub>H</sub>H*

Les V<sub>H</sub>H 1, 2 et 3, sélectionnés au cours de différentes expériences de criblage, sont présentés dans le **Tableau 19**. Les régions CDR1, 2 et 3 sont positionnées par analogie aux séquences de V<sub>H</sub>H d'alpagas caractérisées par David R. Maass et ses collaborateurs<sup>321</sup>.

Le V<sub>H</sub>H 1 est sélectionné sur des nanodisques immobilisés sur des billes magnétiques. Sa spécificité est pré-criblée sur des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3, et le ratio s'élève à 1.33.

Les V<sub>H</sub>H 2 et 3 sont sélectionnés sur du récepteur purifié en DDM et immobilisé sur des billes magnétiques. La spécificité du V<sub>H</sub>H 2 est pré-criblée sur des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3, pour un ratio de 1.35. Le V<sub>H</sub>H 3 est quant à lui testé à la fois sur des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 et sur du récepteur en DDM, et le ratio de spécificité est nettement plus important dans ce deuxième cas (3.47 contre 0.86 seulement sur les nanodisques).



**Figure 62 : Analyse SDS-PAGE des V<sub>H</sub>H 1, 2 et 3 purifiés.**  
 Migration de 10 µL des fractions issues de la chromatographie d'affinité ([H]) ou de la colonne de gel filtration ([S]) sur un gel coloré au bleu de Coomassie.

### *Le cas du V<sub>H</sub>H 3*

Le V<sub>H</sub>H 3 comporte dans sa séquence initiale un codon stop ambre en position 39. Les bactéries *E. coli* TG1 possédant un ARNt suppresseur de codon ambre, ce V<sub>H</sub>H est synthétisé dans la banque sous sa forme complète, avec une glutamine (Q) en lieu et place du codon stop (résidu en caractère gras dans le **Tableau 19**).

Dans une perspective d'expression du V<sub>H</sub>H dans une souche bactérienne non suppressive, le codon ambre TAG est muté en codon CAG, permettant l'incorporation d'un acide glutamique. La séquence synthétique modifiée, clonée dans le vecteur commercial pET22b(+), est commandée chez un prestataire privé. Ce vecteur comprend également une séquence signal *pelB*, qui permet l'adressage périplasmique de la protéine d'intérêt.

L'étape de sous-clonage engendre l'ajout d'une méthionine (M) et d'une alanine (A) du côté amino-terminal de la protéine. Ces résidus sont indiqués entre parenthèses dans la séquence (**Tableau 19**).

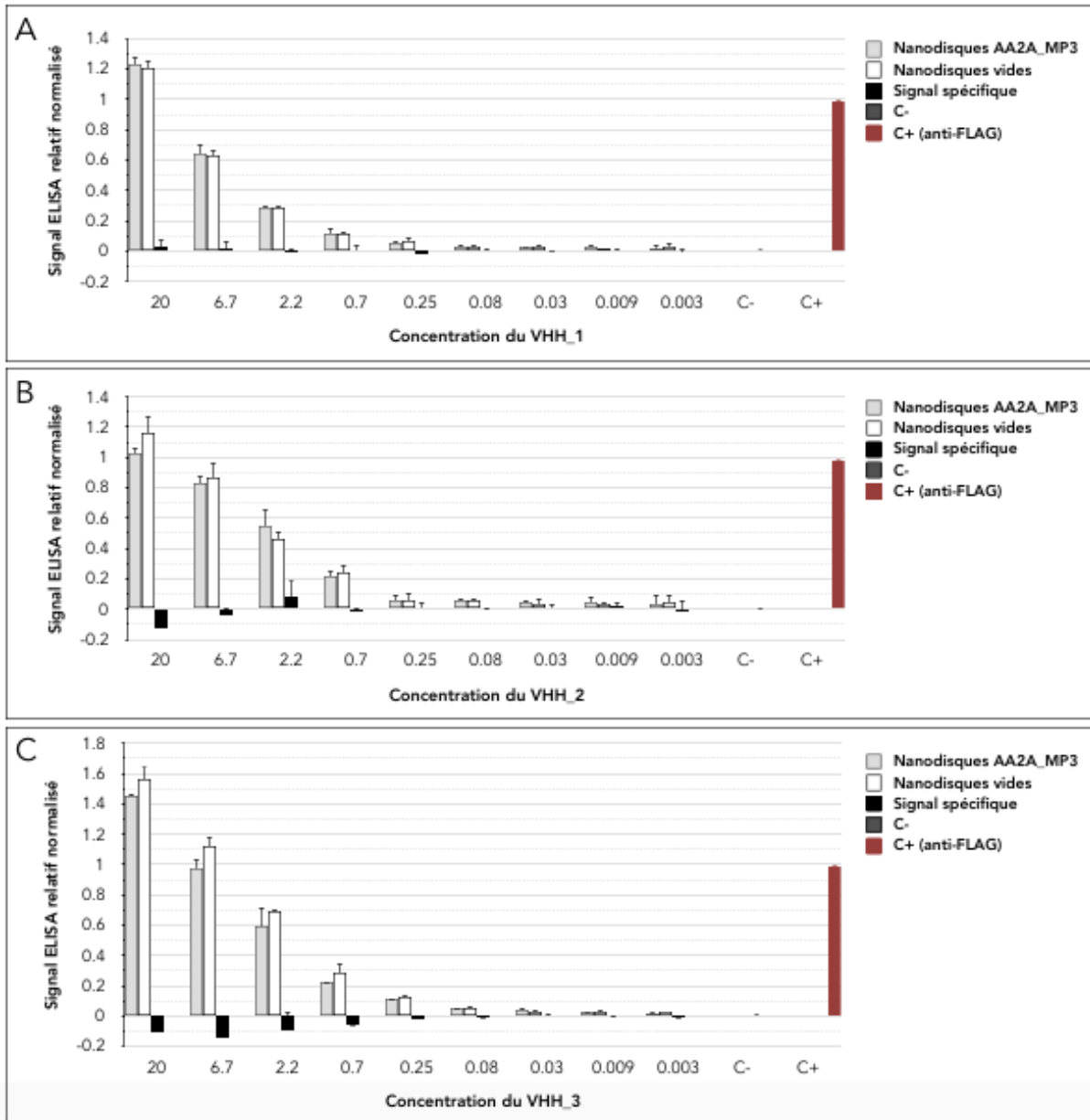
## **3. Caractérisation de trois candidats nanobodies identifiés**

### 3.1. Production et purification

#### 3.1.1. Expression bactérienne

Les V<sub>H</sub>H 1 et 2, clonés dans le phagemide pMECS-GG, sont exprimés en bactéries *E. coli* WK6. Cette souche bactérienne, non suppressive, permet la synthèse périplasmique du V<sub>H</sub>H d'intérêt à partir du phagemide. L'expression est conduite dans 330 mL de milieu TB. Après ajout d'IPTG, la culture est incubée pendant la nuit à 28°C, puis les cellules sont récoltées par centrifugation et stockées à -80°C jusqu'à la purification.

Le V<sub>H</sub>H 3, cloné dans le plasmide pET22b(+), est exprimé en bactéries *E. coli* BL21. Tout comme la souche bactérienne WK6, celle-ci est non suppressive. La bioproduction est conduite dans 100 mL de milieu TB auto-inductible. La culture est alors incubée à 37°C pendant 22 heures avant centrifugation. Les culots secs sont stockés à -80°C jusqu'à la purification.



**Figure 63 : Évaluation de l'interaction des V<sub>H</sub>H purifiés avec le récepteur AA<sub>2A</sub> par test ELISA.** (A) V<sub>H</sub>H 1, (B) V<sub>H</sub>H 2, (C) V<sub>H</sub>H 3. Antigène : 0.8 pmol de nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 biotinylés (signal total) ou 0.8 pmol de nanodisques vides biotinylés (signal non spécifique) par puits, adsorbés via une liaison streptavidine-biotine. Signal spécifique : signal non spécifique soustrait du signal total. Anticorps primaire : gamme de V<sub>H</sub>H purifié. Anticorps secondaire anti-HA révélé avec un anticorps tertiaire anti-souris-HRP. C+ : détection des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 avec un anticorps anti-FLAG. C- : contrôle négatif sans V<sub>H</sub>H. Le signal est normalisé par rapport au contrôle positif.

### 3.1.2. Purification

Un extrait périplasmique des cultures est réalisé grâce à un choc osmotique. La suspension cellulaire est ensuite clarifiée par centrifugation. Le surnageant est mis en contact avec 1 mL de résine nickel pendant la nuit à 4°C. La résine est coulée dans une colonne à usage unique et la purification s'effectue manuellement par gravimétrie.

Les protéines contaminantes sont éliminées par trois lavages successifs contenant respectivement 10 mM et 25 mM d'imidazole, puis 1 M de NaCl. Le V<sub>H</sub>H est ensuite élué avec un pallier de 250 mM d'imidazole, dans un volume de 5 mL. L'échantillon issu de cette chromatographie d'affinité au nickel est noté [H].

Celui-ci est injecté dans sa totalité sur une colonne de gel filtration préparative. Les fractions correspondant au pic d'éluion majoritaire sont regroupées pour former le « pool [S] ». Celui-ci est additionné de 5 % de glycérol puis congelé à -80°C sous forme d'aliquotes individuels. Le rendement obtenu est d'environ 1 mg de V<sub>H</sub>H purifié à partir de 100 mL de milieu de culture.

L'analyse SDS-PAGE des fractions purifiées (**Figure 62**) révèle, pour les trois V<sub>H</sub>H d'intérêt, une bande majoritaire juste au-dessus de 15 kDa, ce qui s'approche du poids théorique attendu. La pureté des échantillons est estimée visuellement comme étant supérieure à 80 %.

### 3.2. Caractérisation de l'interaction avec le récepteur cible

Une gamme de chaque V<sub>H</sub>H purifié est mise en jeu dans un test ELISA présentant des nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 biotinylés. Le signal non spécifique est déterminé en parallèle sur des nanodisques vides biotinylés. La différence entre les deux constitue le signal spécifique.

Les résultats, présentés en **Figure 63**, indiquent que malheureusement, aucun des trois V<sub>H</sub>H n'interagit spécifiquement avec le récepteur AA<sub>2A</sub>.

En conséquence, l'étude portant sur ces trois candidats est interrompue.



## 4. Discussion des résultats

L'objectif de ce second et dernier axe du projet est d'utiliser les virus SFV-AA<sub>2A</sub> recombinants pour générer des anticorps de camélidés spécifiques au récepteur, et de sélectionner les V<sub>H</sub>H d'intérêt à l'aide des outils biochimiques mis en place. L'utilisation du SFV n'a jamais été décrite chez des animaux de cette famille, ce qui renforce le caractère innovant de cette approche. Toutefois, des cas d'encéphalite équine de l'Est, causée par un autre alphavirus, ont été rapportés chez des lamas et des alpagas<sup>322</sup>.

Les expériences d'immunisation ont été confiées à l'équipe de recherche dirigée par le professeur Serge Muyldermans, et le choix s'est porté sur l'alpaga pour de simples raisons logistiques. Ces gros animaux sont précieux et leur coût d'élevage n'est pas négligeable, aussi, contrairement à la souris, la comparaison de plusieurs procédures d'immunisation n'était pas envisageable dans le cadre de ce projet.

### 4.1. La caractérisation du sérum de l'animal immunisé

La titration du sérum de l'animal après immunisation permet de révéler le développement d'une réponse humorale dirigée contre le récepteur AA<sub>2A</sub>. En l'absence de possibilité d'évaluer la surexpression du récepteur dans les tissus injectés, ce résultat constitue à lui seul la preuve que les particules virales recombinantes sont bien prises en charge par les cellules de l'alpaga, et constitue en soi une avancée d'importance.

Cependant, le titre obtenu semble faible. Les résultats des expériences de titration sont rarement publiés, et nous manquons de recul au laboratoire concernant les titres pouvant être attendus suite à l'administration d'un antigène membranaire. Une étude de 2012<sup>323</sup> fait état de l'obtention d'un titre de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  dans le sérum polyclonal d'un lama immunisé avec de la  $\beta$ -lactamase — donc environ 100 à 1000 fois plus important que dans notre cas. En outre, les anticorps conventionnels de l'animal participent également à la séroconversion<sup>323,324</sup>, et ne sont pas discriminés dans le test ELISA mis en œuvre.

Considérés dans leur ensemble, ces éléments tendent à indiquer que les anticorps à chaîne lourde spécifiques au récepteur ne seraient que faiblement représentés dans le sérum, et, en conséquence, dans la banque générée.

### 4.2. Le criblage de la banque et la sélection de clones individuels

Les expériences de caractérisation des récepteurs purifiés décrites dans le premier chapitre de ce manuscrit encouragent nettement l'utilisation de nanodisques lipidiques pour les expériences de criblage. Dans ce format, le récepteur, entouré de lipides, est stable plus longtemps que lorsqu'il est purifié dans une micelle de détergents. Des



nanodisques ont notamment été utilisés avec succès pour sélectionner des nanobodies spécifiques à la bactériorhodopsine<sup>325</sup>, au transporteur métallique bactérien CorA, à la protéine transmembranaire d'archée Mj0480<sup>320</sup>, ou encore au récepteur  $\beta_2$ -adrénergique couplé à la protéine G<sub>s</sub> hétérotrimérique<sup>57,324</sup>.

Dans le criblage mis en œuvre, cependant, les étapes de sélection faisant usage de nanodisques ne permettent pas d'observer un enrichissement important de la banque (données non présentées en détail), contrairement au criblage réalisé sur le récepteur purifié en DDM. Cette différence peut être mise en relation avec la présence, dans la banque, de plusieurs phages tronqués qui génèrent un bruit de fond non spécifique important. Ceux-ci semblent difficiles à éliminer lors des lavages, *a fortiori* lorsque la sélection est réalisée sur des nanodisques, et donc en l'absence totale de détergents.

D'autre part, on note une différence importante des enrichissements lorsque le récepteur est immobilisé sur des billes magnétiques ou au fond d'une plaque ELISA. Dans ce deuxième cas, la quantité de récepteur mise en jeu est limitée par la surface du puits, alors que la quantité de billes peut être augmentée très facilement. Si l'antigène est trop peu représenté durant la sélection, le risque de perdre des V<sub>H</sub>H d'intérêt dès les premiers cycles de sélection est élevé, ce qui est d'autant plus problématique lorsque la banque contient peu de V<sub>H</sub>H spécifiques, comme on le soupçonne ici.

Il semble important de souligner que la technique du phage display est une approche extrêmement puissante qui permet de sélectionner un clone unique parmi une banque comportant plus de 10<sup>7</sup> individus — ce qui s'apparente à retrouver une aiguille dans une botte de foin. La difficulté principale réside dans le nombre presque illimité de conditions expérimentales possibles. Et tant qu'aucun clone d'intérêt n'est identifié, l'optimisation de celles-ci se fait à l'aveugle.

Le criblage réalisé ici a été l'objet de nombreuses modifications des paramètres expérimentaux, avec toutefois un certain manque de points de repères et d'expertise spécifiques à l'utilisation d'antigènes membranaires.

En se fiant uniquement à la qualité des enrichissements observés, et contrairement à notre postulat initial, le criblage en utilisant du récepteur purifié en DDM semble le plus prometteur. Cette conclusion doit cependant être considérée avec précaution, étant donné qu'aucune des conditions de criblage n'a permis de sélectionner un V<sub>H</sub>H spécifique au récepteur d'intérêt.

De la même manière, il apparaît que lors de l'évaluation de la spécificité des clones individuels par le biais d'un test ELISA, les ratios de spécificité sont plus élevés lorsque le test est effectué sur du récepteur purifié en DDM. Mais on observe également que les clones présentant les meilleurs ratios de spécificité correspondent à des séquences de V<sub>H</sub>H tronquées. Ces résultats artéfactuels peuvent être imputés à une dénaturation potentielle du récepteur purifié en DDM présenté sur la plaque ELISA. Les V<sub>H</sub>H sélectionnés ne sont donc pas spécifiques au récepteur sous sa forme native. Cette même

hypothèse peut être étendue au cas du V<sub>H</sub>H 3, qui présente un ratio de spécificité nettement supérieur à 2 lors du pré-criblage ELISA sur le récepteur en DDM, mais qui, une fois purifié, n'interagit pas spécifiquement avec le récepteur en nanodisques.

Les V<sub>H</sub>H 1, 2 et 3 identifiés sont produits et purifiés sans difficulté dans le système bactérien *E. coli*, avec des rendements très satisfaisants. Toutefois, aucun des trois V<sub>H</sub>H n'interagit spécifiquement avec le récepteur AA<sub>2A</sub> présenté sous sa forme native. Ces résultats sont donc, malheureusement, en accord avec les faibles ratios de spécificité obtenus lors du pré-criblage ELISA sur le récepteur en nanodisques.

### 4.3. Perspectives générales

Au vu de la titration du sérum de l'alpaga immunisé, l'utilisation de SFV dans le but de générer des anticorps de camélidés semble être une approche prometteuse. Cependant, et tout comme cela a été le cas chez la souris, l'optimisation de la procédure d'immunisation — à savoir le nombre et l'espace des injections, la quantité de virus injectée, la voie d'injection, la présence d'adjuvants, ... — est nécessaire afin de permettre l'apparition de la meilleure réponse immunitaire possible. De plus, l'existence d'une certaine variabilité inter-individuelle dans la réponse ne peut pas être écartée, et l'administration des virus à plusieurs animaux en parallèle permettrait d'augmenter les chances de réussite.

Le criblage de la banque de V<sub>H</sub>H est vraisemblablement rendu particulièrement délicat par l'efficacité modérée de l'immunisation dans les conditions mises en œuvre, et ce malgré les outils biochimiques de qualité à disposition.

Afin d'essayer d'améliorer la réponse immunitaire et de faciliter les étapes de sélection d'anticorps, une nouvelle série d'immunisations du même animal avec des virus SFV-AA<sub>2A</sub> est actuellement en cours.



# Conclusion générale et perspectives

Le travail réalisé au cours de cette thèse pose les jalons de la mise au point d'une méthode d'immunisation innovante pour générer des anticorps spécifiques à des Récepteurs Couplés aux Protéines G.

L'administration de particules virales SFV recombinantes codant pour le récepteur de l'adénosine A<sub>2A</sub> permet d'engendrer une réponse immunitaire humorale dirigée contre celui-ci. Utilisée sur des souris Balb/c femelle, cette approche permet, après quatre injections, de générer un sérum polyclonal présentant une immunoréactivité avérée contre le récepteur AA<sub>2A</sub> exposé dans un test ELISA. La mise au point d'outils permettant la validation du sérum pour le marquage immunohistochimique du récepteur est actuellement en cours au laboratoire. Cette approche constitue ainsi une voie alternative intéressante pour la production d'anticorps monoclonaux murins. Les mêmes particules virales semblent également prometteuses pour la génération de fragments d'anticorps de camélidés. En effet, quatre administrations de celles-ci à un alpaga engendrent une réponse immunitaire humorale spécifique détectable dans le sérum de l'animal. Toutefois, cette réponse s'avère trop faible pour permettre la sélection de V<sub>H</sub>H d'intérêt par phage display dans les conditions utilisées. L'optimisation de la procédure d'immunisation doit être envisagée pour permettre de poursuivre ce volet de l'étude.

Cette approche est également mise en œuvre sur un deuxième récepteur cible, le récepteur de la mélatonine de type 1. Des particules virales recombinantes codant pour celui-ci sont administrées à des souris dans les mêmes conditions que pour le récepteur AA<sub>2A</sub>. Cette tentative reste, dans ce cas, infructueuse. Plusieurs limites de la méthode sont ainsi mises en évidence.

Tout d'abord, l'utilisation de SFV chez l'animal se heurte aux mêmes barrières qu'en tant que vecteur d'expression *in cellulo*. L'efficacité de cette approche repose sur la capacité du système à induire la production de la protéine d'intérêt sous une forme fonctionnelle, et correctement adressée à la membrane plasmique. En cellules mammifères, les rendements d'expression de RCPG sont variables en fonction des cibles<sup>194</sup>, et cette observation peut très probablement être extrapolée *in vivo*.

De plus, cette technique d'immunisation, si elle représente un moyen de s'affranchir de la nécessité de produire et éventuellement de purifier le récepteur d'intérêt en suffisamment grande quantité pour l'injecter aux animaux, ne permet pas de lutter contre la faible immunogénicité naturelle des récepteurs cibles. Plus le récepteur d'intérêt est compact, avec des extrémités N-terminales et C-terminales courtes, (comme c'est le cas du récepteur MT<sub>1</sub>), plus le nombre d'épitopes potentiels est restreint. D'autre part, le degré de similitude entre le récepteur cible et son homologue chez l'animal hôte choisi doit également être considéré (**Annexe 4**). Les RCPG

présentent en général un degré de conservation très élevé parmi tous les mammifères, rongeurs et camélidés compris. C'est principalement pour cette raison que certains se tournent vers l'immunisation d'animaux phylogénétiquement plus éloignés, comme la poule<sup>326</sup>.

Enfin, outre les difficultés d'immunisation, la nature même du récepteur influe sur son comportement biochimique, et sur la quantité et la qualité des objets purifiés que l'on est capables d'obtenir. Or l'accès à du matériel qualitatif pour la détection, le criblage et la sélection des anticorps générés reste indispensable, ce qui peut constituer une limite non négligeable pour certaines cibles.

Pour conclure, cette approche, bien que prometteuse, doit désormais être éprouvée sur d'autres récepteurs cibles afin de renforcer sa crédibilité. Un travail sur le récepteur à la ghréline GHSR (pour *Growth Hormone Secretagogue Receptor*) a été entamé au laboratoire en collaboration avec l'équipe du docteur Jean-Louis Banères (Institut des Biomolécules Max Moussron, *Montpellier*).





# Annexes

## Tableaux et Figures

*Certains hommes parlent durant leur sommeil.  
Il n'y a guère que les conférenciers pour parler  
pendant le sommeil des autres.*

*Alfred Capus*



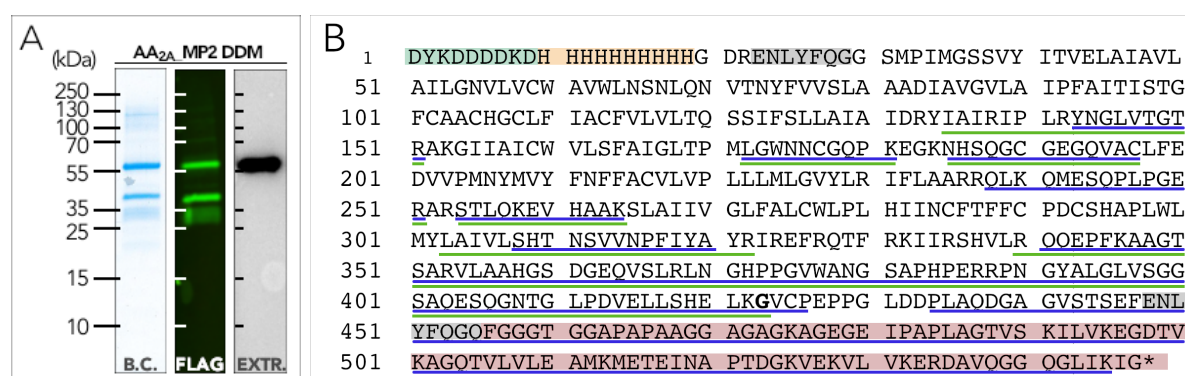
## Annexe 1. Caractérisation des différentes formes du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 par spectrométrie de masse

Le récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 purifié en DDM est déposé sur gel de polycarylamide dénaturant, coloré au bleu de Coomassie après migration, et confié au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (*LSMBO, Strasbourg*).

Brièvement, les protéines extraites des bandes découpées sont digérées à la pepsine et à la trypsine, puis une analyse peptidique est effectuée par nano LC-MS/MS. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Mascot.

La **Figure annexe 1** ci-dessous présente l'allure des bandes analysées ainsi que le recouvrement peptidique obtenu par spectrométrie de masse.

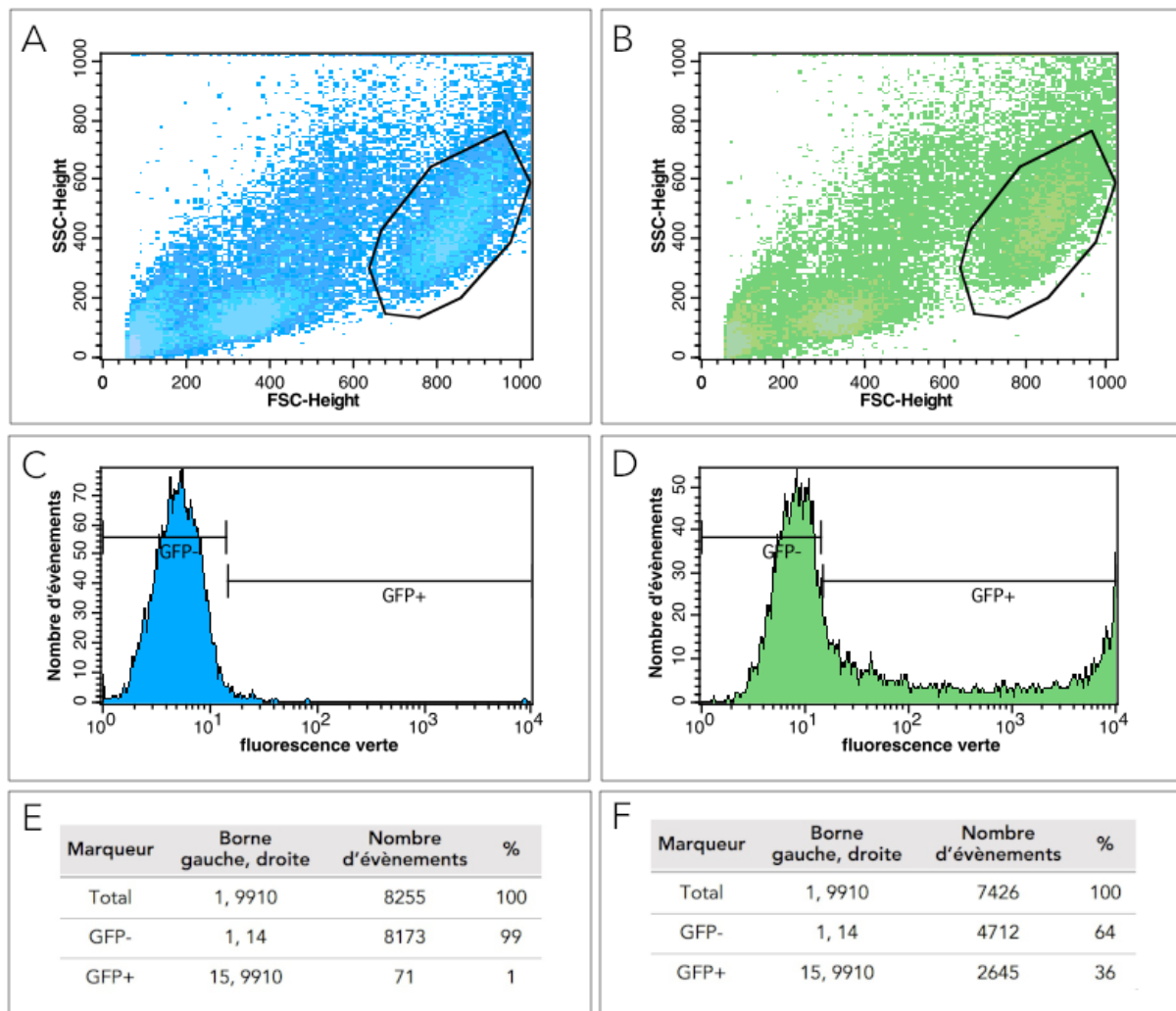
Cette analyse permet de localiser la troncature de la forme clivée du récepteur au niveau de la glycine 423 (à minima). Celle-ci appartient à l'extrémité C-terminale du récepteur, bien au-delà de l'hélice H8 associée à la membrane.



**Figure annexe 1 : Analyse peptidique du récepteur AA<sub>2A</sub>\_MP2 purifié en détergents par spectrométrie de masse.** (A) Analyse SDS-PAGE du récepteur purifié sur gel coloré au bleu de Coomassie (*gauche*), immunodétection avec un anticorps anti-flag (*centre*) et révélation de la biotine au moyen de l'extravidine-HRP (*droite*). (B) **Illustration du recouvrement de séquence des peptides analysés par spectrométrie de masse.** Soulignée en bleu : analyse de la bande correspondant au récepteur sous sa forme complète (migration à 55 kDa). Soulignée en vert : bande correspondant au récepteur tronqué côté C-terminal (migration à 40 kDa). Surligné en vert : étiquette FLAG ; en orange : étiquette décahistidine ; en gris : séquence de clivage de la protéase TEV ; en rouge : séquence de biotinylation.

## Annexe 2. Analyse de cellules HEK fluorescentes par cytométrie en flux

Après infection par les particules virales SFV-eGFP, le pourcentage de cellules fluorescentes est déterminé par cytométrie en flux. La **Figure annexe 2** expose un exemple détaillé des résultats obtenus sur des cellules HEK infectées avec une MOI de 100. Une telle infection conduit à l'obtention de 36% de cellules fluorescentes.

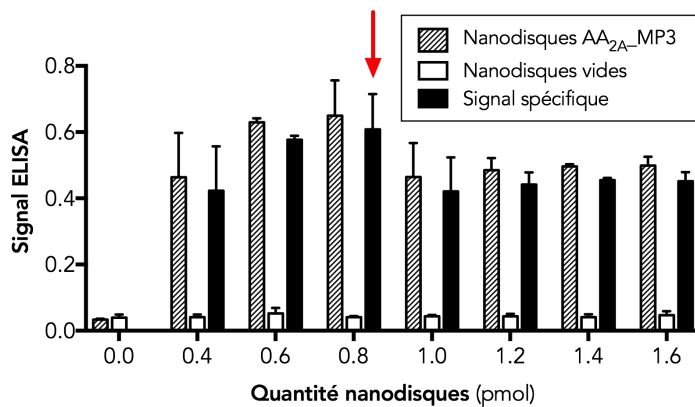


**Figure annexe 2 :** Analyse par cytométrie en flux de la fluorescence verte de cellules HEK infectées par des virus SFV-eGFP. *Colonne de gauche :* contrôle négatif, cellules non infectées. *Colonne de droite :* infection avec une MOI de 100, cellules récoltées et analysées 24 heures après infection. **(A)** et **(B)** Taille (FSC) et granularité (SSC) des particules contenues dans l'échantillon. La zone analysée, correspondant aux cellules vivantes, est cerclée en noir. **(C)** et **(D)** Intensité de fluorescence des cellules analysées. Les zones GFP- et GFP+ sont fixées par rapport au signal de la population de cellules du contrôle négatif. **(E)** et **(F)** Répartition du nombre d'évènements en fonction de l'intensité de fluorescence.

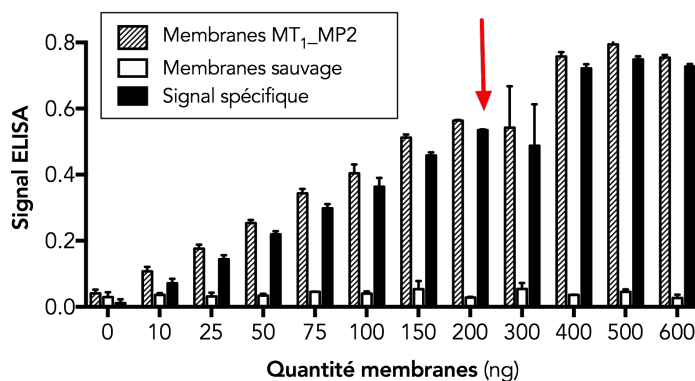
### Annexe 3. Courbes de saturation des antigènes mis en jeu dans les tests ELISA

Les expériences de titration d'anticorps sont réalisées lors de test ELISA mettant en jeu une quantité saturante d'antigène immobilisé par puits. En effet, l'utilisation d'une quantité saturante permet de s'assurer que la variation de signal observée dépend uniquement de la quantité d'anticorps spécifiques contenus dans l'échantillon testé. Celle-ci est déterminée par les courbes de saturation présentées en **Figure annexe 3** et **Figure annexe 4**.

Au vu des résultats, 0.8 pmol de nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 et 200 ng de préparations membranaires MT<sub>1</sub>\_MP2 sont immobilisés par puits pour l'ensemble des tests.



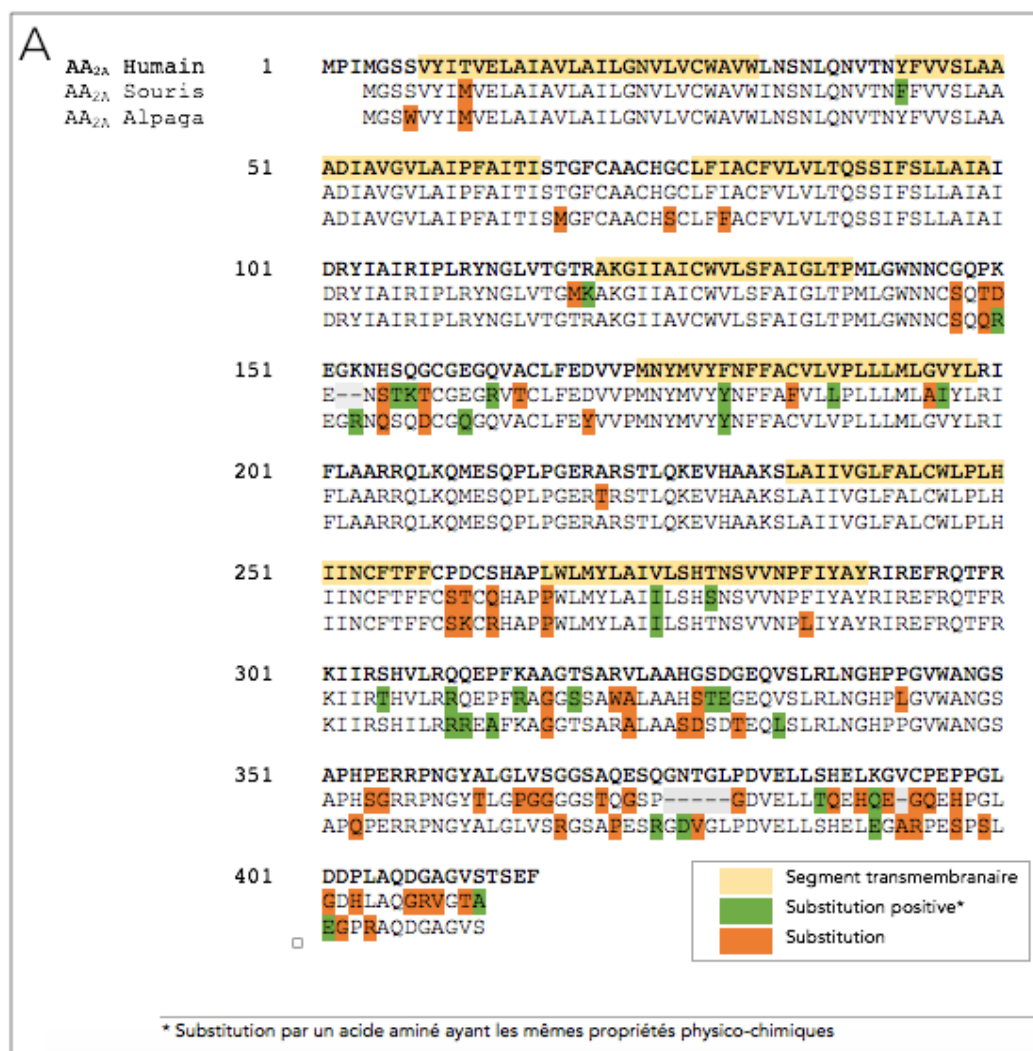
**Figure annexe 3 : Courbe de saturation de nanodisques AA<sub>2A</sub>\_MP3 lors d'un test ELISA.** Antigène : quantités croissantes de nanodisques biotinylés adsorbés via une liaison streptavidine-biotine. Détection des nanodisques par un anticorps primaire anti-FLAG. Signal non spécifique mesuré sur des nanodisques vides. Flèche rouge : quantité saturante mise en jeu dans les tests ultérieurs.



**Figure annexe 4 : Courbe de saturation de préparations membranaires MT<sub>1</sub>\_MP2 lors d'un test ELISA.** Antigène : quantités croissantes de préparations membranaires *Pichia pastoris* recombinantes exprimant le récepteur MT<sub>1</sub>\_MP2, adsorbés via une liaison streptavidine-biotine. Quantité exprimée en protéines membranaires totales. Détection du récepteur par un anticorps primaire anti-FLAG. Signal non spécifique mesuré sur des préparations membranaires *Pichia pastoris* SMD1163 non recombinantes. Flèche rouge : quantité saturante mise en jeu dans les tests ultérieurs.

## Annexe 4. Alignements des séquences des récepteurs AA<sub>2A</sub> et MT<sub>1</sub> et de leurs homologues

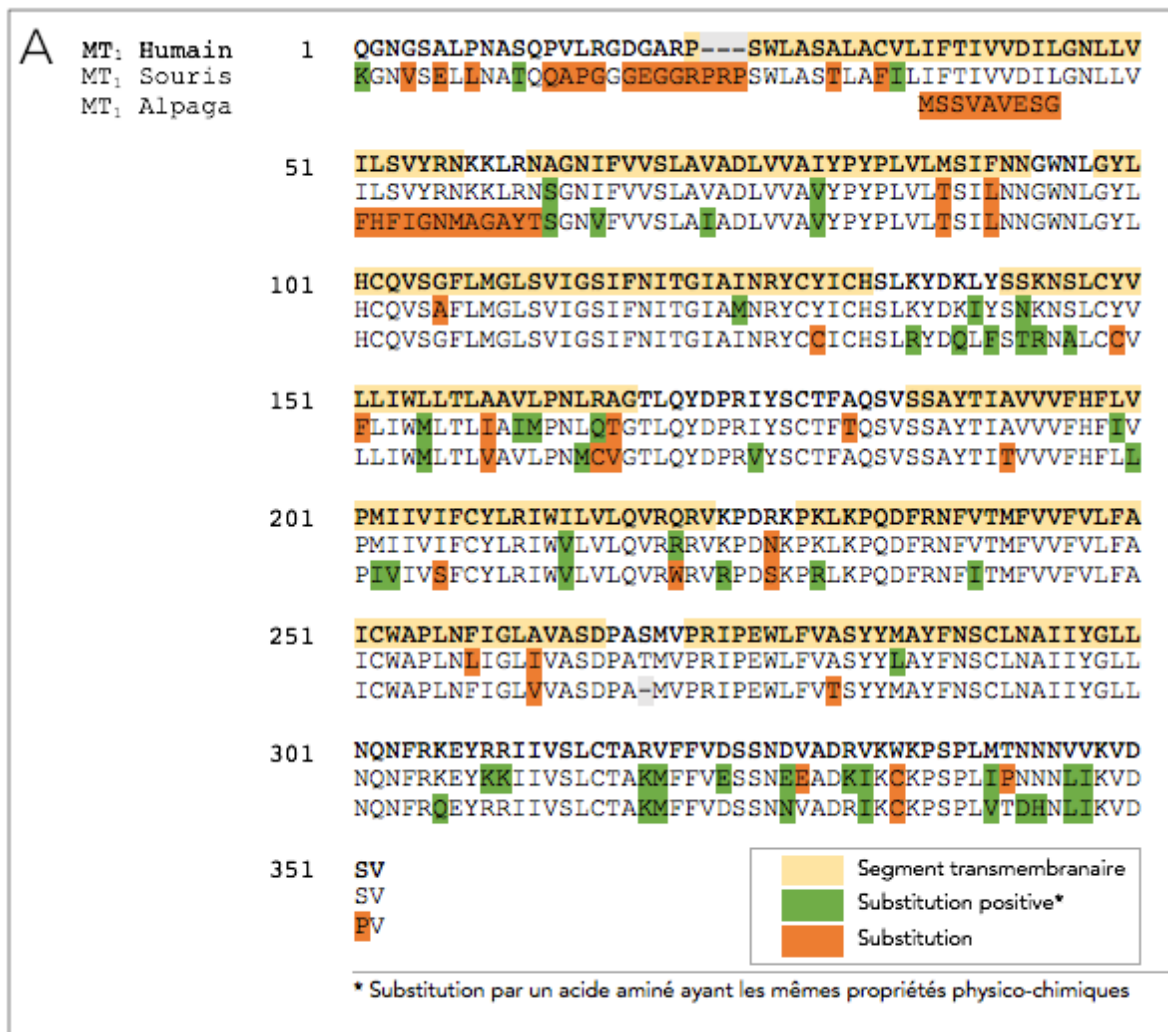
Les RCPG sont communément reconnus comme étant faiblement immunogènes, notamment en raison des fortes similarités de séquence entre les récepteurs homologues. La **Figure annexe 5** et la **Figure annexe 6** présentent de manière détaillée ces homologies pour les récepteurs d'intérêt chez les espèces immunisées.



**B**

Organisme	Référence NCBI	Identité	Résidus positifs
Humain ( <i>Homo sapiens</i> )	NP_000666.2	412/412 (100%)	412/412 (100%)
Souris ( <i>Mus musculus</i> )	NP_033760.2	339/409 (83%)	359/409 (87%)
Alpaga ( <i>Vicugna pacos</i> )	XP_006213343.1	364/409 (89%)	378/409 (92%)

**Figure annexe 5 : Comparaison des séquences protéiques des récepteurs AA<sub>2A</sub> humain, murin et d'alpaga. (A) Alignement par BLASTp des séquences protéiques.** Les segments transmembranaires sont identifiés en jaune sur la séquence de référence, codant pour la version humaine du récepteur. Les résidus indiqués en vert et orange sont les résidus substitués dans les séquences de souris et d'alpaga. **(B) Degré d'identité entre les récepteurs homologues.** Les pourcentages sont indiqués par rapport à la séquence de référence.



**B**

Organisme	Référence NCBI	Identité	Résidus positifs
Humain ( <i>Homo sapiens</i> )	NP_005949.1	349/349 (100%)	349/349 (100%)
Souris ( <i>Mus musculus</i> )	NP_032665.1	294/352 (84%)	322/352 (91%)
Alpaga ( <i>Vicugna pacos</i> )	XP_006198144.1	244/311 (78%)	274/311 (78%)

Figure annexe 6 : Comparaison des séquences protéiques des récepteurs MT<sub>1</sub> humain, murin et d'alpaga. (A) Alignement par BLASTp des séquences protéiques. Les segments transmembranaires sont identifiés en jaune sur la séquence de référence, codant pour la version humaine du récepteur. Les résidus indiqués en vert et orange sont les résidus substitués dans les séquences de souris et d'alpaga. (B) Degré d'identité entre les récepteurs homologues. Les pourcentages sont indiqués par rapport à la séquence de référence.





# Annexes

## Publications Scientifiques

*Patience et longueur de temps  
Font plus que force ni que rage.*

*Jean de la Fontaine*





## **Publication 1.**

### Expression of Eukaryotic Membrane Proteins in *Pichia pastoris*.

Hartmann L., Kugler V., Wagner R.

*Methods in Molecular Biology*, 2016

Volume 1432, pages 143-162

# Chapter 10

## Expression of Eukaryotic Membrane Proteins in *Pichia pastoris*

Lucie Hartmann, Valérie Kugler, and Renaud Wagner

### Abstract

A key point when it comes to heterologous expression of eukaryotic membrane proteins (EMPs) is the choice of the best-suited expression platform. The yeast *Pichia pastoris* has proven to be a very versatile system showing promising results in a growing number of cases. Indeed, its particular methylotrophic characteristics combined to the very simple handling of a eukaryotic microorganism that possesses the majority of mammalian-like machineries make it a very competitive expression system for various complex proteins, in amounts compatible with functional and structural studies. This chapter describes a set of robust methodologies routinely used for the successful expression of a variety of EMPs, going from yeast transformation with the recombinant plasmid to the analysis of the quality and quantity of the proteins produced.

**Key words** *Pichia pastoris*, Yeast, Eukaryotic membrane protein, GPCR, Heterologous expression

---

### 1 Introduction

*Pichia pastoris* is one of the few budding yeasts that have developed a specific methanol utilization metabolism. Upon deprivation of preferential carbohydrates (i.e., sugars, glycerol), the presence of methanol as the unique carbon source actually strongly stimulates the expression of genes involved in its degradation for energy and biomass production [1]. The exceptional expression levels triggered by these tightly regulated methanol-dependent promoters have thus been exploited to constitute one of the most efficient eukaryotic systems used for bioproduction purposes. Up to now indeed, hundreds of proteins have been successfully produced with this host, including more than 70 commercial products (<http://www.pichia.com/science-center/commercialized-products>).

Non-surprisingly, this system has also proven to be very powerful for the recombinant expression of a large number of eukaryotic membrane proteins (EMPs) from various key membrane functions (transport, signaling, enzymatic activities) and diverse

structural organizations (representative membrane-spanning topologies and oligomeric states involving various membrane and cytosoluble subunits). As a strong illustration of its versatility and competitiveness in this domain, the most diverse panel of structure-solved EMPs has been produced with *P. pastoris*, encompassing P-glycoprotein ABC transporters, monoamine oxidases, G-protein-coupled receptors (GPCRs), several aquaporins, and various types of ion channels (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>, as of June 2015).

A full description of the system, its advantages and drawbacks, and how it performs for the production of EMPs in comparison with other expression systems can be found in a number of very complete and authoritative reviews [2–6].

We present here a series of robust and straightforward methodologies and techniques that we routinely apply for the overexpression of EMPs that are intended to be purified for different biochemical and biophysical purposes [7–10]. Exemplified with a panel of representative EMPs, this chapter covers all the procedures needed to handle the expression system, from yeast transformation and clone selection steps down to the inducible expression phases in different formats. Associated analytical experiments performed to evaluate the expression levels and, when possible, the activity of the recombinant EMP, are also described. The following extraction and purification steps are not addressed in this chapter since, from our experience, these procedures are quite systematically protein dependent and request to be set up in a tailored-made fashion.

---

## 2 Materials

### 2.1 Yeast Transformation

1. The recombinant expression vector of your choice that you carefully selected (*see* Subheading 3.1).
2. Restriction enzyme *PmeI* and its specific buffer.
3. Sterile water.
4. Nucleic acid extraction and purification kit (e.g., NucleoSpin kit, Machery-Nagel).
5. Loading dye (e.g., 6× DNA gel loading dye, Thermo Scientific).
6. 1% (w/v) agarose gels supplemented with 0.5 µg/mL ethidium bromide.
7. Additional equipment for agarose gel electrophoresis.
8. 24:24:1 (v/v/v) chloroform:phenol:isoamyl alcohol.
9. Chloroform.
10. 100% (v/v) ethanol, ice cold.

11. 3 M Sodium acetate, pH 4.8.
12. 70% (v/v) ethanol, ice cold.
13. *Pichia pastoris* strain SMD1163 streaked on a YPD plate.
14. YPD agar plates: 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) dextrose, 2% (w/v) agar. Heat sterilize in autoclave.
15. Spectrophotometer .
16. 1 M 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), pH 8.
17. 1 M Dithiothreitol (DTT).
18. 1 M sorbitol, ice-cold.
19. 30 °C Shaking incubator.
20. Electroporation instrument (e.g., Gene Pulser system, BioRad).
21. Sterile 0.2 cm electroporation cuvettes.
22. YNB plates (minimal medium): 1.34% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, 2% (w/v) dextrose, 2% (w/v) agar. Heat sterilize in autoclave.
23. All materials and solutions in contact with the cells must be sterile.

## **2.2 Screening of Recombinant Clones**

1. YPD liquid medium and agar plates: 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) dextrose. For YPD agar plates, add 2% (w/v) agar. Heat sterilize in autoclave. When needed, supplement with appropriate concentrations of antibiotic (typically 50–250 µg/mL geneticin).
2. Spectrophotometer.
3. 100% (v/v) glycerol, autoclave sterilized.
4. 96-Well plate.
5. Sterile toothpicks or inoculating loop.
6. 30 °C Shaking incubator.
7. YEP agar medium (to be dissolved in 700 mL): 10 g Yeast extract, 20 g meat peptone, 20 g agar. Heat sterilize in autoclave.
8. 1 M Phosphate buffer, pH 6: 3.1% (w/v) dipotassium hydrogen phosphate trihydrate ( $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ ), 11.81% (w/v) potassium dihydrogen phosphate ( $KH_2PO_4$ ). Filter sterilize.
9. BMGY agar medium: 700 mL YEP agar medium (still liquid and warm), 100 mL 13.4% (w/v) yeast nitrogen base without amino acid (10× solution, filter sterilized), 100 mL 10% (v/v) glycerol (10× solution, filter sterilized), 100 mL 1 M phosphate buffer, pH 6 (10× solution, filter sterilized).

10. BMMY agar medium: 700 mL YEP agar medium (still liquid and warm), 100 mL 13.4% (w/v) yeast nitrogen base without amino acid (10× solution, filter sterilized), 100 mL 5% (v/v) methanol (10× solution, filter sterilized), 100 mL 1 M phosphate buffer, pH 6 (10× solution, filter sterilized).
11. 14 cm diameter Petri dishes.
12. 0.45 μm Nitrocellulose blotting membrane of a 96-well plate dimension.
13. Lysis buffer: 100 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM β-mercaptoethanol, 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2% (v/v) SDS, and 9 M urea. Dissolve the components at 65 °C.
14. Whatman paper of a 96-well plate dimension.
15. 65 °C Incubator.

### **2.3 Yeast Culturing**

1. Recombinant clones freshly streaked on a YPD plate supplemented with appropriate concentrations of antibiotic (typically 50 μg/mL geneticin)
2. YEP medium (to be dissolved in 700 mL): 10 g Yeast extract, 20 g meat peptone. Heat sterilize in autoclave.
3. 1 M Phosphate buffer, pH 6.
4. BMGY liquid medium: 700 mL YEP medium, 100 mL 13.4% (w/v) yeast nitrogen base without amino acid (10× solution, filter sterilized), 100 mL 10% (v/v) glycerol (10× solution, filter sterilized), 100 mL 1 M phosphate buffer pH 6 (10× solution, filter sterilized).
5. BMMY liquid medium: 700 mL YEP medium, 100 mL 13.4% (w/v) yeast nitrogen base without amino acid (10× solution, filter sterilized), 100 mL 5% (v/v) methanol (10× solution, filter sterilized), 100 mL 1 M phosphate buffer pH 6 (10× solution, filter sterilized).
6. Phosphate-buffered saline (PBS): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7–7.4.
7. Baffled flasks: 250 mL (small-scale culturing), 1 and 2 L (upscale).
8. 30 °C Shaking incubator.
9. Spectrophotometer.

### **2.4 Yeast Cell Lysis and Membrane Preparation**

1. Yeast cell pellet.
2. TNG buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl, 10% (v/v) glycerol, 1 mM PMSF (added extemporaneously).
3. TNGE buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl, 10% (v/v) glycerol, 1 mM PMSF (added extemporaneously), 1 mM EDTA.

4. Acid-washed glass beads (425 to 600  $\mu\text{m}$  diameter, Sigma-Aldrich).
5. High-speed benchtop homogenizer (e.g., FastPrep 24, MP Biomedicals).
6. Ultracentrifuge equipped with an appropriate fixed-angle rotor and adapted polycarbonate bottles.
7. Potter homogenizer.
8. Protein assay kit for the determination of protein concentration (e.g., Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific).

## **2.5 Immuno-detection**

1. 40% Acrylamide/Bis-acrylamide solution, 19:1.
2. 3 M Tris-HCl pH 8.45, 0.3% (w/v) SDS.
3. 80% (v/v) glycerol.
4. 10% (w/v) ammonium persulfate (APS).
5. Tetramethylethylenediamine (TEMED).
6. Gel-casting stand and electrophoresis chamber (e.g., Mini-PROTEAN system, Bio-Rad).
7. Membrane preparation samples.
8. Tris-tricine-SDS cathode running buffer: 1 M Tris-HCl pH 8.2, 1 M tricine, 1% (w/v) SDS.
9. Tris anode running buffer: 1 M Tris-HCl pH 8.9.
10. 2 $\times$  Tricine sample buffer (SB 2 $\times$ ): 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% (v/v) glycerol, 8% (w/v) SDS, 0.02% (w/v) Coomassie blue G250, 200 mM DTT.
11. Tris-glycine transfer buffer: 25 mM Tris base, 200 mM glycine, 0.02% (w/v) SDS, 20% (v/v) ethanol.
12. 0.45  $\mu\text{m}$  Nitrocellulose blotting membrane.
13. Whatman paper.
14. Electroblotting system (e.g., Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad).
15. Phosphate-buffered saline (PBS).
16. PBS containing 0.02% (v/v) Tween 80 (PBST).
17. Blocking buffer: PBST with 5% (w/v) nonfat dry milk.
18. Primary anti-tag or anti-protein antibody (e.g., monoclonal anti-FLAG antibody from mouse, Sigma).
19. Secondary anti-mouse IgG antibody linked to a reporter system (traditionally HRP-conjugated antibody, here an IRD800-coupled antibody).
20. Reagents and detection device adapted to the reporter system selected.
21. Orbital shaker.
22. Microfiltration blotting device (e.g., Bio-Dot apparatus, Bio-Rad).

## 2.6 Radioligand Binding Assay

1. Membrane preparation samples.
2. EMP-specific binding buffer (here: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA).
3. Filter preincubation buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.3% (v/v) polyethylenimine.
4. Washing buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.4.
5. Nonradioactive, EMP-specific ligand, here melatonin.
6. Radiolabeled ligand, here [<sup>3</sup>H]-O-methyl-melatonin (Perkin Elmer).
7. Scintillation cocktail (e.g., Microscint-O scintillation fluid, Perkin Elmer).
8. Low-protein-binding 96-well plate.
9. Shaking incubator.
10. GF/B-grade glass-fiber Unifilters (Perkin Elmer).
11. Scintillation counter.
12. Manifold vacuum filtration apparatus, here a Unifilter-96 harvester (Perkin Elmer).
13. Analysis software (e.g., Prism4, GraphPad Software).

---

## 3 Methods

### 3.1 *P. pastoris* Vector Design and Cloning Procedure

*P. pastoris* expression vectors are built on a classical *E. coli*/yeast shuttle model with components required for *E. coli* amplification (classically one origin of replication and one antibiotic selection marker) and specific elements for heterologous gene expression in *P. pastoris*. These typically include a selectable auxotrophy marker and/or an antibiotic resistance bacterial gene, as well as a promoter and a terminator sequences surrounding a cloning cassette.

The *P. pastoris* system offers a wide range of plasmid backbones, selection markers, promoters, and fusion sequences that can be combined to obtain the best-suited vector for a given protein. For an exhaustive description of the different elements available and guidelines to choose their assembly, we recommend the reader a chapter from a previous volume of the Methods in Molecular Biology series [11] that is fully dedicated to these aspects.

The examples illustrating the methods presented here are based on the utilization of modified pPIC9K vectors (Life Technologies) designed for the large-scale production of EMPs as described in [7] and [10] notably. Briefly, this vector comprises the gene coding for histidinol dehydrogenase (*HIS4*) as an auxotrophy marker, as well as a bacterial gene (*Kan*) conferring *P. pastoris* resistance to geneticin. The gene coding for the protein of interest is expressed under the control of the strong P<sub>AOX1</sub> promoter, which is



induced by methanol in the absence of other preferential carbohydrate source. The recombinant proteins are flanked at their N- and/or C-termini by a panel of tags (Flag, decahistidine, c-myc, biotinylation domain), which are used for analysis and/or purification purposes. If the fusion sequences need to be eliminated during or after the purification process, tobacco etch virus (TEV) protease sites may be inserted on both sides of the protein to be expressed.

### 3.2 Preparation of the Expression Vector

Contrary to other yeast systems, no autonomously replicating vectors are available for *P. pastoris*, so they are designed to be integrated in the yeast genome. This is achieved by homologous recombination events that naturally occur between linearized sequences carried by the plasmids (typically *HIS4* or *P<sub>AOX1</sub>*) and their homologous counterparts present on the genome, leading to the targeted insertion of the expression vector. Moreover, such plasmid insertions frequently occur in tandem in yeasts and thus lead to multiple integration of the gene of interest with an associated impact on its expression levels.

We describe here a transformation protocol based on the electroporation of the *P. pastoris* SMD1163 strain (*his4*, *pep4*, *prb1*) (see **Note 1**).

1. Digest 5–7 µg of the purified expression vector with *PmeI* restriction enzyme (see **Note 2**) according to the manufacturer's instructions (typically mix 5–7 µg of the expression vector with 25 U of *PmeI*, 20 µL of 10× corresponding buffer, and sterile water to a final volume of 200 µL; incubate the reaction for 2 h at 37 °C).
2. Purify the DNA using the NucleoSpin kit. Alternatively to the use of a commercial kit for the purification of restriction-digested plasmids, we routinely perform this phenol-chloroform extraction procedure that yields a high-quality DNA leading to optimal transformation efficiencies (see protocol detailed in **steps 3–10**).
3. Add 400 µL of 24:24:1 (v/v/v) chloroform:phenol:isoamyl alcohol to 200 µL of digestion mixture.
4. Centrifuge for 5 min at 18,000×*g*, room temperature, and transfer the upper aqueous phase to a new 1.5 mL microcentrifuge tube.
5. Add 400 µL of chloroform and vortex thoroughly for about 20 s.
6. Centrifuge for 5 min at 18,000×*g*, room temperature, and transfer the upper aqueous phase to a new 1.5 mL microcentrifuge tube.

7. Add 1 mL of 100% ethanol and 50  $\mu\text{L}$  of 3 M sodium acetate and incubate for at least 1 h at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  to precipitate the DNA.
8. Centrifuge for 30 min  $18,000\times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Discard the supernatant.
9. Wash the pellet with 100  $\mu\text{L}$  of 70% (v/v) ethanol and centrifuge for 5 min at  $18,000\times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Discard the supernatant.
10. Air-dry the pellet for 15 min and then resuspend in 15  $\mu\text{L}$  sterile  $\text{H}_2\text{O}$ .
11. Check the DNA linearization by loading 1  $\mu\text{L}$  of the reaction mix on a 1% (w/v) agarose gel (*see Note 3*).

### **3.3 Preparation of *P. pastoris* Electrocompetent Cells (See Note 4)**

1. To prepare about 500  $\mu\text{L}$  of electrocompetent *P. pastoris* cells, inoculate 100 mL YPD medium with a fresh SMD1163 colony and incubate overnight at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a shaking incubator.
2. Measure the  $\text{OD}_{600}$  of the culture with a spectrophotometer, dilute the culture with 400 mL fresh YPD to obtain an  $\text{OD}_{600}$  of 0.25, and incubate at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (*see Note 5*).
3. When the culture reaches an  $\text{OD}_{600}$  of 1 (approximately after 4 h), harvest the cells by centrifugation in sterile tubes for 5 min at  $4000\times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
4. Discard the supernatant and resuspend the cells in 100 mL YPD, 20 mL of 1 M HEPES pH 8, and 2.5 mL of 1 M DTT. Mix gently until the pellet is resuspended.
5. Incubate for 15 min at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
6. Transfer onto ice and add ice-cold sterile  $\text{H}_2\text{O}$  to a final volume of 500 mL.
7. Pellet the cells by centrifuging for 5 min at  $4000\times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
8. Discard the supernatant and wash the cell pellet with 250 mL ice-cold sterile  $\text{H}_2\text{O}$ .
9. Pellet the cells by centrifuging for 5 min at  $4000\times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
10. Discard the supernatant and resuspend the cell pellet in 20 mL ice-cold 1 M sorbitol by gently mixing.
11. Pellet the cells by centrifuging for 5 min at  $4000\times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
12. Discard the supernatant and resuspend the cell pellet in 500  $\mu\text{L}$  ice-cold 1 M sorbitol by gently mixing.

### **3.4 Electro-transformation and Selection of the Recombinant Clones**

1. Place an electroporation cuvette on ice at least 10–15 min before performing the transformation.
2. Mix gently 40  $\mu\text{L}$  competent cells with 7.5  $\mu\text{L}$  of the linearized DNA in the cuvette and incubate for 5 min on ice.
3. Adjust the electroporation settings as follows: 1500 V, 25  $\mu\text{F}$ , and 400  $\Omega$ .

4. Place the cuvette in the electroporator chamber and apply the electric pulse.
5. Immediately resuspend the electroporated mixture in 1 mL ice-cold 1 M sorbitol and transfer into a sterile tube.
6. Allow the cells to recover for about 1 h at 30 °C, and then pellet the cells by centrifuging for 10 min at 4000×*g*, room temperature.
7. Discard the supernatant and resuspend the pellet in 500 μL of 1 M sorbitol.
8. Spread, respectively, 10% (50 μL) and 90% (450 μL) of electrotransformed cells on each of the two YNB plates and incubate for 2–3 days at 30 °C (*see Note 6*).

### **3.5 Screening of Recombinant Clones**

When using expression vectors comprising the *HIS4* auxotrophy selection marker (e.g., vectors from the pPIC9K series), recombinant yeast clones are selected in two consecutive steps. The first one, performed after the electrotransformation, is based on the recovery of histidine prototrophy through growth ability on minimal medium. The second one is dedicated to the identification of multicopy transformants producing high yields of recombinant proteins. Indeed, a high number of integrated copies often (but not always) correlates with higher expression levels, and it is necessary to screen several His<sup>+</sup> transformants in order to identify a high producer.

To this end, we propose two different procedures: either a classical one in which His<sup>+</sup> transformants are selected on YPD plates containing a range of geneticin concentrations or a more high-throughput immunostaining method named Yeastern blot in which histidine-prototroph clones are grown in expression conditions and lysed directly on a nitrocellulose membranes in a 96-well plate format.

The goal of screening on increasing geneticin concentration is to select clones with geneticin resistance phenotypes representative of the number of expression vector-integrated copies (the higher number of integrated copies, the potentially higher resistance level), before evaluating their performance in terms of EMP expression (*see Note 7*).

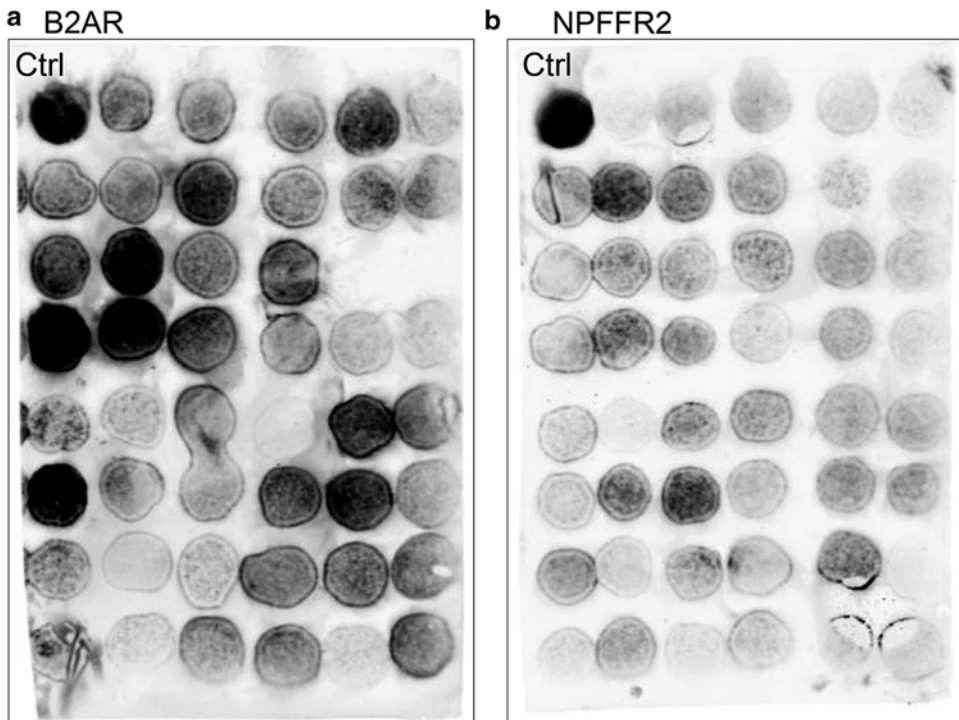
1. Harvest the His<sup>+</sup> transformants with 1 mL of YPD medium poured onto the YNB plates and scrape off all the clones using a sterile scraper.
2. Perform 10× and 100× dilutions and measure the OD<sub>600</sub> for each.
3. Spread an equivalent of 10<sup>5</sup> cells/plate (OD<sub>600</sub> of 1 is equivalent to approximately 5 × 10<sup>7</sup> cells/mL) on YPD plates supplemented with increasing geneticin concentrations ranging from 50 to 250 μg/mL (*see Notes 8 and 9*).

4. Incubate for 2–3 days at 30 °C.
5. Pick 6–12 representative colonies from the different geneticin concentration plates, streak them onto a fresh YPD plate supplemented with 50 µg/mL geneticin, and let them grow for 1–2 days at 30 °C.
6. Directly use these colonies for further expression tests and/or resuspend them in 1 ml of sterile YPD supplemented with 20 % glycerol and store them at –80 °C.

The goal of the high-throughput expression-level screening assay or yeastern blotting that we developed is to screen at once the largest number of EMP-expressing clones with the fewest and simplest handling steps. Therefore, no selection based on geneticin resistance phenotypes is required (*see* **Note 10**).

**Steps 1–8** must be performed in sterile conditions.

1. Fill each well of a 96-well plates with 100 µL YPD supplemented with 20 µg/mL geneticin.
2. Inoculate each well with a single His<sup>+</sup> colony (from the YNB plate) with a sterile toothpick or inoculation loop.
3. Incubate overnight on a shaker at 250 rpm, 30 °C.
4. On the next day, place a sterile nitrocellulose membrane on a BMGY plate (14 cm diameter) avoiding air bubbles.
5. With a multichannel pipette, spot 5 µL of each preculture on the membrane. Add 20 µL sterile glycerol in each well and conserve the plate at –20 or –80 °C.
6. Incubate for about 12 h at 30 °C (plate lid on the top).
7. After incubation, transfer the membrane on a BMMY plate avoiding air bubbles.
8. Incubate for about 20 h at 30 °C (plate lid on the top).
9. In a petri dish, soak 12 Whatman paper sheets in lysis buffer. The liquid level should not recover the last sheet.
10. Transfer the nitrocellulose membrane on top of the Whatman paper pile avoiding air bubbles.
11. Incubate for 4 h at 65 °C.
12. After lysis, rinse generously the membrane with water to get rid of all visible yeast cell traces and proceed to standard immunodetection of the protein of interest as described in Subheading 3.8. Figure 1 presents two examples of GPCR-expressing colonies assayed with this method that are representative of the typical patterns that can be obtained. This immunoblot clearly highlights clones that exhibit high expression levels of the proteins of interest.
13. Streak the high-expressing clones onto a fresh YPD plate supplemented with 50 µg/mL geneticin and let them grow for 1–2 days at 30 °C.



**Fig. 1** Yeastern blot analysis of ca. 96 recombinant *P. pastoris* clones expressing class A GPCRs. **(a)** Flag-tagged human B2AR receptor; **(b)** flag-tagged human NPFFR2 receptor. *Ctrl*: colony expressing the AA2A receptor used as a positive control. After expression induction and direct lysis of the colonies grown on the nitrocellulose membrane, the tagged receptors were immunodetected with an M2 anti-flag antibody

14. Directly use these colonies for further expression tests and/or resuspend them in 1 ml of sterile YPD supplemented with 20 % glycerol and store them at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.6 Yeast Culturing for Membrane Protein Expression

Once interesting transformants have been identified, their expression abilities should be further explored in liquid culture. For expression based on  $P_{AOXI}$ -dependent vectors, yeasts are first cultured in a glycerol-containing medium to an appropriate cell density and growth phase. Transferring the cells into a methanol-containing medium then induces protein expression.

The procedure presented below describes small-scale culturing using shaken baffled flasks, which allows the parallel screening of several clones. It can easily be up-scaled to bigger baffled flasks for the production of larger amounts of EMP (*see Note 11*).

1. Inoculate 50 mL of freshly prepared BMGY medium in a 250 mL baffled flask with a fresh recombinant colony isolated on a YPD agar plate. Incubate on a shaker at 250 rpm,  $30^{\circ}\text{C}$ , ON.
2. On the next day, measure the  $\text{OD}_{600}$  of the culture. Dilute the cells into 50 mL of fresh BMGY medium in a 250 mL flask to achieve an  $\text{OD}_{600}$  of 1 (about  $5 \times 10^7$  cells/mL) and incubate

on a shaker at 250 rpm, 30 °C. This step usually corresponds to a tenfold dilution of the pre-culture.

3. When the culture reaches  $\approx 5$  OD<sub>600</sub> (about 5 h later), pellet the cells by centrifuging in sterile tubes for 5 min at 4000 × *g*, room temperature.
4. Discard the supernatant and resuspend the cell pellet with 50 mL fresh BMMY medium (*see* **Note 12**). Incubate for 18–24 h in a shaker at 30 °C, 250 rpm.
5. After induction, harvest the cells by centrifuging for 5 min at 4000 × *g*, 4 °C.
6. Discard the supernatant and wash the cell pellet with 50 mL PBS. Pellet the cells by centrifuging for 5 min at 4000 × *g*, 4 °C.
7. Discard the supernatant and weigh the cell pellet. At this stage, the cell pellet can either be snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C, or kept on ice to be directly used for membrane preparation.

### **3.7 Yeast Cell Lysis and Membrane Preparation Procedure**

*P. pastoris* cells are surrounded by a thick protective cell wall, resulting in the need to use a robust cell lysis method. The protocol described below involves glass microbeads associated with vigorous mechanical shaking. Programmable equipment such as the FastPrep 24 from MP Biomedicals employed here can be used to achieve reliable and reproducible results. It can also be adapted to various sample volumes and formats (from 1.5 mL microcentrifuge tubes to 50 mL conical centrifuge tubes). However, similar results can be obtained using a basic vortex apparatus in 4–8 cycles of alternating shaking and ice-cooling phases.

1. Resuspend the yeast pellet obtained (about 1 g wet cells) with 10 mL ice-cold TNGE buffer in a 50 mL conical centrifuge tube.
2. Add 5 mL of acid-washed glass beads.
3. Place the tubes on the cell breaker device and proceed to cell lysis by alternating shaking and cooling steps on ice (3 cycles of 40 s each at 6.5 m/s on a FastPrep 24).
4. Centrifuge the samples for 5 min at 4000 × *g*, 4 °C, collect the supernatant, and store at 4 °C.
5. Dissolve the remaining pellet in 10 mL ice-cold TNGE buffer.
6. Repeat steps 3–4 times (or until the supernatant is clear).
7. Centrifuge the collected supernatants for an additional 5 min at 4000 × *g*, 4 °C.
8. Proceed to supernatant ultracentrifugation for 30 min at 100,000 × *g*, 4 °C.

9. Discard the supernatant and resuspend the membrane pellet with a Potter homogenizer in 3 mL ice-cold TNG buffer until a homogeneous suspension is obtained.
10. Determine the protein concentration using the BCA assay kit following the manufacturer's recommendations.
11. Use directly the membrane preparation for expression-level analysis or purification, or store them at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.8 Membrane Analysis Procedure: Immunodetection**

Immunodetection methods allow the determination of the overall amount of the recombinant EMP contained in the membrane preparations. These analyses can be performed using specific antibodies targeted against the EMP of interest or against the tags fused to the protein.

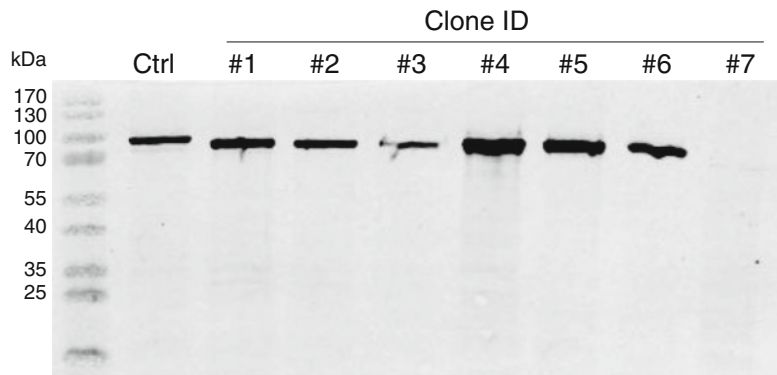
The expression level can either be estimated on membrane samples previously separated by a denaturing SDS-PAGE or directly by spotting membrane preparation on a nitrocellulose membrane with a dot-blot device. Both methods are presented below.

The following proportions are given for casting two gels of 1 mm thickness in a standard Mini-Protean system from Bio-Rad.

1. Prepare the separating gel by mixing 2.5 mL of the acrylamide solution, 3.3 mL Tris-HCl SDS buffer, 1.25 mL 80% (v/v) glycerol, and 2.9 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . Add 90  $\mu\text{L}$  APS and 6  $\mu\text{L}$  TEMED, mix, and immediately cast the gel. Allow space to cast the stacking gel.
2. Prepare the stacking gel by mixing 0.6 mL of the acrylamide solution, 1.6 mL Tris-HCl SDS buffer, and 4.1 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . Add 90  $\mu\text{L}$  APS and 6  $\mu\text{L}$  TEMED, mix, and cast carefully over the separating gel. The presence of glycerol in the separating part avoids the need to wait for its complete polymerization. Insert a 10-well gel comb immediately without introducing air bubbles.
3. Let polymerize for about 30 min.
4. Preincubate 10  $\mu\text{g}$  of membrane preparation in SB 2 $\times$  for about 10 min at room temperature (*see Note 13*).
5. Load the sample in a well of a 10% SDS-polyacrylamide gel. Proceed to electrophoresis using Tris-tricine-SDS cathode running buffer and Tris anode running buffer in a tank unit for about 1 h 30 min at 100 V.
6. Transfer the proteins from the gel to a nitrocellulose membrane by electroblotting in Tris-glycine transfer buffer for about 1 h 30 min at 100 V.
7. Incubate the membrane in 50 mL blocking buffer for 1 h at room temperature on an orbital shaker. Alternatively, incubate the membrane overnight at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
8. Remove the blocking solution and incubate the membrane with the selected antibody diluted in blocking buffer (for

instance a monoclonal anti-flag antibody at a final concentration of 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1 h at room temperature on an orbital shaker.

9. Wash the membrane three times, each time with 50 mL PBST on an orbital shaker for 5 min at room temperature.
10. Remove the PBST and incubate the membrane with the adapted anti-IgG antibody diluted in blocking buffer (typical final concentration of 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1 h at room temperature on an orbital shaker.
11. Wash the membrane three times, each time with 50 mL PBST on an orbital shaker for 5 min at room temperature.
12. Remove the PBST and wash the membrane with 50 mL PBS on an orbital shaker for 5 min at room temperature.
13. Store the membrane in PBS until revelation.
14. Proceed to membrane revelation according to the reporter system selected and following the manufacturer's recommendations. Figure 2 exemplifies a typical Western blot profile obtained for membrane samples prepared from different clones expressing the same EMP construct (here a 1 TM human enzyme). This example illustrates the variation of expression levels that can be observed between clones, from no (clone #7) to low (clone #3) and relatively high (clone #4) amounts of protein produced.

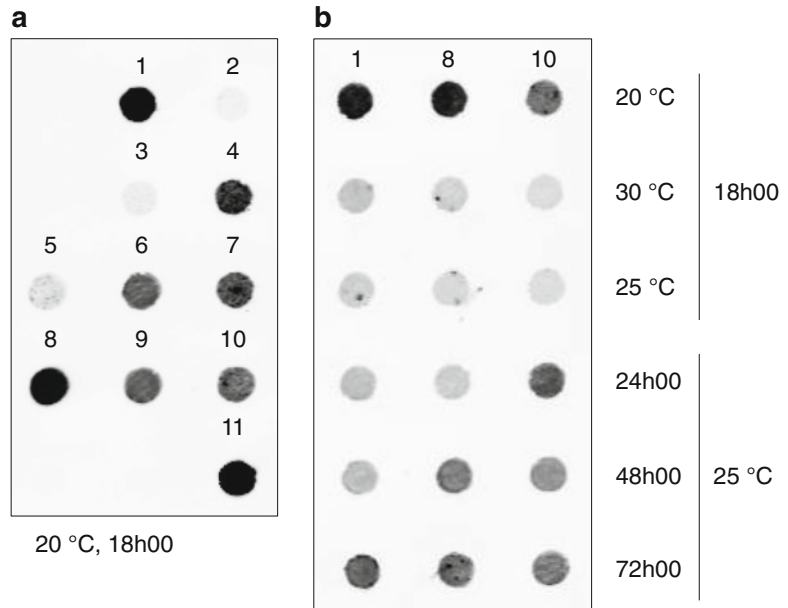


**Fig. 2** Western blot analysis of membrane samples from eight different recombinant *P. pastoris* clones expressing a native 1TM, ER-located, human enzyme. *Ctrl*: membrane sample of a clone used as a positive control, expressing a tagged version of the ER enzyme. Equal amounts of membrane proteins were loaded in each lane (10  $\mu\text{g}$ ). Proteins were separated by a 10% SDS-PAGE and immunoblotted with a protein-specific monoclonal antibody. Molecular weights are indicated in kilodalton (kDa) on the *left*



*For Dot-Blot Immunodetection*

1. Pre-soak with PBS a piece of nitrocellulose membrane and fix it tightly into the microfiltration-blotting device following the manufacturer's instructions.
2. Pipet 100  $\mu\text{L}$  of PBS into each well of the blotting device and let it flow through the nitrocellulose membrane by applying the vacuum.
3. Turn the vacuum off and pipet 5–10  $\mu\text{g}$  of membrane protein samples into the appropriate wells. Incubate for 5 min at room temperature before applying the vacuum.
4. Turn the vacuum on and wash the wells three times, each time with 100  $\mu\text{L}$  PBS.
5. Remove the nitrocellulose membrane from the blotting device and proceed to the blocking and immunodetection reactions (as already described). Figure 3 provides an illustration of how this approach could be helpful in two different applications.



**Fig. 3** Dot blot comparisons of membrane samples from independent *P. pastoris* clones induced in different conditions for the expression of a human class C GPCR. **(a)** Membrane samples from 11 different clones (#1 to #11) induced with methanol for 18 h at 20 °C. **(b)** Membranes from clones #1, #8, and #10 induced at various temperatures (20, 25, and 30 °C) and for different periods of time (18, 24, 48, and 72 h). Equal amounts of corresponding membrane proteins (10  $\mu\text{g}$ ) were loaded in each well of the blotting device and immunoblotted with an M2 anti-flag antibody (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

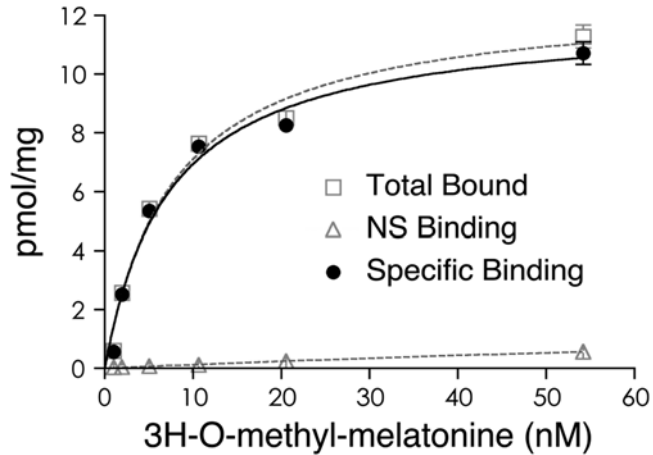
With a higher throughput than a Western blot, the first application (panel A) is the ranking of several individual clones on their capacity to produce the recombinant EMP of interest. In a second direction, this method allows to screen relatively easily a number of parameters that may influence the yields of the expressed protein. The present example notably highlights the significant effect of induction time and temperature on the expression levels of a class C GPCR, but several other parameters may also be influential as shown in a number of studies (*see* **Note 12**).

### **3.9 Membrane Analysis Procedure: Radioligand Binding Assay**

In the case of GPCRs and other ligand-regulated EMPs, ligand binding assays are highly valuable procedures to infer the amounts of active receptors ( $B_{\max}$ ) in a membrane preparation and their affinity ( $K_d$ ) for the ligand tested. These very sensitive and reliable techniques however suppose the availability of protein-specific radiolabeled ligands and an access to a lab facility where radioactive material can be handled.

In the following protocol, a saturation ligand binding procedure is exemplified with a class A GPCR, the MT1 melatonin receptor, assayed with the [ $^3\text{H}$ ]-O-methyl-melatonin used as the tracer radioligand, and the agonist melatonin used to determine the nonspecific binding.

1. Thaw and homogenize membrane preparations on ice.
2. For each concentration of radiolabeled ligand assayed (e.g., 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, and 50 nM), ligand-binding measurements are performed in triplicate for total (T) binding and in parallel for nonspecific (NS) binding (i.e., 6-point measurement for each concentration of radioligand).
3. Fill each T well with 10  $\mu\text{g}$  membrane proteins diluted in 90  $\mu\text{L}$  binding buffer.
4. Fill each NS well with 10  $\mu\text{g}$  membrane proteins diluted in 80  $\mu\text{L}$  binding buffer. Add 10  $\mu\text{L}$  of 100  $\mu\text{M}$  nonradioactive ligand (for a final cold ligand concentration of 10  $\mu\text{M}$ ).
5. Add to each well 10  $\mu\text{L}$  of tenfold concentrated radiolabeled ligand to achieve the concentration range of 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, and 50 nM in a final volume of 100  $\mu\text{L}$ .
6. Incubate at room temperature on a shaker for 2 h to achieve ligand-binding equilibrium.
7. During the incubation or at least 15 min prior to filtration, pre-soak the GF/B filters in filter buffer.
8. Terminate the reactions by a rapid filtration of the samples through the pre-soaked GF/B filters using a vacuum manifold according to the manufacturer's instructions.
9. Wash the filters three times with ice-cold washing buffer.



**Fig. 4** Radioligand binding saturation curve determined on membranes of a *P. pastoris* clone expressing the human MT1 melatonin receptor. The specific binding curve (*black circles*) is calculated by subtracting the nonspecific (*triangles*) to the total (*squares*) binding values. Data are fitted using the one-site saturation binding model

10. Let the 96-well plate filter dry and add 40  $\mu$ L scintillation cocktail.
11. Incubate the vials for 2 h in the dark before proceeding to counting.
12. Subtract the NS from the T values to determine specific (S) binding values. Analyze the data by nonlinear regression using appropriate software.

Figure 4 represents a typical saturation binding curve obtained with membranes of a *P. pastoris* clone expressing the MT1 receptor. In the present case, the GraphPad Prism software determined from these data a  $B_{\max}$  value of  $11.9 \pm 0.4$  pmol/mg and a  $K_D$  of  $7.2 \pm 0.8$  nM. According to the conversion factors detailed in [3], the total number of ligand-binding sites ( $B_{\max}$ ) present in this membrane sample approximately corresponds to about 0.5 mg of active receptor produced per 1 l of culture. On the other side, the measured  $K_D$  value suggests that the affinity of MT1 for its agonist ligand melatonin is decreased about tenfold in *P. pastoris* membranes compared to the receptor expressed in mammalian cells [10].

## 4 Notes

1. A number of *P. pastoris* strains that are frequently used for EMP expression present an auxotrophic behavior for histidine due to a histidinol dehydrogenase deficiency (*his4* genotype). The prototrophy for histidine can be restored upon transfor-

mation with a series of pPIC vectors bearing the *HIS4* gene, thereby allowing positive selection of the transformants on minimum medium. Strains from the SMD series bear additional deficiencies in endogenous proteases (*pep4*, *prb1* for SMD1163) and are often preferred for this convenient phenotype (*see* ref. 10 for more details).

2. *PmeI* is used to linearize the expression vector in the  $P_{AOXI}$  promoter, thus favoring its integration at the homologous  $P_{AOXI}$  genomic locus. The absence of the *PmeI* site in the gene to be expressed should be checked; otherwise several fragments would be generated instead of a linearized vector. In case *PmeI* is present, another restriction enzyme that cut only once in the  $P_{AOXI}$  or *HIS4* sequences of the vector can be selected instead (*SacI* or *SaII* for instance).
3. When the plasmid is correctly linearized, one single DNA band of the corresponding size should be observed. If additional bands of nonlinearized plasmid are present, proceed back to **step 1** and double the amount of *PmeI* restriction enzyme.
4. Unlike bacteria, yeast cells cannot conserve their competence properties when stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Electrocompetent *P. pastoris* cells should then be prepared extemporaneously before each transformation experiment.
5. One OD<sub>600</sub> unit measured with an Eppendorf Biophotometer approximately corresponds to  $5 \times 10^7$  cells/mL. In order to keep a proper OD<sub>600</sub>/cell density proportionality, be also aware that it is important to dilute the cell culture before the spectrophotometer measurement so that OD<sub>600</sub> values do not exceed *ca.* 0.3 (higher values are underestimating the actual cell density).
6. Commercial vectors from the pPICZ series (Life Technologies) do not contain the *HIS4* auxotrophy marker and the geneticin resistance gene present on the pPIC9K vectors. They comprise instead a single resistance marker to zeocin antibiotic. In this case, positive transformants are isolated on YPD plates containing a low zeocin concentration (e.g., 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) before proceeding to the screening of expressing clones.
7. Direct selection of transformants on geneticin-containing medium is not recommended. Indeed, the level of resistance is dependent on the cell density and false-positive clones may be isolated. In addition, high concentration of antibiotics applied directly after transformation may eliminate potentially valuable clones that have not fully recovered from electroporation nor achieved homologous recombination.
8. Because of its mutations conferring protease deficiencies, the strain SMD1163 exhibits a relatively high susceptibility to

geneticin and the concentration range of antibiotic should be reduced to 50–250 µg/mL. When using other strains, recombinant clones may be selected on YPD plates supplemented with up to 2 mg/mL geneticin.

9. When using vectors from the pPICZ series, zeocin concentrations ranging from 25 to 1500 µg/mL may be applied.
10. This second procedure enables to screen a high number of transformants within a shorter time frame. However, for difficult-to-express membrane proteins, a combination of both methods can be beneficial (e.g., a Yeastern Blot performed with clones selected on high geneticin concentrations).
11. This protocol can be applied to larger culturing format. It is however recommended to maintain a 1:5 ratio between the volume of the culture and the total volume of the selected baffled flasks for an optimal aeration of the culture. Robust procedures for large-scale culturing in bioreactors are also available [12] but are less straightforward to handle as they necessitate specific equipment and a succession of culturing conditions before the induction step.
12. BMMY induction medium can be supplemented with different components depending on the protein expressed. In particular, dimethyl sulfoxide (DMSO) supplemented at 2.5% (v/v) has been shown to increase remarkably the production yield of ligand-binding active GPCRs [7]. Similarly, adding a ligand specific to the receptor to be produced has been highly beneficial for a large majority of the GPCRs tested [7], probably playing the role of a pharmacological chaperone [13].
13. It is usually not recommended to boil membrane protein samples prior to electrophoresis. When compact and highly hydrophobic proteins such as GPCRs are boiled, they usually aggregate and keep stuck in the stacking gel.

## References

1. Gellissen G (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 54(6):741–750
2. Cereghino JL, Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24:45–66
3. Sarramegna V, Talmont F, Demange P, Milon A (2003) Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification. *Cell Mol Life Sci* 60(8):1529–1546
4. Alkhalfioui F, Logez C, Bornert O, Wagner R (2011) Expression systems: *Pichia pastoris*. In: Robinson AS (ed) *Production of membrane proteins—strategies for expression and isolation*. Wiley-VCH, Weinheim. doi:10.1002/9783527634521
5. Bill RM (2014) Playing catch-up with *Escherichia coli*: using yeast to increase success rates in recombinant protein production experiments. *Front Microbiol* 5:85
6. Bertheleme N, Singh S, Dowell S, Byrne B (2015) Heterologous expression of G-protein-coupled receptors in yeast. *Methods Enzymol* 556:141–164
7. André N, Cherouati N, Prual C, Steffan T, Zeder-Lutz G, Magnin T, Pattus F, Michel H,

- Wagner R, Reinhart C (2006) Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in *Pichia pastoris* to levels required for structural studies via a single expression screen. *Protein Sci* 15:1115–1126
8. Magnin T, Fiez-Vandal C, Potier N, Coquard A, Leray I, Steffan T, Logez C, Alkhalfioui F, Pattus F, Wagner R (2009) A novel, generic and effective method for the rapid purification of G protein-coupled receptors. *Protein Expr Purif* 64(1):1–7
  9. Bornert O, Møller TC, Boeuf J, Candusso MP, Wagner R, Martinez KL, Simonin F (2013) Identification of a novel protein-protein interaction motif mediating interaction of GPCR-associated sorting proteins with G protein-coupled receptors. *PLoS One* 8(2):e56336
  10. Logez C, Berger S, Legros C, Banères JL, Cohen W, Delagrangé P, Nosjean O, Boutin JA, Ferry G, Simonin F, Wagner R (2014) Recombinant human melatonin receptor MT1 isolated in mixed detergents shows pharmacology similar to that in mammalian cell membranes. *PLoS One* 9(6):e100616
  11. Logez C, Alkhalfioui F, Byrne B, Wagner R (2012) Preparation of *Pichia pastoris* expression plasmids. *Methods Mol Biol* 866:25–40
  12. Singh S, Gras A, Fiez-Vandal C, Martinez M, Wagner R, Byrne B (2012) Large-scale production of membrane proteins in *Pichia pastoris*: the production of G protein-coupled receptors as a case study. *Methods Mol Biol* 866:197–207
  13. Bernier V, Bichet DG, Bouvier M (2004) Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol* 4(5):528–533



**Publication 2.** Direct Extraction and Purification of Recombinant Membrane Proteins from *Pichia pastoris* Protoplasts.

Hartmann L., Metzger E., Ottelard N., Wagner R.

*Methods in Molecular Biology*, 2017

Volume 1635, pages 45-56



## Direct Extraction and Purification of Recombinant Membrane Proteins from *Pichia pastoris* Protoplasts

Lucie Hartmann, Estelle Metzger, Noémie Ottelard, and Renaud Wagner

### Abstract

In the past decade, the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has proved to be one of the most efficient systems for mass production of recombinant eukaryotic membrane proteins (MPs), leading to the crystallization and structure determination for a variety of them. The actual overexpression of functional MPs achieved with this system is, however, often accompanied by the formation of a variable but significant proportion of misfolded and/or aggregated proteins that are co-extracted and co-purified during the purification process. In order to minimize this unwanted phenomenon, we devised a novel procedure in which MPs produced in *Pichia pastoris* are directly solubilized from whole cells instead of crude membrane preparation. This approach aims at favoring the extraction of correctly folded membrane proteins that have been targeted to the plasma membrane, limiting the solubilization of the misfolded proteins and protein aggregates that are stored in internal membrane compartments. The method described herewith is based on the formation of protoplasts through enzymatic treatment prior to protein solubilization. This chapter details a set of protocols going from yeast cell preparation and protein solubilization to purification using affinity and size exclusion chromatography.

**Key words** *Pichia pastoris*, Yeast, Membrane protein, Protoplast, Detergent solubilization, Purification

---

### 1 Introduction

When coping with membrane protein (MP) solubilization from any cellular expression system, the most common approach consists in the preliminary preparation of the membrane fraction. This membrane enrichment step can be quite valuable during the downstream extraction and purification phases by reducing the amount of soluble proteases as well as potential soluble contaminants from the sample.

However, membrane fractionation necessarily involves cell lysis procedures that could be more or less drastic. When harsh mechanical conditions are used, undesired and poorly controlled events such as heat and shear forces may occur that are often detrimental to the integrity of membrane proteins.

In addition, standard MP protocols usually recover the whole membrane fractions issuing from the different cellular compartments and containing a mixture of properly folded and misfolded proteins. Even if this phenomenon is still poorly characterized in the context of membrane protein production, it is actually widely recognized that overexpression overwhelms the cell biosynthesis and translocation machineries that often elicits improper MP folding. Such events cause a number of stresses and responses with various outcomes including the retention of misfolded proteins within the secretory pathway and the formation of protein aggregates before their eventual degradation [1, 2]. As a result, when preparing membranes for protein purification purposes, the following solubilization step may lead to the co-extraction of various heterogeneous forms of the protein of interest that are further difficult to separate.

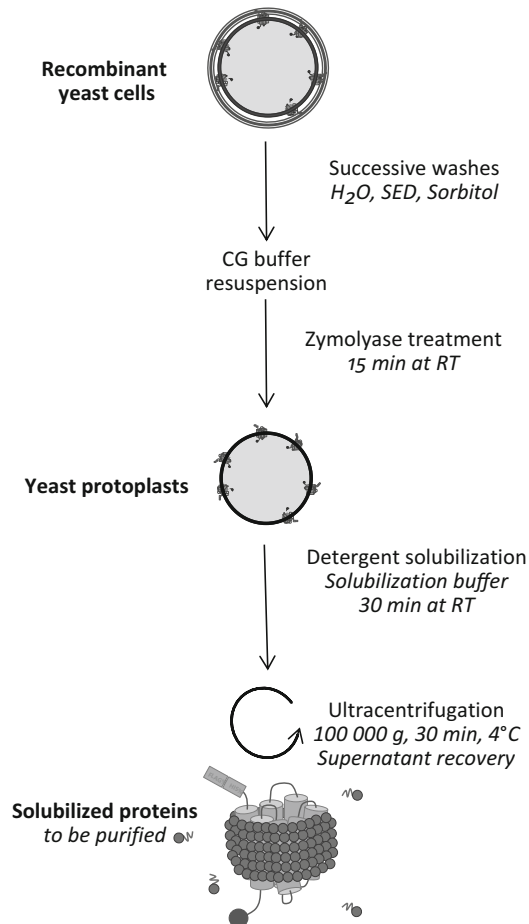
The protocol presented here proposes to limit these phenomena by performing a short solubilization step directly on whole cells in order to favor the extraction of the undamaged, correctly folded MPs that have been targeted to the plasma membrane.

This method has been developed in our lab with the yeast *Pichia pastoris*, a robust and versatile system that we routinely use for the recombinant expression of various MPs [3–7]. Because this cellular host possesses a very thick and robust cell wall that is detergent-resistant, a preliminary enzymatic treatment is required to obtain yeast protoplasts (*i.e.*, yeast cells devoid of their cell wall) before the detergent solubilization and purification steps.

The whole procedure has been successfully applied to a variety of eukaryotic (mainly human) MPs recombinantly expressed in *P. pastoris*, encompassing GPCRs, ion channels, and other integral MPs. By comparison with the standard procedure where the same proteins were extracted from membrane preparations after cell lysis, the method not only proved to be much more rapid, but, most importantly, allowed significantly reducing the presence of protein aggregates after purification in several cases.

Here, we illustrate this method with the solubilization and purification of the human adenosine A2A receptor extracted from yeast protoplasts. The starting biological material consists of yeast pellets obtained after the expression of a N-Flag-10His-HUMAN\_AA2A-Biotag construct, following the conditions reported in [3]. A full description of the generation and selection of *Pichia pastoris* clones, as well as the subsequent procedures for recombinant expression, can be found in other recent and comprehensive chapters of the Methods in Molecular Biology series [8, 9].

The present protocol reports the enzymatic treatment of yeast cells expressing recombinant protein to obtain protoplasts, which are then directly subjected to detergent solubilization (Fig. 1). A subsequent two-step purification procedure (Ion Metal Affinity



**Fig. 1** Protoplasting and protein solubilization procedure. Recombinant yeast cell pellet is first submitted to Zymolyase<sup>®</sup> treatment for cell wall degradation. The protoplasts formed are then directly used for protein solubilization using detergents. An ultracentrifugation step enables to recover the solubilized fraction that will undergo the purification process

Chromatography and Size Exclusion Chromatography) is also presented to illustrate the yield and purity of the MPs that can be isolated with this method.

## 2 Materials

### 2.1 Zymolyase<sup>®</sup> Treatment

1. Recombinant cell pellet.
2. Milli-Q water.
3. SED buffer: 1 M sorbitol, 25 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 M dithiothreitol (DTT) (added extemporaneously).

4. 1 M sorbitol.
5. CG buffer: 20 mM trisodium citrate, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (added extemporaneously). Adjust the pH to 5.8 with hydrochloric acid.
6. Zymolyase<sup>®</sup> 20 T (Amsbio, UK). It can be resuspended in water at 200 U/mL and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for a few months.

## **2.2 Protein Solubilization**

1. Solubilization buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 20 mM imidazole (*see Note 1*), detergent (*see Note 2*), inhibitor protease cocktail (added extemporaneously, e.g., cOmplete<sup>™</sup> EDTA-free, Roche, France).
2. Ultracentrifuge equipped with an appropriate fixed-angle rotor and adapted polycarbonate tubes.

## **2.3 Purification of Solubilized Material**

1. Automated protein purification system (AKTA Purifier, GE Healthcare, or equivalent). A sample pump or a superloop is required for the affinity chromatography step.
2. 1 mL prepacked nickel affinity chromatography column (e.g., HisTrap HP 1 mL, GE Healthcare).
3. 0.22  $\mu\text{M}$  syringe filter.
4. Buffer A: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, detergent (*see Note 2*).
5. Buffer B: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, detergent (*see Note 2*).
6. Centrifugal protein concentrator (e.g., Vivaspin 6, Sartorius, cutoff adapted to the protein of interest).
7. Size Exclusion Chromatography (SEC) column (e.g., Superdex 200 Increase 10/300, GE Healthcare).
8. SEC running buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, detergent (*see Note 2*).

## **2.4 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)**

1. 40% Acrylamide/Bis-acrylamide solution, 29:1.
2. 3 M Tris-HCl pH 8.45, 0.3% (w/v) SDS.
3. 80% (v/v) glycerol.
4. 10% (w/v) ammonium persulfate (APS).
5. Tetramethylethylenediamine (TEMED).
6. Gel casting stand and electrophoresis chamber (e.g., Mini-PROTEAN system, Bio-Rad).
7. Membrane preparation samples.
8. Tris-Tricine-SDS cathode running buffer: 1 M Tris-HCl pH 8.2, 1 M Tricine, 1% (w/v) SDS.
9. Tris anode running buffer: 1 M Tris-HCl pH 8.9.

10. 2× Tricine Sample Buffer (SB 2×): 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% (v/v) glycerol, 8% (w/v) SDS, 0.02% (w/v) Coomassie blue G250, 200 mM DTT.

### 2.5 Protein Transfer and Western Blot Immunodetection

1. Tris-Glycine transfer buffer: 25 mM Tris, 200 mM glycine, 0.02% (w/v) SDS, 20% (v/v) ethanol.
2. 0.45 μm nitrocellulose blotting membrane.
3. Whatman paper.
4. Electroblotting system (e.g., Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad).
5. Phosphate-buffered saline (PBS).
6. PBS containing 0.02% (v/v) Tween 80 (PBST).
7. Blocking buffer: PBST with 5% (w/v) nonfat dry milk.
8. Primary anti-tag or anti-protein antibody (e.g., monoclonal anti-FLAG antibody from mouse, Sigma).
9. Secondary anti-mouse IgG antibody linked to a reporter system (traditionally HRP-conjugated antibody, here an IRDye 800-coupled antibody).
10. Reagents and detection device adapted to the reporter system selected.
11. Orbital shaker.

---

## 3 Methods

### 3.1 Protoplasting: Zymolyase<sup>®</sup> Treatment of Recombinant Cell Paste

Zymolyase<sup>®</sup> is a mixture of several carbohydrases (i.e., β-1,3 glucan laminaripentaohydrolase, β-1,3 glucanase, protease and mannanase) extracted from *Arthrobacter luteus*. These enzymes work in conjunction to degrade efficiently the cell wall of a large spectrum of yeasts, thus leading to the formation of yeast protoplasts. A number of other enzymes for yeast cell wall degradation are commercially available but Zymolyase<sup>®</sup> has proved to be the most efficient in our hands for this protocol with *Pichia pastoris*.

#### 3.1.1 Cell Paste Preparation

The following proportions are given for 3 g of wet cell paste, obtained from about 250 mL of *Pichia pastoris* culture.

1. Resuspend the cell pellet in 50 mL Milli-Q H<sub>2</sub>O.
2. Harvest the cells by centrifuging for 5 min at 5000 × g, 4 °C.
3. Discard the supernatant and wash the cell pellet with 50 mL SED buffer.
4. Harvest the cells by centrifuging for 5 min at 5000 × g, 4 °C.
5. Discard the supernatant and wash the cell pellet with 50 mL 1 M sorbitol.
6. Harvest the cells by centrifuging for 5 min at 5000 × g, 4 °C.

7. Discard the supernatant and resuspend the cell pellet in 37.5 mL of CG buffer, in order to reach a cell paste concentration of about 80 g/L.

### 3.1.2 Enzymatic Cell Wall Degradation

1. Add 20 U of Zymolyase<sup>®</sup> per gram of cell paste initially prepared.
2. Incubate for 15 min (*see Note 3*) at room temperature under gentle agitation (*see Note 4*).
3. Harvest the protoplasts formed by a soft centrifugation for 5 min at  $750 \times g$ , room temperature. In order to avoid protoplast lysis, reduce the acceleration and deceleration speed of the centrifuge.
4. Carefully discard the supernatant using a pipette.

## 3.2 Protein Solubilization

As for every MP solubilization, the successful selection of the best detergent to use is a fine-tuned combination between the extraction efficiency and the preservation of the protein fold and function. It both depends on the protein of interest and the expression system. The choice of the detergent, here DDM for AA2A, has thus to be adjusted accordingly (*see Note 2*).

1. Gently resuspend the pellet in 37.5 mL of solubilization buffer (no vortexing). The cell paste concentration should be close to 80 g/L.
2. Incubate for 30 min at room temperature under gentle agitation.
3. Separate the solubilized fraction by ultracentrifuging for 30 min at  $100,000 \times g$  and 4 °C. Store 20 µL of the suspension before ultracentrifugation at 4 °C for SDS-PAGE analysis.
4. After ultracentrifugation, recover the supernatant containing the solubilized fraction. Store 20 µL at 4 °C for SDS-PAGE analysis.
5. The ultracentrifuge pellet can also be analyzed by SDS-PAGE after resuspension in 37.5 mL of solubilization buffer without detergents, imidazole, and protease inhibitor cocktail. Use a glass Teflon homogenizer to obtain a homogeneous suspension.

## 3.3 Purification of Solubilized Material

### 3.3.1 Nickel Affinity Chromatography

The following protocol is designed for automated purification (e.g., using AKTA protein purification systems). It can however be easily adapted for batch/gravity flow purification. The whole purification process can be performed at a flow rate of 1 mL/min.

1. Filter the ultracentrifuge supernatant using a 0.22 µm syringe filter.
2. Add imidazole at a final concentration of 20 mM.

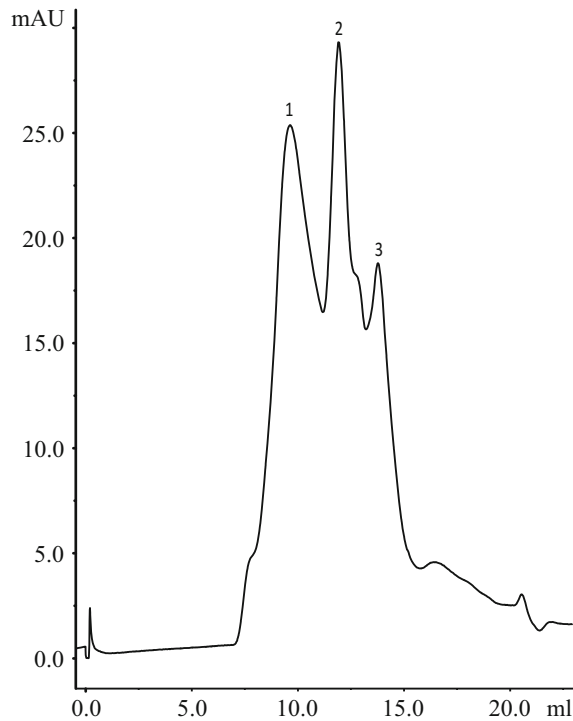
3. Equilibrate a 1 mL prepacked nickel affinity column with buffer A.
4. Inject the filtrated supernatant onto the column. Store 20  $\mu$ L of the injected sample at 4 °C for SDS-PAGE analysis.
5. Wash with 20 mL of buffer A, or until the 280 nm-absorbance signal returns to the baseline.
6. Wash for 10 mL with 20% buffer B (corresponding to about 100 mM imidazole) (*see Note 5*).
7. Elute the protein of interest either with a gradient of buffer B or with a step of 100% buffer B (*see Note 6*). Collect 0.5 mL elution fractions.
8. Pool the fractions representative of one elution peak and concentrate them, using a centrifugal concentrator, to a volume suited for injection onto the size exclusion chromatography column (according to the manufacturer's recommendations, typically a maximum of 500  $\mu$ L for a 24 mL column). For concentration, choose a cutoff adapted to the size of the protein of interest (typically 30 or 50 kDa MWCO).
9. Store 20  $\mu$ L of the concentrated pool of interest and all other representative elution fractions (flow through and wash fractions) at 4 °C for SDS-PAGE analysis.

### 3.3.2 Size Exclusion Chromatography (SEC)

The following protocol is designed for automated purification (e.g., using AKTA protein purification systems). Superdex 200 10/300 SEC column or equivalent is generally well suited for small-scale preparative purification of MPs between 10 kDa and 600 kDa.

1. Equilibrate the SEC column with at least 1.5 column-volume (CV) of running buffer.
2. Inject the concentrated sample. Set the flow rate according to the manufacturer's recommendations. Collect 0.5 mL elution fractions.
3. Store 20  $\mu$ L of each peak-representative fraction at 4 °C for SDS-PAGE analysis.

Figure 2 shows a typical SEC elution profile obtained during the purification of the adenosine A2A receptor using the procedure described above. SEC enables the separation of oligomeric objects and contaminants from monomeric receptor of interest. Oligomeric and/or aggregated objects are eluted close to the void volume of the column (corresponding to peak 1) and correspond to the inactive protein. The monomeric and ligand-binding active receptor is mainly eluted in peak 2. In typical similar experiments performed on proteins extracted from whole membrane fractions after cell lysis (standard procedure), peak 1 has systematically about



**Fig. 2** Size exclusion chromatography elution profile of the adenosine A2A receptor. Profile obtained on a Superdex 200 Increase 10/300 GL SEC column with absorbance measured at 280 nm. In this case, SEC enables the separation of 3 main peaks named respectively 1, 2, and 3

3–5 times the intensity of peak 2 (data not shown). These data exemplify how this method may be highly beneficial to reduce the amount of aggregated MPs during extraction. In terms of yield, the protocol described here enables to recover about 1.5 mg of monomeric adenosine A2A receptor from 1 L of yeast culture. However, protein extraction from yeast protoplasts does not significantly improve the final amount of active purified receptors compared to more classical methods.

Fractions representative of each elution peak (respectively 1, 2, and 3) have to be analyzed using biochemical methods in order to assess their protein content. In this chapter, we describe SDS-PAGE analyses, but functional tests such as radioligand binding assay may be also performed if available for the protein of interest.



### **3.4 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)**

#### **3.4.1 10% SDS Tricine Polyacrylamide Gel Preparation**

The following proportions are given for casting two gels of 1 mm thickness in a standard Mini-Protean system from Bio-Rad.

1. Prepare the separating gel by mixing 2.5 mL of acrylamide solution, 3.3 mL of Tris-HCl SDS buffer, 1.25 mL of 80% (v/v) glycerol, 2.9 mL H<sub>2</sub>O. Add 90  $\mu$ L of APS and 6  $\mu$ L of TEMED, mix, and immediately cast the gel. Allow space for the stacking gel.
2. Prepare the stacking gel by mixing 0.6 mL of acrylamide solution, 1.6 mL of Tris-HCl SDS buffer, 4.1 mL H<sub>2</sub>O. Add 90  $\mu$ L of APS and 6  $\mu$ L of TEMED, mix, and cast carefully over the separating gel. The presence of glycerol in the separating part avoids the need to wait for its complete polymerization before casting the stacking gel. Insert a 10-well gel comb immediately without introducing air bubbles.
3. Let the gel polymerize for about 30 min.

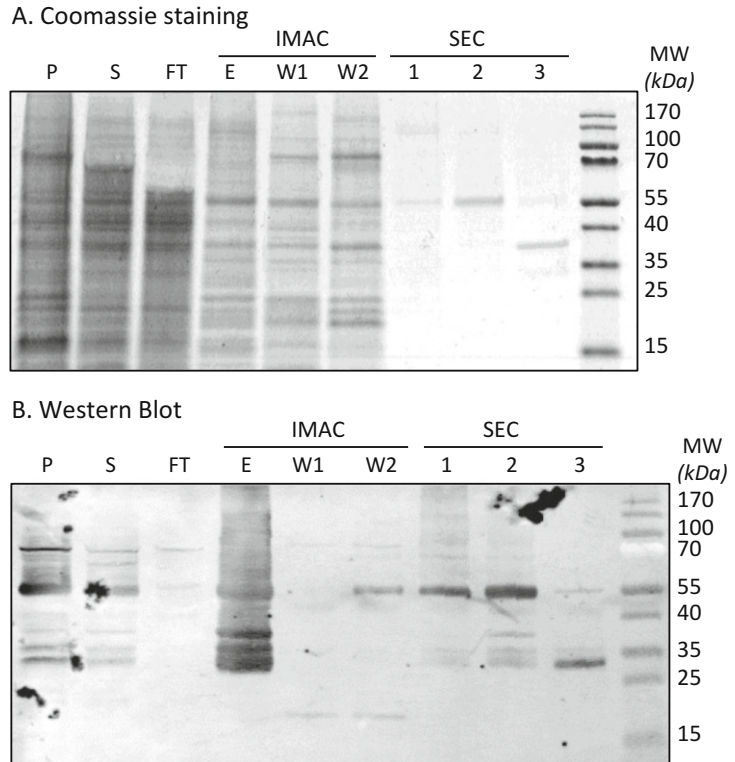
#### **3.4.2 Gel Electrophoresis and Coomassie Staining**

1. Incubate 20  $\mu$ L of the elution fractions of interest in 20  $\mu$ L of SB 2 $\times$  for about 10 min at room temperature (*see Note 7*).
2. Load in parallel two 10% SDS-polyacrylamide gels with respectively 20  $\mu$ L (first gel) and 10  $\mu$ L (second gel) of the sample in its sample buffer. The first gel will be used for total protein staining with Coomassie blue, the second one will be transferred on a nitrocellulose membrane for immunodetection of the protein of interest.
3. Proceed to electrophoresis using Tris-Tricine-SDS cathode running buffer and Tris anode running buffer in a tank unit. Run for about 1 h 30 min at 100 V.
4. Stain the first gel with Coomassie blue following the manufacturer's instructions.

Figure 3a presents a typical Coomassie blue SDS-PAGE analysis obtained for adenosine A2A receptor purification. A number of contaminant proteins are still present in the IMAC elution pool but SEC enables to obtain highly purified proteins.

### **3.5 Protein Transfer and Western Blot Immunodetection**

1. Transfer the proteins from the second gel to a nitrocellulose membrane by electroblotting in Tris-glycine transfer buffer for about 1 h 30 min at 100 V. An ice pack can be added into the electroblotting device to mitigate the heat produced.
2. Incubate the membrane in 50 mL blocking buffer for 1 h at room temperature on an orbital shaker. Alternatively, incubate the membrane overnight at 4 °C.
3. Remove the blocking solution and incubate the membrane with the selected antibody diluted in blocking buffer (for instance a monoclonal anti-flag antibody at a final concentration of 0.1  $\mu$ g/mL) for 1 h at room temperature on an orbital shaker.



**Fig. 3** SDS-PAGE analysis of representative fractions from adenosine A2A receptor purification. *P*: ultracentrifugation pellet; *S*: solubilized fraction loaded onto nickel affinity chromatography column; *FT*: IMAC flow through; *E*: IMAC elution pool; *W1* and *W2*: IMAC washes before elution; *1*, *2*, and *3*: SEC elution peaks. **(a)** Analysis of the total protein content of 10  $\mu$ L of each sample on a 10% polyacrylamide Tris-Tricine gel stained with Coomassie *blue*. **(b)** Western Blot analysis of the Adenosine A2A receptor content of 5  $\mu$ L of each sample. Immunoblotting realized with a M2 anti-flag antibody (0.1  $\mu$ g/mL)

4. Wash the membrane three times, each time with 50 mL of PBST on an orbital shaker for 5 min at room temperature.
5. Remove the PBST and incubate the membrane with the adapted ant-IgG antibody diluted in blocking buffer (typical final concentration of 0.1  $\mu$ g/mL) for 1 h at room temperature on an orbital shaker.
6. Wash the membrane three times, each time with 50 mL of PBST on an orbital shaker for 5 min at room temperature.
7. Remove the PBST and wash the membrane with 50 mL of PBS on an orbital shaker for 5 min at room temperature.
8. Store the membrane in PBS until revelation.

9. Proceed to membrane revelation according to the reporter system selected and following the manufacturer's recommendations.

Figure 3b shows the western blot analysis of adenosine A2A receptor purification, using an anti-flag primary antibody. Several bands corresponding to the receptor of interest can be identified. The major signal at the apparent molecular weight of 55 kDa corresponds to the complete form of the receptor. SEC peak 2 thus contains the complete and monomeric form of the adenosine A2A receptor. A radioactive ligand-binding assay further confirms the functional state of this fraction of the purified receptor (data not shown).

---

## 4 Notes

1. Imidazole can be added to the solubilized sample after the ultracentrifugation step. The use of high quality imidazole (e.g., I0250, Sigma), which shows a very limited absorption signal at 280 nm, is strongly recommended for ion immobilized metal affinity chromatography.
2. The detergent used in the buffers has to be selected according to its solubilization and stabilization properties toward your protein of interest. We recommend a preliminary solubilization screening using different detergents before large-scale purification. In terms of concentration, we recommend using about 10–20 times the critical micellar concentration (CMC) when possible during the solubilization step, and at least twice the CMC for subsequent purification steps.
3. The duration of Zymolyase<sup>®</sup> treatment and/or amount of Zymolyase<sup>®</sup> used may be critical for protein integrity and can thus be adjusted to the protein of interest.
4. Whereas yeast cells are very resistant to mechanical stress, yeast protoplasts are as fragile as mammalian cells and have thus to be handled very carefully in order to avoid mechanical cell lysis.
5. This first step enables to get rid of unspecific contaminants, and can be adapted according to the protein of interest and the cellular context. In our experience, G protein coupled receptors labeled with a decahistidine tag elute from Ni Sepharose High Performance nickel affinity columns from about 150 mM imidazole.
6. Protein elution using an imidazole gradient (typically 0–100% of B buffer spread in 25 mL) can be of great use to separate monomeric from oligomeric or aggregated MPs. Based on our experience, aggregated proteins show a higher affinity for the resin and are thus eluted later than monomeric proteins.

7. It is usually not recommended to boil MP samples prior to electrophoresis. When compact and highly hydrophobic proteins such as GPCRs are boiled, they usually aggregate and stay stuck in the concentrating gel.

## References

1. Schleich JP, Sanders CR (2015) The safety dance: biophysics of membrane protein folding and misfolding in a cellular context. *Q Rev Biophys* 48(1):1–34
2. Buck TM, Jordan R, Lyons-Weiler J, Adelman JL, Needham PG, Kleyman TR, Brodsky JL (2015) Expression of three topologically distinct membrane proteins elicits unique stress response pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiol Genomics* 47:198–214
3. André N, Cherouati N, Prual C, Steffan T, Zeder-Lutz G, Magnin T, Pattus F, Michel H, Wagner R, Reinhart C (2006) Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in *Pichia pastoris* to levels required for structural studies via a single expression screen. *Protein Sci* 15:1115–1126
4. Magnin T, Fiez-Vandal C, Potier N, Coquard A, Leray I, Steffan T, Logez C, Alkhalifioui F, Pattus F, Wagner R (2009) A novel, generic and effective method for the rapid purification of G protein-coupled receptors. *Protein Expr Purif* 64(1):1–7
5. Bornert O, Alkhalifioui F, Logez C, Wagner R (2012) Overexpression of membrane proteins using *Pichia pastoris*. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 29:Unit 29.2
6. Bornert O, Møller TC, Boeuf J, Candusso MP, Wagner R, Martinez KL, Simonin F (2013) Identification of a novel protein-protein interaction motif mediating interaction of GPCR-associated sorting proteins with G protein-coupled receptors. *PLoS One* 8(2):e56336
7. Logez C, Berger S, Legros C, Banères JL, Cohen W, Delagrangé P, Nosjean O, Boutin JA, Ferry G, Simonin F, Wagner R (2014) Recombinant human melatonin receptor MT1 isolated in mixed detergents shows pharmacology similar to that in mammalian cell membranes. *PLoS One* 9(6):e100616
8. Logez C, Alkhalifioui F, Byrne B, Wagner R (2012) Preparation of expression plasmids for *Pichia pastoris*. *Meth. Mol Biol* 866:25–40
9. Hartmann L, Kugler V, Wagner R (2016) Expression of eukaryotic membrane proteins in *Pichia pastoris*. *Methods Mol Biol* 1432:143–162



**Publication 3.** Ultra-Miniaturized Weak Affinity  
Chromatography for Ligand Identification of  
Nanodiscs-Solubilized G-Protein Coupled Receptors

Lecas L., Hartmann L., Caro L., Mohamed-Bouteben S.,  
Wagner R., Krimm I., Dugas V., Demesmay C.

*Article en cours de soumission*

# Ultra-miniaturized weak affinity chromatography for ligand identification of nanodiscs-solubilized G-protein coupled receptors

Lucile Lecas<sup>1</sup>, Lucie Hartman<sup>2</sup>, Lydia Caro<sup>2</sup>, Sarah Mohamed-Bouteben<sup>2</sup>, Renaud Wagner<sup>2</sup>,  
Isabelle Krimm, Vincent Dugas<sup>1</sup>, Claire Demesmay<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques  
UMR5280, 5 rue de la Doua, F-69100 VILLEURBANNE, France

<sup>2</sup>Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Plateforme IMPReSs  
UMR7242, 300, Boulevard Sébastien Brant, 67412 ILLKIRCH cedex

\* Corresponding author:

Tel.: +33437423552

Email address: [demesmay@univ-lyon1.fr](mailto:demesmay@univ-lyon1.fr)

Declarations of interest: none

Integral membrane proteins represent 20-30% of the total proteins encoded in the human genome, including ion channels, transporters, receptors and enzymes [1]. The G protein-coupled receptors (GPCRs) family is the most diversified family of membrane proteins and play a key role in nearly all physiological processes including vision, immune system, neurotransmission, cellular proliferation. As a consequence, GPCRs are involved in many diseases such as asthma, diabetes, Alzheimer disease and cancer, representing approximately 30% of currently marketed therapeutic drug targets [2]. Still, 73% of the non-olfactory GPCRs remain untargeted [3], explaining why the pharmaceutical industry places intensive efforts on GPCR drug discovery programmes and is seeking for innovative and robust drug screening methodologies.

Among these approaches, the development of drugs targeting GPCRs through Structure-Based-Drug-Design (SBDD) appears highly promising but faces two main issues. Firstly, the overproduction of GPCRs leading to structure determination is challenging both in terms of quantities and stability. Because GPCRs are highly dynamics proteins that undergo a number of conformational changes upon ligand binding, this inherent conformational flexibility is actually a key issue for crystallographic structural studies. In the last decade, the implementation of GPCR-stabilization strategies, such as receptor mutagenesis, insertion of fusion proteins or use of antibody fragments [4], induced a major breakthrough in GPCR structural biology, which in turn opened the route for SBDD [5,6]. The second issue concerns the development of novel ligands, and in particular weak affinity ligands such as fragments. Fragments are small molecules, with restricted physico-chemical properties known as the rule of three. This rule suggests that fragments have limited molecular weight (< 300 g/mol), high solubility ( $\log P > 3$ ) and few hydrogen bond donors (<3) and acceptors (<3) [15]. Screening such small compounds is highly effective in terms of chemical space, and fragment libraries are usually composed of only one to several thousand molecules. The fragments hits that are identified typically display low to high  $\mu\text{M}$  affinities and are then elaborated into active compounds through a second step based on structural approaches. Identifying such small molecules, the first step of the Fragment-Based Drug Design (FBDD) process, consists of screening fragments against a purified protein, using biophysical techniques, among which NMR, X-Ray crystallography and Plasmonic Surface Resonance are the most extensively used [7]. While FBDD has been widely applied to soluble proteins [8], very limited reports illustrate some examples of fragment screening against GPCRs [9–14].

Undoubtedly, there is a major need for the identification and elaboration of novel GPCR ligands and in particular for techniques that enable the screening and identification of weak affinity fragments. Ideally, such techniques should accommodate the GPCR-specific requirements discussed above *i.e.*, (i)

minimize the sample size to fit the small amounts of purified GPCR that can be reasonably achieved, and (ii) be adapted to the dynamics and intrinsic conformational flexibility of the receptors in a membrane-like environment.

Among the variety of systems that have been developed over the years to investigate GPCRs in solution, lipid nanodiscs have particularly attracted attention for native GPCR interaction studies, most notably with techniques such as NMR and SPR [16–18]. Nanodiscs are self-assembled soluble discoidal phospholipids bilayers encircled by an amphipatic protein called Membrane Scaffold Protein (MSP) [19]. They have been proved to give the membrane proteins a native-like environment associated with a high homogeneity in size and a high solubility and stability in aqueous solution [20].

Here, we propose a strategy that combines the preparation of nanodiscs-embedded GPCRs and the miniaturization of a weak affinity chromatography (WAC) technique for the detection of GPCR-bound weak affinity fragments. In this approach, the nanodisc-embedded target is immobilized on the chromatographic support and the retention of fragments is directly related to their affinity for the target protein. The technique is exemplified using the adenosine A<sub>2A</sub> receptor (AA<sub>2A</sub>R), a prototypical class A GPCR receptor. AA<sub>2A</sub>R has been extensively studied during the past few decades making it an ideal model with a large repertoire of ligands [21,22] and 3D X-ray structures available in the presence of antagonists, agonists and in complex with a G-protein [23]. Nevertheless, AA<sub>2A</sub>R remains a hot topic and the discovery of additional compounds could lead to numerous possibilities for therapeutics applications against inflammation, asthma, cardiovascular diseases, central nervous system diseases and cancer [24–27].

In this study, the wild-type human AA<sub>2A</sub>R receptor N-terminally fused to a Flag and a deca-histidine tags was produced with a yeast *Pichia pastoris* recombinant clone overexpressing the corresponding DNA construct [28,29]. After extraction from the yeast membranes and purification in presence of a DDM/CHS detergent mixture, AA<sub>2A</sub>R was further assembled in lipid nanodiscs similarly to previously described conditions [17]. For the purpose of the present affinity chromatography strategy, nanodisc particles have to be firmly immobilized on the chromatographic support. Therefore, the MSP employed here (*i.e.* MSP1E3D1) was *in vitro* biotinylated using a NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin reagent. While the resulting AA<sub>2A</sub>R nanodisc brings the receptor a stable membrane-mimicking environment compatible with an extensive use in dynamic conditions [30], it also allows a strong immobilization on streptavidin-coated supports via the biotin residues grafted on the MSP belt. Thanks to the presence of the PEG spacer arm that further maintains the assembly at distance from the support, the overall particle design thus ensures a full accessibility of the extramembrane domains of the receptor to the solvent and to any potential ligands it may contains.

The qualification of AA<sub>2A</sub>R in these nanodiscs was assessed by ligand-binding assays performed in two different formats. In a first filtration-based equilibrium binding assays, the pharmacology profile was determined through competition assays involving one agonist, adenosine, and three antagonist compounds, ZM-241385, CGS-15943 and xanthine amine congener (XAC) (Figure S3 in Supporting Information). The K<sub>i</sub> values obtained were similar to previously published data (Table 1 (RW)), indicating that the receptor was correctly folded in the nanodisc preparation. In a second format relying on the SPA technology (Scintillation Proximity Assay), radio-ligand binding was followed over time in order to evaluate the stability of AA<sub>2A</sub>R nanodiscs at room temperature. This assay revealed about 50% of residual [<sup>3</sup>H]ZM-241385 binding after more than 40 hours measurement (Figure S4 in Supporting Information), which appears well-suited to the conditions planned for the WAC studies.

One of the main objectives here was to drastically reduce the quantity of GPCR used for the characterization of GPCR-ligand interactions. Therefore, we used an in-house developed miniaturized affinity chromatographic column (75 μm internal diameter and 8.5 cm length *i.e.* less than 0.5 μL in volume). Such miniaturized columns have already been used for protein-ligand interaction studies with the human serum albumin (HSA) or the N-terminal domain of HSP90, and a number of their ligands whose affinities varied from μM to hundred μM [31]. With their unique characteristics, these nano-columns have an internal diameter about 60 times smaller than commercially available affinity columns (4.6 mm i.d), and 7 times smaller than the smallest in-house microcolumns previously



described in the literature for affinity studies (500  $\mu\text{m}$  i.d) [32], which corresponds to a 3600-fold or a 50-fold reduction of the column volume, respectively. At this level of miniaturization, an in-situ synthesized monolith chromatographic support was preferred to conventional packed particulate ones. The epoxy surface groups of the poly(GMA-co-EDMA) monolith were then hydrolyzed into diols that were subsequently oxidized into aldehyde capable of reacting with streptavidin through Schiff base reaction [31] (see Supporting Information). The resulting streptavidin-coated columns were finally used to immobilize the biotinylated nanodiscs containing AA<sub>2A</sub>R. The immobilization was performed dynamically, by simply flowing through the column a few microliters of a dilute solution of nanodisc-embedded AA<sub>2A</sub>R ( $\mu\text{M}$  range). The immobilization step was monitored using in-situ UV detection (Figure S5 in Supporting Information), in order to stop the sample flow until saturation is reached (no excess of protein consumed) and to quantify the total amount of nanodiscs captured. The typical immobilization step duration is quite short, *viz* about 10 minutes. For a set of 10 columns, around 14 pmol of samples were immobilized per column ( $14.2 \pm 2.7$  pmol,  $n = 10$ ), which correspond to about 0.6  $\mu\text{g}$  of AA<sub>2A</sub>R-containing nanodiscs. These miniaturized and reusable affinity columns thus lead to a considerable reduction of protein consumption (less than 1  $\mu\text{g}$  per column here and in [31]) when compared to chromatography in classical (3600-fold factor) or micro-scale (50-fold factor) formats.

In order to assess the functionality of the column-immobilized AA<sub>2A</sub>R nanodiscs, frontal affinity chromatography (FAC) was used to study protein-ligand interactions. FAC is a powerful chromatographic tool for the measurement of protein-ligand binding constants and is particularly suitable for the analysis of weak interactions. With this approach, solutions of increasing ligand concentration are continuously infused into the affinity column until their breakthrough, due to saturation of the binding sites. The on-line UV signal monitoring gives a typical sigmoid-like profile, with front and plateau at the breakthrough time ( $t_{\text{plateau}}$ ). Binding interaction between the ligand and the immobilized protein is characterized by an increase in breakthrough time with decreasing ligand concentration. If there is no specific interaction, the breakthrough time remains constant regardless of the ligand concentration [33]. Measuring the breakthrough times for several ligand concentrations permits to characterize the binding affinity, the amount of active proteins and to reveal potential non-specific interactions. Indeed, for each ligand concentration [L], the total amount of ligand captured in the column,  $q$ , can be experimentally determined using **Equation 1**:

$$q = (t_{\text{plateau}} - t_0) \times F \times [L] \quad (\text{Eq.1})$$

with  $F$  being the flow rate and  $t_0$  the column dead time.

The total amount of ligand captured is the sum of what is specifically interacting within each protein binding sites and what is non-specifically interacting with the column surface and/or, in our case, with the nanodiscs particles, as shown in **Equation 2**:

$$q = \underbrace{\sum_i \left[ \frac{B_{\text{act},i} [L]}{K_{D,i} + [L]} \right]}_{\text{specific}} + \underbrace{K_{\text{ns}} [L]}_{\text{non-specific}} \quad (\text{Eq.2})$$

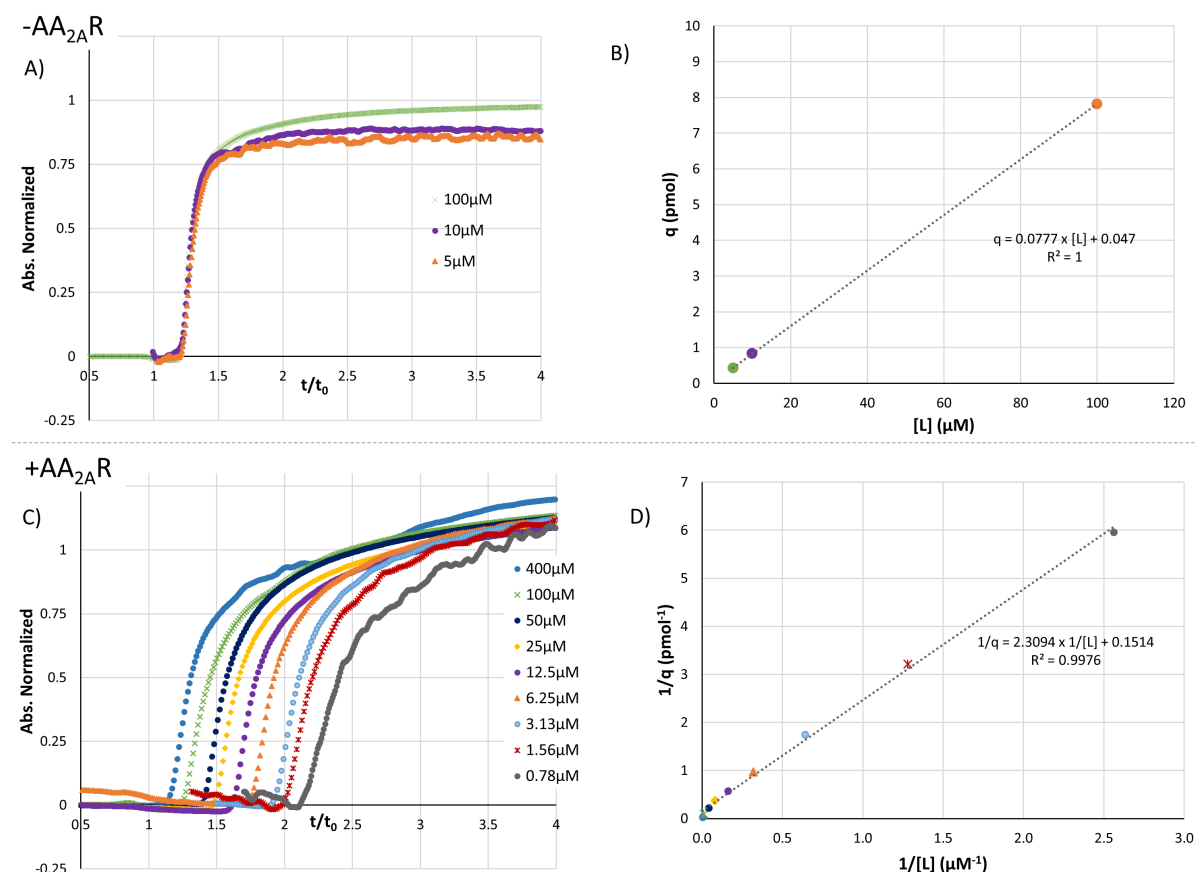
with  $B_{\text{act},i}$  being the amount of each protein active binding site  $i$ ,  $K_{D,i}$  the dissociation constants of the ligand interacting with each of them and  $K_{\text{ns}}$  the constant related to non-specific interactions.

If only non-specific interactions occur, equation 2 becomes a linear equation and the amount of ligand captured varies proportionally to the applied ligand concentration. Otherwise, if non-specific

interactions are negligible in comparison with specific ones, the type of interaction can be characterized by plotting a double reciprocal graph  $1/q$  versus  $1/[L]$ . Thus, a one-site interaction leads to a linear fit whereas a multi-site interaction leads to a non-linear fit. From there, the dissociation constants  $K_{d,i}$  and the numbers of active sites  $B_{act,i}$  can be determined by linear or non-linear regression [34].

In order to detect and quantify potential non-specific binding of ligands, the experiments carried out on AA<sub>2A</sub>R-nanodiscs grafted columns were also simultaneously performed on empty-nanodiscs grafted columns. Regardless of the ligand concentration, the normalized breakthrough time  $t_{plateau}/t_0$  is equal to 1 if no non-specific interactions occur, or constant and higher than 1 otherwise. This provides a simple and convenient negative control.

FAC experiments were performed with three well-characterized compounds, two antagonists, theophylline and caffeine, and one agonist, adenosine. The breakthrough curves obtained for theophylline are represented in **Figure 1**. In the absence of AA<sub>2A</sub>R, the normalized breakthrough time was not modified upon theophylline concentration and was equal to 1.3 thus revealing low non-specific interactions (**Figure 1A**). In addition, as expected for non-specific interactions, the amount of theophylline captured on empty nanodiscs column varied proportionally to its concentration (**Figure 1B**). In the presence of AA<sub>2A</sub>R, the normalized breakthrough time increased as the theophylline concentration was decreased, as expected for specific interactions (**Figure 1C**). At the highest ligand concentrations, where non-specific interactions predominate, the normalized breakthrough time tends to 1.3, corresponding to the normalized breakthrough time value measured on empty nanodiscs and characteristic of non-specific interactions. The  $1/q$  versus  $1/[L]$  plot was linear and thus typical of one-site interaction (**Figure 1D**). Only a small deviation occurred for the highest concentrations (lowest  $1/[L]$  range) due to non-specific interactions that contribute more significantly to the overall amount captured. Overall, non-specific binding is considered low as it accounts for less than 30 % of total



binding for theophylline concentrations lower than 25  $\mu\text{M}$ . Assuming that the total amount of ligand retained in the column corresponds to the sum of what is specifically interacting with a unique protein binding site, and of what is non-specifically interacting with the column surface and/or the nanodiscs particles, the calculated  $K_d$  value for theophylline was  $32 \pm 11 \mu\text{M}$ . This  $K_d$  value is consistent with values reported in the literature (25  $\mu\text{M}$  [21]). The amount of active sites  $B_{\text{act}}$  was  $7.2 \pm 1.3 \text{ pmol}$  (correlation coefficient 0.9997). Therefore, based on the known total protein content of the column ( $B_{\text{tot}}$  as equal to 11.3 pmol), the activity rate for AA<sub>2A</sub>R ( $B_{\text{act}}/B_{\text{tot}}$ ) was  $63 \pm 11 \%$  (Table 2).

**Figure 1. Frontal Affinity Chromatography analysis of the interaction between theophylline and immobilized nanodiscs columns** (column dimensions:  $l=8.5 \text{ cm}$  i.d.  $75\mu\text{m}$ ; applied pressure 12MPa ( $0.14 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ))

**-AA<sub>2A</sub>R upper panels: empty nanodiscs.** (A) Frontal affinity breakthrough curves (reduced time axis) on an empty-nanodiscs column. (B) Plot of captured quantities ( $q$ ) versus ligand concentrations  $[L]$  and on an empty-nanodiscs column accounting for non-specific interactions.

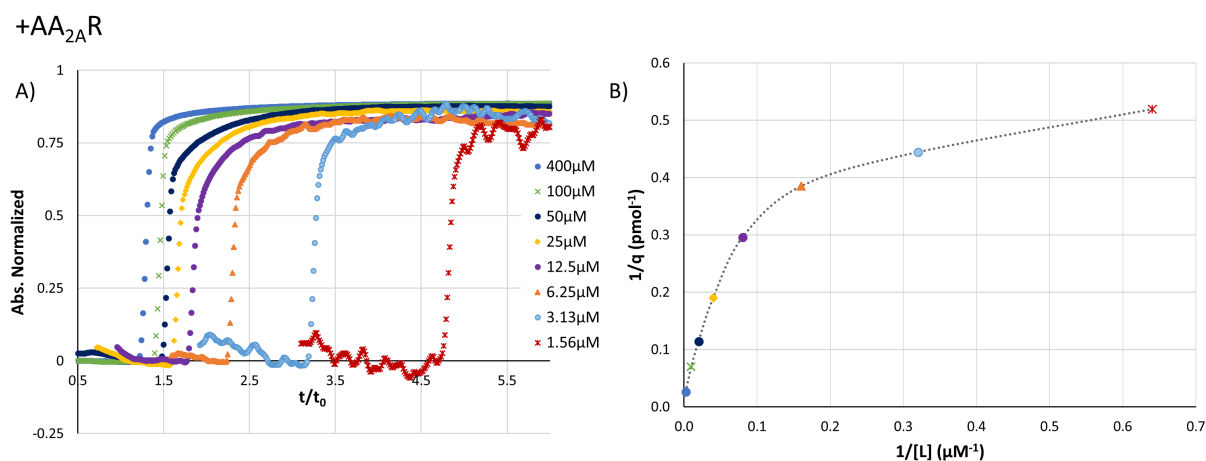
**+AA<sub>2A</sub>R lower panels: AA<sub>2A</sub>R-nanodiscs.** (C) Frontal affinity breakthrough curves (X-axis in reduced retention time  $t/t_0$ ) on an AA<sub>2A</sub>R-nanodiscs column. (D) Corresponding double reciprocal plot  $1/q$  versus  $1/[L]$  accounting for a one-site model.

For caffeine, similar breakthrough curves were observed in the presence of AA<sub>2A</sub>R (Figure S6 in Supporting Information). A  $K_d$  of  $41 \pm 15 \mu\text{M}$  was calculated, in good agreement with the literature (23.4  $\mu\text{M}$  [21]). In addition,  $B_{\text{act}}$  was  $11.6 \pm 2.3 \text{ pmol}$  (correlation coefficient 0.9999), indicating that the AA<sub>2A</sub>R activity rate was  $104 \pm 21 \%$  with low non-specific interactions (Table 2). Such high specific activities show that the grafting process is protein-friendly as it preserves the functionality of the nanodiscs-embedded AA<sub>2A</sub>R.

Ligand	Type of interaction		$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )		$B_{\text{act}}$ (pmol)	Activity rate ( $B_{\text{act}}/B_{\text{tot}}$ )
			FAC	Literature		
Theophylline	single site	AA <sub>2A</sub> R	$32 \pm 11$	25	$7.2 \pm 1.3$	$63 \pm 12 \%$
Caffeine	single site	AA <sub>2A</sub> R	$41 \pm 15$	23.4	$11.6 \pm 2.3$	$104 \pm 21 \%$
Adenosine	multi-site	AA <sub>2A</sub> R	$0.32 \pm 0.03$	0.7	$2.3 \pm 0.8$	$20 \pm 7 \%$
		Streptavidin	$447 \pm 21$	100-200	$43 \pm 8$	-

**Table 2. Characterization of the interaction of various AA<sub>2A</sub>R known ligands with the nanodiscs-embedded protein using frontal affinity chromatography (FAC) experiments.** The compounds theophylline and caffeine have a single binding site behaviour within the AA<sub>2A</sub>R grafted column. In contrast, the adenosine specifically interacts with AA<sub>2A</sub>R but also with the streptavidin. All these interactions were characterized by measuring dissociation constants ( $K_d$ ), amount of active binding sites ( $B_{\text{act}}$ ) and specific activities.

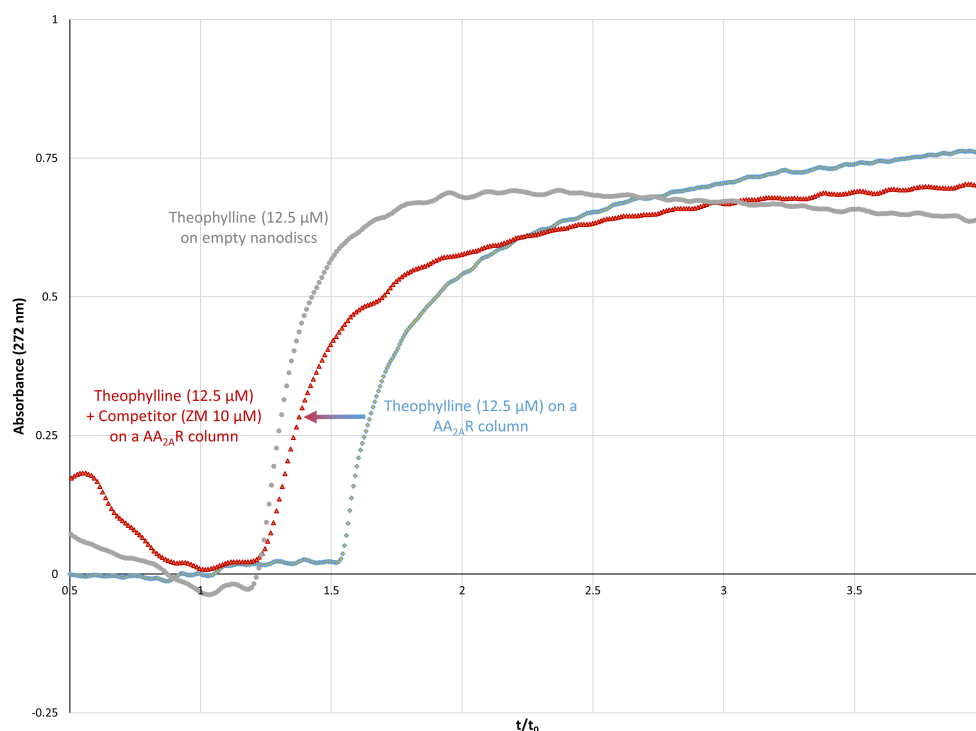
Concerning the binding of adenosine in the presence of AA<sub>2A</sub>R (Figure 2), the normalized breakthrough time increased with decreased adenosine concentrations, as expected for specific interactions. However, a strong deviation from linearity was observed on the double reciprocal plot  $1/q$  versus  $1/[L]$ , suggesting a multi-site interaction. As the adenosine has previously been reported to specifically bind streptavidin, a two-site model was used and turned out as the best-fit line. The calculated  $K_d$  values were 0.32  $\mu\text{M}$  for the first site and 417  $\mu\text{M}$  for the second (correlation coefficient 0.9998). These values are in good agreement with the reported values for the binding of the adenosine to AA<sub>2A</sub>R (0.7  $\mu\text{M}$  [21]) or streptavidin (100-200  $\mu\text{M}$  [35]). These results were further confirmed using FAC experiments carried out on control columns with either non-complexed streptavidin or immobilized empty nanodiscs (Figure S7 and S8 in Supporting Information). The amounts of active binding sites were also determined using the two-site model. The calculated values were 2.3 pmol for AA<sub>2A</sub>R resulting in an activity rate of approximately 20 %, and 43 pmol for the streptavidin which is in good agreement with the expected amount of grafted streptavidin on the monolith [31] (Table 2).



**Figure 2. FAC analysis of the interaction between adenosine and immobilized AA<sub>2A</sub>R nanodiscs** (A) Frontal affinity breakthrough curves with adenosine at various concentrations; (B) double reciprocal plot  $1/q$  versus  $1/[L]$  accounting for a two-site model.

In order to take the proof of concept a step further, ligand-binding experiments in a competition format were investigated. Competition experiments can be particularly valuable in the context of fragment screening to assess the binding site of fragments using a well-characterized competitor, or to serve as a control experiment for non-specific interactions. In the case of FAC experiments, the strategy involves a constant infusion of the competitor into the column, first alone then with the monitored ligand. The chromatograms are analyzed by measuring the change in the breakthrough time of the monitored ligand in the absence and in the presence of the competitor: competition for the same binding site is expected to selectively reduce the breakthrough time.

Here, a competition experiment was achieved between theophylline and the high-affinity AA<sub>2A</sub>R antagonist ZM-241385 (ZM). When 10 μM ZM was added in the mobile phase with theophylline, the breakthrough time shrank to a value close to the one obtained with theophylline alone on empty nanodiscs (**Figure 3**). This competition experiment confirmed that the interaction between theophylline and AA<sub>2A</sub>R nanodiscs, observed using the miniaturized FAC system, corresponds to a specific interaction in the orthosteric pocket of the protein.

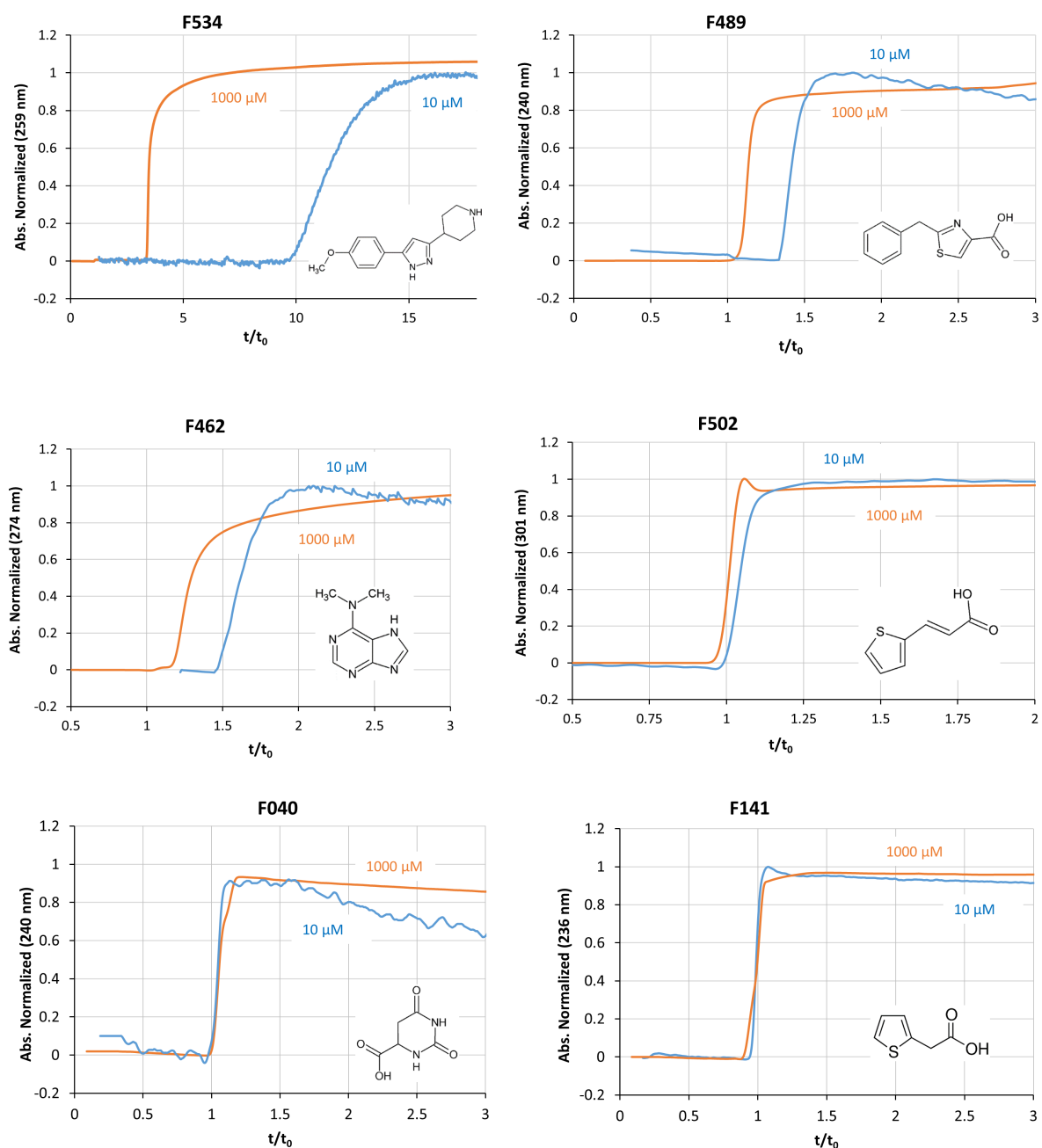


**Figure 3. FAC analysis of the competition between theophylline and ZM-241385 for the interaction with immobilized AA<sub>2A</sub>R nanodiscs.** Frontal affinity breakthrough curves (X-axis in reduced retention time) of a 12.5 μM theophylline solution on (i) a control column with empty nanodiscs; (ii) on the AA<sub>2A</sub>R-nanodiscs column without competitor; (iii) on the AA<sub>2A</sub>R-nanodiscs column in presence of 10 μM ZM-241385.

Finally, the technique was tested for its capacity to identify weak affinity ligands, and the possibility to discriminate weak affinity binders from non-binders, a particularly prominent issue with membrane proteins due to the presence of compounds used to maintain them in solution. The FAC strategy hitherto used to validate AA<sub>2A</sub>R-ligand interactions, and shared by others [36,37], relies on the comparison of the normalized breakthrough times measured on columns grafted with protein over control columns (columns with empty-nanodiscs here). However, using control columns may lead to an overestimation of non-specific interactions due to the absence of the targeted protein, thus resulting in potential false negative signals as was previously suggested [37]. Here, we observed that the normalized breakthrough time measured at high ligand concentrations in the presence of AA<sub>2A</sub>R was close to the one measured on the control column (**Figure 1**). Hence, we put forward an alternative approach that compares the normalized breakthrough times for two extreme fragment concentrations on a single column containing the immobilized-protein. Nonetheless, since the measures are realized on the same column, this strategy further avoids uncertainties associated with column variability due to the grafting efficacy. In order to determine what those extreme concentrations should be, normalized breakthrough time differences were simulated for several  $K_d$  values and various fragment concentrations. For the lowest affinities, 10 and 1000 μM showed the most significant discrepancy (**Figure S9** in Supporting Information). With this set-up, and a minimal difference in normalized breakthrough time fixed at 10%,  $K_d$  values as high as 250 μM are detectable.

This approach was applied to six fragments selected from a published NMR screening carried out on AA<sub>2A</sub>R in detergent micelles [9]. Four of them were shown to bind AA<sub>2A</sub>R using STD-NMR experiments, while two were shown not to. As illustrated in **Figure 4**, significant differences between normalized breakthrough times measured at low and high concentrations were observed for fragments F534, F489, F462 and F502, whereas fragments F040 and F141 displayed identical normalized breakthrough times regardless of the concentration. Consequently, F534, F489, F462 and F502 were identified as ligands of AA<sub>2A</sub>R while F040 and F141 were identified as non-ligands. These results are in perfect agreement with the previously reported STD-NMR data [9]. Because the higher

the normalized breakthrough time discrepancy, the higher the affinity for the target, these FAC experiments also allow a ranking of the ligands according to their increased affinities, starting from F502 to F462, F489 and F534. The normalized breakthrough time at high fragment concentrations also still gives an indication about non-specific interactions: the higher the normalized breakthrough time, the higher the non-specific interactions. Thus, with normalized breakthrough times at 1000  $\mu\text{M}$  closed to 1, F502, F462, F489, F040 and F141 exhibited low non-specific interactions, while, with a normalized breakthrough time higher than 3, F534 exhibited high ones.



**Figure 4.** FAC analysis of fragments interaction with immobilized AA<sub>2A</sub>R nanodiscs. Frontal affinity breakthrough curves obtained on an AA<sub>2A</sub>R-nanodiscs column for several fragments prepared in a 67mM phosphate pH7.4 buffer.

## **CONCLUSION**

Here we have shown for the first time that lipid-nanodiscs systems and ultra-miniaturized affinity chromatography can be combined to identify specific small molecule ligands that bind to an integral membrane protein. The approach was exemplified using the AA<sub>2A</sub>R GPCR. Specific and unspecific ligand/receptor interactions were distinguished using empty nanodiscs as a negative control. Competition experiments can be performed to identify the binding pocket of uncharacterized ligands using a reference compound. Weak affinity ligands with  $K_d$  smaller than 250  $\mu$ M can be detected. At last, the applicability of this method was demonstrated with 6 fragments recently identified as ligands or non-ligands of AA<sub>2A</sub>R. Here, experiments were carried out at two extreme concentrations on a unique affinity column.

Besides being a suitable membrane-mimicking environment for AA<sub>2A</sub>R, the use of nanodiscs also offers multiple advantages with regards to the grafting procedure. AA<sub>2A</sub>R is not itself tethered to the stationary phase but through the biotinylated MSP that enables a homogenous oriented immobilisation, and the presence of the spacer arm ensures a full accessibility of the binding pocket to small molecules. AA<sub>2A</sub>R remains full native, as evidenced by the high specific activities obtained. The strong and rapid biotin-streptavidin interaction associated with the UV-monitoring of the grafting step permits the use of the exact amount of grafted protein and a very rapid grafting step. The reduction of both the grafting duration and protein consumption represent two tremendous assets for proteins that are difficult to produce and that present a limited stability. A column contains only 0.6  $\mu$ g of AA<sub>2A</sub>R on average (14 pmol). Streptavidin columns can be prepared in advance, stored for several months (4°C) before being grafted with the target of interest.

In addition, the exact determination of the amount of grafted protein enables a quality control of each column before its use. Quantities of small molecules used are also decreased. Indeed, if FAC experiments are not often carried out because of the high amounts of solutes required in the classical format, the ultra-miniaturization of the columns associated with the direct pressurized mode of a capillary electrophoresis device, allowed a huge reduction of their consumption.

The method reported here is applicable to any membrane protein reconstituted in biotinylated nanodiscs and offers a real potential for FBDD of in membrane proteins. Its coupling with mass spectrometry via a nanospray interface, should allow a rapid screening of a library (for a 30 min total analysis time, and considering mixtures of 10-20 compounds, 500 to 1000 compounds should be screened in one day, with a minimal protein consumption and with reduced stability issues).

1. Wallin E, Heijne GV. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Science*. 7(4), 1029–1038 (2008).
2. Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, Gloriam DE. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nature Reviews Drug Discovery*. 16(12), 829–842 (2017).
3. Shimada I, Ueda T, Kofuku Y, Eddy MT, Wüthrich K. GPCR drug discovery: integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures. *Nat Rev Drug Discov*. (2018).
4. Ghosh E, Kumari P, Jaiman D, Shukla AK. Methodological advances: the unsung heroes of the GPCR structural revolution. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 16(2), 69–81 (2015).
5. Cooke RM, Brown AJH, Marshall FH, Mason JS. Structures of G protein-coupled receptors reveal new opportunities for drug discovery. *Drug Discovery Today*. 20(11), 1355–1364 (2015).
6. Andrews SP, Brown GA, Christopher JA. Structure-Based and Fragment-Based GPCR Drug Discovery. *ChemMedChem*. 9(2), 256–275 (2014).
7. Erlanson DA, Fesik SW, Hubbard RE, Jahnke W, Jhoti H. Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 15(9), 605–619 (2016).
8. Murray CW, Verdonk ML, Rees DC. Experiences in fragment-based drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*. 33(5), 224–232 (2012).
9. Igonet S, Raingeval C, Cecon E, *et al*. Enabling STD-NMR fragment screening using stabilized native GPCR: A case study of adenosine receptor. *Scientific Reports* [Internet]. 8(1) (2018). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-26113-0>.
10. Chen D, Errey JC, Heitman LH, Marshall FH, IJzerman AP, Siegal G. Fragment Screening of GPCRs Using Biophysical Methods: Identification of Ligands of the Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor with Novel Biological Activity. *ACS Chemical Biology*. 7(12), 2064–2073 (2012).
11. Congreve M, Rich RL, Myszka DG, Figaroa F, Siegal G, Marshall FH. Fragment Screening of Stabilized G-Protein-Coupled Receptors Using Biophysical Methods [Internet]. In: *Methods in Enzymology*, Elsevier, 115–136 (2011) [cited 2018 Jun 15]. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123812742000054>.
12. Aristotelous T, Ahn S, Shukla AK, *et al*. Discovery of  $\beta_2$  Adrenergic Receptor Ligands Using Biosensor Fragment Screening of Tagged Wild-Type Receptor. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 4(10), 1005–1010 (2013).
13. Christopher JA, Brown J, Doré AS, *et al*. Biophysical Fragment Screening of the  $\beta_1$  - Adrenergic Receptor: Identification of High Affinity Arylpiperazine Leads Using Structure-Based Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry*. 56(9), 3446–3455 (2013).
14. Navratilova I, Besnard J, Hopkins AL. Screening for GPCR Ligands Using Surface Plasmon Resonance. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2(7), 549–554 (2011).
15. Jhoti H, Williams G, Rees DC, Murray CW. The “rule of three” for fragment-based drug discovery: where are we now? *Nature Reviews Drug Discovery*. 12(8), 644–644 (2013).
16. Fredriksson K, Lottmann P, Hinz S, *et al*. Nanodiscs for INPHARMA NMR Characterization of GPCRs: Ligand Binding to the Human A<sub>2A</sub> Adenosine Receptor. *Angewandte Chemie International Edition*. 56(21), 5750–5754 (2017).
17. Bocquet N, Kohler J, Hug MN, *et al*. Real-time monitoring of binding events on a thermostabilized human A<sub>2A</sub> receptor embedded in a lipid bilayer by surface plasmon resonance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1848(5), 1224–1233 (2015).
18. Silvia L-H, A YA, Klaus G, Inna G. Surface plasmon resonance applied to G protein-coupled receptors. *Biomedical Spectroscopy and Imaging*. (3), 155–181 (2013).
19. Bayburt TH, Sligar SG. Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Lett*. 584(9), 1721–1727 (2010).
20. Serebryany E, Zhu GA, Yan ECY. Artificial membrane-like environments for in vitro studies of purified G-protein coupled receptors. *Biochim. Biophys. Acta*. 1818(2), 225–233 (2012).
21. de Lera Ruiz M, Lim Y-H, Zheng J. Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor as a Drug Discovery Target. *Journal of Medicinal Chemistry*. 57(9), 3623–3650 (2014).
22. Müller CE, Jacobson KA. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1808(5), 1290–1308 (2011).



23. Carpenter B, Lebon G. Human Adenosine A2A Receptor: Molecular Mechanism of Ligand Binding and Activation. *Frontiers in Pharmacology* [Internet]. 8 (2017). Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00898/full>.
24. Pinna A. Adenosine A2A Receptor Antagonists in Parkinson's Disease: Progress in Clinical Trials from the Newly Approved Istradefylline to Drugs in Early Development and Those Already Discontinued. *CNS Drugs*. 28(5), 455–474 (2014).
25. Franco R, Navarro G. Adenosine A2A Receptor Antagonists in Neurodegenerative Diseases: Huge Potential and Huge Challenges. *Frontiers in Psychiatry* [Internet]. 9 (2018). Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpsy.2018.00068/full>.
26. Sek K, Mølck C, Stewart G, Kats L, Darcy P, Beavis P. Targeting Adenosine Receptor Signaling in Cancer Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(12), 3837 (2018).
27. Chen J-F, Eltzhig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets — what are the challenges? *Nature Reviews Drug Discovery*. 12(4), 265–286 (2013).
28. André N, Cherouati N, Prual C, *et al.* Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in *Pichia pastoris* to levels required for structural studies via a single expression screen. *Protein Sci*. 15(5), 1115–1126 (2006).
29. Hartmann L, Kugler V, Wagner R. Expression of Eukaryotic Membrane Proteins in *Pichia pastoris*. *Methods Mol. Biol.* 1432, 143–162 (2016).
30. Hansen RW, Wang X, Golab A, *et al.* Functional Stability of the Human Kappa Opioid Receptor Reconstituted in Nanodiscs Revealed by a Time-Resolved Scintillation Proximity Assay. *PLoS ONE*. 11(4), e0150658 (2016).
31. Lecas L, Randon J, Berthod A, Dugas V, Demesmay C. Monolith weak affinity chromatography for µg-protein-ligand interaction study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 166, 164–173 (2019).
32. Duong-Thi M-D, Bergström M, Fex T, Svensson S, Ohlson S, Isaksson R. Weak Affinity Chromatography for Evaluation of Stereoisomers in Early Drug Discovery. *Journal of Biomolecular Screening*. 18(6), 748–755 (2013).
33. Ohlson S, Duong-Thi M-D. Fragment screening for drug leads by weak affinity chromatography (WAC-MS). *Methods*. 146, 26–38 (2018).
34. Matsuda R, Li Z, Zheng X, Hage DS. Analysis of multi-site drug–protein interactions by high-performance affinity chromatography: Binding by glimepiride to normal or glycosylated human serum albumin. *Journal of Chromatography A*. 1408, 133–144 (2015).
35. Bing T, Chang T, Qi C, Zhang N, Liu X, Shangguan D. Specific interactions between adenosine and streptavidin/avidin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 22(23), 7052–7055 (2012).
36. Conrad ML, Moser AC, Hage DS. Evaluation of indole-based probes for high-throughput screening of drug binding to human serum albumin: Analysis by high-performance affinity chromatography. *Journal of Separation Science*. 32(8), 1145–1155 (2009).
37. Duong-Thi M-D, Bergström M, Edwards K, *et al.* Lipodisks integrated with weak affinity chromatography enable fragment screening of integral membrane proteins. *The Analyst*. 141(3), 981–988 (2016).





# Bibliographie

1. Boudry, C., Costes, B., Fournier, G., Dewals, B. & Vanderplassen, A. Les homologues viraux des récepteurs cellulaires couplés aux protéines G. **11**, 14 (2007).
2. Wacker, D., Stevens, R. C. & Roth, B. L. How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell* **170**, 414–427 (2017).
3. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G. & Schiöth, H. B. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**, 1256–1272 (2003).
4. Vaudry, H. Molecular evolution of GPCRs: What we know and what the future holds. *J Mol Endocrinol* **52**, E1–E2 (2014).
5. Santos, R. *et al.* A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery* **16**, 19–34 (2017).
6. Max R. Bennett. The concept of transmitter receptors: 100 years on. *Neuropharmacology* **39**, 523–546 (2000).
7. Robert J. Lefkowitz. Historical review: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **25**, 413–422 (2004).
8. Limbird, L. E. Chapter 1 - Historical Perspective for Understanding of Adrenergic Receptors. in *Current Topics in Membranes* (ed. Wang, Q.) **67**, 1–17 (Academic Press, 2011).
9. Langley, J. N. On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *The Journal of Physiology* **33**, 374 (1905).
10. Furchgott, R. F. Receptor Mechanisms. *Annual Review of Pharmacology* **4**, 21–50 (1964).
11. Gilman, A. G. G Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 615–649 (1987).
12. Robison G. A. & Sutherland E. W. Cyclic amp and the function of eukaryotic cells: an introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences* **185**, 5–9 (1971).
13. Walsh, D. A., Perkins, J. P. & Krebs, E. G. An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* **243**, 3763–3765 (1968).
14. Caron, M. G., Srinivasan, Y., Pitha, J., Kocielek, K. & Lefkowitz, R. J. Affinity chromatography of the beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **254**, 2923–2927 (1979).
15. Lomasney, J. W. *et al.* Mammalian alpha 1-adrenergic receptor. Purification and characterization of the native receptor ligand binding subunit. *J. Biol. Chem.* **261**, 7710–7716 (1986).
16. Regan, J. W., Nakata, H., DeMarinis, R. M., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. Purification and characterization of the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **261**, 3894–3900 (1986).
17. Dixon, R. A. F. *et al.* Cloning of the gene and cDNA for mammalian  $\beta$ -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* **321**, 75–79 (1986).
18. Ovchinnikov Yu.A. Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure—function relationships. *FEBS Letters* **148**, 179–191 (1982).
19. Dohlman, H. G., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* **26**, 2657–2664 (1987).
20. Attwood, T. K. & Findlay, J. B. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng.* **7**, 195–203 (1994).

21. Strader, C. D., Fong, T. M., Tota, M. R., Underwood, D. & Dixon, R. a F. Structure and Function of G Protein-Coupled Receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 101–132 (1994).
22. Palmer, M., Chan, A., Dieckmann, T. & Honek, J. Chapter 5: G Protein-Coupled Receptors. in *Biochemical Pharmacology* (John Wiley & Sons, 2012).
23. Palczewski, K. *et al.* Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* **289**, 739–745 (2000).
24. Bockaert, J. G-protein-coupled receptors: general features and activation mechanisms. *12* (2012).
25. Kolakowski, L. F. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept. Channels* **2**, 1–7 (1994).
26. Bockaert, J. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO Journal* **18**, 1723–1729 (1999).
27. Tyndall, J. D. A. & Sandilya, R. GPCR agonists and antagonists in the clinic. *Med Chem* **1**, 405–421 (2005).
28. Cherezov, V. *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258–1265 (2007).
29. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383–387 (2007).
30. Lagerström, M. C. & Schiöth, H. B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 339–357 (2008).
31. Alexander, S. P. *et al.* The concise guide to pharmacology 2017/18: G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology* **174**, S17–S129 (2017).
32. Møller, T. C., Moreno-Delgado, D., Pin, J.-P. & Kniazeff, J. Class C G protein-coupled receptors: reviving old couples with new partners. *Biophys Rep* **3**, 57–63 (2017).
33. Eilers, M., Hornak, V., Smith, S. O. & Konopka, J. B. Comparison of Class A and D G Protein-Coupled Receptors: Common Features in Structure and Activation. *Biochemistry* **44**, 8959–8975 (2005).
34. Krishnan, A., Almén, M. S., Fredriksson, R. & Schiöth, H. B. The origin of GPCRs: identification of mammalian like Rhodopsin, Adhesion, Glutamate and Frizzled GPCRs in fungi. *PLoS ONE* **7**, e29817 (2012).
35. Vinson, C. R., Conover, S. & Adler, P. N. A Drosophila tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature* **338**, 263–264 (1989).
36. OncoMed Pharmaceuticals Inc. A Study of Vantictumab (OMP-18R5) in Combination With Paclitaxel in Locally Recurrent or Metastatic Breast Cancer. *ClinicalTrials.gov* (2013). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01973309>. (Accessed: 5th July 2018)
37. Hilger, D., Masureel, M. & Kobilka, B. K. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 4–12 (2018).
38. Deupi, X. & Kobilka, B. K. Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function. *Physiology (Bethesda)* **25**, 293–303 (2010).
39. Carpenter, B., Nehmé, R., Warne, T., Leslie, A. G. W. & Tate, C. G. Structure of the adenosine A2A receptor bound to an engineered G protein. *Nature* (2016).
40. Milligan, G. & Kostenis, E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* **147 Suppl 1**, S46-55 (2006).
41. Yamada, M., Inanobe, A. & Kurachi, Y. G Protein Regulation of Potassium Ion Channels. *Pharmacol Rev* **50**, 723–757 (1998).
42. Magalhaes, A. C., Dunn, H. & Ferguson, S. S. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins: Regulation of G-protein-coupled receptor activity. *British Journal of Pharmacology* **165**, 1717–1736 (2012).

43. Reiter, E. & Lefkowitz, R. J. GRKs and  $\beta$ -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **17**, 159–165 (2006).
44. Ferguson, S. S. Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling. *Trends in Pharmacological Sciences* **28**, 173–179 (2007).
45. Smith, N. J. & Milligan, G. Allosterity at G protein-coupled receptor homo- and heteromers: uncharted pharmacological landscapes. *Pharmacol. Rev.* **62**, 701–725 (2010).
46. Insel, P. A., Tang, C.-M., Hahntow, I. & Michel, M. C. Impact of GPCRs in clinical medicine: Monogenic diseases, genetic variants and drug targets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1768**, 994–1005 (2007).
47. Gloriam, D. E. Structure statistics. *GPCRdb* Available at: <https://gpcrdb.org/structure/statistics>. (Accessed: 22nd January 2019)
48. Ghosh, E., Kumari, P., Jaiman, D. & Shukla, A. K. Methodological advances: the unsung heroes of the GPCR structural revolution. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 69–81 (2015).
49. Zou, Y., Weis, W. I. & Kobilka, B. K. N-Terminal T4 Lysozyme Fusion Facilitates Crystallization of a G Protein Coupled Receptor. *PLOS ONE* **7**, e46039 (2012).
50. Chun, E. *et al.* Fusion Partner Toolchest for the Stabilization and Crystallization of G Protein-Coupled Receptors. *Structure* **20**, 967–976 (2012).
51. Zhang, R. *et al.* Characterizing the structure of lipodisq nanoparticles for membrane protein spectroscopic studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1848**, 329–333 (2015).
52. Ring, A. M. *et al.* Adrenaline-activated structure of  $\beta$ 2-adrenoceptor stabilized by an engineered nanobody. *Nature* **502**, 575–579 (2013).
53. Serrano-Vega, M. J., Magnani, F., Shibata, Y. & Tate, C. G. Conformational thermostabilization of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor in a detergent-resistant form. *PNAS* **105**, 877–882 (2008).
54. Standfuss, J. *et al.* Crystal structure of constitutively active rhodopsin: How an agonist can activate its GPCR. *Nature* **471**, 656 (2011).
55. Lu, M. & Wu, B. Structural studies of G protein-coupled receptors. *IUBMB Life* **68**, 894–903 (2016).
56. Pándy-Szekeres, G. *et al.* GPCRdb in 2018: adding GPCR structure models and ligands. *Nucleic Acids Res* **46**, D440–D446 (2018).
57. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Crystal structure of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549–555 (2011).
58. Kang, Y. *et al.* Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature* **523**, 561–567 (2015).
59. Shimada, I., Ueda, T., Kofuku, Y., Eddy, M. T. & Wüthrich, K. GPCR drug discovery: integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures. *Nature Reviews Drug Discovery* **18**, 59–82 (2019).
60. Saarenpää, T., Jaakola, V.-P. & Goldman, A. Baculovirus-mediated expression of GPCRs in insect cells. *Meth. Enzymol.* **556**, 185–218 (2015).
61. Reiländer, H. & Weiss, H. M. Production of G-protein-coupled receptors in yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 510–517 (1998).
62. Michael R Eckart & Christopher M Bussineau. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Current Opinion in Biotechnology* **7**, 525–530 (1996).
63. Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B. & Harvey, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* **22**, 249–270 (2005).

64. Pichia Produced Products on the Market. Available at: <https://pichia.com/science-center/commercialized-products/>. (Accessed: 21st September 2018)
65. Alkhalfioui, F., Logez, C., Bornert, O. & Wagner, R. Expression Systems: Pichia pastoris. in *Production of Membrane Proteins: Strategies for Expression and Isolation* (Anne Skaja Robinson, 2011).
66. Stephen White. Membrane Proteins of Known 3D Structure. (2018). Available at: [http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/#id\\_TRANSMEMBRANE\\_PROTEINS\\_ALPHAHELICAL:Channels\\_Aquaporins\\_and\\_Glyceroporphorins](http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/#id_TRANSMEMBRANE_PROTEINS_ALPHAHELICAL:Channels_Aquaporins_and_Glyceroporphorins).
67. Wheatley, M. & Hawtin, S. R. Glycosylation of G-protein-coupled receptors for hormones central to normal reproductive functioning: its occurrence and role. *Hum. Reprod. Update* **5**, 356–364 (1999).
68. Yurugi-Kobayashi, T. *et al.* Comparison of functional non-glycosylated GPCRs expression in Pichia pastoris. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380**, 271–276 (2009).
69. Opekarová, M. & Tanner, W. Specific lipid requirements of membrane proteins--a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**, 11–22 (2003).
70. Marx, H. *et al.* Cloning, disruption and protein secretory phenotype of the GAS1 homologue of Pichia pastoris. *FEMS Microbiol. Lett.* **264**, 40–47 (2006).
71. Cabib, E. & Arroyo, J. How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nat Rev Micro* **11**, 648–655 (2013).
72. Hopkins, T. R. Physical and chemical cell disruption for the recovery of intracellular proteins. *Bioprocess Technol* **12**, 57–83 (1991).
73. Hartmann, L., Metzger, E., Ottelard, N. & Wagner, R. Direct Extraction and Purification of Recombinant Membrane Proteins from Pichia pastoris Protoplasts. *Methods in Molecular Biology* 45–56 (2017).
74. Stetsenko, A. & Guskov, A. An Overview of the Top Ten Detergents Used for Membrane Protein Crystallization. *Crystals* **7**, 197 (2017).
75. Tate, C. G. Practical Considerations of Membrane Protein Instability during Purification and Crystallisation. in *Heterologous Expression of Membrane Proteins* (ed. Mus-Veteau, I.) **601**, 187–203 (Humana Press, 2010).
76. Garavito, R. M. & Ferguson-Miller, S. Detergents as tools in membrane biochemistry. *J. Biol. Chem.* **276**, 32403–32406 (2001).
77. Newstead, S., Ferrandon, S. & Iwata, S. Rationalizing alpha-helical membrane protein crystallization. *Protein Sci.* **17**, 466–472 (2008).
78. Chae, P. S. *et al.* Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat Methods* **7**, 1003–1008 (2010).
79. Borch, J. & Hamann, T. The nanodisc: a novel tool for membrane protein studies. *Biological Chemistry* **390**, 805–814 (2009).
80. Nath, A., Atkins, W. M. & Sligar, S. G. Applications of Phospholipid Bilayer Nanodiscs in the Study of Membranes and Membrane Proteins. *Biochemistry* **46**, 2059–2069 (2007).
81. Ritchie, T. K. *et al.* Chapter Eleven - Reconstitution of Membrane Proteins in Phospholipid Bilayer Nanodiscs. in *Methods in Enzymology* (ed. Düzgünes, N.) **464**, 211–231 (Academic Press, 2009).
82. Denisov, I. G., Grinkova, Y. V., Lazarides, A. A. & Sligar, S. G. Directed Self-Assembly of Monodisperse Phospholipid Bilayer Nanodiscs with Controlled Size. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3477–3487 (2004).
83. Chaptal, V. *et al.* Quantification of Detergents Complexed with Membrane Proteins. *Sci Rep* **7**, (2017).

84. Bayburt, T. H., Grinkova, Y. V. & Sligar, S. G. Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Lett.* **2**, 853–856 (2002).
85. Davidson, W. S. & Thompson, T. B. The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **282**, 22249–22253 (2007).
86. Hansen, R. W. *et al.* Functional Stability of the Human Kappa Opioid Receptor Reconstituted in Nanodiscs Revealed by a Time-Resolved Scintillation Proximity Assay. *PLoS ONE* **11**, e0150658 (2016).
87. Ashok, Y. & Jaakola, V.-P. Nanodisc-Tm: Rapid functional assessment of nanodisc reconstituted membrane proteins by CPM assay. *MethodsX* **3**, 212–218 (2016).
88. Bocquet, N. *et al.* Real-time monitoring of binding events on a thermostabilized human A2A receptor embedded in a lipid bilayer by surface plasmon resonance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1848**, 1224–1233 (2015).
89. Cruz, F. & Edmondson, D. E. Kinetic properties of recombinant MAO-A on incorporation into phospholipid nanodisks. *J Neural Transm (Vienna)* **114**, 699–702 (2007).
90. Denisov, I. G. & Sligar, S. G. Nanodiscs in Membrane Biochemistry and Biophysics. *Chemical Reviews* **117**, 4669–4713 (2017).
91. Williams, A. F. & Barclay, A. N. The Immunoglobulin Superfamily—Domains for Cell Surface Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **6**, 381–405 (1988).
92. Alberts, B. *et al.* *Essential Cell Biology*. (Garland Science, 2015).
93. Schroeder, H. W. & Cavacini, L. Structure and Function of Immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* **125**, S41–S52 (2010).
94. Lahaie, Y.-M. & Watier, H. Contribution of physiologists to the identification of the humoral component of immunity in the 19th century. *MAbs* **9**, 774–780 (2017).
95. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
96. Cosimi, A. B. *et al.* Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. *Transplantation* **32**, 535–539 (1981).
97. Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. & Baty, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol* **157**, 220–233 (2009).
98. Ecker, D. M., Jones, S. D. & Levine, H. L. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs* **7**, 9–14 (2014).
99. Cai, H. H. Therapeutic monoclonal antibodies approved by FDA in 2017. **3** (2017).
100. Hutchings, C. J., Koglin, M. & Marshall, F. H. Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *MAbs* **2**, 594–606 (2010).
101. Freskgård, P.-O. & Urich, E. Antibody therapies in CNS diseases. *Neuropharmacology* **120**, 38–55 (2017).
102. Welch, M. J., Meltzer, E. O. & Simons, F. E. R. H1-antihistamines and the central nervous system. *Clin Allergy Immunol* **17**, 337–388 (2002).
103. Nogueiras, R. *et al.* Peripheral, but Not Central, CB1 Antagonism Provides Food Intake-Independent Metabolic Benefits in Diet-Induced Obese Rats. *Diabetes* **57**, 2977–2991 (2008).
104. Agarwal, N. *et al.* Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat Neurosci* **10**, 870–879 (2007).
105. Michel, M. C., Wieland, T. & Tsujimoto, G. How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies? *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* **379**, 385–388 (2009).



106. Duvic, M., Evans, M. & Wang, C. Mogamulizumab for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma: recent advances and clinical potential. *Ther Adv Hematol* **7**, 171–174 (2016).
107. Hutchings, C. J., Koglin, M., Olson, W. C. & Marshall, F. H. Opportunities for therapeutic antibodies directed at G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Drug Discovery* **16**, 787–810 (2017).
108. Holliger, P. & Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology* **23**, 1126–1136 (2005).
109. Hunte, C. & Michel, H. Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments. *Current Opinion in Structural Biology* **12**, 503–508 (2002).
110. Gupta, A., Heimann, A. S., Gomes, I. & Devi, L. A. Antibodies against G-protein coupled receptors: novel uses in screening and drug development. *Comb Chem High Throughput Screen* **11**, 463–467 (2008).
111. Gupta, A. *et al.* Conformation state-sensitive antibodies to G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **282**, 5116–5124 (2007).
112. Vincke, C. & Muyldermans, S. Introduction to Heavy Chain Antibodies and Derived Nanobodies. in *Single Domain Antibodies* (eds. Saerens, D. & Muyldermans, S.) 15–26 (Humana Press, 2012). doi:10.1007/978-1-61779-968-6\_2
113. Hamers-Casterman, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, (1993).
114. Manglik, A., Kobilka, B. K. & Steyaert, J. Nanobodies to Study G Protein-Coupled Receptor Structure and Function. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **57**, 19–37 (2017).
115. Wesolowski, J. *et al.* Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol* **198**, 157–174 (2009).
116. Vu, K. B., Ghahroudi, M. A., Wyns, L. & Muyldermans, S. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol. Immunol.* **34**, 1121–1131 (1997).
117. Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J. A. & Hamers, R. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng.* **7**, 1129–1135 (1994).
118. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Structure of a nanobody-stabilized active state of the  $\beta(2)$  adrenoceptor. *Nature* **469**, 175–180 (2011).
119. Mujčić-Delić, A., de Wit, R. H., Verkaar, F. & Smit, M. J. GPCR-targeting nanobodies: attractive research tools, diagnostics, and therapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences* **35**, 247–255 (2014).
120. De Genst, E. *et al.* Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4586–4591 (2006).
121. Schmitz, K. R., Bagchi, A., Roovers, R. C., van Bergen en Henegouwen, P. M. P. & Ferguson, K. M. Structural evaluation of EGFR inhibition mechanisms for nanobodies/VHH domains. *Structure* **21**, 1214–1224 (2013).
122. Desmyter, A. *et al.* Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 803–811 (1996).
123. Bradley, M. E. *et al.* Potent and Efficacious Inhibition of CXCR2 Signaling by Biparatopic Nanobodies Combining Two Distinct Modes of Action. *Mol Pharmacol* **87**, 251–262 (2015).
124. Jahnichen, S. *et al.* CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 20565–20570 (2010).

125. Maussang, D. *et al.* Llama-derived Single Variable Domains (Nanobodies) Directed against Chemokine Receptor CXCR7 Reduce Head and Neck Cancer Cell Growth in Vivo. *J Biol Chem* **288**, 29562–29572 (2013).
126. Ramsey, D. M. & McAlpine, S. R. Halting metastasis through CXCR4 inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **23**, 20–25 (2013).
127. Harmsen, M. M. *et al.* Passive immunization of guinea pigs with llama single-domain antibody fragments against foot-and-mouth disease. *Vet. Microbiol.* **120**, 193–206 (2007).
128. Harmsen, M. M., Van Solt, C. B., Fijten, H. P. D. & Van Setten, M. C. Prolonged in vivo residence times of llama single-domain antibody fragments in pigs by binding to porcine immunoglobulins. *Vaccine* **23**, 4926–4934 (2005).
129. Hmila, I. *et al.* VHH, bivalent domains and chimeric Heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin AahI'. *Molecular Immunology* **45**, 3847–3856 (2008).
130. Kruse, A. C. *et al.* Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **504**, 101–106 (2013).
131. Che, T. *et al.* Structure of the Nanobody-Stabilized Active State of the Kappa Opioid Receptor. *Cell* **172**, 55–67.e15 (2018).
132. Staus, D. P. *et al.* Allosteric nanobodies reveal the dynamic range and diverse mechanisms of G-protein-coupled receptor activation. *Nature* **535**, 448–452 (2016).
133. Rothbauer, U. *et al.* Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat. Methods* **3**, 887–889 (2006).
134. Staus, D. P. *et al.* Regulation of  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Function by Conformationally Selective Single-Domain Intrabodies. *Mol Pharmacol* **85**, 472–481 (2014).
135. Arbabi-Ghahroudi, M., Tanha, J. & MacKenzie, R. Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev* **24**, 501–519 (2005).
136. Frenken, L. G. J. *et al.* Isolation of antigen specific Llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* **78**, 11–21 (2000).
137. De Meyer, T., Muyldermans, S. & Depicker, A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends in Biotechnology* **32**, 263–270 (2014).
138. Dumoulin, M. *et al.* Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci* **11**, 500–515 (2002).
139. Ewert, S., Cambillau, C., Conrath, K. & Plückthun, A. Biophysical Properties of Camelid VHH Domains Compared to Those of Human VH3 Domains. *Biochemistry* **41**, 3628–3636 (2002).
140. Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R. & Muyldermans, S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Letters* **414**, 521–526 (1997).
141. Röthlisberger, D., Pos, K. M. & Plückthun, A. An antibody library for stabilizing and crystallizing membrane proteins – selecting binders to the citrate carrier CitS. *FEBS Letters* **564**, 340–348 (2004).
142. Hoogenboom, H. R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnology* **23**, 1105–1116 (2005).
143. Huang, R., Kiss, M. M., Batonick, M., Weiner, M. P. & Kay, B. K. Generating Recombinant Antibodies to Membrane Proteins through Phage Display. *Antibodies* **5**, 11 (2016).

144. Ryckaert, S., Pardon, E., Steyaert, J. & Callewaert, N. Isolation of antigen-binding camelid heavy chain antibody fragments (nanobodies) from an immune library displayed on the surface of *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* **145**, 93–98 (2010).
145. Uchański, T. *et al.* An improved yeast surface display platform for the screening of nanobody immune libraries. *Sci Rep* **9**, 382 (2019).
146. Fleetwood, F. *et al.* Surface display of a single-domain antibody library on Gram-positive bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 1081–1093 (2013).
147. Kleinschmidt, J. H. & Popot, J.-L. Folding and stability of integral membrane proteins in amphipols. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **564**, 327–343 (2014).
148. Wheatley, M. *et al.* GPCR-styrene maleic acid lipid particles (GPCR-SMALPs): their nature and potential. *Biochemical Society Transactions* **44**, 619–623 (2016).
149. Willis, S. *et al.* Use of virus-like particles as quantitative probes of membrane protein interactions. *Biochemistry* **47**, 6988–6990 (2008).
150. Chain, B. M., Noursadeghi, M., Gardener, M., Tsang, J. & Wright, E. HIV blocking antibodies following immunisation with chimaeric peptides coding a short N-terminal sequence of the CCR5 receptor. *Vaccine* **26**, 5752–5759 (2008).
151. Chambers, R. S. Antibody production using genetic immunization. *Discov Med* **3**, 52–53 (2003).
152. van der Woning, B. *et al.* DNA immunization combined with scFv phage display identifies antagonistic GCGR specific antibodies and reveals new epitopes on the small extracellular loops. *MAbs* **8**, 1126–1135 (2016).
153. Shope, R. E. Medical significance of togaviruses: an overview of diseases caused by togaviruses in man and in domestic and wild vertebrate animals. in *The togaviruses* 47–82 (Elsevier, 1980).
154. Manwaring, W. H. Semliki Forest Virus. *Cal West Med* **62**, 4 (1945).
155. Mathiot, C. C. *et al.* An outbreak of human Semliki Forest virus infections in Central African Republic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **42**, 386–393 (1990).
156. Strauss, J. H. & Strauss, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* **58**, 491–562 (1994).
157. Liljeström, P. & Garoff, H. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology (N.Y.)* **9**, 1356–1361 (1991).
158. Xiong, C. *et al.* Sindbis virus: an efficient, broad host range vector for gene expression in animal cells. *Science* **243**, 1188–1191 (1989).
159. Davis, N. L., Willis, L. V., Smith, J. F. & Johnston, R. E. In vitro synthesis of infectious venezuelan equine encephalitis virus RNA from a cDNA clone: analysis of a viable deletion mutant. *Virology* **171**, 189–204 (1989).
160. Piver, E., Collin, C., Vaudin, P. & Diatta, A. Les vecteurs dérivés des alphavirus, un système toujours pertinent grâce à de nouveaux modes de vectorisation. **11**, 10 (2007).
161. Leung, J. Y.-S., Ng, M. M.-L. & Chu, J. J. H. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. *Adv Virol* **2011**, (2011).
162. Arudchandran, R. *et al.* Polyethylene glycol-mediated infection of non-permissive mammalian cells with semliki forest virus: application to signal transduction studies. *J. Immunol. Methods* **222**, 197–208 (1999).
163. Kielian, M., Chanel-Vos, C. & Liao, M. Alphavirus Entry and Membrane Fusion. *Viruses* **2**, 796–825 (2010).

164. Atkins, G. J., Sheahan, B. J. & Liljeström, P. The molecular pathogenesis of Semliki Forest virus: a model virus made useful? *Journal of General Virology* **80**, 2287–2297 (1999).
165. Rikkonen, M. Functional Significance of the Nuclear-Targeting and NTP-Binding Motifs of Semliki Forest Virus Nonstructural Protein nsP2. *Virology* **218**, 352–361 (1996).
166. Glasgow, G. M. *et al.* The Semliki Forest virus vector induces p53-independent apoptosis. *Journal of General Virology* **79**, 2405–2410 (1998).
167. McKimmie, C. S., Johnson, N., Fooks, A. R. & Fazakerley, J. K. Viruses selectively upregulate Toll-like receptors in the central nervous system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **336**, 925–933 (2005).
168. Montgomery, S. A., Berglund, P., Beard, C. W. & Johnston, R. E. Ribosomal Protein S6 Associates with Alphavirus Nonstructural Protein 2 and Mediates Expression from Alphavirus Messages. *J Virol* **80**, 7729–7739 (2006).
169. Liljeström, P. & Garoff, H. Expression of proteins using Semliki Forest virus vectors. *Current protocols in molecular biology* 16–20 (1994).
170. Liljeström, P., Lusa, S., Huylebroeck, D. & Garoff, H. In vitro mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest virus: the small 6,000-molecular-weight membrane protein modulates virus release. *J. Virol.* **65**, 4107–4113 (1991).
171. Berglund, P. *et al.* Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology (N.Y.)* **11**, 916–920 (1993).
172. Lobigs, M. & Garoff, H. Fusion function of the Semliki Forest virus spike is activated by proteolytic cleavage of the envelope glycoprotein precursor p62. *J. Virol.* **64**, 1233–1240 (1990).
173. Lobigs, M., Wahlberg, J. M. & Garoff, H. Spike protein oligomerization control of Semliki Forest virus fusion. *J Virol* **64**, 5214–5218 (1990).
174. Stanford University. Recombinant Viral Vector Biosafety Levels. *Stanford Environmental Health & Safety* Available at: <https://ehs.stanford.edu/reference/recombinant-viral-vector-biosafety-levels>. (Accessed: 19th February 2019)
175. Haut Conseil des Biotechnologies. *Principes de classement et guides officiels de la commission de génie génétique*. (2014).
176. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. *General position statement of the ZKBS on frequently carried out genetic engineering operations based on the criteria of comparability: Genetic engineering operations with Sindbis virus and Semliki Forest virus expression systems*. (2007).
177. Commission fédérale d'experts pour la sécurité biologique CFSB. *Recommendation of the SECB on the classification of work with genetically modified viral vectors*. (Commission fédérale d'experts pour la sécurité biologique CFSB, 2016).
178. Smerdou, C. & Liljeström, P. Two-Helper RNA System for Production of Recombinant Semliki Forest Virus Particles. *J Virol* **73**, 1092–1098 (1999).
179. Kohno, A., Emi, N., Kasai, M., Tanimoto, M. & Saito, H. Semliki Forest virus-based DNA expression vector: transient protein production followed by cell death. *Gene Therapy* **5**, 415–418 (1998).
180. DiCiommo, D. P. & Bremner, R. Rapid, High Level Protein Production Using DNA-based Semliki Forest Virus Vectors. *J. Biol. Chem.* **273**, 18060–18066 (1998).
181. Puglia, A. L. P. *et al.* Quantitative RT-PCR for titration of replication-defective recombinant Semliki Forest virus. *Journal of Virological Methods* **193**, 647–652 (2013).

182. Lundstrom, K. Alphaviruses as Tools in Neurobiology and Gene Therapy. *Journal of Receptors and Signal Transduction* **19**, 673–686 (1999).
183. Lundström, K. *et al.* High-level Expression of the Human Neurokinin-1 Receptor in Mammalian Cell Lines using the Semliki Forest Virus Expression System. *European Journal of Biochemistry* **224**, 917–921 (1994).
184. Olson, K. E. *et al.* The expression of chloramphenicol acetyltransferase in *Aedes albopictus* (C6/36) cells and *Aedes triseriatus* mosquitoes using a double subgenomic recombinant sindbis virus. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **24**, 39–48 (1994).
185. Blasey, H. D. *et al.* Large scale transient 5-HT<sub>3</sub> receptor production with the Semliki Forest Virus Expression System. *Cytotechnology* **32**, 199–208 (2000).
186. Olkkonen, V. M., Liljeström, P., Garoff, H., Simons, K. & Dotti, C. G. Expression of heterologous proteins in cultured rat hippocampal neurons using the semliki forest virus vector. *Journal of Neuroscience Research* **35**, 445–451 (1993).
187. Paul, N. I. *et al.* Expression of HIV-1 Envelope Glycoproteins by Semliki Forest Virus Vectors. *AIDS Research and Human Retroviruses* **9**, 963–970 (1993).
188. Cook, D. G. *et al.* Expression and analysis of presenilin 1 in a human neuronal system: localization in cell bodies and dendrites. *PNAS* **93**, 9223–9228 (1996).
189. Monastyrskaja, K. *et al.* Expression and Intracellular Localisation of Odorant Receptors in Mammalian Cell Lines Using Semliki Forest Virus Vectors. *Journal of Receptors and Signal Transduction* **19**, 687–701 (1999).
190. Lundstrom, K., Pralong, W. & Martinou, J. C. Anti-apoptotic effect of Bcl-2 overexpression in RIN cells infected with Semliki Forest virus. *Apoptosis* **2**, 189–191 (1997).
191. Ulmanen, I. *et al.* Expression and intracellular localization of catechol O-methyltransferase in transfected mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* **243**, 452–459 (1997).
192. Lundstrom, K. Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1610**, 90–96 (2003).
193. Benmaamar, R., Astray, R. M., Wagner, R. & Pereira, C. A. High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector. *Journal of Biotechnology* **139**, 283–290 (2009).
194. Hassaine, G. *et al.* Semliki Forest virus vectors for overexpression of 101 G protein-coupled receptors in mammalian host cells. *Protein Expression and Purification* **45**, 343–351 (2006).
195. Lundstrom, K. *et al.* Structural genomics on membrane proteins: comparison of more than 100 GPCRs in 3 expression systems. *J Struct Funct Genomics* **7**, 77–91 (2006).
196. Lundstrom, K., Abenavoli, A., Malgaroli, A. & Ehrenguber, M. U. Novel semliki forest virus vectors with reduced cytotoxicity and temperature sensitivity for long-term enhancement of transgene expression. *Molecular Therapy* **7**, 202–209 (2003).
197. Ehrenguber, M. U. *et al.* Recombinant Semliki Forest virus and Sindbis virus efficiently infect neurons in hippocampal slice cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7041–7046 (1999).
198. Lundstrom, K., Richards, J. G., Pink, J. R. & Jenck, F. Efficient in vivo expression of a reporter gene in rat brain after injection of recombinant replication-deficient Semliki Forest virus. *Gene Therapy and Molecular Biology* **3**, 15–23 (1999).
199. Jia, F., Miao, H., Zhu, X. & Xu, F. Pseudo-typed Semliki Forest virus delivers EGFP into neurons. *J. Neurovirol.* **23**, 205–215 (2017).

200. Ehrenguber, M. U. & Lundstrom, K. Alphaviruses: Semliki Forest Virus and Sindbis Virus Vectors for Gene Transfer into Neurons. *Current Protocols in Neuroscience* **41**, 4.22.1-4.22.24 (2007).
201. Lundstrom, K. Alphavirus vectors as tools in neuroscience and gene therapy. *Virus Research* **216**, 16–25 (2016).
202. Huckriede, A. *et al.* Induction of cytotoxic T lymphocyte activity by immunization with recombinant Semliki Forest virus: indications for cross-priming. *Vaccine* **22**, 1104–1113 (2004).
203. Berglund, P., Fleeton, M. N., Smerdou, C. & Liljeström, P. Immunization with recombinant Semliki Forest virus induces protection against influenza challenge in mice. *Vaccine* **17**, 497–507 (1999).
204. Leitner, W. W. *et al.* Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways. *Nat Med* **9**, 33–39 (2003).
205. Ren, H., Boulikas, T., Söling, A., Warnke, P. C. & Rainov, N. G. Immunogene therapy of recurrent glioblastoma multiforme with a liposomally encapsulated replication-incompetent Semliki forest virus vector carrying the human interleukin-12 gene—a phase I/II clinical protocol. *Journal of neuro-oncology* **64**, 147–154 (2003).
206. Nordström, E. K. L. *et al.* Enhanced immunogenicity using an alphavirus replicon DNA vaccine against human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* **86**, 349–354 (2005).
207. Riezebos-Brilman, A. *et al.* Induction of human papilloma virus E6/E7-specific cytotoxic T-lymphocyte activity in immune-tolerant, E6/E7-transgenic mice. *Gene Therapy* **12**, 1410–1414 (2005).
208. Astray, R. M. *et al.* Rabies virus glycoprotein and immune response pattern using recombinant protein or recombinant RNA viral vectors. *Vaccine* **32**, 2829–2832 (2014).
209. Brinster, C. *et al.* Hepatitis C virus non-structural protein 3-specific cellular immune responses following single or combined immunization with DNA or recombinant Semliki Forest virus particles. *Journal of General Virology* **83**, 369–381 (2002).
210. Penttilä, T. *et al.* DNA immunization followed by a viral vector booster in a Chlamydia pneumoniae mouse model. *Vaccine* **22**, 3386–3394 (2004).
211. Chen, Q. *et al.* Immunization with PfEMP1-DBL1 $\alpha$  generates antibodies that disrupt rosettes and protect against the sequestration of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Vaccine* **22**, 2701–2712 (2004).
212. Riezebos-Brilman, A. *et al.* Recombinant alphaviruses as vectors for anti-tumour and anti-microbial immunotherapy. *Journal of Clinical Virology* **35**, 233–243 (2006).
213. Ho, M., Davis, T. M., Silamut, K., Bunnag, D. & White, N. J. Rosette formation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes from patients with acute malaria. *Infect Immun* **59**, 2135–2139 (1991).
214. Krasemann, S., Jürgens, T. & Bodemer, W. Generation of monoclonal antibodies against prion proteins with an unconventional nucleic acid-based immunization strategy. *Journal of Biotechnology* **73**, 119–129 (1999).
215. Giraud, A. *et al.* Generation of monoclonal antibodies to native human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein by immunization of mice with naked RNA. *J. Virol. Methods* **79**, 75–84 (1999).
216. Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K.-N. & Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol Rev* **53**, 527–552 (2001).

217. Gloriam, D. E. GPCRdb. Available at: <https://gpcrdb.org/>. (Accessed: 24th January 2019)
218. Camici, M., Garcia-Gil, M. & Tozzi, M. G. The Inside Story of Adenosine. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
219. Daly, J. W., Butts-Lamb, P. & Padgett, W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: Interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cellular and Molecular Neurobiology* **3**, 69–80 (1983).
220. Kull, B., Svenningsson, P. & Fredholm, B. B. Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Mol. Pharmacol.* **58**, 771–777 (2000).
221. Jacobson, K. A. & Gao, Z.-G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 247–264 (2006).
222. Keuerleber, S., Gsandtner, I. & Freissmuth, M. From cradle to twilight: The carboxyl terminus directs the fate of the A2A-adenosine receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1808**, 1350–1357 (2011).
223. Vidi, P.-A., Chen, J., Irudayaraj, J. M. K. & Watts, V. J. Adenosine A(2A) receptors assemble into higher-order oligomers at the plasma membrane. *FEBS Lett.* **582**, 3985–3990 (2008).
224. Canals, M. *et al.* Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Neurochem.* **88**, 726–734 (2004).
225. Ciruela, F. *et al.* Heterodimeric adenosine receptors: a device to regulate neurotransmitter release. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2427–2431 (2006).
226. Carriba, P. *et al.* Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* **32**, 2249–2259 (2007).
227. Borroto-Escuela, D. O. *et al.* Mapping the Interface of a GPCR Dimer: A Structural Model of the A2A Adenosine and D2 Dopamine Receptor Heteromer. *Front Pharmacol* **9**, (2018).
228. de Lera Ruiz, M., Lim, Y.-H. & Zheng, J. Adenosine A2A Receptor as a Drug Discovery Target. *J. Med. Chem.* **57**, 3623–3650 (2014).
229. Bahreyni, A. *et al.* Therapeutic potential of A2 adenosine receptor pharmacological regulators in the treatment of cardiovascular diseases, recent progress, and prospective. *J. Cell. Physiol.* **234**, 1295–1299 (2019).
230. Pinna, A., Serra, M., Morelli, M. & Simola, N. Role of adenosine A2A receptors in motor control: relevance to Parkinson's disease and dyskinesia. *J Neural Transm* **125**, 1273–1286 (2018).
231. Leone, R. D. & Emens, L. A. Targeting adenosine for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer* **6**, (2018).
232. Jaakola, V.-P. *et al.* The 2.6 Å Crystal Structure of a Human A2A Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. *Science* **322**, 1211–1217 (2008).
233. Schonenbach, N. S., Rieth, M. D., Han, S. & O'Malley, M. A. Adenosine A2a receptors form distinct oligomers in protein detergent complexes. *FEBS Lett.* (2016). doi:10.1002/1873-3468.12367
234. Lebon, G., Bennett, K., Jazayeri, A. & Tate, C. G. Thermostabilisation of an Agonist-Bound Conformation of the Human Adenosine A2A Receptor. *J Mol Biol* **409**, 298–310 (2011).
235. Naranjo, A. N., McNeely, P. M., Katsaras, J. & Robinson, A. S. Impact of purification conditions and history on A2A adenosine receptor activity: The role of CHAPS and lipids. *Protein Expression and Purification* doi:10.1016/j.pep.2016.05.015

236. Jamshad, M. *et al.* G-protein coupled receptor solubilization and purification for biophysical analysis and functional studies, in the total absence of detergent. *Bioscience Reports* **35**, 1–10 (2015).
237. Brea, R. J. *et al.* In Situ Reconstitution of the Adenosine A2A Receptor in Spontaneously Formed Synthetic Liposomes. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 3607–3610 (2017).
238. Igonet, S. *et al.* Enabling STD-NMR fragment screening using stabilized native GPCR: A case study of adenosine receptor. *Scientific Reports* **8**, (2018).
239. Tripathi, A., Gaponenko, V. & Majetschak, M. Commercially available antibodies directed against  $\alpha$ -adrenergic receptor subtypes and other G protein-coupled receptors with acceptable selectivity in flow cytometry experiments. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **389**, 243–248 (2016).
240. Hino, T. *et al.* G protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature* **482**, 237–240 (2012).
241. McMahon, C. *et al.* Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies. *Nature Structural & Molecular Biology* **25**, 289–296 (2018).
242. Hardeland, R., Pandi-Perumal, S. R. & Cardinali, D. P. Melatonin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38**, 313–316 (2006).
243. Arendt, J. Complex effects of melatonin. *Therapie* **53**, 479–488 (1998).
244. Reppert, S. M. & Weaver, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**, 935–941 (2002).
245. Guerrero, J. M. & Reiter, R. J. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* **2**, 167–179 (2002).
246. Menéndez-Menéndez, J. & Martínez-Campa, C. Melatonin: An Anti-Tumor Agent in Hormone-Dependent Cancers. *Int J Endocrinol* **2018**, 3271948 (2018).
247. Hardeland, R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* **27**, 119–130 (2005).
248. Dubocovich, M. L. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, Classification, and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. *Pharmacol Rev* **62**, 343–380 (2010).
249. Jockers, R., Maurice, P., Boutin, J. A. & Delagrange, P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* **154**, 1182–1195 (2008).
250. Nosjean, O. *et al.* Identification of the Melatonin-binding Site MT 3 as the Quinone Reductase 2. *J. Biol. Chem.* **275**, 31311–31317 (2000).
251. Gloriam, D. E. MT1 receptor (MTr1a\_human). *GPCRdb* Available at: [https://gpcrdb.org/protein/mtr1a\\_human/](https://gpcrdb.org/protein/mtr1a_human/). (Accessed: 24th January 2019)
252. Dubocovich, M. L. & Markowska, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocr* **27**, 101–110 (2005).
253. Slominski, R. M., Reiter, R. J., Schlabritz-Loutsevitch, N., Ostrom, R. S. & Slominski, A. T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol. Cell. Endocrinol.* **351**, 152–166 (2012).
254. Oishi, A., Cecon, E. & Jockers, R. Chapter Two - Melatonin Receptor Signaling: Impact of Receptor Oligomerization on Receptor Function. in *International Review of Cell and Molecular Biology* (ed. Shukla, A. K.) **338**, 59–77 (Academic Press, 2018).
255. Ayoub, M. A. *et al.* Monitoring of Ligand-independent Dimerization and Ligand-induced Conformational Changes of Melatonin Receptors in Living Cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *J. Biol. Chem.* **277**, 21522–21528 (2002).



256. Ayoub, M. A., Levoye, A., Delagrangé, P. & Jockers, R. Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers. *Mol. Pharmacol.* **66**, 312–321 (2004).
257. Baba, K. *et al.* Heteromeric MT1/MT2 Melatonin Receptors Modulate Photoreceptor Function. *Sci. Signal.* **6**, ra89–ra89 (2013).
258. Levoye, A. *et al.* The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J.* **25**, 3012–3023 (2006).
259. Cecon, E., Oishi, A. & Jockers, R. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. *British Journal of Pharmacology* **175**, 3263–3280 (2018).
260. Liu, J. *et al.* MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **56**, 361–383 (2016).
261. Zhu, L. & Zee, P. C. Circadian rhythm sleep disorders. *Neurol Clin* **30**, 1167–1191 (2012).
262. Sumaya, I. C., Masana, M. I. & Dubocovich, M. L. The antidepressant-like effect of the melatonin receptor ligand luzindole in mice during forced swimming requires expression of MT2 but not MT1 melatonin receptors. *J. Pineal Res.* **39**, 170–177 (2005).
263. Wang, X. *et al.* The melatonin MT1 receptor axis modulates mutant Huntingtin-mediated toxicity. *J. Neurosci.* **31**, 14496–14507 (2011).
264. Chern, C.-M., Liao, J.-F., Wang, Y.-H. & Shen, Y.-C. Melatonin ameliorates neural function by promoting endogenous neurogenesis through the MT2 melatonin receptor in ischemic-stroke mice. *Free Radical Biology and Medicine* **52**, 1634–1647 (2012).
265. Blask, D. E. *et al.* Melatonin Inhibition of Cancer Growth in Vivo Involves Suppression of Tumor Fatty Acid Metabolism via Melatonin Receptor-mediated Signal Transduction Events. *Cancer Res* **59**, 4693–4701 (1999).
266. O’Neal-Moffitt, G., Pilli, J., Kumar, S. S. & Olcese, J. Genetic deletion of MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> melatonin receptors enhances murine cognitive and motor performance. *Neuroscience* **277**, 506–521 (2014).
267. Hutchinson, A. J., Hudson, R. L. & Dubocovich, M. L. Genetic deletion of MT(1) and MT(2) melatonin receptors differentially abrogates the development and expression of methamphetamine-induced locomotor sensitization during the day and the night in C3H/HeN mice. *J. Pineal Res.* **53**, 399–409 (2012).
268. Clough, S. J., Hutchinson, A. J., Hudson, R. L. & Dubocovich, M. L. Genetic Deletion of the MT1 or MT2 Melatonin Receptors Abrogates Methamphetamine-Induced Reward in C3H/HeN Mice. *Physiol Behav* **132**, 79–86 (2014).
269. Logez, C. Etude du récepteur humain de la mélatonine MT1 par des approches in vitro : mise au point des conditions de production, de purification et de caractérisation fonctionnelle. (Université de Strasbourg, 2013).
270. Logez, C. *et al.* Recombinant Human Melatonin Receptor MT1 Isolated in Mixed Detergents Shows Pharmacology Similar to That in Mammalian Cell Membranes. *PLoS One* **9**, (2014).
271. Logez, C. *et al.* Detergent-free isolation of functional G Protein-Coupled Receptors into Nanomeric Lipid Particles. *Biochemistry* **55**, 38–48 (2015).
272. Wu, Y.-H. *et al.* Distribution of MT1 melatonin receptor immunoreactivity in the human hypothalamus and pituitary gland: Colocalization of MT1 with vasopressin, oxytocin, and corticotropin-releasing hormone. *Journal of Comparative Neurology* **499**, 897–910 (2006).

273. Williams, L. M. *et al.* Characterization of an antibody to the human melatonin mt1 receptor. *Journal Of Neuroendocrinology* **13**, 94–101 (2001).
274. Angeloni, D., Longhi, R. & Fraschini, F. Production and characterization of antibodies directed against the human melatonin receptors Mel-1a (mt1) and Mel-1b (MT2). *Eur J Histochem* **44**, 199–204 (2000).
275. Cecon, E. *et al.* Detection of recombinant and endogenous mouse melatonin receptors by monoclonal antibodies targeting the C-terminal domain. *Journal of Pineal Research* **0**, e12540 (2019).
276. Cordeiro, N. *et al.* Obtaining anti-type 1 melatonin receptor antibodies by immunization with melatonin receptor-expressing cells. *Journal of Immunological Methods* **428**, 37–41 (2016).
277. Benmaamar, R. Development and optimization of alphaviral systems for membrane protein functional expression. (Strasbourg, 2009).
278. André, N. *et al.* Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in *Pichia pastoris* to levels required for structural studies via a single expression screen. *Protein Sci.* **15**, 1115–1126 (2006).
279. Kapust, R. B. *et al.* Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng.* **14**, 993–1000 (2001).
280. Denisov, I. G., Baas, B. J., Grinkova, Y. V. & Sligar, S. G. Cooperativity in cytochrome P450 3A4: linkages in substrate binding, spin state, uncoupling, and product formation. *J. Biol. Chem.* **282**, 7066–7076 (2007).
281. Dominik, P. K. & Kossiakoff, A. A. Chapter Eleven - Phage Display Selections for Affinity Reagents to Membrane Proteins in Nanodiscs. in *Methods in Enzymology* (ed. Shukla, A. K.) **557**, 219–245 (Academic Press, 2015).
282. Yardeni, T., Eckhaus, M., Morris, H. D., Huizing, M. & Hoogstraten-Miller, S. Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim (NY)* **40**, 155–160 (2011).
283. Romão, E. *et al.* Construction of High-Quality Camel Immune Antibody Libraries. in *Phage Display* 169–187 (2018).
284. Vincke, C. *et al.* Generation of Single Domain Antibody Fragments Derived from Camelids and Generation of Manifold Constructs. in *Antibody Engineering* (ed. Chames, P.) **907**, 145–176 (Humana Press, 2012).
285. Cheng, Y. & Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K<sub>I</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108 (1973).
286. Singh, S. *et al.* Large-scale production of membrane proteins in *Pichia pastoris*: the production of G protein-coupled receptors as a case study. *Methods Mol. Biol.* **866**, 197–207 (2012).
287. Chapman-Smith, A. & Cronan, J. E. In vivo enzymatic protein biotinylation. *Biomolecular Engineering* **16**, 119–125 (1999).
288. Magnani, F., Shibata, Y., Serrano-Vega, M. J. & Tate, C. G. Co-evolving stability and conformational homogeneity of the human adenosine A2a receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10744–10749 (2008).
289. DeGRIP, J. W., VanOOSTRUM, J. & Bovee-Geurts, P. H. M. Selective detergent-extraction from mixed detergent/lipid/protein micelles, using cyclodextrin inclusion compounds: a novel generic approach for the preparation of proteoliposomes. *Biochemical Journal* **330**, 667–674 (1998).
290. Pandit, A. *et al.* Assembly of the Major Light-Harvesting Complex II in Lipid Nanodiscs. *Biophysical Journal* **101**, 2507–2515 (2011).

291. Schleichach, J. P. & Sanders, C. R. The safety dance: biophysics of membrane protein folding and misfolding in a cellular context. *Quarterly Reviews of Biophysics* **48**, 1–34 (2015).
292. Buck, T. M. *et al.* Expression of three topologically distinct membrane proteins elicits unique stress response pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiological Genomics* **47**, 198–214 (2015).
293. Palmer, T. M., Poucher, S. M., Jacobson, K. A. & Stiles, G. L. 125I-4-(2-[7-amino-2-[2-furyl][1, 2, 4] triazolo [2, 3-a][1, 3, 5] triazin-5-yl-amino] ethyl) phenol, a high affinity antagonist radioligand selective for the A2a adenosine receptor. *Molecular pharmacology* **48**, 970–974 (1995).
294. Audinot, V. *et al.* Molecular cloning and pharmacological characterization of rat melatonin MT1 and MT2 receptors. *Biochemical Pharmacology* **75**, 2007–2019 (2008).
295. Lundstrom, K. Purification and Concentration of Alphavirus. *Cold Spring Harb Protoc* **2012**, pdb.prot070169 (2012).
296. Choi, Y. *et al.* Melatonin directly interacts with cholesterol and alleviates cholesterol effects in dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers. *Soft Matter* **10**, 206–213 (2013).
297. Hamdan, N., Kritsiligkou, P. & Grant, C. M. ER stress causes widespread protein aggregation and prion formation. *J Cell Biol* **216**, 2295–2304 (2017).
298. Thomas, J. A. & Tate, C. G. Quality Control in Eukaryotic Membrane Protein Overproduction. *Journal of Molecular Biology* **426**, 4139–4154 (2014).
299. Andréll, J. & Tate, C. G. Overexpression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. *Mol Membr Biol* **30**, 52–63 (2013).
300. Cabrera, A., Sáez, D., Céspedes, S., Andrews, E. & Oñate, A. Vaccination with recombinant Semliki Forest virus particles expressing translation initiation factor 3 of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Immunobiology* **214**, 467–474 (2009).
301. Walczak, M. *et al.* Heterologous Prime-Boost Immunizations with a Virosomal and an Alphavirus Replicon Vaccine. *Mol. Pharmaceutics* **8**, 65–77 (2011).
302. van de Wall, S. *et al.* Tattoo Delivery of a Semliki Forest Virus-Based Vaccine Encoding Human Papillomavirus E6 and E7. *Vaccines (Basel)* **3**, 221–238 (2015).
303. Ip, P. P. *et al.* Antigen design enhances the immunogenicity of Semliki Forest virus-based therapeutic human papillomavirus vaccines. *Gene Ther* **22**, 560–567 (2015).
304. Reynolds, T. D., Buonocore, L., Rose, N. F., Rose, J. K. & Robek, M. D. Virus-Like Vesicle-Based Therapeutic Vaccine Vectors for Chronic Hepatitis B Virus Infection. *J Virol* **89**, 10407–10415 (2015).
305. Babb, R., Chan, J., Khairat, J. E., Furuya, Y. & Alsharifi, M. Gamma-Irradiated Influenza A Virus Provides Adjuvant Activity to a Co-Administered Poorly Immunogenic SFV Vaccine in Mice. *Front Immunol* **5**, (2014).
306. Niedre-Otomere, B. *et al.* Recombinant Semliki Forest virus vectors encoding hepatitis B virus small surface and pre-S1 antigens induce broadly reactive neutralizing antibodies. *Journal of Viral Hepatitis* **19**, 664–673 (2012).
307. Berek, C. & Ziegner, M. The maturation of the immune response. *Immunology Today* **14**, 400–404 (1993).
308. Lundstrom, K. Alphavirus-Based Vaccines. *Viruses* **6**, 2392–2415 (2014).
309. Bachmann, M. F. & Jennings, G. T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology* **10**, 787–796 (2010).

310. Cubas, R. *et al.* Virus-like particle (VLP) Lymphatic Trafficking and Immune Response Generation after Immunization by Different Routes. *J Immunother* **32**, 118–128 (2009).
311. Fink, A. L., Engle, K., Ursin, R. L., Tang, W.-Y. & Klein, S. L. Biological sex affects vaccine efficacy and protection against influenza in mice. *PNAS* **115**, 12477–12482 (2018).
312. Zeng, M., Nourishirazi, E., Guinet, E. & Nouri-Shirazi, M. The genetic background influences the cellular and humoral immune responses to vaccines. *Clin Exp Immunol* **186**, 190–204 (2016).
313. Kuipers, K. *et al.* Genetic background impacts vaccine-induced reduction of pneumococcal colonization. *Vaccine* **35**, 5235–5241 (2017).
314. Daemen, T., Riezebos-Brilman, A., Regts, J., Dontje, B. & Wilschut, J. Superior therapeutic efficacy of alphavirus-mediated immunization against human papilloma virus type 16 antigens in a murine tumour model: effects of the route of immunization. 11
315. Xiao, G., Li, X., Kumar, A. & Cui, Z. Transcutaneous DNA immunization following waxing-based hair depilation elicits both humoral and cellular immune responses. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **82**, 212–217 (2012).
316. Potthoff, A. *et al.* Immunogenicity and efficacy of intradermal tattoo immunization with adenoviral vector vaccines. *Vaccine* **27**, 2768–2774 (2009).
317. Kramer, M. G. *et al.* Neoadjuvant administration of Semliki Forest virus expressing interleukin-12 combined with attenuated Salmonella eradicates breast cancer metastasis and achieves long-term survival in immunocompetent mice. *BMC Cancer* **15**, (2015).
318. Bouressam, M.-L., Lartaud, I., Dupuis, F. & Lecat, S. No answer to the lack of specificity: mouse monoclonal antibody targeting the angiotensin II type 1 receptor AT1 fails to recognize its target. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (2018). doi:10.1007/s00210-018-1522-4
319. Bazan, J., Całkosiński, I. & Gamian, A. Phage display—A powerful technique for immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother* **8**, 1817–1828 (2012).
320. Dominik, P. K. *et al.* Conformational Chaperones for Structural Studies of Membrane Proteins Using Antibody Phage Display with Nanodiscs. *Structure* **24**, 300–309 (2016).
321. Maass, D. R., Sepulveda, J., Pernthaner, A. & Shoemaker, C. B. Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods* **324**, 13–25 (2007).
322. Nolen-Walston, R. *et al.* Eastern equine encephalitis in 9 South American camelids. *J. Vet. Intern. Med.* **21**, 846–852 (2007).
323. Ferrari, A. *et al.* Activity modulation of microbial enzymes by llama (*Lama glama*) heavy-chain polyclonal antibodies during in vivo immune responses. *animal* **6**, 510–517 (2012).
324. Pardon, E. *et al.* A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nature Protocols* **9**, 674–693 (2014).
325. Pavlidou, M., Hänel, K., Möckel, L. & Willbold, D. Nanodiscs Allow Phage Display Selection for Ligands to Non-Linear Epitopes on Membrane Proteins. *PLoS One* **8**, (2013).
326. Könitzer, J. D. *et al.* Generation of a highly diverse panel of antagonistic chicken monoclonal antibodies against the GIP receptor. *MAbs* **9**, 536–549 (2017).



# Remerciements

Après ce travail — et cette lecture — de longue haleine, voici venu le temps, tant attendu, des remerciements. Et heureusement pour moi, le nombre de pages n'en est pas officiellement limité, car j'en ai de nombreux à faire ...

Les premiers vont à tous les membres du jury, et particulièrement à Julie Kniazeff et Bruno Miroux. Merci d'avoir accepté et pris le temps d'examiner mon travail, et d'y apporter votre regard d'expert. J'espère que vous aurez trouvé la lecture de ce manuscrit aussi agréable que possible. J'adresse également toute ma gratitude à Gilles Ferry et Jean Boutin, qui ont appuyé et soutenu le projet, et ont ainsi contribué de manière non négligeable à son co-financement par l'Institut de Recherches Servier. Merci également d'avoir créé et beaucoup œuvré pour la vie d'un réseau de travail sur les protéines membranaires. Les collaborations effectuées dans ce cadre ont été très enrichissantes en plus d'être toujours agréables, et j'ai grandement apprécié de pouvoir en faire partie.

Je souhaite ensuite adresser un remerciement — ou plutôt une foule de remerciements — tous particuliers à Renaud. Merci pour ta bonne humeur et ton optimisme absolument inébranlables. Merci pour ta disponibilité et tes conseils avisés. Merci pour la confiance que tu m'as accordée tout au long de ce projet, et pour toute l'autonomie dont j'ai pu bénéficier, sans jamais me sentir livrée à moi-même pour autant. Tu m'auras permis de faire une thèse qui me ressemble. Merci pour l'ensemble des collaborations auxquelles tu m'as invitée à prendre part, et qui m'ont laissé un goût inoubliable d'exotisme et d'aventure. Travailler à tes côtés et sous ta supervision a été extrêmement formateur, et tu représentes à mes yeux un modèle de management.

Ce travail de thèse n'a pu être bâti que grâce à la contribution d'un grand nombre de collaborateurs, qui m'ont pour certains accueillie dans leurs murs et qui ont consacré du temps à ma formation. Merci à Renato Astray, Ana Lia Puglia, Sandra Suárez-Patiño, et à toute l'équipe du LIV pour votre gentillesse et votre accueil, je n'aurais pas pu imaginer un meilleur cadre pour découvrir un petit morceau de Brésil. Merci à Serge Muyldermans et à Cécile Vincke pour votre enthousiasme au pied levé face à nos idées virales farfelues, et pour votre accueil à Bruxelles. J'ai adoré pouvoir profiter de la bonne humeur qui règne dans votre joyeuse équipe. Merci à Laurent Mailly et au Professeur Baumert, sans vous je ne sais pas si des virus auraient un jour pu traverser les portes infranchissables d'une animalerie ! Merci également à Roslyn Bill, Alice Rothnie et Hoor Ayub pour votre accueil à Birmingham. Les résultats de nos efforts n'auront pas directement porté leurs fruits dans le cadre de ce travail, mais je ne désespère pas que d'autres percent un jour les mystères et les avantages du protoplasting de levures. Merci à Jean-Louis Banères de l'IBMM, les quelques jours de formation nanodisques remontent un peu maintenant, mais ils ont constitué ma

première expérience « d'ailleurs » — la famille IMPReSs part en voyage —, et je ne les oublie pas. Merci enfin à Sarah Cianferani et Thomas Botzanowski du LSMBO, travailler avec vous fut un très grand plaisir.

Mais bien sûr, il n'y a pas que l'ailleurs ! Je suis arrivée au sein du laboratoire en tant qu'ingénieure d'étude et sans imaginer une seconde en ressortir avec un titre de docteur, mais si j'avais voulu faire une thèse, pour rien au monde je n'aurais souhaité la faire dans un autre cadre ! Merci à tous mes collègues — permanents et transitoires — du bureau D327 et de la plateforme IMPReSs : Gabrielle et Valérie pour votre gentillesse et votre aide, Sarah pour ton énergie débordante. Merci à Lydia, grâce à tes conseils, les nanodisques n'ont qu'à bien se tenir (et mes papilles se souviennent encore du goût des *Millionnaire Shortbread*). Merci Pernelle et Anna pour la vie que vous avez apporté chacune à votre manière à l'équipe durant votre passage. Merci également à Estelle et Noémie, vous accompagner durant vos stages aura été pour moi une expérience très formatrice. Et enfin merci Lucile, tu constitues pour l'instant à toi seule la nouvelle génération IMPReSsienne ! Cinq années de travail de laboratoire comportent un nombre incalculable d'ascenseurs émotionnels, et ils auraient été beaucoup plus difficiles à surmonter sans la bonne humeur qui règne dans le bout du couloir.

Merci à toute l'équipe « RCPG, Douleur et Inflammation », pour votre écoute et la pertinence de vos remarques et conseils en réunion de laboratoire, et pour votre disponibilité et votre aide en cas de besoin.

Merci à Georges Orfanoudakis de m'avoir confié une partie de la responsabilité de l'enseignement des projets de Bioproduction à l'ESBS, et encore une fois merci à Renaud d'avoir partagé cet enseignement avec moi. J'ai découvert grâce à cette expérience la joie de transmettre, et j'ai eu la chance de le faire avec des élèves motivés et consciencieux, dans un cadre aussi optimal qu'exceptionnel.

Plus largement au sein de l'UMR7242, je souhaite remercier le comité des fêtes et l'ensemble des doc/post-doc que j'ai pu côtoyer. Merci pour les fêtes de Noël, les décors de bureau, les WIP, les pétanques, les raclettes, les baby-foot, les barbecues ... et j'en passe.

Merci également à l'équipe du Jardin des Sciences de Strasbourg, et particulièrement à Amandine Duluard, Lucile Schneider et Marie Jeantin. Les formations de vulgarisation scientifique, le concours « *Ma Thèse en 180 Secondes* », et les différentes autres actions auxquelles j'ai eu la chance de participer m'ont fait découvrir un domaine et un champ des possibles professionnels que je ne soupçonnais pas.

J'ai eu la grande chance de pouvoir faire de ma période de rédaction de thèse une très belle aventure. Merci à toutes celles et tous ceux qui ont rendu cela possible. Gaël, Tof et Elsa à Saint-Quay-Portrieux, Joanne à Quimper, Clémence à Lyon, Jérôme à Servoz, Juliette à Paris et la famille Jacquemin à Bellefosse. Cette carrière temporaire

d'écrivain, au lieu d'un tunnel infini de galères et de frustrations, m'aura apportée beaucoup de beaux souvenirs.

Et bien sûr, merci du fond du cœur à toutes celles et tous ceux qui ont contribué à rendre ces cinq dernières années lumineuses et pleines de joie ! Je n'aurais jamais pu imaginer un tel bilan quand je suis revenue à Strasbourg — et, comble de l'ironie, dans le même bâtiment — au moment où tout le reste de la promotion 2014 de l'ESBS s'envolait vers d'autres horizons, le diplôme en poche ! Il faut avouer que j'avais légèrement la mort dans l'âme...

Merci à Nathalie et Clémence, puis Bruno, pour ces très belles années partagées dans le triplex des lentilles. Merci à Glenn, Raphaëlle et Armand, pour avoir fait d'Illkirch et de Strasbourg un havre de paix où il fait bon vivre, et ce malgré les galères du quotidien et les lamas récalcitrants ; merci pour les tup-courses, les dîners, les soirées, les week-ends, les trails, les matinales piscine, ... Merci à Johanna, Clémence et Juliette, amies de toujours, fidèles au poste du remontage de moral et partenaires de bons moments. Merci à Sophie, Nico, petit Nico et Julien, pour tous ces instants partagés sur un bateau ou entre deux tirades ; l'aviron a été un exutoire plus que salvateur pour ma santé mentale à bien des moments. Merci à Jérôme, et à Etienne, pour les soirées jeux passées plutôt à manger des pizzas. Et merci enfin à tous les autres, que la liste est trop longue pour citer nommément, pour tous ces moments et ces discussions partagés. En faisant partie de ma vie, vous avez, chacun à votre manière, contribué à faire de moi celle que je suis aujourd'hui, et votre participation indirecte à cette thèse n'est pas à prouver.

Pour finir en beauté, je tiens également à remercier mes parents, mon frère, ainsi que Murielle et Angélique. Votre amour et votre soutien sont des armes fabuleuses pour affronter la vie.





Lucie Hartmann

# Développement et caractérisation d'outils immunologiques dirigés contre des récepteurs membranaires d'intérêt thérapeutique

## Résumé

Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) constituent la plus grande famille de protéines membranaires chez l'Homme, et leur implication dans un grand nombre de processus physiologiques justifie pleinement l'intérêt de leur étude. Les anticorps spécifiques de ces récepteurs sont des outils polyvalents à haute valeur ajoutée, qui restent toutefois encore trop rarement disponibles, notamment en raison des difficultés techniques posées par leur génération.

Ce manuscrit présente la mise au point d'une méthode d'immunisation alternative et innovante, mettant en jeu des particules virales recombinantes dérivées du Virus de la Forêt de Semliki (SFV) codant pour le récepteur d'intérêt. Appliquée au récepteur de l'adénosine A<sub>2A</sub> humain, l'immunisation permet d'engendrer la surexpression de celui-ci à la surface des cellules de l'animal infecté, et de provoquer l'apparition d'une réponse immunitaire.

Cette approche permet d'une part de générer un sérum polyclonal de souris spécifique au récepteur, et ouvre donc une nouvelle voie pour l'obtention d'anticorps monoclonaux murins. Elle semble d'autre part prometteuse pour la génération de fragments d'anticorps de camélidés ou V<sub>H</sub>H.

## Résumé en anglais

G Protein Coupled Receptors (GPCRs) constitute the largest membrane protein family represented in the human genome. Their involvement in a wide number of biological processes fully supports their study. GPCR-targeting antibodies are versatile and valuable tools, which remain scarcely available, chiefly because their generation is a challenging process.

This thesis presents an alternative and innovative strategy in which recombinant Semliki Forest Virus (SFV) particles coding for the receptor of interest are used as immunogens. When applied to the human version of the Adenosine A<sub>2A</sub> receptor, this method enables to cause the receptor's overexpression at the surface of the infected animal cells, which generates an immune response.

This strategy enables to raise receptor-specific mouse polyclonal serum. It opens a new path towards the generation of monoclonal mouse antibodies. Additionally, it seems to also be a promising approach to develop camelid antibody fragments, also known as V<sub>H</sub>H.

Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) constituent la plus grande famille de protéines membranaires chez l'Homme, et leur implication dans un grand nombre de processus physiologiques justifie pleinement l'intérêt de leur étude. Les anticorps spécifiques de ces récepteurs sont des outils polyvalents à haute valeur ajoutée, qui restent toutefois encore trop rarement disponibles, notamment en raison des difficultés techniques posées par leur génération.

Ce manuscrit présente la mise au point d'une méthode d'immunisation alternative et innovante, mettant en jeu des particules virales recombinantes dérivées du Virus de la Forêt de Semliki (SFV) codant pour le récepteur d'intérêt. Appliquée au récepteur de l'adénosine A2A humain, l'immunisation permet d'engendrer la surexpression de celui-ci à la surface des cellules de l'animal infecté, et de provoquer l'apparition d'une réponse immunitaire.

Cette approche permet d'une part de générer un sérum polyclonal de souris spécifique au récepteur, et ouvre donc une nouvelle voie pour l'obtention d'anticorps monoclonaux murins. Elle semble d'autre part prometteuse pour la génération de fragments d'anticorps de camélidés ou VHH.



G Protein Coupled Receptors (GPCRs) constitute the largest membrane protein family represented in the human genome. Their involvement in a wide number of biological processes fully supports their study. GPCR-targeting antibodies are versatile and valuable tools, which remain scarcely available, chiefly because their generation is a challenging process.

This thesis presents an alternative and innovative strategy in which recombinant Semliki Forest Virus (SFV) particles coding for the receptor of interest are used as immunogens. When applied to the human version of the Adenosine A2A receptor, this method enables to cause the receptor's overexpression at the surface of the infected animal cells, which generates an immune response.

This strategy enables to raise receptor-specific mouse polyclonal serum. It opens a new path towards the generation of monoclonal mouse antibodies. Additionally, it seems to also be a promising approach to develop camelid antibody fragments, also known as VHH.