



HAL
open science

Inhibition isoforme spécifique des fonctions de la MAPK p38 α par des fragments d'anticorps

Emilie Renaud

► **To cite this version:**

Emilie Renaud. Inhibition isoforme spécifique des fonctions de la MAPK p38 α par des fragments d'anticorps. Cancer. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT088 . tel-02500676

HAL Id: tel-02500676

<https://theses.hal.science/tel-02500676>

Submitted on 6 Mar 2020

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale CBS2 n°168

Unité de recherche U1194 – Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier

Inhibition isoforme spécifique des fonctions de la MAPK p38 α par des fragments d'anticorps

Présentée par Emilie RENAUD

Le 30 Novembre 2018

Sous la direction du Dr Laurence GUGLIELMI

Devant le jury composé de

M. Eric REITER, DR2, UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements

M. Patrick CHAMES, DR2, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille

Mme Sofia KOSSIDA, PR, Institut de Génétique Humaine

M. Philippe MONDON, Directeur de Projet, LFB SA

Mme Laurence GUGLIELMI, MCF, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Présidente du jury

Examineur

Directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury, les Dr. Eric Reiter, Patrick Chames, Philippe Mondon et le Pr. Sofia Kossida pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie également les Dr. Marion Peter-Baylon, Serge Roche, Céline Gongora et Aurélien Olichon qui ont suivi l'évolution de mon projet au cours des différents comités de thèse.

Ce projet a pu être réalisé grâce au financement de la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer. Je tiens donc également à les remercier pour m'avoir permis de réaliser ces trois années de recherche qui sont venues conclure mon parcours pharmaceutique.

Je tiens tout particulièrement à remercier mes encadrants, les Dr. Laurence Guglielmi, Christian Larroque et Pierre Martineau.

Christian, tu auras débuté en tant que directeur de thèse pour te faire rattraper par Laurence sur le sprint final juste avant la photo finish. Je te remercie pour tes conseils, ton autre regard sur le projet ainsi que pour ton sourire bienveillant à chaque fois que tu me croisais dans les couloirs. Tu m'as emmenée dans les recoins les plus sombres de l'enzymologie et de la spectrométrie de masse sur lesquels j'avais définitivement tiré un trait depuis mes premières années de fac. Je te souhaite une retraite heureuse parmi tes extraits de plantes et tes « tisanes » exotiques, ainsi qu'auprès de tes petits-enfants actuels et à venir ;)

Pierre, je crois que tu ne m'as jamais laissée sans réponse à toutes mes interrogations, mêmes les plus nocturnes et les plus arrosées au cours de soirées post-JET. Toujours disponible malgré cet emploi du temps de ministre, je tiens à te remercier pour tout ce que tu as pu m'apprendre au cours de ces années à côtoyer les anticorps. Grand vaudou des puissances de 10, sache que tes brouillons griffonnés au coin d'une feuille se vendent cher au marché noir.

Laurence, par où commencer... Je suis arrivée à tes côtés en stage de Master 2 avec pour ambition de découvrir ce qui pouvait bien se cacher derrière un intracorps ! Je n'ai pas été déçue, et c'est encore aujourd'hui avec le même plaisir et intérêt que j'ai à venir au labo. Tu m'as énormément appris. Mille fois merci pour ton investissement sans faille depuis le début. Je suis bien consciente de la chance que j'ai eue d'avoir une directrice de thèse qui prenait le relais dans mes manips pendant que j'écrivais mes demandes de financement ou mon manuscrit de thèse. J'ai été ta toute première doctorante. J'espère ne pas trop t'avoir fatiguée par moment avec cette fonction et que tu encadreras de prochains étudiants avec toujours autant de plaisir. Nous avons su faire avec le caractère ou les défauts de chacune et j'ai eu beaucoup de plaisir à échanger avec toi, que ce soit sur le plan scientifique ou autre. Tu as été une excellente directrice de thèse.

Je vous remercie tous les 3 pour m'avoir fait évoluer et progresser tout du long de ces trois dernières années. Vous avez participé à l'ouverture de mon champ scientifique et au renforcement de mon souhait de poursuivre dans la recherche et le monde fabuleux des anticorps.

Le labo et les manip c'est chouette, mais on ne va pas se mentir, sans les principaux occupants ça sonne bien vide. Je voudrais remercier l'ensemble des membres de l'équipe PM, passés et présents. Kékile, tu resteras à jamais la personne m'ayant fait découvrir le dark web des dessous usagés. Je n'ai jamais autant porté de jean taille haute depuis notre rencontre. Vive les figues et les concombres ! ; Sheila *on fire* et tes cartons ; Julie pour ta douceur, ton sourire et ton accent aveyronnais ; Adeline pour mes sessions shopping faites sur le dos de tes enfants ; Déboubiche, la dernière survivante du cru 2016, à notre escapade pécsoise où j'ai bien cru pendant un moment que l'on était en train de rejouer une scène de Taken dans les mains de la mafia hongroise ! Nos discussions au-dessus des écrans du bureau m'ont beaucoup manquée après ton départ ; Nicole et tes « mistinguettes », encore merci pour tes conseils et ton aide pour les manip d'ADP-Glo et THP-1 ; Bruno et tes apéros tout bio ; Vincent mon partenaire de pause-café le plus fidèle et tes madeleines Bijou ; aux deux dernières recrues, Tristan et Célestine, pour leur vent de fraîcheur sur l'équipe (Kof ! kof ! kof !) et enfin à la team GenAc, à Mady et son énergie communicative et à Myriam, ses tubulures et ses pâtisseries Top Chef. En parlant de douceurs, je voudrais aussi remercier notre stagiaire Ikrame et ses pots de départ. Tu devrais repartir plus souvent, si ce n'est que pour mieux revenir parmi nous évidemment 😊

Merci également aux colocs de l'équipe CG avec qui nous partageons notre bureau. Je n'aurai jamais cru pouvoir un jour partager mon quotidien auprès de Nathalie Portman (aka Alice de Dijon ou d'Istanbul), Jason Statham (aka Romain le Vegan Boy) et Tom Welling (aka Augusto qui nous permet de remplir notre quota d'immigré). Merci à Coelha de m'avoir soutenue ces derniers mois où les soirées se prolongeaient tard au bureau. Spéciale dédicace à mes deux sudistes préférés, Eve (et ses zézettes) et Matthieu, avé l'acceng chantant et aux ronchonnements quotidiens. Merci à vous tous pour les parties de franches rigolades, de lancer de balle, et pour le soutien moral lors de la rédaction.

Je remercie également les autres doctorants de l'institut pour les bons moments passés ensemble, notamment la team Pèlerin, partenaires des pauses-café et des virées Mont-Dore.

Plus généralement, merci à l'ensemble des membres de l'IRCM. Plus que des collègues, j'y ai trouvé des amis. L'ambiance quotidienne qui règne dans cet institut est très agréable grâce à chacun. Un grand merci en particulier à Marion pour les manip de spectro de masse et pour son fondant au chocolat de la mort qui tue, à Martine et Corinne pour la SPR et à Béatrice et ses petites aiguilles magiques.

Enfin, un immense merci à mes parents qui m'ont toujours soutenue dans tous mes projets, chacun à leur manière. A mon frère Jean, qui quand je quitte enfin mes études décide de reprendre les siennes. Je te souhaite de t'épanouir dans ta scolarité comme j'ai pu le faire, et pas qu'en soirées ! A mes amies Audrey, Nina, Delphine, Lise. Vous êtes mon noyau dur, mes bests. Avec vous la vie à ce goût de folie que j'aime tant ! J'ai eu la lourde tâche d'enterrer deux jeunes filles parmi vous cet été. Car oui, en plus de la rédaction de ce manuscrit, j'ai assuré la fonction de témoin de choc à mi-temps. Je profite de ces remerciements pour vous exprimer à nouveau le bonheur et la fierté que j'ai eu à assurer cette mission à vos côtés pour l'un des plus beaux jours de votre vie.

Je dédie le bilan de ces 9 longues années d'études post-bac à mes grands-parents, eux à qui les épreuves de l'Histoire ont enlevé la possibilité de pouvoir poursuivre les leurs.

Contente de quitter le statut d'étudiante avant mes 30 ans (ENFIIIIIIN !!!!), je termine ce chapitre le sourire aux lèvres et quand même un peu avec soulagement. Hâte d'ouvrir le prochain où tout est à écrire...

Au futur et à toutes ces nouvelles aventures !

À Annie et Hubert,

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	13
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	15
INTRODUCTION	19
I. Ingénierie des anticorps.....	19
A. Généralités sur les anticorps	19
1. Structure des immunoglobulines	20
a. Les chaînes	20
b. Les domaines d'immunoglobulines	21
2. Reconnaissance d'un antigène	22
B. Ingénierie des anticorps	24
1. Les fragments d'anticorps	24
a. Formats monovalents	25
i. Le Fab (antigen-binding fragment)	25
ii. Le scFv (single-chain Fragment variable)	26
iii. Les anticorps simple domaine : VH/VL et fragments variables apparentés (VHH et V-NAR) .	27
b. Formats multivalents	28
2. Les banques d'anticorps recombinants.....	28
a. Les banques naturelles	29
i. Les banques naïves	29
ii. Les banques immunes	29
b. Les banques synthétiques.....	30
c. Les banques semi-synthétiques	32
3. Systèmes de sélection des banques combinatoires	34
a. Le phage display.....	34
b. Autres systèmes de présentation	36
II. Les anticorps intracellulaires.....	38
A. Généralités	38
1. L'immunisation intracellulaire.....	38
2. Vectorisation et expression intracellulaire des anticorps	39
3. Limites à l'utilisation des intracorps.....	40
B. Stratégies d'identification	42
1. Sélection d'intracorps directement en milieu réducteur	43
a. Sélection en système eucaryote	43
b. Sélection en système procaryote.....	47

c.	Criblage phénotypique.....	48
2.	Création de banques optimisées.....	49
C.	Applications des anticorps intracellulaires.....	53
1.	Intracorps modulateurs de fonctions protéiques	53
2.	Détection de protéines endogènes	56
3.	Applications thérapeutiques	57
III.	La MAPK p38α comme cible thérapeutique et analyse de ses principaux inhibiteurs	59
A.	Présentation générale de la famille MAPK p38.....	59
1.	Mécanismes de régulation de la signalisation p38	60
a.	Activation de la voie p38.....	60
i.	Voie d'activation classique	60
ii.	Autophosphorylation indépendamment des MAPK kinases	64
b.	Régulation par les phosphatases	65
c.	Régulation par les protéines d'échafaudage	66
d.	Autres mécanismes de régulation	66
2.	Propriétés structurales.....	67
a.	Boucle d'activation	69
b.	Site de liaison à l'ATP	69
c.	Domaines d'interaction avec les différents partenaires protéiques.....	70
3.	Une diversité de substrats pour une diversité fonctionnelle	71
B.	Implication pathologique de l'isoforme p38 α	72
1.	p38 et inflammation.....	72
2.	p38 et cancer	73
a.	Rôle suppresseur de tumeur.....	73
b.	Rôle oncogénique	75
C.	Principaux inhibiteurs chimiques ciblant la MAPK p38 α	78
1.	Généralités	78
2.	Modes de liaison	78
a.	Inhibiteurs ciblant le site de liaison à l'ATP	79
b.	Inhibiteurs non compétitifs de l'ATP	80
3.	Sélectivité	80
	OBJECTIFS.....	85
	RESULTATS	87
I.	Criblage de la banque HUSC1 pour l'isolement de scFv spécifiques de la p38α	87
A.	Phage Display	87
B.	Criblage de clones scFv spécifiques de p38 α	89

C.	Analyse de la spécificité des clones scFv sélectionnés à partir de productions purifiées.....	92
1.	ELISA.....	93
2.	Immunoprécipitation (IP).....	94
II.	Modulation de l'activité kinase de la p38α par les scFv sélectionnés.....	96
A.	Sélection de scFv modulateur de l'activité kinase de la p38 α <i>in vitro</i>	96
1.	Phosphorylation de p38 par MKK6.....	96
2.	Phosphorylation de substrats par p38.....	97
B.	Détermination du mécanisme d'inhibition du scFv G9.....	100
1.	Test de compétition pour la liaison au site ATP.....	100
2.	Test de compétition par mesure de l'activité enzymatique.....	102
III.	Caractérisation du scFv G9 <i>in vitro</i>.....	105
A.	Mesure des constantes d'affinité du scFv G9 par Résonance Plasmonique de Surface (SPR)	105
B.	Détermination de l'épitope de p38 α reconnu par le scFv G9.....	110
1.	Epitope linéaire ou conformationnel ?.....	110
2.	Couplage chimique et analyse par Spectrométrie de masse (XL-MS).....	111
a.	Réaction de couplage avec le CDI.....	112
b.	Réaction de couplage avec le BuUrBu.....	114
IV.	Etude des scFv en tant qu'intracorps.....	116
A.	Test de relocalisation cellulaire.....	116
B.	FRET (Förster Resonance Energy Transfer).....	122
C.	Mise au point d'un test phénotypique dans l'inflammation.....	125
1.	Mise en place du modèle.....	125
a.	Validation du test phénotypique.....	126
b.	Expression inductible des intracorps.....	126
c.	Absence d'effet de la doxycycline sur la production de TNF- α	131
2.	Test phénotypique d'inhibition de la p38 α endogène.....	131
V.	Résumé des résultats.....	133
	DISCUSSION.....	135
	MATERIELS ET METHODES.....	141
I.	Criblage de la banque HUSCI par Phage Display.....	141
A.	Plasmide et bactéries.....	141
B.	Sélection de scFv contre la p38 α par phage display.....	141
C.	Criblage des scFv.....	142
D.	Purification des plasmides bactériens codant les scFv sélectionnés.....	143

II. Productions et purifications protéiques	145
A. Expression des fragments d'anticorps en système bactérien	145
1. Préparation de bactéries compétentes au RbCl	145
2. Production de scFv en périplasme de HB2151	145
a. Production périplasmique.....	146
b. Lyse par choc osmotique	146
3. Production de scFv en cytoplasme de BL21(DE3)	147
a. Production cytoplasmique	147
b. Lyse des bactéries	147
B. Expression des p38 α et p38 α P en système bactérien.....	148
1. Production de p38 α en BL21(DE3)	148
2. Production de p38 α P en BL21(DE3)	148
C. Purification des productions protéiques par chromatographie d'affinité	149
III. Modulation de l'activité kinase de la p38α par les scFv sélectionnés	150
A. Mesures de l'activité enzymatique	150
1. Analyse par WB	150
a. Réaction de phosphorylation <i>in vitro</i> de la p38 α par MKK6-EE	150
b. Réaction de phosphorylation <i>in vitro</i> du substrat ATF2	150
2. Analyse par le système ADP-Glo™	151
B. Mesure par fluorescence de la liaison au site ATP	151
IV. Caractérisation du scFv G9 <i>in vitro</i>	152
A. Mesures des constantes d'affinité par SPR	152
B. Réactions de couplage.....	152
V. Caractérisation des scFv en tant qu'intracorpis	153
A. Transfection transitoire	153
1. Construction du vecteur receveur pCMV-Recipient-mCherry	153
2. Assemblage des scFv amplifiés avec les amorces BbsI dans le vecteur receveur pCMV-Recipient-mCherry	155
3. Co-Transfection transitoire dans la lignée Hela	156
B. Transfection stable	157
1. Description du vecteur lentiviral autoinductible « all-in-one ».....	157
2. Productions de surnageants contenant les lentivirus	158
3. Transduction de la lignée THP-1.....	159
4. Mesure de la production de TNF- α dans les surnageants de culture cellulaire	159
BIBLIOGRAPHIE.....	161
ANNEXE.....	179

ABREVIATIONS

μg	microgramme	FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
2x YT	2x Yeast Tryptone	Fc	Fragment cristallisable
aa	acide aminé	FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
AAV	Virus Adéno-Associé	FR	framework
Ac	Anticorps	FRET	Förster Resonance Energy Transfer
ADN	Acide désoxyribonucléique	HRP	HorseRadish Peroxidase
ADNc	ADN codant	HuCAL	Human Combinatorial Antibody Libraries
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché	HUSCI	Human scFv intrabody library
Amp	ampicilline	IACT	Intracellular Antibody Capture Technology
ARNm	Acide Ribonucléique messenger	ICS	Intracellular Concensus Sequence
ATF2	Activating Transcription Factor 2	Ig	immunoglobuline
ATP	Adénosine TriPhosphate	IP	immunoprécipitation
BiTE	Bi-specific T-cell engager	IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
BSA	Bovine Serum Albumin	ISG	Interferon Stimulated Genes
CDR	Complementarity-Determining Region	K _A	constante d'association à l'équilibre
CH	Constant Heavy	k _a	constante de vitesse d'association
CL	Constant Light	K _D	constante de dissociation à l'équilibre
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	kd	constante de vitesse de dissociation
DO	Densité Optique	kDa	kilodalton
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	K _m	constante de Michaelis
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein	LB	Luria Broth
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay		
Fab	Fragment antigen-binding		

LPS	Lipopolysaccharide	RE	Réticulum Endoplasmique
MACS	Magnetic Assisted Cell Sorting	rpm	rotation par minute
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase	RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
MKK6	MAPK kinase 6	RT	Température ambiante
NES	Nuclear Export Signal	scFv	single chain Fragment variable
NLS	Nuclear Localisation Signal	SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Nonidep P-40	octyl phenoxyethoxyethanol	sec	seconde
O/N	overnight	SPR	Surface Plasmon Resonance
p38 α P	p38 α phosphorylée	SVF	Sérum de Veau Foetal
PAR	Polyarthrite rhumatoïde	TLR4	Toll-Like Receptor 4
pb	paire de bases	uma	unité de masse atomique
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell	VH	Variable Heavy domain
PBS	Phosphate Buffer Saline	VHH	VH d'une chaîne lourde de camélidé = Nanobody
PCR	Polymerase Chain Reaction	VL	Variable Light domain
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate	WB	Western Blot
PTM	modification post traductionnelle		
QSP	Quantité Suffisante Pour		

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1: Structure d'une immunoglobuline.	22
Figure 2 : Représentation schématique de différents formats d'anticorps naturels et recombinants. 25	
Figure 3 : Processus de sélection d'anticorps.	33
Figure 4 : Principe d'une sélection par phage display.	35
Figure 5 : Les différentes approches d'expression et de vectorisation d'anticorps dans les cellules... 40	
Figure 6 : Représentation schématique des différentes approches utilisées dans la littérature pour l'isolement d'intracorps fonctionnels dans l'environnement réducteur intracellulaire.	42
Figure 7 : Principe de la sélection d'intracorps fonctionnels antigène-dépendent chez la levure.	45
Figure 8 : Implication de chaque résidu dans l'énergie de liaison et nombre de positions mutées par CDR	50
Figure 9 : Fréquence de chaque acide aminé au niveau du paratope	52
Figure 10 : Propriétés et mécanismes d'action des intracorps ciblés au RE ou au cytoplasme/noyau. 55	
Figure 11 : Voie de signalisation générique des MAPK.	61
Figure 12 : La signalisation MAPK p38.....	63
Figure 13 : Modèles structuraux des formes inactive et active (doublement phosphorylée sur Thr180 et Tyr182) de la p38 α	68
Figure 14 : Illustration des différents rôles de p38 α dans la tumorigenèse identifiés à partir de modèles chez la souris.	77
Figure 15: Représentation schématique du site de liaison à l'ATP de la p38 α et des poches hydrophobes adjacentes.	79
Figure 16 : Principe du phage display réalisé pour la sélection de scFv anti-p38 α	88
Figure 17 : Enrichissement à partir de la banque naïve en phages spécifiques anti-p38 α	89
Figure 18 : Criblage des clones scFv en format soluble obtenus après 3 cycles de sélection contre la p38 α	90
Figure 19 : Fréquence des clones scFv anti-p38 α sélectionnés à l'issue du phage display.	91
Figure 20 : Production cytoplasmique des scFv en bactéries BL21(DE3).	92
Figure 21 : Etude par ELISA de la spécificité des 5 scFv anti-p38 α purifiés.....	93
Figure 22 : Etude par immunoprécipitation sur extraits cellulaires de la spécificité des 5 scFv anti-p38 α purifiés.....	94
Figure 23 : Analyse par Western Blot de la phosphorylation de la p38 α par MKK6.	97
Figure 24 : Analyse par Western Blot de la phosphorylation d'ATF2.....	98
Figure 25 : Dose-réponse de l'inhibition de la p38 α réalisée à l'aide du système ADP-Glo TM	99

Figure 26 : Compétition de liaison entre le SKF86002 et les scFv G9 et B2 à la MAPK p38 α	101
Figure 27 : Mesure de l'activité enzymatique de la p38 α en présence de concentrations croissantes d'inhibiteurs.	103
Figure 28 : Etude par ELISA de la spécificité du scFv G9.	105
Figure 29 : Sensorgramme schématisant les différentes étapes de l'interaction entre un ligand et un analyte.....	106
Figure 30 : Sensorgramme des association/dissociation de p38 α ou p38 α P au scFv G9.	107
Figure 31 : Détermination des constantes d'affinité du scFv G9 pour la p38 α et la p38 α P.	108
Figure 32 : Comparaison des cinétiques d'association/dissociation à 200nM de p38 α et p38 α P.....	108
Figure 33 : Masse moléculaire des p38 α et p38 α P recombinantes produites chez E. coli BL21(DE3).	109
Figure 34 : Analyse par Western-Blot de la formation du complexe p38 α /scFv G9/CDI.....	113
Figure 35 : Analyse de la formation du complexe p38 α /scFv G9/BuUrBu.....	114
Figure 36 : Principe du test de relocalisation cellulaire.	117
Figure 37 : Essai de relocalisation cellulaire des scFv issus de la sélection avec les différentes constructions de eGFP-p38 α dans les cellules Hela.	121
Figure 38 : Analyse de l'interaction des scFv-mCherry avec la eGFP-p38 α par microscopie FLIM-FRET.	124
Figure 39 : Evaluation de l'activité inhibitrice du SB202190 sur la production de TNF- α	126
Figure 40 : Principe du test phénotypique.	127
Figure 41 : Analyse de l'expression intracellulaire des scFv-eGFP dans les cellules THP-1.....	128
Figure 42 : Analyse de l'expression des scFv-eGFP dans les cellules THP-1 par Western-Blot.	130
Figure 43 : Mesure de l'effet de la doxycycline sur la production de TNF- α	131
Figure 44 : Evaluation de l'activité inhibitrice des intracorps G9 et B2 sur la production de TNF- α . .	132
Figure 45: Cartes plasmidiques des différents vecteurs phagemide et bactériens utilisés.	144
Figure 46: Schéma des vecteurs d'expression eucaryote avant et après le clonage Golden-Gate des scFv dans le vecteur receveur.	156
Figure 47: Détails du vecteur lentiviral autoinductible « all-in-one » utilisé pour le clonage des scFv-eGFP	158
Tableau 1 : Principaux modes de sélection des banques d'ADNc d'anticorps recombinants.....	37
Tableau 2 : Formule chimique et caractéristiques principales des agents de couplage utilisés.....	112

INTRODUCTION

Les anticorps (Ac), ou immunoglobulines (Ig), sont les acteurs principaux de la réponse immunitaire humorale. Exprimés à la membrane des lymphocytes B ou sécrétés par les plasmocytes, les anticorps ont pour propriété d'être spécifique d'un déterminant antigénique auquel ils se lient dans le but de neutraliser ou d'éliminer un antigène. Le large répertoire d'anticorps présent chez chaque individu permet au système immunitaire de reconnaître et éliminer le non-soi, que ce soit un microorganisme pathogène, une cellule tumorale ou une greffe incompatible.

Plus d'un siècle de recherche sur les anticorps a permis d'en faire de nouveaux agents thérapeutiques polyvalents pour le traitement de très nombreuses maladies dont la liste s'allonge chaque jour comme le cancer, les maladies inflammatoires et auto-immunes, les infections, la douleur, les désordres neurologiques, métaboliques ou sanguins. Cela a notamment été rendu possible par le développement de l'ingénierie des anticorps et les progrès de la biologie moléculaire.

Cependant, l'utilisation des anticorps thérapeutiques est à ce jour restreinte au compartiment extracellulaire. Or, dans de nombreuses pathologies telles que le cancer, la plupart des cibles thérapeutiques se situent dans le milieu intracellulaire. L'expression de fragments d'anticorps de faible taille au sein des cellules constitue alors un outil d'investigation original pour étudier la fonction et la dynamique de protéines cytoplasmiques ou nucléaires, aussi bien en recherche fondamentale qu'à des fins thérapeutiques.

I. Ingénierie des anticorps

A. Généralités sur les anticorps

A la fin des années 50, les travaux de Rodney R. Porter sur la protéolyse ménagée des immunoglobulines à l'aide d'une enzyme, la papaïne, lui permirent d'isoler des fragments avec des propriétés bien spécifiques. Ainsi, il put identifier un fragment conservant les propriétés de liaison de l'anticorps initial à l'antigène, le fragment Fab, et un deuxième fragment dit cristallisable, le fragment Fc, dépourvu de capacité de liaison à l'antigène (Porter, 1958). Quelques années plus tard, Gerald M. Edelman montra que les IgG sont composées de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères appariées entre elles par des ponts disulfures. L'ensemble de ces travaux leur permit de proposer le premier modèle de la structure chimique des anticorps (symbolisée par la forme de lettre Y) et leur valut le prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1972.

Ces travaux ont permis de caractériser le rôle de chaque domaine et la dualité structurale et fonctionnelle des molécules d'immunoglobulines : les 2 fragments Fab portent les domaines variables responsables de la spécificité de reconnaissance d'un antigène tandis que le domaine Fc, constitué de domaines constants, est impliqué dans les fonctions effectrices des molécules d'anticorps.

1. Structure des immunoglobulines

Les anticorps sont des molécules symétriques de 150 à 190 kDa, formées de deux chaînes lourdes identiques (annotées H pour *heavy*) de 50 à 70 kDa chacune et de deux chaînes légères identiques (annotées L pour *light*) de 25 kDa chacune. Des liaisons non covalentes et des ponts disulfures relient les deux chaînes lourdes entre elles et les chaînes lourdes aux chaînes légères.

a. Les chaînes

Les anticorps sont divisés en classes et sous-classes définies selon la nature de leur chaîne lourde. Chez l'Homme, il existe 5 classes de chaînes lourdes, désignées par les lettres α , δ , ϵ , γ et μ définissant respectivement les cinq classes d'immunoglobulines : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM. Ces classes diffèrent entre elles par leur séquence primaire et par leur structure, notamment par le nombre de domaines, le nombre de ponts disulfures inter-chaînes et la position des cystéines impliquées dans leur formation. Des sous-classes (appelées isotypes), déterminées par le sous-type de chaîne lourde, sont distinguées au sein de certaines classes (IgG et IgA). La classe des IgG comprend 4 sous-classes (IgG1 à IgG4) et la classe des IgA 2 sous-classes (IgA1 et IgA2) définissant ainsi un total de 9 isotypes d'immunoglobulines. A chaque isotype d'immunoglobuline sont associés des caractéristiques structurales (nombre de domaines constituant la chaîne lourde, multimérisation) ainsi que des propriétés fonctionnelles (capacité à interagir avec les autres composants du système immunitaire) leur assurant ainsi des rôles biologiques distincts.

On recense deux types de chaînes légères, appelées κ et λ , ainsi que 4 sous-types de chaînes légères λ ($\lambda 1$ à $\lambda 4$), identiques d'un point de vue fonctionnel. Chez l'Homme, environ 60% des anticorps sont formés par des chaînes légères κ , contre 40% de chaînes légères λ . Pour une immunoglobuline donnée, les deux chaînes légères seront nécessairement du même type mais peuvent s'associer à n'importe quel type de chaîne lourde.

b. Les domaines d'immunoglobulines

Chaque chaîne de l'immunoglobuline est organisée en domaines d'environ 110 acides aminés qui forment une structure repliée globulaire. Un domaine Ig est composé de deux feuillets β antiparallèles superposés, stabilisés par des interactions hydrophobes et reliés l'un à l'autre par un pont disulfure intracaténaire formé entre des cystéines très conservées (Williams and Barclay, 1988). Les brins de chaque feuillet β sont reliés par des boucles. Une chaîne légère est constituée de deux domaines, alors qu'une chaîne lourde en possède quatre (IgA, IgD, IgG) ou cinq (IgE et IgM).

Les régions variables sont composées des deux domaines VH (*Variable Heavy*) et VL (*Variable Light*), respectivement situés à l'extrémité amino-terminale des chaînes H et L. La séquence de ces domaines varie fortement d'un anticorps à l'autre, plus particulièrement dans leurs régions hypervariables ou CDR (*Complementarity Determining Region*), situées sur 3 boucles du VH et 3 boucles du VL (Figure 1). Ces résidus constituent l'essentiel du site de liaison de l'anticorps à l'antigène, appelé paratope.

De part et d'autre des CDR se trouvent les régions charpentes ou « *frameworks* » qui présentent une variabilité inférieure à celle retrouvée dans les CDR. Comme leur nom l'indique, ces régions servent de squelette et d'ancrage aux boucles CDR et sont nécessaires à la structure tridimensionnelle et au rapprochement des 6 CDR dans l'espace pour former le paratope. La séquence et l'organisation spatiale des régions variables sont critiques pour la capacité de liaison à l'antigène et plus particulièrement pour la reconnaissance de la zone d'interaction appelée épitope. De plus, cette diversité en séquence et structure des CDR est la source de la diversité du répertoire d'anticorps présent chez chaque individu.

A l'inverse, la partie constante est très peu variable d'un anticorps à l'autre. Elle est constituée des domaines CH1, CH2, CH3 voire CH4 (*Constant Heavy*) sur les chaînes lourdes et du domaine CL (*Constant Light*) sur les chaînes légères. Ces domaines participent à l'architecture de l'immunoglobuline et sont très conservés au sein d'une espèce et au sein d'un même isotype.

Entre les domaines CH1 et CH2 se trouve la région charnière (*hinge*). Elle assure la stabilité du dimère de chaînes lourdes par des ponts disulfures (entre 1 et 5 en fonction de l'isotype de chaîne lourde). La région charnière relie la portion Fc aux deux bras Fab et est extrêmement flexible. Cette propriété permet aux deux bras de l'anticorps d'avoir des mouvements indépendants et d'adapter l'écartement entre les deux sites de reconnaissance en fonction de l'encombrement de l'antigène ou de lier des épitopes distants (Adlersberg, 1976). Bien qu'elle fasse partie du domaine constant, la séquence de la

région charnière est très variable en termes de résidus et de longueur d'un isotype à l'autre (Roux et al., 1997). Les IgM et les IgE ne possèdent pas de région charnière (à la place, elles ont un domaine CH supplémentaire). Elles sont considérées comme étant moins flexibles que les autres classes d'anticorps.

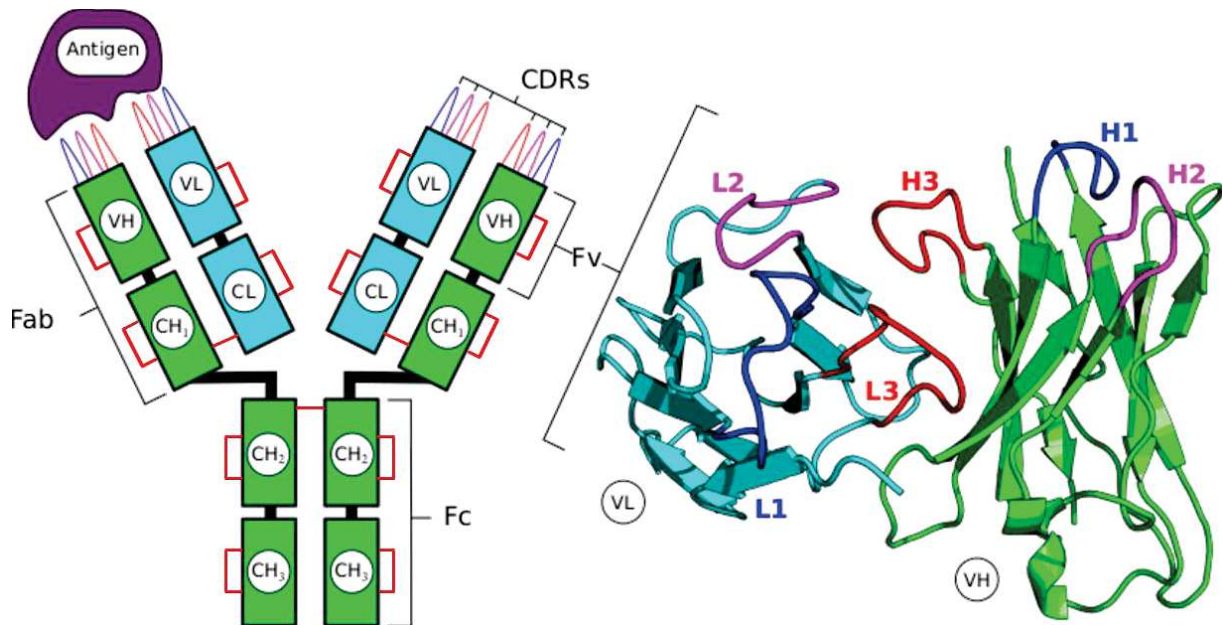


Figure 1: Structure d'une immunoglobuline. Les chaînes légères sont en bleu et les chaînes lourdes en vert. Une chaîne légère est constituée d'un domaine variable VL et d'un domaine constant CL, alors qu'une chaîne lourde est constituée d'un domaine variable VH et de trois (IgA, IgD, IgG) ou quatre (IgE et IgM) domaines constants CH. La structure est stabilisée par des ponts disulfures intra et inter-chaînes en rouge. A droite sont représentées les structures tridimensionnelles des domaines VL et VH. Les CDR situés au niveau des boucles reliant les brins β sont numérotés L1, L2 et L3 pour le VL et H1, H2 et H3 pour le VH.

2. Reconnaissance d'un antigène

Les anticorps se lient et neutralisent les éléments reconnus comme étranger par l'organisme. Leur découverte remonte à 1890 lorsqu'Emil von Behring et Shibasaburo Kitasato identifient dans le sang d'animaux ayant reçu une dose non létale de toxine diphtérique ou tétanique une substance protégeant de l'administration ultérieure d'une dose létale, et que l'état d'immunité qui en résulte peut être transféré par le sérum à des animaux naïfs. C'est alors la naissance de la « serum-therapy » ou sérothérapie (von Behring and Kitasato, 1991; Watier, 2009).

Chaque cellule B exprime à sa surface une Ig de spécificité unique. C'est au cours du développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse qu'est constitué le répertoire primaire des anticorps dont la diversité est due à une série de réarrangements somatiques des gènes codant pour les Ig, appelés recombinaisons V(D)J. Ce processus permet l'assemblage de segments de gènes V (variable), J (jonction) et D (diversité, uniquement pour la chaîne lourde), qui s'associent de façon aléatoire afin de générer un nouvel exon codant pour les parties variables des Ig (Tonegawa, 1988). Les multiples combinaisons entre ces éléments (diversité combinatoire), l'imprécision de leurs jonctions (diversité jonctionnelle) ainsi que l'association combinatoire entre une chaîne lourde et une chaîne légère contribuent considérablement à générer une diversité théorique de plus de 10^{14} immunoglobulines différentes à partir d'un nombre de gènes restreints (Schroeder and Cavacini, 2010). Par la suite, la stimulation antigénique des cellules B matures en périphérie initie la formation de centres germinatifs où auront lieu les hypermutations somatiques (Rada et al., 1998). Ce processus entraîne une augmentation de la diversité du répertoire des anticorps par l'introduction de nombreuses mutations dans les exons réarrangés codant les parties variables des chaînes lourdes et légères des Ig et conduit à la sélection d'anticorps de forte affinité.

La liaison de l'anticorps à l'antigène est réversible. Elle implique plusieurs types d'interactions non covalentes : électrostatiques, hydrophobes, Van der Waals et liaisons hydrogènes. L'affinité d'un anticorps quantifie sa force de liaison à son antigène. Elle est caractérisée par la constante de dissociation K_D . Un K_D faible traduit une affinité élevée.

La valence de l'anticorps est le nombre d'épitopes identiques que peut lier une molécule d'anticorps. Elle fait référence au nombre de sites de liaison à l'antigène (1 par Fab). La valence de tous les anticorps est d'au moins deux et peut être supérieure pour certaines classes d'anticorps (IgA et IgM). Les IgM ont une structure pentamérique et hexamérique qui leur confère 10 voire 12 sites de liaison. Elles peuvent ainsi fixer simultanément plusieurs épitopes identiques spatialement proches. La force totale de la liaison sera supérieure à l'affinité de chaque Fab pour son épitope. On parle alors d'avidité (synergie des affinités de chaque Fab pour son épitope = force avec laquelle un anticorps multivalent se fixe à un antigène plurivalent).

B. Ingénierie des anticorps

La spécificité des anticorps pour leur antigène ainsi que l'étendue du répertoire antigénique potentiellement reconnu en font des outils de choix pour cibler une molécule biologique d'intérêt tant à visée diagnostique que thérapeutique.

L'utilisation des anticorps a connu un véritable essor avec la mise au point en 1975 de la technique de production d'anticorps monoclonaux par des hybridomes par Georges Köhler et César Milstein, ce qui leur valut le prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 1984 (Köhler and Milstein, 1975). En fusionnant des plasmocytes de souris préalablement immunisées avec une cellule de myélome murin, ces deux chercheurs ont obtenu des clones de cellules hybrides (hybridomes) qui conservent la propriété de la cellule cancéreuse à se multiplier indéfiniment et celle du plasmocyte à produire des immunoglobulines. Chaque clone de cellules filles (toutes issues d'un même hybridome) produit le même anticorps de spécificité connue pour l'antigène.

Les anticorps furent par la suite petit à petit « humanisés » en remplaçant les domaines constants puis les régions frameworks des domaines variables murins par leurs homologues humains, pour finalement aboutir à la production d'anticorps « fully human » principalement grâce aux technologies de phage display (1990) et des souris transgéniques (1994).

Bien que ces techniques aient permis le développement d'anticorps de forte affinité pour leur antigène et une diminution de leur immunogénicité chez l'Homme, l'obtention d'une IgG entière reste un processus long et onéreux. La protéolyse ménagée des Ig à la pepsine et à la papaïne et la connaissance des propriétés fonctionnelles des fragments d'anticorps en résultant ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique à travailler avec des formats alternatifs. De plus, les progrès de la biologie moléculaire, notamment grâce à la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) et au séquençage des gènes codant pour les immunoglobulines, ont facilité la manipulation et le sous-clonage des gènes codant les anticorps dans différents vecteurs d'expression (procaryote ou eucaryote). On parle alors d'anticorps recombinants.

1. Les fragments d'anticorps

Lorsque les études se concentrent uniquement sur les effets de la liaison de l'anticorps à sa cible, sans prendre en compte les fonctions effectrices, l'absence du fragment Fc de l'anticorps peut être envisagée. Les fragments d'anticorps ainsi générés conservent les régions variables et la spécificité pour l'antigène de l'anticorps entier dont ils sont issus.

Le premier avantage d'un fragment d'anticorps est sa petite taille, bien inférieure aux 150 kDa de l'anticorps entier. Ils sont donc plus faciles à manipuler d'un point de vue génétique et plus faciles à produire (l'absence du site de glycosylation du Fc permet leur production en système procaryote). Ils sont par conséquent de plus en plus utilisés dans les phases de recherche de nouveaux candidats thérapeutiques et même en clinique. On distingue les fragments monovalents, qui possèdent un seul site de liaison à l'antigène, et les fragments multivalents, dont le nombre de site de liaison ≥ 2 à l'antigène permet d'augmenter l'avidité ou de lier des cibles différentes.

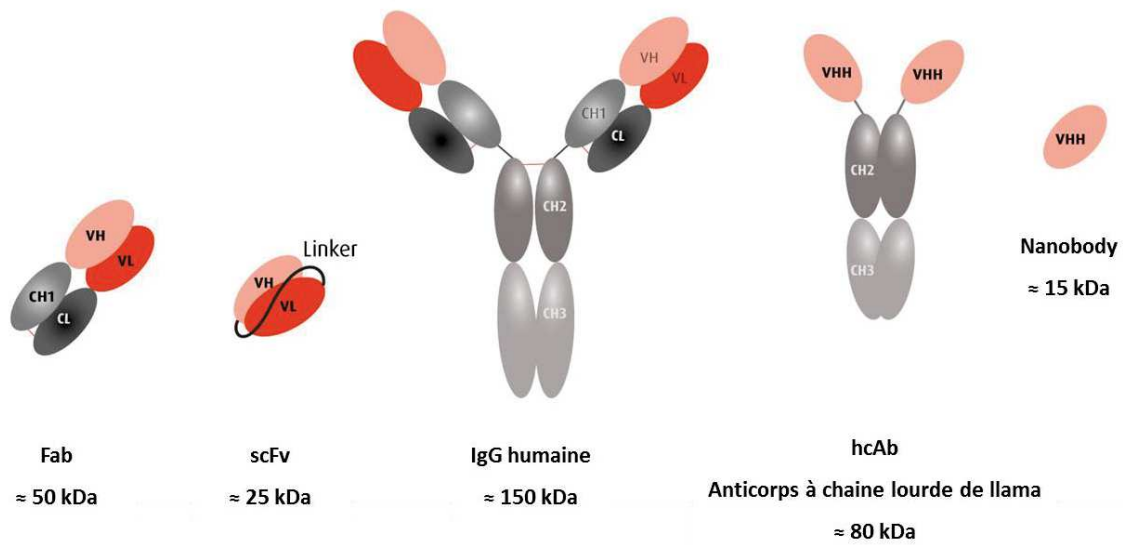


Figure 2 : Représentation schématique de différents formats d'anticorps naturels et recombinants.

a. Formats monovalents

i. ***Le Fab (antigen-binding fragment)***

Le format Fab est constitué de deux chaînes polypeptidiques. Il est formé de la chaîne légère complète appariée avec un fragment de la chaîne lourde qui contient le domaine variable VH et le premier domaine constant CH1. L'interaction entre les deux chaînes est stabilisée par un pont disulfure entre la cystéine terminale du domaine constant CL et une située généralement dans le domaine CH1 ou dans la charnière dans le cas des IgG1 humaines. Les Fab ont une masse approximative de 50 kDa. Ils conservent une spécificité et une affinité de liaison à l'antigène semblables à celles de l'anticorps parental à ceci près qu'ils ne possèdent qu'un site de liaison à l'antigène. Le format Fab peut être produit de façon recombinante mais nécessite la synthèse et l'assemblage des deux chaînes polypeptidiques pour son repliement fonctionnel.

ii. *Le scFv (single-chain Fragment variable)*

Chez L'Homme, le fragment Fv d'un anticorps est la plus petite entité conservant l'ensemble du site de liaison à l'antigène. Il est constitué des domaines variables de la chaîne lourde (VH) et de la chaîne légère (VL) associés entre eux de façon non covalente. Ces deux domaines sont instables pour la plupart des applications biologiques et se dissocient rapidement à faible concentration contrairement aux fragments Fab qui sont stabilisés par les interactions entre les domaines constants. Deux équipes ont proposé de stabiliser l'interaction entre ces deux domaines en exprimant le Fv sous la forme d'une protéine de fusion (Bird et al., 1988; Huston et al., 1988). Pour cela, les exons codant les domaines variables VH et VL sont reliés entre eux par une séquence codant pour un lien peptidique flexible d'une quinzaine d'acides aminés appelé linker. Les deux chaînes sont donc exprimées en concentration équimolaire sous la forme d'un polypeptide unique et la liaison covalente facilite l'association des domaines VH et VL lors de leur repliement. Ces fragments sont alors appelés scFv pour *single chain Fragment variable*.

Outre leur petite taille (25 - 30 kDa), les scFv offrent de nombreux avantages. Ils conservent une spécificité et une affinité de liaison élevée à l'antigène, proche de celle de l'anticorps dont ils sont issus. Ils sont codés par une seule chaîne nucléotidique, ouvrant la voie à des constructions simplifiées de protéines de fusion et à une production simple et rapide en système bactérien. La taille du linker reliant les domaines VH et VL influe sur le phénomène de multimérisation des scFv. Un linker composé d'au moins 12 acides aminés (aa) permet l'appariement des domaines VH et VL pour former un scFv. Lorsque l'on réduit la taille du linker à moins de 12 aa, les domaines variables ne peuvent pas se replier en un domaine Fv fonctionnel et s'associent en tandem à un second scFv pour former des dimères (appelé « diabodies » 55kDa) voire même des trimères (« triabodies » 80kDa) ou tétramères lorsque la taille du linker est inférieure à 3 résidus (Hudson and Kortt, 1999). Le format de scFv le plus couramment utilisé consiste en l'association des gènes sous l'orientation VH-linker-VL, où le linker est un polypeptide de 15 résidus de type (Gly₄Ser)₃.

La principale limite à l'utilisation de ce format est que certains scFv peuvent se retrouver sous forme d'agrégats insolubles dus à leur manque de stabilité. Pour remédier à ce problème, des bibliothèques de scFv ont été construites à partir d'un *framework* connu pour sa stabilité et sa solubilité même en l'absence de formation des ponts disulfures intra domaines (Philibert et al., 2007).

iii. Les anticorps simple domaine : VH/VL et fragments variables apparentés (VHH et V-NAR)

Les domaines variables VH et VL peuvent également être exprimés sous la forme de simple domaine d'anticorps (sdAb pour *single domain antibodies*) (Dubnovitsky et al., 2000; Ward et al., 1989). Ces fragments d'anticorps conservent une activité de liaison à l'antigène et ont un faible poids moléculaire (≈ 14 kDa). Leur petite taille leur permet de cibler des antigènes inaccessibles aux autres formats d'anticorps tels que des « canyons » à la surface de virus ou des sites catalytiques enzymatiques. Cependant leur affinité, leur stabilité ainsi que leur solubilité sont moindres que celles des autres fragments d'anticorps préalablement décrits à cause de l'exposition au solvant de l'interface hydrophobe de l'interaction entre le VH et le VL. C'est pourquoi la plupart des domaines VH isolés ont une tendance prononcée à agréger en solution (Jäger and Plückthun, 1999). Contrairement aux VH, les domaines VL ne montrent généralement qu'une faible tendance à l'agrégation et leur solubilité est moins affectée par les variations de séquence dans les CDR (Hussack et al., 2012).

L'ingénierie de ces fragments a permis d'améliorer leur stabilité et leur solubilité par le design de régions charpentes plus stables, la mutation des résidus hydrophobes de l'interface VH-VL, ou par l'introduction d'un pont disulfure intra-domaine additionnel (Henry et al., 2017).

D'autres fragments d'anticorps simple domaine non humain font l'objet d'un intérêt grandissant depuis leur découverte.

Les camélidés et les poissons cartilagineux produisent naturellement des anticorps dépourvus de chaîne légère dans lesquels le site de liaison à l'antigène est composé d'un seul domaine variable : VHH pour *Variable Heavy of Heavy chain antibodies* chez les camélidés, également nommé nanobody (Hamers-Casterman et al., 1993) et V-NAR pour *Variable-New Antigen Receptor* chez les poissons cartilagineux (Streltsov et al., 2004). Contrairement aux anticorps « classiques » où la surface de liaison à l'antigène est principalement plane ou concave dans les Ig humaines ou murines, les VHH et V-NAR possèdent une boucle CDR3 composée d'un grand nombre d'acides aminés qui peut s'étendre jusqu'à 20 Å au-delà de la zone charpente. Cette spécificité leur permet de pénétrer les cavités de l'antigène cible, comme des sites actifs enzymatiques ou des canyons viraux peu accessibles aux fragments d'anticorps classiques. Les autres avantages conférés par ces fragments de petite taille (15 kDa) sont qu'ils sont plus solubles et plus stables que les domaines VH. Plusieurs équipes ont cherché à transférer ces propriétés à des domaines VH humains par substitution de résidus clés. Ce processus est appelé camélisation (Davies and Riechmann, 1996). Bien qu'étant décrits comme

peu immunogènes, d'autres équipes ont à l'inverse cherché à humaniser les VHH pour étendre leur utilisation à des applications thérapeutiques (Vincke et al., 2009).

b. Formats multivalents

Tous les fragments d'anticorps préalablement décrits ne possèdent qu'un site de liaison à l'antigène. Le passage à des formats multivalents permet d'augmenter l'affinité fonctionnelle (l'avidité) de ces fragments à l'antigène et ainsi de diminuer leur constante de dissociation apparente.

De plus, ces fragments multivalents peuvent également être multispécifiques et ainsi permettre le rapprochement de deux cibles différentes avec des applications importantes dans le recrutement de fonctions effectrices ou de cellules cytotoxiques. C'est le cas des BiTE (*Bispecific T-cell engager*) qui sont des anticorps bispécifiques constitués de deux scFv en tandem permettant le rapprochement des cellules T (via un anti-CD3) aux cellules tumorales. On peut citer pour exemple le Blinatumomab (Blinicyto®) qui se lie au CD19 exprimé par les cellules B et qui a reçu une AMM en 2014 pour le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques à précurseur B.

2. Les banques d'anticorps recombinants

La mise au point d'amorces de PCR « universelles » (Marks et al., 1991; Orlandi et al., 1989), grâce aux bases de données de séquences d'Ig humaines, a permis de simplifier et d'accélérer le clonage des gènes codant pour les régions variables des Ac dans des vecteurs d'expression eucaryotes ou bactériens. Ces amorces reposent sur la conservation de séquences nucléotidiques aux extrémités 5' et 3' des gènes codant les VH et VL entre les différents clones d'anticorps. On peut ainsi amplifier à partir de l'ADNc les gènes variables d'immunoglobulines de différentes sources (lymphocyte B, plasmocyte, hybridome), puis les combiner aléatoirement pour générer des banques d'anticorps de grande diversité. Ces banques sont ensuite utilisées pour isoler rapidement des anticorps monoclonaux envers une cible d'intérêt. L'avantage est de travailler avec le répertoire des gènes variables d'anticorps par le biais de techniques de sélection *in vitro* sans utiliser d'animaux.

De nombreuses banques d'ADNc d'anticorps ont ainsi été créées. Ces banques sont généralement constituées de fragments d'anticorps sans la portion Fc (Fab, scFv et sdAb) car plus faciles à manipuler.

Il existe différents types de banques en fonction de la provenance des gènes variables d'Ig ayant servi à leur construction. Chaque type de banque possède ses particularités, ses avantages et ses inconvénients.

a. Les banques naturelles

Dans les banques naturelles, le système immunitaire du donneur (animal ou humain) est utilisé pour créer la diversité du répertoire. Le principe de construction de ces banques est d'extraire l'ARNm de lymphocytes B prélevés chez un donneur et d'amplifier, après une étape de transcription inverse, l'ADNc correspondant pour les gènes réarrangés VH et VL par PCR. Des combinaisons de gènes VH et VL sont ensuite associées aléatoirement et une seconde PCR permet d'inclure des sites de restriction pour le clonage dans différents vecteurs d'expression.

Le statut immunitaire du donneur définit le type de la banque naturelle construite.

i. Les banques naïves

On parle de banque naïve ou non-immunisée si le donneur n'a pas été exposé à un immunogène. La diversité de la banque obtenue n'est pas orientée vers un antigène particulier et leur grande diversité (environ 10^{10} clones) permet en théorie l'obtention d'anticorps contre tout antigène. Les autres avantages de ce type de banques sont qu'elles ne nécessitent pas d'étape d'immunisation et que l'on peut donc isoler des anticorps difficiles à obtenir par immunisation comme pour un antigène non-immunogène, un antigène du soi (auto-antigène) ou toxique.

L'inconvénient majeur des premières banques naïves était l'obtention d'anticorps de plus faible affinité (K_A d'environ $10^6 - 10^8 \text{ M}^{-1}$) que pour les banques immunes, mais cela n'est plus le cas avec les banques de dernière génération de très grande taille.

ii. Les banques immunes

Elles sont obtenues par amplification des cellules B de donneurs infectés ou naturellement immunisés. Les donneurs ont été mis en contact avec l'immunogène, il y a donc eu prolifération des cellules B aptes à reconnaître l'antigène, différenciation en plasmocyte et maturation d'affinité des anticorps sécrétés par hypermutation somatique. Ces banques sont par conséquent enrichies en anticorps spécifiques et de haute affinité pour l'antigène (K_A de $10^9 - 10^{10} \text{ M}^{-1}$), ce qui s'explique par la maturation des Ac qui a eu lieu au cours de la réponse immunitaire du donneur. La diversité de ces

banques est donc biaisée vers une reconnaissance de l'antigène cible. Les banques immunes peuvent être de taille relativement petite ($10^5 - 10^7$ clones) puisqu'elles possèdent une faible diversité en comparaison des banques naïves. L'antigène utilisé au cours de la sélection doit être identique ou proche de celui ayant servi à l'immunisation, ce qui nécessite la construction d'une nouvelle banque pour chaque nouvel antigène.

Ces banques présentent les inconvénients techniques imposés par l'immunisation d'un animal : le temps nécessaire à l'immunisation d'un animal est long et la réponse immunitaire contre l'antigène d'intérêt n'est pas prédictible ; le mécanisme de tolérance de l'hôte induit la difficulté voire l'impossibilité d'isoler un anticorps contre un antigène du soi ; difficulté d'obtenir des anticorps contre un antigène toxique natif pouvant être létal pour le donneur.

Les banques naturelles naïves ou immunes présentent certains inconvénients. Elles sont constituées par l'association aléatoire des domaines variables des chaînes lourdes et des chaînes légères après une amplification indépendante des gènes codant les VH et VL. L'appariement naturel des chaînes lourdes et légères n'est donc pas conservé, ce qui implique qu'il est presque impossible de cloner les vrais anticorps exprimés par les cellules B du donneur. C'est particulièrement regrettable dans le cas des banques immunes et plutôt favorable pour les banques naïves puisque cela introduit une diversité supplémentaire. De plus, lors du procédé de sélection de ces banques, certains clones s'amplifient mieux que d'autres et prennent ainsi le dessus au détriment des clones pouvant prétendre à des affinités supérieures pour la cible. Un clone peut induire une diminution du pouvoir infectieux du phage qui l'exprime (dans le cas du phage display), présenter un taux de traduction ou de sécrétion relativement faible, être dégradé par les protéases endogènes ou encore induire une toxicité chez l'hôte dans lequel il est produit. Ceci a pour conséquence l'absence de ce clone en fin de sélection malgré sa présence d'un point de vue génique au sein de la banque et diminue ainsi la diversité fonctionnelle de la banque.

b. Les banques synthétiques

Les banques synthétiques ont été développées pour pallier aux limites des banques naturelles préalablement décrites et éviter de faire appel à des donneurs.

Les banques d'anticorps synthétiques sont construites entièrement *in vitro*. Leur taille et leur diversité sont donc maîtrisées et améliorées. Elles sont développées à partir des connaissances des configurations germinales des locus d'Ig, des mécanismes de réarrangement des segments de gènes V(D)J ainsi que des données structurales des anticorps. Puisqu'ils sont synthétiques, les répertoires

géniques peuvent être choisis et optimisés afin de maximiser la fonctionnalité et les propriétés physico-chimiques des anticorps issus de la banque. La diversité de ces banques est introduite synthétiquement et est principalement localisée dans les CDR comme dans les anticorps naturels. Les régions frameworks sont souvent optimisées pour certaines propriétés telles que la solubilité, la stabilité et le niveau d'expression. Les variations de séquences des CDR sont la plupart du temps générées à l'aide d'oligonucléotides synthétiques qui introduisent des zones de dégénérescence complètes ou ciblées dans un ou plusieurs gènes variables. Les gènes VH et VL peuvent également être appariés aléatoirement comme dans les banques naturelles.

Un des exemples les plus abouti est la famille de banques synthétiques HuCAL (*Human Combinatorial Antibody Libraries*) développées par la société MorphoSys. Le design de ces banques est basé sur l'analyse du répertoire des anticorps humains (diversité structurale, des séquences en acides aminés, lignées germinales utilisées). Cette analyse a permis de mettre en évidence que 7 familles de lignées germinales codant pour les VH et 7 pour les VL couvrent plus de 95% de la diversité des anticorps humains. Une séquence consensus « framework » a été dérivée pour chaque famille et optimisée pour l'expression chez *E. coli* générant ainsi 49 combinaisons de gènes clonées dans un phagemide. La diversité de la banque est portée sur les CDR3 des régions VH et VL. Ces régions sont remplacées par des « cassettes » de séquences CDR3 générées à partir de mélanges de trinucleotides de façon biaisée pour refléter la variation de longueur et la composition naturelle des CDR3 humains.

La première version de cette banque au format scFv fut publiée en 2000 (Knappik et al., 2000), puis au format Fab en 2003 (Rauchenberger et al., 2003). Finalement, une version incorporant une diversité supplémentaire dans les CDR1 et CDR2 a été proposée en 2008 (Rothe et al., 2008) et des optimisations de fonctionnalité en évitant par exemple l'introduction de potentiels sites de N-glycosylations qui mènent à des fragments d'anticorps non productifs en 2011 (Prassler et al., 2011).

D'autres banques synthétiques ont été développées pour une expression optimisée des fragments d'anticorps à l'intérieur des cellules. Elles reposent sur l'utilisation d'une seule ou d'un nombre restreint de régions charpentes très stables, capables de se replier en l'absence de formation des ponts disulfures, afin de limiter l'agrégation et l'inactivité de ces fragments une fois exprimés dans l'environnement réducteur du cytoplasme et du noyau des cellules (der Maur et al., 2002; Philibert et al., 2007).

c. Les banques semi-synthétiques

Elles combinent une diversité naturelle et synthétique. Elles sont créées pour augmenter la diversité naturelle tout en maintenant un certain niveau de diversité fonctionnelle : à partir d'un/plusieurs gène(s) d'Ig naturelle(s), une partie est mutée (généralement les CDR) pour générer de la diversité. Cette approche consiste à s'appuyer sur les séquences d'anticorps naturels de donneurs en faisant l'hypothèse que les anticorps naturellement produits sont sélectionnés par les cellules B pour une bonne expression et activité de liaison. Les travaux de Hoet ont permis d'obtenir des anticorps de meilleure affinité en combinant des séquences CDR3 de chaîne lourde de donneurs avec l'introduction d'une diversité synthétique, imitant le modèle des mutations observées dans les Ig après sélection clonale, sur certains résidus des CDR1 et CDR2 impliqués dans la liaison avec l'antigène (Hoet et al., 2005).

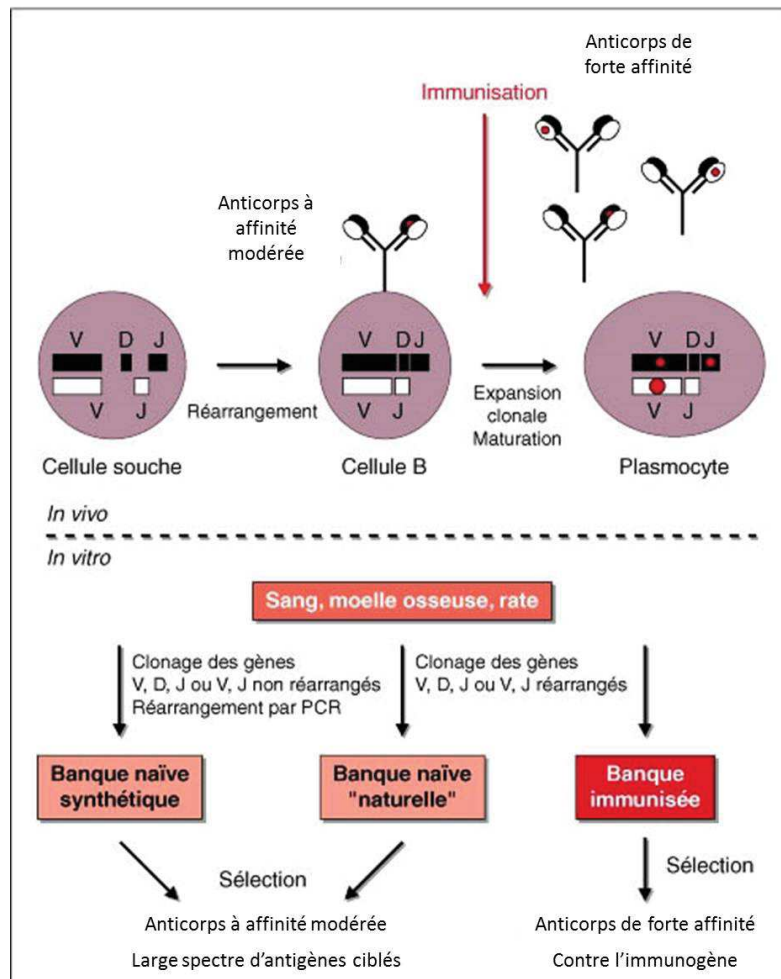


Figure 3 : Processus de sélection d'anticorps. *In vivo*, après réarrangements des gènes V(D)J, les lymphocytes B naïfs présentent en surface des anticorps IgM et IgD. Après immunisation, les clones reconnaissant l'immunogène subissent des mutations somatiques dans leurs régions variables qui induisent une augmentation de l'affinité des anticorps pour la cible. Les clones sélectionnés entrent en expansion clonale et se différencient en plasmocytes capables de sécréter des anticorps (IgA, IgG, IgM ou IgE). Les banques d'anticorps permettent de mimer ce processus *in vitro*. Adapté de (Souriau et al., 1998).

Ces banques de fragments d'anticorps sont exploitées par le biais de techniques de sélection *in vitro* pour isoler rapidement des anticorps monoclonaux à partir de ces répertoires. Elles ouvrent une alternative aux techniques de sélection d'anticorps plus classiques telles que l'hybridation lymphocytaire ou les animaux transgéniques, en écartant ainsi l'usage d'animaux et les contraintes qui y sont associées tout en permettant la découverte d'anticorps totalement humains contre potentiellement n'importe quel antigène.

3. Systèmes de sélection des banques combinatoires

Les banques de fragments d'anticorps peuvent être exprimées à la surface de différentes structures comme les phages, les cellules procaryotes et eucaryotes ou encore les ribosomes. Ces systèmes d'exposition permettent de sélectionner une protéine présentée en surface (sur l'activité de liaison à un antigène dans le cas des anticorps) et de fournir un lien physique avec le génotype codant (ADN correspondant). Il est ainsi aisé de remonter aux séquences des clones capables de se lier à l'antigène. A l'aide de ces techniques de présentation, les fragments d'anticorps les plus affins contenus dans ces banques peuvent être rapidement isolés, même s'ils sont présents en très faible nombre.

La construction d'une banque nécessite d'anticiper son protocole de sélection, c'est-à-dire le système utilisé pour présenter à sa surface les fragments d'anticorps constituant la banque. La sélection de la grande majorité des banques d'anticorps recombinants utilise la technique du phage display, technique également employée dans mes travaux de thèse.

Les autres systèmes majeurs de sélection ne seront décrits que sommairement.

a. Le phage display

Le phage display repose sur l'utilisation de bactériophages filamenteux qui sont des virus de bactéries. La capacité des phages filamenteux à présenter des peptides à leur surface a été décrite pour la première fois par George P. Smith en 1985 (Smith, 1985). Cette technique représente un outil puissant pour l'étude des interactions protéine-ligand *in vitro*. Ce principe a ensuite été adapté à l'exposition de fragments d'anticorps pour sélectionner des anticorps spécifiques d'une cible (McCafferty et al., 1990).

Une sélection par phage display consiste à réaliser un ou plusieurs tours de sélection pour enrichir étape par étape la proportion de phages exprimant un fragment d'anticorps reconnaissant la cible d'intérêt. Cette sélection fondée sur la capacité de liaison à une cible s'appelle le biopanning (sélection par affinité). Elle repose sur des cycles répétés de liaison, de lavage et d'amplification (Figure 4).

Pour cela, les phages exprimant la banque de fragments d'anticorps sont mis en contact avec l'antigène cible purifié. La méthode la plus utilisée consiste à adsorber l'antigène sur une surface plastique (polystyrène) telle que le fond d'un puits d'une plaque 96 puits, mais toute autre approche permettant la récupération spécifique de l'antigène est utilisable comme la streptavidin pour une protéine biotinylée ou l'utilisation d'un anticorps (anti-His, FLAG, c-myc, etc.) si la protéine

recombinante porte un drapeau. D'autres techniques de sélection sur cellules, dans le cas où l'antigène cible est un marqueur de surface cellulaire (Watters et al., 1997), sur des coupes histologiques (Sun et al., 2009) ainsi qu'*in vivo* (Robert et al., 2006) existent.

Les phages qui présentent un anticorps spécifique pour l'antigène sont retenus par leur interaction avec l'antigène cible tandis que les autres phages, ne liant pas l'antigène, sont éliminés par simple lavage. Les phages liés sont ensuite élués et sont amplifiés par infection d'une souche d'*E. coli*. Le pool de phages amplifiés obtenu, enrichi de clones spécifiques de la cible, est ensuite à nouveau sélectionné sur la cible. Plusieurs cycles de sélection sont ainsi effectués et permettent d'enrichir en clones d'intérêt et donc de faire émerger des clones faiblement représentés initialement au sein d'une banque. Cette technique mime ainsi *in vitro* ce qui se passe naturellement lors d'une immunisation : les clones de lymphocytes B aptes à reconnaître l'antigène avec la meilleure affinité sont sélectionnés puis amplifiés par expansion clonale.

Le pool de phages enrichi en clones spécifiques obtenus à la fin du dernier cycle sera ensuite criblé. L'association de la protéine exposée en surface (phénotype) avec son ADN codé par le phage (génotype) permet d'accéder rapidement aux séquences ADN des fragments d'anticorps d'intérêt.

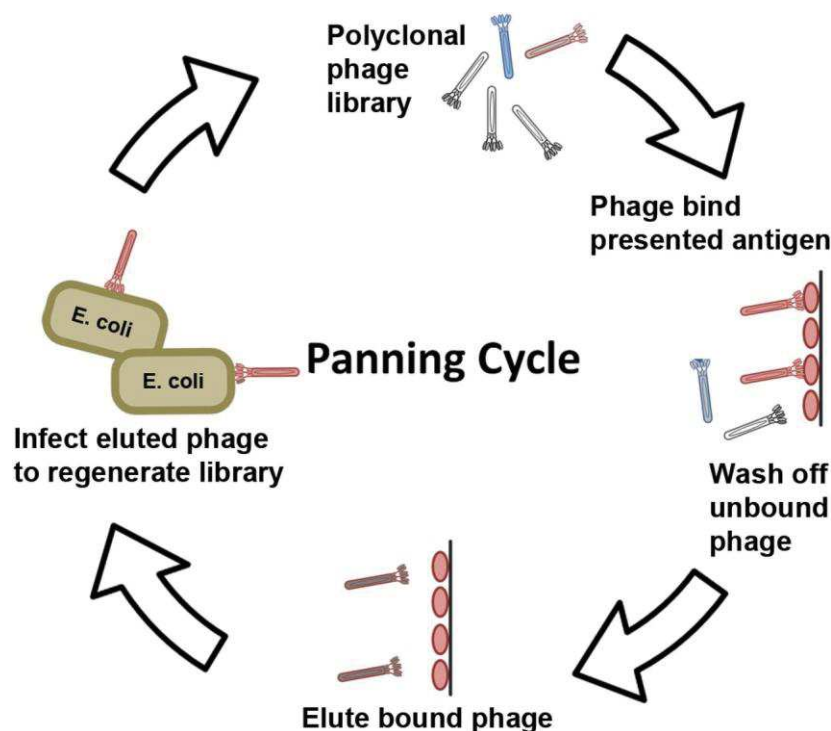


Figure 4: Principe d'une sélection par phage display (Chan et al., 2014).

b. Autres systèmes de présentation

D'autres méthodes de présentation en surface de microorganismes vivants existent. Elles font intervenir des bactéries ou des cellules eucaryotes telles que des levures ou des cellules de mammifères. Ces techniques de présentation en surface cellulaire ont pour avantage de permettre l'utilisation du FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) pour sélectionner rapidement les cellules exprimant à leur surface des fragments d'anticorps spécifiques d'un antigène donné. Les cellules doublement marquées (pour l'anticorps et l'antigène) sont alors triées et quantifiées en fonction de la liaison à l'antigène (affinité) et de l'expression du fragment d'anticorps à la surface de la cellule (stabilité). Elles sont ensuite remises en culture et réutilisées pour un nouveau tour de sélection contre le même antigène. Le tri cellulaire par FACS permet de discriminer les clones qui ont une affinité différente pour la cible, offrant ainsi la possibilité de sélectionner directement les fragments d'anticorps qui ont la meilleure affinité pour l'antigène.

D'autres approches de sélection *in vitro* comme le ribosome display et le mRNA display sont indépendantes d'un microorganisme. Elles exploitent les machineries de transcription et de traduction extraites de lysats bactériens ou eucaryotes pour atteindre des tailles de banques plus importantes que celles obtenues par transformation cellulaire.

Les avantages et inconvénients de chaque système de présentation sont résumés dans le tableau récapitulatif qui suit (Tableau 1).

Tableau 1 : Principaux modes de sélection des banques d'ADNc d'anticorps recombinants

	Phage display	Yeast display	Mammalian display	Ribosome/mRNA display
principe	Anticorps fusionné à une protéine du manteau du phage (pIII)	Anticorps fusionné à une protéine de la paroi cellulaire de la souche <i>S. cerevisiae</i> (sous-unité Aga2p de l' α -agglutinine)	Fusion à une protéine transmembranaire	L'anticorps est lié à son ARNm par l'intermédiaire du ribosome ou de la puromycine dans le mRNA display
Taille de la banque	$10^9 - 10^{10}$	$10^7 - 10^9$	10^6	$10^{12} - 10^{14}$
Formats d'anticorps	scFv, Fab, Fab' ₂ , sdAb, diabody	scFv, Fab, sdAb	Ig, scFv	scFv, sdAb
Valence de présentation	Monovalent multivalent	multivalent	multivalent	monovalent
Stratégie de sélection	<i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> , <i>in vivo</i>	Tri cellulaire par FACS, MACS	FACS, MACS	<i>in vitro</i>
avantages	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicité de mise en œuvre • Robustesse • Automatisable • Stabilité des phages aux pH/températures extrêmes permet des sélections en conditions non physiologiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Discrimination possible des clones sur l'affinité • Modifications post-traductionnelles 	<ul style="list-style-type: none"> • Ig complète • Modifications post-traductionnelles • Sélection d'anticorps à visée thérapeutique 	<ul style="list-style-type: none"> • Totalement <i>in vitro</i>, pas de transformation cellulaire • Banque de grande taille • Introduction de diversité génétique additionnelle entre les cycles de sélection (ADN shuffling et/ou « error-prone » PCR)
inconvénients	Absence de modifications post-traductionnelles	<ul style="list-style-type: none"> • Sélection sur l'avidité du au grand nombre d'anticorps présentés en surface (jusqu'à 10^5) • Taille restreinte de la banque du à l'efficacité de transfection 	<ul style="list-style-type: none"> • Taille restreinte de la banque du à efficacité de transfection • Difficile à mettre en œuvre 	<ul style="list-style-type: none"> • Petit panel d'Ac • Complexe ARNm-ribosome-protéine instable car pas de lien covalent entre la protéine exprimée et son ARNm contrairement au mRNA display

Références	(Griffiths and Duncan, 1998; Souriau et al., 1998)	(Boder and Wittrup, 1997; Boder et al., 2012; Chao et al., 2006)	(Ho et al., 2006; Zhou et al., 2010)	(Lipovsek and Plückthun, 2004)
-------------------	--	--	--------------------------------------	--------------------------------

Légende : FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting
MACS: Magnetic Assisted Cell Sorting

II. Les anticorps intracellulaires

A. Généralités

1. L'immunisation intracellulaire

La possibilité d'utiliser les propriétés de spécificité et de diversité des Ac, pour cibler, neutraliser, ou encore moduler les fonctions des protéines intracellulaires est à l'origine de l'approche d'« immunisation intracellulaire ». L'Ac intracellulaire est alors appelé intracorps.

L'utilisation des Ac à l'intérieur des cellules remonte aux années 80 avec la microinjection dans des cellules isolées d'anticorps (Antman and Livingston, 1980) ou d'ARNm extrait à partir d'hybridome sélectionné (Burke and Warren, 1984). Ces premières expériences ont permis de décrire l'utilisation des Ac comme des outils pour l'étude et le ciblage des protéines intracellulaires. Bien qu'ayant montré son efficacité, la technique de microinjection présente de nombreux inconvénients : la dégradation et la dilution des anticorps exogènes injectés limitent son utilisation à des études courtes dans le temps et à l'étude de réponses biologiques rapides. De plus, avec cette technique, les cellules sont manipulées une à une, ce qui limite également le nombre de cellules analysées.

La première démonstration de l'utilisation d'un anticorps exprimé en intracellulaire pour moduler la fonction d'une protéine endogène a été publiée par Carlson en 1988 (Carlson, 1988). Carlson décrit l'expression des chaînes γ et κ d'un anticorps inhibiteur de l'activité de l'enzyme ALDH1 (alcohol dehydrogenase I) dans le cytoplasme de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Pour démontrer l'activité *in cellulo* de l'anticorps, Carlson mesure la croissance des levures en présence d'alcool allylique qui est métabolisé par l'enzyme ALDH1 en un composé toxique pour la levure. L'expression d'un anticorps actif dans le cytoplasme devrait donc inhiber l'enzyme ALDH1 et permettre la croissance de la levure. Même si l'effet reste limité, Carlson montre une croissance plus importante de la levure en présence d'alcool allylique dans le cas des levures exprimant l'anticorps inhibiteur, démontrant également l'activité intracellulaire de l'anticorps.

Ce travail a rapidement été suivi par les travaux de Biocca et coll. en cellules de mammifère (Biocca et al., 1990). Ces travaux ont permis de montrer qu'il était possible de détourner l'adressage d'un anticorps du compartiment de sécrétion au cytoplasme, et que les chaînes lourdes et légères d'un anticorps peuvent être synthétisées et assemblées de manière fonctionnelle dans le cytoplasme d'une cellule. Toutefois, ne disposant pas d'un système génétique comme chez la levure, la démonstration reste indirecte en mesurant la capacité des anticorps intracellulaires à interagir avec un anticorps anti-

idiotype. Ces travaux ont également montré qu'il était possible d'adresser les anticorps assemblés dans le cytosol dans un compartiment intracellulaire tel que le noyau en fusionnant une séquence d'adressage nucléaire à l'un des gènes codant l'immunoglobuline.

L'expression d'Ac entiers fonctionnels dans les cellules reste une tâche difficile en raison de leur grande taille et de leur structure hétérodimérique. Le développement des fragments d'anticorps recombinants à simple chaîne, de plus petite taille, a facilité leur emploi pour des applications intracellulaires. Ils ne nécessitent pas d'assemblage à partir de deux chaînes protéiques, éliminant ainsi le besoin de vecteurs bicistroniques et les problèmes associés pour obtenir le bon ratio chaîne lourde/chaîne légère lors de l'expression. Le format le plus utilisé est le format scFv, bien que des banques d'intracorps simple domaine de type VH (Tanaka et al., 2003a) et de plus en plus à partir de nanobody voient le jour. Des formats multispécifiques ont également été utilisés avec succès (Jendreyko et al., 2003). Dans ces travaux, le ciblage de deux récepteurs tyrosine kinase par un intradiabody bispécifique a montré une meilleure réponse anti-angiogénique que l'effet de chacun des intracorps scFv monospécifiques.

2. Vectorisation et expression intracellulaire des anticorps

En raison de leur nature physicochimique, les anticorps, comme toutes autres protéines, ne peuvent pas diffuser librement à travers la membrane plasmique. Deux grandes approches ont donc été développées pour leur ciblage intracellulaire : les fragments d'anticorps peuvent être synthétisés par la cellule après transfert du matériel génétique ou la protéine peut être introduite directement par des méthodes de vectorisation.

La première stratégie repose sur le transfert de l'information génétique nécessaire à la synthèse de l'anticorps au sein même de la cellule cible. L'introduction de l'ADN codant peut se faire soit par transfection plasmidique ou par transduction à l'aide de virus (adénovirus, virus adéno-associé (AAV), rétrovirus ou lentivirus).

La deuxième approche consiste à introduire l'anticorps purifié *in vitro* directement dans la cellule. L'administration des fragments d'anticorps complets peut se faire par l'utilisation d'agents de transfection (on parle alors de profection), par fusion avec un peptide internalisant (PTD pour Protein Transduction Domain ou CPP pour Cell Penetrating Peptide) ou dans le contexte de liposomes ou de nanoparticules de polymères. Des récepteurs membranaires à la surface de la cellule cible sont également employés pour induire l'internalisation de complexes sous l'action de la liaison à leur ligand. Des méthodes physiques comme l'électroporation, la micro-injection ou la sonoporation sont

également utilisées (Marschall et al., 2011; Pérez-Martínez et al., 2010). L'utilisation de peptides d'internalisation ou de récepteurs membranaires et la transfection de protéines entraînent l'endocytose des fragments d'anticorps dans des endosomes. La part de ces anticorps libérés des endosomes dans le cytoplasme où ils vont pouvoir interagir avec leur cible et exercer leur fonction est généralement faible et la majorité des anticorps endocytés se retrouvent séquestrés dans les vésicules et inactifs.

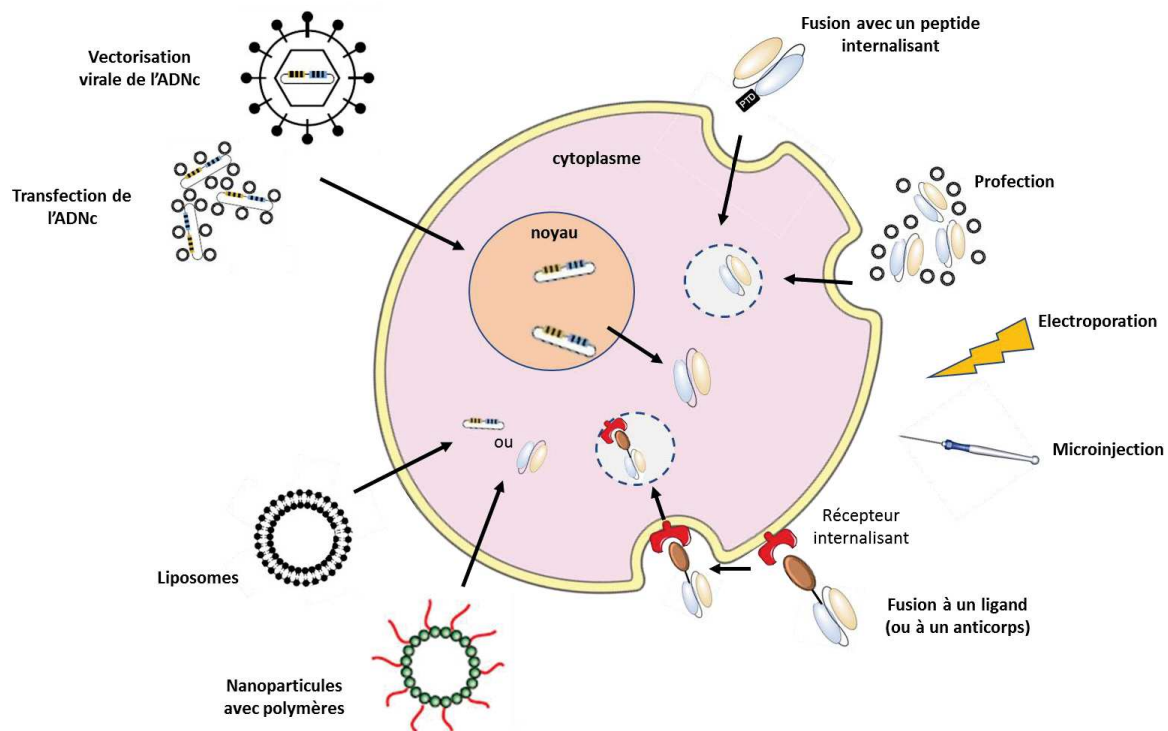


Figure 5 : Les différentes approches d'expression et de vectorisation d'anticorps dans les cellules.

3. Limites à l'utilisation des intracorps

L'utilisation des intracorps se heurte à des problèmes liés à leur instabilité et à leur tendance à l'agrégation lorsqu'ils sont exprimés à l'intérieur de la cellule. Ces problèmes sont dus majoritairement au milieu réducteur du cytoplasme et du noyau qui empêche la formation des ponts disulfures intra-domaines (Biocca et al., 1995). Les anticorps naturels qui sont sécrétés par les plasmocytes ont évolué pour fonctionner dans un environnement extracellulaire. Leurs liaisons disulfures ainsi que leur repliement conformationnel sont assurés grâce à l'environnement oxydant du réticulum endoplasmique et par la présence de protéines chaperonnes telles que la Protein Disulfide Isomerase. Ainsi de nombreux scFv, bien qu'étant fonctionnels *in vitro*, manquent de stabilité en raison de l'absence de ponts disulfures intra-domaines, se retrouvent sous forme d'agrégats insolubles et n'interagissent plus avec leur antigène une fois exprimés dans le cytosol (Visintin et al., 1999).

Cependant des études ont montré que dans ces conditions, et malgré leur agrégation, certains anticorps conservent leurs propriétés d'affinité de liaison et sont capables de séquestrer leur cible antigénique au sein d'agrégates (Cardinale et al., 2001). C'est le cas par exemple du scFv F7 dirigé contre la phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) capable de bloquer l'activation de PLC- γ 1 induite par l'EGF en séquestrant PLC- γ 1 au sein d'agrégats, l'empêchant ainsi d'être recrutée à la membrane (Yi et al., 2001).

D'autres facteurs liés à l'encombrement moléculaire intracellulaire favorisent l'oligomérisation des protéines et leur agrégation (Ellis, 2001). Ces problèmes sont encore exacerbés par le niveau d'expression ectopique des intracorps. La surexpression de protéines recombinantes, comme c'est le cas dans les transfections transitoires, peut aggraver leur instabilité intrinsèque et entraîner la formation rapide d'agrégats insolubles qui peuvent être toxiques pour la cellule et entraîner la mort cellulaire (Sibler et al., 2003). La sensibilité aux protéases intracellulaires peut également influencer de manière significative le niveau d'expression d'un intracorps.

Ainsi de nombreux travaux ont démontré que la capacité d'un anticorps à fonctionner *in cellulo* est corrélée à sa stabilité *in vitro*, à son niveau d'expression et à sa demi-vie. Les mesures d'affinité *in vitro* ne sont pas un caractère suffisant et prédictif pour sa fonctionnalité en tant qu'intracorps (Wörn et al., 2000; Zhu et al., 1999). La composition en acides aminés de leur séquence semble également être déterminante pour cette stabilité intracellulaire. Des études de comparaison des séquences et de l'expression de différents intracorps au format scFv ou VHH ont montré qu'une charge nette négative (acidité élevée) au pH cytoplasmique et une hydrophobicité plus élevée dans une moindre mesure sont associées avec une meilleure solubilité intracellulaire (Kvam et al., 2010). La présence de l'antigène cible affecte également la demi-vie de l'intracorps en stabilisant le complexe (Sibler et al., 2005).

Ainsi différents paramètres physico-chimiques sont à prendre en considération pour améliorer l'obtention d'intracorps fonctionnels. Les propriétés de stabilité, demi-vie *in vivo*, de solubilité, d'agrégation, d'affinité et de spécificité doivent être optimisées.

La littérature recense plusieurs exemples d'identification de scFv fonctionnels dans l'environnement réducteur du cytoplasme obtenus soit à partir d'hybridomes (Cochet et al., 1998; Marasco et al., 1993) soit sélectionnés *in vitro* à partir de banques de phage. Cependant l'efficacité des anticorps obtenus par ces méthodes de sélection une fois exprimés en tant qu'intracorps reste aléatoire puisque seulement 1 à 10% des scFv peuvent être exprimés à un niveau adéquat dans le cytoplasme des cellules de mammifères (Auf der Maur et al., 2004). De nombreuses étapes d'ingénierie et d'optimisation *in vitro* lourdes à mettre en œuvre sont souvent nécessaires avant

d'obtenir un intracorp fonctionnel et un phénotype dans la cellule. C'est pourquoi différentes techniques ont été développées pour accélérer l'obtention d'intracorp.

B. Stratégies d'identification

Il existe deux grandes stratégies pour l'identification d'intracorp. La première repose sur des technologies de sélection d'anticorp fonctionnels directement *in cellulo* dans des conditions d'expression intracellulaire. La seconde utilise des régions charpentes (frameworks) fixes, qui possèdent un repliement fonctionnel et une stabilité dans l'environnement réducteur intracellulaire comme base de développement d'intracorp.

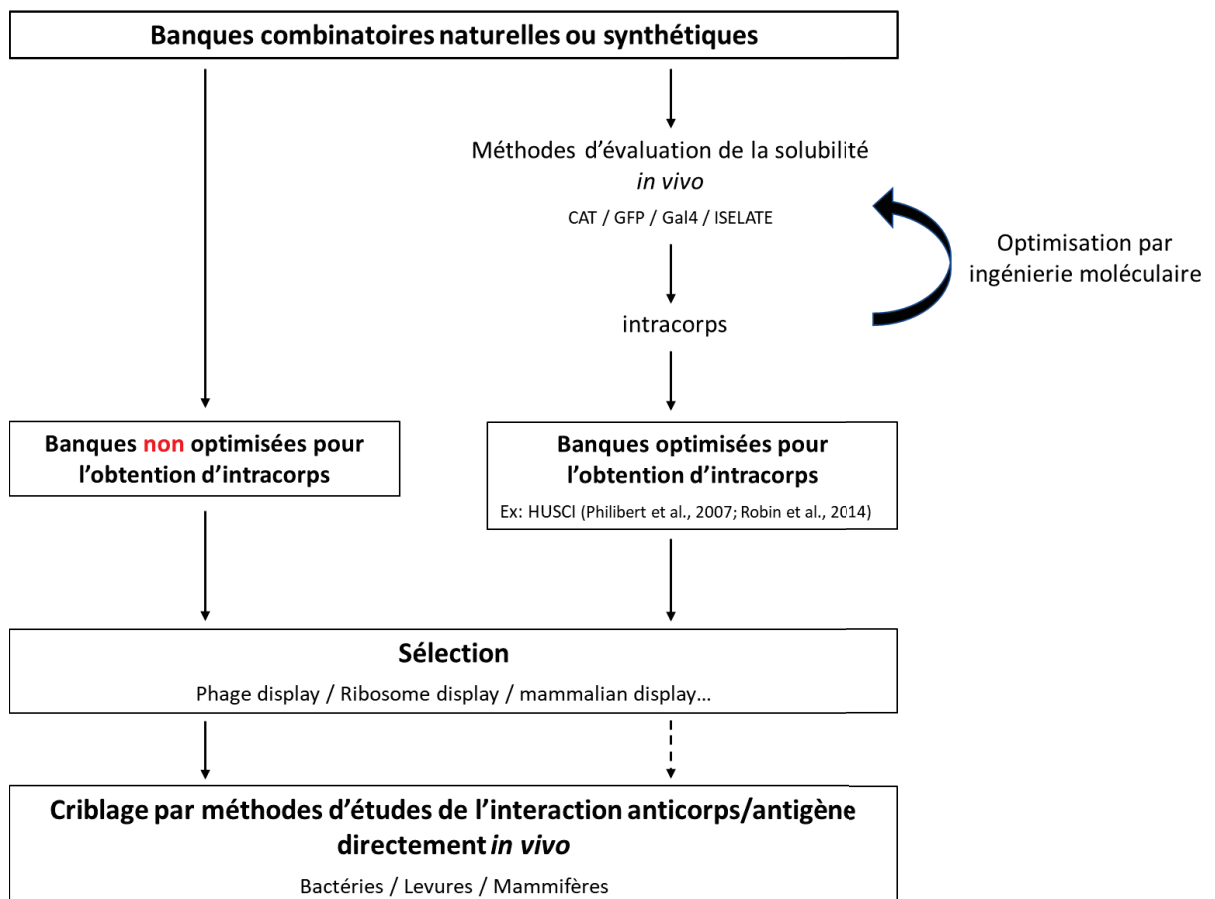


Figure 6 : Représentation schématique des différentes approches utilisées dans la littérature pour l'isolement d'intracorp fonctionnels dans l'environnement réducteur intracellulaire.

1. Sélection d'intracorp directement en milieu réducteur

Pour pallier au caractère aléatoire des anticorps provenant de grands répertoires naturels ou synthétiques à conserver leur fonctionnalité une fois exprimés dans la cellule, différentes méthodes de sélection basées sur l'activité de gènes rapporteurs ou sur la restauration d'une fonction enzymatique ont été développées.

a. Sélection en système eucaryote

L'IACT (Intracellular Antibody Capture Technology) est une méthode de sélection *in vivo* chez la levure pour l'isolement d'anticorps capables de se replier correctement et de se lier à leur antigène dans les conditions d'expression intracellulaire. Cette technique qui permet d'isoler rapidement des anticorps intracellulaires fonctionnels est basée sur la méthode de sélection par double-hybride chez la levure (Fields and Song, 1989). Le gène codant pour l'antigène cible d'une part, fusionné au domaine de liaison à l'ADN de la protéine LexA d'*E. coli*, et les gènes codant les scFv fusionnés au domaine d'activation du facteur de transcription VP16 du virus *Herpes simplex* type 1 d'autre part, sont cotransfectés dans la souche de levure rapportrice *S. cerevisiae* L40. Cette souche de levure porte des gènes rapporteurs *His3* et *LacZ* placés sous le contrôle d'une séquence régulatrice comprenant un site de reconnaissance à l'ADN LexA. L'interaction entre l'anticorps et l'antigène dans le cytoplasme rapproche le domaine d'activation de transcription VP16 du domaine de liaison à l'ADN LexA qui vont alors interagir et activer la transcription des deux gènes rapporteurs via leur domaine de liaison LexA (Figure 7.A). La croissance sur milieu minimum dépourvu d'Histidine et la coloration des colonies de levures en bleu permet le criblage des paires anticorps-antigène actives *in cellulo* (Visintin et al., 1999). Un double signal de localisation nucléaire est situé uniquement sur le produit de fusion scFv-VP16 mais aucun sur l'antigène, forçant ainsi l'interaction à se produire dans le cytoplasme avant que le complexe ne soit transloqué vers le noyau et active la transcription, ce qui augmente la spécificité et diminue le bruit de fond du système.

Cette technique est généralement précédée d'une étape de sélection *in vitro* par phage display en fonction de la source des gènes variables des anticorps utilisés (hybridome, lymphocyte d'un donneur immunisé, banque synthétique...). Cette étape de pré-sélection permet de produire une sous-librairie de scFv enrichie en clones spécifiques de l'antigène cible et de plus petite taille que le répertoire initial pour permettre la transformation en levure.

Cette technique permet donc de sélectionner à la fois des anticorps (i) qui reconnaissent un antigène protéique donné d'intérêt et (ii) entièrement fonctionnels à l'intérieur de la cellule. Elle nécessite cependant une étape d'enrichissement préalable à la sélection en double-hybride chez la levure pour compenser l'efficacité de transformation limitée chez cet organisme (10^7). Cette étape d'enrichissement contre l'antigène d'intérêt nécessite à chaque fois de produire et purifier la protéine, ce qui constitue une étape limitante à l'utilisation de cette technologie pour du criblage à haut-débit. Les mêmes auteurs ont donc construit une banque naturelle naïve de scFv, par amplification des régions variables de lymphocytes de souris non-immunisées, appelée SPLINT (Single Pot Library of Intracellular antibodies) directement exprimée dans le cytoplasme de la levure (Figure 7.A). L'utilisation de cette banque couplée à la technique de sélection IACT permet de sélectionner des intracorps contre un large spectre d'antigènes différents malgré sa taille de 10^7 clones initiaux, facilitant ainsi l'isolation d'intracorps directement depuis les séquences des gènes sans manipulation de protéines (Visintin et al., 2004a). Une version améliorée de l'IACT (IAC3 pour 3^{ème} génération) a été développée afin de compenser la faible diversité de la banque initiale par l'ajout d'étapes de maturation d'affinité *in vitro* par randomisation des CDR des clones positifs obtenus en sortie des tours successifs de sélection en double-hybride (Tanaka and Rabbitts, 2010). Le risque de faux positifs y est aussi largement diminué par l'alternance dans les systèmes rapporteurs de l'interaction utilisés (LexA et Gal4).

Une autre modification de la technique d'IACT originale, le Yeast 3-SPLINT, a été développée pour sélectionner des intracorps interférents, capables de perturber spécifiquement des interactions protéine-protéine (Figure 7.B) (Visintin et al., 2008).

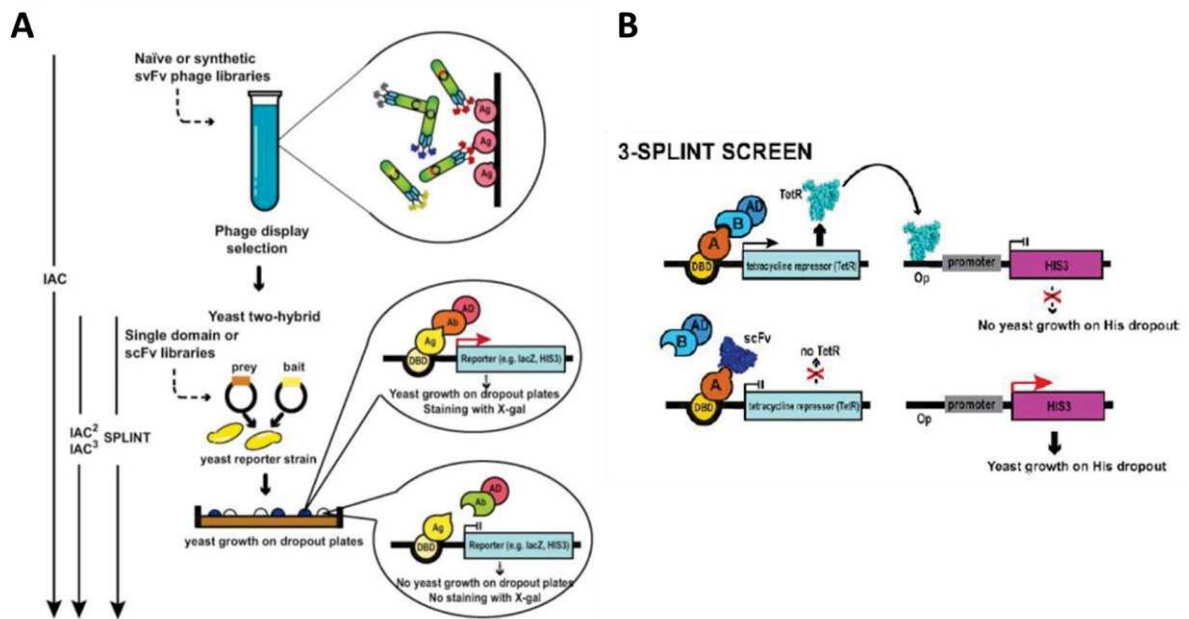


Figure 7 : Principe de la sélection d'intracops fonctionnels antigène-dépendent chez la levure (Pérez-Martínez et al., 2010).

- (A)** La technique d'IACT (Intracellular Antibody Capture Technology) et ses versions améliorées. Dans la première version d'IACT, les banques naïves ou synthétiques de scFv sont présélectionnées *in vitro* par une étape de phage display contre l'antigène d'intérêt. La sous-banque obtenue est ensuite criblée dans la levure par un système de double-hybride. Seuls les scFv qui conservent la capacité de liaison spécifique *in vivo* peuvent activer les gènes rapporteurs *His3* et *LacZ* qui permettent la sélection positive par croissance sur milieu minimum dépourvu d'Histidine et de quantifier le niveau d'activation génique par l'activité β -galactosidase respectivement. Dans les développements ultérieurs de l'IACT (IAC², IAC³ et SPLINT), l'étape préliminaire de phage-display n'est plus réalisée et la sélection se fait directement en levure.
- (B)** Criblage direct de banques en levures pour l'identification d'intracops interférents par la méthode du 3-SPLINT. Les 2 partenaires protéiques sont exprimés dans la levure sous forme de protéine de fusion à un domaine de liaison à l'ADN (DBD)-antigène A ou à un domaine d'activation transcriptionnel (AD)-antigène partenaire B. L'interaction entre A et B active l'expression de la protéine de répression de la tétracycline TetR qui empêche la transcription du gène rapporteur *His3*.

Le nombre croissant d'intracops fonctionnels disponibles, provenant de sources différentes et dirigés contre des antigènes variés, a permis l'établissement d'une base de données appelée VIDA (Validated Intrabody DAtabase) dans laquelle ont été collectées les séquences des intracops validés (Visintin et al., 2004b). La comparaison des séquences a conduit à l'identification d'un grand nombre de résidus conservés entre les différents intracops et a ainsi mené à la définition de séquences consensus pour les intracops (ICS, Intracellular Consensus Sequence) (Visintin et al., 2002). Ainsi,

l'utilisation d'un « framework » dérivé d'une séquence consensus a permis la construction de répertoire optimisé pour l'obtention d'intracorps avec des propriétés de solubilité et d'expression améliorées *in cellulo* (Tanaka et al., 2003b). Cette base de données permet également d'attribuer un caractère prédictif à un anticorps donné sur sa capacité d'être un intracorps fonctionnel par l'attribution d'un score IPS (Intrabody Prediction Score).

Très récemment, une équipe japonaise a mis au point une nouvelle technique de sélection d'intracorps dans le cytoplasme de cellules de mammifère en utilisant un signal de croissance induit par l'interaction de l'antigène cible et d'un scFv. Dans leur méthode, une protéine de fusion appelée capteur de croissance est construite en liant un fragment scFv au domaine cytoplasmique de c-kit, récepteur tyrosine kinase, qui est activé par dimérisation. Afin d'activer c-kit, deux scFv doivent donc interagir à proximité. Cette technique est par conséquent limitée à la nécessité de l'antigène cible à s'oligomériser ou, dans le cas contraire, à exprimer l'antigène cible sous la forme d'un dimère en fusionnant deux antigènes identiques par l'intermédiaire d'un linker ou sous la forme d'une protéine de fusion avec un domaine de type leucine zipper. Leur étude porte sur la sélection d'intracorps anti-rabiques, dirigés contre la protéine RV-N (rabies virus nucleoprotein). Lors de l'interaction spécifique entre un scFv et la protéine RV-N qui s'oligomérisent, le capteur de croissance forme un homo-oligomère, permet l'activation de c-kit et entraîne la transduction d'un signal de croissance (Nguyen et al., 2017). Bien que cette méthode présente comme avantage une sélection d'intracorps directement en cellule de mammifère, elle nécessite une étape préliminaire de phage display pour adapter le nombre de clones criblés à partir des banques combinatoires à l'efficacité de transformation des cellules eucaryotes. De plus, elle ne permet des sélections qu'envers certains antigènes cibles capables de s'oligomériser tels que des protéines virales, des protéines impliquées dans les désordres neurologiques ou des protéines de signalisation dans les cancers. L'optimisation du linker reliant le scFv à c-kit est également nécessaire pour chaque sélection afin d'obtenir le meilleur rapport signal-bruit.

Une autre méthode de sélection d'intracorps stables et solubles, cette fois-ci indépendamment de l'antigène, appelée « Quality control », a été développée chez la levure et en cellules de mammifères (Auf der Maur et al., 2004). Cette technique repose également sur la mesure de l'activité d'un gène rapporteur : *His3* et *LacZ* chez la levure et luciférase en cellule de mammifère. Le gène codant le scFv est fusionné à un domaine d'activation transcriptionnel et à un domaine de liaison au facteur de transcription Gal4. L'expression soluble du scFv permet l'interaction spécifique avec le facteur de transcription Gal4 et la transcription des gènes rapporteurs. L'activité de la protéine

de fusion formée avec le scFv est strictement corrélée à la stabilité et à la solubilité du fragment scFv à l'intérieur de la cellule. Les scFv insolubles entraînent une non fonctionnalité de la protéine de fusion et l'absence d'activation des gènes rapporteurs.

Ce système de sélection d'intracops indépendamment de l'antigène a été appliqué au criblage de banques de scFv afin d'identifier des clones stables et solubles, qui ont ensuite servi de charpente acceptrice pour construire des banques d'intracops après randomisation des boucles CDR.

b. Sélection en système procaryote

L'utilisation d'*E. coli* comme système de sélection d'intracops permet le criblage de grands répertoires de gènes dû à l'efficacité de transformation chez la bactérie et une simplicité de mise en œuvre de la technique. Néanmoins, la limite de ce système est qu'il ne permet pas l'analyse de modifications post-traductionnelles des protéines.

Un système équivalent au « Quality control » eucaryote a été développé chez la bactérie pour l'identification *in vivo* de scFv fonctionnels dans le cytoplasme bactérien. Cette technique appelée ISELATE (Intrabody Selection After Tat Export) se sert du mécanisme de contrôle qualité intrinsèque du repliement des protéines de la voie de sécrétion périplasmique TAT (Twin-Arginine Translocation) d'*E. coli* pour la sélection de scFv solubles et stables, indépendamment de l'antigène (Fisher and DeLisa, 2009). L'ISELATE permet de sélectionner rapidement les clones d'une banque qui possèdent une meilleure efficacité d'exportation périplasmique TAT. Ce transport périplasmique est corrélé aux propriétés de solubilité et de repliement fonctionnel de la protéine dans le cytoplasme bactérien. Le gène du scFv est fusionné en N-terminal au peptide signal du système TAT (ssTorA) pour permettre son export dans le périplasme par la voie TAT, et en C-terminal à la β -lactamase qui apporte la résistance à l'ampicilline une fois dans le périplasme.

Ce système a également été adapté afin de sélectionner des intracops spécifiques d'une cible directement dans l'environnement réducteur du cytoplasme de la bactérie. Dans ce cas, l'intracops est fusionné au peptide signal TAT et l'antigène à la β -lactamase. Seules les paires Ac-Ag correctement repliées et fonctionnelles dans le cytoplasme peuvent être exportées vers le périplasme et conférer la résistance à l'ampicilline. Ce système appelé FLI-TRAP (Functional Ligand-Binding Identification by Tat based Recognition of Associating Proteins) permet de sélectionner des interactions de fortes affinités (de l'ordre du nM) nécessaires pour maintenir le complexe associé pendant le transport périplasmique (Waraho and DeLisa, 2009).

Un autre système de criblage d'interactions anticorps-antigène dans le cytoplasme d'*E. coli* repose sur l'adaptation de la technique de complémentation de fragment protéique. Une protéine rapportrice de l'interaction, la dihydrofolate réductase de souris (mDHFR) est divisée en deux parties (mDHFRI et II) correspondant aux séquences amino et carboxy terminales. Le scFv est fusionné à la mDHFRI et l'Ag à la mDHFRII. L'interaction Ac-Ag permet de rapprocher les deux fragments, de reconstituer la mDHFR et de restaurer l'activité de l'enzyme qui permet la croissance et la sélection des colonies sur milieu minimum en présence de l'antibiotique triméthoprime (Mössner et al., 2001). Bien que cette technique ait démontré son efficacité par le criblage direct d'une banque synthétique de scFv (Koch et al., 2006), la longueur des linkers reliant l'Ac et l'Ag au fragment de la mDHFR a un impact sur l'efficacité du système (solubilité et résistance à la protéolyse) et doit être optimisée pour chaque sélection en fonction de la taille de l'anticorps (scFv, VH, VHH...) et de l'antigène.

D'autres systèmes de criblage utilisés pour visualiser des interactions protéiques autres qu'anticorps/antigène peuvent également être applicables pour la sélection d'intracorps, tel que la complémentation d'une protéine fluorescente comme la GFP (Cabantous et al., 2013).

c. Criblage phénotypique

Une toute autre approche de criblage a été développée au sein de l'équipe pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques *in cellulo*. Cette stratégie appelée IBPheS pour Intrabody-Based Phenotypic Screen est basée sur l'expression intracellulaire d'une banque de fragments d'anticorps scFv optimisés pour l'expression dans les cellules eucaryotes, et sur la sélection d'anticorps associés au phénotype recherché. Comme cette méthode repose sur l'interaction intracorps-cible, elle permet la co-sélection d'une cible avec son intracorps associé. La cible est ensuite identifiée par spectrométrie de masse.

Cette stratégie a été appliquée à un modèle d'allergie et d'inflammation où le phénotype étudié par FACS est la dégranulation de la lignée de basophiles leucémiques de rat RBL-2H3. Les intracorps inhibant la dégranulation sont sélectionnés et amplifiés par plusieurs tours de sélection par FACS. Ce criblage a permis d'identifier un nouvel acteur dans l'activation des mastocytes, C12orf4, avec son intracorps inhibiteur spécifique (Mazuc et al., 2014).

2. Création de banques optimisées

Cette approche consiste à optimiser les paramètres de stabilité, de solubilité et d'expression intracellulaire d'un *scaffold* qui servira ensuite de support à la construction d'une banque d'anticorps.

De nombreux travaux ont été entrepris pour obtenir des *frameworks* plus stables, qui peuvent se replier correctement en l'absence des ponts disulfures intradomains pour une expression cytoplasmique (Jurado et al., 2002; Martineau et al., 1998; Proba et al., 1998; Wörn and Plückthun, 1998). Une fois ce *scaffold* optimisé par ingénierie moléculaire, la diversité est apportée aux niveaux des CDR des domaines variables. Une certaine proportion des anticorps dérivant de cette banque possède les caractéristiques thermodynamiques de la séquence d'origine ayant servi à la construction de la banque et le pourcentage d'obtention d'intracorps fonctionnels est supérieur à celui des banques d'anticorps non optimisés.

La technologie d'IAC préalablement décrite a permis d'identifier des séquences consensus ICS constituées de résidus fréquemment retrouvés dans les VH et les VL d'anticorps intracellulaires fonctionnels. Des anticorps construits sur ces séquences sont solubles, ont un bon niveau d'expression et sont fonctionnels lorsqu'ils sont exprimés en tant qu'intracorps dans des cellules de mammifères (Tanaka and Rabbitts, 2003). L'utilisation de *framework* dérivé de ces séquences comme base pour la construction de banque d'anticorps présente donc un intérêt majeur pour l'obtention de grands répertoires d'anticorps optimisés pour l'expression intracellulaire. Ainsi des banques d'intracorps ont été construites *de novo* à partir de la connaissance de ces séquences consensus sans avoir recours à des clones de gènes d'anticorps préexistants (Tanaka et al., 2003b). La diversité y est ensuite introduite aux niveaux des CDR par PCR de mutagénèse. Ces banques de nouvelle génération peuvent ensuite être directement sélectionnées *in vivo* chez la levure par le même système de double-hybride sans nécessiter l'étape d'enrichissement préalable par phage-display utilisée dans le cas de la première génération d'IAC.

Une autre approche similaire a été suivie dans notre équipe pour la conception d'une banque optimisée pour des applications intracellulaires. Une banque synthétique humaine de scFv a été construite à partir d'une région charpente unique (séquence consensus du scFv 13R4 (Martineau et al., 1998)) améliorée par évolution moléculaire à partir d'un premier scFv identifié par phage display, pour un niveau d'expression et une activité optimale dans le cytoplasme de différents organismes (Lener et al., 2000; Sibler et al., 2003).

La deuxième version de cette banque, nommée HUSCI (Human scFv Intrabody library), a été utilisée pour la réalisation de mes travaux de thèse. Le design de cette banque repose sur des travaux de l'équipe dont une partie a été publiée (Robin et al., 2014). L'analyse de la structure de 227 complexes antigène-anticorps a permis de définir des règles générales quant à la position et à la composition en acide-aminés des résidus intervenant dans l'interface de liaison et l'énergie d'interaction entre l'anticorps et l'antigène. Ainsi il a été montré que très peu de résidus des régions variables sont impliqués quantitativement dans l'énergie de liaison. La grande majorité de ces sites d'interaction sont localisés dans les régions CDR (selon la définition de Kabat) et certaines positions (points chauds) sont fréquemment retrouvées comme critiques dans l'énergie de liaison des complexes (Figure 8).

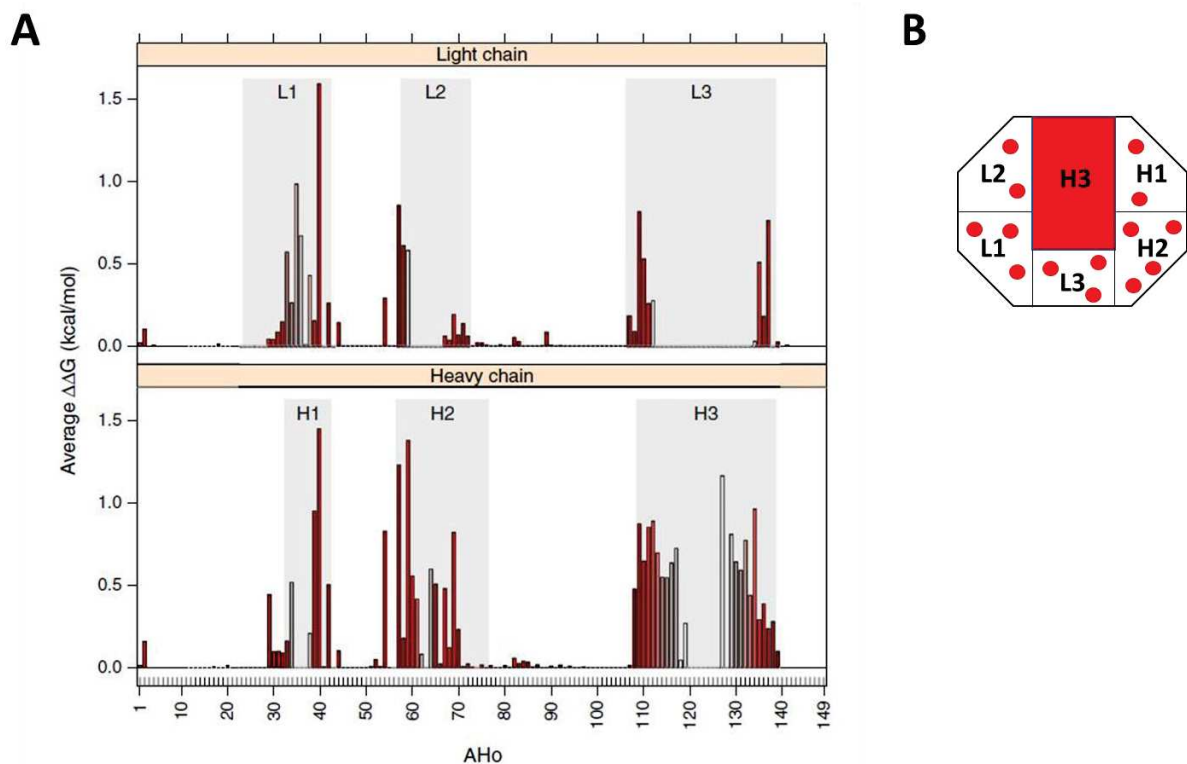


Figure 8 : Implication de chaque résidu dans l'énergie de liaison et nombre de positions mutées par CDR. (Robin et al., 2014)

- (A) Energie libre de liaison moyenne pour chaque position de la chaîne légère et de la chaîne lourde parmi les complexes antigène-anticorps analysés. La fréquence d'occupation de chaque position est représentée par le code couleur, de 0% (blanc) à 100% (rouge foncé).
- (B) Représentation schématique du site de liaison à l'antigène. Les points rouges représentent le nombre de positions mutées dans la banque HUSCI pour les différents CDR. Le nombre étant variable pour le CDR3 du VH, l'intégralité de la case a été colorée.

Pour la construction de la banque HUSCI, seuls les résidus possédant une énergie libre de liaison moyenne supérieure à 0,5 kcal/mol et appartenant aux CDR ont été considérés pour introduire la diversité. Cela correspond à 3 (L1), 2 (L2), 3 (L3), 2 (H1) et 4 (H2) résidus pour chaque CDR. De par sa longueur très variable, le CDR3 de la chaîne lourde a été traité indépendamment. Dans le H3, 8 longueurs de boucle ont été introduites (de longueur 7 à 14 dans la définition de Kabat) puis le même cut-off énergétique que pour les autres CDR a été utilisé pour chaque longueur de boucle H3 identifiant ainsi entre 2 et 7 positions variables. Suivant la longueur de la boucle H3, la banque HUSCI contient donc entre 16 et 21 positions variables. La diversité en acides aminés introduite sur ces positions reflète également la diversité retrouvée au niveau de ces « points chauds ». Il a été observé que les résidus impliqués dans l'énergie de liaison sont fortement biaisés (Figure 9A). Certains acides aminés sont fortement présents dans les paratopes des anticorps (barre rose du graphique), parmi lesquels les aa essentiellement aromatiques (Y, W et F) contribuent à l'énergie de liaison (barre rouge du graphique). Pour restreindre la diversité potentielle de la banque (10^{20} à 10^{27} avec un code à 20 aa) et la rendre compatible avec la diversité réelle (banque sur phages limitée à 10^{10} par l'efficacité de transformation d'*E. coli*) un code réduit à 5 aa a été utilisé pour introduire la diversité sur chaque position. Les cinq résidus les plus fréquemment observés ont été choisis à l'exception du Tryptophane dont l'importante hydrophobicité pourrait conduire à des anticorps de faible solubilité. Les fréquences finales de chaque aa introduites dans la banque sont données dans la Figure 9B. Avec ce code à 5 aa la diversité potentielle de la banque est réduite à environ 10^{14} , ce qui permet d'avoir une bonne représentativité de la banque dans les 10^{10} clones réels tout en évitant les redondances de séquences.

La banque HUSCI a été largement validée par l'équipe et a déjà montré qu'elle permettait d'isoler rapidement par phage display des scFv optimisés pour une bonne expression intracellulaire.

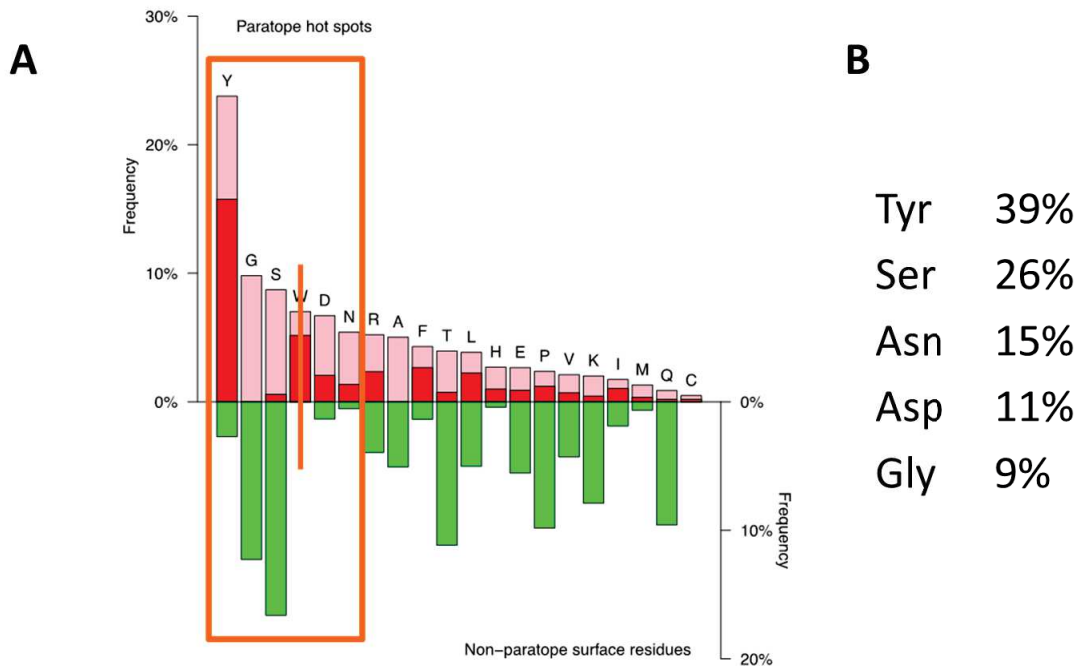


Figure 9 : Fréquence de chaque acide aminé au niveau du paratope. (Robin et al., 2014)

(A) La hauteur de la barre représente la fréquence de chaque acide aminé dans le paratope (rose) et en surface de l'anticorps en dehors du paratope (en vert). En rouge est représentée la fréquence à laquelle le résidu contribue à l'énergie libre de liaison avec l'antigène. Pour la construction de la banque HUSCI seuls les 5 aa les plus fréquemment retrouvés dans le paratope ont été conservés (YGSDN) exception faite du tryptophane, pour introduire la diversité.

(B) Code à cinq acides aminés utilisé pour la diversité de la banque avec leur pourcentage respectif.

C. Applications des anticorps intracellulaires

L'expression intracellulaire de fragments d'anticorps présente de multiples applications tant en recherche fondamentale qu'en recherche appliquée.

La première consiste à exprimer des intracorps de façon à neutraliser ou à moduler l'activité fonctionnelle d'une protéine cible pour en étudier le rôle dans un processus biologique donné ou pour la validation de cibles thérapeutiques (Lobato and Rabbitts, 2003; Marschall et al., 2015). Au-delà de ses effets neutralisant, l'intracorps peut également permettre de visualiser une cible directement dans une cellule vivante. Ainsi, la fusion d'un scFv à un marqueur fluorescent offre la possibilité de tracer des protéines cytoplasmiques ou nucléaires et d'étudier leur rôle de façon dynamique par des analyses d'imagerie en temps réel. L'expression intracellulaire des anticorps permet donc de réaliser des études du protéome dans des conditions physiologiques, et ainsi préserver les composantes biochimiques et dynamiques intracellulaires.

Cette technologie présente certains avantages pour l'étude des fonctions des protéines par rapport aux approches qui ciblent l'ADN ou l'ARN (shRNA, miRNA ou encore CRISPR). Tout d'abord les anticorps possèdent une très grande spécificité pour leur cible évitant ainsi les effets « off-targets » souvent rencontrés avec les techniques visant au *knockdown* de l'expression d'une protéine. Un autre avantage est la possibilité de cibler sélectivement des variants d'épissage, différentes isoformes et des modifications post-traductionnelles (Cassimeris et al., 2013; Koo et al., 2014) et conformationnelles (Meli et al., 2009; Nizak et al., 2003) d'une protéine. Enfin, ils peuvent interférer avec les fonctions de leur antigène exclusivement dans des compartiments cellulaires spécifiques sans affecter leurs fonctions dans le reste de la cellule (Zehner et al., 2015).

1. Intracorps modulateurs de fonctions protéiques

Les intracorps peuvent interférer avec les fonctions biologiques d'un antigène cible de multiples façons. Ils peuvent neutraliser une fonction en bloquant des interactions critiques de type protéine-protéine (Dauvillier et al., 2002) ou protéine-acide nucléique (Cohen et al., 1998) ou en inhibant une activité enzymatique d'une kinase (Paz et al., 2005) bloquant ainsi les voies de transduction du signal sous-jacentes. Ces mécanismes d'inactivation sont dépendants de l'épitope d'interaction.

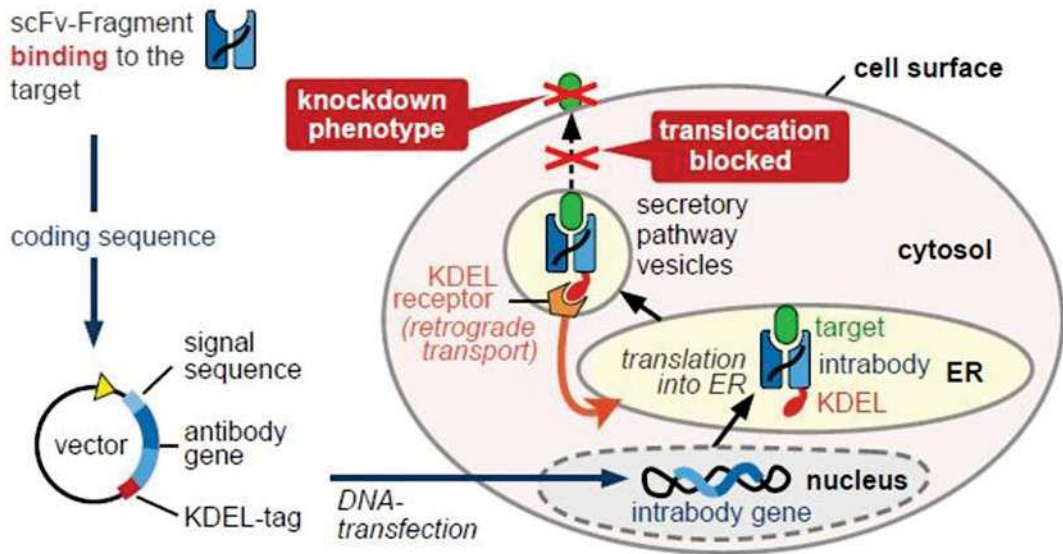
Un autre processus d'inhibition consiste à relocaliser l'antigène cible dans un compartiment cellulaire distinct de celui où il exerce ses fonctions physiologiques. Les fragments d'anticorps peuvent

être adressés à un compartiment cellulaire particulier en fusionnant leur séquence codante à une séquence signal comme par exemple une séquence de localisation nucléaire NLS (Nuclear Localisation Signal) qui permet d'adresser l'anticorps au noyau (Sibler et al., 2003). Ainsi l'anticorps qui interagit avec sa cible est capable de la transférer dans le noyau où elle ne peut plus interférer avec ses substrats ou exercer son activité. Les intracorps peuvent être adressés dans différents compartiments subcellulaires tels que le noyau, le réticulum endoplasmique (RE), le Golgi, les mitochondries, les peroxisomes ainsi qu'au feuillet interne de la membrane plasmique (Persic et al., 1997).

Une des approches de ciblage cellulaire largement utilisée est l'adressage des intracorps au RE. Les intracorps adressés au RE (RE Ac) sont obtenus en les fusionnant en N-terminale à une séquence signal de sécrétion et en C-terminale à un peptide de rétention KDEL. Ce peptide permet à l'intracorps d'interagir avec le récepteur hERD2 et sa rétention dans la lumière du compartiment RE/Golgi empêchant ainsi la sécrétion de l'anticorps avec l'antigène cible qui lui est lié (Böldicke, 2007). Les RE Ac permettent de séquestrer les antigènes qui passent par la voie sécrétrice, tels que les molécules de surface cellulaire, des récepteurs membranaires ou des molécules sécrétées, et empêchent leur expression à la membrane plasmique ou leur sécrétion dans l'environnement extracellulaire. Les RE Ac nécessitent juste de lier leur antigène pour induire un *knockdown* fonctionnel de leur cible alors que les Ac ciblant des antigènes cytoplasmiques ou nucléaires nécessitent en plus d'interagir avec des épitopes clefs pour neutraliser ou inhiber leur fonction (Figure 10). De plus, les RE Ac sont exprimés dans un milieu oxydant permettant la formation des ponts disulfures intra-chaîne des scFv et les problèmes de stabilité associés à l'expression cytoplasmique sont très fortement diminués.

Les RE Ac ont déjà été utilisés à de nombreuses reprises et ont montré leur efficacité pour réduire la surexpression en surface de facteurs impliqués dans les voies oncogéniques tels que les récepteurs HER2 (Graus-Porta et al., 1995), EGFR (Jannot et al., 1996) ou encore de protéines sécrétées comme les métalloprotéinases (Wang et al., 2000) et la Cathepsin L (Rousselet et al., 2004). D'autres applications en virologie pour empêcher l'assemblage de particules virales ou pour bloquer l'entrée de virus en réprimant l'expression membranaire de leur récepteur d'adhésion sont également décrites (pour une revue complète voir (Marschall et al., 2015)).

Intracorps ciblé au Réticulum-Endoplasmique



Intracorps ciblé au cytoplasme ou au noyau

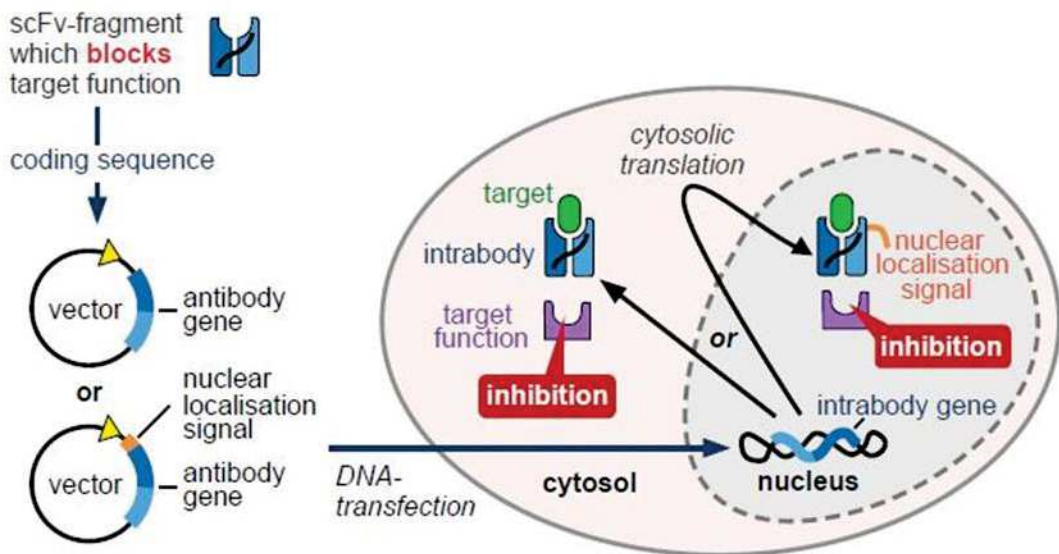


Figure 10 : Propriétés et mécanismes d'action des intracorps ciblés au RE ou au cytoplasme/noyau.

Grâce à leur peptide de rétention KDEL, un intracorps adressé au RE séquestre son antigène cible en se liant à lui, l'empêchant ainsi d'atteindre la surface cellulaire ou d'être sécrété dans le milieu extracellulaire pour exercer sa fonction. Un intracorps adressé au cytoplasme ou au noyau grâce à une séquence d'adressage nucléaire nécessite, en plus de lier leur antigène, d'être neutralisant ou inhibiteur pour inactiver sa cible. De plus, les conditions réductrices du cytoplasme et du noyau nécessitent des étapes d'optimisation et de sélection pour le bon repliement et la stabilité de l'intracorps contrairement au RE où sont produits naturellement les anticorps.

Adapté de (Marschall and Dübel, 2016).

Les intracorps peuvent également être fonctionnalisés à l'aide de différents peptides ou protéines afin de recruter des effecteurs cellulaires impliqués dans les voies apoptotiques (Tse and Rabbitts, 2000) ou dans les voies de dégradation du protéasome (Kuo et al., 2011; Melchionna and Cattaneo, 2007) pour induire spécifiquement la lyse de la cellule exprimant l'antigène cible ou la dégradation de l'antigène une fois reconnu par l'anticorps.

2. Détection de protéines endogènes

Les propriétés de spécificité et d'affinité des anticorps pour leur cible en font des réactifs de choix pour étudier la dynamique endogène de protéine dans les cellules vivantes. Ainsi en les fusionnant à une protéine fluorescente telle que la GFP (Green Fluorescent Protein), il est possible de suivre en temps réel la localisation et la dynamique d'une protéine cible endogène sans perturber son activité biologique. Des travaux menés au sein de l'équipe ont permis de suivre la dynamique de polymérisation des microtubules par un scFv anti α -tubuline, le 2G4-GFP, qui reconnaît spécifiquement la forme tyrosinée de la protéine montrant ainsi que les intracorps peuvent être utilisés comme biosenseur de modification post-traductionnelle d'une protéine (Cassimeris et al., 2013).

Les cellules humaines contiennent plus de 200 modifications post-traductionnelles (PTM) dont le rôle et l'importance clinique sont encore pour la plupart inconnus. Un grand nombre de dérégulations des PTM ont été impliquées dans des mécanismes intimement liés au cancer, comme le cycle cellulaire, la prolifération, la mort cellulaire. Un des aspects importants de ces modifications est qu'elles sont en grande majorité dynamiques, ce qui rend leur étude encore plus difficile. Les outils disponibles pour l'étude des PTM sont peu nombreux et ne donnent qu'une vision statique ou modélisée de leur fonction. Les intracorps s'avèrent donc être des outils innovants permettant de suivre l'évolution des PTM dans les cellules vivantes.

L'équipe d'Etienne Weiss a développé une approche permettant de visualiser, à l'aide d'intracorps, des protéines faiblement exprimées dans la cellule et difficilement détectable par des techniques classiques d'immunomarquage. Ainsi l'expression dans la cellule d'une paire de scFv anti-gankyrin où chaque scFv est fusionné à un fluorochrome différent (eGFP et RFP) a permis de visualiser la protéine endogène par des analyses FLIM-FRET (Förster resonance energy transfer) et d'étudier sa distribution cellulaire (Rinaldi et al., 2013).

3. Applications thérapeutiques

Les intracorps ont démontré leur efficacité pour le ciblage et la neutralisation de protéines ou de cellules impliquées dans le développement de pathologies.

Les premiers travaux rendant compte de la possibilité de synthétiser des scFv fonctionnels dans les cellules, et de les utiliser pour interférer avec des protéines intracellulaires, ont été réalisés par le groupe de Haseltine au début des années 90. L'expression intracellulaire d'un scFv dirigé contre la protéine d'enveloppe gp120 du virus VIH, nécessaire à la pénétration des virions dans les cellules, a permis de séquestrer cette protéine dans le réticulum endoplasmique, diminuant ainsi l'infectivité de nouvelles particules virales (Marasco et al., 1993, 1998).

Dans le cas de cette infection virale, d'autres travaux ont rapporté l'efficacité d'un scFv anti-Tat, dont l'expression bloque le transport nucléaire de la protéine Tat qui est un activateur transcriptionnel, inhibant ainsi la réplication du virus (Mhashilkar et al., 1995, 1999). Un autre scFv a également été utilisé pour inhiber l'activité de l'intégrase responsable de la réplication du virus (Levy-Mintz et al., 1996).

Dans le domaine du cancer, les intracorps ont été exploités pour leur capacité à cibler et inactiver différentes protéines oncogéniques impliquées dans la différenciation, la prolifération, ou l'invasion (Amici et al., 2016; Cochet et al., 1998; Griffin et al., 2006; Tanaka et al., 2007) ou à l'inverse pour restaurer l'activité transcriptionnelle de p53 dans le cas de tumeurs p53^{-/-} (Caron de Fromentel et al., 1999). L'administration au moyen d'un vecteur adénoviral, d'un scFv dirigé contre l'oncogène erbB-2, est en essai clinique dans le cas du cancer de l'ovaire (Alvarez et al., 2000). La possibilité d'utiliser un vecteur lentiviral pour apporter un intracorps dans la tumeur a également été démontrée dans le cas de la Cathepsin L (Frade et al., 2008) par injection directe dans la tumeur résultant en une inhibition de la croissance tumorale et de l'angiogenèse dans un modèle de mélanome.

Dans le cas de pathologies résultant d'une accumulation de protéines au repliement erroné, telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, d'Huntington, ainsi que les maladies à Prion, les intracorps suscitent de nombreux espoirs. En effet, leur capacité à reconnaître de manière spécifique diverses isoformes d'une protéine, peut être exploitée pour neutraliser spécifiquement des conformations pathologiques (Emadi et al., 2004; Heppner et al., 2001; Lecerf et al., 2001; Liu et al., 2004).

Une autre application décrite par notre équipe, consiste en l'utilisation des intracorps pour guider l'identification de molécules candidats médicaments. Le principe est de sélectionner dans un

premier temps des scFv dont l'expression intracellulaire induit un phénotype d'intérêt thérapeutique. Dans un deuxième temps, les scFv sélectionnés sont utilisés pour isoler des mimes moléculaires par le criblage de chimiothèques au moyen d'un test ELISA de déplacement d'Ac (brevet européen EP1743178B1). Dans un modèle d'allergie, un scFv dirigé contre les domaines SH2 de la protéine kinase Syk a été utilisé pour réaliser le criblage d'une banque de 3000 composés chimiques à l'aide du test de déplacement d'Ac. Une molécule présentant un fort potentiel anti-allergique dans les cellules mais également chez la souris a ainsi été identifiée (Mazuc et al., 2008).

III. La MAPK p38 α comme cible thérapeutique et analyse de ses principaux inhibiteurs

Les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) sont des composants de la signalisation essentiels dans l'adaptation cellulaire en réponse aux signaux extracellulaires. Ces voies de signalisation sont parmi les plus conservées au cours de l'évolution. Chez les mammifères, 3 sous-familles ont principalement été décrites, fonctionnant en parallèle, chacune ayant une certaine sélectivité par rapport aux stimuli activateurs et à leurs fonctions effectrices. La voie ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) est activée en réponse aux stimuli mitogènes et prolifératifs tels que des facteurs de croissance et est associée à la prolifération et à la différenciation cellulaire. Les voies JNK (c-Jun amino-terminal Kinase) et p38 sont toutes deux activées en réponse à des stress environnementaux (tels que des rayonnements ultraviolets, choc osmotique, stress oxydatif) ou à des cytokines, ce qui a conduit à les qualifier de SAPK pour *Stress-Activated Protein Kinase*. L'activation de ces SAPK conduit à des réponses variables en fonction du type cellulaire et du signal de stress environnemental. Parmi elles, les p38 sont principalement impliquées dans la réponse immunitaire et l'inflammation en réponse à des cytokines pro-inflammatoires (Raman et al., 2007).

A. Présentation générale de la famille MAPK p38

La voie de signalisation des MAPK p38 est composée de 4 isoformes (α , β , γ et δ) qui partagent près de 60% d'homologie de séquence et une identité supérieure à 90% au sein de leur domaine kinase. Ces isoformes sont codées par des gènes différents. Les isoformes α et β sont les plus proches (75%) puis les isoformes γ et δ entre elles (\approx 70%). P38 α a été la première isoforme identifiée comme une protéine de 38 kDa étant la cible des inhibiteurs de la biosynthèse des cytokines en réponse à une stimulation au LPS (lipopolysaccharide) (Lee et al., 1994).

Malgré leur forte homologie de séquence, ces isoformes diffèrent sur plusieurs points. Tout d'abord dans leur profil d'expression tissulaire : les isoformes α et β sont ubiquitaires et l'isoforme α possède un fort niveau d'expression dans la plupart des types cellulaires, alors que les isoformes γ et δ ont un profil d'expression plus restreint et sont spécifiques de certains tissus. Par exemple l'isoforme p38 γ est principalement exprimée dans les muscles squelettiques et le cœur et la p38 δ dans les poumons et les glandes endocrines (Kumar et al., 1997; Li et al., 1996). Les différentes isoformes possèdent de nombreux substrats en commun ainsi que des chevauchements dans leurs fonctions

effectrices rendant ainsi l'attribution des fonctions spécifiques à chaque isoforme mal définies dans certains processus biologiques et pathologiques. Cependant certains substrats sont mieux phosphorylés par les isoformes α et β que par les isoformes γ et δ et inversement. Les différentes isoformes possèdent également des spécificités vis-à-vis de leurs activateurs en amont ainsi que pour leur sensibilité aux inhibiteurs chimiques ciblant la voie p38. Les isoformes α et β sont, par exemple, les seules à être inhibées par les inhibiteurs de type pyridinyl imidazole (Cuenda and Rousseau, 2007).

1. Mécanismes de régulation de la signalisation p38

a. Activation de la voie p38

i. Voie d'activation classique

La voie de signalisation des MAPK est caractérisée par une cascade de phosphorylation faisant intervenir trois niveaux de kinases qui agissent séquentiellement : une MAPK kinase kinase (MAP3K), une MAPK kinase (MAP2K) et enfin une MAPK telle que p38, chaque voie MAPK possédant des activateurs et des substrats spécifiques (Figure 11). Les MAPK sont activées par la double phosphorylation des résidus Thréonine et Tyrosine du motif Thr-X-Tyr situé sur leur boucle d'activation (où X = Glu pour la voie ERK, X = Pro pour la voie JNK et X = Gly pour la voie p38) et sont inactivées par des phosphatases qui agissent sur le même motif. La phosphorylation de ces résidus Thr et Tyr induit des changements conformationnels qui permettent la liaison aux substrats et l'activité catalytique de la protéine.

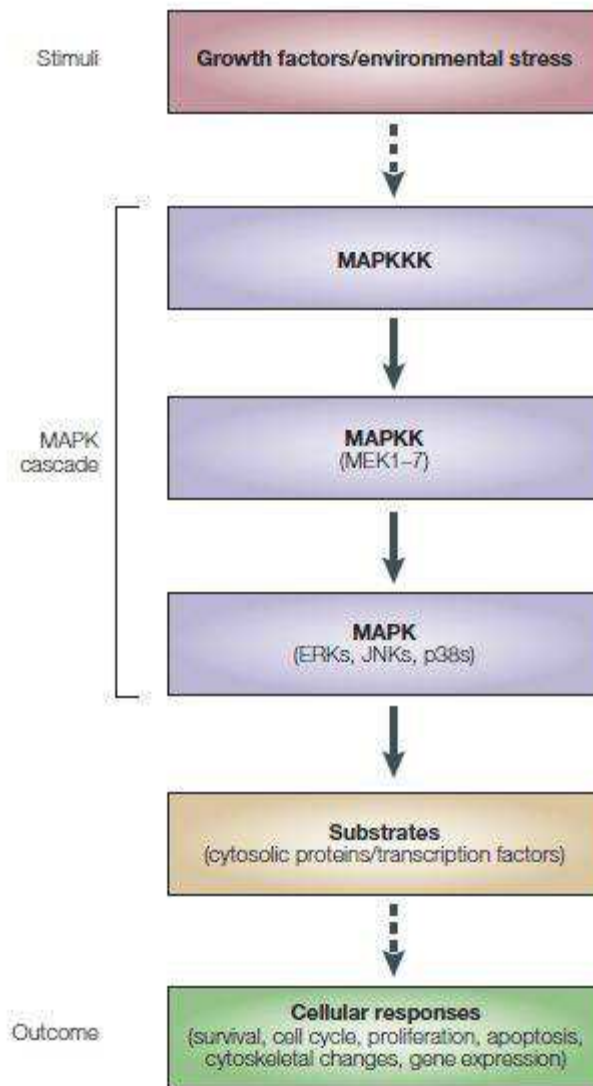


Figure 11 : Voie de signalisation générique des MAPK. La cascade MAPK est composée d’une série de trois protéines kinases : une MAPK parmi les voies ERK, JNK et p38 et de deux composants en amont, la MAPK kinase (MAP2K ou MEK) et la MAPKK kinase (MAP3K). (Kumar et al., 2003)

Les MAPK p38 peuvent être phosphorylées en réponse à de nombreux signaux extracellulaires. Parmi eux figurent des facteurs de stress cellulaire tels que le stress oxydatif, les rayonnements UV, un choc osmotique, un agent cytotoxique endommageant l’ADN, un antibiotique inhibant la synthèse protéique et des cytokines pro-inflammatoires comme l’IL-1 β et le TNF- α (Raingeaud et al., 1995). Ces signaux vont entraîner l’activation des p38 par une voie classique faisant intervenir une MAP3K et une MAP2K (Figure 12).

Les résidus Thréonine et Tyrosine de leur motif Thr180-Gly-Tyr182 situés dans leur boucle d’activation peuvent être phosphorylés par trois MAP2K qui sont MKK6, MKK3 et MKK4. La principale MAP2K activatrice de la voie p38 est MKK6 qui peut phosphoryler les 4 isoformes de p38. MKK3 active

les isoformes α , γ et δ . Ces deux MAP2K sont spécifiques de la voie p38 (Enslin et al., 1998). L'isoforme p38 α peut également être phosphorylée par une troisième MAP2K, MKK4, qui est un activateur de la voie JNK (Raingeaud et al., 1996). La contribution relative de chaque MAP2K à l'activation des différentes isoformes de p38 dépend du stimulus et du type cellulaire en raison des variations du niveau d'expression des MAP2K entre les différents types cellulaires (Alonso et al., 2000; Branco et al., 2003). Les MAP2K sont elles-mêmes activées par phosphorylation sur deux aa conservés Ser et Thr de leur boucle d'activation par les MAP3K. Plusieurs MAP3K sont impliquées dans le déclenchement de l'activation de la voie p38 et certaines d'entre elles peuvent également activer la voie JNK. En amont de cette cascade, la régulation des MAP3K est plus complexe. De façon générale, une fois les signaux déclenchés suite à l'activation de récepteurs ou l'induction de conditions de stress, ils sont transmis soit par l'activation de petites GTPases de la famille Rho telles que Rac1 et Cdc42, soit par l'intermédiaire de protéines adaptatrices telles que les protéines G hétérotrimériques couplées aux récepteurs (Cuenda and Rousseau, 2007). Dans les deux cas il y a activation des MAP3K de la voie p38. La diversité des MAP3K ainsi que de leur mécanisme de régulation permettent de répondre à de nombreux stimuli différents et d'intégrer l'activation de la voie MAPK p38 à d'autres voies de signalisation.

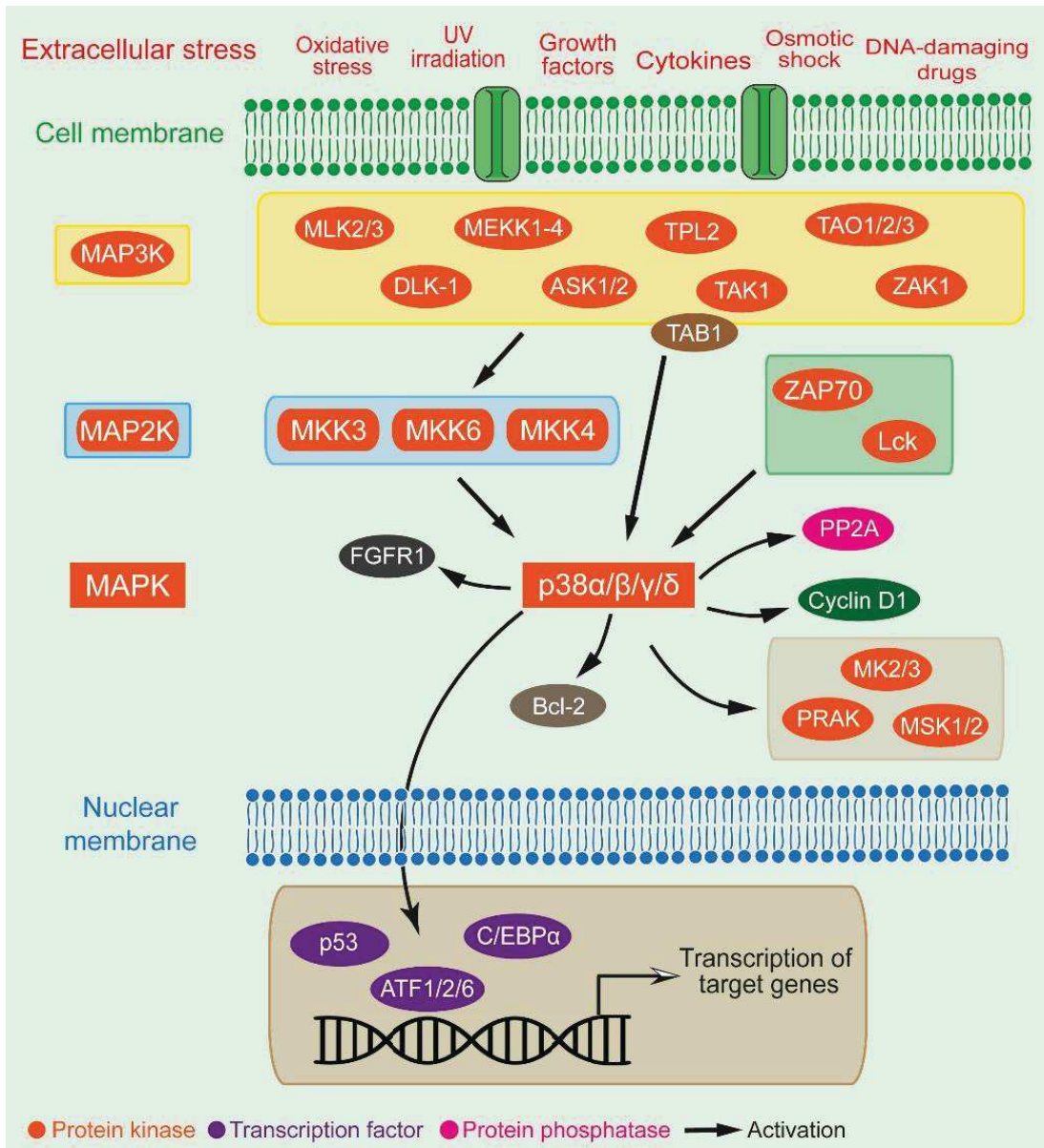


Figure 12 : La signalisation MAPK p38. Les différents mécanismes d'activation sont illustrés. La voie d'activation classique implique des événements de phosphorylation et d'activation séquentiels qui passent d'une MAP3K à une MAP2K puis d'une MAP2K à la MAPK p38. La MAPK p38α peut également être activée par autophosphorylation, déclenchée par une interaction avec TAB1 ou par la phosphorylation médiée par Lck et ZAP70. Les principales cibles de p38 incluent des facteurs de transcription, des protéines kinases et des phosphatases, des récepteurs des facteurs de croissance ainsi que les principaux régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose (*Zou and Blank, 2017*).

ii. Autophosphorylation indépendamment des MAPK kinases

D'autres mécanismes d'activation de la voie p38 indépendants des MAP2K ont été décrits notamment pour l'isoforme α .

Un premier, spécifique aux cellules T, est lié à l'activation des p38 par le biais des récepteurs TCR (T Cell Receptor). La stimulation des cellules T par leur récepteur à l'antigène TCR conduit à l'activation successive des protéines tyrosine kinases proximales Lck et ZAP70. Cette dernière va phosphoryler les isoformes p38 α et β sur leur résidu Tyr323 situé en dehors de la boucle d'activation. Cette phosphorylation conduit à l'autophosphorylation de la boucle d'activation et à l'activation de la p38 (Salvador et al., 2005a). Cette voie médiée par l'activation des TCR est nécessaire pour la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules T et est inhibée par GADD45 α (growth-arrest and DNA-damage-inducible protein), une petite protéine liant la p38 (Salvador et al., 2005b). Bien que les travaux initiaux aient décrit une autophosphorylation des résidus Thr180 et Tyr182 de la boucle d'activation, une étude plus récente a montré que la phosphorylation de la Tyr323 par ZAP70 conduisait principalement à la monophosphorylation de la Thr180. Cette monophosphorylation n'entraîne pas l'inactivation de l'activité kinase mais une modification de la spécificité de la p38 α pour ses substrats par rapport à la forme doublement phosphorylée (Thr180 et Tyr182) (Mittelstadt et al., 2009).

Un deuxième mécanisme d'activation spécifique à la p38 α et indépendant des MAP2K est médié par TAB1 (TAK1-binding protein 1). Cette protéine adaptatrice se lie spécifiquement à l'isoforme p38 α pour induire son autophosphorylation dans sa boucle d'activation (Ge et al., 2002). Ce mécanisme d'activation a été décrit dans les cardiopathies ischémiques et dans certains processus immunologiques tel que la production d'IL-12 par les macrophages (Kim et al., 2005; Tanno et al., 2003). TAB1 peut également réguler l'activation des p38 par la voie classique en activant la MAP3K TAK1 (Sakurai et al., 2000).

Ces voies d'activation alternatives peuvent permettre un ciblage spécifique de certaines réponses cellulaires dépendantes de p38.

b. Régulation par les phosphatases

Les MAPK, MAP2K et MAP3K sont toutes activées par phosphorylation. La durée du signal de phosphorylation est cruciale dans la régulation du devenir cellulaire : une phosphorylation prolongée est fréquemment associée avec une induction de l'apoptose, alors qu'une phosphorylation transitoire peut être associée à la survie induite par un facteur de croissance.

La déphosphorylation des résidus Thr et Tyr de la boucle d'activation des MAPK p38 entraîne une diminution notable de leur activité. Elle peut être régulée par 3 types de phosphatases classées en fonction de leur sensibilité à déphosphoryler les résidus Thr, Ser/Thr ou Thr/Tyr.

Les MAP Kinase Phosphatases (MKP) sont des « Dual Specificity Phosphatase » ou DUSP qui déphosphorylent les MAPK sur les résidus phospho-thréonine et phospho-tyrosine du motif Thr-X-Tyr. Ces enzymes partagent une structure commune distincte de leur site catalytique qui constitue un site d'ancrage à la MAPK (appelé site de Docking ou domaine D). La liaison de la MAPK au site de docking des MKP augmente l'activité phosphatase. Plusieurs de ces membres, tels que MKP-1, MKP-4, MKP-5 et MKP-7 peuvent efficacement déphosphoryler p38 α et p38 β en plus de la voie JNK. Les isoformes p38 γ et p38 δ sont résistantes à tous les membres de la famille des MKP. La régulation transcriptionnelle de l'expression des MKP, en réponse aux stimuli activateurs de la signalisation MAPK, permet un rétrocontrôle négatif et ainsi de limiter l'activation de la MAPK (Owens and Keyse, 2007). Il a été montré que l'induction de MKP-1 suite à une stimulation prolongée de la voie p38 par des cytokines (comme c'est le cas lors d'une infection) permet une activation oscillatoire de p38. Cette oscillation est importante pour l'induction efficace des gènes des cytokines pro-inflammatoires tout en prévenant des dommages cellulaires et de l'apoptose pouvant être provoqués par une activation continue et excessive de la voie p38 (Tomida et al., 2015).

D'autres types de phosphatases, comme les protéines tyrosine phosphatases telles que STEP (striatal enriched tyrosine phosphatase), HePTP (haemopoietic tyrosine phosphatase) et les sérine/thréonine protéines phosphatases type 2A et 2C (PP2A, PP2C) mènent à la formation de formes monophosphorylées des MAPK.

La phosphorylation du résidu Thréonine de la boucle d'activation est essentielle pour l'activité kinase des p38 comme montré avec un mutant Thr180Ala de la p38 α devenant alors inactive. Une mutation de la Tyr182 sur la p38 α a quant à elle démontré que la kinase restait active, bien qu'à un niveau 10 à 20 fois inférieur à celui de la forme doublement phosphorylée. Cette Tyrosine est impliquée dans l'autoactivation de la kinase et dans la reconnaissance des substrats comme précédemment évoqué. Une mutation Tyr182Phe dans des mutants p38 α constitutivement actifs entraîne une perte presque

complète de leur autophosphorylation et de leur activité kinase, suggérant que la phosphorylation de la Tyr182 améliore l'autoactivation (Askari et al., 2009; Zhang et al., 2008).

c. Régulation par les protéines d'échafaudage

Les protéines d'échafaudage permettent de recruter simultanément différents composants d'une voie de signalisation spécifique et ainsi d'en faciliter la transmission du signal. Les protéines d'échafaudage rapportées pour p38 incluent : les membres JIP2 et JIP4 de la famille JIP (JNK-interacting protein) (Kelkar et al., 2005); OSM (osmosensing scaffold for MEKK3) qui forme un complexe avec Rac, MEKK3 et MKK3 et régule l'activation de p38 α en réponse à un choc osmotique (Uhlik et al., 2003) ; et Dlg1 qui orchestre la phosphorylation de p38 sur la Tyr323 par le biais des récepteurs TCR (Round et al., 2007).

L'assemblage des différents composants de la cascade de signalisation par ces protéines d'échafaudage permet une phosphorylation et une activation efficaces des p38.

d. Autres mécanismes de régulation

D'autres mécanismes de régulation ont été rapportés pour contrôler la signalisation médiée par p38.

Des changements dans les niveaux d'expression des différents composants constituant la cascade, impliquant à la fois des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels ont été décrits.

Des modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations, comme précédemment évoquées, ainsi que des acétylations et des méthylations peuvent affecter l'activité catalytique des protéines impliquées (Zou and Blank, 2017). On peut citer comme exemple l'acétylation des résidus Ser207 et Thr211 de la boucle d'activation de la MAP2K MKK6 médiée par la protéine effectrice bactérienne YopJ de *Yersinia pestis*. Ces acétylations bloquent la phosphorylation et l'activation de MKK6 par les MAP3K (Mukherjee et al., 2006). Un autre exemple est la phosphorylation du résidu Thr123 des p38. Ce résidu se situe au niveau du domaine d'interaction de la p38 avec le site d'ancrage de ses partenaires protéiques. La phosphorylation de ce résidu interfère avec la capacité de la p38 à lier et à être phosphorylée par MKK6, ainsi qu'avec la capacité de la p38 à lier et à phosphoryler des substrats. Cette phosphorylation est médiée par GRK2 (G-protein-coupled receptor kinases 2) (Peregrin et al., 2006).

2. Propriétés structurales

Comme la plupart des kinases, les MAPK p38 sont composées de deux lobes ou domaines distincts : un domaine N-terminal plus petit constitué principalement de brins β et un domaine C-terminal formé d'hélices α . Les deux lobes sont reliés par une région charnière flexible qui forme le site de liaison de l'ATP avec des éléments structuraux provenant des deux lobes (Taylor and Kornev, 2011).

Les 4 isoformes de p38 partagent des éléments structuraux dont les principaux sont détaillés ci-dessous. Ils sont également représentés dans la Figure 13. La numérotation des acides aminés indiqués se réfère à la séquence de la p38 α qui est utilisée comme référence. Une présentation dynamique est également disponible en suivant le lien <https://doi.org/10.7554/eLife.22175.003> et permet de visualiser en détail les résidus impliqués dans l'activation de p38 α .

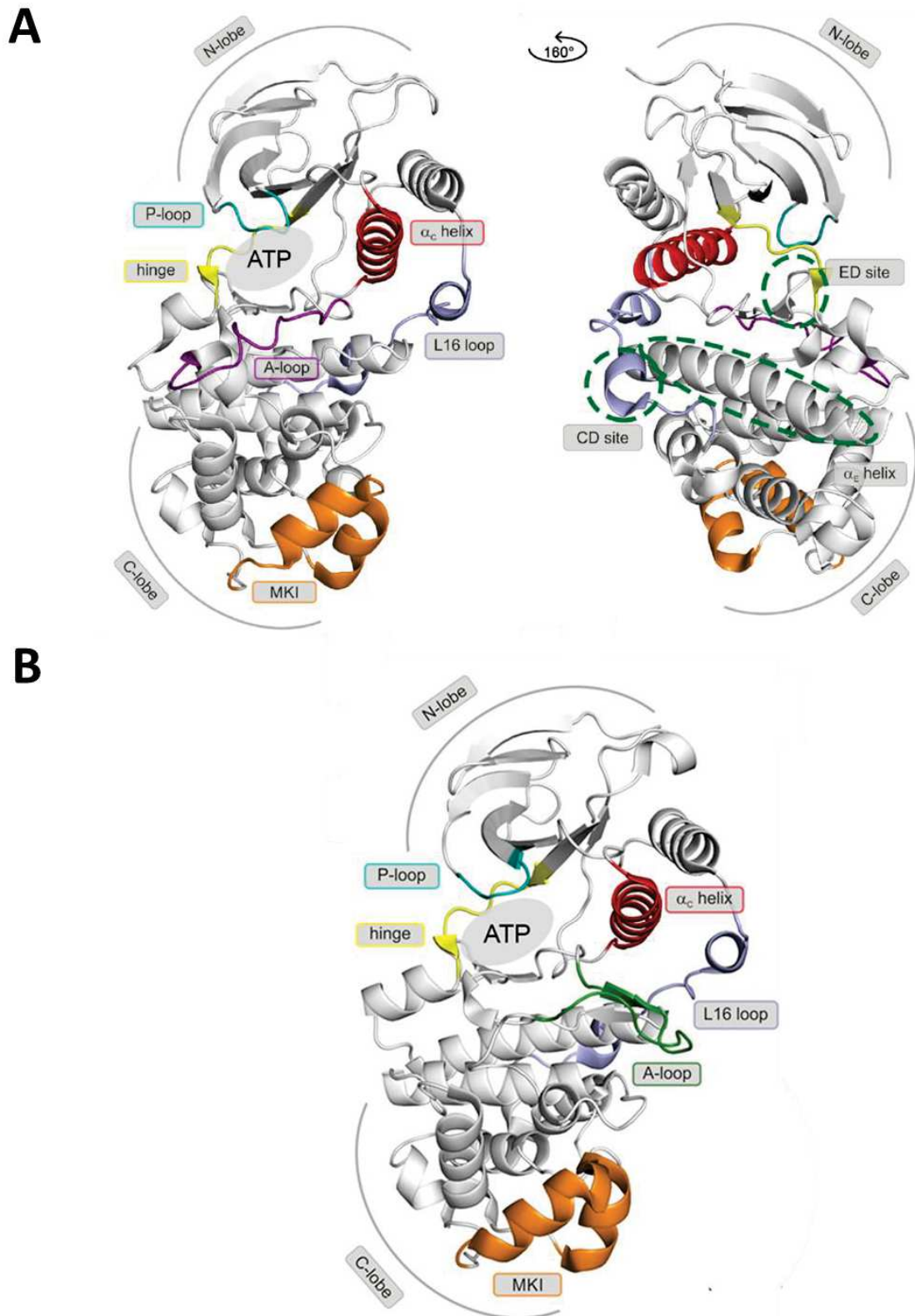


Figure 13 : Modèles structuraux des formes (A) inactive et (B) active (doublement phosphorylée sur Thr180 et Tyr182) de la p38 α . La boucle d'activation (indiquée A-loop) est représentée en violet pour la forme inactive et en vert pour la forme active (Kuzmanic et al., 2017).

a. Boucle d'activation

Dans la voie d'activation classique, les p38 sont phosphorylées par les MAP2K sur leur résidus Thr180 et Tyr182 du motif TGY situé dans la boucle d'activation de la kinase. Cette boucle d'activation, ou boucle de phosphorylation, est constituée de 13 aa (résidus Leu171 à Val183) et est située à proximité du site actif, en surface de la protéine dans le domaine C-terminal. Les chaînes latérales des résidus phospho-accepteurs sont également exposées en surface.

Dans la forme inactive, non phosphorylée de la protéine, la boucle d'activation est positionnée sur le lobe C-terminal et ses résidus sont orientés de manière à obstruer le site de fixation des substrats. De plus, une seconde boucle appelée « P-loop » est repliée dans le site de liaison à l'ATP (Adenosine TriPhosphate) (Kuzmanic et al., 2017). Les domaines N- et C-terminaux de la kinase sont également orientés loin l'un de l'autre de telle sorte que les résidus catalytiques, essentiels pour l'activité kinase, situés dans le domaine N-terminal (Lys53 et Glu71) sont séparés de ceux situés dans le domaine C-terminal (Asp168) créant ainsi un désalignement du site actif (Wilson et al., 1996). L'ensemble de ces caractéristiques structurales témoignent de la faible affinité de la forme non phosphorylée de la kinase pour l'ATP (Frantz et al., 1998). La régulation de l'activité enzymatique de la kinase s'explique donc par l'incapacité de la p38 non phosphorylée à lier étroitement l'ATP. Comme précédemment évoqué, les MAPK p38 sont capables de s'autophosphoryler. Elles possèdent ces mécanismes inhibiteurs inhérents à leur structure pour les empêcher de prendre une conformation active. Un réarrangement de l'orientation des domaines N- et C-terminaux l'un par rapport à l'autre est nécessaire pour que la protéine kinase adopte une conformation active.

La phosphorylation du motif TGY dans la boucle d'activation induit des changements conformationnels qui libèrent le blocage stérique et stabilisent la boucle d'activation dans une conformation ouverte et étendue caractéristique en brin β , facilitant la liaison au substrat et l'activité catalytique. Cette nouvelle position de la boucle d'activation rapproche les lobes N- et C-terminaux et facilite la réorientation des résidus clés (Lys53, Glu71 et Asp168) qui participent à la stabilisation de l'ATP et des ions Mg^{2+} indispensables à l'activité catalytique (Taylor and Kornev, 2011). L'ensemble de ces modifications permettent à l'enzyme d'adopter une conformation active.

b. Site de liaison à l'ATP

Le site de liaison à l'ATP (aussi appelé domaine catalytique ou domaine kinase) se situe dans la région charnière entre les deux lobes de la kinase. Le pont formé par les résidus His107 à Asp112 reliant les deux domaines de p38 constitue une des parois de la poche de liaison à l'ATP (Wang et al., 1997). Ce pont interagit avec le cycle adénine de l'ATP par deux liaisons hydrogènes impliquant les résidus

His107 et Met109. Le site de liaison à l'ATP comprend également des résidus provenant des deux lobes. Le domaine N-terminal forme une poche de fixation pour le cycle adénine tandis que le domaine C-terminal fournit le site de liaison pour le groupement β -phosphate de l'ATP, la base catalytique et les sites de liaison pour l'ion Mg^{2+} qui sert de cofacteur à la réaction enzymatique (Taylor and Kornev, 2011; Wilson et al., 1996).

De par leur forte homologie de séquence, les isoformes α et β possèdent une structure tridimensionnelle très similaire. Cependant des différences dans l'orientation relative des domaines N- et C-terminaux entraînent une réduction de la taille de la poche ATP pour l'isoforme β (Patel et al., 2009). Cette différence de taille entre les deux poches ATP peut être exploitée pour obtenir une sélectivité des composés inhibiteurs compétitifs de l'ATP envers l'isoforme α .

c. Domaines d'interaction avec les différents partenaires protéiques

Les p38, tout comme les MAPK ERK et JNK, sont des sérines/thréonines kinases. Elles phosphorylent leurs substrats sur des résidus Sérine ou Thréonine qui sont généralement suivis d'un résidu Proline (séquence consensus P/L-X-S/T-P où X est un aa variable excepté une Pro) (Clark-Lewis et al., 1991; Gonzalez et al., 1991).

Un des aspects clefs dans la reconnaissance kinase-substrat repose sur l'interaction du domaine catalytique de la kinase avec le résidu phospho-accepteur du substrat. Les résidus impliqués dans cette interaction (Val183 – Arg189) forment la poche nommée « P+1 » pour indiquer la spécificité de la kinase pour le résidu hydrophobe Pro situé en +1 du résidu Ser/Thr phospho-accepteur. Cette poche est adjacente à la boucle d'activation de la kinase. A l'état non phosphorylée, le site P+1 est complètement bloqué et se forme lors de l'activation par phosphorylation de la kinase.

Certains substrats contiennent également des domaines de liaison spécifiques appelés « docking sites » ou sites d'ancrage. Ces domaines d'ancrage sont distincts des sites de phosphorylation du substrat mais jouent un rôle clé dans l'efficacité de la phosphorylation du substrat par la kinase (Tokunaga et al., 2014). Le « docking site » le mieux caractérisé est le domaine D qui est constitué de deux ou plus aa basiques (Lys ou Arg) séparés par un court linker d'un groupe de résidus hydrophobes (Chang et al., 2002; Tanoue et al., 2000). Les interactions de docking servent à améliorer l'efficacité et la spécificité de la phosphorylation de la cible par les MAPK. Cependant, tous les substrats des p38 ne contiennent pas ce site d'ancrage. Dans ces cas, la sélection du substrat dépend d'autres déterminants tels que la disponibilité, la concentration et la localisation subcellulaire ainsi que de l'intensité et durée de l'activité p38. Ces motifs de docking sont également retrouvés au sein des MAP2K et des

phosphatases de type MKP, responsables de l'activation et de l'inactivation des p38, ainsi que dans les protéines d'échafaudage.

Une portion en C-terminale de la p38 appelée domaine CD (pour Common Docking) correspond au site d'interaction avec le domaine D. Ce domaine CD est caractérisé par un cluster d'aa acides (Asp313, Asp315 et Asp316) reconnu par les sites de docking enrichi en aa basiques (Lys et Arg) (Tanoue et al., 2000).

Ce motif CD forme avec d'autres domaines distants du site catalytique comme le site ED (Glu160 et Asp161) (Tanoue et al., 2001) un sillon d'ancrage pour les interactions de docking. Cette interaction de docking aide à réguler l'efficacité et la spécificité des réactions enzymatiques mais n'explique pas à elle seule la spécificité de l'interaction de la kinase avec ces différents partenaires protéiques (Chang et al., 2002).

3. Une diversité de substrats pour une diversité fonctionnelle

La voie de signalisation des MAPK p38 joue un rôle important dans la capacité des cellules à intégrer des stimuli externes et à les convertir en signaux appropriés. Les p38 jouent un rôle clé dans la réponse aux stress (rayonnement UV, stress oxydatif, thermique ou osmotique...) mais également aux cytokines, chemokines, hormones et facteurs de croissance, conduisant ainsi à la régulation de nombreux processus cellulaires. La quantité de publications décrivant l'implication de p38 dans de multiples fonctions peut en témoigner.

De par son profil d'expression ubiquitaire et à un niveau élevé dans les cellules, la plupart des fonctions généralement attribuées aux MAPK p38 se réfèrent en fait à l'isoforme p38 α qui est la mieux caractérisée.

Plus de 100 protéines peuvent être directement phosphorylées par p38 α (Tremplec et al., 2013a, 2013b). Une grande proportion d'entre elles est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes. Les principaux substrats des p38 comprennent des protéines kinases impliquées dans différents processus, des protéines nucléaires dont des facteurs de transcription et des régulateurs du remodelage de la chromatine, et une multitude de protéines cytosoliques intervenant dans la régulation de fonctions variées telles que la dégradation des protéines, la stabilité des ARNm, l'endocytose, l'apoptose, la dynamique du cytosquelette ainsi que la différenciation et la migration cellulaire. La variété des cibles connues soutient l'idée que cette voie de signalisation relie de nombreux stimuli différents à un large spectre de réponses cellulaires.

Les fonctions médiées par les MAPK p38 sont normalement associées avec leur capacité à phosphoryler leurs substrats sur les motifs Ser-Pro ou Thr-Pro. Cependant les p38 peuvent également avoir des rôles indépendamment de leur fonction kinase, qui seraient dus à leur liaison à la cible en l'absence de phosphorylation. Ce mécanisme implique une modification conformationnelle de la cible, des changements de leur localisation subcellulaire ou une compétition avec leur liaison à d'autres protéines (Cuadrado and Nebreda, 2010).

B. Implication pathologique de l'isoforme p38 α

En raison de la quantité de cibles et de fonctions biologiques médiées par la MAPK p38 α , une dérégulation de cette voie de signalisation conduit au développement de nombreuses pathologies. D'autres isoformes ont également une implication dans le développement de certaines pathologies telles que les tauopathies pour les isoformes γ et δ (Feijoo et al., 2005) et le diabète pour l'isoforme δ (Sumara et al., 2009).

1. p38 et inflammation

La p38 α a originellement été identifiée pour son rôle dans l'inflammation dans la régulation de la biosynthèse des cytokines pro-inflammatoires suite à une stimulation de monocytes par du LPS (Lee et al., 1994). L'utilisation de souris génétiquement modifiées, déficientes pour la p38 α au sein des cellules myéloïdes ou dans les cellules épithéliales, ainsi que d'inhibiteurs pharmacologiques, ont confirmé l'implication de cette voie dans la production de cytokines et les réponses inflammatoires *in vivo* (Gupta and Nebreda, 2015; Kang et al., 2008; Kim et al., 2008). L'isoforme p38 β quant à elle n'est pas nécessaire pour les réponses inflammatoires aiguës ou chroniques. Des souris déficientes en p38 β ne présentent aucun défaut dans la production de cytokines ou dans la fonction immunitaire (Beardmore et al., 2005; O'Keefe et al., 2007).

La p38 α régule la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'interleukine 1 β et l'interleukine 6, qui jouent un rôle clé dans l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, le psoriasis ou encore l'asthme chronique. En plus de cette production de cytokines, p38 α stimule l'induction d'autres médiateurs inflammatoires comme l'enzyme COX-2 (cyclooxygénase 2) (Hwang et al., 1997).

Une inflammation excessive est un facteur crucial dans la pathogénèse de plusieurs autres maladies comme la maladie d'Alzheimer et les cancers, faisant de la p38 α et de sa voie de signalisation une cible prometteuse pour le développement de thérapies anti-inflammatoires.

2. p38 et cancer

Les cellules cancéreuses se caractérisent par un échappement à l'apoptose, un potentiel réplicatif non limité, des propriétés invasives ainsi qu'à former des métastases, une capacité à initier et maintenir l'angiogenèse, et un développement de la résistance aux drogues (Hanahan and Weinberg, 2000). La signalisation MAPK p38 régule non seulement la production de médiateurs inflammatoires mais intervient également dans la plupart de ces processus tumoraux liés à l'homéostasie tissulaire, tels que la prolifération, la différenciation et la survie des cellules.

De nombreuses études ont démontré que la p38 α joue un rôle suppresseur de tumeur. Cependant son rôle dans la cancérogénèse reste controversé. Des études ont également rapporté que la p38 α pouvait faciliter la survie et la prolifération des cellules tumorales, contribuant ainsi à la progression de certains types de tumeurs. De plus, l'activation de p38 α aide les cellules tumorales à survivre à certains traitements de chimiothérapies. Dans ces cas, l'inhibition de la p38 α présente un intérêt thérapeutique potentiel. La compréhension contexte-dépendante de la signalisation médiée par p38 α dans les processus tumoraux revêt donc une grande importance pour l'utilisation d'inhibiteurs ciblant la voie p38 pour la thérapie des cancers.

a. Rôle suppresseur de tumeur

Les preuves pour le rôle suppresseur de tumeur de p38 proviennent d'études menées sur des lignées cellulaires ainsi que dans des modèles murins, où l'inactivation de la voie p38 accroît la transformation cellulaire (Bulavin and Fornace, 2004; Han and Sun, 2007).

Le rôle suppresseur de tumeur alloué à p38 s'explique par l'effet inhibiteur de l'activation des isoformes α et β sur les points de contrôle du cycle cellulaire G0, G1/S et G2/M en réponse à des stimuli qui nécessitent un arrêt du cycle cellulaire et/ou une mort cellulaire (Ambrosino and Nebreda, 2001). Cet arrêt permet la réparation des dommages à l'ADN ou dans le cas contraire une mort par apoptose. P38 α est également impliquée dans l'inhibition de contact qui entraîne un arrêt de la prolifération cellulaire (Swat et al., 2009). La prolifération cellulaire est régulée par les contacts cellule-cellule. Dans les fibroblastes, il y a une activation soutenue de la p38 α en réponse à ce contact qui mène à un arrêt du cycle cellulaire. L'utilisation d'inhibiteurs ciblant les p38 entraîne une prolifération anarchique des

cellules, également observable dans les fibroblastes p38 α -/- (Faust et al., 2005). Ces fonctions dans le contrôle du cycle cellulaire témoignent du rôle anti-oncogénique de p38 α .

Plusieurs exemples de tumeurs confirment que des défauts de la fonction de p38 α peuvent entraîner des anomalies du cycle cellulaire et mener à la tumorigenèse. On peut citer le rôle joué par p38 α dans l'induction de la différenciation terminale des myoblastes, qui nécessite un arrêt de la prolifération et l'expression de marqueurs spécifiques. Un défaut de différenciation des cellules précurseurs musculaires est associé à une diminution de l'activité de p38 α et à une prolifération dérégulée de ces cellules impliquées dans les rhabdomyosarcomes (Puri et al., 2000).

La p38 α est impliquée dans l'homéostasie de nombreux tissus. Dans le colon, dans le poumon, le foie etc., la p38 α régule l'intégrité de la barrière épithéliale, contrôle l'auto-renouvellement des cellules souches et progénitrices et inhibe la prolifération en facilitant la différenciation (Igea and Nebreda, 2015). L'inhibition de l'expression de la p38 α dans ces tissus entraîne une prolifération des cellules et une sensibilité à la tumorigenèse du côlon associée à l'inflammation, favorise la tumorigenèse induite par K-Ras^{G12V} dans l'épithélium pulmonaire et facilite le carcinome hépatocellulaire induit par la N-nitrosodéthylamine par la production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species) et d'IL1- α (Gupta et al., 2014; Sakurai et al., 2008; Ventura et al., 2007).

Cependant l'effet anti-tumoral conjugué à l'activation de p38 α est également associé dans ces mêmes tissus à un effet pro-tumoral, p38 α facilitant la progression des tumeurs. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de p38 réduit la charge tumorale de tumeurs du côlon chez la souris (Chiacchiera et al., 2009; Gupta et al., 2014) et une augmentation de la phosphorylation p38 a été rapportée dans les tumeurs pulmonaires humaines par rapport aux tissus sains (Wagner and Nebreda, 2009).

Un autre exemple permettant d'illustrer ce double rôle joué par p38 α dans les tumeurs est le cancer du sein où l'activation de p38 α entraîne une inhibition de la tumorigenèse chez des souris exprimant les oncogènes Erbb2 ou H-Ras et déficientes pour la phosphatase Wip1 ciblant la p38. Ces souris, dont l'activation de p38 est augmentée, présentent une réduction significative de la tumorigenèse mammaire par rapport aux souris contrôles exprimant la phosphatase, témoignant du rôle suppresseur de tumeur de la voie p38 dans l'initiation de la tumeur du sein (Bulavin et al., 2004). Un traitement avec l'inhibiteur de p38 LY2228820 réduit quant à lui la croissance tumorale dans des xénogreffes de lignées cellulaires de cancer du sein humain (Campbell et al., 2014). Un second inhibiteur de p38, le PH797804 altère la croissance des tumeurs mammaires dans un modèle de cancer du sein chez la souris (Pereira et al., 2013). De plus, des taux élevés de p38 active ont été corrélés avec

un mauvais pronostic, la présence de métastases ganglionnaires et une résistance au tamoxifène chez des patientes atteintes de cancer du sein (Wagner and Nebreda, 2009). Toutes ces données confirment le rôle de la p38 α dans la progression tumorale du cancer du sein malgré son rôle initial suppresseur de tumeur.

b. Rôle oncogénique

La p38 α est également impliquée dans différents processus oncogéniques comme précédemment évoqué. Ce changement fonctionnel de p38 dans les cancers semble dépendre du stade de la tumeur et du type cellulaire. Cela peut être dû à des modifications dans le programme d'expression des gènes qui accompagnent la transformation des cellules malignes ou être provoqué par différents signaux provenant du microenvironnement tumoral (Igea and Nebreda, 2015). D'autres protéines de signalisation sont connues pour avoir une double fonction dans la tumorigénèse comme par exemple les membres de la famille du TGF- β (Transforming Growth Factor- β) (Massagué, 2012).

Le rôle oncogénique de p38 α peut être lié à son implication dans la régulation de l'angiogénèse et de l'invasion tumorale de par son rôle dans la transduction des signaux chimiotactiques (Barrantes and Nebreda, 2012).

P38 α est activée en conditions hypoxiques et est impliquée dans la production de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), un facteur qui joue un rôle essentiel au cours de l'angiogénèse (Pagès et al., 2000). P38 α est également impliquée dans la régulation de l'expression de métalloprotéases, lesquelles contrôlent la dégradation et le remodelage de la matrice extracellulaire qui sont importants pour le développement de métastases. Une augmentation des taux de facteurs VEGF et des MMP est corrélée avec un phénotype invasif accru des cellules cancéreuses et à un pronostic défavorable dans de nombreuses tumeurs (Cuenda and Rousseau, 2007).

Enfin, p38 α joue un rôle clé dans la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que COX-2 et de cytokines comme l'IL-6, l'IL-1 et le TNF- α qui ont des effets pro-angiogéniques et de survie (Kumar et al., 2003). L'inflammation chronique est un puissant promoteur du cancer et les cytokines sont des facteurs de survie importants pour les cellules cancéreuses (Mantovani et al., 2008). L'inhibition de la p38 α peut donc être bénéfique pour le traitement des cancers associés à l'inflammation, tel que le cancer du côlon.

Un autre aspect imputé à la p38 α dans les processus cancéreux est son implication dans la résistance aux traitements de chimiothérapies. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont rapporté que l'inhibition de la p38 α potentialise l'effet des drogues cytotoxiques. On peut citer par exemple une

amélioration de la réponse au cisplatine combinée avec l'inhibition de p38 dans la réduction de la charge tumorale de modèles murins de cancer du sein. L'inhibition de p38 entraîne une sensibilisation à l'apoptose induite par le cisplatine par l'activation de la voie JNK (Pereira et al., 2013).

Des méthodes de screening par RNA interférence ont également permis d'identifier l'implication de la p38 α dans la résistance au sorafenib dans des hépatocarcinomes cellulaires chez la souris (Rudalska et al., 2014). Une approche similaire a été réalisée dans notre équipe par l'analyse du profil transcriptomique de deux lignées d'adénocarcinomes coliques humaines présentant des profils de résistances différents à l'Irinotécan. La comparaison de l'expression des gènes entre les deux lignées a permis de mettre en évidence une activation endogène de la voie p38 au sein de la lignée possédant un phénotype de résistance 6 fois supérieur à celui de la lignée sensible (Gongora et al., 2008). Une analyse plus détaillée a permis d'identifier les isoformes p38 α et β comme étant impliquées dans le développement de la résistance à l'Irinotécan et que leur niveau de phosphorylation était corrélé à la résistance des cellules au traitement. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant les isoformes α et β permet de restaurer la sensibilité des cellules à l'Irinotécan et leur utilisation en association avec l'Irinotécan possède un effet additif sur la croissance tumorale *in vivo* (Paillas et al., 2011).

Un autre mécanisme par lequel la p38 α peut faciliter la résistance à la chimiothérapie consiste à induire la dormance des cellules tumorales, les cellules qui ne se divisent pas étant plus résistantes aux traitements cytotoxiques. Des études sur des modèles de carcinomes tête et cou ont montré que le passage de la prolifération des cellules tumorales à l'état de dormance est régulé par l'équilibre entre les voies ERK et p38 et qu'un faible ratio ERK/p38 est associé à la dormance des cellules cancéreuses (Sosa et al., 2014).

Toutes ces données indiquent que la voie p38 α peut réguler la tumorigenèse à différents niveaux et par le biais de différents mécanismes en fonction du type cellulaire et du stade du cancer. La complexité de cette voie de signalisation nécessite de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans chaque modèle étudié.

L'ensemble des propriétés de la p38 α associées à la tumorigenèse est résumé dans la Figure 14.

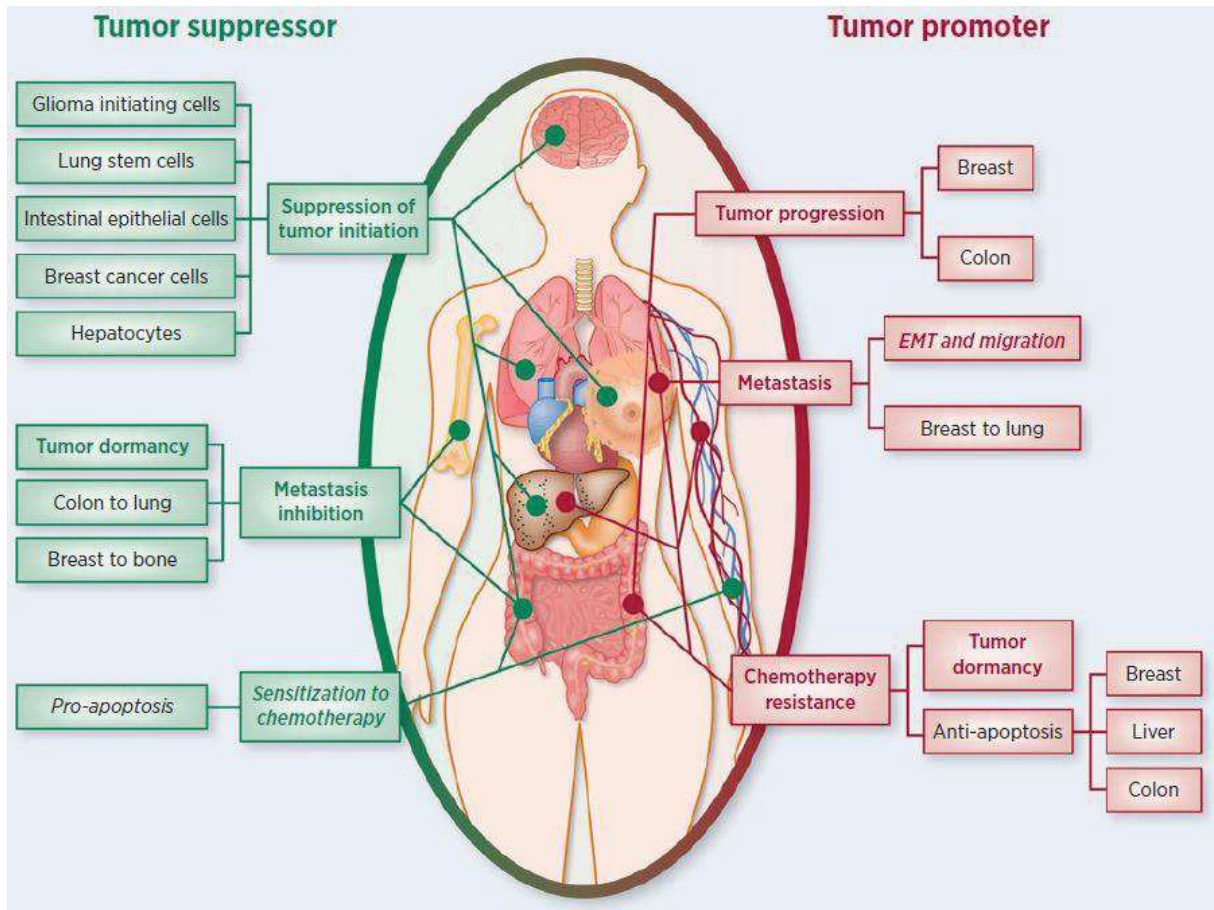


Figure 14 : Illustration des différents rôles de p38 α dans la tumorigenèse identifiés à partir de modèles chez la souris. En italique figurent des études approfondies *in vitro* mais aucune preuve de la pertinence *in vivo* (Igea and Nebreda, 2015).

C. Principaux inhibiteurs chimiques ciblant la MAPK p38 α

1. Généralités

En raison de son rôle clé dans la régulation de la signalisation dans l'inflammation ainsi que dans la production de cytokines, de nombreuses sociétés pharmaceutiques se sont investies dans le développement de petites molécules inhibitrices de la MAPK p38 α comme approche de traitement anti-inflammatoire. Cette recherche intensive a mené à l'identification de nombreux inhibiteurs de structures très diverses. Plusieurs composés, de pharmacophores différents, bloquant la voie de signalisation p38 sont entrés dans des essais cliniques de phase II pour des applications thérapeutiques variées telles que la polyarthrite rhumatoïde (PAR), la maladie de Crohn, le psoriasis et d'autres indications caractérisées par une inflammation chronique. Cependant dans presque tous les cas, les essais cliniques ont échoué.

Bien qu'efficaces dans des modèles pré-cliniques, des problèmes de toxicité en particulier affectant le foie, et un manque d'efficacité sur le long terme pour le traitement de pathologies chroniques ont interféré avec leur développement en clinique (Dambach, 2005). La plupart des essais ont rapporté une diminution significative des biomarqueurs de l'inflammation tels que la CRP (protéine réactive C) au cours de la première semaine de traitement mais que cet effet n'est pas maintenu pendant la durée de l'étude (Goldstein et al., 2010). Ces résultats suggèrent qu'une voie inflammatoire compensatoire pourrait être activée en réponse à une inhibition prolongée de la voie p38 α chez des patients atteints de PAR ou de la maladie de Crohn.

Actuellement, les études cliniques impliquant des inhibiteurs ciblant la voie p38 portent sur de nouvelles indications notamment l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive, la maladie d'Alzheimer et en cancérologie (clinicaltrials.gov, entrée : MAPK14).

2. Modes de liaison

Les inhibiteurs de kinase sont classés selon leur mode de liaison. On distingue ceux liant le site de liaison à l'ATP de ceux liant un site distinct.

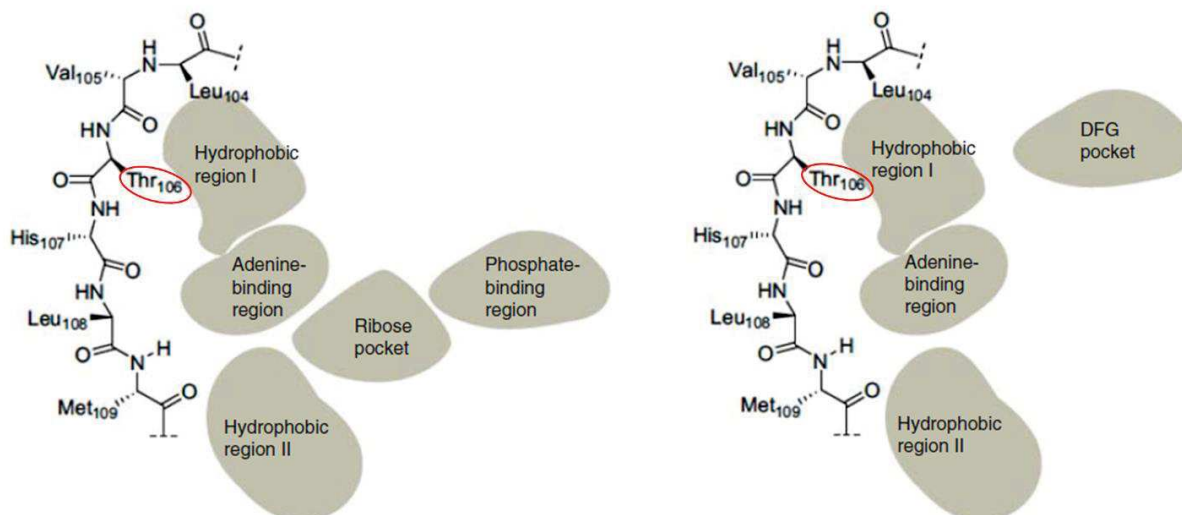


Figure 15: Représentation schématique du site de liaison à l'ATP de la p38 α et des poches hydrophobes adjacentes. A gauche sont représentées les régions de liaison accessibles dans la conformation active DFG-in, et à droite celles dans la conformation inactive DFG-out. Le résidu gatekeeper Thr106 est entouré en rouge (Bühler and Laufer, 2014).

a. Inhibiteurs ciblant le site de liaison à l'ATP

La grande majorité des inhibiteurs de p38 rapportés cible la poche de liaison à l'ATP et fonctionne par un mécanisme de compétition à l'ATP. Ils peuvent être classés en trois groupes en fonction de leur mode de liaison.

Les inhibiteurs de type I

Les inhibiteurs de kinase de type I occupent la région de liaison au cycle adénine de l'ATP, et établissent des interactions de type liaisons hydrogènes avec les résidus de la charnière de la kinase, en particulier avec la Met109. En plus de ce résidu, la plupart des inhibiteurs de type I occupent également une poche hydrophobe adjacente au site de liaison à l'ATP mais non occupée par l'ATP appelée HR-1 pour région hydrophobe I (Figure 15). En fonction de l'inhibiteur, d'autres interactions intermoléculaires peuvent être établies avec une seconde poche hydrophobe HR-II, la poche de liaison au ribose ainsi que la région de liaison aux groupements phosphates de l'ATP. Les membres de cette classe d'inhibiteurs n'interagissent pas avec le site allostérique. Les inhibiteurs de la classe des piridinyl-imidazoles, comme le SB202190, qui ont été les premiers inhibiteurs de p38 à être identifiés, sont des inhibiteurs de type I (Lee et al., 1994).

Les inhibiteurs de type II

Les inhibiteurs de kinase de type II ciblent une conformation inactive de la kinase appelée DFG-out. En plus de se lier au site de liaison de l'ATP ils exploitent des interactions clés au sein du site allostérique. Le site allostérique est adjacent à la poche HR-I et n'est accessible que lorsque la kinase adopte une conformation catalytiquement inactive (DFG-out) dans laquelle le motif hautement conservé DFG (Asp168-Phe169-Gly170) situé à l'extrémité N-terminale de la boucle d'activation de la kinase subit une rotation de 180° par rapport à la conformation active (DFG-in) (Liu and Gray, 2006). Lors de l'interaction avec un inhibiteur de type II, la rotation du motif DFG induit une réorientation de la chaîne latérale du résidu Phénylalanine, normalement enterrée dans une poche hydrophobe, en direction de la poche de liaison du cycle adénine de l'ATP et empêche ainsi la liaison de l'ATP. L'espace laissé vacant par la Phe constitue un nouveau site de liaison appelé site allostérique. Le ciblage de cette poche par un inhibiteur entraîne une affinité et une spécificité accrues de l'inhibiteur pour la kinase. C'est le cas notamment pour le BIRB-796 ciblant les MAPK p38 (Pargellis et al., 2002), et de l'Imatinib (Gleevec), premier inhibiteur de kinase ayant obtenu une AMM, ciblant la tyrosine kinase ABL pour le traitement des leucémies myéloïdes chroniques.

Les inhibiteurs de type I½

Les inhibiteurs de type I½ possèdent le même pharmacophore que les inhibiteurs de type I mais présentent également une partie de leur structure dirigée en direction du site allostérique.

b. Inhibiteurs non compétitifs de l'ATP

Les inhibiteurs de type III se lient sur un site distinct de celui de l'ATP. Ils se lient soit au site allostérique sans aucune interaction avec la région charnière ou à d'autres poches distantes du site de liaison à l'ATP. On parle alors d'inhibiteurs allostériques. Ils se caractérisent par un meilleur profil de sélectivité car ils se lient sur des sites moins conservés entre les kinases. Seuls quelques exemples ont été rapportés jusqu'à présent pour la p38α (Comess et al., 2011).

3. Sélectivité

La grande majorité des inhibiteurs de p38 cible le site ATP de la kinase. Comme toutes les plus de 500 protéines kinases identifiées dans le génome humain possèdent un site ATP, il existe un grand potentiel de réactivité croisée avec ces inhibiteurs qui peut être à l'origine d'effets indésirables et de

problème de toxicité observés lors des essais cliniques. Des inhibiteurs plus récents dit de « troisième génération » présentent une spécificité nettement améliorée pour la voie p38 et ont démontré qu'une inhibition sélective de cette voie de signalisation était possible. Malgré le fait que ces composés ciblent toujours pour la grande majorité la poche l'ATP, ils possèdent un profil de sélection élevé pour l'isoforme p38 α . Cette spécificité s'explique par l'utilisation de propriétés structurales propres à cette kinase appelées points chauds ou « hot spots » de sélectivité. Ces « hot spots » sont des régions hydrophobes adjacentes au site de liaison à l'ATP, mais non directement impliquées dans la liaison à l'ATP et où la séquence en aa de la p38 α est distincte de la majorité des autres kinases. L'engagement de ces régions de la protéine par l'interaction avec un ligand entraîne un gain de sélectivité pour la p38 α .

Plusieurs points chauds de sélectivité sont décrits pour l'isoforme p38 α .

La région hydrophobe HR-I, comme évoquée précédemment, est une région hydrophobe située à l'arrière du site de liaison à l'ATP et sans relation avec la fonction kinase. Cette poche est séparée du site de liaison à l'ATP par la chaîne latérale du résidu appelé « gatekeeper » (Figure 15). La taille de ce résidu contrôle l'accès à cette poche. Chez les p38 α et p38 β , ce résidu correspond à l'aa Thr106. La petite taille et la rotabilité de sa chaîne latérale permet l'accès aux inhibiteurs qui occupent cette poche hydrophobe directement depuis le site de liaison à l'ATP. D'autres kinases peuvent posséder un résidu plus volumineux à cette position, empêchant ainsi par encombrement stérique l'accès à la poche. C'est le cas par exemple des isoformes p38 γ et p38 δ qui possèdent un aa Met comme gatekeeper qui explique leur faible affinité pour les inhibiteurs de type I SB202190 ou SB203580 par rapport aux isoformes α et β . Environ 20% des protéines kinases humaines possèdent un Aa Thréonine comme résidu gatekeeper (Goldstein et al., 2010). L'interaction d'un inhibiteur avec ce résidu influence sur l'affinité et la sélectivité de l'inhibiteur pour la kinase (Wroblewski and Doweyko, 2005).

Une deuxième région hydrophobe HR-II est située du côté C-terminal du site de liaison à l'ATP. Cette poche constitue un autre déterminant de la sélectivité de certains inhibiteurs de type I pour les p38 (Azevedo et al., 2012). Cette poche HR-II est entourée d'une zone exposée aux solvants et la présence de substituants polaires dans les inhibiteurs, qui s'étendent à partir de HR-II, a été décrite comme améliorant l'affinité des inhibiteurs en fournissant des interactions supplémentaires favorables. Cette poche HR-II est réduite de 2Å en largeur chez p38 β par rapport à celle de la p38 α , en raison d'une différence d'orientation entre les domaines N- et C-terminaux des deux kinases (Patel et al., 2009). Cette différence conformationnelle peut être exploitée pour augmenter la sélectivité des inhibiteurs envers l'isoforme α , en modulant la taille et la rigidité des substituants se liant au niveau de cette poche.

La capacité de certains inhibiteurs à interagir avec la Gly110 de la région charnière par le biais d'une liaison hydrogène constitue également un gain de sélectivité envers la p38 α . Les classes d'inhibiteurs quinazolinone et pyridol-pyrimidine induisent un basculement appelé « peptide flip » de la liaison peptidique reliant les résidus Met109 et Gly110. Cette rotation permet la formation d'une liaison hydrogène supplémentaire avec la Gly110 en plus de celle impliquant la chaîne principale de la Met109. La capacité d'un inhibiteur à induire ce changement de conformation lors de la liaison entraîne une sélectivité améliorée de l'inhibiteur pour les p38 α , β et γ par rapport aux autres MAPK p38 δ , ERK et JNK qui possèdent des résidus plus volumineux que la Gly en position 110. La présence de résidus plus encombrants rend le « peptide-flip » requis lors de la fixation de l'inhibiteur plus défavorable du point de vue énergétique (Fitzgerald et al., 2003). Environ 8% seulement des protéines kinases humaines possèdent une Gly à cette position (Goldstein et al., 2010). Par conséquent le ciblage de ce point chaud entraîne une meilleure sélectivité à travers le kinome.

Le ciblage de ces différentes régions de sélectivité par les inhibiteurs permet d'obtenir des inhibiteurs compétitifs de l'ATP hautement sélectifs de la kinase p38 α . Cependant, en raison du fort degré d'homologie entre les isoformes p38 α et β (95% dans le site de liaison à l'ATP), tous ces composés partagent une réactivité croisée avec l'isoforme β . Les déterminants de sélectivité tels que la Thr106 et la Gly110 sont conservés entre les deux isoformes. La grande majorité des inhibiteurs de p38 rapportés à ce jour sont des inhibiteurs doublement spécifiques des p38 α/β et pratiquement inactifs vis-à-vis des deux autres isoformes γ et δ . La dualité de ces composés ne permet pas leur utilisation pour différencier les fonctions et propriétés spécifiques des deux enzymes. Bien que l'inhibition de la p38 β n'ait pas été rapportée pour entraîner des effets secondaires indésirables (les souris p38 β KO n'ont aucun phénotype connu (Beardmore et al., 2005)) plusieurs données suggèrent que le ciblage de la voie p38 α est suffisant et nécessaire pour l'obtention de certains phénotypes. L'inhibition de la p38 β n'a aucun effet sur la production de TNF- α ou sur la régulation de la réponse inflammatoire et l'inhibition spécifique de l'isoforme α suffit à l'efficacité anti-inflammatoire *in vivo* (O'Keefe et al., 2007). De plus, le fait que les isoformes α et β soient activées différemment et qu'elles puissent être impliquées de manière distincte dans différentes voies biologiques suggèrent que l'inhibition de la p38 β pourrait être non thérapeutique et éventuellement menée à des effets secondaires indésirables.

OBJECTIFS

L'exploration de nouvelles stratégies thérapeutiques représente un enjeu important pour contourner les problèmes de résistance aux chimiothérapies, principale cause des échecs thérapeutiques et des rechutes du cancer. Notre équipe s'intéresse à la résistance des cancers colorectaux métastatiques aux chimiothérapies et notamment à l'implication de la MAPK p38 α , dont l'activation est corrélée à la résistance des cellules et au statut non répondeur des patients à l'Irinotécan. Les inhibiteurs de p38 α disponibles aujourd'hui bloquent l'activité kinase de la protéine par un mécanisme de compétition à l'ATP. De par la grande conservation du domaine kinase à travers la vaste famille des kinases, la spécificité de la plupart de ces inhibiteurs n'est pas restreinte à la p38 α et des effets « off-targets » ont été rapportés. Pour cette raison, de nombreuses études s'intéressent à l'identification d'inhibiteurs allostériques visant à exploiter les caractéristiques structurales et les mécanismes de régulation qui sont propres à une kinase particulière. Dans ce contexte, mon projet de thèse s'est porté sur le développement d'une nouvelle stratégie de ciblage pharmacologique permettant de sélectionner des inhibiteurs hautement spécifiques de l'isoforme α de la p38.

Nous souhaitons montrer, par l'intermédiaire d'anticorps, qu'il est possible de cibler l'activité catalytique de la p38 α endogène dans les cellules de manière analogue aux approches pharmacologiques et ainsi d'induire une inhibition sélective de la voie de signalisation de la p38 α . A partir d'une banque synthétique de scFv, optimisée pour l'obtention d'intracorps stables et solubles, nous avons sélectionné par phage display des fragments d'anticorps spécifiques de la MAPK p38 α . Leur capacité à moduler l'activité catalytique de la protéine a été dans un premier temps évaluée *in vitro* sur la protéine recombinante et est actuellement testée, après expression des intracorps, dans des lignées cellulaires sur la protéine endogène.

Ce projet s'articule autour de deux axes :

- Le premier se concentre sur l'étude des aspects mécanistiques par lesquels les scFv exercent leur activité inhibitrice afin de déterminer les modes de liaison, les mécanismes d'inhibition ainsi que les épitopes d'interaction des scFv inhibiteurs. Ces données permettront de définir les régions de la p38 α à cibler pour le développement d'inhibiteurs chimiques de meilleure spécificité que ceux actuellement disponibles qui ciblent les isoformes α et β des p38.
- Le second axe consiste à tester l'activité inhibitrice des scFv exprimés en tant qu'intracorps sur l'activité de la p38 α endogène au moyen d'un modèle cellulaire de production de cytokines inflammatoires comme l'ont été la plupart des inhibiteurs pharmacologiques de p38 développés jusqu'ici.

RESULTATS

I. Criblage de la banque HUSCI pour l'isolement de scFv spécifiques de la p38 α

La banque HUSCI mise au point au laboratoire a été utilisée pour l'identification de fragments d'anticorps spécifiques de l'isoforme α de la MAPK p38. Cette banque synthétique de scFv humains a été construite en utilisant la séquence du framework du scFv anti- β -galactosidase 13R4 (Martineau et al., 1998). Les gènes codant les scFv sont clonés dans le vecteur phagemide pHEN1 en fusion avec la protéine pIII du phage M13 pour permettre un criblage de la banque par phage display. Le phage helper KM13 a été utilisé pour améliorer l'efficacité de la sélection par diminution du bruit de fond. Ce phage helper contient un site de clivage à la trypsine dans sa pIII (Kristensen and Winter, 1998). Après traitement par la protéase, seules les particules virales ayant incorporé une protéine de fusion pIII-scFv provenant du phagemide (ne contenant pas le site de clivage) seront infectantes et donc amplifiées. Ce phage helper permet ainsi d'éviter une multiplication des clones bactériens infectés par les phages ne présentant pas de protéines recombinantes à leur surface.

A. Phage Display

Afin d'isoler des clones scFv spécifiques de l'isoforme α , trois étapes de déplétion sur l'isoforme β de la p38 ont été réalisées en amont de la procédure de sélection par phage display. Ces étapes d'épuisement visent à éliminer de la banque de scFv les clones cross-réactant capables de lier la p38 α et la p38 β , isoformes présentant plus de 70% d'homologie de séquence (Patel et al., 2009). Après épuisement de la banque, trois tours de sélection sur l'antigène p38 α ont été réalisés. A l'issue de chaque tour de sélection, un nouveau stock de phages a été généré par infection d'*E. coli*. Finalement, ces stocks de phages ont été testés par ELISA pour évaluer l'efficacité de la sélection et la spécificité de liaison à la p38 α .

Les étapes de déplétion et de sélection ont été réalisées en utilisant les protéines recombinantes p38 α et p38 β produites chez *E. coli*, purifiées sur colonne d'affinité, puis adsorbées sur plaque de microtitration.

La procédure de phage display réalisée pour ce crible est résumée dans la Figure 16.

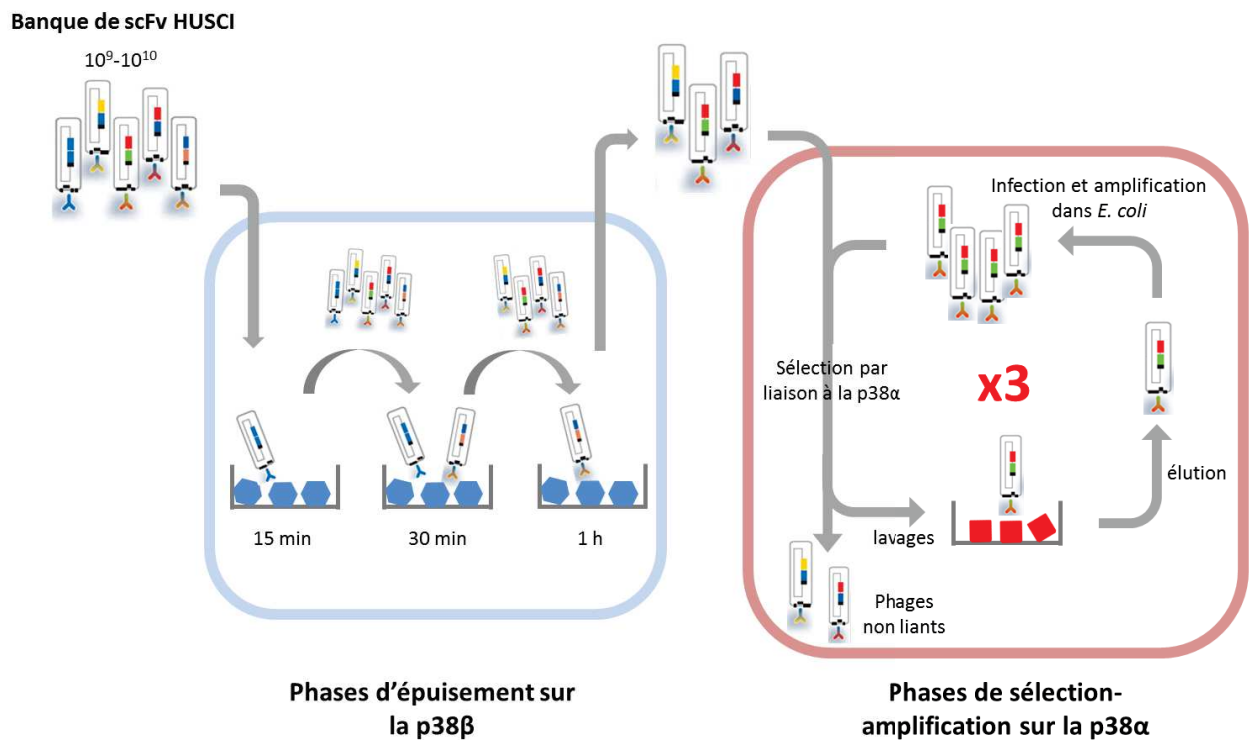


Figure 16 : Principe du phage display réalisé pour la sélection de scFv anti-p38α. Trois étapes d'épuisement de respectivement 15 min, 30 min et 1h ont été réalisées à partir de la banque naïve de phages HUSCI sur la p38β afin d'éliminer les phages liant des régions conservées de la protéine. Trois tours de sélection – amplification ont ensuite été réalisés sur l'antigène p38α.

Les phages élués après l'étape de biopanning contre la p38α ont été utilisés pour infecter la souche bactérienne suppressive *E. coli* TG1 servant à l'amplification des phages qui serviront au prochain tour de sélection sur p38α. Le stock de phages initial ainsi que les 3 stocks R1, R2 et R3 obtenus à l'issue des tours de sélection 1, 2 et 3 respectivement ont été testés par ELISA contre la p38α pour observer l'enrichissement des clones liant la p38α au cours des tours de sélection (Figure 17.A) Un signal positif est obtenu à partir du 2^{ème} cycle de sélection et augmente fortement au 3^{ème} cycle (décalage d'un log).

L'enchaînement des tours de sélection a ainsi conduit à l'enrichissement de la suspension de phages en clones liant la p38α. Ces clones sont bien spécifiques de l'isoforme α de p38 puisque le signal ELISA sur l'isoforme β est faible, voire nul (Figure 17.B). Les trois phases d'épuisement réalisées avant la sélection ont donc bien supprimé de la banque des clones liant la p38β, évitant ainsi l'enrichissement en clones cross réactifs des deux isoformes.

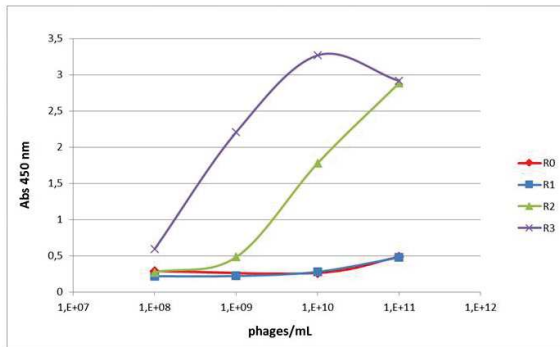
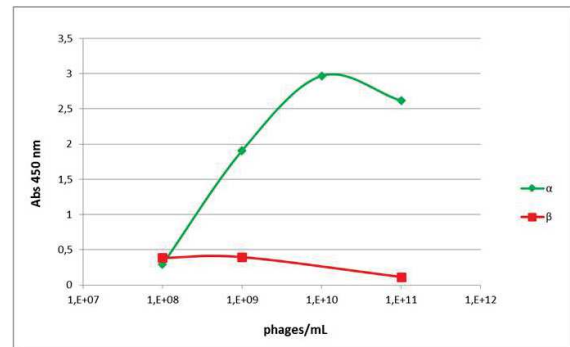
A**B**

Figure 17 : Enrichissement à partir de la banque naïve en phages spécifiques anti-p38α.

(A) Enrichissement de la banque de phages au cours de la sélection envers la p38α. Les phages obtenus à l'issue de chacun des 3 cycles de sélection ont été testés par ELISA contre leur antigène p38α. R0 est la librairie de phage initiale non sélectionnée et R_n le stock de phage obtenu après le n^{ième} cycle de sélection.

(B) Évaluation de la spécificité du pool de phages obtenu après le 3^{ème} cycle de sélection. Les phages obtenus à l'issue du 3^{ème} cycle de sélection ont été testés pour leur spécificité par ELISA sur chacun des antigènes ayant servi à l'épuisement et à la sélection de la banque.

La révélation des phages se fait par l'utilisation de l'Ac monoclonal anti-M13 conjugué HRP qui cible la protéine majoritaire du manteau du phage pVIII.

L'étape suivante consiste à identifier les clones monoclonaux spécifiques de p38α par criblage.

B. Criblage de clones scFv spécifiques de p38α

La souche non-suppressive HB2151 d'*E. coli* a été infectée avec les phages élués après le 3^{ème} tour de sélection contre la p38α. Cette souche reconnaît le codon Ambre TAG situé en 5' du gène pIII comme un codon Stop et permet une expression soluble des scFv dans le périplasma des bactéries et non plus présentés comme une protéine de fusion à la surface du phage. Après environ 16h d'incubation, une certaine proportion des fragments d'anticorps exprimés est retrouvée dans le milieu de culture (Rouet et al., 2012). Les niveaux d'expression dans les phagemides sont suffisamment élevés pour permettre un criblage direct des surnageants de culture.

Après induction de l'expression des scFv par l'ajout d'IPTG, un inducteur gratuit du promoteur au lactose, les surnageants de culture contenant les scFv sont utilisés pour tester la spécificité de liaison et la réactivité des clones sélectionnés par ELISA (Figure 18). Quarante-cinq clones bactériens sont criblés dans une plaque de microtitration pour leur capacité à lier la p38α et la p38β. Dix-neuf d'entre eux, soit 20% des clones testés, sont clairement positifs pour la p38α et donnent un fort signal

avec des valeurs d'absorbances supérieures à 1 (> 5 fois le bruit de fond). Aucun ne présente de réaction croisée envers la p38 β confirmant ainsi le profil obtenu avec le stock de phages à l'issue de la sélection (Figure 17B) et l'enrichissement spécifique de la banque en clones liant l'isoforme α .

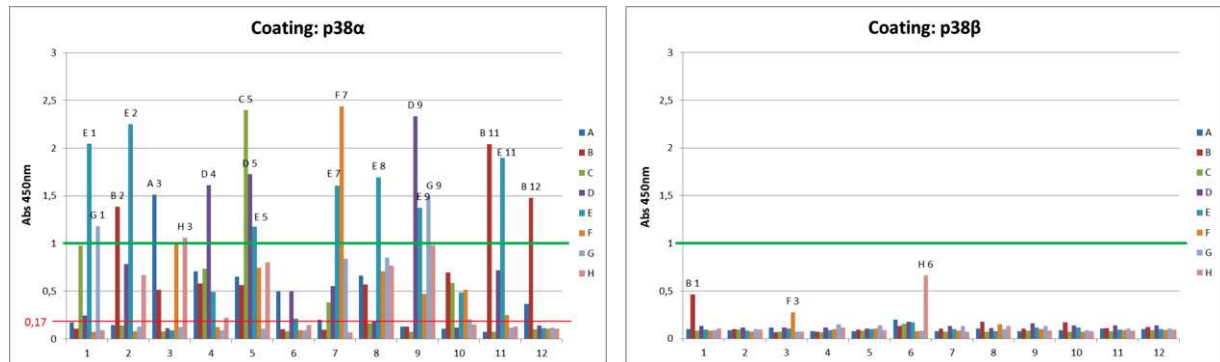


Figure 18 : Criblage des clones scFv en format soluble obtenus après 3 cycles de sélection contre la p38 α . Quarante-vingt-quinze clones de la sélection ont été testés par ELISA pour leur spécificité sur chacun des antigènes ayant servi à l'épuisement de la banque et à la sélection. La révélation des scFv se fait par l'utilisation de l'Ac monoclonal anti c-myc 9E10 conjugué HRP. Le cut-off choisi pour la sélection des clones positifs est placé à une valeur d'Abs de 1, soit environ 5 fois le bruit de fond (Abs = 0,17).

Les 19 clones ont ensuite été analysés afin de déterminer les séquences des CDR des chaînes lourdes (notés H1, H2 et H3) et des chaînes légères (notés L1, L2 et L3). Pour rappel, seules certaines positions au sein des CDR (selon la définition de Kabat) ont été considérées pour introduire la diversité de la banque HUSCI. Cela correspond à 3, 2, 3, 2 et 4 résidus dans les boucles L1, L2, L3, H1 et H2 respectivement. En plus des variations de séquence, une variation de la longueur de la boucle H3 a été introduite. La diversité introduite au niveau de ces positions est restreinte à 5 aa qui sont Tyr, Ser, Asn, Asp et Gly selon un pourcentage dégressif. D'autres mutations plus rares au niveau de ces sites peuvent également être observées.

Ainsi, après élimination des séquences « illisibles » en raison d'un mélange de clones, 5 séquences différentes de scFv ont été isolées (Figure 19B). Plusieurs clones présentent une séquence identique, résultat de l'enrichissement d'un même phage initial.

A

```

      5      10      15      20      25      30
1 M A E V Q L V E S G G S L V K P G S L R L S C A A S G F T
31 F S N Y S M N W V R Q A P G K G L E W I S S I S G S S R V I
      VH1                                VH2
61 V Y A D F V K G R F T I S R D N A T N S L Y L Q M N S L R A
91 E D T A V Y Y C V R S S I T I F G G G M D V W G R G T L V T
      VH3
121 V S S G G G G S G G G S G G G S Q S V L T Q P A S V S G
151 S P G Q S I T I S C A G T S S D V G G Y N Y V S W Y Q Q H P
      VL1
181 G K A P K L M I Y E D S K R P S G V S N R F S G S K S G N T
      VL2
211 A S L T I S G L Q A E D E A D Y Y C S S Y T T R S T R V F G
      VL3
241 G G T K L A V L G

```

B

scFv	Fréquence des clones	H1	H2	H3	FR1	L1	L2	L3
13R4		YS	S I S G S S R Y I Y	S I T I F G G	QSVLTQPASV...	Y N Y	E D S K	Y T T R
B2	3/19	YN	SIRGSSRYIY	SS---NG		GYN	NDSY	YTNY
B12	3/19	YY	GIYGSSRGIN	-----YY		GSG	SDSS	YTNY
D9	4/19	YY	GIYGSSRYIS	-----YY		GSG	SDSY	YTNN
E5	3/19	NS	SIRGSSRYIY	SN---DG	QSVLTQ L ASV...	GYS	NDSY	YTSY
G9	2/19	YS	YIGSSRYIY	SY---YG		YGG	YDSY	YTYS

Figure 19 : Fréquence des clones scFv anti-p38 α sélectionnés à l'issue du phage display.

(A) Séquence protéique du scFv 13R4 anti- β -galactosidase ayant servi à la construction de la banque HUSCI. Les séquences des CDR sont soulignées. Les positions surlignées en gris correspondent aux sites qui peuvent être mutés. Le linker reliant les domaines variables des chaînes lourdes et légères est représenté en jaune.

(B) Récapitulatif des mutations isolées des 5 séquences scFv anti-p38 α obtenues après séquençage. En rouge sont représentés les sites d'introduction des mutations sur la séquence du 13R4. Le clone E5 présente en plus des mutations situées dans les CDR une substitution dans le FR1 de sa chaîne légère (P7 \rightarrow L).

Le scFv E5 possède en plus des mutations présentes dans les CDR, une mutation ponctuelle dans le framework 1 de sa chaîne légère (Pro7 \rightarrow Leu). Cette substitution a été vraisemblablement introduite lors de la construction de la banque HUSCI. Bien qu'elle soit située en dehors des zones d'introduction définies pour la diversité, nous avons conservé ce clone pour la suite de la caractérisation car il est fonctionnel et spécifique de l'isoforme α comme le montre l'ELISA (Figure 18).

Les sélections réalisées en routine au sein de l'équipe mènent généralement à l'identification d'une dizaine à une vingtaine de clones spécifiques de la cible en sortie de phage display. La p38 α est une petite protéine de 41 kDa. L'isolation de 5 séquences n'est pas aberrant compte tenu de la taille de la p38 et des étapes de contre-sélection réalisées en amont du phage display, les isoformes α et β partageant près de 75% d'homologie de séquence. Parmi les 5 séquences isolées on peut distinguer 2 familles d'anticorps selon la longueur de la boucle CDR3 du VH : d'un côté les scFv B12 et D9, de l'autre

B2, E5 et G9. Afin de savoir si les scFv reconnaissent le même site antigénique ou des sites distincts sur la p38 α , nous avons envisagé de réaliser des tests de compétition de liaison à la p38 α par ELISA en sandwich. Ne disposant pas de constructions permettant la production de scFv fusionnés à des étiquettes différentes, nous avons reformaté les scFv au format scFv-Fc. Cependant, les anticorps obtenus sont pour la plupart inactifs, incapables de lier la p38 α . La présence de plusieurs sites de glycosylations dans leur CDR peut expliquer cette perte d'activité. Les scFv-Fc contrairement au format scFv sont produits en cellules eucaryotes. Les glycosylations au niveau de ces sites impliqués dans l'interaction avec l'antigène peuvent expliquer l'absence de liaison à l'antigène.

Les séquences des scFv B2, B12, D9, E5 et G9 sont ensuite clonées dans différents vecteurs d'expression bactériens pour permettre la production et la purification des fragments d'anticorps nécessaires à la poursuite de leur caractérisation.

C. Analyse de la spécificité des clones scFv sélectionnés à partir de productions purifiées

Les scFv ont dans un premier temps été produits à partir d'extraits cytoplasmiques de bactéries BL21(DE3) (Figure 20). Cependant, à l'exception des scFv B2 et G9, les scFv sont retrouvés en totalité dans la fraction insoluble et ne peuvent être purifiés. Les fragments d'anticorps ont donc par la suite été produits et purifiés à partir d'extraits périplasmiques.

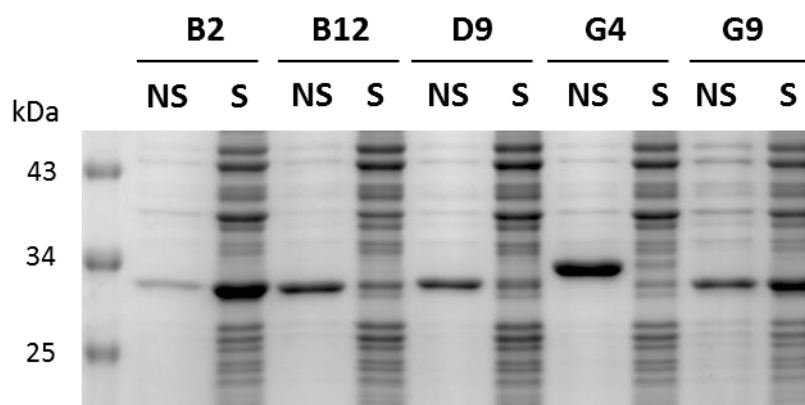


Figure 20 : Production cytoplasmique des scFv en bactéries BL21(DE3).

Les fractions solubles (S) et non solubles (NS) ont été analysées par SDS-PAGE et coloration du gel au bleu de Coomassie. Le scFv G4 est un fragment d'anticorps anti-p38 α issu d'une précédente sélection réalisée à partir de la banque HUSCI.

La spécificité de liaison des scFv est vérifiée *in vitro* par des tests ELISA et d'immunoprécipitation sur extraits cellulaires.

1. ELISA

Afin de s'assurer que les scFv B2, B12, D9, E5 et G9 purifiés reconnaissent de façon spécifique la protéine p38 α contre laquelle ils ont été sélectionnés, j'ai réalisé un ELISA indirect sur les p38 α et p38 β (Figure 21). Les 5 scFv reconnaissent et sont spécifiques de la p38 α , comme le montre l'absence de signal avec la p38 β même aux plus fortes concentrations de scFv. La réactivité de tous les clones témoigne du bon repliement des scFv une fois purifiés à partir des extraits périplasmiques. Dans ce test, parmi les 5 scFv, G9 possède une activité de liaison à la p38 α légèrement plus faible comme le montre l'intensité du signal obtenu à 450 nm (absorbance de 2 pour les plus fortes concentrations en scFv contre des valeurs de 2,3 à 2,7 pour les autres clones) et la concentration minimale donnant un signal positif (0,05 μ g/mL pour G9 contre 0,015 μ g/mL pour les autres clones). Ces valeurs obtenues en ELISA ne peuvent toutefois pas être directement corrélées à une affinité mais les 5 scFv montrent une bonne activité de liaison à l'antigène dans une gamme de concentration de l'ordre de 10 nM (0,3 μ g/mL).

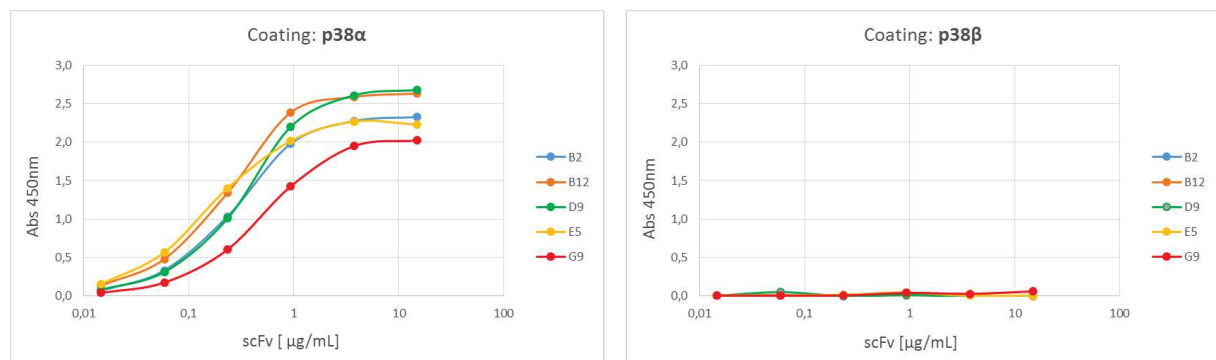


Figure 21 : Etude par ELISA de la spécificité des 5 scFv anti-p38 α purifiés. Les scFv produits en périplasme et purifiés ont été testés pour leur spécificité de liaison à la p38 α . La p38 β est utilisée comme contrôle négatif. La révélation des scFv se fait par l'utilisation de l'Ac monoclonal anti c-myc 9E10 conjugué HRP. Les antigènes p38 α et p38 β sont coâtés à 10 μ g/mL en PBS en plaque 96 puits.

2. Immunoprécipitation (IP)

Des immunoprécipitations sur extraits cellulaires des protéines endogènes en solution ont également été effectuées. Cette approche permet de s'assurer que les scFv se lient à la p38 α sous sa forme native. En effet, il est généralement admis que dans la méthode ELISA indirect, les protéines cibles adsorbées sur le support peuvent présenter des changements de conformation rendant certains épitopes plus ou moins accessibles. De plus, l'ensemble des protéines utilisées jusqu'alors étaient des protéines recombinantes produites avec un drapeau poly-Histidine chez *E. coli*, ce qui pourrait affecter la réactivité des clones.

Les résultats de l'immunoprécipitation (Figure 22) montrent que les 5 scFv reconnaissent la forme endogène de la protéine et sont spécifiques de la p38 α , ce qui confirme les résultats obtenus en ELISA. Le scFv E5 immunoprécipite faiblement la p38 α présente dans les extraits cellulaires contrairement à l'intensité du signal obtenu en ELISA avec ce clone. Cette différence d'affinité entre les résultats d'ELISA et d'IP peut s'expliquer par la densité antigénique entre la protéine coatée à une concentration élevée pour l'ELISA par rapport à sa concentration intracellulaire, et par les éventuels changements de conformation de la protéine en ELISA ou sa nature recombinante, comme évoqué précédemment.

Le scFv G9 immunoprécipite la p38 α moins efficacement que les scFv D9, B12 et B2, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus en ELISA.

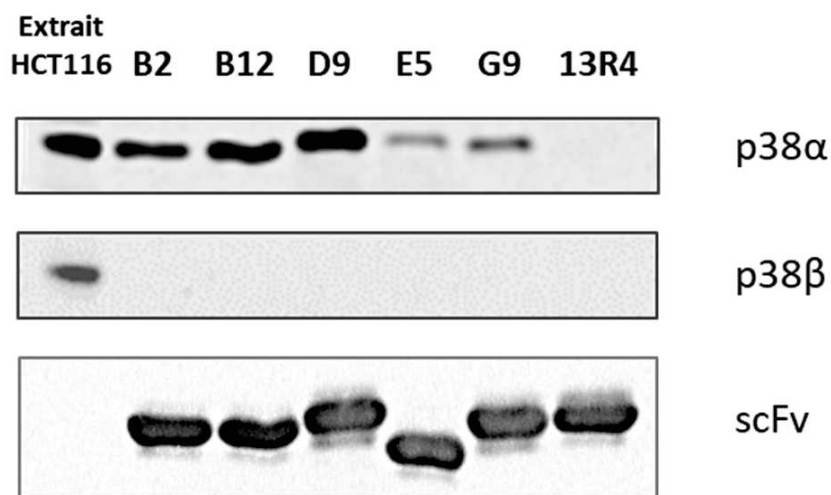


Figure 22 : Etude par immunoprécipitation sur extraits cellulaires de la spécificité des 5 scFv anti-p38 α purifiés. Analyse par Western-Blot des immunoprécipitations : de gauche à droite se trouvent un échantillon d'extrait cellulaire de la lignée HCT-116 à partir de laquelle ont été réalisées les immunoprécipitations et les IP des p38 par les scFv produits en périplasme et purifiés. Le 13R4 est un scFv anti- β -galactosidase servant de témoin négatif.

Les résultats obtenus à l'issue des ELISA et de l'immunoprécipitation confirment que les 5 scFv sélectionnés par phage display ciblent spécifiquement l'isoforme α de la p38. De plus, leur capacité à immunoprécipiter la p38 α endogène démontre qu'ils reconnaissent bien la protéine native et constitue un facteur prédictif de leur efficacité à lier la p38 α dans les cellules une fois exprimé en tant qu'intracorps.

II. Modulation de l'activité kinase de la p38 α par les scFv sélectionnés

La voie de signalisation dépendante des MAPK p38 passe par l'activation d'une cascade de phosphorylation de nombreux acteurs. La MAPK p38 α est principalement activée par la MAPK Kinase MKK6, capable d'activer les 4 isoformes de p38 (Keesler et al., 1998). Une fois phosphorylées, les p38 phosphorylent à leur tour différents substrats cellulaires tels que le facteur de transcription ATF2 (Activating Transcription Factor 2).

Nous avons donc recherché la capacité éventuelle des scFv sélectionnés à moduler l'activité catalytique de la p38 α à deux niveaux de la voie de signalisation, soit en empêchant sa phosphorylation par MKK6, soit en augmentant ou en inhibant son activité kinase.

A. Sélection de scFv modulateur de l'activité kinase de la p38 α *in vitro*

1. Phosphorylation de p38 par MKK6

Nous avons étudié si les scFv inhibent la phosphorylation de la p38 α par l'enzyme MKK6. La réaction de phosphorylation de la p38 α est réalisée *in vitro* par l'enzyme MKK6 constitutivement active (MKK6-EE) (Raingeaud et al., 1996) en présence d'ATP. L'analyse de la phosphorylation de la p38 α par Western-Blot montre que les 5 scFv sélectionnés inhibent l'activation de p38 α par MKK6 (Figure 23). La quantification du signal de phosphorylation montre que cette inhibition est > 50% pour les 5 scFv.

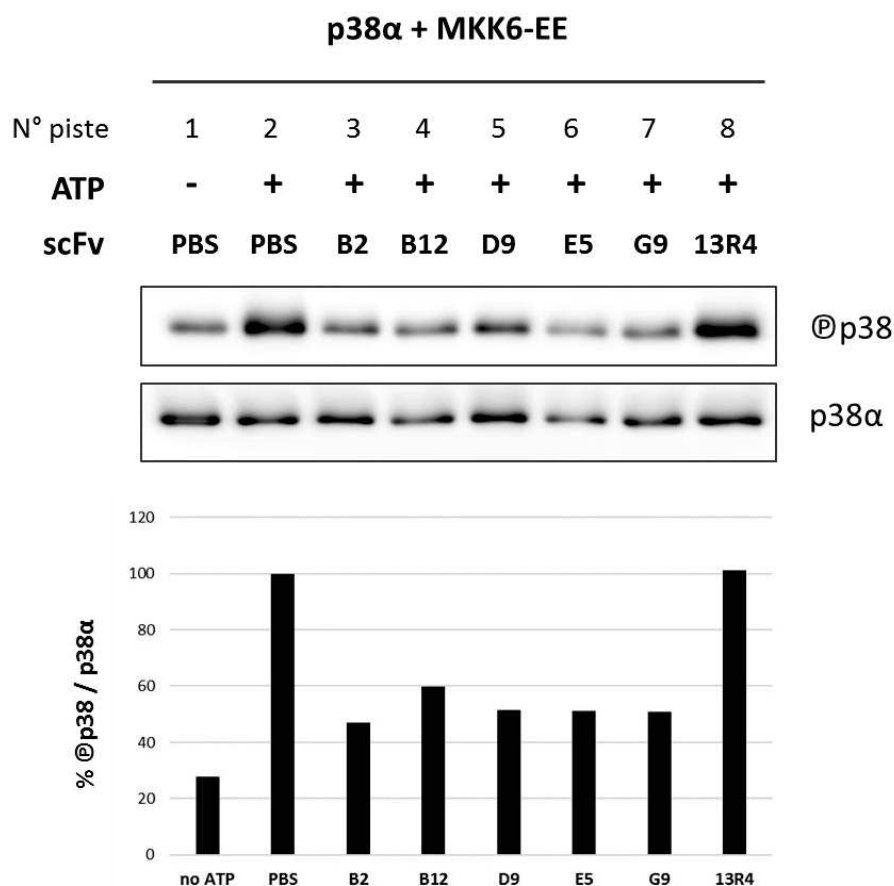


Figure 23 : Analyse par Western Blot de la phosphorylation de la p38 α par MKK6. La p38 α est phosphorylée *in vitro* par l'enzyme MKK6-EE constitutivement active en présence d'ATP. La piste 1 représente le niveau basal de phosphorylation de la p38 α . La phosphorylation est révélée par un anticorps anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) et est normalisée par rapport au signal de la p38 α .

2. Phosphorylation de substrats par p38

Afin d'évaluer la capacité des scFv à moduler spécifiquement l'activité kinase de la p38 α , un test de phosphorylation d'ATF2 a été réalisé en présence des différents scFv. Les 5 scFv B2, B12, D9, E5 et G9 sont testés, ainsi que le G4, autre scFv spécifique de la p38 α issu d'une précédente sélection par phage display. Pour ce test, les kinases p38 α et p38 β ont été préalablement activées *in vitro* par l'enzyme MKK6 et leur niveau de phosphorylation a été évalué par Western Blot. La phosphorylation du substrat ATF2 par la p38 α est fortement inhibée en présence du scFv G9 alors qu'il est sans effet sur la phosphorylation d'ATF2 par la p38 β (Figure 24.A). Le scFv G9 est donc un inhibiteur spécifique de l'activité kinase de la p38 α . La quantification du signal de phosphorylation d'ATF2 par Western-Blot (Figure 24.B) permet de mettre en évidence que G9 réduit de plus de 95% la phosphorylation d'ATF2 par la p38 α . Aucun des autres scFv testés n'altère la phosphorylation d'ATF2 par la p38 α ou par la p38 β .

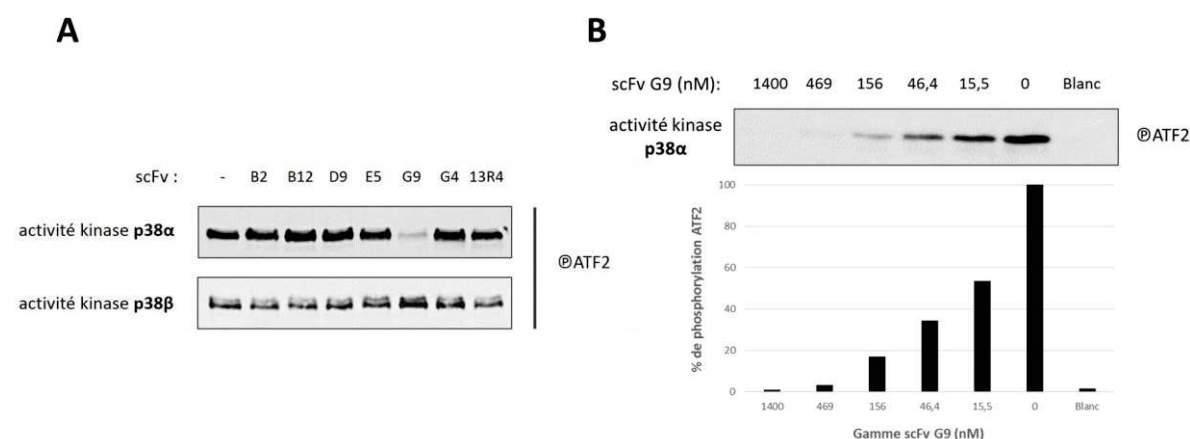


Figure 24 : Analyse par Western Blot de la phosphorylation d'ATF2.

Pour l'ensemble des réactions, les p38α et p38β ont été préalablement phosphorylées *in vitro* par MKK6.

(A) Activité kinase des p38α et p38β en présence des différents scFv. Le scFv G4 est un scFv spécifique de la p38α issu d'une précédente sélection par phage display. Le scFv 13R4 sert de témoin négatif.

(B) Activité kinase de la p38α en présence d'une gamme de concentrations du scFv G9. Pour chacune des conditions, la quantité totale de scFv est complétée avec le scFv 13R4 pour atteindre 1400 nM. Le blanc correspond à la réaction de phosphorylation d'ATF2 par MKK6 en l'absence de p38α.

L'activité inhibitrice du scFv G9 a été confirmée dans un second système mesurant l'activité kinase de la p38α par la quantification de l'ADP produit au cours de la réaction enzymatique (ADP-Glo™, Promega) (Figure 25). Le substrat utilisé est un peptide synthétique contenant des sites de phosphorylation pour les sérine/thréonine kinases mais qui ne possède pas de site de fixation aux MAPK p38. Pour ce test et pour la suite des expérimentations, des productions purifiées cytoplasmiques des scFv ont été utilisées.

La courbe d'inhibition de l'activité kinase de la p38α en présence de concentrations croissantes du scFv G9 a permis de déterminer une IC50 de 150 nM, qui est du même ordre de grandeur que celle des inhibiteurs chimiques ciblant la voie p38 (Figure 25.A). Le SB202190 est un inhibiteur de la classe des pyridinylimidazoles inhibant les isoformes p38α et β par un mécanisme de compétition avec l'ATP. Nous retrouvons avec ce test une valeur d'IC50 pour le SB202190 de 40 nM qui est comparable aux valeurs citées dans la littérature (IC50 de 50 nM) (Frantz et al., 1998). Les scFv B2 et 13R4 ont également été testés et n'inhibent pas l'activité kinase de la p38α. Aucun des 3 scFv n'inhibe l'activité kinase de la p38β.

Le scFv G9 et le composé SB202190 ont également été testés en combinaison (Figure 25.B). En présence de l'inhibiteur compétitif de l'ATP, nous observons une diminution par deux de l'IC50 du scFv G9. Les données des deux molécules seules ou associées ont été comparées en utilisant le modèle

d'indépendance de Bliss (Bliss, 1939). La courbe obtenue pour la combinaison des deux inhibiteurs correspond parfaitement au modèle d'indépendance de Bliss, suggérant que les deux molécules agissent par un mécanisme différent et indépendant sur l'activité de la p38 α . De plus, l'utilisation d'un peptide synthétique ne contenant que le site de phosphorylation pour les sérine/thréonine kinases, montre que l'inhibition ne passe pas par un blocage par le scFv G9 du « docking site » de la p38 α , permettant l'interaction de l'enzyme avec son substrat comme cela pourrait être le cas dans le test sur ATF2. Il n'est toutefois pas impossible que les deux mécanismes soient présents dans le cas d'un substrat complet et il faudra confirmer ce résultat en utilisant d'autres substrats des p38 (MK2, Hsp27).

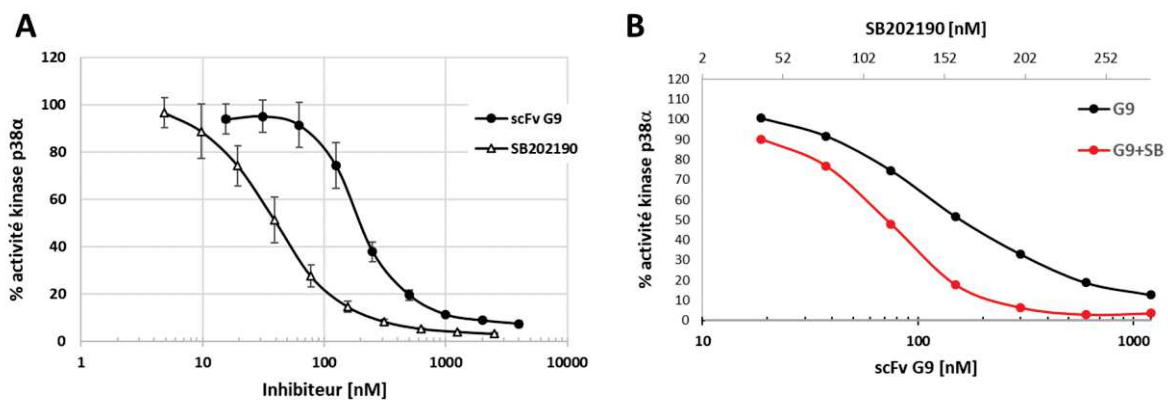


Figure 25 : Dose-réponse de l'inhibition de la p38 α réalisée à l'aide du système ADP-Glo™ (Promega).

Le substrat utilisé est un peptide synthétique (IPTTPITTTYFFFKKK) contenant des sites de phosphorylation des sérine/thréonine kinases.

(A) Mesures de l'activité kinase de la p38 α en présence de concentrations croissantes du scFv G9 ou de l'inhibiteur chimique de p38 SB202190. Les valeurs représentent la moyenne de 3 expérimentations indépendantes.

(B) Mesures de l'activité kinase de la p38 α en présence de concentrations croissantes du scFv G9 et de l'association scFv G9 + SB202190.

L'ensemble de ces résultats montre que des fragments d'anticorps peuvent être utilisés pour la sélection d'inhibiteurs spécifiques de l'isoforme α de la p38. Les 5 scFv issus de la sélection par phage display inhibent l'activation de la p38 α par les kinases en amont. Ils agissent probablement par un mécanisme d'inhibition stérique en empêchant l'accès de l'enzyme MKK6 au niveau de son site d'interaction du « docking domain » de la p38 α tout en permettant la liaison avec le substrat ATF2 et l'ATP. Afin de confirmer cette hypothèse nous envisageons de réaliser des essais de « pull-down » de l'enzyme MKK6, en présence ou non des différents scFv, en précipitant la p38 α par son tag 6His.

Le scFv G9 possède un mécanisme d'inhibition différent : il agit à deux niveaux de la cascade d'activation de la MAPK p38 α et présente par conséquent un intérêt majeur. En effet, les voies de régulation des p38 présentent de nombreuses interactions avec d'autres voies de signalisation cellulaires. L'activation par phosphorylation des résidus Thr180 et Tyr182 de la boucle d'activation par les MAP2K MKK3, MKK4 et MKK6 constitue la voie canonique d'activation de la p38 α mais n'est pas la seule voie d'activation. Une inhibition de l'activité catalytique de la p38 α au niveau de la kinase elle-même présente un avantage supplémentaire pour obtenir une inhibition de la voie. De plus, contrairement aux inhibiteurs actuels ciblant la p38 α , ce scFv ne bloque pas la liaison à l'ATP et ne reconnaît et ne perturbe pas l'activité enzymatique de la p38 β . Il représente donc une nouvelle classe d'inhibiteur de p38 α , fonctionnant par un mécanisme différent des inhibiteurs actuels.

Nous avons donc décidé de concentrer nos efforts sur la caractérisation de l'activité inhibitrice du scFv G9.

B. Détermination du mécanisme d'inhibition du scFv G9

Les inhibiteurs de p38 disponibles aujourd'hui bloquent l'activité kinase de la protéine en ciblant le domaine kinase fortement conservé dans la famille des MAPK. Ils se lient de manière compétitive sur les sites de liaison de l'ATP (inhibiteurs de type I, ex : SB202190), ou bien sur les sites de liaison de l'ATP et les poches hydrophobes adjacentes (inhibiteurs de type II, ex : BIRB796). Très peu d'inhibiteurs de type III, non compétitif de l'ATP, ont été développés jusqu'à présent.

Afin de déterminer le mode de liaison du scFv G9 à la p38 α et d'établir le mécanisme moléculaire à l'origine de son activité inhibitrice, deux tests de compétition, l'un basé sur un signal de fluorescence, l'autre sur l'activité enzymatique, ont été réalisés.

1. Test de compétition pour la liaison au site ATP

L'inhibiteur de kinase SKF86002 est un petit imidazole bicyclique qui a pour propriété d'émettre un fort signal de fluorescence une fois lié dans la poche ATP des protéines kinases dont la p38 α (Pargellis et al., 2002). Il est utilisé en tant que rapporteur de fluorescence pour le screening d'inhibiteurs de kinase compétitifs de l'ATP (Parker et al., 2014). Nous avons réalisé l'expérience de la façon suivante : la p38 α est d'abord "chargée" en SKF86002, puis les scFv ou le SB202190 sont ajoutés à la réaction. La fluorescence est mesurée au cours du temps afin d'observer de façon cinétique un

éventuel déplacement du composé SKF86002 de la poche ATP. Une diminution de l'intensité de fluorescence à la longueur d'onde d'émission du SKF ($\lambda_{\text{émission}}$ 420 nm) indique que le composé testé entre en compétition avec le SKF86002 et est un compétiteur du site de liaison à l'ATP de la kinase. Les cinétiques de fluorescence sont présentées dans la Figure 26.

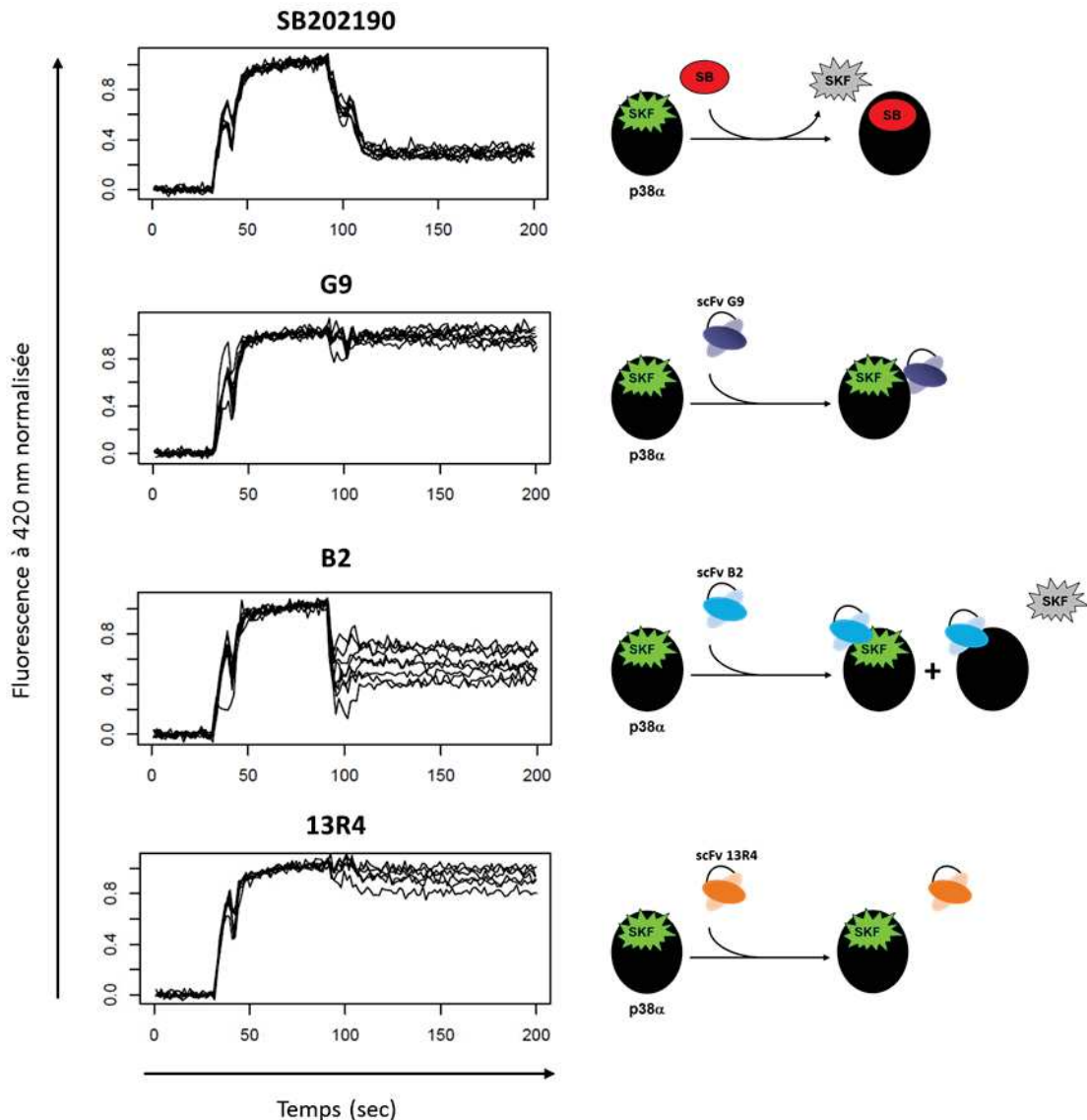


Figure 26 : Compétition de liaison entre le SKF86002 et les scFv G9 et B2 à la MAPK p38 α .

De 0 à 30 sec : intensité de fluorescence de la p38 α seule. A 30 sec : injection du composé SKF86002 et apparition du signal de fluorescence. A 90 sec : injection des différents composés testés. La diminution du signal de fluorescence à 420 nm correspond à un déplacement du composé SKF86002 du site de liaison à l'ATP de la p38 α . Les concentrations utilisées sont : p38 α 200 nM; SKF86002 200 nM; SB202190 2 μ M; scFv 1 μ M. Le 13R4 sert de témoin négatif. Pour chaque composé testé, 8 mesures ont été effectuées. La longueur d'onde d'excitation : 340 nm ; longueur d'onde d'émission : 420 nm.

Contrairement à l'inhibiteur pharmacologique de type I SB202190, la liaison du scFv G9 à la p38 α n'entraîne pas de diminution du signal de fluorescence (moins de 1% vs 70% pour le SB202190). Il agit donc comme un ligand non compétitif de l'ATP, se liant sur un site distinct de celui des inhibiteurs ciblant le domaine kinase, ce qui confirme les résultats obtenus en ADP-Glo™.

Le scFv B2 entraîne quant à lui une diminution de 44% du signal de fluorescence et est donc un agoniste partiel pour la fixation de l'ATP. La liaison du scFv à la p38 α pourrait ainsi modifier la conformation du site ATP entraînant alors une atténuation de la fluorescence du SKF86002 qui est dépendante des interactions du composé avec son microenvironnement et/ou un changement d'affinité pour le composé. Ce résultat peut sembler surprenant compte tenu du fait que le scFv B2 n'entraîne pas de modification de l'activité kinase de la p38 α . Cependant, il faut tenir compte des conditions expérimentales propres à chaque test : les tests d'activité enzymatique (ADP-Glo™ et phosphorylation d'ATF-2) ont été réalisés en présence de très fortes concentrations d'ATP (150 à 200 μ M), alors que le test de déplacement du SKF86002, analogue de l'ATP, a été réalisé avec une concentration du composé environ 1000 fois moindre (200 nM). Il semble donc vraisemblable que l'activité agoniste du B2 n'est visible qu'à des faibles concentrations en ATP. La concentration en ATP dans la cellule étant extrêmement élevée (1-10 mM), l'effet du B2 sur la fixation de l'ATP ne devrait pas être présent dans l'environnement intracellulaire de la p38 α endogène.

Des résultats similaires ont été obtenus quel que soit l'état de phosphorylation de la p38 α utilisée.

2. Test de compétition par mesure de l'activité enzymatique

Pour caractériser davantage le mécanisme d'inhibition du scFv G9, l'activité kinase de la p38 α a été mesurée dans des tests de compétition en présence de quantités croissantes du substrat ATP pour différentes concentrations du G9. L'activité catalytique de l'enzyme est mesurée grâce au kit ADP-Glo™ (Promega). La représentation du signal de luminescence obtenu après 30 minutes de réaction pour chacune des concentrations de l'inhibiteur en fonction de la concentration en substrat ATP (représentation de Lineweaver-Burke) nous permet de déterminer le K_m (constante de Michaelis) en l'absence d'inhibiteur et le K_m apparent (K_{mapp}) pour chacune des concentrations du G9 (Figure 27.A). La constante de Michaelis correspond à la concentration en substrat à laquelle la vitesse de la réaction enzymatique est à la moitié de sa valeur maximale. En présence de concentrations croissantes de G9 on observe une augmentation du K_m apparent (intersection des droites avec l'axe des abscisses) et aucun effet sur la vitesse maximale (intersection des droites avec l'axe des ordonnées).

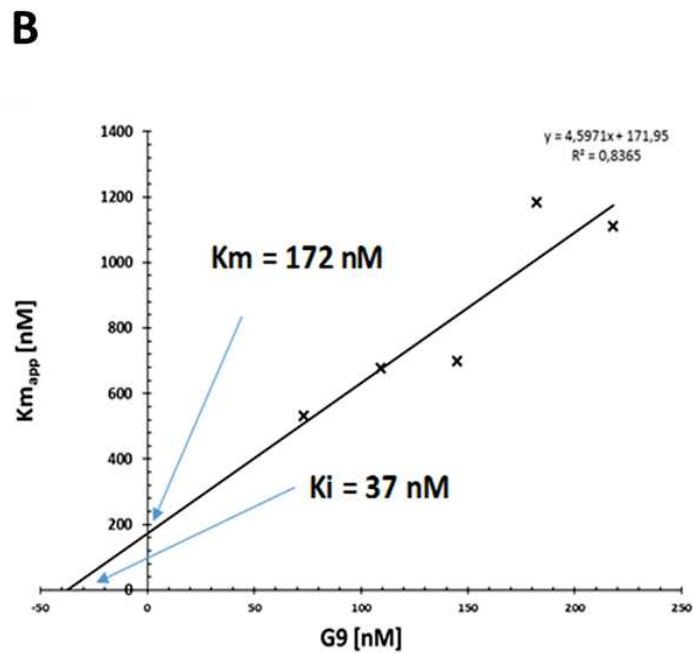
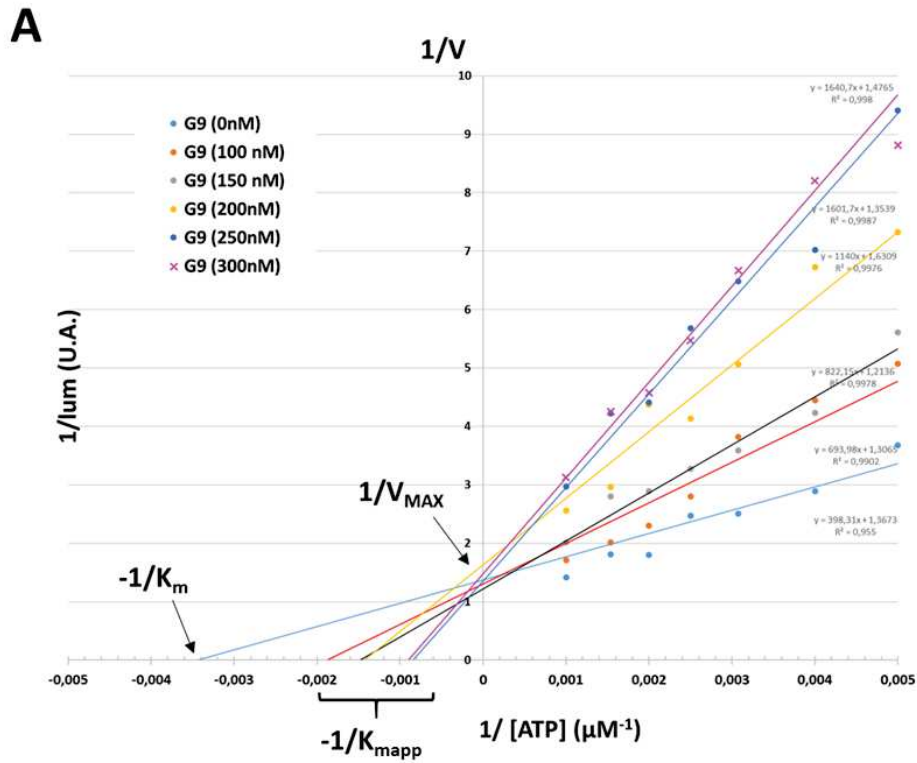


Figure 27 : Mesure de l'activité enzymatique de la p38 α en présence de concentrations croissantes d'inhibiteurs.

(A) Représentation de Lineweaver-Burk de la compétition du scFv G9 avec l'ATP pour l'activité kinase de la p38 α . L'activité enzymatique de la p38 α est déterminée en l'absence d'inhibiteur ou en présence de G9 (100, 150, 200, 250, et 300 nM) à différentes concentrations d'ATP. Ces courbes ont permis de déterminer le K_m en l'absence de G9 et le K_m apparent (K_{mapp}) pour chaque concentration de G9.

(B) Mesure de la constante d'inhibition K_i du scFv G9.

Ce profil enzymatique est caractéristique des inhibiteurs compétitifs et indique que le scFv G9 est un inhibiteur compétitif de l'ATP pour l'activité kinase de la p38 α . Le calcul de sa constante d'inhibition ($K_i = 37$ nM) révèle qu'elle est du même ordre de grandeur que celle des inhibiteurs chimiques de p38 (Figure 27.B). Le SB203580 est un inhibiteur de la même classe des pyridinyl imidazole que le SB202190 et possède un K_i de 21 nM (Young et al., 1997). Un autre composé, le PH-797804, inhibiteur de troisième génération qui présente un meilleur profil de sélection pour les MAPK p38 possède un K_i de 5,8 nM pour la p38 α (Xing et al., 2009). Le BIRB-796, inhibiteur de type II a un K_i de 0,1 – 22 nM selon les études pour la p38 α (<http://www.bindingdb.org> entrée 1KV2).

L'ensemble de ces résultats indique que le scFv G9, bien qu'il n'empêche pas la fixation de l'ATP, est un inhibiteur compétitif de l'hydrolyse de l'ATP. De plus, il possède une affinité à la p38 α du même ordre de grandeur que celles des inhibiteurs chimiques. Le mécanisme moléculaire à l'origine de cette inhibition est certainement dû à un effet allostérique. La liaison du scFv G9 à la p38 α entraîne une modification conformationnelle de la kinase qui n'empêche pas l'ATP de se lier au domaine kinase mais qui empêche son hydrolyse. Le scFv G9 agit par un mécanisme d'inhibition différent de celui des inhibiteurs chimiques connus actuels et se présente comme un inhibiteur compétitif non conventionnel.

III. Caractérisation du scFv G9 *in vitro*

A. Mesure des constantes d'affinité du scFv G9 par Résonance Plasmonique de Surface (SPR)

L'analyse de la spécificité du scFv G9 par ELISA envers les 4 isoformes de p38 et envers les formes actives et inactives de la p38 α nous a permis de constater que le scFv G9 reconnaît la p38 α que celle-ci soit phosphorylée ou non et que les productions cytoplasmiques de scFv étaient fonctionnelles (Figure 28). L'étude de l'affinité du scFv pour chacune des conformations de la p38 α a été réalisée par SPR.

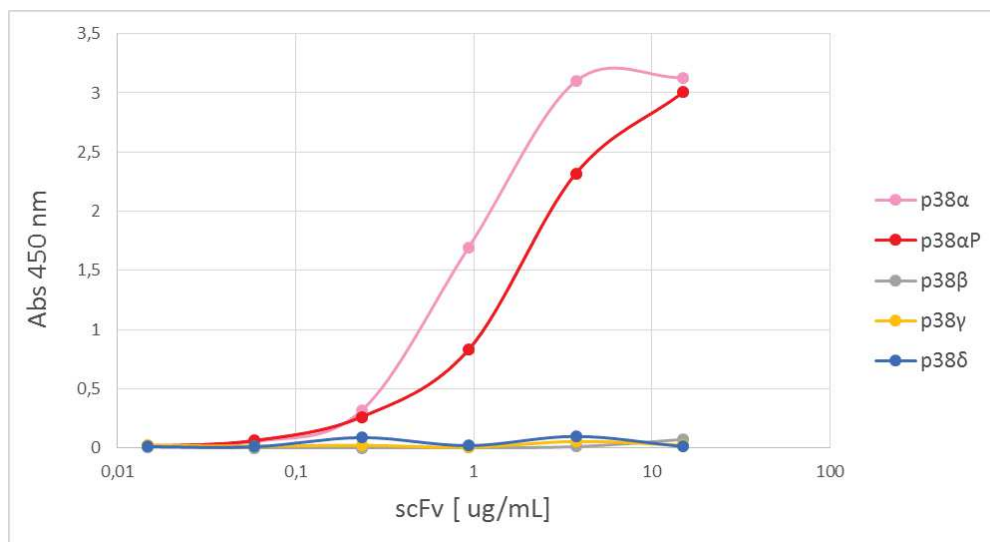


Figure 28 : Etude par ELISA de la spécificité du scFv G9. Le scFv G9 produit en cytoplasme de bactéries BL21(DE3) et purifié est testé pour sa spécificité de liaison à l'isoforme p38 α . La forme phosphorylée de la p38 α (p38 α P) est produite chez *E. coli* après cotransformation de la souche BL21(DE3) avec les constructions codantes pour la p38 α et la forme constitutivement active de la MAP2K MKK6-EE. L'activation de la p38 α produite et purifiée a été vérifiée par Western-Blot et le niveau de phosphorylation estimé à 100%. La révélation du scFv G9 se fait par l'utilisation de l'Ac monoclonal anti c-myc 9E10 conjugué HRP. Les différents antigènes sont coatés à 10 µg/mL en PBS en plaque 96 puits.

La résonance plasmonique de surface est une technique optique qui permet la détection et le suivi d'interactions moléculaires en temps réel et sans aucun marquage. Une des molécules (le ligand) est immobilisée ou capturée sur une biopuce (*sensor chip*) tandis que l'autre espèce (l'analyte) est injectée dans un flux continu de tampon à la surface de la puce au moyen d'un système de microfluidique. Cette technique permet la détection des variations de masse à la surface de la biopuce dues à la formation et à la dissociation des complexes moléculaires. L'enregistrement du signal SPR en fonction du temps (sensorgramme) pour différentes concentrations d'analyte permet de déterminer les constantes de vitesse d'association (k_a) et de dissociation (k_d) et d'en déduire les constantes d'association et de dissociation à l'équilibre K_A et K_D (Figure 29). D'autres paramètres tels que la stœchiométrie d'une interaction peuvent également être étudiés.

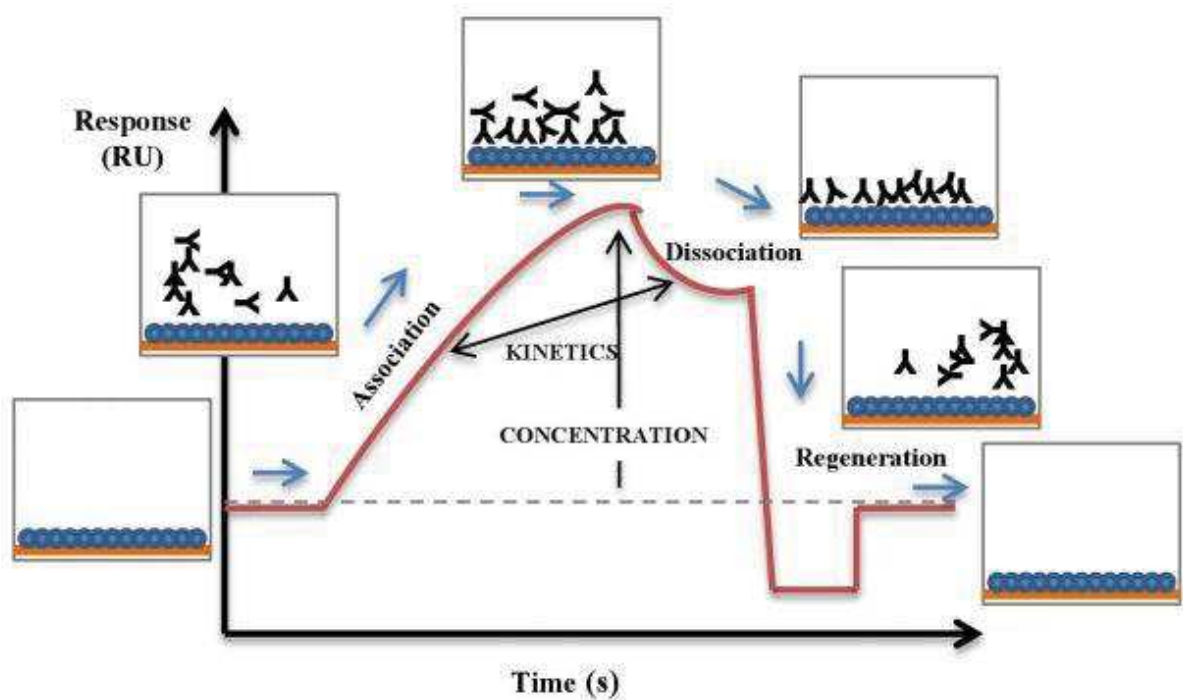


Figure 29 : Sensorgramme schématisant les différentes étapes de l'interaction entre un ligand et un analyte. La ligne de base correspond au débit du tampon. Lorsque l'analyte est injecté et qu'il y a interaction, la formation du complexe est suivie par l'augmentation du signal de résonance exprimé en RU (Resonance Unit, 1 RU = changement de densité de surface de $1\text{pg}/\text{mm}^2$). A la fin de l'injection, le signal de résonance diminue indiquant la dissociation du complexe. A la fin du cycle, le ligand immobilisé sur la puce peut être régénéré et le signal retourne à la ligne de base (Trabucchi et al., 2013).

Pour l'étude de l'interaction entre le scFv G9 et les protéines p38 α et p38 α P (p38 α Phosphorylée), nous avons procédé à une immobilisation indirecte du scFv G9 sur la puce en capturant dans un premier temps l'anticorps monoclonal c-Myc 9E10. Cet anticorps de capture permet d'immobiliser le scFv via son étiquette c-Myc.

Le scFv G9, injecté à une concentration de 50 nM, est dans un premier temps capturé à un niveau de 400 RU sur l'anticorps anti-c-Myc 9E10 immobilisé par couplage covalent sur une puce CM5 à un niveau de 7540 RU. Les p38 α et p38 α P sont ensuite injectées à différentes concentrations (1,6 à 200 nM) sur le scFv G9 immobilisé. Les sensorgrammes obtenus pour chacune des protéines sont représentés dans la Figure 30.

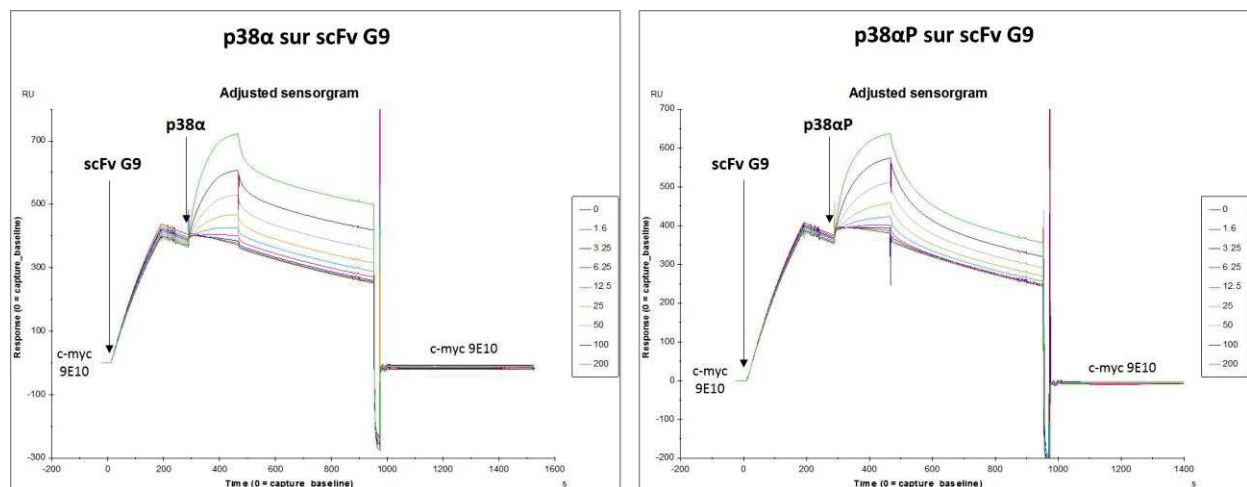


Figure 30 : Sensorgramme des association/dissociation de p38 α ou p38 α P au scFv G9. Le scFv G9 (50 nM) est présenté par l'anticorps monoclonal c-myc 9E10 immobilisé à 7540 RU (ligne de base). Le scFv G9 est capturé à 400 RU pour chacune des cinétiques. Les p38 α ou p38 α P sont injectées de 1,6 à 200 nM. Chacun des sensorgrammes est corrigé en soustrayant le signal du canal contrôle où aucune protéine n'a été immobilisée (pas d'anticorps c-myc 9E10).

Après soustraction de la pente correspondante à la dissociation longue du scFv G9 on obtient les cinétiques représentées sur la Figure 31 pour la p38 α et la p38 α P. Les cinétiques pour les deux protéines sont difficilement ajustables à un modèle de type « hétérogène » pour le calcul des constantes de vitesse d'association et de dissociation. Le calcul des constantes d'affinité en « steady state » permet de simplifier la comparaison et de déterminer une constante de dissociation à l'équilibre K_D quasi identique : $K_D = 75 \pm 6,9$ nM pour la p38 α et $K_D = 79,8 \pm 2,9$ nM pour la p38 α P. Le scFv G9 lie donc la p38 α et la forme phosphorylée avec des affinités comparables. Néanmoins lorsque l'on compare les profils des cinétiques, les deux protéines ne se comportent pas tout à fait de la même manière : (i) la p38 α s'associe plus que la forme phosphorylée au scFv G9 (390 RU pour p38 α contre 280 RU pour p38 α P à la plus forte concentration) et (ii) cette différence de niveau d'association

est due à une vitesse de dissociation plus lente dans le cas de p38 α comme le montre la comparaison des profils de dissociation obtenus à 200 nM (Figure 32).

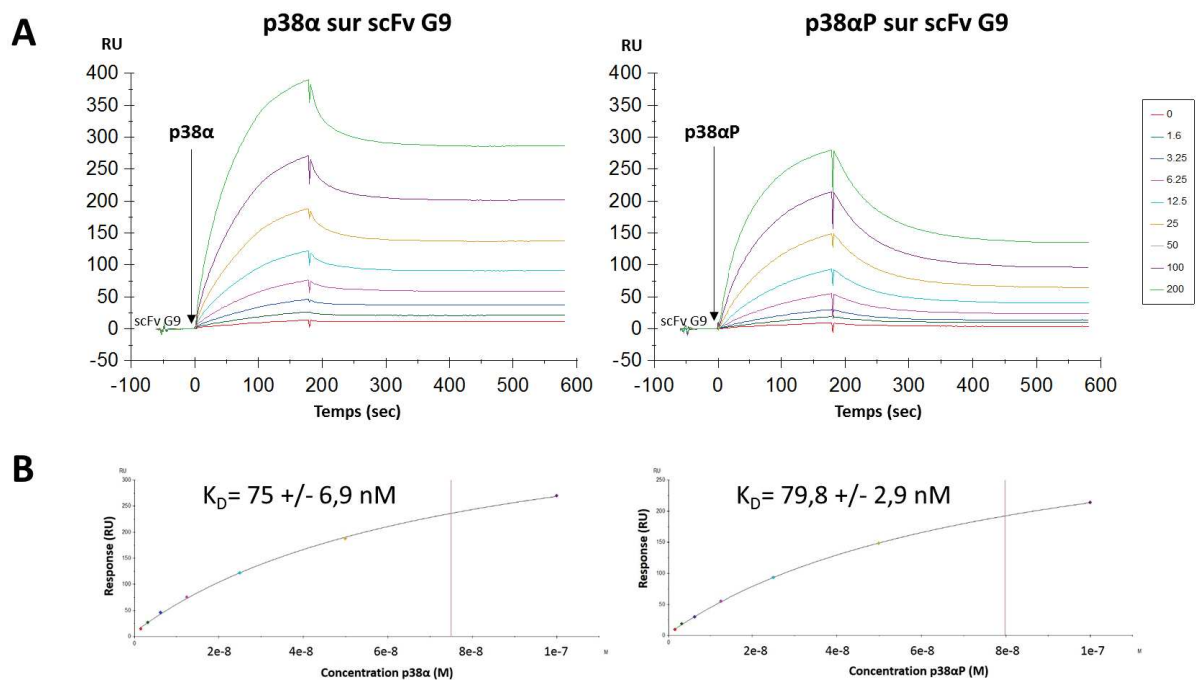


Figure 31 : Détermination des constantes d'affinité du scFv G9 pour la p38 α et la p38 α P.

(A) Cinétiques d'association/dissociation de p38 α et p38 α P (1,6 à 200 nM) sur le scFv G9 (50 nM) après soustraction de la pente de dissociation longue du scFv G9. Le scFv G9 est capturé à 400 RU pour chacune des cinétiques (ligne de base). Chacun des sensorgrammes est corrigé en soustrayant le signal du canal contrôle où aucune protéine n'a été immobilisée (pas d'anticorps c-myc 9E10).

(B) Détermination de la constante de dissociation K_D à l'équilibre pour les p38 α et p38 α P par représentation de type « steady state ».

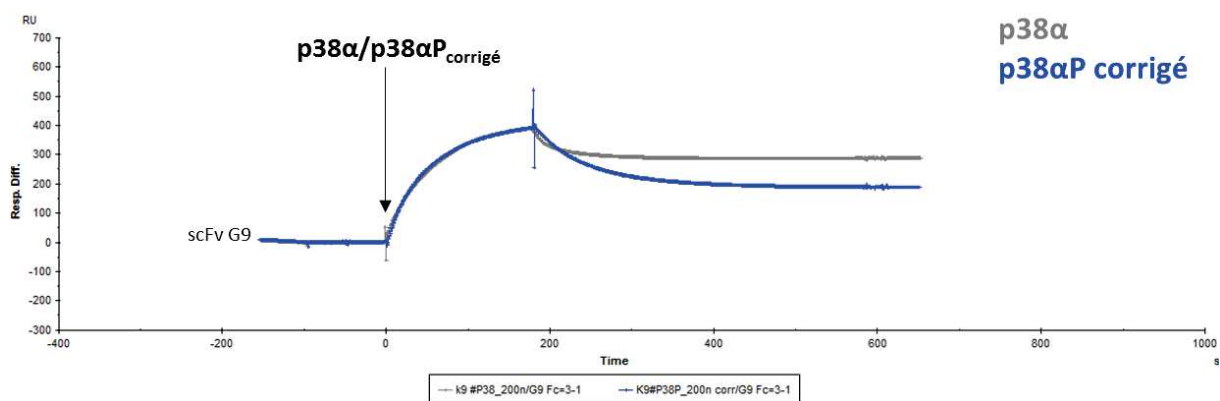


Figure 32 : Comparaison des cinétiques d'association/dissociation à 200nM de p38 α et p38 α P normalisées au même niveau de liaison pour visual des dissociations de chacune des protéines au scFv G9.

Les fits hétérogènes peuvent s'expliquer par la présence d'un mélange de formes phosphorylée et non phosphorylée dans chacune des préparations de p38 α . Ces protéines ont été produites en bactérie *E. coli* et purifiées par chromatographie d'affinité sur résine Cobalt. Leur analyse par chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse montre la présence de plusieurs états de phosphorylation pour chacune des deux protéines, l'addition d'un groupement phosphate sur une protéine se caractérisant par un décalage de 80 Da (ou uma, unité de masse atomique) sur le spectre (Figure 33). La préparation p38 α est composée majoritairement de forme non phosphorylée mais comprend également une fraction moins importante de formes mono et bi-phosphorylées de la p38 α . La production de p38 α phosphorylée présente quant à elle 4 pics majoritaires correspondant à différents états de phosphorylation. En effet, en plus de ces résidus Thr₁₈₀ et Tyr₁₈₂, la p38 α présente de nombreux résidus Thr, Tyr et Ser qui peuvent être phosphorylés et dont certains ont une implication dans la signalisation de p38 (Zou and Blank, 2017). Notons qu'une différence significative dans les masses minimales obtenues pour chaque protéine p38 α et p38 α P (43 900 uma vs 44 300 uma respectivement) rend complexe l'interprétation des profils massiques, la masse moléculaire attendue, calculée à partir de la séquence de la p38 α avec une étiquette 6His étant de 44 042,28 Da. De plus, des modifications post-traductionnelles autres que les phosphorylations peuvent être également présentes dans ces protéines.

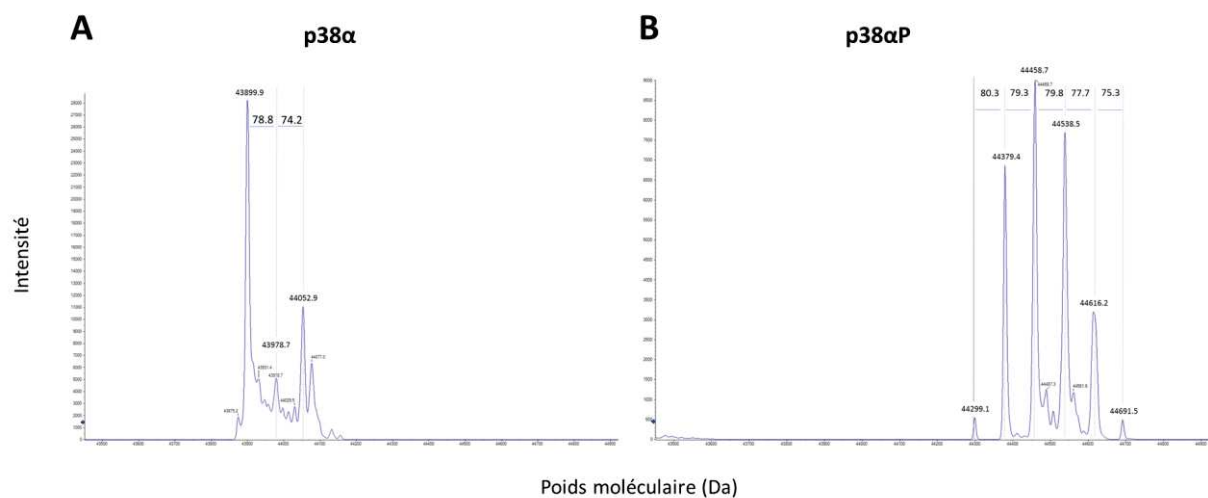


Figure 33 : Masse moléculaire des p38 α et p38 α P recombinantes produites chez *E. coli* BL21(DE3). Dix μ g de chacune des préparations de p38 obtenues après chromatographie d'affinité sur résine Cobalt sont analysés par LC-MS. Un delta de masse de 80 uma correspond à la présence d'un groupement phosphate.

(A) Spectre de masse de la p38 α . Le pic majoritaire à 43899,9 Da correspond à la p38 α non phosphorylée. Les pics à 43978,7 et 44052,9 Da correspondent à des formes mono et bi-phosphorylées de la p38 α .

(B) Spectre de masse de la p38 α P. Le spectre permet de mettre en évidence au moins 4 sites de phosphorylation.

B. Détermination de l'épitope de p38 α reconnu par le scFv G9

Le scFv G9 est un inhibiteur spécifique de l'activité kinase de la p38 α . Contrairement aux inhibiteurs actuels ciblant la p38 α , ce scFv ne reconnaît pas et ne perturbe pas l'activité enzymatique de la p38 β *in vitro*. Il possède un site de liaison ainsi qu'un mode d'inhibition distincts des inhibiteurs chimiques classiques ciblant la voie des MAPK p38 jusqu'à présent décrits. La détermination de l'épitope d'interaction du scFv G9 sur la p38 α représente donc un intérêt majeur pour induire une inhibition spécifique de la voie de signalisation de la p38 α dans les cellules.

1. Epitope linéaire ou conformationnel ?

L'épitope, ou déterminant antigénique, est la portion de l'antigène à laquelle vient se fixer l'anticorps *via* ses CDR. L'épitope peut être soit linéaire, faisant intervenir une séquence d'environ 4 à 8 acides aminés successifs de la séquence primaire de la protéine, ou conformationnel, impliquant alors des résidus distants dans la séquence de l'antigène mais rapprochés par le repliement tridimensionnel de la protéine.

Afin de définir si les scFv G9 et B2 reconnaissent un épitope linéaire ou conformationnel de la protéine p38 α , l'anticorps a été testé par Western-Blot sur une « membrane spot » (Frank, 2002). Il s'agit d'une membrane de cellulose sur laquelle la séquence protéique de la p38 α a été synthétisée sous la forme de peptides. Chaque peptide, d'une taille de 15 aa, constitue un « spot ». La séquence de la p38 α pour chaque spot est chevauchante de 10 aa avec la séquence du spot suivant. Ainsi, les peptides chevauchants couvrent l'ensemble de la séquence de la p38 α . L'hybridation de la membrane avec un scFv et l'immunodétection des spots d'interaction, grâce à un anticorps secondaire dirigé contre l'un de ses tags, comme en Western-Blot classique, permet d'identifier les peptides de p38 α liés par le scFv. En remontant à la séquence correspondant à chaque spot, on peut ainsi déterminer le domaine d'interaction du scFv à la protéine. La révélation de plusieurs spots consécutifs indique que l'épitope est linéaire et la détection de spots distants sur la membrane indique que l'épitope peut être conformationnel après comparaison avec la structure 3D de la protéine.

Cette approche ne nous a pas permis d'identifier de signal spécifique sur la p38 α pour les scFv G9 et B2 testés. Les deux anticorps ne permettent également pas la détection par Western Blot de la p38 α entière dénaturée, qu'il s'agisse de la protéine recombinante purifiée ou à partir d'extrait cellulaire. Ces données suggèrent ainsi que les scFv G9 et B2 reconnaissent tous deux un épitope

conformationnel de la p38 α . Ce résultat est conforme à nos attentes car beaucoup d'anticorps précédemment sélectionnés à partir de la banque HUSCI sont également conformationnels.

2. Couplage chimique et analyse par Spectrométrie de masse (XL-MS)

Des techniques résolutive permettent d'identifier l'épitope d'un anticorps telles que la cristallographie des complexes antigène-anticorps ou la génération de mutants par mutagenèse dirigée de résidus au niveau du domaine d'interaction de l'antigène. Cependant ces techniques sont très lourdes à mettre en œuvre. La génération de cristaux est un processus qui peut s'avérer très long voire impossible à réaliser pour certains complexes protéiques. Des cristaux ont déjà été obtenus à partir de scFv issus de la banque HUSCI (Robin et al., 2014). Cependant, les scFv G9 et B2, bien qu'étant solubles lorsqu'ils sont produits dans le cytoplasme de bactéries, agrègent à des concentrations élevées, ce qui constitue un facteur limitant. Une alternative serait alors de reformater les scFv en format Fab.

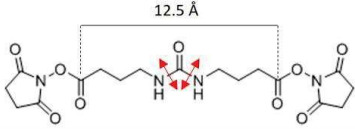
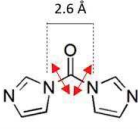
Pour déterminer la zone d'interaction du scFv G9 sur la p38 α , nous avons utilisé des agents de couplage chimiques clivables. Cette approche consiste à créer un pontage covalent entre deux protéines et à étudier les zones d'interaction par spectrométrie de masse en tandem (MS-MS). Cette technique est également utilisée pour l'étude de conformations protéiques.

Il existe un grand nombre d'agents de couplage de spécificités réactionnelles et de longueurs différentes. Lors d'une réaction de « cross-link », l'agent de couplage réagit avec les groupements fonctionnels de chaînes latérales de deux aa qu'il lie de manière covalente. Les positions des aa couplés dépendent de la longueur de l'agent de couplage qui crée des contraintes de distance entre les aa liés, permettant de déduire des informations structurales tridimensionnelles des protéines étudiées.

Afin d'identifier les sites de contact entre le scFv G9 et la p38 α , nous utilisons deux agents de couplage clivables par spectrométrie de masse dérivés de l'urée : le BuUrBU et le CDI. Ces deux composés possèdent des réactivités ainsi que des longueurs différentes. L'utilisation de ces deux linkers permettra de générer des informations complémentaires pour l'identification de la zone d'interaction du G9 sur la p38 α . Les caractéristiques de chacun des linkers utilisés sont résumées dans le Tableau 2.

Nous avons dans un premier temps évalué par biochimie la formation de complexes entre les deux partenaires p38 α et scFv G9 en présence des différents agents de couplage.

Tableau 2 : Formule chimique et caractéristiques principales des agents de couplage utilisés. Les sites de clivage lors de la fragmentation dans la cellule de collision de la MS2 sont indiqués par des flèches rouges.

	BuUrBu ou DSBU (disuccinimidyl dibutyric urea)	CDI (1,1'-carbonyldiimidazole)
Structure chimique		
Réactivité	Amine (Lys, extrémité N-terminale)	Amine (Lys, extrémité N-terminale) et groupes hydroxyles (Ser, Thr, Tyr)
Distance Cα-Cα maximale de couplage	27 Å	16 Å

a. Réaction de couplage avec le CDI

Le CDI est un agent de couplage avec une longueur d'espaceur pratiquement nulle (2,6 Å correspondant à une unité carbonyle). L'utilisation de cet agent permet d'obtenir des modélisations de résolution supérieure aux autres agents de couplage plus longs. De plus, le CDI possède des réactivités similaires vis-à-vis des groupements aminés et hydroxyles des protéines, ce qui lui permet de cibler des régions protéiques supplémentaires et inaccessibles avec les agents de couplage plus classiques comme le BuUrBu (Hage et al., 2017).

La réaction de couplage avec le CDI est effectuée avec 25 équivalents molaires de l'agent couplant par rapport à la quantité totale de protéines. L'analyse des différents profils protéiques obtenus à l'issue de la réaction de couplage a été réalisée par Western-Blot (Figure 34). Les pistes 1 et 5 présentent une bande aux alentours de 130 kDa spécifique de la présence des 3 partenaires p38α/scFvG9/CDI. L'analyse par Western-Blot permet de mettre en évidence la présence de p38α (piste 1) et de scFv G9 (piste 5) au même niveau de cette bande de migration. La colocalisation des deux protéines en présence de CDI en conditions réductrices et dénaturantes démontre qu'un couplage covalent a bien eu lieu entre les deux partenaires protéiques. La piste 7 montre la dimérisation du scFv G9 en présence de CDI (signal aux alentours de 60 kDa) ce qui confirme la tendance générale des scFv à former des diabodies ou des agrégats. En présence de p38α, la dimérisation des scFv est moindre (piste 5) et la part de scFv colocalisant avec la p38α augmente indiquant que les scFv interagissent avec la p38α même en dimérisant, ce qui est en faveur de la formation de diabodies actifs plutôt que d'agrégats inactifs de scFv.

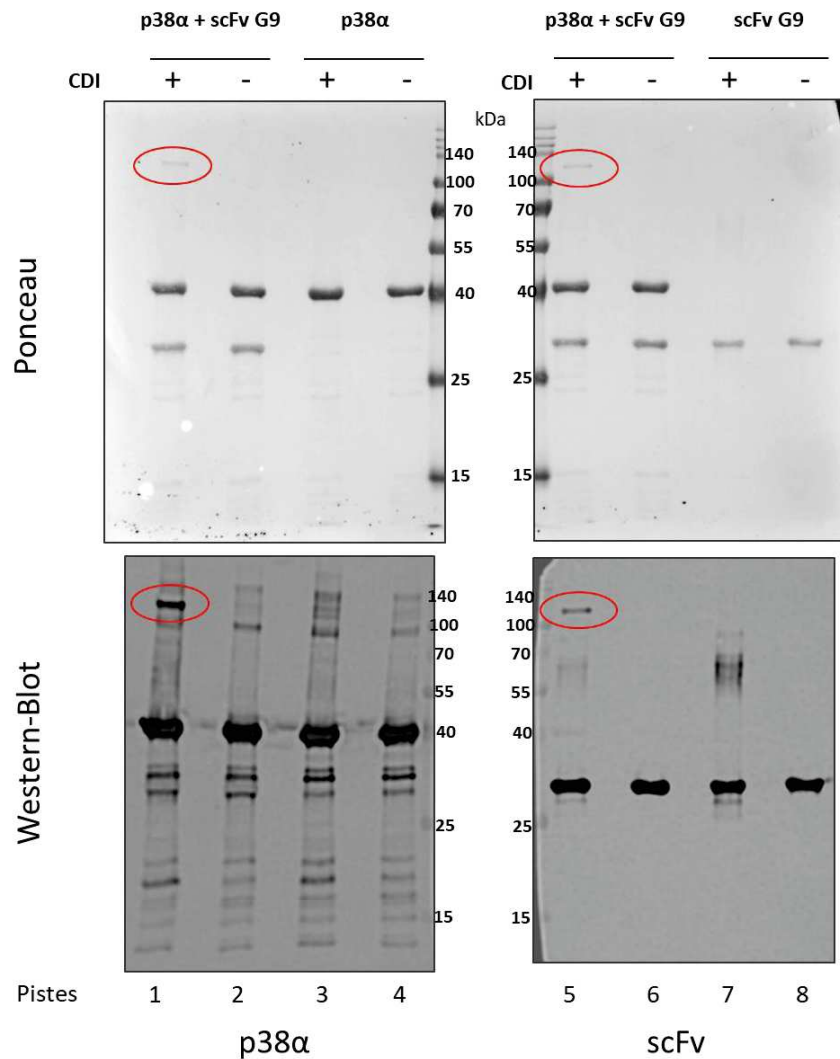


Figure 34 : Analyse par Western-Blot de la formation du complexe p38 α /scFv G9/CDI. Les p38 α et scFv G9 sont en rapport équimolaire. Le CDI est ajouté à 25 équivalents molaires par rapport à la quantité totale de protéine.

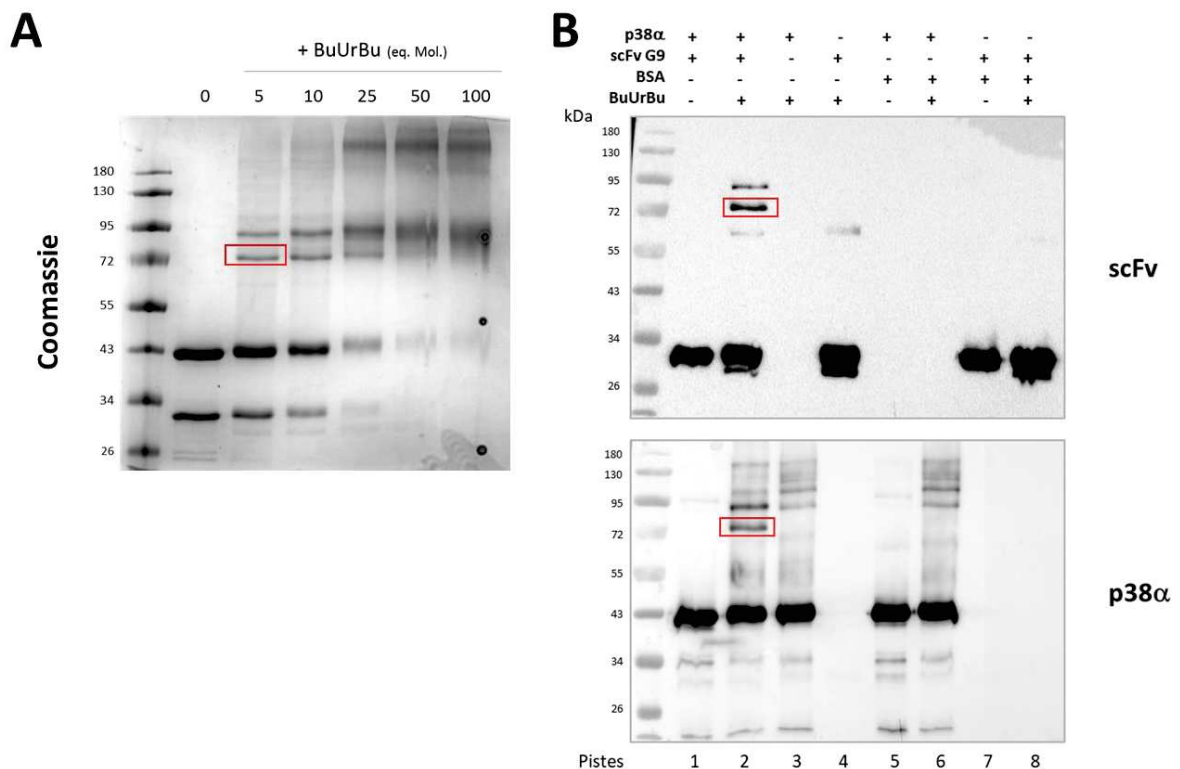
La concentration de CDI utilisée pour cette première caractérisation fixée à 25 équivalents molaires est celle décrite dans la littérature (Hage et al., 2017). Cependant la seule publication décrivant la combinaison de CDI avec une analyse MS-MS s'est intéressée à l'étude de croos-links intramoléculaires afin d'obtenir des renseignements sur l'arrangement spatial de protéines comme la BSA et p53 dont les structures sont déjà caractérisées. Ces modèles leur ont permis de valider leur approche mais l'étude d'interactions inter-moléculaires s'avère être plus complexe.

Même si nous observons un signal colocalisant la p38 α et le scFv G9 en WB, l'intensité de la bande obtenue correspondante en Ponceau est faible. Le rendement de formation du complexe nécessite donc des mises au point : temps d'incubation, concentration, température, tampon... Ces optimisations seront nécessaires pour la suite de la caractérisation du complexe par l'analyse MS-MS. Une autre hypothèse peut être que les résidus potentiellement couplés par le CDI ne sont pas

suffisamment proches dans l'espace pour permettre la formation de cross-link entre la p38 α et le scFv G9. Nous utilisons donc d'autres agents comme le BuUrBu qui permet des couplages entre résidus plus distants.

b. Réaction de couplage avec le BuUrBu

Le BuUrBu est un agent de couplage clivable utilisé dans un plus grand nombre de publications que le CDI (Müller et al., 2010). Une gamme de concentration croissante en BuUrBu nous permet de détecter dès 5 équivalents molaires des produits de couplage entre la p38 α et le scFv G9 (Figure 35.A). La bande à 72 kDa correspond à un couplage de stœchiométrie 1:1 entre la p38 α et G9. Nous décidons de nous placer dans un premier temps dans ce rapport molaire pour étudier l'interaction par Western-Blot (Figure 35.B). La piste 2 du WB nous permet de confirmer la présence de p38 α et de scFv G9 au niveau de la bande à 72 kDa.



La bande encadrée en rouge sur le Coomassie et sur les Blots correspond à une interaction p38 α /scFv G9 de stœchiométrie 1:1.

La présence de crosslink entre la p38 α et le scFv G9 est détectée pour chacun des agents de couplage utilisé. La comparaison des profils obtenus en Western-Blot nous montre que l'on n'obtient pas les mêmes couplages entre le CDI et le BuUrBu. Avec le CDI une bande colocalisant la kinase et le scFv est obtenue vers 130 kDa, ce qui pourrait correspondre à une stœchiométrie p38 α :G9 de 1:3, 2:1 ou 2:2, alors qu'avec le BuUrBu on détecte une bande caractéristique de l'interaction d'une p38 avec un scFv à 72 kDa dans une stœchiométrie de 1:1. De plus on observe moins de dimérisation du scFv avec le BuUrBu. Il est donc intéressant de mener en parallèle l'analyse avec plusieurs linkers pour obtenir des informations complémentaires quant à la détermination des zones d'interactions entre le scFv G9 et la p38 α . Nous pouvons aussi envisager d'utiliser des agents de couplage clivables avec des propriétés différentes comme le DMTMM qui réagit avec des résidus acides (Asp, Glu).

Chacune de ces réactions de couplage entre la p38 α et le scFv G9 est en cours d'analyse par spectrométrie de masse MS-MS. Jusqu'à aujourd'hui, l'analyse XL-MS n'a jamais été réalisée pour des interactions de type antigène-anticorps. L'identification des fragments peptidiques impliqués dans les couplages covalents nous permettra de remonter aux séquences correspondantes de la p38 et du scFv impliquées dans l'interaction. Ainsi, les agents de couplage permettent de créer une « empreinte » de résidus couplés à proximité des résidus impliqués dans l'interaction paratope-épitope. Ils nous permettront de définir la zone d'interaction intermoléculaire entre la p38 α et le scFv G9 au niveau peptidique mais la détermination exacte des résidus impliqués ne pourra se faire que par la création d'une banque de mutants de la p38 α .

IV. Etude des scFv en tant qu'intracorps

L'ensemble des caractérisations menées jusqu'à présent ont été réalisées *in vitro*. Il nous faut maintenant montrer la capacité des scFv, exprimés en tant qu'intracorps, à inhiber l'activité kinase de la p38 α dans les cellules.

L'immunoprécipitation de la p38 α à partir d'extraits cellulaires nous a précédemment démontré que les 5 scFv issus de notre sélection par phage display reconnaissent la forme native de la protéine contre laquelle ils ont été sélectionnés. Cependant l'environnement réducteur du cytoplasme des cellules est défavorable à l'expression et à la stabilité des intracorps qui peuvent alors agréger et ne plus interagir avec leur cible intracellulaire. Le niveau d'expression, la solubilité ainsi que la capacité de liaison des scFv ont donc été étudiés dans un premier temps *in cellulo*.

A. Test de relocalisation cellulaire

La fonctionnalité des scFv à lier la p38 α dans les cellules eucaryotes a été évaluée par un test de relocalisation cellulaire inspiré de Sibling et coll. (Sibling et al., 2003). Ces travaux ont démontré la corrélation entre la solubilité et la stabilité d'un anticorps exprimé dans l'environnement intracellulaire avec sa capacité à entraîner la délocalisation de son antigène cible à travers la membrane nucléaire grâce à des séquences d'adressage nucléaire ou cytoplasmique.

Nous avons ainsi réalisé des co-transfections transitoires de cellules Hela pour l'expression des protéines p38 α et scFv fusionnées au fluorophore eGFP ou mCherry respectivement. Ainsi chacune des protéines peut être directement analysée et visualisée dans les cellules par microscopie à fluorescence. Dans notre test, la p38 α a également été exprimée en fusion avec une séquence de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localisation Signal) ou à une séquence d'exclusion nucléaire (NES, Nuclear Export Signal) pour diriger sa localisation respective dans le noyau ou le cytoplasme des cellules transfectées. Chacun des scfv-mCherry testés est exprimé avec l'une des trois constructions d'eGFP-p38 α et la capacité de la p38 α à médier l'importation/l'exportation nucléaire du scFv a été visualisée par microscopie à fluorescence. Les phénotypes attendus en cas d'interaction du scFv avec la p38 α dans les cellules sont présentés dans la Figure 36.

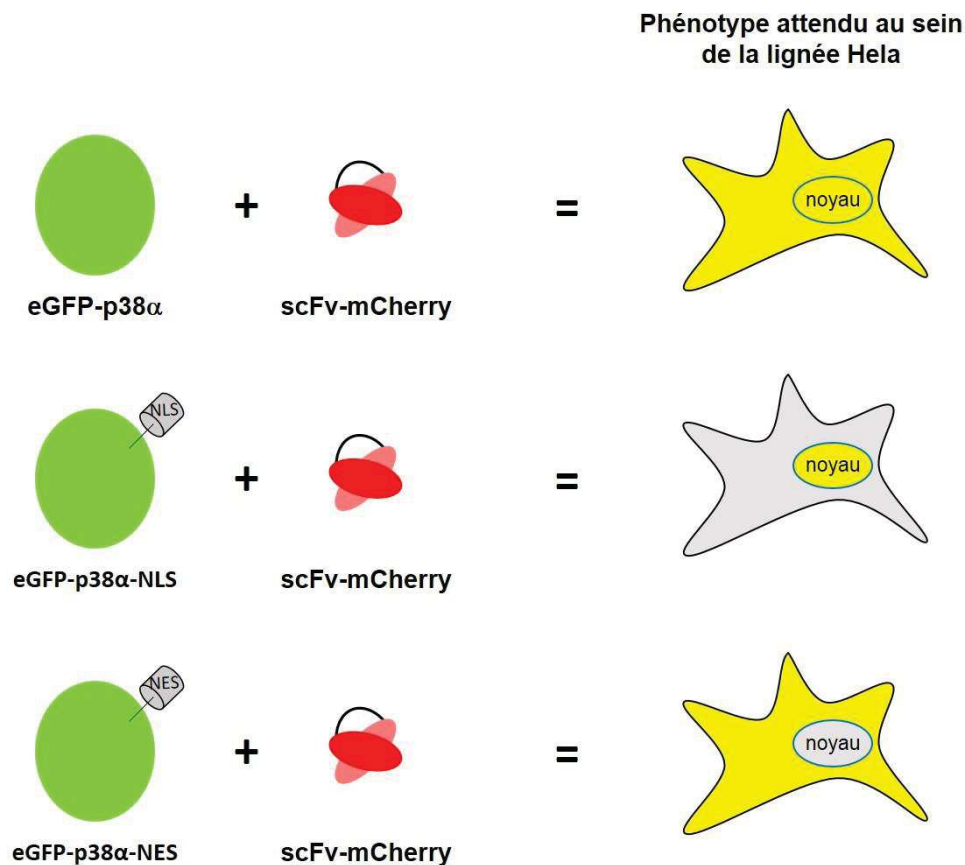


Figure 36 : Principe du test de relocalisation cellulaire. Cotransfection transitoire au sein de la lignée Hela des plasmides codant pour chacune des constructions indiquées. La p38α et les scFv sont exprimés sous la forme d'une protéine de fusion au fluorophore eGFP et mCherry respectivement. Le phénotype représenté correspond à celui attendu en cas d'interaction du scFv avec la p38α.

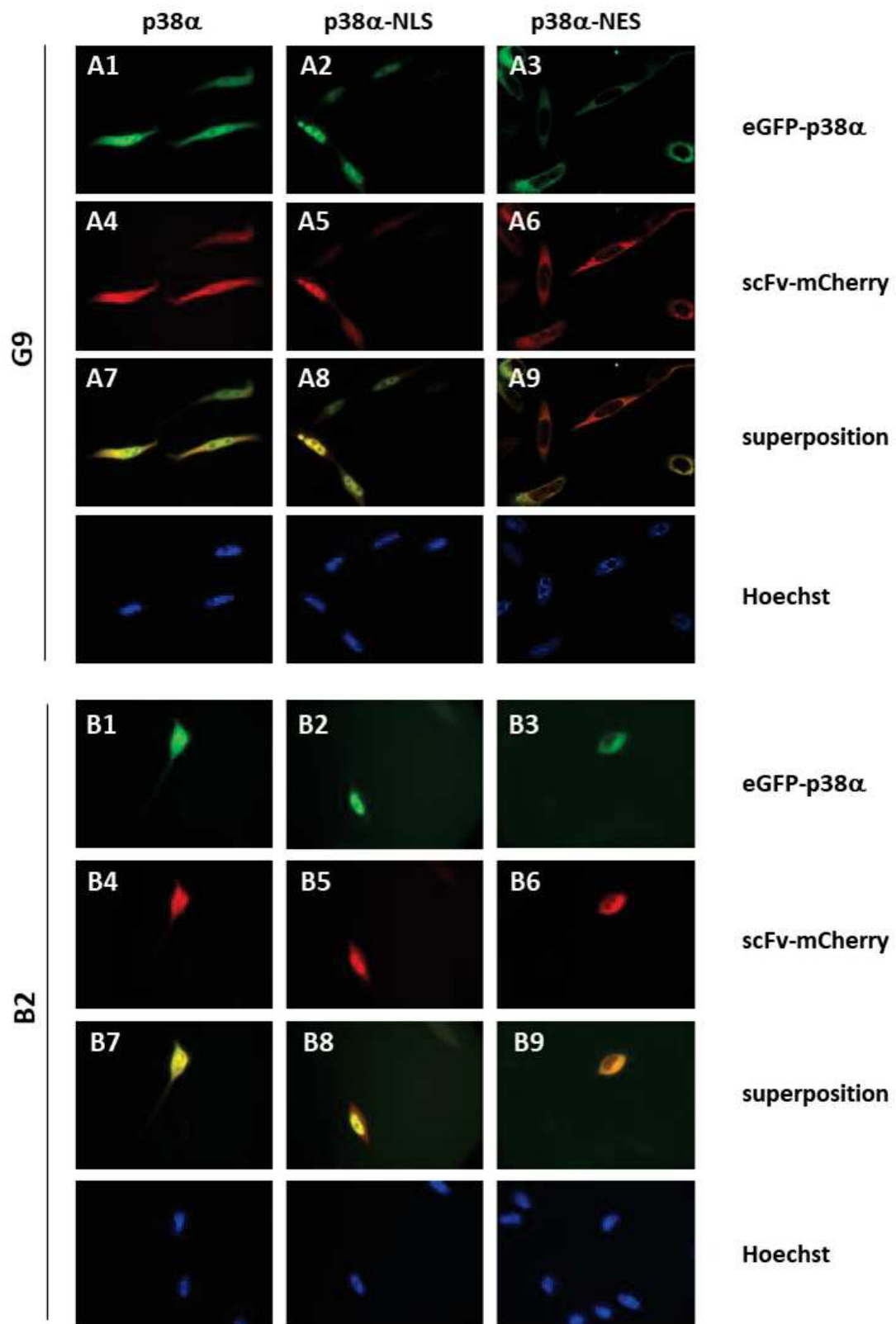
Les 5 scFv issus de notre sélection de phage display ont été testés et les résultats sont présentés dans la Figure 37.

Les MAPK p38 sont des protéines solubles réparties de façon uniforme dans les cellules. En l'absence de séquence d'adressage, la eGFP-p38α présente une expression homogène dans les cellules (Cf. images A1, B1, C1 et D1) et diffuse dans le noyau dû à sa petite taille (les petites molécules < 40-60 kDa diffusent passivement à travers les complexes de pore nucléaire) (Yoneda, 2000). Le scFv 13R4 qui a servi de base structurale à la construction de la banque dont sont issus les scFv, ne nécessite pas la formation de ponts disulfures pour son repliement stable et fonctionnel (Martineau and Betton, 1999). Il possède une expression diffuse et ne forme pas d'agrégats dans l'environnement réducteur intracellulaire en présence des 3 constructions de p38α (images D4, D5 et D6) nous servant ainsi de témoin d'expression soluble pour les scFv. L'expression des scFv G9 et B2 est également uniforme dans les cellules en présence de eGFP-p38α (images A4 et B4). Contrairement au 13R4, l'expression dirigée de la p38α dans le noyau (A-D 2) ou le cytoplasme des cellules (A-D 3) entraîne une modification de la

localisation des scFv G9 (A5 et A6) et B2 (B5 et B6), confirmant ainsi l'interaction spécifique des intracorps avec leur cible au sein de la cellule. Les scFv B12, D9 et E5 présentent de nombreux agrégats dans le cytoplasme des cellules (images C4 à C6 pour le scFv D9) les empêchant ainsi de relocaliser avec la p38 α dans le noyau (image C5 pour le scFv D9).

Ces résultats confirment la relation entre la solubilité d'un intracorps et sa capacité à lier son antigène dans l'environnement réducteur intracellulaire. L'analyse des productions cytoplasmiques bactériennes par bleu de Coomassie nous avait permis d'observer que les scFv B12 et D9 étaient retrouvés en totalité dans la fraction insoluble (Figure 20). Les scFv G9 et B2 sont donc stables et fonctionnels *in cellulo* une fois exprimés en tant qu'intracorps.

Malgré l'optimisation de la banque pour l'obtention de scFv solubles en milieu réducteur intracellulaire, seuls 2 scFv de notre sélection, le B2 et le G9 sont majoritairement présents dans la fraction soluble du cytoplasme et sont fonctionnels en tant qu'intracorps. La sélection des clones monoclonaux à l'issue des 3 cycles de phage display a été réalisée à partir des surnageants de culture bactériens (expression périplasmique) de la souche HB2151. Afin d'augmenter le pourcentage de clones fonctionnels *in fine*, nous aurions pu réaliser le criblage par ELISA des clones spécifiques de la p38 α à partir de productions cytoplasmiques des bactéries infectées. Cela aurait pu permettre de sélectionner directement des scFv stables et solubles et par conséquent fonctionnels pour des productions cytoplasmiques ultérieures ainsi que leur utilisation en tant qu'intracorps.



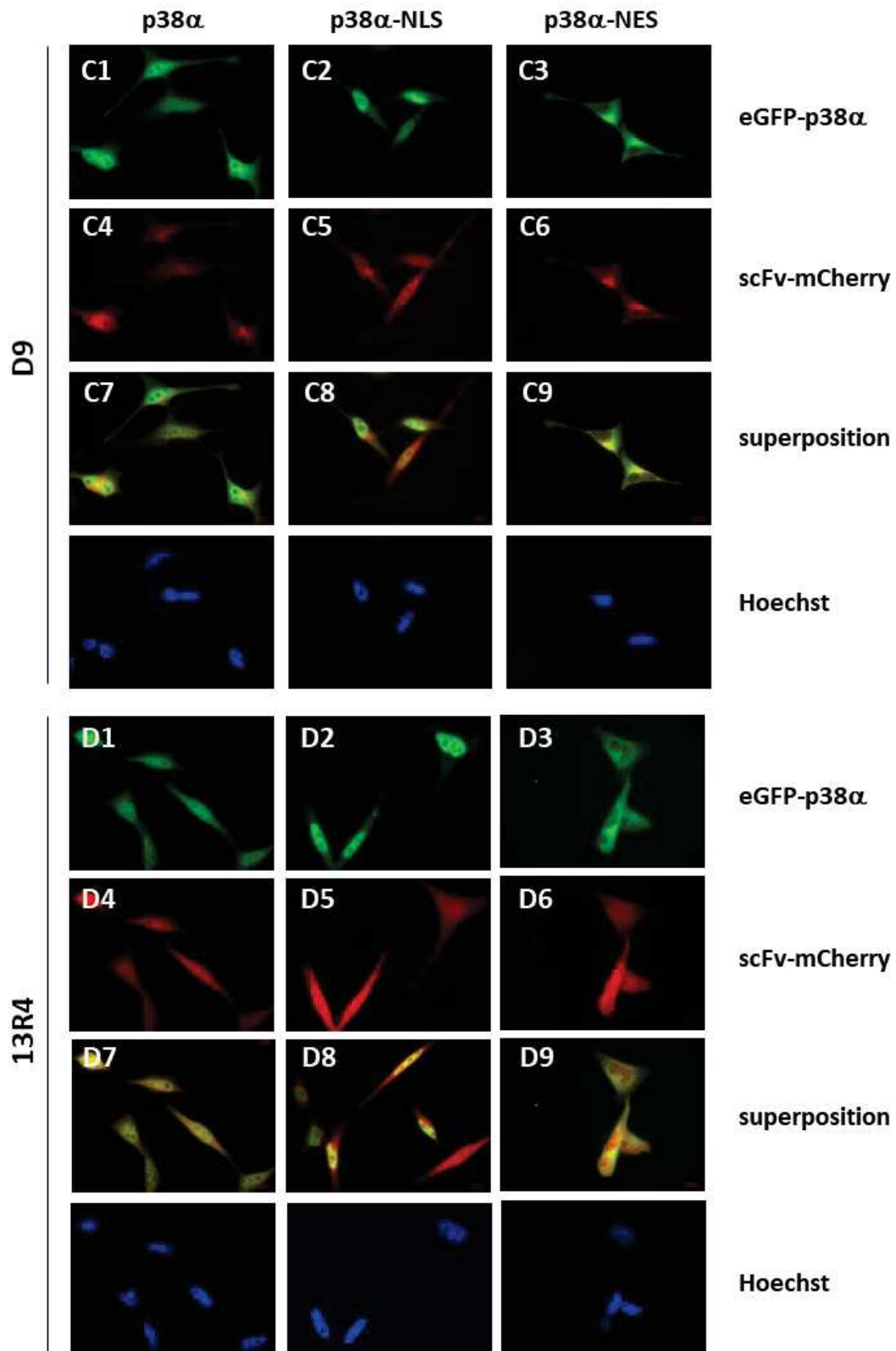


Figure 37: Essai de relocalisation cellulaire des scFv issus de la sélection avec les différentes constructions d'eGFP-p38 α dans les cellules HeLa. La distribution cellulaire de la protéine de fusion scFv-mCherry coexprimée avec la eGFP-p38 α non taguée, taguée NLS ou NES, est visualisée par microscopie à fluorescence. Le scFv 13R4 sert de témoin négatif. Les images acquises pour le scFv G9 ont été prises en Apotome. Les noyaux sont marqués au Hoechst (Bleu). Grossissement x63

B. FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

La p38 α est une protéine soluble uniformément répartie dans la cellule. Il est donc difficile de quantifier la part des intracops liée à la p38 α de celle retrouvée sous forme libre. Afin de confirmer l'interaction des intracops avec la p38 α dans le milieu réducteur intracellulaire, un deuxième système utilisant de l'imagerie FLIM-FRET a été utilisé.

Le FRET implique un transfert d'énergie non radiatif entre deux fluorophores positionnés dans certaines conditions de distance et de conformation. L'énergie d'un fluorophore donneur à l'état excité est transmise à un fluorophore accepteur à proximité immédiate (distance < 10 nm). Cette technique est utilisée pour détecter les interactions intramoléculaires, telles que les changements conformationnels ou la dimérisation de protéines, ainsi que pour l'étude d'interactions intermoléculaires dans les cellules vivantes.

Chacun des partenaires protéiques intervenant dans l'interaction à étudier est fusionné à un couple de fluorophore compatible (nécessité de chevauchement du spectre d'émission du donneur et du spectre d'absorption de l'accepteur). Dans notre cas, les mêmes constructions d'eGFP-p38 α et des scFv-mCherry ont été utilisées que pour le test précédent. En cas d'interaction de la p38 α avec le scFv une diminution de l'intensité de fluorescence du donneur eGFP sera observée tandis que l'intensité de fluorescence de l'accepteur mCherry augmentera. L'interaction entre la p38 α et les scFv B2 et D9 a été analysée par FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) (Figure 38). Lors de la réalisation de ces expériences nous ne connaissions pas encore l'effet inhibiteur du G9 et les scFv avaient été choisis par leur profil d'expression en microscopie à fluorescence classique (soluble pour le B2 et agrégeant pour le D9) ainsi que par la spécificité de leur signal en ELISA. Le FLIM mesure la diminution de la durée de vie de fluorescence du fluorophore donneur, à savoir eGFP dans notre cas. Le choix de la technique de FLIM pour la mesure de FRET permet d'obtenir un meilleur rapport signal/bruit. De plus la mesure de la durée de vie de fluorescence est indépendante de la concentration en fluorophore. Ainsi, par rapport au test de relocalisation cellulaire, cette approche permet de visualiser où et quand les scFv et la p38 α interagissent dans la cellule. Ces expérimentations ont été menées en collaboration avec Marion Peter-Baylon (IGMM CNRS UMR 5535).

L'expression de la p38 α est observée en biphotonique avant l'acquisition de FLIM-FRET afin d'éviter les phénomènes de « photobleaching » et de phototoxicité des cellules. Comme précédemment observé dans notre test de relocalisation cellulaire, la p38 α s'exprime de manière homogène au sein des cellules (cytoplasme + noyau) (Figure 38.B). La durée de vie de la eGFP en l'absence d'accepteur FRET est de 2,4 ns (échelle de couleur dans les tons bleus). Le scFv 13R4, qui nous sert toujours de scFv irrelevant, n'induit pas de diminution de la durée de vie de fluorescence de

la eGFP indiquant qu'il n'y a pas d'interaction entre la p38 α et le scFv 13R4 à l'intérieur des cellules. Le pByffu est une protéine de fusion entre les fluorophores eGFP et mCherry séparés par un linker qui émet du FRET de manière constitutive et qui nous sert de contrôle positif (Tramier et al., 2006). Avec le scFv B2 on peut observer une diminution uniforme de la durée de vie de la eGFP (jusqu'à 0,4 ns de diminution) indiquant que l'interaction entre le scFv B2 et la p38 α a bien lieu dans les cellules vivantes. Pour le scFv D9, l'interaction avec la p38 α est moins probante : son niveau d'expression est faible (intensité du signal de la mCherry obtenue en confocal) et il présente également des agrégats dans la cellule. La diminution de la durée de vie de la eGFP avec le D9 n'est pas homogène comme avec le B2 et colocalise avec les agrégats observés de scFv.

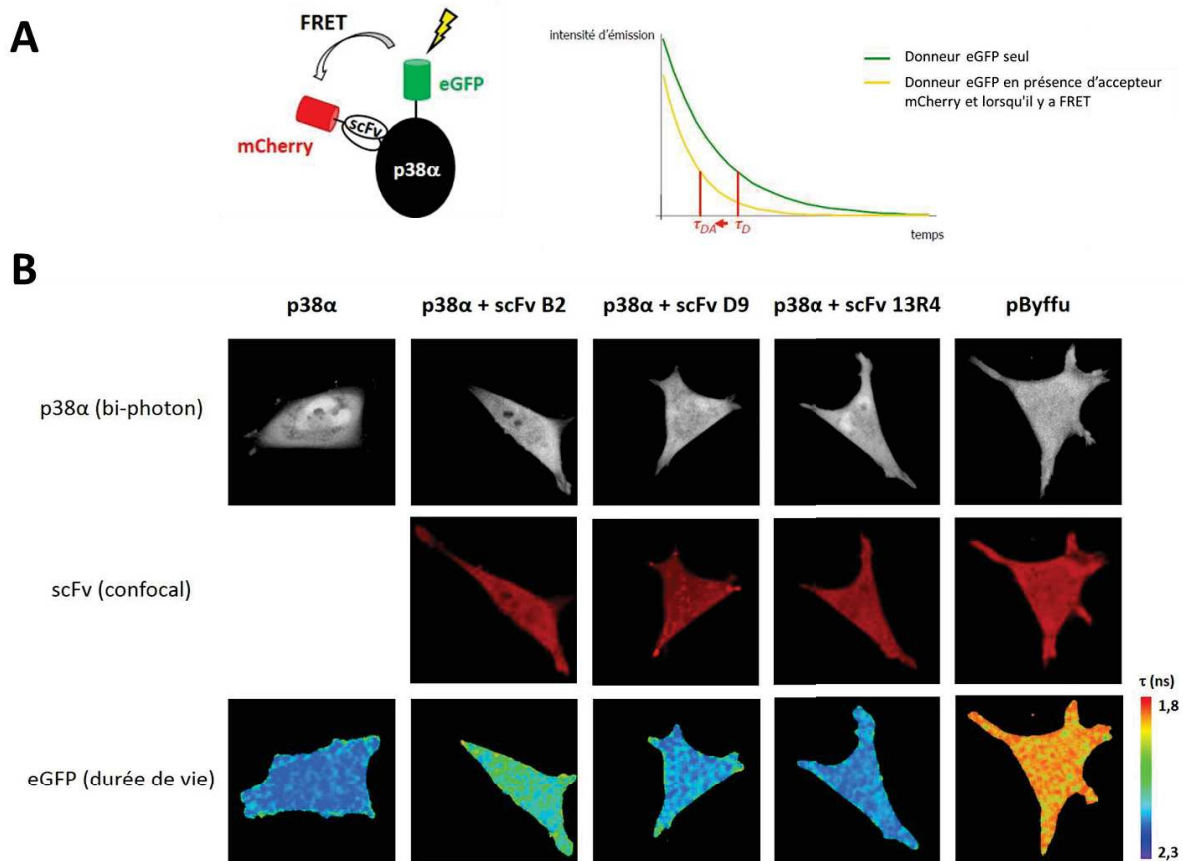


Figure 38 : Analyse de l'interaction des scFv-mCherry avec la eGFP-p38α par microscopie FLIM-FRET. (A) Représentation schématique du signal FRET intermoléculaire (flèche blanche) reflétant l'interaction entre la eGFP-p38α (molécule donneuse de fluorescence) avec les scFv-mCherry (molécule acceptrice de fluorescence). La proximité spatiale entre les deux protéines de fusion entraîne une diminution de la durée de vie de fluorescence du fluorophore donneur (eGFP). (B) Analyse par FLIM-FRET de la capacité de liaison des scFv dans les cellules Hela. Les cellules ont été cotransfectées avec les scFv-mCherry et la eGFP-p38α et analysées par FLIM 48h après la transfection. Les mesures de la durée de vie de fluorescence de la eGFP sont converties en images avec une échelle de couleur allant du bleu (2,3ns) au rouge (1,8 ns). La durée de vie de fluorescence de la eGFP en l'absence d'accepteur FRET est de 2,4 ns. Le scFv 13R4 sert de témoin négatif. Le pByffu émet constitutivement un signal FRET et sert de témoin positif. Objectif x63.

Ces résultats confirment ceux obtenus avec le test de relocalisation cellulaire. La capacité des scFv à interagir avec la p38α au sein des cellules est corrélée à leur stabilité et solubilité une fois exprimé en tant qu'intracorporel. Les acquisitions de FLIM-FRET montrent qu'il y a bien interaction et non pas seulement colocalisation du scFv B2 avec la p38α. Le scFv G9, bien que non testé en FRET, est également fonctionnel dans les cellules.

L'ensemble de ces résultats nous permet d'envisager des tests fonctionnels d'inhibition de la p38α endogène.

C. Mise au point d'un test phénotypique dans l'inflammation

Notre équipe travaille sur la résistance des cancers colorectaux métastatiques aux traitements de chimiothérapies notamment à base d'Irinotécan. Comme évoqué précédemment, la forte activation par phosphorylation de la p38 α au sein de lignées d'adénocarcinomes coliques humaines est corrélée au phénotype de résistance des cellules. Plutôt que d'évaluer l'activité inhibitrice de nos scFv dans un modèle en cancérologie, dont les voies de régulation souvent complexes peuvent se compenser entre elles, nous avons décidé de les tester dans un modèle cellulaire dans l'inflammation, amplement utilisé pour la caractérisation d'inhibiteurs chimiques ciblant la voie des MAPK p38.

Les MAPK p38, et plus particulièrement l'isoforme p38 α , jouent un rôle clé dans l'inflammation notamment par la production de cytokines inflammatoires. La plupart des inhibiteurs pharmacologiques de p38 développés jusqu'ici ont été testés pour leur capacité à inhiber la production des cytokines inflammatoires IL-1 β et TNF- α dans des tests de stimulation de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) ou de la lignée cellulaire humaine de monocytes THP-1 par du LPS (LipoPolySacchararide). Nous avons donc décidé de reproduire ce test phénotypique en utilisant la lignée THP-1 qui présente comme intérêt d'exprimer très peu l'isoforme p38 β ((Hale et al., 1999) et données du laboratoire). Ainsi le phénotype observé sera exclusivement lié à l'inhibition de la p38 α sans effet de compensation par les autres voies de p38.

1. Mise en place du modèle

La production de cytokines proinflammatoires suite à une stimulation au LPS passe par une activation du récepteur TLR4 (Toll-Like Receptor 4). Ce récepteur est exprimé notamment par les cellules immunitaires de la réponse innée et permet, suite à la liaison du LPS bactérien, de déclencher l'activation de cascades de signalisation impliquant entre autres la MAPK p38. Il en résulte une synthèse de cytokines pro-inflammatoires qui agiront alors pour activer les réponses immunitaires, ainsi que des interférons de type I et l'expression des gènes inductibles par les interférons (ISG, Interferon stimulated genes) pour les réponses antivirales et antibactériennes (Lu et al., 2008). L'activité inhibitrice des intracorp sera dans un premier temps testée sur leur capacité à inhiber la production de TNF- α par des cellules THP-1 stimulées au LPS. Nous compléterons par la suite l'analyse par l'étude de différentes cytokines dont l'expression est connue pour être régulée par la p38 α (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17).

a. Validation du test phénotypique

Dans notre modèle, la lignée monocyttaire THP-1 a été différenciée en macrophages en cultivant les cellules pendant 48h en présence de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 10 nM) (Lund et al., 2016). Les cellules ont ensuite été stimulées avec du LPS (100 ng/mL) pendant 4h et la quantité de TNF- α sécrétée dans le milieu de culture dosée par ELISA.

Afin de valider notre modèle, nous avons dans un premier temps traitées les cellules avec des concentrations croissantes de l'inhibiteur pharmacologique de p38 SB202190 (Figure 39). Nos résultats montrent que la production de TNF- α induite par la stimulation des cellules THP-1 par du LPS est bien fortement réduite en présence d'inhibiteur de p38.

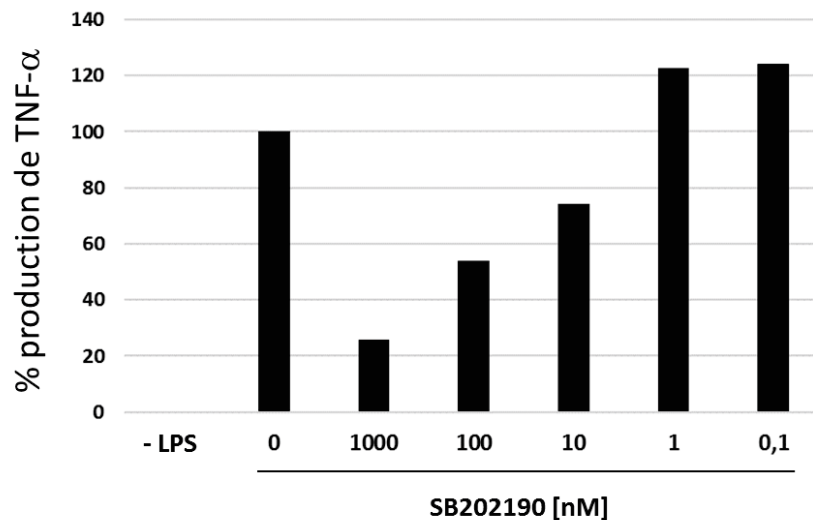


Figure 39 : Evaluation de l'activité inhibitrice du SB202190 sur la production de TNF- α .

Les cellules THP-1 sont cultivées en présence de PMA pendant 48h. Après 1h de préincubation avec le SB202190, les cellules sont stimulées par du LPS toujours en présence d'inhibiteur pendant 4h. Le TNF- α présent dans le surnageant de culture est dosé par ELISA.

b. Expression inductible des intracorp

La protéine p38 α est une protéine de stress cellulaire impliquée dans la régulation de processus biologiques variés allant de la prolifération cellulaire à l'apoptose. L'expression en continu et à un fort niveau de scFv inhibiteurs dans le cytoplasme pourrait alors s'avérer toxique pour les cellules. Les cellules THP-1 ont donc été transduites par des vecteurs lentiviraux afin d'exprimer un scFv fusionné à la GFP par le système inductible Tet-On[®] (Clontech) (Giry-Laterrière et al., 2011). L'expression des scFv est alors induite par l'addition de l'antibiotique doxycycline pendant 48h au milieu de culture, durant la phase de différenciation des THP-1 en présence de PMA. La concentration

en doxycycline utilisée a été déterminée comme celle permettant un fort taux d'expression par le plus grand nombre de cellules. Le test phénotypique mis en place, avec ses variantes, est détaillé dans la Figure 40.

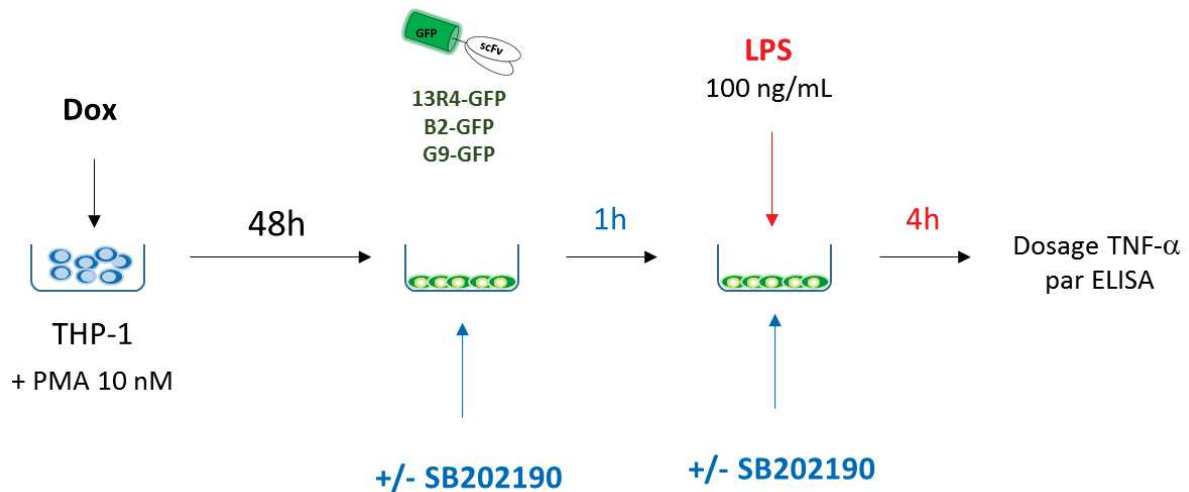
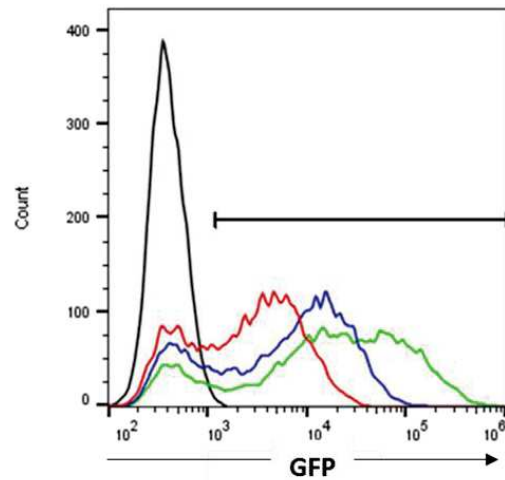


Figure 40 : Principe du test phénotypique. La lignée THP-1 est cultivée en présence de PMA (10nM) qui permet la différenciation des cellules en macrophages, et en présence de Doxycycline pour induire l'expression des intracorpers scFv-GFP. Après 48h, les cellules sont stimulées avec du LPS (100 ng/mL) pendant 4h. Pour certaines expériences, l'inhibiteur chimique de MAPK p38 SB202190 est préincubé pendant 1 h avant le début de la stimulation au LPS. Les surnageants de culture sont récoltés puis centrifugés et le TNF- α dosé par ELISA.

L'expression des différents scFv au sein des cellules transduites a été évaluée par analyse directe de la fluorescence de la eGFP des cellules par FACS et par microscopie à fluorescence, ainsi que par Western-Blot afin de s'assurer que le signal fluorescent observé est lié à la protéine de fusion scFv-eGFP et non à une protéine tronquée de type eGFP seule.

L'analyse par FACS (Figure 41.A) nous montre que les protéines de fusion scFv-eGFP sont exprimées avec des niveaux d'expression différents qui reflète la stabilité du scFv dans les cellules (13R4 > B2 > G9). De plus, nous constatons que les scFv ne sont pas exprimés par la totalité des cellules : le scFv G9 est exprimé dans 66,5% des cellules contre 84% et 75% pour les scFv 13R4 et B2 respectivement. Enfin, l'analyse des cellules THP-1 par microscopie à fluorescence permet de confirmer qu'aucun agrégat n'est visible et que les protéines de fusion scFv-eGFP sont retrouvées aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau des cellules (Figure 41.B).

A

	% GFP+	GOmean
THP-1 non transduite	0,4%	1536
13R4-GFP	84%	27121
G9-GFP	66,5%	4903
B2-GFP	75,4%	10783

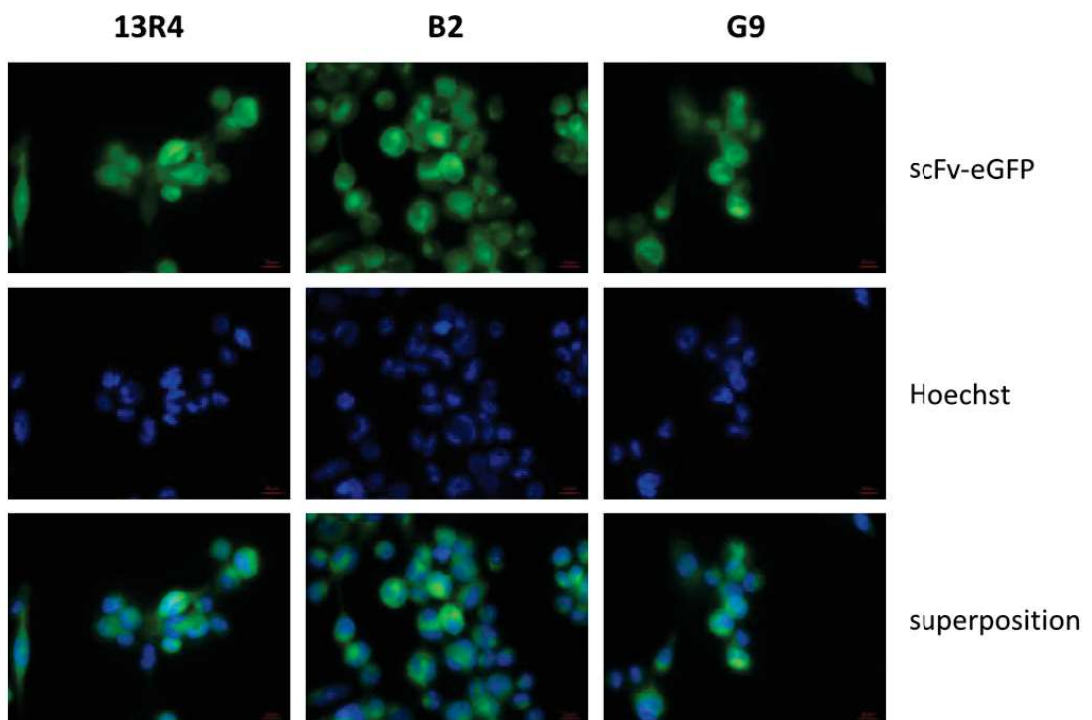
B

Figure 41 : Analyse de l'expression intracellulaire des scFv-eGFP dans les cellules THP-1.

L'expression des scFv-eGFP a été induite par l'ajout de Doxycycline au milieu de culture des cellules THP-1 différenciées en présence de PMA. La fluorescence est observée 48h d'expression.

(A) Analyse par FACS du signal de fluorescence eGFP. Le pourcentage de cellules positives ainsi que la moyenne de l'intensité de fluorescence sont indiqués.

(B) Analyse par microscopie à fluorescence. Les noyaux sont marqués au Hoechst. Grossissement x63.

Des extraits cellulaires de la lignée THP-1, transduite ou non, ainsi que les précipitations des scFv présents dans ces extraits cellulaires ont été analysés par Western-Blot (Figure 42). Les précipitations ont été réalisées avec des billes magnétiques de Nickel qui permettent, via le tag 6His présent en C-terminal, de capturer les protéines de fusion scFv-eGFP ainsi que les formes tronquées de la protéine comme le montre la présence de plusieurs bandes par piste sur le Blot (pistes 1 à 4). Les bandes présentes dans les pistes des précipitations 2 à 4 ainsi que dans les extraits cellulaires 6 à 8 correspondent à la protéine de fusion scFv-eGFP entière (taille attendue 55,6 kDa), au domaine VL du scFv fusionné à l'eGFP (taille attendue 42 kDa) et à la protéine eGFP seule (taille attendue 29,5 kDa). La quantification des signaux obtenus en Western-Blot montre le pourcentage de chacune des trois formes obtenues pour chacun des intracorpores. Les formes tronquées du scFv sont la conséquence de la dégradation des différents linkers de la protéine par des protéases cellulaires, soit du linker reliant les domaines variables de la chaîne lourde à la chaîne légère (forme VL-eGFP), soit du peptide de liaison avec le fluorophore eGFP. En fonction de l'affinité de l'interaction des domaines VH et VL, il n'est pas exclu que ces derniers restent associés pour former un complexe protéique fonctionnel. Comme ce qui a pu être observé par FACS, le scFv 13R4 possède un meilleur niveau d'expression au sein des cellules et G9 s'exprime avec un niveau moins élevé que les scFv B2 et 13R4. L'absence de signaux dans les pistes correspondantes aux fractions non solubles des extraits cellulaires (pistes 9 à 12) indique que les scFv B2, G9 et 13R4 sont solubles et n'agrègent pas au sein des cellules THP-1 ce qui confirme l'absence d'agrégats visibles en microscopie à fluorescence.

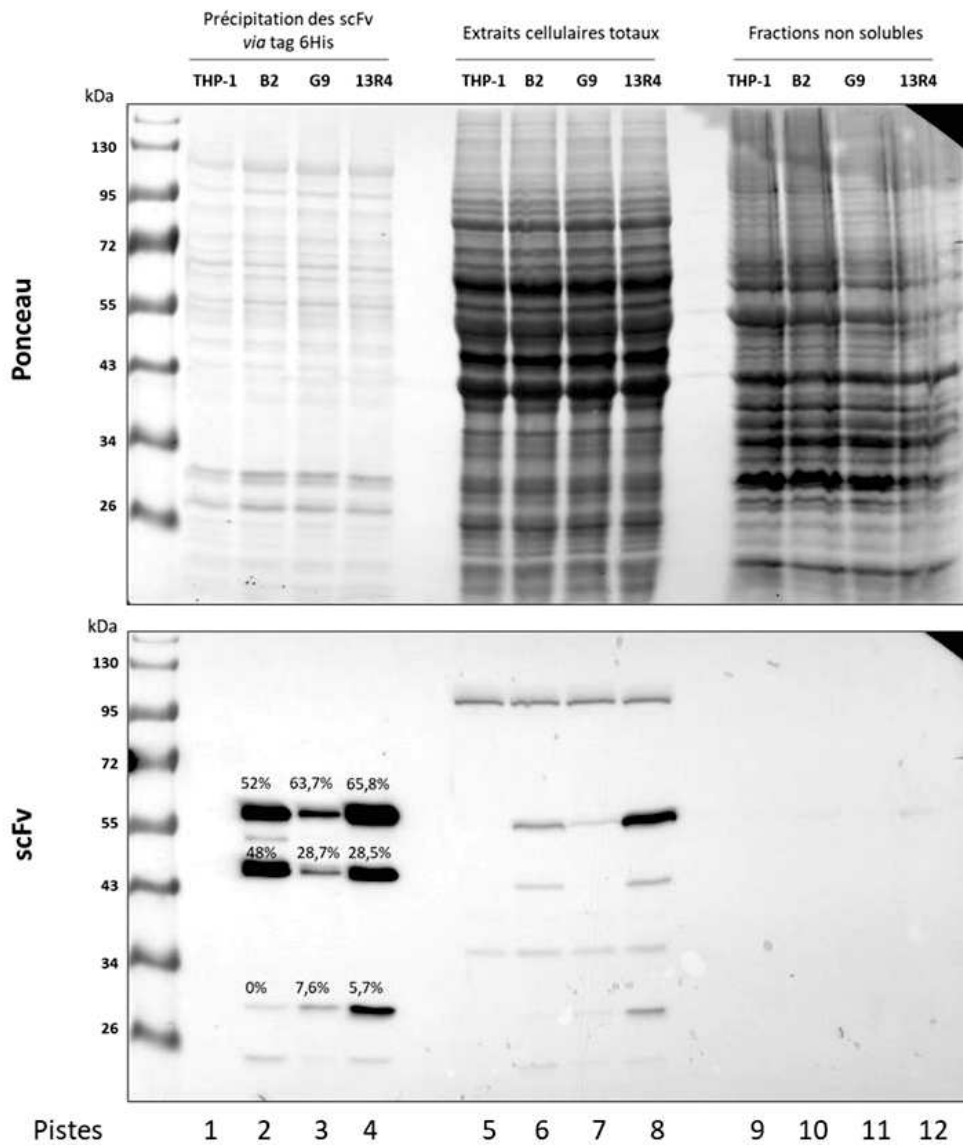
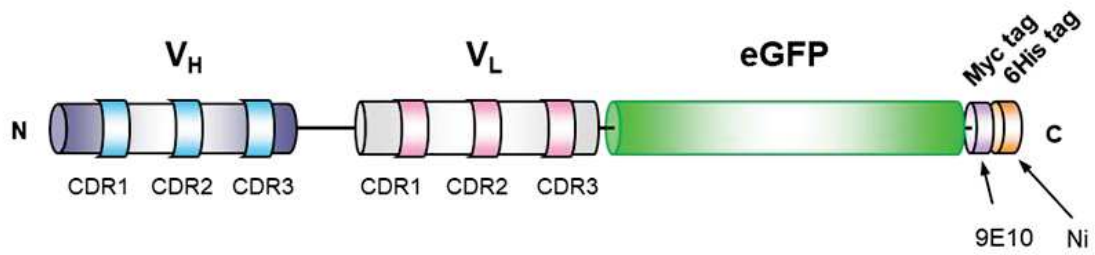


Figure 42 : Analyse de l'expression des scFv-eGFP dans les cellules THP-1 par Western-Blot. Les cellules THP-1 ont été cultivées 48h en présence de PMA et de doxycycline (0,5 µg/mL) Pistes 1 à 4: capture sur billes de Nickel des scFv-eGFP présents dans les extraits cellulaires THP-1. Pistes 5 à 8: extraits cellulaires totaux (environ 135 000 cellules par piste). Pistes 9 à 12: fractions non solubles des extraits cellulaires. La révélation des scFv-eGFP ainsi que des formes tronquées de la protéine a été réalisée grâce à l'anticorps monoclonal 9E10 (hybridome du laboratoire) qui cible le tag c-myc des scFv situé entre la eGFP et le tag 6His.

c. Absence d'effet de la doxycycline sur la production de TNF- α

Nous avons d'abord vérifié que le traitement des cellules à la doxycycline nécessaire à l'expression des intracops ne modifie pas le profil d'expression du TNF- α . Pour cela, nous avons cultivé des cellules THP-1 non transduites ou transduites pour l'expression de l'intracops 13R4-eGFP avec des concentrations croissantes de doxycycline pendant 48h. Le dosage de la cytokine dans le surnageant de culture montre que la doxycycline, même à la plus forte concentration (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ne perturbe pas la production et la sécrétion de TNF- α par les cellules THP-1.

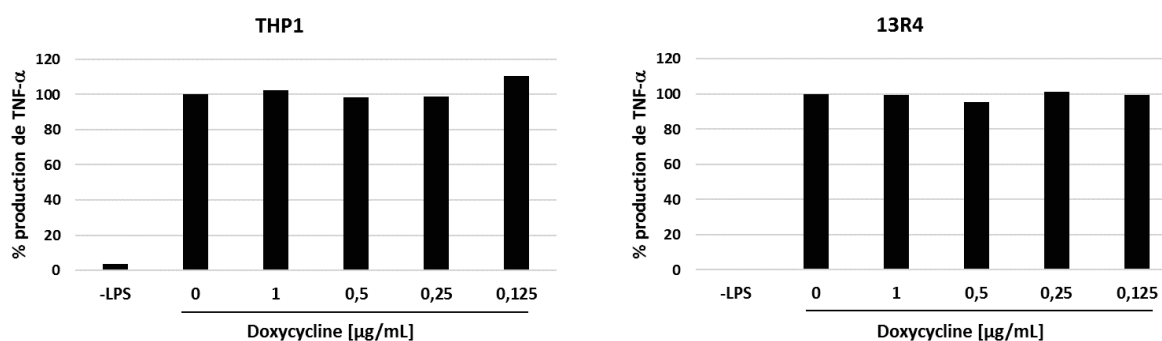


Figure 43 : Mesure de l'effet de la doxycycline sur la production de TNF- α .

Les cellules THP-1 ont été cultivées pendant 48h en présence de PMA et de différentes concentrations de doxycycline. Les cellules ont ensuite été stimulées avec du LPS pendant 4h. Le TNF- α présent dans le surnageant de culture a été dosé par ELISA.

2. Test phénotypique d'inhibition de la p38 α endogène

Deux expériences indépendantes ont été réalisées afin de tester la capacité des intracops B2 et G9 à inhiber l'activité de la p38 α endogène (Figure 44). Ces expériences montrent cependant des résultats contradictoires. Dans la première, nous observons une inhibition d'environ 20% de la production de TNF- α par les cellules THP-1, aussi bien par celles exprimant le scFv G9 que celles exprimant le scFv B2. Dans la seconde, aucun effet des intracops n'est observé. Un troisième test est donc nécessaire pour conclure.

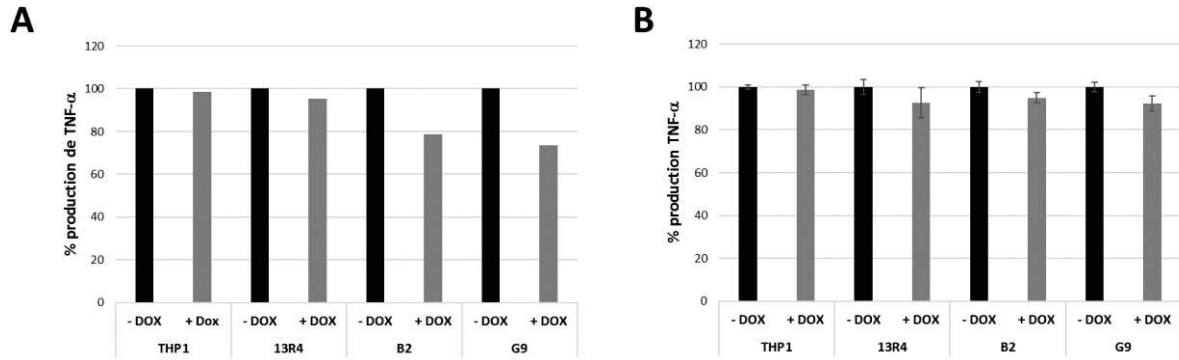


Figure 44 : Evaluation de l'activité inhibitrice des intracorp G9 et B2 sur la production de TNF- α .

Deux tests phénotypiques indépendants ont été réalisés. Les cellules THP-1 ont été cultivées pendant 48h en présence de PMA et de doxycycline (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) puis stimulées pendant 4h avec du LPS. Le TNF- α présent dans le surnageant de culture a été dosé par ELISA. A la différence de l'expérience (A), l'expérience (B) a été réalisée en triplicats.

Dans l'hypothèse où nous n'arriverions pas à conclure sur un effet inhibiteur des scFv G9 et B2 dans les cellules, nous envisageons de modifier les conditions expérimentales du test phénotypique. En effet, nous avons précédemment montré que le scFv G9 et l'inhibiteur SB202190 agissent par des mécanismes différents et indépendants sur l'activité de la p38 α . Leur combinaison pourrait ainsi permettre de mettre plus facilement en évidence l'activité inhibitrice du fragment d'anticorps en réduisant la quantité d'intracorp nécessaire pour observer une diminution de la production de TNF- α . Nous pouvons également envisager de réduire le niveau d'activation de la p38 α en stimulant les cellules THP-1 avec des concentrations plus faibles de LPS. Cependant, nous savons que les scFv interagissent aussi bien avec la forme active qu'inactive de la protéine. Bien que les intracorp soient solubles et fonctionnels dans les cellules, leur niveau d'expression n'est peut-être pas assez élevé pour interagir avec une quantité suffisante de protéines p38 α pour observer un phénotype d'inhibition. On pourrait alors tenter de diminuer le niveau d'expression de la cible avec des shRNA. Enfin, le traitement des cellules à la doxycycline n'induit pas une expression des intracorp par la totalité des cellules et ceci, de façon très reproductible, quel que soit la concentration d'antibiotique utilisée. Nous pouvons donc également envisager de trier les cellules par FACS afin d'enrichir la population cellulaire exprimant fortement les intracorp.

V. Résumé des résultats

Mon projet de thèse portait sur le développement de nouvelles classes d'inhibiteurs de la MAPK p38 α par l'utilisation de fragment d'anticorps. Notre objectif visait à exploiter les propriétés de spécificité et d'affinité des anticorps afin de sélectionner des inhibiteurs hautement sélectifs de l'isoforme α de la p38. De plus, à la différence des petites molécules chimiques qui se lient de préférence dans les rainures et les cavités protéiques et possèdent une petite interface d'interaction, les interactions protéines-protéines nécessitent généralement des interfaces planes, laissant ainsi envisager la sélection d'une nouvelle catégorie d'inhibiteur.

Nous avons sélectionné par phage display 5 fragments d'anticorps scFv spécifiques de l'isoforme α des MAPK p38 à partir d'une banque synthétique de scFv. Aucun des scFv sélectionnés ne présente de réactivité croisée avec l'isoforme p38 β , protéine présentant la plus forte identité de séquence avec la p38 α , témoignant ainsi de la grande spécificité de nos fragments d'anticorps.

Notre approche nous a permis d'identifier deux classes de scFv inhibiteurs de la p38 α agissant à différents niveaux de la voie de signalisation : (i) des scFv empêchant l'activation par phosphorylation de la p38, probablement en bloquant l'interaction de la protéine avec MKK6, (ii) un scFv, nommé G9, agissant directement sur l'activité kinase de p38 α qu'il est capable d'inhiber totalement *in vitro*.

Nos efforts se sont principalement concentrés sur le scFv G9 afin d'étudier son mécanisme d'action. Pour certaines expériences, nous avons également inclus une analyse du scFv B2, inhibiteur de la phosphorylation de p38 α .

Des mesures de l'activité enzymatique ainsi que des tests de compétition ont permis de caractériser le scFv G9 comme un inhibiteur compétitif de l'hydrolyse de l'ATP. Ses constantes d'inhibition (IC₅₀ = 150 nM ; K_i = 37 nM ; K_m = 172 nM) sont du même ordre de grandeur que celles des inhibiteurs chimiques classiques, témoignant de son affinité et de la puissance de ce scFv comme inhibiteur. Cependant, contrairement à ces derniers, le scFv G9 ne se lie pas dans le site actif de la kinase et fonctionne par un mécanisme d'inhibition différent de celui des inhibiteurs compétitifs de l'ATP. De plus, l'utilisation de peptide synthétique comme substrat, ne contenant que le site de phosphorylation pour les sérine/thréonine kinases, montre que l'inhibition ne passe pas par un blocage par le scFv G9 du « docking site » de la p38 α , permettant l'interaction de l'enzyme avec son substrat.

L'ensemble de ces données suggère que le scFv G9 agit par un mécanisme d'inhibition allostérique sur l'activité kinase de la p38 α . Les mesures de ses constantes de vitesse d'association et de dissociation montrent que le scFv G9 se lie préférentiellement à la forme inactive, non phosphorylée

de la p38 α , et pourrait ainsi agir par un mécanisme allostérique en stabilisant la p38 α dans sa conformation inactive.

Nous souhaitons maintenant valider la fonction inhibitrice des scFv sur la protéine endogène dans des tests cellulaires. Les scFv B2 et G9 sont stables et solubles dans l'environnement réducteur intracellulaire. Nous avons pu montrer que les scFv restent fonctionnels et interagissent avec la p38 α une fois exprimés en tant qu'intracorps. Leur activité inhibitrice sur l'activité de la p38 α endogène est en cours d'évaluation dans un modèle cellulaire de production de cytokines.

DISCUSSION

Les protéines kinases sont des composantes essentielles des voies de signalisation dans les cellules. Elles catalysent la phosphorylation de protéines, qui est la modification post-traductionnelle la plus répandue dans la transduction du signal. Une dérégulation de leur activité est directement impliquée dans la survenue de nombreuses pathologies, notamment en oncologie et dans l'inflammation. Pour ces raisons les protéines kinases sont devenues l'une des classes cibles les plus importantes pour le développement de médicaments de ce 21^{ème} siècle (Cohen, 2002).

La grande majorité des inhibiteurs de protéine kinase cible la poche catalytique de l'enzyme et fonctionne par un mécanisme de compétition à l'ATP. Les protéines kinases constituent la plus grande famille d'enzymes avec plus de 500 kinases codées par le génome humain et elles possèdent toutes un site de liaison à l'ATP (Manning et al., 2002). La spécificité d'un inhibiteur vis-à-vis d'une kinase sélectionnée doit donc être testée expérimentalement contre de nombreuses kinases pour identifier les éventuelles interactions « off targets » non souhaitées (Fabian et al., 2005).

Un second aspect avec ces inhibiteurs ciblant le site de liaison à l'ATP est qu'ils doivent également posséder une affinité de liaison élevée pour leur cible afin de pouvoir entrer en compétition avec l'ATP présent *in cellulo* à des concentrations élevées (1mM).

Pour toutes ces raisons il y a un grand intérêt à identifier des inhibiteurs allostériques qui ciblent des zones distinctes du site de liaison à l'ATP moins conservées entre les kinases.

Un site allostérique d'une kinase est une structure distincte du site actif de l'ATP dont la liaison à un ligand induit une modification de l'activité de l'enzyme. Ces sites peuvent être très divergents d'une kinase à l'autre et offrent donc la possibilité de pouvoir moduler l'activité enzymatique d'une kinase spécifique. Cependant très peu de modulateurs allostériques chimiques existent car, contrairement aux ligands qui ciblent le site actif, les pré-requis structuraux pour mimer la diversité des inhibiteurs ou activateurs biologiques des kinases sont moins bien connus.

Des inhibiteurs allostériques des MAPK ont été développés. Ils exercent leur fonction en bloquant les interactions avec les différents partenaires protéiques impliqués dans la voie de signalisation. Ces inhibiteurs sont des peptides qui se comportent comme des pseudo-substrats, ciblant le site de « docking » constitué par les domaines CD (Common Docking) et ED (glutamate/aspartate) au niveau de la MAPK et les domaines D présents sur les MAP2K, les substrats et les phosphatases. Leur séquence a ainsi été inspirée de ces régions de contact. Divers peptides

ciblant les MAPK ont été décrits dans la littérature en tant qu'inhibiteurs de la phosphorylation (Gaestel and Kracht, 2009). Ces interactions de docking ont également la capacité de moduler de manière allostérique d'autres régions de la protéine. Les travaux de Tokunaga et coll. ont montré que la liaison d'un domaine D au niveau du domaine d'ancrage situé dans le lobe C-terminal de la p38 α améliore la liaison de l'ATP au niveau du site actif et des résidus phospho-accepteurs. Cette liaison accélère la réaction de transfert des groupements phosphates et par conséquent l'activité catalytique de la kinase (Tokunaga et al., 2014). Ces travaux confirment que les protéines kinases sont des enzymes hautement régulées, divers mécanismes contrôlant leur activité catalytique. Des études de simulations moléculaires dynamiques ont permis de comprendre que l'activation de la p38 α , induite par le changement conformationnel de sa boucle d'activation, n'était pas liée uniquement à la double phosphorylation de leur motif TGY ainsi que par la liaison à l'ATP. La liaison de l'ATP stabilise une structure de type actif mais ne suffit pas à ce que la protéine adopte la conformation active décrite dans les modèles cristallographiques. Ces travaux ont ainsi décrits que la p38 α adopte sa conformation active avec sa boucle d'activation complètement étendue (conformation DFG-in) uniquement lorsqu'elle est phosphorylée, liée à l'ATP et à un peptide au niveau de son site de docking (Kuzmanic et al., 2017). Toutes ces données témoignent ainsi de l'intérêt du ciblage de ce site de docking sur la p38 α afin de moduler son état d'activation. Cette approche a été utilisée pour stabiliser la p38 α dans une conformation inactive grâce à un composé chimique, l'UPC-K-005. La p38 α forme un complexe avec son substrat MK2 dans lequel la p38 α est inactive. L'étude de la zone d'interaction de cet hétérodimère et des résidus impliqués a permis d'identifier un pharmacophore mimant cette interface et l'identification de composés chimiques comme UPC-K-005 par screening, inhibant l'activité kinase par un mécanisme non compétitif de l'ATP en se liant à ce site allostérique (Gomez-Gutierrez et al., 2016).

Dans notre approche, nous avons utilisé des fragments d'anticorps pour inhiber l'activité kinase de la p38 α . Les scFv sont des molécules avec un poids moléculaire d'environ 28 kDa et possèdent une interface de liaison à leur cible beaucoup plus étendue que celle formée par de petites molécules chimiques. De plus les petites molécules chimiques se lient de préférence dans les rainures et les cavités protéiques alors que les fragments d'anticorps ciblent plutôt des épitopes en surface et des surfaces planes. Par cette approche nous devrions donc identifier de nouveaux sites d'inhibition possibles en surface des p38.

Nous avons ainsi identifié le scFv G9 comme un inhibiteur allostérique de l'activité kinase de la p38 α . Ce scFv se comporte comme un inhibiteur compétitif de l'hydrolyse de l'ATP tout en se liant sur un site distinct de celui de l'ATP et des inhibiteurs de type I. L'hypothèse la plus probable concernant son mécanisme d'inhibition est que le scFv G9, en se liant à la p38 α , induit une

conformation dans la kinase qui altère son activité enzymatique en gênant la mise en place des résidus du site catalytique critique pour l'hydrolyse de l'ATP comme pour la conformation DFG-out. Les mesures des constantes de vitesse d'association et de dissociation par SPR nous montrent que le scFv G9 s'associe préférentiellement à la forme inactive et notamment qu'il présente une cinétique de dissociation plus lente de la forme inactive que de la forme phosphorylée de la kinase. Le scFv G9 pourrait ainsi stabiliser la p38 α dans sa conformation inactive (ou intermédiaire), poussant l'équilibre entre les formes active et inactive en faveur de la conformation inactive de la kinase. La capacité d'un fragment scFv à déséquilibrer une protéine en faveur d'un état conformationnel particulier a déjà été mise en évidence. Haque et coll. ont identifié par phage display un scFv capable de reconnaître l'état conformationnel oxydé de la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B). Cette phosphatase est impliquée dans la résistance à l'insuline et a été identifiée comme potentielle cible thérapeutique pour le traitement du diabète de type II et de l'obésité. L'insuline stimule l'augmentation de l'H₂O₂ intracellulaire qui oxyde et inactive de façon transitoire la phosphatase PTP1B. L'oxydation induit des changements conformationnels majeurs dans la phosphatase lors desquels la fente du site actif s'ouvre à la fois pour exposer des résidus catalytiques critiques et pour présenter de nouvelles surfaces de liaison sur la protéine. Les auteurs ont exploité ces nouvelles surfaces de liaison propres à la forme oxydée de l'enzyme pour générer le scFv45 spécifique de la conformation oxydée de la PTP1B *in vitro*. L'expression de l'intracorporel scFv45 stabilise la conformation oxydée de la phosphatase en retardant sa réduction et sa réactivation, déplaçant ainsi l'équilibre vers la phosphorylation de la sous-unité β du récepteur à l'insuline et la signalisation accrue et durable en réponse à l'insuline (Haque et al., 2011).

La liaison du scFv G9 à la p38 α entraîne également une inhibition de la phosphorylation de la kinase par son principal activateur en amont, MKK6. Cette inhibition, comme observée avec les 5 scFv isolés, est probablement due à un encombrement stérique, prévenant l'accès de l'enzyme MKK6, protéine de 37 kDa, à la p38 α . Cette hypothèse reste à être démontrée par des essais de pull-down de MKK6 par précipitation de la p38 α en présence des scFv.

L'identification de l'épitope d'interaction entre la p38 α et le scFv G9 nous permettra d'identifier un site d'intérêt pharmacologique pour le développement d'inhibiteur spécifique de la p38 α . La très grande majorité des inhibiteurs chimiques actuels ciblant l'isoforme α reconnaissent également l'isoforme p38 β . La connaissance des résidus impliqués dans l'interaction pourra permettre la sélection de petites molécules inhibitrices capables de reproduire l'interaction entre G9 et p38 α . Les interactions protéines-protéines impliquent classiquement des surfaces de contact plus planes que celles formées par des molécules chimiques et l'interaction entre le scFv G9 et la p38 α ne pourrait peut-être pas être reproduite avec des molécules chimiques. Toutefois, des travaux précédents menés

au sein de l'équipe ont montré qu'il était possible de convertir l'épitope d'un anticorps inhibiteur dirigé contre le domaine SH2 de la tyrosine kinase Syk en une molécule chimique par l'utilisation d'un test de déplacement de l'anticorps pour le criblage de banque de molécules. Ces molécules sont capables de reproduire les effets de l'intracorps au sein de cultures cellulaires et le phénotype d'inhibition de choc anaphylactique dans des modèles animaux une fois administrées par voie orale (Mazuc et al., 2008; Villoutreix et al., 2011).

Les anticorps inhibiteurs G9 et B2 sont en cours de caractérisation dans des modèles cellulaires pour évaluer leur capacité à inhiber l'activité de la p38 α endogène en tant qu'intracorps.

Les scFv ont comme principal inconvénient leur manque de stabilité qui peut mener à la formation d'agrégats lorsqu'ils sont exprimés dans l'environnement réducteur intracellulaire par l'absence de formation des ponts disulfures. Bien que l'inhibition d'enzymes *in vitro* par des anticorps ait souvent été décrite, très peu de ces inhibiteurs se sont avérés efficaces *in vivo* par manque de stabilité menant à une faible concentration en anticorps fonctionnel soluble et à une demi-vie limitée pour cause d'agrégation. Les nanobody, constitués du domaine variable des chaînes lourdes d'Ac de camélidés, sont très intéressants pour la modulation de l'activité de protéine cible dans les cellules et l'étude de leur fonction dans les voies de signalisation. Ces molécules constituées d'un domaine unique sont généralement plus stables que les scFv et offrent la possibilité d'atteindre des sites catalytiques enfouis dans les cryptes d'enzyme grâce à l'extension formée par leur boucle CDR3 (Genst et al., 2006). Ne reconnaissant pas les mêmes épitopes, l'utilisation des nanobody et des scFv sont fortement complémentaires pour couvrir la diversité épitopique d'une cible. D'autres « scaffolds » protéiques ont également été conçus pour la génération d'inhibiteur enzymatique. Des protéines de liaison synthétiques, construites à partir d'une base moléculaire non dérivée d'immunoglobuline, permettent de limiter les problèmes de stabilité des fragments d'anticorps dans le milieu intracellulaire. Ces protéines de différentes structures (Affibody, DARPin, Monobody, Anticalin etc.) ont comme propriétés communes une petite taille et une grande stabilité dans le milieu intracellulaire réducteur due à l'absence de pont disulfure dans leur structure. Ces protéines synthétiques peuvent lier des protéines avec une spécificité et une affinité de l'ordre du nanomolaire comparables à celles des molécules d'anticorps. De plus, la variabilité dans la nature de leur « squelette » de base et leur caractère modulable a permis de générer des protéines de liaison synthétiques capables de lier différentes topographies en surface de protéines (concave, convexe, plane) élargissant ainsi les types d'épitopes pouvant être reconnus (Sha et al., 2017). Parmi ces protéines de liaison synthétiques, les Monobody ont principalement été décrits comme liant des surfaces fonctionnelles de leur molécule cible. Plusieurs exemples de Monobody ont été décrits comme modulant de manière allostérique les fonctions des protéines. Un monobody se liant au domaine SH2 du variant oncogénique BCR-ABL de la

kinase ABL perturbe l'interaction intramoléculaire du domaine SH2 avec la kinase conduisant ainsi à l'inhibition de la kinase et à la mort des cellules dans des lignées cellulaires de leucémie myéloïde chronique (Wojcik et al., 2016). Un second monobody dirigé contre la GTPase RAS et plus particulièrement au niveau de son interface de dimérisation conduit au blocage de l'hétérodimérisation et de la transformation induite par les oncogènes H-RAS et K-RAS (Spencer-Smith et al., 2017). Bien que ces monobody aient conduit à la découverte de sites allostériques majeurs pour l'inhibition de protéines kinases impliquées dans les processus tumoraux, la régulation allostérique est obtenue via la modulation des interactions protéine-protéine parmi les domaines d'une même protéine ou parmi les complexes protéiques et non pas de la modulation de l'équilibre conformationnel au sein d'une seule protéine globulaire telle que notre cible p38.

Les formats alternatifs ont été développés pour pallier aux limites de l'utilisation des anticorps conventionnels dans le milieu intracellulaire. Cependant, bien qu'ils présentent des niveaux d'expression intéressants, la diversité pouvant être introduite dans ces molécules reste limitée. Les scFv sont obtenus à partir des anticorps produits par notre système immunitaire. Ces molécules sont conçues pour reconnaître et interagir avec de nombreux motifs de natures chimiques différentes. La grande variabilité de leur répertoire produit entre autre par la recombinaison des gènes V, D et J permet de cibler n'importe quel motif antigénique. De plus, la banque HUSCI à partir de laquelle ont été isolés les anticorps a été optimisée pour l'obtention d'intracorps stables et solubles. Sur les 5 séquences de scFv anti-p38 α identifiées, 2 scFv, soit 40% des clones obtenus sont solubles dans le cytoplasme des cellules. Ce pourcentage est bien supérieur aux 1 à 10% prédits d'anticorps fonctionnels en tant qu'intracorps à partir des banques non optimisées (Auf der Maur et al., 2004). Nous espérons ainsi, avec la mise au point des conditions expérimentales de notre test phénotypique de productions de cytokines, pouvoir observer une inhibition de l'activité kinase de la p38 α intracellulaire.

MATERIELS ET METHODES

I. Criblage de la banque HUSCI par Phage Display

A. Plasmide et bactéries

Le vecteur phagemide pHEN1 (Figure 45), dérivé du vecteur pUC119, est utilisé pour le clonage et l'expression des scFv. Il contient : le promoteur *lacZ* permettant l'induction de l'expression des scFv par l'addition d'IPTG (analogue du lactose), une séquence signal *pe/B* permettant l'exportation des fragments d'anticorps dans le périplasma des bactéries, les sites de restriction *NcoI* et *NotI* encadrant le site de multiclonaage, le tag c-myc, un codon Ambre, la séquence du gène pIII codant pour la protéine mineure d'enveloppe pIII du phage filamenteux M13 ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline. Le codon Ambre situé entre les séquences codantes du scFv et du gène pIII permet en fonction de la souche bactérienne utilisée, l'expression du scFv sous la forme d'une protéine de fusion avec la protéine d'enveloppe pIII ou sous la forme d'un fragment soluble sans nécessité de recloner le gène.

Les bactéries *E. coli* TG1 de génotype K-12 *supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB- hsdSM5) (r_K- m_K-) [F' traD36 proAB lac^r ZΔM15]* ont été utilisées pour l'amplification des phages sélectionnés par phage display au cours des 3 tours de sélection effectués. Cette souche code pour un ARN de transfert suppresseur de codon Ambre (TAG) qui est alors traduit en glutamine, permettant ainsi l'expression du scFv sous la forme d'une protéine de fusion à la surface du phage.

La souche non-suppressive HB2151 d'*E. coli* de génotype K-12 [*F'proA+B+lacIq lacZΔM15*]*ara Δ(lac-pro) thi* reconnaît quant à elle le codon Ambre comme un codon stop et permet la production des scFv en format soluble. Cette souche est utilisée pour le criblage des clones scFv par ELISA.

B. Sélection de scFv contre la p38α par phage display

Trois cycles de sélection-amplification sont réalisés à partir de la banque naïve de phages HUSCI. Avant le lancement du premier cycle de sélection, trois phases d'épuisement de respectivement 15 min, 30 min et 1h sont réalisées sur l'isoforme p38β à 10μg/mL.

Pour chaque cycle de sélection, 100μL d'antigènes purifiés sont fixés dans un puits d'une plaque Nunc Maxisorp 96 puits à la concentration de 10μg/mL en milieu PBS à 4°C pendant 16h. Après trois lavages en milieu PBS-T 0.1%, les puits sont saturés pendant 2h à température ambiante avec 200 μL de milieu MPBS (PBS-lait écrémé 2%) pour les 1^{er} et 3^{ème} cycles ou PBS-BSA 2% pour le 2^{ème} cycle. Entre 10¹¹ à 10¹² phages de la librairie sont introduits par puits dans le même milieu que celui utilisé

pour la saturation et incubés 2 h à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés 20 fois pour le 1^{er} cycle de sélection ou 40 fois pour les 2^{ème} et 3^{ème} cycles avec du PBS-T 0.1% puis 3 fois avec du PBS, éliminant ainsi tous les phages ne s'étant pas fixés à l'antigène. Les phages sont ensuite élués avec 100µL de tampon Trypsine fraîchement préparé (Trypsine 125µg/mL TPCK-treated Sigma[®], Tris 50 mM pH8, CaCl₂ 1 mM) pendant 15 min à température ambiante. A l'issue de l'éluion, la suspension de phages élués est utilisée pour infecter 200 µL de bactéries TG1 (DO_{600nm} ≈ 0.5) en milieu 2xYT (Yeast Tryptone) pendant 1h à 37°C sous agitation 150 rpm. Les bactéries TG1 infectées par les phages sont ensuite culotées par centrifugation (3000 g pendant 10 min) et resuspendues dans 500µL de milieu 2xYT, Ampicilline 100µg/mL, Glucose 2% et incubées à 30°C sous agitation 200 rpm jusqu'au lendemain. Vingt microlitres de cette culture sont réensemencés dans 1 mL de nouveau milieu 2xYT, Ampicilline 100µg/mL, Glucose 2% et incubés 1h à 37°C 180 rpm pour préparer un nouveau stock de phages en utilisant le phage helper infectieux KM13 (Kristensen and Winter, 1998).

Le phage helper KM13 est ajouté 20 fois en excès à la culture bactérienne ($\approx 1 \times 10^8$ bactéries) et incubé pendant 1 h à 37°C sous agitation 150 rpm. Après centrifugation (3000 g, 30 min), le culot bactérien est resuspendu dans 500 µL de milieu 2xYT, Ampicilline 100µg/mL, Kanamycine 25µg/mL à 30°C sous forte agitation (200 rpm) jusqu'au lendemain. Les phages, contenus dans le surnageant de culture, sont précipités par l'ajout d'un cinquième du volume de PEG-8000 20%, NaCl 2.5 M pendant 1 h à 4°C puis resuspendus dans 100µL de milieu PBS, 15% Glycerol après centrifugation (10 000g, 10 min à 4°C).

La quantification des bactériophages présents dans le nouveau stock de phage se fait en utilisant la formule établie par George P. Smith (Université du Missouri, USA) après mesure de l'absorbance à 269 nm et 320 nm par spectrophotométrie.

Environ 10^{11} - 10^{12} phages de ce stock de phage enrichi sont utilisés pour le prochain cycle de sélection.

C. Criblage des scFv

Pour le criblage des clones amplifiés, 200 µL de bactéries de la souche non-suppressive HB2151 sous croissance exponentielle en milieu LB à 37°C sont infectées avec 10 µL des suspensions de phages obtenues à l'issue du 3^{ème} cycle de sélection pendant 30 min à 37°C au bain marie, puis étalées sur boîtes de Pétri (LB, Ampicilline 100 µg/mL, 1% Glucose).

Après incubation à 37°C pendant 16h, des colonies isolées sont repiquées dans une plaque 96 puits dans 200 µL de milieu 2xYT Ampicilline 100µg/mL, 1% Glucose et mises en culture à 37°C sous agitation 200 rpm. Le lendemain, dans une nouvelle plaque 96 puits, 5 µL de la culture de la première

plaque (Master Plate) sont transférés dans 200µL de nouveau milieu 2xYT, Ampicilline 100 µg/mL, 0.1% Glucose à 37°C sous agitation jusqu'à obtenir une $DO_{600nm} \approx 0.9$. L'induction de l'expression des scFv est alors déclenchée par l'ajout d'IPTG à une concentration finale d'1 mM et la plaque est incubée pendant 20h à 30°C sous forte agitation (220 rpm). Après centrifugation des bactéries (2000 rpm, 20 min), 50 µL du surnageant de chaque puits est utilisé pour détecter par ELISA la spécificité de liaison de chaque clone scFv envers l'antigène fixé dans une plaque Nunc Maxisorp 96 puits. La révélation est effectuée avec l'anticorps monoclonal c-myc 9E10 couplé HRP.

D. Purification des plasmides bactériens codant les scFv sélectionnés

Une culture des bactéries HB2151 des clones scFv sélectionnés est réalisée à partir des Master Plates dans 2 mL de milieu LB, Ampicilline (100 µg/mL), 1% glucose et incubée pendant 16h à 37°C sous agitation (200 rpm). La purification se fait selon le protocole du kit ZR Plasmid Miniprep™ Classic (Zymo Research). L'ADN plasmidique purifié obtenu est ensuite envoyé au séquençage (sous-traitance par MWG).

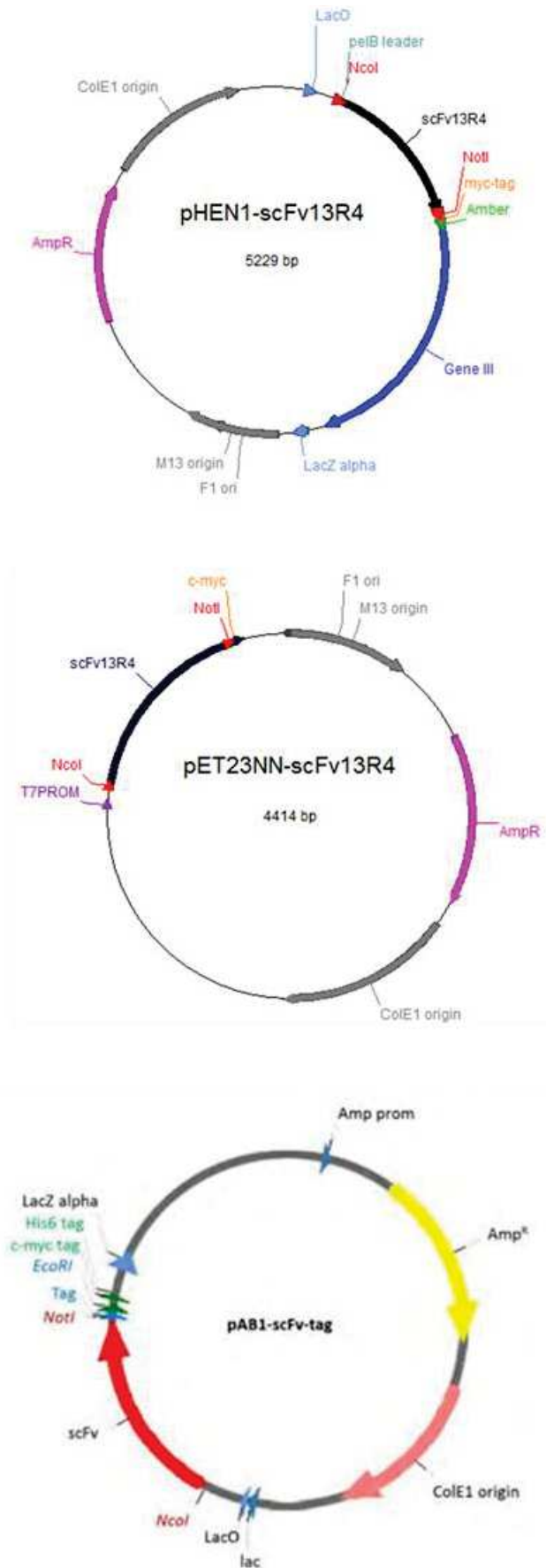


Figure 45: Cartes plasmidiques des différents vecteurs phagemide et bactériens utilisés.

II. Productions et purifications protéiques

A. Expression des fragments d'anticorps en système bactérien

Les vecteurs d'expression pAB1 et pET23NN ont été utilisés pour produire les scFv respectivement dans le périplasme ou le cytoplasme des souches bactériennes HB2151 ou BL21(DE3).

1. Préparation de bactéries compétentes au RbCl

1. Pré-culture des bactéries dans 3 mL de LB sur la nuit à 37°C sous agitation.
2. Ensemencement dans 250 mL de LB + MgSO₄ 20 mM, jusqu'à D₀₆₀₀ = 0,4-0,6
3. Centrifugation à 4000 rpm 10 min à 4°C.
4. La suite des étapes doit être réalisée avec du matériel à 4°C (tampons, pipettes, tubes,...)
5. Resuspension du culot dans 100 mL de TFB1 froid (soit 1/2,5 du volume de départ)
6. Incubation 5 min sur glace
7. Centrifugation à 4000 rpm 10 min à 4°C
8. Resuspension du culot dans 10 mL de TFB2 froid (soit 1/25 du volume de départ)
9. Incubation sur glace entre 15 et 60 min avant d'aliquoter en 100 µL/tube
10. Stockage des bactéries compétentes à -80°C.

Composition des solutions :

TFB1 : 30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15 % glycerol, pH 5,8

TFB2 : 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % glycerol, pH 6,5

2. Production de scFv en périplasme de HB2151

Le vecteur pAB1 (Figure 45) contient un promoteur *lac* et une séquence signal *Pe/B* qui permet la sécrétion du scFv dans le périplasme de la souche HB2151 par induction à l'IPTG. Le périplasme est un milieu oxydant qui permet la formation des ponts disulfures. De plus il est riche en protéines chaperones qui aident au repliement des fragments d'anticorps produits. Les scFv sont ensuite extraits du périplasme grâce à une lyse par choc osmotique. Le choc osmotique consiste à utiliser une solution hypertonique contenant du saccharose pour faire gonfler les membranes bactériennes. L'utilisation d'une solution hypotonique contenant des ions magnésium va ensuite libérer le contenu périplasmique.

a. Production périplasmique

Le milieu 2x TY est utilisé (tryptone 16 g/L, extrait de levure 10 g/L, NaCl 5 g/L).

1. Ensemencement d'un clone en 2xTY, ampicilline 100 µg/mL, glucose 2% à 37°C
2. Culture sur la nuit à 37°C sous agitation 250 rpm.
3. Le lendemain, dilution au dixième dans 2xTY, ampicilline 100µg/mL, glucose 0.1%. Culture à 37°C sous agitation 250 rpm jusqu'à une DO₆₀₀ d'environ 0,5 – 0,7. A ce moment tout le glucose a été consommé.
4. Induction à l'IPTG 1mM final
5. Incubation à 30°C 250rpm pendant 4h
6. Refroidissement de la culture sur glace
7. Centrifugation 10 min à 4000 rpm à 4°C. Surnageant : fraction milieu de culture à jeter

b. Lyse par choc osmotique

1. Resuspension du culot bactérien dans 1/20 volume de Tris-HCl 30mM pH 8, EDTA 1mM, saccharose 20%. Ce milieu hypertonique va faire gonfler la membrane bactérienne.
2. Incubation 20min sur glace
3. Centrifugation 10 min-6000g-4°C. Normalement les membranes n'ont pas encore été lysées donc il ne devrait pas y avoir de protéines dans le surnageant.
4. Resuspension du culot dans 1/20 volume de MgSO₄ ou MgCl₂ 5mM dissout dans l'eau et préalablement refroidi. Homogénéisation jusqu'à bien resuspendre tout le culot.
5. Incubation 20 min sur glace. Le périplasme est alors libéré.
6. Centrifugation 10 min-6000g-4°C
7. Le surnageant correspond au périplasme (fraction périplasmique)
8. Le culot contient des «sphéroplastés » qui sont constitués par le cytoplasme et la membrane interne de la bactérie.
9. Si l'on souhaite séparer le cytoplasme et la fraction insoluble, on peut congeler le culot à -20°C et le reprendre en tampon de lyse : HEPES, NaCl, EDTA, lysozyme, NP40 (voir le protocole de production en cytoplasme) puis centrifuger.

3. Production de scFv en cytoplasme de BL21(DE3)

a. Production cytoplasmique

Les scFv ont été induits à l'IPTG selon le même protocole que celui de la production périplasmique. Seule la lyse des culots bactériens diffère.

Les bactéries *E. coli* BL21 de génotype *F⁻, ompT, hsdSB(r_B-m_B), dcm, gal, λ (DE3), [pLysS, Cm^r]* ont été utilisées pour l'expression des fragments d'anticorps à partir du vecteur plasmidique pET23NN (Figure 45). Ce plasmide est dérivé du pET23d(+) (Novagen) et permet le clonage des gènes des scFv encadrés par les sites de restriction des enzymes *NcoI*, contenant le codon d'initiation ATG, et *NotI*.

Les vecteurs d'expression pET23NN-scFv possèdent également les séquences codant pour les étiquettes c-myc et polyhistidine (6xHis) placées en aval du gène du scFv, facilitant respectivement une immuno-détection avec l'anticorps monoclonal anti c-myc 9E10 et la purification de la protéine par chromatographie d'affinité.

Le vecteur pET23NN contient un promoteur T7 qui est reconnu par l'ARN polymérase du phage T7. Cette enzyme très active est codée par le prophage λDE3 inséré dans le chromosome de la souche BL21(DE3). Cette polymérase est sous le contrôle du promoteur inductible lacUV5 (Studier and Moffatt, 1986). Ainsi, en l'absence d'induction du promoteur lacUV5, peu d'ARN polymérase T7 et de scFv sont présents, ce qui permet une bonne croissance des bactéries. Lorsqu'un inducteur comme l'IPTG est ajouté, l'ARN polymérase est produite et va permettre la transcription du scFv qui va ensuite être traduit et s'accumuler dans le cytoplasme.

Le contenu cytoplasmique (fraction soluble) est obtenu par congélation des bactéries et resuspension dans un tampon de lyse contenant du lysozyme et un détergent, le NP-40. Toutes les protéines qui ne sont pas solubilisées à cette étape sont des agrégats et constituent la fraction insoluble.

b. Lyse des bactéries

1. Reprise du culot congelé à -20°C pendant 30 min dans du tampon de lyse (même volume que le volume de culture dont le culot est issu) : Tris 20 mM pH 8, EDTA 0,5 mM, NaCl 30 mM, Nonidet P-40 0,65% (w/v) ; lysozyme de blanc d'oeuf de poule (Sigma Aldrich) 0,1 mg/mL ; Benzonase® Nuclease (Merck Millipore) 2U/mL
2. Incubation 1h à 4°C sous agitation
3. Sonication des échantillons (400 Watt, amplitude 20%, pulse 1 sec pendant 1 min)
4. Ajout de NaCl 100 mM pour arriver à une concentration physiologique de 130 mM
5. Centrifugation à 8 000 rpm pendant 40 min à 4°C

6. Une filtration du surnageant sur filtre 0,45 μm de diamètre permet d'éliminer les débris cellulaires et de récupérer les lysats totaux qui correspondent à la fraction soluble (cytoplasme + périplasme). Le culot correspond à la fraction insoluble (agrégats de protéines et membranes).

B. Expression des p38 α et p38 α P en système bactérien

1. Production de p38 α en BL21(DE3)

La protéine p38 α est clonée dans le vecteur pET (origine de réplication pBR322, résistance Ampicilline) avec une étiquette polyhistidine (6xHis) placée en aval du gène. La p38 α a été produite chez *E. coli* BL21(DE3) après induction à l'IPTG selon le même protocole que les scFv produits en cytoplasme de BL21(DE3). Seules changent la concentration en IPTG et le temps d'induction :

- Induction à l'IPTG 0,3 mM final
- Induction à 30°C, 250 rpm pdt 5h

2. Production de p38 α P en BL21(DE3)

La protéine p38 α phosphorylée a été produite en bactéries *E. coli* BL21(DE3). Pour cela la p38 α a été coexprimée avec l'enzyme MKK6-EE constitutivement active dans le cytoplasme des bactéries.

Les bactéries BL21(DE3) compétentes ont dans un premier temps été transformées avec le plasmide pACYC184 codant la protéine GST-3xHA-MKK6-EE (origine de réplication p15A, résistance au Chloramphénicol (Chlor)). Un stock de bactéries compétentes a été réalisé selon le protocole décrit précédemment (Cf. « Préparation de bactéries compétentes au RbCl ») à partir d'un clone BL21(DE3) sélectionné sur milieu LB-Chlor ayant intégré le transgène. Les bactéries BL21(DE3)MKK6-EE compétentes ont ensuite été transformées avec le plasmide pET codant la p38 α et les bactéries sélectionnées sur milieu LB-Amp-Chloramphénicol. La p38 α P est produite dans le cytoplasme des BL21(DE3)MKK6-EE après induction à l'IPTG selon le même protocole que pour la production de p38 α .

Les culots bactériens des différentes productions sont ensuite lysés selon le même protocole que décrit précédemment (Cf. « lyse des bactéries »). Après purification, le niveau de phosphorylation des p38 α et p38 α P est évalué par Western-Blot grâce à l'anticorps Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182, Cell Signaling Technology).

C. Purification des productions protéiques par chromatographie d'affinité

Les scFv, p38 α et p38 α P provenant des lysats totaux bactériens ainsi que les scFv des fractions périplasmiques ont ensuite été purifiés par chromatographie d'affinité sur résine de cobalt (TALON[®] Metal Affinity Resin, Clontech) grâce à leur tag 6His.

Chaque lysat est préalablement dilué avec 1 volume de PBS 2x (Phosphate Buffer Saline 1x : NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2mM, pH 7,4) auquel est ajouté 10 mM final de Mg²⁺ pour être chélaté par l'EDTA qui pourrait décrocher les cations divalents de la résine lors de la purification, ainsi que 5 mM d'imidazole pour que la fixation sur la résine cobalt soit plus spécifique. Les protéines sont éluées en présence de 200 mM d'imidazole.

Les fractions purifiées sont ensuite dessalées sur colonne de dessalage PD-10 (Amersham Biosciences) pour éliminer les sels et l'imidazole présents dans les échantillons qui pourraient interférer avec les expériences d'immunoprécipitation et pour permettre la conservation des productions de scFv dans du tampon PBS 1X et les p38 α et p38 α P en tampon Tris HCl 50 mM pH 7,5, KCl 100 mM, DTT 0,5 mM, Glycérol 5%.

Après dialyse, l'absorbance à 280 nm est mesurée afin d'estimer la concentration en protéine selon la loi de Beer-Lambert $A_{\lambda} = \epsilon l C$ (A : absorbance ; ϵ : coefficient d'extinction spécifique ; l : longueur de la cuve ; C : concentration).

$$\epsilon \text{ scFv} = 1.6 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon \text{ p38}\alpha = 1,13 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

On obtient ainsi des quantités produites de l'ordre de 0,3 – 1,5 mg et 5 – 20 mg de scFv pur pour 500 mL de culture bactérienne pour les productions périplasmiques et cytoplasmiques respectivement. Pour les productions cytoplasmiques de p38, on obtient 22 mg de p38 α et 4,7 mg de p38 α P pur pour 500 mL de culture bactérienne.

III. Modulation de l'activité kinase de la p38 α par les scFv sélectionnés

A. Mesures de l'activité enzymatique

1. Analyse par WB

a. Réaction de phosphorylation *in vitro* de la p38 α par MKK6-EE

La p38 α est phosphorylée par l'enzyme MKK6-EE constitutivement active en présence d'ATP : un μ g de p38 α est incubé en présence de 10 ng de MKK6-EE, 200 μ M d'ATP et de 2 μ g de chaque scFv testé en tampon kinase (Cell Signaling Technology) QSP 25 μ L.

La réaction enzymatique est maintenue à 22°C pendant 14h. L'équivalent de 400 ng de p38 α est déposé sur gel SDS-PAGE et le niveau de phosphorylation est quantifié par Western-Blot grâce à l'anticorps Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182, Cell Signaling Technology) et est normalisé par rapport au signal de la p38 α , révélée grâce à l'anticorps monoclonal anti-polyHistidine-Peroxydase (HIS-1 Sigma-Aldrich).

b. Réaction de phosphorylation *in vitro* du substrat ATF2

Le substrat des p38 ATF2 est phosphorylé par les p38 α ou p38 β en présence d'ATP. Les kinases p38 α et p38 β ont été préalablement activées *in vitro* par l'enzyme MKK6-EE. Deux μ g d'ATF2 (Cell Signaling) sont incubés en présence de 100 ng de p38, 200 μ M d'ATP et de 1 μ g de scFv total en tampon kinase (Cell Signaling Technology) QSP 25 μ L.

La réaction enzymatique est maintenue à 30°C en bain sec pendant 40 min. L'équivalent de 1,6 μ g d'ATF2 est déposé sur gel SDS-PAGE et le niveau de phosphorylation est quantifié par Western-Blot grâce à l'anticorps Phospho-ATF-2 (Thr71, Cell Signaling Technology).

2. Analyse par le système ADP-Glo™

Dans un premier temps, la p38 α P (30 nM) a été incubée en présence de différentes concentrations de l'inhibiteur SB202190 (de 2500 à 5 nM) ou des scFv G9, B2 ou 13R4 (de 3000 à 11 nM) ainsi que du peptide synthétique servant de substrat de p38 (200 μ g/mL ; IPTTPITTTYFFFKKK, SignalChem) dans un Tampon Kinase (Tris 40mM pH7.5, MgCl₂ 20 mM, DTT 50 μ M, BSA 0.1 mg/mL). Après 20 min d'incubation à température ambiante, l'ATP (150 μ M) a été rajouté afin de lancer la réaction enzymatique. La réaction a été stoppée après 60 min d'incubation à température ambiante. L'ADP produit au cours d'une réaction enzymatique est ensuite quantifié par un test de luminescence grâce au kit ADP-Glo™ (Promega).

Pour les tests de compétition avec l'ATP, les concentrations d'ATP testées sont : 1000, 650, 500, 400, 325, 250, 200, 100, 50, 0 μ M. Chaque concentration d'ATP a été associée à différentes concentrations de scFv G9 : 300, 250, 200, 150, 100 nM. La réaction a été stoppée après 30 min d'incubation afin de se situer dans la phase initiale de la réaction enzymatique durant laquelle la vitesse est linéaire.

B. Mesure par fluorescence de la liaison au site ATP

L'inhibiteur de kinase SKF86002 (Sigma), analogue de l'ATP, est utilisé comme rapporteur de fluorescence. Le signal de fluorescence est mesuré sur FLEXstation 3 (plateforme Arpege, Pharmacologie Criblage Interactome, IGF) à la longueur d'onde $\lambda_{\text{émis}}$ 420 nm pour une λ_{exc} 340 nm. Une cinétique de 200 sec a été réalisée pour chaque acquisition. Les concentrations utilisées sont : p38 α 200 nM, SKF86002 200 nM, SB202190 2 μ M et scFv 1 μ M en tampon kinase (Cell Signaling Technology).

Le signal de fluorescence à 420 nm est normalisé sur le signal obtenu avec la p38 α seule (0) et complexée au composé SKF86002 (1) avec R. Une diminution du signal de fluorescence correspond à une compétition du composé testé avec l'analogue de l'ATP.

IV. Caractérisation du scFv G9 *in vitro*

A. Mesures des constantes d'affinité par SPR

Les analyses SPR ont été effectuées sur un appareil Biacore T200 à 25°C sur puce dextran CM5S. L'anticorps monoclonal c-Myc 9E10 (Santa Cruz Biotechnology) est immobilisé par couplage covalent sur une puce CM5S à un niveau de 7540 RU en tampon acétate 10mM pH5. Le scFv G9 est ensuite injecté à 50 nM en tampon Tris 50 mM, KCl 100 mM et est capturé grâce à son étiquette c-myc à un niveau de 400 RU sur l'anti-c-Myc 9E10. Les p38 α et p38 α P sont ensuite injectées sur le scFv G9 pendant 180 sec, à différentes concentrations (1,6 à 200 nM) dans le même tampon mais en présence de DTT (0,5 mM). Après 400 sec de dissociation dans le tampon de flux Tris 50 mM, KCl 100 mM le biocapteur est régénéré par un pulse de glycine 10 mM pH 1,7. Les valeurs de K_D ont été calculées en modèle « steady state » par le logiciel d'évaluation T200 version 3. Tous les sensorgrammes ont été corrigés par double soustraction du blanc tampon et du signal obtenu sur le canal contrôle (sans anticorps c-Myc immobilisé).

Ces analyses ont été effectuées par la plateforme PP2I (Plateforme Protéomique Imagerie et Interactions moléculaires, IRCM).

B. Réactions de couplage

Les agents de pontage clivables CDI (1,1'-carbonyldiimidazole, Sigma-Aldrich) et BuUrBu (disuccinimidyl dibutyric urea, Sigma-Aldrich) ont été utilisés pour les réactions de couplage entre le scFv G9 et la p38 α .

Pour la réaction de couplage avec le CDI, 10 μ M de scFv G9 ont été incubés à RT pendant 40 min en présence de 10 μ M de p38 α avant l'ajout de 500 μ M de CDI dans une solution d'Hepes à 20 mM. La réaction est stoppée au bout de 60 min par l'ajout de 10 mM de Tris pH 8.

Pour la réaction avec le BuUrBu, une première réaction de pontage entre le scFv G9 et la p38 α à 5 μ M chacun a été réalisée avec une gamme de BuUrBu (0 à 1 mM) afin de définir les conditions de couplage qui serviront à l'analyse MS-MS. Les conditions retenues ont été scFv G9 5 μ M, p38 α 5 μ M et BuUrBu 50 μ M. Les réactions sont réalisées à RT sans préincubation de la p38 α avec le scFv G9 et stoppées par l'ajout de 2mM de Tris pH8.

Dans les deux cas la totalité de la réaction de couplage est déposée sur gel SDS-PAGE 10% et colorée au bleu de Coomassie au bout de 15 min de migration à 100 V et 10 min à 150 V. La bande de la réaction de couplage est ensuite découpée sur gel.

Les échantillons sont ensuite déshydratés à l'acétonitrile, réduits au DTT (10 mM dans NH_4HCO_3 100 mM, 45 min à 56°C), alkylés à l'iodoacétamide (55 mM dans NH_4HCO_3 100 mM, 30 min) avant d'être digérés à la trypsine sur la nuit (5ng/ μl final à 37°C). Les peptides sont ensuite purifiés sur Zip Tip Agilent et analysés en spectrométrie de masse MS-MS après séparation sur une colonne C18 (Discovery Bio Wide Pore C18-3 10cm x 0.5mm, 3 μm (Cat#:65518-U) de Supelco) et analysés par la plateforme PP2I.

V. Caractérisation des scFv en tant qu'intracorps

Afin d'évaluer le niveau d'expression ainsi que la stabilité et solubilité des scFv une fois exprimé dans le cytoplasme des cellules, les scFv ont été clonés dans différents vecteurs d'expression eucaryotes sous la forme d'une protéine de fusion avec un fluorophore.

A. Transfection transitoire

Les scFv ont été clonés en fusion avec le fluorophore mCherry dans un vecteur d'expression utilisant un promoteur CMV (Cytomegalovirus). Les scFv ont été clonés par la technique d'assemblage dite Golden Gate dans le vecteur pCMV-recipient-mCherry. Cette technique de clonage est dite « scar-free » car elle repose sur l'utilisation d'enzymes de restriction de type II qui sont des endonucléases qui coupent l'ADN en dehors de leur séquence de reconnaissance. Le site de restriction est ainsi éliminé dans la construction finale ce qui permet d'effectuer la digestion et la ligation simultanément (Engler et al., 2008).

1. Construction du vecteur receveur pCMV-Recipient-mCherry

Les oligonucléotides servant à l'introduction du linker de GoldenGate (contenant les sites BbsI) ont dans un premier temps été hybridés. Les sites BbsI sont soulignés.

```
GG_clone.for   CTAGccacccaGTCTTCagatctGAAGACtatcg
GG_clone.rev   GATCcgataGTCTTCagatctGAAGACtgggtgG
```


2. Assemblage des scFv amplifiés avec les amorces BbsI dans le vecteur receveur pCMV-Recipient-mCherry

1. Amplification par PCR des scFv avec les amorces contenant les sites BbsI

Plasmide contenant l'insert scFv	1 ng
H ₂ O	QSP 10 µl
Tampon Hfx5	2 µl
dNTP 10 mM	0,2 µl
13R4_BbsI.for 10 pMoles/µl	0,5 µl
13R4_BbsI.rev 10 pMoles/µl	0,5 µl
Polymerase Phusion (2 u/µl)	0,1 µl

98° 30" ; (98° 5" ; Tm° 10" ; 72° 5")x35 ; 72° 5' ; 4° hold

2. Purification des scFv amplifiés BbsI avec le kit Macherey-Nagel "PCR clean-up and Gel extraction" en diluant le tampon NT1 dans H₂O selon le ratio 1/7 pour enlever les dimères d'oligo BbsI.
3. Assemblage Golden Gate selon rapport vecteur:insert de 1 :2

H ₂ O	QSP 20 µl
Vecteur pCMV-recipient-mCherry	75 ng
Produit PCR purifié scFv-BbsI (insert:vecteur= 2:1)	
Tampon Gx10 (Fermentas)	2 µl
ATP 10 mM	1 µl
BbsI (NEB)	0,5 ul (5 u)
T4 DNA ligase (Fermentas)	0,4 ul (2 u)

Dans un appareil PCR avec couvercle chauffant éteint :

(37°C, 1 min ; 16°C, 1 min) x 30 ; 65°C, 20 min

4. Transformation bactérienne avec 5 µL du produit PCR et criblage des clones positifs sur milieu LB-Kanamycine.

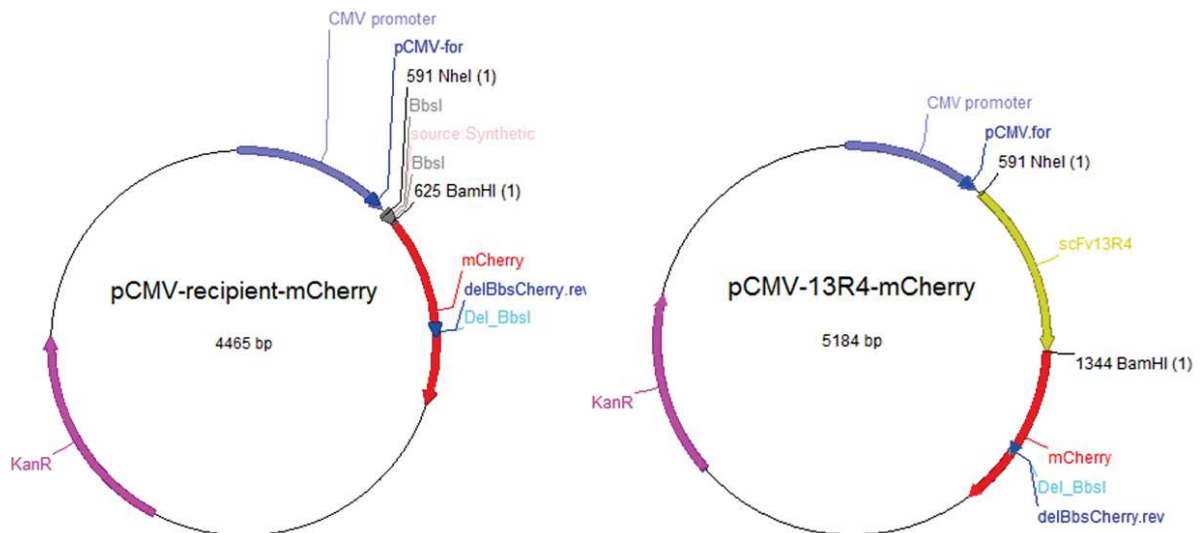


Figure 46: Schéma des vecteurs d'expression eucaryote avant (à gauche) et après (à droite) le clonage Golden-Gate des scFv dans le vecteur receveur. On peut noter la disparition des sites de recombinaison BbsI après la ligation du scFv.

3. Co-Transfection transitoire dans la lignée Hela

1. Ensemencement des cellules Hela (milieu RPMI Glutamax + 10% SVF) en plaque 24 puits sur coverslips ou sur fluorodish pour les acquisitions de FRET.
2. A 50% de confluence (24h post-ensemencement) préparer 1µg d'ADN total par puit selon le rapport p38α/scFv 1:3 (ou 1:4 pour les acquisitions de FRET) dans 150 mM de NaCl stérile pour un volume final de 50 µL et vortexer brièvement.
3. Préparer séparément l'agent transfectant : 2µL de jetPEI (Polyplus transfection) dans 150 mM de NaCl stérile pour un volume final de 50 µL par puit et vortexer brièvement.
4. Ajouter les 50µL de solution jetPEI sur les 50 µL de solution contenant l'ADN et vortexer durant 15 sec.
5. Incuber à RT pendant 15 min
6. Changer le milieu de culture par du milieu frais
7. Déposer au goutte à goutte le contenu du tube (ADN + agent transfectant) dans chaque puit contenant les cellules et homogénéiser en agitant doucement la plaque.
8. Après 5 h d'incubation à 37°C, changer le milieu par du milieu frais pour éliminer les réactifs de transfection.
9. Pour les acquisitions d'épifluorescence, les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde, perméabilisées au Triton et marquées au Hoechst 24h après transfection. Les coverslips ont ensuite été montées sur lame et les images ont été acquises sur un microscope droit Zeiss Imager

M2 + Apotome avec un objectif 63X/1.4 (oil). Pour les acquisitions de FRET, les fluorodish sont observées 24h après transfection. Les images ont été acquises sur un microscope Zeiss LSM 780 multi-photonique avec un objectif 63X Plan Apo (1.4NA).

B. Transfection stable

1. Description du vecteur lentiviral autoinductible « all-in-one »

Afin d'établir des lignées cellulaires stables pour l'expression des scFv, nous avons utilisé un vecteur lentiviral. La p38 α est une protéine de stress cellulaire et la répression de son activité par l'expression continue des scFv pourrait s'avérer être toxique pour les cellules. Nous sommes donc passé par un système d'expression inductible des scFv en utilisant le vecteur lentiviral autoinductible multicistronique dit « all-in-one » pCLX-pTF-R1-DEST-R2-EBR65 (Addgene #45952).

Ce vecteur permet l'expression inductible rapide d'un transgène d'intérêt par l'addition de doxycycline (un dérivé de la tétracycline) au milieu de culture. La transition entre les états ON(expression)/OFF(non-expression) repose sur le système TET-ON optimisé, qui permet une activité basale très basse d'expression du gène et une activité induite à un niveau élevé réversible (Giry-Laterrière et al., 2011).

Ce vecteur multicistronique contient deux cassettes de transcription indépendantes (Figure 47) :

La première contient le transgène d'intérêt (construction scFv-eGFP) cloné suivant le système de recombinaison Gateway (protocole Clonase II d'Invitrogen). L'expression des scFv-eGFP est sous le contrôle du promoteur inductible TET pTF. Ce promoteur pTF contient des opérateurs TetO et le promoteur minimal CaMV S35 (Cauliflower mosaic virus).

La deuxième cassette d'expression contient le promoteur EF-1 α (elongation factor 1 α short) capable de contrôler l'expression simultanée du gène de résistance à la Blastidine et de l'activateur transcriptionnel rtTA (reverse transcriptional TET-transactivator) grâce au peptide viral 2A. Ce peptide 2A permet de coder plusieurs protéines à partir d'une même molécule d'ARNm par « ribosome skipping » (Donnelly et al., 2001).

En présence de doxycycline uniquement, rtTA se lie au niveau des opérateurs TetO du promoteur pTF et induit l'activation du promoteur CaMV S35 et ainsi la transcription des scFv-eGFP.

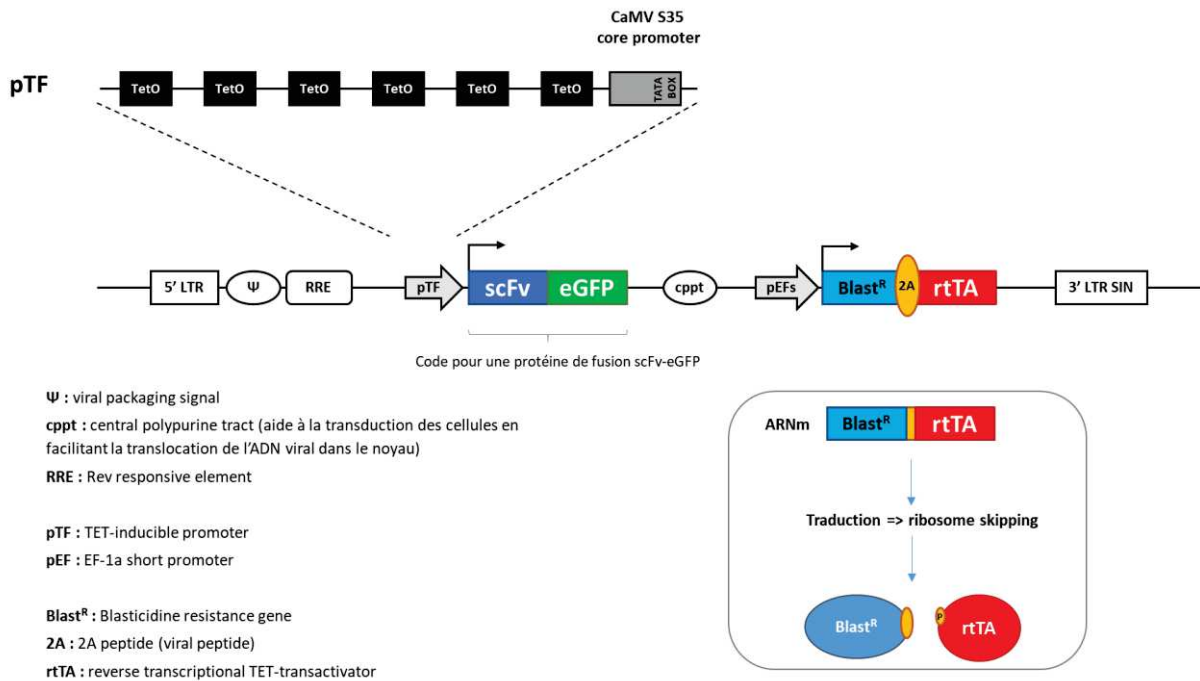


Figure 47: Détails du vecteur lentiviral autoinductible « all-in-one » utilisé pour le clonage des scFv-eGFP.

2. Productions de surnageants contenant les lentivirus

1. La lignée HEK293T estensemencée à 2.10^6 cellules par boîtes de Pétri 10 cm dans 10 mL de milieu DMEM Glutamax + SVF.
2. Après 24h d'incubation à 37°C, les cellules sont transfectées avec 3 vecteurs lentiviraux : 1 µg PSPax2 (Addgene #12260) codant pour les gènes gag et pol du HIV ; 1 µg PMD2G (Addgene #12259) codant la protéine d'enveloppe VSV-G ; 3 µg du vecteur pCLX contenant les transgènes scFv-eGFP.
3. Quinze µL de l'agent de transfection jetPEI (Polyplus transfection) sont utilisés par boîte et le protocole est identique à celui décrit pour les transfections transitoires en cellules Hela.
4. Le temps d'incubation à RT avant le dépôt au goutte à goutte sur les cellules est de 30 min.
5. Une deuxième transfection, identique à la première est réalisée 24h après.
6. Les surnageants de culture des cellules HEK293T contenant les particules virales de lentivirus sont récupérés à J+3 après la 1^{ère} transfection, filtrés (0,45 µm) et directement utilisés pour transduire les cellules d'intérêt ou congelés à -80°C.

3. Transduction de la lignée THP-1

La lignée cellulaire humaine de monocytes THP-1 est mise en contact des surnageants de culture 293T contenant les lentivirus sur la nuit. Les cellules sont ensuite centrifugées (5' à 1200 rpm) et le culot cellulaire est repris en milieu RPMI Glutamax + 10% SVF. L'antibiotique Blasticidine (5µg/mL) est ajouté au milieu de culture 48h après la transduction pour pression de sélection et est maintenu durant toute la durée de culture des cellules.

Le niveau d'expression des scFv-eGFP au sein des cellules THP-1 est contrôlé par fluorescence directe par FACS après addition de doxycycline au milieu de culture.

4. Mesure de la production de TNF-α dans les surnageants de culture cellulaire

Les cellules THP-1 ($5 \cdot 10^5$ cellules/mL) ont été cultivées en présence de PMA (10nM) qui permet la différenciation des cellules en macrophages, et en présence de Doxycycline pour induire l'expression des intracorpores scFv-GFP. Après 48h, les cellules ont été stimulées avec du LPS (100 ng/mL) pendant 4h. Pour certaines expériences, l'inhibiteur chimique de MAPK p38 SB202190 a été préincubé pendant 1 h avant le début de la stimulation au LPS. Les surnageants de culture ont été récoltés puis centrifugés et le TNF-α dosé par ELISA selon le protocole du kit BioLegend.

BIBLIOGRAPHIE

- Adlersberg, J.B. (1976). The immunoglobulin hinge (interdomain) region. *Ric. Clin. Lab.* *6*, 191–205.
- Alonso, G., Ambrosino, C., Jones, M., and Nebreda, A.R. (2000). Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength. *J. Biol. Chem.* *275*, 40641–40648.
- Alvarez, R.D., Barnes, M.N., Gomez-Navarro, J., Wang, M., Strong, T.V., Arafat, W., Arani, R.B., Johnson, M.R., Roberts, B.L., Siegal, G.P., et al. (2000). A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD21): a phase I trial. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *6*, 3081–3087.
- Ambrosino, C., and Nebreda, A.R. (2001). Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biol. Cell* *93*, 47–51.
- Amici, C., Visintin, M., Verachi, F., Paolini, F., Percario, Z., Di Bonito, P., Mandarino, A., Affabris, E., Venuti, A., and Accardi, L. (2016). A novel intracellular antibody against the E6 oncoprotein impairs growth of human papillomavirus 16-positive tumor cells in mouse models. *Oncotarget* *7*, 15539–15553.
- Antman, K.H., and Livingston, D.M. (1980). Intracellular neutralization of SV40 tumor antigens following microinjection of specific antibody. *Cell* *19*, 627–635.
- Askari, N., Beenstock, J., Livnah, O., and Engelberg, D. (2009). p38alpha is active in vitro and in vivo when monophosphorylated at threonine 180. *Biochemistry* *48*, 2497–2504.
- Auf der Maur, A., Tissot, K., and Barberis, A. (2004). Antigen-independent selection of intracellular stable antibody frameworks. *Methods San Diego Calif* *34*, 215–224.
- Azevedo, R., van Zeeland, M., Raaijmakers, H., Kazemier, B., de Vlieg, J., and Oubrie, A. (2012). X-ray structure of p38 α bound to TAK-715: comparison with three classic inhibitors. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *68*, 1041–1050.
- Barrantes, I. del B., and Nebreda, A.R. (2012). Roles of p38 MAPKs in invasion and metastasis. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 79–84.
- Beardmore, V.A., Hinton, H.J., Eftychi, C., Apostolaki, M., Armaka, M., Darragh, J., McIlrath, J., Carr, J.M., Armit, L.J., Clacher, C., et al. (2005). Generation and characterization of p38beta (MAPK11) gene-targeted mice. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 10454–10464.
- von Behring, E., and Kitasato, S. (1991). [The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890]. *Mol. Immunol.* *28*, 1317, 1319–1320.
- Biocca, S., Neuberger, M.S., and Cattaneo, A. (1990). Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells. *EMBO J.* *9*, 101–108.
- Biocca, S., Ruberti, F., Tafani, M., Pierandrei-Amaldi, P., and Cattaneo, A. (1995). Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endoplasmic reticulum, cytosol and mitochondria. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.* *13*, 1110–1115.

Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S., and Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423–426.

Bliss, C.I. (1939). The Toxicity of Poisons Applied Jointly¹. *Ann. Appl. Biol.* 26, 585–615.

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

Boder, E.T., Raeeszadeh-Sarmazdeh, M., and Price, J.V. (2012). Engineering antibodies by yeast display. *Arch. Biochem. Biophys.* 526, 99–106.

Böldicke, T. (2007). Blocking translocation of cell surface molecules from the ER to the cell surface by intracellular antibodies targeted to the ER. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 54–70.

Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J.-J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2003). Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev.* 17, 1969–1978.

Bühler, S., and Laufer, S.A. (2014). p38 MAPK inhibitors: a patent review (2012 - 2013). *Expert Opin. Ther. Pat.* 24, 535–554.

Bulavin, D.V., and Fornace, A.J. (2004). p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Adv. Cancer Res.* 92, 95–118.

Bulavin, D.V., Phillips, C., Nannenga, B., Timofeev, O., Donehower, L.A., Anderson, C.W., Appella, E., and Fornace, A.J. (2004). Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat. Genet.* 36, 343–350.

Burke, B., and Warren, G. (1984). Microinjection of mRNA coding for an anti-Golgi antibody inhibits intracellular transport of a viral membrane protein. *Cell* 36, 847–856.

Cabantous, S., Nguyen, H.B., Pedelacq, J.-D., Koraïchi, F., Chaudhary, A., Ganguly, K., Lockard, M.A., Favre, G., Terwilliger, T.C., and Waldo, G.S. (2013). A new protein-protein interaction sensor based on tripartite split-GFP association. *Sci. Rep.* 3, 2854.

Campbell, R.M., Anderson, B.D., Brooks, N.A., Brooks, H.B., Chan, E.M., De Dios, A., Gilmour, R., Graff, J.R., Jambrina, E., Mader, M., et al. (2014). Characterization of LY2228820 dimesylate, a potent and selective inhibitor of p38 MAPK with antitumor activity. *Mol. Cancer Ther.* 13, 364–374.

Cardinale, A., Filesi, I., and Biocca, S. (2001). Aggresome formation by anti-Ras intracellular scFv fragments. The fate of the antigen-antibody complex. *Eur. J. Biochem.* 268, 268–277.

Carlson, J.R. (1988). A new means of inducibly inactivating a cellular protein. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2638–2646.

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

- Cassimeris, L., Guglielmi, L., Denis, V., Larroque, C., and Martineau, P. (2013). Specific in vivo labeling of tyrosinated α -tubulin and measurement of microtubule dynamics using a GFP tagged, cytoplasmically expressed recombinant antibody. *PLoS One* 8, e59812.
- Chan, C.E.Z., Lim, A.P.C., MacAry, P.A., and Hanson, B.J. (2014). The role of phage display in therapeutic antibody discovery. *Int. Immunol.* 26, 649–657.
- Chang, C.I., Xu, B., Akella, R., Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J. (2002). Crystal structures of MAP kinase p38 complexed to the docking sites on its nuclear substrate MEF2A and activator MKK3b. *Mol. Cell* 9, 1241–1249.
- Chao, G., Lau, W.L., Hackel, B.J., Sazinsky, S.L., Lippow, S.M., and Wittrup, K.D. (2006). Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *Nat. Protoc.* 1, 755–768.
- Chiacchiera, F., Matrone, A., Ferrari, E., Ingravallo, G., Lo Sasso, G., Murzilli, S., Petruzzelli, M., Salvatore, L., Moschetta, A., and Simone, C. (2009). p38 α blockade inhibits colorectal cancer growth in vivo by inducing a switch from HIF1 α - to FoxO-dependent transcription. *Cell Death Differ.* 16, 1203–1214.
- Clark-Lewis, I., Sanghera, J.S., and Pelech, S.L. (1991). Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J. Biol. Chem.* 266, 15180–15184.
- Cochet, O., Kenigsberg, M., Delumeau, I., Virone-Oddos, A., Multon, M.C., Fridman, W.H., Schweighoffer, F., Teillaud, J.L., and Tocqué, B. (1998). Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression. *Cancer Res.* 58, 1170–1176.
- Cohen, P. (2002). Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 309–315.
- Cohen, P.A., Mani, J.C., and Lane, D.P. (1998). Characterization of a new intrabody directed against the N-terminal region of human p53. *Oncogene* 17, 2445–2456.
- Comess, K.M., Sun, C., Abad-Zapatero, C., Goedken, E.R., Gum, R.J., Borhani, D.W., Argiriadi, M., Groebe, D.R., Jia, Y., Clampitt, J.E., et al. (2011). Discovery and characterization of non-ATP site inhibitors of the mitogen activated protein (MAP) kinases. *ACS Chem. Biol.* 6, 234–244.
- Cuadrado, A., and Nebreda, A.R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* 429, 403–417.
- Cuenda, A., and Rousseau, S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1358–1375.
- Dambach, D.M. (2005). Potential adverse effects associated with inhibition of p38 α /beta MAP kinases. *Curr. Top. Med. Chem.* 5, 929–939.
- Dauvillier, S., Mérida, P., Visintin, M., Cattaneo, A., Bonnerot, C., and Dariavach, P. (2002). Intracellular single-chain variable fragments directed to the Src homology 2 domains of Syk partially inhibit Fc epsilon RI signaling in the RBL-2H3 cell line. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 169, 2274–2283.
- Davies, J., and Riechmann, L. (1996). Single antibody domains as small recognition units: design and in vitro antigen selection of camelized, human VH domains with improved protein stability. *Protein Eng.* 9, 531–537.

Donnelly, M.L., Hughes, L.E., Luke, G., Mendoza, H., ten Dam, E., Gani, D., and Ryan, M.D. (2001). The “cleavage” activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring “2A-like” sequences. *J. Gen. Virol.* *82*, 1027–1041.

Dubnovitsky, A.P., Kravchuk, Z.I., Chumanovich, A.A., Cozzi, A., Arosio, P., and Martsev, S.P. (2000). Expression, refolding, and ferritin-binding activity of the isolated VL-domain of monoclonal antibody F11. *Biochem. Biokhimiia* *65*, 1011–1018.

Ellis, R.J. (2001). Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *11*, 114–119.

Emadi, S., Liu, R., Yuan, B., Schulz, P., McAllister, C., Lyubchenko, Y., Messer, A., and Sierks, M.R. (2004). Inhibiting aggregation of alpha-synuclein with human single chain antibody fragments. *Biochemistry* *43*, 2871–2878.

Engler, C., Kandzia, R., and Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* *3*, e3647.

Enslin, H., Raingeaud, J., and Davis, R.J. (1998). Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J. Biol. Chem.* *273*, 1741–1748.

Fabian, M.A., Iii, W.H.B., Treiber, D.K., Atteridge, C.E., Azimioara, M.D., Benedetti, M.G., Carter, T.A., Ciceri, P., Edeen, P.T., Floyd, M., et al. (2005). A small molecule–kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.* *23*, 329–336.

Faust, D., Dolado, I., Cuadrado, A., Oesch, F., Weiss, C., Nebreda, A.R., and Dietrich, C. (2005). p38alpha MAPK is required for contact inhibition. *Oncogene* *24*, 7941–7945.

Feijoo, C., Campbell, D.G., Jakes, R., Goedert, M., and Cuenda, A. (2005). Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38delta at Thr50 promotes microtubule assembly. *J. Cell Sci.* *118*, 397–408.

Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* *340*, 245–246.

Fisher, A.C., and DeLisa, M.P. (2009). Efficient isolation of soluble intracellular single-chain antibodies using the twin-arginine translocation machinery. *J. Mol. Biol.* *385*, 299–311.

Fitzgerald, C.E., Patel, S.B., Becker, J.W., Cameron, P.M., Zaller, D., Pikounis, V.B., O’Keefe, S.J., and Scapin, G. (2003). Structural basis for p38alpha MAP kinase quinazolinone and pyridol-pyrimidine inhibitor specificity. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 764–769.

Frade, R., Rousselet, N., and Jean, D. (2008). Intratumoral gene delivery of anti-cathepsin L single-chain variable fragment by lentiviral vector inhibits tumor progression induced by human melanoma cells. *Cancer Gene Ther.* *15*, 591–604.

Frank, R. (2002). The SPOT-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. *J. Immunol. Methods* *267*, 13–26.

Frantz, B., Klatt, T., Pang, M., Parsons, J., Rolando, A., Williams, H., Tocci, M.J., O’Keefe, S.J., and O’Neill, E.A. (1998). The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding. *Biochemistry* *37*, 13846–13853.

- Gaestel, M., and Kracht, M. (2009). Peptides as signaling inhibitors for mammalian MAP kinase cascades. *Curr. Pharm. Des.* 15, 2471–2480.
- Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R.J., Luo, Y., and Han, J. (2002). MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* 295, 1291–1294.
- Genst, E.D., Silence, K., Decanniere, K., Conrath, K., Loris, R., Kinne, J., Muyldermans, S., and Wyns, L. (2006). Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 4586–4591.
- Giry-Laterrière, M., Cherpin, O., Kim, Y.-S., Jensen, J., and Salmon, P. (2011). Polyswitch lentivectors: “all-in-one” lentiviral vectors for drug-inducible gene expression, live selection, and recombination cloning. *Hum. Gene Ther.* 22, 1255–1267.
- Goldstein, D.M., Kuglstatter, A., Lou, Y., and Soth, M.J. (2010). Selective p38alpha inhibitors clinically evaluated for the treatment of chronic inflammatory disorders. *J. Med. Chem.* 53, 2345–2353.
- Gomez-Gutierrez, P., Campos, P.M., Vega, M., and Perez, J.J. (2016). Identification of a Novel Inhibitory Allosteric Site in p38 α . *PLoS One* 11, e0167379.
- Gongora, C., Candeil, L., Vezzio, N., Copois, V., Denis, V., Breil, C., Molina, F., Fraslon, C., Conseiller, E., Pau, B., et al. (2008). Altered expression of cell proliferation-related and interferon-stimulated genes in colon cancer cells resistant to SN38. *Cancer Biol. Ther.* 7, 822–832.
- Gonzalez, F.A., Raden, D.L., and Davis, R.J. (1991). Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J. Biol. Chem.* 266, 22159–22163.
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., and Hynes, N.E. (1995). Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1182–1191.
- Griffin, H., Elston, R., Jackson, D., Ansell, K., Coleman, M., Winter, G., and Doorbar, J. (2006). Inhibition of papillomavirus protein function in cervical cancer cells by intrabody targeting. *J. Mol. Biol.* 355, 360–378.
- Griffiths, A.D., and Duncan, A.R. (1998). Strategies for selection of antibodies by phage display. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 102–108.
- Gupta, J., and Nebreda, A.R. (2015). Roles of p38 α mitogen-activated protein kinase in mouse models of inflammatory diseases and cancer. *Febs J.* 282, 1841–1857.
- Gupta, J., del Barco Barrantes, I., Igea, A., Sakellariou, S., Pateras, I.S., Gorgoulis, V.G., and Nebreda, A.R. (2014). Dual function of p38 α MAPK in colon cancer: suppression of colitis-associated tumor initiation but requirement for cancer cell survival. *Cancer Cell* 25, 484–500.
- Hage, C., Iacobucci, C., Rehkamp, A., Arlt, C., and Sinz, A. (2017). The First Zero-Length Mass Spectrometry-Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 56, 14551–14555.
- Hale, K.K., Trollinger, D., Rihaneck, M., and Manthey, C.L. (1999). Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 162, 4246–4252.

- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hammers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., and Hammers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* *363*, 446–448.
- Han, J., and Sun, P. (2007). The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends Biochem. Sci.* *32*, 364–371.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Haque, A., Andersen, J.N., Salmeen, A., Barford, D., and Tonks, N.K. (2011). Conformation-sensing antibodies stabilize the oxidized form of PTP1B and inhibit its phosphatase activity. *Cell* *147*, 185–198.
- Henry, K.A., Kandalaf, H., Lowden, M.J., Rossotti, M.A., van Faassen, H., Hussack, G., Durocher, Y., Kim, D.Y., and Tanha, J. (2017). A disulfide-stabilized human VL single-domain antibody library is a source of soluble and highly thermostable binders. *Mol. Immunol.* *90*, 190–196.
- Heppner, F.L., Musahl, C., Arrighi, I., Klein, M.A., Rüllicke, T., Oesch, B., Zinkernagel, R.M., Kalinke, U., and Aguzzi, A. (2001). Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science* *294*, 178–182.
- Ho, M., Nagata, S., and Pastan, I. (2006). Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 9637–9642.
- Hoet, R.M., Cohen, E.H., Kent, R.B., Rookey, K., Schoonbroodt, S., Hogan, S., Rem, L., Frans, N., Daukandt, M., Pieters, H., et al. (2005). Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity. *Nat. Biotechnol.* *23*, 344–348.
- Hudson, P.J., and Kortt, A.A. (1999). High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *J. Immunol. Methods* *231*, 177–189.
- Hussack, G., Keklikian, A., Alsughayyir, J., Hanifi-Moghaddam, P., Arbabi-Ghahroudi, M., van Faassen, H., Hou, S.T., Sad, S., MacKenzie, R., and Tanha, J. (2012). A VL single-domain antibody library shows a high-propensity to yield non-aggregating binders. *Protein Eng. Des. Sel.* *25*, 313–318.
- Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotný, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Brucoleri, R.E., Haber, E., and Crea, R. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 5879–5883.
- Hwang, D., Jang, B.C., Yu, G., and Boudreau, M. (1997). Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* *54*, 87–96.
- Igea, A., and Nebreda, A.R. (2015). The Stress Kinase p38 α as a Target for Cancer Therapy. *Cancer Res.* *75*, 3997–4002.
- Jäger, M., and Plückthun, A. (1999). Folding and assembly of an antibody Fv fragment, a heterodimer stabilized by antigen11Edited by P. E. Wright. *J. Mol. Biol.* *285*, 2005–2019.

- Jannot, C.B., Beerli, R.R., Mason, S., Gullick, W.J., and Hynes, N.E. (1996). Intracellular expression of a single-chain antibody directed to the EGFR leads to growth inhibition of tumor cells. *Oncogene* *13*, 275–282.
- Jendreyko, N., Popkov, M., Beerli, R.R., Chung, J., McGavern, D.B., Rader, C., and Barbas, C.F. (2003). Intradiabodies, bispecific, tetravalent antibodies for the simultaneous functional knockout of two cell surface receptors. *J. Biol. Chem.* *278*, 47812–47819.
- Jurado, P., Ritz, D., Beckwith, J., de Lorenzo, V., and Fernández, L.A. (2002). Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* *320*, 1–10.
- Kang, Y.J., Chen, J., Otsuka, M., Mols, J., Ren, S., Wang, Y., and Han, J. (2008). Macrophage deletion of p38alpha partially impairs lipopolysaccharide-induced cellular activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 5075–5082.
- Keesler, G.A., Bray, J., Hunt, J., Johnson, D.A., Gleason, T., Yao, Z., Wang, S.W., Parker, C., Yamane, H., Cole, C., et al. (1998). Purification and activation of recombinant p38 isoforms alpha, beta, gamma, and delta. *Protein Expr. Purif.* *14*, 221–228.
- Kelkar, N., Standen, C.L., and Davis, R.J. (2005). Role of the JIP4 scaffold protein in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 2733–2743.
- Kim, C., Sano, Y., Todorova, K., Carlson, B.A., Arpa, L., Celada, A., Lawrence, T., Otsu, K., Brissette, J.L., Arthur, J.S.C., et al. (2008). The kinase p38 alpha serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression. *Nat. Immunol.* *9*, 1019–1027.
- Kim, L., Del Rio, L., Butcher, B.A., Mogensen, T.H., Paludan, S.R., Flavell, R.A., and Denkers, E.Y. (2005). p38 MAPK autophosphorylation drives macrophage IL-12 production during intracellular infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 4178–4184.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A., and Virnekäs, B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.* *296*, 57–86.
- Koch, H., Gräfe, N., Schiess, R., and Plückthun, A. (2006). Direct selection of antibodies from complex libraries with the protein fragment complementation assay. *J. Mol. Biol.* *357*, 427–441.
- Köhler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* *256*, 495–497.
- Koo, M.Y., Park, J., Lim, J.M., Joo, S.Y., Shin, S.-P., Shim, H.B., Chung, J., Kang, D., Woo, H.A., and Rhee, S.G. (2014). Selective inhibition of the function of tyrosine-phosphorylated STAT3 with a phosphorylation site-specific intrabody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 6269–6274.
- Kristensen, P., and Winter, G. (1998). Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Fold. Des.* *3*, 321–328.
- Kumar, S., McDonnell, P.C., Gum, R.J., Hand, A.T., Lee, J.C., and Young, P.R. (1997). Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *235*, 533–538.

- Kumar, S., Boehm, J., and Lee, J.C. (2003). p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 717–726.
- Kuo, C.-L., Oyler, G.A., and Shoemaker, C.B. (2011). Accelerated neuronal cell recovery from Botulinum neurotoxin intoxication by targeted ubiquitination. *PLoS One* 6, e20352.
- Kuzmanic, A., Sutto, L., Saladino, G., Nebreda, A.R., Gervasio, F.L., and Orozco, M. (2017). Changes in the free-energy landscape of p38 α MAP kinase through its canonical activation and binding events as studied by enhanced molecular dynamics simulations. *ELife* 6.
- Kvam, E., Sierks, M.R., Shoemaker, C.B., and Messer, A. (2010). Physico-chemical determinants of soluble intrabody expression in mammalian cell cytoplasm. *Protein Eng. Des. Sel.* 23, 489–498.
- Lecerf, J.M., Shirley, T.L., Zhu, Q., Kazantsev, A., Amersdorfer, P., Housman, D.E., Messer, A., and Huston, J.S. (2001). Human single-chain Fv intrabodies counteract in situ huntingtin aggregation in cellular models of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4764–4769.
- Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., et al. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372, 739–746.
- Lener, M., Horn, I.R., Cardinale, A., Messina, S., Nielsen, U.B., Rybak, S.M., Hoogenboom, H.R., Cattaneo, A., and Biocca, S. (2000). Diverting a protein from its cellular location by intracellular antibodies. The case of p21Ras. *Eur. J. Biochem.* 267, 1196–1205.
- Levy-Mintz, P., Duan, L., Zhang, H., Hu, B., Dornadula, G., Zhu, M., Kulkosky, J., Bizub-Bender, D., Skalka, A.M., and Pomerantz, R.J. (1996). Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J. Virol.* 70, 8821–8832.
- Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R.J., and Han, J. (1996). The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228, 334–340.
- Lipovsek, D., and Plückthun, A. (2004). In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *J. Immunol. Methods* 290, 51–67.
- Liu, Y., and Gray, N.S. (2006). Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat. Chem. Biol.* 2, 358–364.
- Liu, R., McAllister, C., Lyubchenko, Y., and Sierks, M.R. (2004). Proteolytic antibody light chains alter beta-amyloid aggregation and prevent cytotoxicity. *Biochemistry* 43, 9999–10007.
- Lobato, M.N., and Rabbitts, T.H. (2003). Intracellular antibodies and challenges facing their use as therapeutic agents. *Trends Mol. Med.* 9, 390–396.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., and Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151.
- Lund, M.E., To, J., O'Brien, B.A., and Donnelly, S. (2016). The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J. Immunol. Methods* 430, 64–70.

- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298, 1912–1934.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444.
- Marasco, W.A., Haseltine, W.A., and Chen, S.Y. (1993). Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 7889–7893.
- Marasco, W.A., Chen, S., Richardson, J.H., Ramstedt, U., and Jones, S.D. (1998). Intracellular antibodies against HIV-1 envelope protein for AIDS gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 9, 1627–1642.
- Marks, J.D., Tristem, M., Karpas, A., and Winter, G. (1991). Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes. *Eur. J. Immunol.* 21, 985–991.
- Marschall, A.L.J., and Dübel, S. (2016). Antibodies inside of a cell can change its outside: Can intrabodies provide a new therapeutic paradigm? *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 14, 304–308.
- Marschall, A.L.J., Frenzel, A., Schirrmann, T., Schüngel, M., and Dübel, S. (2011). Targeting antibodies to the cytoplasm. *MAbs* 3, 3–16.
- Marschall, A.L.J., Dübel, S., and Böldicke, T. (2015). Specific in vivo knockdown of protein function by intrabodies. *MAbs* 7, 1010–1035.
- Martineau, P., and Betton, J.M. (1999). In vitro folding and thermodynamic stability of an antibody fragment selected in vivo for high expression levels in *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 292, 921–929.
- Martineau, P., Jones, P., and Winter, G. (1998). Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 280, 117–127.
- Massagué, J. (2012). TGF β signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 616–630.
- der Maur, A.A., Zahnd, C., Fischer, F., Spinelli, S., Honegger, A., Cambillau, C., Escher, D., Plückthun, A., and Barberis, A. (2002). Direct in vivo screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework. *J. Biol. Chem.* 277, 45075–45085.
- Mazuc, E., Villoutreix, B.O., Malbec, O., Roumier, T., Fleury, S., Leonetti, J.-P., Dombrowicz, D., Daëron, M., Martineau, P., and Dariavach, P. (2008). A novel druglike spleen tyrosine kinase binder prevents anaphylactic shock when administered orally. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 188–194, 194.e1-3.
- Mazuc, E., Guglielmi, L., Bec, N., Perez, V., Hahn, C.S., Mollevi, C., Parrinello, H., Desvignes, J.-P., Larroque, C., Jupp, R., et al. (2014). In-Cell Intrabody Selection from a Diverse Human Library Identifies C12orf4 Protein as a New Player in Rodent Mast Cell Degranulation. *PLoS ONE* 9.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., and Chiswell, D.J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552–554.
- Melchionna, T., and Cattaneo, A. (2007). A protein silencing switch by ligand-induced proteasome-targeting intrabodies. *J. Mol. Biol.* 374, 641–654.

- Meli, G., Visintin, M., Cannistraci, I., and Cattaneo, A. (2009). Direct in vivo intracellular selection of conformation-sensitive antibody domains targeting Alzheimer's amyloid-beta oligomers. *J. Mol. Biol.* *387*, 584–606.
- Mhashilkar, A.M., Bagley, J., Chen, S.Y., Szilvay, A.M., Helland, D.G., and Marasco, W.A. (1995). Inhibition of HIV-1 Tat-mediated LTR transactivation and HIV-1 infection by anti-Tat single chain intrabodies. *EMBO J.* *14*, 1542–1551.
- Mhashilkar, A.M., LaVecchio, J., Eberhardt, B., Porter-Brooks, J., Boisot, S., Dove, J.H., Pumphrey, C., Li, X., Weissmahr, R.N., Ring, D.B., et al. (1999). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro in acutely and persistently infected human CD4+ mononuclear cells expressing murine and humanized anti-human immunodeficiency virus type 1 Tat single-chain variable fragment intrabodies. *Hum. Gene Ther.* *10*, 1453–1467.
- Mittelstadt, P.R., Yamaguchi, H., Appella, E., and Ashwell, J.D. (2009). T cell receptor-mediated activation of p38 α by mono-phosphorylation of the activation loop results in altered substrate specificity. *J. Biol. Chem.* *284*, 15469–15474.
- Mössner, E., Koch, H., and Plückthun, A. (2001). Fast selection of antibodies without antigen purification: adaptation of the protein fragment complementation assay to select antigen-antibody pairs. *J. Mol. Biol.* *308*, 115–122.
- Mukherjee, S., Keitany, G., Li, Y., Wang, Y., Ball, H.L., Goldsmith, E.J., and Orth, K. (2006). Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* *312*, 1211–1214.
- Müller, M.Q., Dreiocker, F., Ihling, C.H., Schäfer, M., and Sinz, A. (2010). Cleavable cross-linker for protein structure analysis: reliable identification of cross-linking products by tandem MS. *Anal. Chem.* *82*, 6958–6968.
- Nguyen, T.D., Takasuka, H., Kaku, Y., Inoue, S., Nagamune, T., and Kawahara, M. (2017). Engineering a growth sensor to select intracellular antibodies in the cytosol of mammalian cells. *J. Biosci. Bioeng.* *124*, 125–132.
- Nizak, C., Monier, S., del Nery, E., Moutel, S., Goud, B., and Perez, F. (2003). Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors. *Science* *300*, 984–987.
- O'Keefe, S.J., Mudgett, J.S., Cupo, S., Parsons, J.N., Chartrain, N.A., Fitzgerald, C., Chen, S.-L., Lowitz, K., Rasa, C., Visco, D., et al. (2007). Chemical genetics define the roles of p38 α and p38 β in acute and chronic inflammation. *J. Biol. Chem.* *282*, 34663–34671.
- Orlandi, R., Güssow, D.H., Jones, P.T., and Winter, G. (1989). Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 3833–3837.
- Owens, D.M., and Keyse, S.M. (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* *26*, 3203–3213.
- Pagès, G., Berra, E., Milanini, J., Levy, A.P., and Pouyssegur, J. (2000). Stress-activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability. *J. Biol. Chem.* *275*, 26484–26491.

- Paillas, S., Boissière, F., Bibeau, F., Denouel, A., Mollevi, C., Causse, A., Denis, V., Vezzio-Vié, N., Marzi, L., Cortijo, C., et al. (2011). Targeting the p38 MAPK pathway inhibits irinotecan resistance in colon adenocarcinoma. *Cancer Res.* *71*, 1041–1049.
- Pargellis, C., Tong, L., Churchill, L., Cirillo, P.F., Gilmore, T., Graham, A.G., Grob, P.M., Hickey, E.R., Moss, N., Pav, S., et al. (2002). Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat. Struct. Biol.* *9*, 268–272.
- Parker, L.J., Taruya, S., Tsuganezawa, K., Ogawa, N., Mikuni, J., Honda, K., Tomabechi, Y., Handa, N., Shirouzu, M., Yokoyama, S., et al. (2014). Kinase crystal identification and ATP-competitive inhibitor screening using the fluorescent ligand SKF86002. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *70*, 392–404.
- Patel, S.B., Cameron, P.M., O’Keefe, S.J., Frantz-Wattley, B., Thompson, J., O’Neill, E.A., Tennis, T., Liu, L., Becker, J.W., and Scapin, G. (2009). The three-dimensional structure of MAP kinase p38beta: different features of the ATP-binding site in p38beta compared with p38alpha. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *65*, 777–785.
- Paz, K., Brennan, L.A., Iacolina, M., Doody, J., Hadari, Y.R., and Zhu, Z. (2005). Human single-domain neutralizing intrabodies directed against Etk kinase: a novel approach to impair cellular transformation. *Mol. Cancer Ther.* *4*, 1801–1809.
- Peregrin, S., Jurado-Pueyo, M., Campos, P.M., Sanz-Moreno, V., Ruiz-Gomez, A., Crespo, P., Mayor, F., and Murga, C. (2006). Phosphorylation of p38 by GRK2 at the docking groove unveils a novel mechanism for inactivating p38MAPK. *Curr. Biol. CB* *16*, 2042–2047.
- Pereira, L., Igea, A., Canovas, B., Dolado, I., and Nebreda, A.R. (2013). Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK. *EMBO Mol. Med.* *5*, 1759–1774.
- Pérez-Martínez, D., Tanaka, T., and Rabbitts, T.H. (2010). Intracellular antibodies and cancer: new technologies offer therapeutic opportunities. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *32*, 589–598.
- Persic, L., Righi, M., Roberts, A., Hoogenboom, H.R., Cattaneo, A., and Bradbury, A. (1997). Targeting vectors for intracellular immunisation. *Gene* *187*, 1–8.
- Philibert, P., Stoessel, A., Wang, W., Sibler, A.-P., Bec, N., Larroque, C., Saven, J.G., Courtète, J., Weiss, E., and Martineau, P. (2007). A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. *BMC Biotechnol.* *7*, 81.
- Porter, R.R. (1958). Separation and isolation of fractions of rabbit gamma-globulin containing the antibody and antigenic combining sites. *Nature* *182*, 670–671.
- Prassler, J., Thiel, S., Pracht, C., Polzer, A., Peters, S., Bauer, M., Nörenberg, S., Stark, Y., Kölln, J., Popp, A., et al. (2011). HuCAL PLATINUM, a Synthetic Fab Library Optimized for Sequence Diversity and Superior Performance in Mammalian Expression Systems. *J. Mol. Biol.* *413*, 261–278.
- Proba, K., Wörn, A., Honegger, A., and Plückthun, A. (1998). Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution. *J. Mol. Biol.* *275*, 245–253.
- Puri, P.L., Wu, Z., Zhang, P., Wood, L.D., Bhakta, K.S., Han, J., Feramisco, J.R., Karin, M., and Wang, J.Y. (2000). Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. *Genes Dev.* *14*, 574–584.

- Rada, C., Ehrenstein, M.R., Neuberger, M.S., and Milstein, C. (1998). Hot spot focusing of somatic hypermutation in MSH2-deficient mice suggests two stages of mutational targeting. *Immunity* 9, 135–141.
- Raingaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., and Davis, R.J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* 270, 7420–7426.
- Raingaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Dérijard, B., and Davis, R.J. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1247–1255.
- Raman, M., Chen, W., and Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100–3112.
- Rauchenberger, R., Borges, E., Thomassen-Wolf, E., Rom, E., Adar, R., Yaniv, Y., Malka, M., Chumakov, I., Kotzer, S., Resnitzky, D., et al. (2003). Human Combinatorial Fab Library Yielding Specific and Functional Antibodies against the Human Fibroblast Growth Factor Receptor 3. *J. Biol. Chem.* 278, 38194–38205.
- Rinaldi, A.-S., Freund, G., Desplancq, D., Sibler, A.-P., Baltzinger, M., Rochel, N., Mély, Y., Didier, P., and Weiss, E. (2013). The use of fluorescent intrabodies to detect endogenous gankyrin in living cancer cells. *Exp. Cell Res.* 319, 838–849.
- Robert, R., Jacobin-Valat, M.-J., Daret, D., Miraux, S., Nurden, A.T., Franconi, J.-M., and Clofent-Sanchez, G. (2006). Identification of human scFvs targeting atherosclerotic lesions: selection by single round in vivo phage display. *J. Biol. Chem.* 281, 40135–40143.
- Robin, G., Sato, Y., Desplancq, D., Rochel, N., Weiss, E., and Martineau, P. (2014). Restricted diversity of antigen binding residues of antibodies revealed by computational alanine scanning of 227 antibody-antigen complexes. *J. Mol. Biol.* 426, 3729–3743.
- Rothe, C., Urlinger, S., Löhning, C., Prassler, J., Stark, Y., Jäger, U., Hubner, B., Bardroff, M., Pradel, I., Boss, M., et al. (2008). The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel display method for efficient selection of high-affinity antibodies. *J. Mol. Biol.* 376, 1182–1200.
- Rouet, R., Lowe, D., Dudgeon, K., Roome, B., Schofield, P., Langley, D., Andrews, J., Whitfeld, P., Jermutus, L., and Christ, D. (2012). Expression of high-affinity human antibody fragments in bacteria. *Nat. Protoc.* 7, 364–373.
- Round, J.L., Humphries, L.A., Tomassian, T., Mittelstadt, P., Zhang, M., and Miceli, M.C. (2007). Scaffold protein Dlg1 coordinates alternative p38 kinase activation, directing T cell receptor signals toward NFAT but not NF-kappaB transcription factors. *Nat. Immunol.* 8, 154–161.
- Rousselet, N., Mills, L., Jean, D., Tellez, C., Bar-Eli, M., and Frade, R. (2004). Inhibition of tumorigenicity and metastasis of human melanoma cells by anti-cathepsin L single chain variable fragment. *Cancer Res.* 64, 146–151.
- Roux, K.H., Strelets, L., and Michaelsen, T.E. (1997). Flexibility of human IgG subclasses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 159, 3372–3382.

- Rudalska, R., Dauch, D., Longerich, T., McJunkin, K., Wuestefeld, T., Kang, T.-W., Hohmeyer, A., Pesic, M., Leibold, J., von Thun, A., et al. (2014). In vivo RNAi screening identifies a mechanism of sorafenib resistance in liver cancer. *Nat. Med.* *20*, 1138–1146.
- Sakurai, H., Miyoshi, H., Mizukami, J., and Sugita, T. (2000). Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1. *FEBS Lett.* *474*, 141–145.
- Sakurai, T., He, G., Matsuzawa, A., Yu, G.-Y., Maeda, S., Hardiman, G., and Karin, M. (2008). Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. *Cancer Cell* *14*, 156–165.
- Salvador, J.M., Mittelstadt, P.R., Guszczynski, T., Copeland, T.D., Yamaguchi, H., Appella, E., Fornace, A.J., and Ashwell, J.D. (2005a). Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat. Immunol.* *6*, 390–395.
- Salvador, J.M., Mittelstadt, P.R., Belova, G.I., Fornace, A.J., and Ashwell, J.D. (2005b). The autoimmune suppressor Gadd45alpha inhibits the T cell alternative p38 activation pathway. *Nat. Immunol.* *6*, 396–402.
- Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S41-52.
- Sha, F., Salzman, G., Gupta, A., and Koide, S. (2017). Monobodies and other synthetic binding proteins for expanding protein science. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *26*, 910–924.
- Sibler, A.-P., Nordhammer, A., Masson, M., Martineau, P., Travé, G., and Weiss, E. (2003). Nucleocytoplasmic shuttling of antigen in mammalian cells conferred by a soluble versus insoluble single-chain antibody fragment equipped with import/export signals. *Exp. Cell Res.* *286*, 276–287.
- Sibler, A.-P., Courtête, J., Muller, C.D., Zeder-Lutz, G., and Weiss, E. (2005). Extended half-life upon binding of destabilized intrabodies allows specific detection of antigen in mammalian cells. *FEBS J.* *272*, 2878–2891.
- Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* *228*, 1315–1317.
- Sosa, M.S., Bragado, P., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2014). Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 611–622.
- Souriau, C., Hua, T.D., Lefranc, M.P., and Weill, M. (1998). Présentation a la surface de phages filamenteux : les multiples applications du phage display. *MS Médecine Sci. Rev. Pap.* ISSN 0767-0974 1998 Vol 14 N° 3 P300-9.
- Spencer-Smith, R., Koide, A., Zhou, Y., Eguchi, R.R., Sha, F., Gajwani, P., Santana, D., Gupta, A., Jacobs, M., Herrero-Garcia, E., et al. (2017). Inhibition of RAS function through targeting an allosteric regulatory site. *Nat. Chem. Biol.* *13*, 62–68.
- Streltsov, V.A., Varghese, J.N., Carmichael, J.A., Irving, R.A., Hudson, P.J., and Nuttall, S.D. (2004). Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 12444–12449.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* *189*, 113–130.

- Sumara, G., Formentini, I., Collins, S., Sumara, I., Windak, R., Bodenmiller, B., Ramracheya, R., Caille, D., Jiang, H., Platt, K.A., et al. (2009). Regulation of PKD by the MAPK p38delta in insulin secretion and glucose homeostasis. *Cell* 136, 235–248.
- Sun, Y., Shukla, G.S., Weaver, D., Pero, S.C., and Krag, D.N. (2009). Phage-display selection on tumor histological specimens with laser capture microdissection. *J. Immunol. Methods* 347, 46–53.
- Swat, A., Dolado, I., Rojas, J.M., and Nebreda, A.R. (2009). Cell density-dependent inhibition of epidermal growth factor receptor signaling by p38alpha mitogen-activated protein kinase via Sprouty2 downregulation. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3332–3343.
- Tanaka, T., and Rabbitts, T.H. (2003). Intrabodies based on intracellular capture frameworks that bind the RAS protein with high affinity and impair oncogenic transformation. *EMBO J.* 22, 1025–1035.
- Tanaka, T., and Rabbitts, T.H. (2010). Protocol for the selection of single-domain antibody fragments by third generation intracellular antibody capture. *Nat. Protoc.* 5, 67–92.
- Tanaka, T., Lobato, M.N., and Rabbitts, T.H. (2003a). Single domain intracellular antibodies: a minimal fragment for direct in vivo selection of antigen-specific intrabodies. *J. Mol. Biol.* 331, 1109–1120.
- Tanaka, T., Chung, G.T.Y., Forster, A., Lobato, M.N., and Rabbitts, T.H. (2003b). De novo production of diverse intracellular antibody libraries. *Nucleic Acids Res.* 31, e23.
- Tanaka, T., Williams, R.L., and Rabbitts, T.H. (2007). Tumour prevention by a single antibody domain targeting the interaction of signal transduction proteins with RAS. *EMBO J.* 26, 3250–3259.
- Tanno, M., Bassi, R., Gorog, D.A., Saurin, A.T., Jiang, J., Heads, R.J., Martin, J.L., Davis, R.J., Flavell, R.A., and Marber, M.S. (2003). Diverse mechanisms of myocardial p38 mitogen-activated protein kinase activation: evidence for MKK-independent activation by a TAB1-associated mechanism contributing to injury during myocardial ischemia. *Circ. Res.* 93, 254–261.
- Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., and Nishida, E. (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat. Cell Biol.* 2, 110–116.
- Tanoue, T., Maeda, R., Adachi, M., and Nishida, E. (2001). Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J.* 20, 466–479.
- Taylor, S.S., and Kornev, A.P. (2011). Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 36, 65–77.
- Tokunaga, Y., Takeuchi, K., Takahashi, H., and Shimada, I. (2014). Allosteric enhancement of MAP kinase p38 α 's activity and substrate selectivity by docking interactions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 704–711.
- Tomida, T., Takekawa, M., and Saito, H. (2015). Oscillation of p38 activity controls efficient pro-inflammatory gene expression. *Nat. Commun.* 6, 8350.
- Tonegawa, S. (1988). Somatic generation of immune diversity. *Biosci. Rep.* 8, 3–26.
- Trabucchi, A., Iacono, R.F., Guerra, L.L., Faccinetti, N.I., Krochik, A.G., Arriazu, M.C., Poskus, E., and Valdez, S.N. (2013). Characterization of insulin antibodies by Surface Plasmon Resonance in two clinical cases: brittle diabetes and insulin autoimmune syndrome. *PloS One* 8, e84099.

- Tramier, M., Zahid, M., Mevel, J.-C., Masse, M.-J., and Coppey-Moisan, M. (2006). Sensitivity of CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells. *Microsc. Res. Tech.* *69*, 933–939.
- Trempelec, N., Dave-Coll, N., and Nebreda, A.R. (2013a). SnapShot: p38 MAPK signaling. *Cell* *152*, 656-656.e1.
- Trempelec, N., Dave-Coll, N., and Nebreda, A.R. (2013b). SnapShot: p38 MAPK substrates. *Cell* *152*, 924-924.e1.
- Tse, E., and Rabbitts, T.H. (2000). Intracellular antibody-caspase-mediated cell killing: an approach for application in cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 12266–12271.
- Uhlik, M.T., Abell, A.N., Johnson, N.L., Sun, W., Cuevas, B.D., Lobel-Rice, K.E., Horne, E.A., Dell'Acqua, M.L., and Johnson, G.L. (2003). Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat. Cell Biol.* *5*, 1104–1110.
- Ventura, J.J., Tenbaum, S., Perdiguero, E., Huth, M., Guerra, C., Barbacid, M., Pasparakis, M., and Nebreda, A.R. (2007). p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* *39*, 750–758.
- Villoutreix, B.O., Laconde, G., Lagorce, D., Martineau, P., Miteva, M.A., and Dariavach, P. (2011). Tyrosine kinase syk non-enzymatic inhibitors and potential anti-allergic drug-like compounds discovered by virtual and in vitro screening. *PLoS One* *6*, e21117.
- Vincke, C., Loris, R., Saerens, D., Martinez-Rodriguez, S., Muyldermans, S., and Conrath, K. (2009). General Strategy to Humanize a Camelid Single-domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold. *J. Biol. Chem.* *284*, 3273–3284.
- Visintin, M., Tse, E., Axelson, H., Rabbitts, T.H., and Cattaneo, A. (1999). Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 11723–11728.
- Visintin, M., Settanni, G., Maritan, A., Graziosi, S., Marks, J.D., and Cattaneo, A. (2002). The intracellular antibody capture technology (IACT): towards a consensus sequence for intracellular antibodies. Edited by J. Karn. *J. Mol. Biol.* *317*, 73–83.
- Visintin, M., Meli, G.A., Cannistraci, I., and Cattaneo, A. (2004a). Intracellular antibodies for proteomics. *J. Immunol. Methods* *290*, 135–153.
- Visintin, M., Quondam, M., and Cattaneo, A. (2004b). The intracellular antibody capture technology: towards the high-throughput selection of functional intracellular antibodies for target validation. *Methods* *34*, 200–214.
- Visintin, M., Melchionna, T., Cannistraci, I., and Cattaneo, A. (2008). In vivo selection of intrabodies specifically targeting protein-protein interactions: a general platform for an “undruggable” class of disease targets. *J. Biotechnol.* *135*, 1–15.
- Wagner, E.F., and Nebreda, A.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 537–549.

- Wang, W., Zhou, J., Xu, L., and Zhen, Y. (2000). Antineoplastic effect of intracellular expression of a single-chain antibody directed against type IV collagenase. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. Off. Organ Int. Soc. Environ. Toxicol. Cancer* 19, 61–68.
- Wang, Z., Harkins, P.C., Ulevitch, R.J., Han, J., Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J. (1997). The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2327–2332.
- Waraho, D., and DeLisa, M.P. (2009). Versatile selection technology for intracellular protein-protein interactions mediated by a unique bacterial hitchhiker transport mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3692–3697.
- Ward, E.S., Güssow, D., Griffiths, A.D., Jones, P.T., and Winter, G. (1989). Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* 341, 544–546.
- Watier, H. (2009). [From the ancient serotherapy to naked antibodies: a century of successful targeted therapies]. *Med. Sci.* MS 25, 999–1009.
- Watters, J.M., Telleman, P., and Junghans, R.P. (1997). An optimized method for cell-based phage display panning. *Immunotechnology Int. J. Immunol. Eng.* 3, 21–29.
- Williams, A.F., and Barclay, A.N. (1988). The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 381–405.
- Wilson, K.P., Fitzgibbon, M.J., Caron, P.R., Griffith, J.P., Chen, W., McCaffrey, P.G., Chambers, S.P., and Su, M.S. (1996). Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 27696–27700.
- Wojcik, J., Lamontanara, A.J., Grabe, G., Koide, A., Akin, L., Gerig, B., Hantschel, O., and Koide, S. (2016). Allosteric Inhibition of Bcr-Abl Kinase by High Affinity Monobody Inhibitors Directed to the Src Homology 2 (SH2)-Kinase Interface. *J. Biol. Chem.* 291, 8836–8847.
- Wörn, A., and Plückthun, A. (1998). Mutual stabilization of VL and VH in single-chain antibody fragments, investigated with mutants engineered for stability. *Biochemistry* 37, 13120–13127.
- Wörn, A., Auf der Maur, A., Escher, D., Honegger, A., Barberis, A., and Plückthun, A. (2000). Correlation between in vitro stability and in vivo performance of anti-GCN4 intrabodies as cytoplasmic inhibitors. *J. Biol. Chem.* 275, 2795–2803.
- Wroblewski, S.T., and Doweyko, A.M. (2005). Structural comparison of p38 inhibitor-protein complexes: a review of recent p38 inhibitors having unique binding interactions. *Curr. Top. Med. Chem.* 5, 1005–1016.
- Xing, L., Shieh, H.S., Selness, S.R., Devraj, R.V., Walker, J.K., Devadas, B., Hope, H.R., Compton, R.P., Schindler, J.F., Hirsch, J.L., et al. (2009). Structural bioinformatics-based prediction of exceptional selectivity of p38 MAP kinase inhibitor PH-797804. *Biochemistry* 48, 6402–6411.
- Yi, K.S., Chung, J.H., Lee, Y.H., Chung, H.G., Kim, I.J., Suh, B.C., Kim, E., Cocco, L., Ryu, S.H., and Suh, P.G. (2001). Inhibition of the EGF-induced activation of phospholipase C-gamma1 by a single chain antibody fragment. *Oncogene* 20, 7954–7964.

Yoneda, Y. (2000). Nucleocytoplasmic protein traffic and its significance to cell function. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 5, 777–787.

Young, P.R., McLaughlin, M.M., Kumar, S., Kassis, S., Doyle, M.L., McNulty, D., Gallagher, T.F., Fisher, S., McDonnell, P.C., Carr, S.A., et al. (1997). Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J. Biol. Chem.* 272, 12116–12121.

Zehner, M., Marschall, A.L., Bos, E., Schloetel, J.-G., Kreer, C., Fehrenschild, D., Limmer, A., Ossendorp, F., Lang, T., Koster, A.J., et al. (2015). The translocon protein Sec61 mediates antigen transport from endosomes in the cytosol for cross-presentation to CD8(+) T cells. *Immunity* 42, 850–863.

Zhang, Y.-Y., Mei, Z.-Q., Wu, J.-W., and Wang, Z.-X. (2008). Enzymatic activity and substrate specificity of mitogen-activated protein kinase p38alpha in different phosphorylation states. *J. Biol. Chem.* 283, 26591–26601.

Zhou, C., Jacobsen, F.W., Cai, L., Chen, Q., and Shen, D. (2010). Development of a novel mammalian cell surface antibody display platform. *MAbs* 2, 508–518.

Zhu, Q., Zeng, C., Huhlov, A., Yao, J., Turi, T.G., Danley, D., Hynes, T., Cong, Y., DiMattia, D., Kennedy, S., et al. (1999). Extended half-life and elevated steady-state level of a single-chain Fv intrabody are critical for specific intracellular retargeting of its antigen, caspase-7. *J. Immunol. Methods* 231, 207–222.

Zou, X., and Blank, M. (2017). Targeting p38 MAP kinase signaling in cancer through post-translational modifications. *Cancer Lett.* 384, 19–26.

ANNEXE

Solubility Characterization and Imaging of Intrabodies Using GFP-Fusions

Emilie Renaud, Pierre Martineau, and Laurence Guglielmi

Methods in Molecular Biology 2017 (1575:165-174)

Solubility Characterization and Imaging of Intrabodies Using GFP-Fusions

Emilie Renaud, Pierre Martineau, and Laurence Guglielmi

Abstract

Ectopically expressed intracellular recombinant antibodies, or intrabodies, are powerful tools to visualize proteins and study their function in fixed or living cells. However, many intrabodies are insoluble and aggregate in the reducing environment of the cytosol. To solve this problem, we describe an approach based on GFP-tagged intrabodies. In this protocol, the GFP is used both as a folding-reporter to select correctly folded intrabodies and as a fluorescent tag to localize the scFv and its associated antigen in eukaryotic cells. Starting from a scFv gene cloned in a retroviral vector, we describe retrovirus production, cell line transduction, and soluble intrabody characterization by microscopy and FACS analysis.

Key words Intrabody, scFv, GFP, Folding, Aggregation, Degradation

1 Introduction

Intrabodies are recombinant antibody fragments expressed in cells. They have been mainly used to study protein function and localization within live cells. Indeed, an intrabody can modulate the activity of its cognate antigen and thus induce a phenotypic change that will give clues about the protein function within the cell [1, 2]. As such, intrabodies are analogous to RNAi but at the protein level. In addition, when fused to the green fluorescent protein (GFP), intrabodies become powerful probes to visualize intracellular targets in live cells [3, 4]. Of interest, intrabodies maintain the high specificity and affinity of the antibody molecule for its antigen, and are thus also able to target a particular protein conformation or posttranslational modification [4].

The most widely used format of intrabodies is the single-chain variable fragment (scFv) since it is the smallest antibody fragment (28 kDa) still containing the full antigen-binding site. ScFvs are made up by joining with a flexible linker the variable domains of the heavy (VH) and the light chain (VL), and are thus encoded by a single gene, contrary to regular antibodies or Fab fragments.

This facilitates the cloning of the gene in different vectors for intrabody expression and also avoids dissociation of the two chains within the cell. Such scFvs are now routinely selected by screening antibody libraries using phage-display in *E. coli*. Isolated scFvs are then produced in *E. coli* periplasm or cytoplasm for further in vitro characterization and finally tested, as intrabodies, in an appropriate mammalian cell model.

Despite advances in the development of optimized libraries based on hyperstable frameworks [5–10], the intracellular expression and activity of many scFvs is limited, making the approach still challenging. The reducing environment that pertains in the cytosol and the nucleus of mammalian cells prevents the formation of the two conserved disulphide bridges of the scFv, resulting in a decrease in its stability and folding efficiency. Consequently, only a small proportion of intrabodies is soluble and functional in the cell cytoplasm and, in many cases, intrabodies form insoluble aggregates or are quickly degraded by the proteolytic machinery of the cell.

We describe here an approach to easily identify the most soluble and stable intrabodies by using the GFP as a folding-reporter, as originally proposed in *E. coli* [11]. This allows the visualization of scFv-GFP fusion proteins in live cells, an easy evaluation of intrabody steady-state expression levels, a sensitive detection of protein aggregates, and even in some cases a first evaluation of the intrabody activity in the cell. The approach relies on the fact that during protein synthesis there is a kinetic competition between folding, aggregation, and proteolytic degradation. During protein folding, aggregation-prone folding intermediates will have different fates depending on the protein expression level. If over-expressed in the cytoplasm in mammalian cells, the degradation machinery will be overwhelmed and scFv-GFP will accumulate as insoluble and strongly fluorescent aggregates. Conversely, when expressed at low level, the intrabody and its companion GFP will be efficiently degraded, resulting in weakly fluorescent cells (Fig. 1) [12]. Therefore, an aggregation-prone scFv fused to the GFP can be distinguished by FACS from a soluble one, provided it is expressed at a sufficiently low level to avoid the formation of fluorescent aggregates: the former will give a weak fluorescent signal, whereas expression of the latter will result in strongly fluorescent cells.

To obtain a sufficiently low expression level, we propose to transfer scFv genes by retroviral infection in mammalian cell lines. Using this approach, only a few scFv-GFP genes enter each cell, while transient transfection would result in the transfer of thousands of copies in a single cell. In addition, the intrabody will be stably and evenly expressed by all the cells.

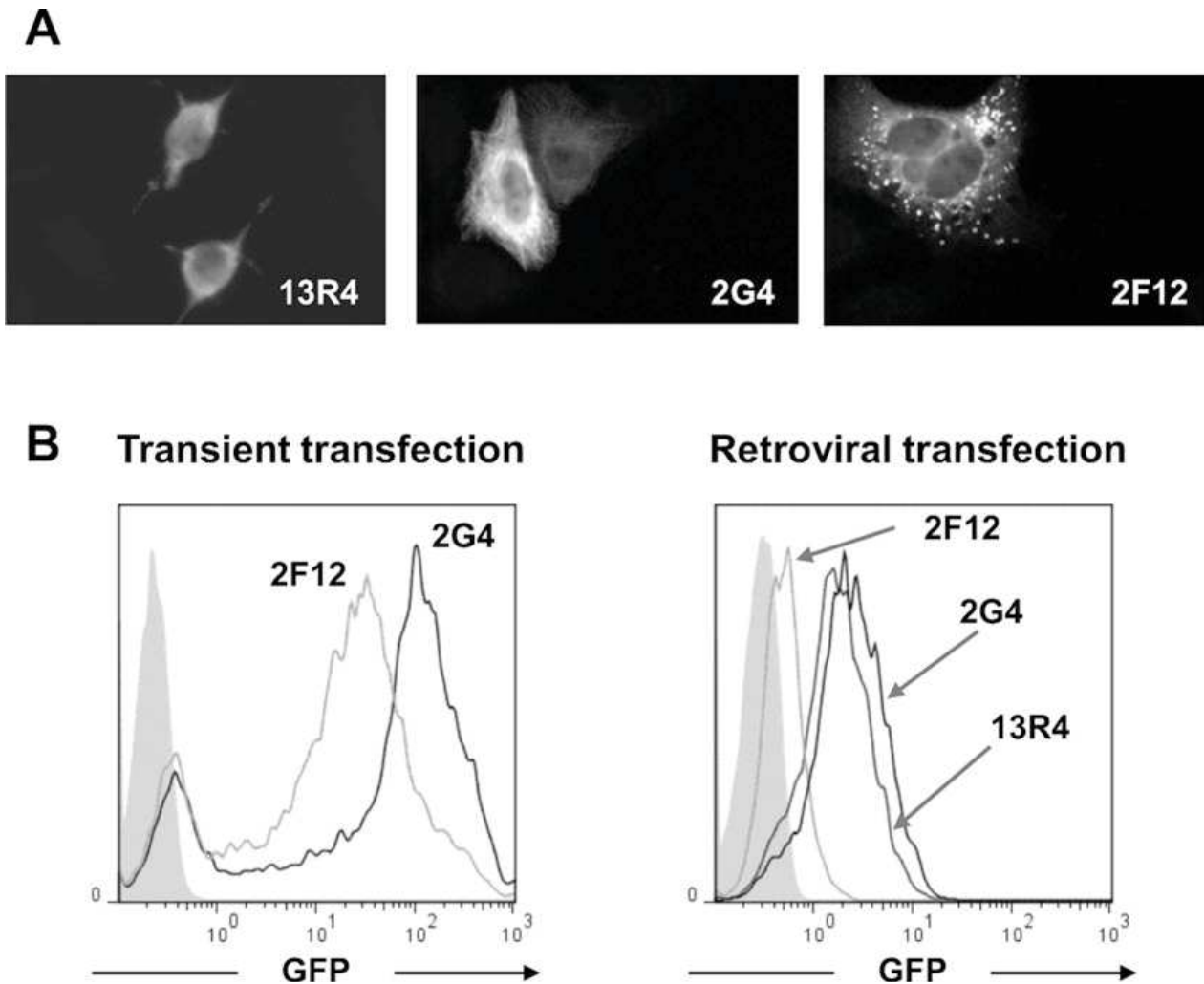


Fig. 1 Cytoplasmic expression of scFvs in HeLa cells. The three scFvs were selected from the same single-framework library [12] and differ only in their CDR3 sequences. Despite their high homology, each scFv has different properties when expressed as an intrabody in the cell cytoplasm and nucleus. Panel A shows the expression pattern of three intrabody-GFP fusions expressed at high levels in HeLa cell cytoplasm (transient transfection using a pCDNA3-derived plasmid). Intrabody 13R4 is highly soluble and does not recognize any cellular protein (13R4); 2G4 is also highly soluble and recognizes alpha-tubulin; 2F12 is aggregation-prone and forms large fluorescent aggregates. Panel B shows FACS analysis of HeLa cells expressing GFP-tagged intrabodies. In the *left panel*, cells were transiently transfected with pCMV-EGFP plasmid containing the indicated scFv, as in panel A. Using this approach, the GFP fluorescence signal does not permit to distinguish soluble and insoluble intrabodies since aggregated proteins are also fluorescent. In the *right panel*, HeLa cells were infected with retrovirus containing 2F12-GFP, 13R4-GFP, and 2G4-GFP fusions. The low expression level of aggregation-prone 2F12 intrabody leads to its degradation by the proteasome and therefore to a low GFP fluorescence signal

In this chapter, we describe procedures to obtain a low intracellular expression of scFv in eukaryotic cells using retroviral transfection. We detail protocols for retrovirus production (Subheading 3.1) and cell line transduction (Subheading 3.2), and then for the monitoring of intrabody expression by microscopy (Subheading 3.3) and FACS (Subheading 3.4) analysis.

2 Materials

1. pMSCV-EGFP plasmid DNA (*see Notes 1 and 2*).
2. Plasmid DNA encoding an amphotropic envelop (VSV-G) (*see Notes 1 and 3*).
3. Plasmid DNA encoding the retroviral packaging genes *gag* and *pol* (*see Note 1*).
4. HEK 293 cell line (*see Note 4*).
5. Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), 1% Glutamate, 1% Pen-Strep. Store at 4 °C.
6. Trypsin/EDTA.
7. 100 mm culture dishes.
8. 150 mM NaCl. Sterilize by filtration through a 0.22 µm filter or by autoclaving.
9. jetPEI transfection reagent (Polyplus Transfection) (*see Note 5*).
10. 1000× Polybrene stock solution at 4 mg/mL dissolved in water or medium. Sterilize by filtration through a 0.22 µm filter. Divide solution into aliquots and freeze at -20 °C for long-term storage (*see Note 6*).
11. Hygromycin B.
12. 12-mm-diameter glass coverslips. Store in 95% ethanol and air dry before use under laminar flow hood.
13. Phosphate-buffered saline (PBS): dissolve 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.61 g Na₂HPO₄, and 0.2 g KH₂HPO₄ in 800 mL distilled water. Adjust volume to 1 L with distilled water. Sterilize by autoclaving. The pH should be about 7.4 and does not need to be adjusted.
14. 2% (w/v) Paraformaldehyde (PFA) diluted in PBS (*see Notes 7 and 8*).
15. 0.01% (v/v) Triton X-100 diluted in PBS. Prepare the day of use using a 10% stock solution (*see Note 9*).
16. Hoechst 33342 dye solution at 500 µg/mL diluted in water (*see Note 10*).
17. Prolong (Invitrogen) (*see Note 11*).

3 Methods

3.1 Retrovirus Production

The following protocol assumes that the sequence of the scFv gene has been cloned in a pMSCV retroviral expression vector [7] in frame with the gene encoding the enhanced GFP (Fig. 2). We describe here a protocol of retrovirus production by transient transfection

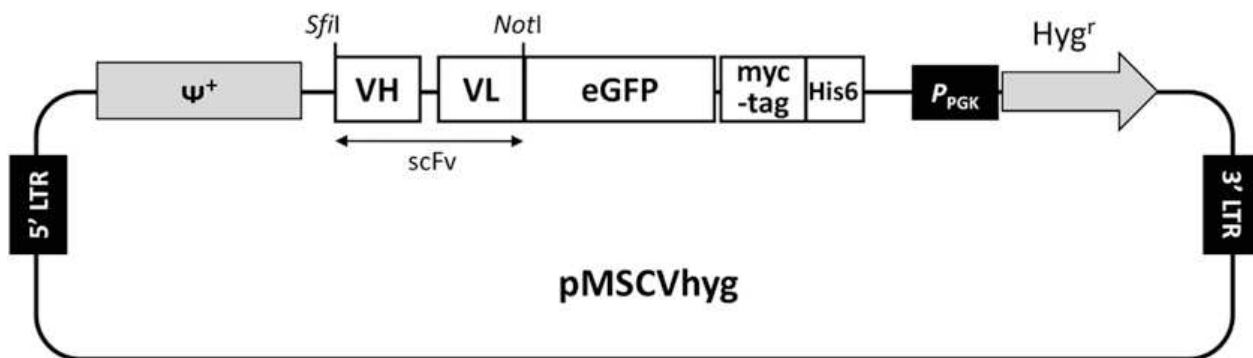


Fig. 2 Retroviral pMSCVhygSN-EGFP plasmid. The pMSCVhygSN-EGFP plasmid is derived from the pMSCVhyg plasmid (Clontech) by insertion of the eGFP, a myc-tag and a his-tag sequence successively cloned in frame. The vector contains: (1) the retroviral packaging signal, Ψ^+ , which promotes high-titer virus production, (2) the hygromycin resistance gene, (3) the long terminal repeat (LTR) promoter that drives high level and constitutive expression of the scFv gene. *Sfi*I and *Not*I unique cloning sites are compatible with most phage-display vectors allowing direct cloning of the selected scFVs

in the human HEK 293 cell line (*see Note 12*). Cells are grown in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

1. Aspirate and discard the culture medium and rinse the cells with trypsin/EDTA.
2. Add enough trypsin/EDTA to cover the cell monolayer and incubate at 37 °C for approximately 3 min until cells become round and start to float (*see Note 13*).
3. Neutralize trypsin with a twofold excess of supplemented culture medium.
4. Centrifuge the cells at $300 \times g$ and resuspend the pellet in fresh medium.
5. Count the cells and plate 2×10^6 cells in a 100 mm diameter culture dish (*see Notes 14* and *15*).
6. Incubate the cells at 37 °C and let them grow until the next day.
7. On the day of transfection, replace the culture medium with 5 mL of fresh DMEM with 10% FCS.
8. For each dish of cells that has to be transfected, set up two tubes. In the first tube, dilute 5 μ g of the three DNA plasmids into 250 μ L of 150 mM NaCl as follows: 1 μ g of plasmid DNA encoding *gag* and *pol* genes, 1 μ g of plasmid DNA encoding the envelope, and 3 μ g of pMSCV plasmid DNA containing the scFv-GFP fusion. In the second tube, mix 15 μ L of jetPEI solution with 250 μ L of 150 mM NaCl solution. Vortex briefly both tubes then add 250 μ L of the jetPEI solution (second tube) to the first tube containing the 250 μ L of DNA solution. Vortex 15 s, and incubate for 20 min at room temperature (*see Note 14*).

9. Add the 500 μL transfection mixture drop-wise to a culture dish and distribute by gently swirling the plate.
10. Incubate the cells for 5 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, then replace the medium with 11 mL of fresh culture medium.
11. To improve retrovirus production and therefore infection efficiency you can perform a second round of transfection. If you decide to do so, incubate your cells overnight and repeat the transfection on the next morning by starting back at **step 7**.
12. Incubate your cells for 48 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, then slowly harvest supernatant containing retroviral particles, paying attention not to detach 293 cells.
13. Filter the supernatant through a 0.4 μm sterile filter. The supernatant is now ready to use for the infection of the recipient cell line (*see* **Notes 16 and 17**).

3.2 Cell Line Transduction and Selection for Stable Integration

The following method describes transduction of adherent cell lines, such as HeLa or MCF7.

1. The day prior to infection, plate 1 million of your target cells in a 100 mm dish and incubate them at 37 $^{\circ}\text{C}$ (*see* **Note 18**).
2. The next day, remove medium, then add 5 mL of fresh medium, 1 mL of viral supernatant (*see* **Note 19**) and Polybrene at 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final concentration.
3. Incubate overnight at 37 $^{\circ}\text{C}$.
4. Change the medium of the infected cells and grow cells for an additional 24 h before replacing the culture medium with fresh medium supplemented with hygromycin B (Invitrogen) as selecting agent (*see* **Notes 20–22**).

3.3 Microscopy Analysis

1. Using forceps, deposit one 12-mm-diameter glass coverslip per well in a 24-well plate.
2. Plate 25,000 cells/well.
3. Twenty-four to 48 h later, wash the cells once with PBS.
4. Cover the cells with 300 μL PBS-2% PFA to fix them. Incubate for 10 min at room temperature (*see* **Note 23**).
5. Wash the cells three times with PBS.
6. Cover the cells with 300 μL of PBS-0.01% Triton X-100 to permeabilize the cells.
7. Incubate 5 min at room temperature.
8. Wash the cells three times with PBS.
9. To visualize DNA, add Hoechst dye to a final concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS.
10. Incubate 5 min at room temperature in the dark (*see* **Note 24**).

11. Wash the cells three times with PBS.
12. Place 12 μL of Prolong mounting medium on the surface of a clean glass microscope slide. Recover a coverslip with a forceps and place it cell-side down onto the Prolong medium. Leave the slide overnight at room temperature before examining the cells under a fluorescent microscope (*see Note 25*).

3.4 FACS Analysis of Intrabody Expression Level

1. Harvest the transduced and non-transduced (negative control) cells, as described above. Count and transfer 5×10^5 cells per sample in a FACS tube. Pellet the cells by centrifugation for 5 min at $300 \times g$.
2. Discard supernatant and resuspend the pellet in 0.5 mL of PBS, and analyze immediately at a suitable flow cytometer equipped with the appropriate laser and filter settings or store the cells at 4°C in the dark.

4 Notes

1. All the vectors used in this protocol were purchased from Clontech. Other manufacturers such as Cell Biolabs also provide retrovirus expression systems.
2. The pMSCV vector is used for the retroviral expression of a scFv of interest under the control of an LTR constitutive promoter. Figure 2 describes the pMSCVhygSN-EGFP plasmid for the expression of the scFv as an N-terminal fusion with the enhanced GFP (eGFP), a c-myc, and a His6 tag [7].
3. Depending on the cell line you want to transduce, choose the appropriate retroviral envelope (ecotropic, amphotropic, pantropic). The VSV-G envelope is used for pantropic virus production that allows all mammalian species cell lines transduction.
4. Stably transfected 293 packaging cell lines expressing Gag and Pol proteins are available at Clontech. They also provide several retroviral packaging cell lines each expressing, in addition to Gag and Pol, a different envelope to make ecotropic, amphotropic, or pantropic retrovirus.
5. The HEK 293 cell line is easy to transfect. You may choose other transfecting reagents such as FuGENE (Promega) or LipofectAMINE (Invitrogen). Refer to the manufacturer's instructions for experimental conditions. The 293 cells can also be efficiently transfected using calcium phosphate.
6. Frozen aliquots are stable for up to 1 year. The working stock can be stored at 4°C for up to 2 weeks.
7. PFA is highly toxic by inhalation. Manipulate under a chemical hood.

8. Concentrated (16% or 32%) stable PFA aqueous solution is available. You can also prepare the PBS-2% PFA solution: Dissolve 2 g of PFA powder in 90 mL of water heated to 60 °C, add 100 μ L of a 2 M NaOH solution, stir until the solution becomes clear, complete with 10 mL of 10 \times PBS, adjust the pH to 7.4, aliquot and store at -20 °C.
9. Undiluted Triton X-100 is a viscous fluid. Prepare a 10% stock solution by adding 1 mL of Triton X-100 to 9 mL of distilled water. Mix at room temperature on a rotating wheel until the detergent is completely dissolved. Store at 4 °C.
10. Prepare a Hoechst 33342 dye solution by dissolving the powder in water to a final concentration of 50 mg/mL. Do not dilute the dye in PBS as it will precipitate at this concentration. Store aliquots at -20 °C.
11. Alternatively, you can prepare Mowiol coverslip mounting solution: add 6 g of glycerol and 2.4 g of Mowiol 4-88 to 6 mL of distilled water and leave at room temperature for 2 h. Add 12 mL of 0.2 M Tris (pH 8.5) and incubate at ~ 55 °C until Mowiol has dissolved. Clarify by centrifugation at $5000 \times g$ for 15 min. Store in 1 mL aliquots at -20 °C.
12. Retrovirus manipulation requires Biosafety Level 2 (BL2) or BL3 physical containment. Check with your local authority before starting your experiment.
13. HEK 293 cells attach weakly to the culture flask or dishes. Cells detach easily by just flushing the dishes. Here, the trypsinization step is important to get single cell suspension and reproducible experiments.
14. Prepare as many dishes as necessary, knowing that, in this protocol, around 10 mL of supernatant containing retrovirus is produced per 100 mm dish, and 1 mL of supernatant will permit to transduce one million of cells. To scale up, you can also transfect 293 cells in 150 mm dishes.
15. To improve attachment of 293 cells to the plastic, you can coat the culture dishes with poly-D-lysine. Cover the 100 mm dishes with a sterile 5 μ g/mL poly-D-Lysine solution diluted in distilled water. Incubate the plates for 2 h at room temperature. Wash three times with PBS before plating your cells.
16. This step is important to get rid of the 293 cells present in the supernatant.
17. For a better efficiency, perform infection immediately with fresh supernatant containing retroviral particles. VSV-G-pseudotyped retrovirus are however stable at -80 °C and aliquots can be kept frozen and used for at least 3 months.
18. Retrovirus only infects dividing cells. Thus, make sure your cells grow well during the infection by adjusting the number of seeded cells.

19. In this protocol, we do not concentrate retroviral particles before infection. All cell lines tested so far in the group (e.g., HeLa, MCF7, HCT116, SW48, DLD-1, HepG2) are efficiently transduced using these experimental conditions. However, in this experiment, you will not control the number of insertion events per cell. For making libraries you may need to determine the viral titer to use a precise MOI during the infection. Using the procedure described here, we routinely obtain a viral titer of about $1-5 \times 10^7$ cfu/mL. Many protocols are available to measure your viral titer, for instance in the retroviral gene transfer and expression user manual of Clontech.
20. You should start to see the scFv-GFP fusion protein expression 6–24 h after cell transduction. If you wish to improve transduction efficiency by increasing the gene copy number per cell, you can perform a second infection 24 h after the first one.
21. Because each cell line has its own sensitivity to a given antibiotic, you have to determine, before the transduction step, the optimal concentration of hygromycin B necessary to kill the uninfected cells. For most cell lines, the optimal concentration will lie between 50 and 1000 $\mu\text{g/mL}$. For instance, optimal concentration is 100 $\mu\text{g/mL}$ for HCT116, and 500 $\mu\text{g/mL}$ for HeLa and MCF7. When performing the retroviral transduction, do not forget to provide a control dish of uninfected target cells as a positive control of the antibiotic selection efficacy. Hygromycin B-induced killing is slow and may take 10–14 days.
22. To guarantee a stable expression of the scFv-GFP protein and avoid silencing, always maintain the antibiotic selective pressure in your cell cultures.
23. Paraformaldehyde cross-links proteins and permits detection of soluble proteins. Alternatively, you can use methanol that fixes the cells by dehydration. Methanol precipitates proteins and permeabilizes the cells at the same time, so that soluble proteins from the cytoplasm may be extracted. Use therefore methanol fixation for nuclear and cytoskeletal protein detection. Immerse coverslips in ice-cold absolute methanol (about 1 mL), then incubate for 10 min at -20°C . Gradually rehydrate the cells by adding PBS in aliquot of about 500 μL to the methanol covering your coverslips. Finally wash cells once in PBS.
24. To prepare a 5 $\mu\text{g/mL}$ solution of Hoechst in PBS, perform a 100-fold intermediate dilution of the stock solution in water. This will avoid precipitation of the dye in PBS.
25. According to the manufacturer's instructions, long-term storage is possible by keeping your slide in the dark at 4 or -20°C .

References

1. Lobato MN, Rabbitts TH (2003) Intracellular antibodies and challenges facing their use as therapeutic agents. *Trends Mol Med* 9:390–396
2. Visintin M, Meli GA, Cannistraci I, Cattaneo A (2004) Intracellular antibodies for proteomics. *J Immunol Methods* 290(1-2):135–153
3. Rinaldi AS, Freund G, Desplancq D, Sibler AP, Baltzinger M, Rochel N, Mély Y, Didier P, Weiss E (2013) The use of fluorescent intrabodies to detect endogenous gankyrin in living cancer cells. *Exp Cell Res* 319(6):838–849
4. Cassimeris L, Guglielmi L, Denis V, Larroque C, Martineau P (2013) Specific In Vivo Labeling of Tyrosinated alpha-Tubulin and Measurement of Microtubule Dynamics Using a GFP Tagged, Cytoplasmically Expressed Recombinant Antibody. *PLoS One* 8:e59812
5. Philibert P, Stoessel A, Wang W, Sibler A, Bec N, Larroque C, Saven JG, Courtete J, Weiss E, Martineau P (2007) A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. *BMC Biotechnol* 7:81
6. Robin G, Sato Y, Desplancq D, Rochel N, Weiss E, Martineau P (2014) Restricted diversity of antigen binding residues of antibodies revealed by computational alanine scanning of 227 antibody-antigen complexes. *J Mol Biol* 426:3729–3743
7. Freund G, Desplancq D, Stoessel A, Weinsanto R, Sibler AP, Robin G, Martineau P, Didier P, Wagner J, Weiss E (2014) Generation of an intrabody-based reagent suitable for imaging endogenous proliferating cell nuclear antigen in living cancer cells. *J Mol Recognit* 27:549–558
8. Auf der Maur A, Zahnd C, Fischer F, Spinelli S, Honegger A, Cambillau C, Escher D, Pluckthun A, Barberis A (2002) Direct in vivo screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework. *J Biol Chem* 277:45075–45085
9. Tanaka T, Chung GTY, Forster A, Lobato MN, Rabbitts TH (2003) De novo production of diverse intracellular antibody libraries. *Nucleic Acids Res* 31:e23
10. Villani ME, Carli MD, Donini M, Traversini G, Lico C, Franconi R, Benvenuto E, Desiderio A (2008) Validation of a stable recombinant antibodies repertoire for the direct selection of functional intracellular reagents. *J Immunol Methods* 329:11–20
11. Waldo GS, Standish BM, Berendzen J, Terwilliger TC (1999) Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 17(7):691–695
12. Guglielmi L, Denis V, Vezzio-Vie N, Bec N, Dariavach P, Larroque C, Martineau P (2011) Selection for intrabody solubility in mammalian cells using GFP fusions. *Protein Eng Des Sel* 24:873–881

RÉSUMÉ

Inhibition isoforme spécifique des fonctions de la MAPK p38 α par des fragments d'anticorps

La MAPK p38 α est une protéine clé de l'inflammation, également impliquée dans de nombreux processus liés au cancer. Les petites molécules chimiques inhibitrices de p38 α bloquent son activité kinase par un mécanisme de compétition à l'ATP. En raison de la grande conservation du domaine kinase, la spécificité de la majorité de ces inhibiteurs n'est pas restreinte à la p38 α et des effets « off-targets » ont été rapportés. Dans ce contexte, le projet de ma thèse a porté sur l'utilisation de fragments d'anticorps au format scFv comme nouvel outil de ciblage pharmacologique afin de définir une/des voie(s) alternative(s) d'inhibition de la p38 α .

Les fragments d'anticorps lient un motif antigénique avec une affinité et une spécificité élevées, tout comme les immunoglobulines classiques. Leur expression intracellulaire permet également le ciblage de protéines cytoplasmiques et l'étude de leurs fonctions dans des processus physiologiques et pathologiques. Nous avons sélectionné par phage display, à partir d'une banque de fragments d'anticorps, 5 scFv spécifiques de la MAPK p38 α . Alors que tous ces scFv empêchent l'activation par phosphorylation de la p38 α par MKK6, l'un d'entre eux agit directement sur l'enzyme pour inhiber totalement son activité kinase *in vitro*. Ce scFv possède un site de liaison et un mécanisme d'inhibition distincts des inhibiteurs pharmacologiques déjà décrits : bien qu'il ne cible pas le domaine kinase et n'empêche pas la fixation de l'ATP, le scFv se comporte comme un inhibiteur compétitif de l'hydrolyse de l'ATP. Ces résultats suggèrent un effet allostérique du scFv sur l'activité de la p38 α et permettent de le caractériser comme un inhibiteur compétitif non conventionnel. La détermination de son épitope d'interaction ainsi que la confirmation de sa fonctionnalité une fois exprimé dans le cytosol des cellules nous permettra de définir une voie alternative d'inhibition de la p38 α et de valider notre approche de ciblage par l'utilisation de fragments d'anticorps.

Ces données ouvrent de nouvelles perspectives de design d'inhibiteurs chimiques de la p38 α de meilleure spécificité que ceux actuellement disponibles.

Mots-clés : MAPK p38 α , scFv, inhibiteur allostérique

ABSTRACT

Isoform-specific inhibition of MAPK p38 α functions by antibody fragments

MAPK p38 α is a key protein in inflammation, but is also involved in many cancer-related processes. All the currently described chemical inhibitors of p38 α inhibit its kinase activity by an ATP-competitive mechanism. Because of the high conservation of the ATP-binding pocket, the majority of these inhibitors are not specific to p38 α and off-target effects have been reported. To identify alternative approaches to inhibit p38 α MAPK, my thesis project focused on the use of scFv antibody fragments as a new highly specific pharmacological tool.

Antibody fragments bind to an antigen with high affinity and specificity like conventional immunoglobulins. Their intracellular expression also allows to target cytoplasmic proteins and study the target functions in physiological and pathological processes. Using a naïve library of antibody fragments, we have selected by phage display five scFv specific of MAPK p38 α isoform. While all these scFv inhibit the activation of p38 α by MKK6, one of them also completely inhibits its kinase activity *in vitro*. This scFv has a binding site and a mechanism of inhibition distinct from the pharmacological inhibitors currently described: although it does not target the ATP-binding pocket and does not prevent ATP binding, it behaves like a competitive inhibitor of ATP hydrolysis. These results suggest an allosteric effect of this scFv on p38 α activity and allow to characterize it as an unconventional competitive inhibitor. The determination of its epitope as well as the confirmation of its inhibitory activity once expressed in the cell cytosol will allow us to propose an alternative approach to target p38 α function using antibody fragments.

These data open up new perspectives for the design of more specific p38 α chemical inhibitors than those currently available.

Keywords : MAPK p38 α , scFv, allosteric inhibitor