



HAL
open science

Nouvelle stratégie de ciblage de la GTPase RhoB : développement d'intracorps conformationnels sélectifs et leur fonctionnalisation en tant qu'inhibiteurs intracellulaires de l'activité de RhoB

Nicolas Bery

► To cite this version:

Nicolas Bery. Nouvelle stratégie de ciblage de la GTPase RhoB : développement d'intracorps conformationnels sélectifs et leur fonctionnalisation en tant qu'inhibiteurs intracellulaires de l'activité de RhoB. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Toulouse 3 Paul Sabatier, 2014. Français. NNT : . tel-04955290

HAL Id: tel-04955290

<https://hal.science/tel-04955290v1>

Submitted on 18 Feb 2025

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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Nicolas BERY

Le vendredi 28 novembre 2014

Titre :

Nouvelle stratégie de ciblage de la GTPase RhoB :
développement d'intracorpse conformationnels sélectifs et leur
fonctionnalisation en tant qu'inhibiteurs intracellulaires de l'activité de RhoB

ED BSB : Biotechnologies, Cancérologie

Unité de recherche :

UMR 1037 - CRCT - Equipe 3 "Rho GTPase in tumor progression"

Directeur(s) de Thèse :

Pr. Gilles FAVRE et Dr. Aurélien OLICHON

Rapporteurs :

Dr. Piona DARIAVACH, Dr. Philippe FORT et Dr. Jean-Luc TEILLAUD

Autre(s) membre(s) du jury :

Dr. Franck PEREZ (Examineur)

Il n'y a pas de problème ; il n'y a que des solutions.

L'esprit de l'homme invente ensuite le problème.

André Gide

A ma Maman,

Remerciements

Aux membres du jury,

Merci aux Dr. Piona Dariavach, Dr. Philippe Fort et Dr. Jean-Luc Teillaud d'avoir accepté d'évaluer mon travail doctoral. C'est un honneur de vous avoir en tant que rapporteur dans mon jury de thèse. Merci au Dr. Franck Perez pour votre présence à cette soutenance en tant qu'examineur. Je vous remercie pour notre collaboration et également de m'avoir accueilli au sein de votre équipe au cours de ma thèse.

A mes directeurs de thèse,

Merci Aurélien, d'avoir accepté de me confier ce projet (et de m'avoir confié l'enseignement!). Je me rappelle encore de notre premier entretien où je suis ressorti avec un bon feeling. Effectivement, je ne me suis pas trompé, tout s'est bien passé pendant ces années passées au laboratoire même si tout n'est pas si facile avec RhoB... Merci pour tout ce que tu as fait pour moi. Grâce à toi j'ai appris et acquis énormément d'autonomie. Je pense donc être paré pour aller en post-doc!

Merci Gilles de m'avoir accueilli dans votre équipe et de m'avoir beaucoup aidé sur mon projet. Un immense merci pour m'avoir donné la possibilité de partir au PEGS à Boston! J'ai passé de très bons moments que ce soit sur le plan humain ou scientifique dans votre équipe.

Aux personnes qui m'ont donné goût à la recherche,

Merci à mon premier encadrant de stage le Pr. Philippe Lanotte. Vous m'avez donné envie, déjà à l'époque, à travers votre gentillesse, votre passion et votre confiance de continuer dans cette voie et je ne le regrette pas du tout!

Merci à mon encadrante lors de mon stage à Sanofi, le Dr. Sylvie Llopart de m'avoir aussi poussé à continuer dans la recherche (dans le monde des anticorps!). J'y suis et j'espère y rester.

Merci au Pr. Claude Maranges de m'avoir soutenu pour effectuer ce parcours recherche lors de mes années INSA.

Aux personnes qui ont participé à ce travail

Merci à Sandrine Moutel pour ton aide précieuse dans notre collaboration dont ton encadrement pour les IF!! Je suis un expert maintenant! Merci à Laura pour ton implication dans ce projet de thèse. Merci à Anne-Laure, Julia et Rémi qui avez été impliqués dans ces travaux!

Aux membres de l'équipe,

Merci à tous les membres de l'équipe pour ces 4 années passées au laboratoire, notamment merci à Anne pour ton aide durant ma thèse, toujours présente pour donner de bons conseils (je pense que tu vas manquer au labo!), à Isa, Patrick et Jean-Charles pour votre aide et vos conseils tout au long de ma thèse, à Claire qui nous simplifie la vie au quotidien, et merci également à Olivier et Stéphanie.

Merci aussi à tous les jeunes (et moins jeunes n'est-ce pas Julia, Olivier et Cathy?!) du labo pour toutes les soirées et sorties que nous avons faites! Rémi pour m'avoir aidé dans mon projet, pour toutes les bonnes soirées ensemble (quand tu ne fais pas une Rémiade...) et tous tes coups de mains hors labo. Attention maintenant tu vas être papa, n'oublie pas de mettre ton casque quand tu fais du vélo! Julia alias mamie, merci pour ton aide et tes tomates et toutes nos discussions (pas de sciences avec toi car tu ne comprends pas tout!). Oliver, Mister Souris, encore quelques papiers et tu l'auras ce concours! Iotefa, Monsieur FACS alias le chinois ou encore le combattant de requins, on a bien rigolé et merci de la compagnie le week end au labo! Marjorie que la cristallo soit avec toi et merci pour ta bonne humeur au labo et à ton légendaire rire, ce qui me fait venir à Magda alias la digne remplaçante d'Audrey! Merci, avec toi, même si on n'est pas drôle on se sent l'âme d'un comique! Merci à Faten et tes strip-teases au labo avec ton collier sexy et Cathy qui danse sur les tables. Je remercie tous les copains / copines de mes collègues avec qui j'ai passé de supers soirées : Pierre, Laurent, Jérémie, Audrey, Aurora et Cédric.

Merci aux personnes des autres équipes présentes à l'ICR : les "Poirot" : à Phillips, j'espère que nos conversations en anglais t'auront fait progressé, en tout cas à présent je suis bilingue! Maud et sa gym suédoise, Marion (merci pour les lignées stables!!), Aurélie, Elodie, Nizar, Manu qui est dans la même galère que moi en train de rédiger, Cécile et le petit Micka le roi du prono! Merci à tous ceux du 3^{ème} : Julie, Perrine, Nico, Anthony, Laurent, Judith, Caro qui nous a facilité la vie avec le L2!

Merci aux membres passés par l'ICR et qui se sont envolés vers d'autres destinations avec qui j'ai passé de supers moments : Audrey merci pour toutes nos sorties hors labo et nos nocturnes au labo, et un grand merci pour ta chaise de bureau, elle est fort confortable! Merci à Kenza et Laura : mes compagnons de bureau et de M2R! J'ai passé 6 mois super avec vous en M2R et ça s'est prolongé avec Kenza pendant 3 ans! On a bien rigolé! Félicitation à Laura pour ta reconversion réussie et ton petit! Aux Suisses Adrien et Sandra avec qui j'ai passé une super première année de thèse! Nos pauses et soirées me manquent quand même! Merci à Emilie pour toutes nos discussions (scientifiques...) et soirées et avec qui j'ai partagé un PC pendant 6 mois (je pensais que tu n'allais jamais partir!) et à Christine partie elle aussi en Suisse. Merci à tous ceux que j'ai côtoyé et avec qui j'ai passé de bons moments sur et en dehors du labo : Anne-Laure (nos supers manips de FACS vont

me manquer!), Magali mon ex-voisine de paillasse, Claire Marty mon ex-ex-voisine de paillasse, Marie-Ange sans qui les manip à l'ICR n'auraient pas été possible et Jeanine pour ta disponibilité, et aux stagiaires venus dans notre équipe durant ces 4 années qui ont apporté de la bonne humeur : Adriano, Guillaume, Morgane, Pauline 1 et Pauline 2, Marion et son rouge à lèvres, Charlène, Maxence, Laurent, Marie-Eve et tout ceux que j'oublie.

A mes amis

Merci aussi à tous mes amis de prépa : à Vincent et Claire les nouveaux mariés, à Matthieu je viendrai bientôt sur ton île paradisiaque! Et Huguy Monsieur Iron Man! Merci pour tous les délires à l'internat et nos férias inoubliables!!!! Merci également à Stéph mon pote de l'INSA! On s'est bien marré pendant nos soirées et férias, dommage qu'on ait un peu "grandi" (eh oui fini la vodka, place au vin!) car ces soirées étaient au top! Merci à mes potos du collège que je retrouve à chaque fois que je rentre chez moi : BenJ et Tony les survivants du 37! Enfin merci aux amis de Toulouse partis ou encore présents : Julie, Florent (top ton apparition dans QPC), Ale, Jérémiah, Aurélie (plus jamais de vacances avec toi!), Roberto et tes supers bouffes à ton appart, Nicola (ah le nombre de match qu'on a pu voir ensemble, ça me manque!) vous m'avez tous permis de sortir, de m'éclater et d'oublier la thèse quand tout n'était pas rose! Merci au coloc Nico qui a supporté la période de rédaction de la thèse à l'appart!

A ma famille

Enfin, un grand merci à toute ma famille qui a toujours été derrière moi : mes chères tantes : tata Maryse (ta soupe à la fane de radis est succulente!) et tata Nana merci vous m'avez toujours soutenu et cru en moi. Mon tonton & parrain courage, je pense fort à toi! Papy, mamie vous m'avez toujours aidé et j'espère que vous êtes fier de moi! A mes cousins cousines et tous nos bons moments passés ensembles (et à venir!!!) : Robin, Juju, Claire, Mohéra, Steeve et mes deux petites cousines trop mignonnes Lilou et Zélie!

Bien sûr un immense merci à mes sœurs, la grosse et la naine, et à mon papa sans qui je ne serai rien. Vous avez toujours été là pour écouter (voire supporter) mes élucubrations scientifiques et m'aider! Je vous aime et vous êtes ce que j'ai de plus cher avec toi Agne!

Heureusement que tu as été présente pendant ces 3 années passées ensemble. Sans toi cette thèse ne se serait pas passée aussi bien, quelle chance de t'avoir eu à mes côtés! Tu m'as toujours aidé et cru en moi! Les nombreux week end au labo sont passés bien mieux avec toi! Je suis heureux que tu aies eu la bonne idée de venir faire une thèse ici! Aie confiance en toi, tu es brillante!! Adesso ti aspetto con impazienza ad Oxford per una nuova avventura a due!

SOMMAIRE

Table des abréviations	1
Table des illustrations	3
Introduction	5
A/ La GTPase RhoB	7
I/ La famille des GTPases Rho	7
1) Organisation de la famille	7
2) Structure et domaines des GTPases RhoA, RhoB et RhoC	8
3) Cycle d'activation des Rho	9
4) Fonctions générales des Rho	10
5) Implication des Rho dans les cancers	10
II/ La GTPase RhoB	12
1) Structure du gène et de la protéine	12
2) Régulations de RhoB	12
a) Régulation transcriptionnelle de l'expression de RhoB	13
b) Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de RhoB	14
c) Régulation post-traductionnelle de l'expression de RhoB	14
i) La prénylation	14
ii) La palmitoylation	15
iii) La phosphorylation	15
iv) L'ubiquitinylation	15
d) Régulation de l'expression de RhoB	16
e) Régulation de l'activation de RhoB	16
3) Localisations subcellulaires de RhoB	17
4) Fonctions biologiques de RhoB	17
a) RhoB et cytosquelette d'actine	18
b) RhoB, adhérence et migration cellulaire	19
c) RhoB et trafic intracellulaire	20
d) RhoB et mort cellulaire	20
e) RhoB et les facteurs de transcription	21
5) RhoB et oncogénèse	22
a) Expression dans les tumeurs	22
b) Mécanismes conduisant à l'oncogénèse	22
i) Prolifération cellulaire	23
ii) Transformation	23
iii) Adhésion/Migration/Invasion	23
iv) Instabilité génomique	24
v) Réponse aux thérapeutiques	24
III/ Méthodes d'études des GTPases Rho	25
1) Modification de l'expression des GTPases Rho	25
a) Extinction de la protéine	25
i) Extinction transitoire des GTPases	25
ii) Extinction stable des GTPases	26
iii) Techniques envisageables	26
b) Surexpression de la protéine	27
2) Modifications de l'activité des GTPases	28
a) Toxines bactériennes	28
b) Inhibiteurs pharmacologiques	29
c) Modulation de la quantité des régulateurs et effecteurs des GTPases	29

d) Agents / Stress activant les GTPases	30
3) Etude de l'activité des GTPases Rho	30
a) Quantification de l'activité	30
b) Etude spatio-temporel des GTPases activées	31
i) Fusion de domaines d'effecteurs à une protéine fluorescente	31
ii) Biosenseurs utilisant le FRET	32
iii) Biosenseurs alternatifs au FRET	34
iv) Les anticorps conformationnels	35
B/ LES ANTICORPS RECOMBINANTS ET LEURS MODES D'OBTENTION	37
I/ Différents formats d'anticorps recombinants	37
1) Fab	37
2) scFv	38
3) Anticorps à simple domaine	39
a) Domaines VH et VL	39
b) V-NAR	40
c) VHH	41
4) Fragments d'anticorps et applications thérapeutiques	43
II/ Méthodes de sélection des fragments d'anticorps	44
1) Phage display	45
a) Historique du phage display	45
b) Principe	45
c) Mise en œuvre du phage display	45
i) Choix du type de phage pour la présentation de l'anticorps	45
ii) Choix de la protéine de capsid du bactériophage M13 pour la présentation de l'Ac	46
iii) Choix du mode d'expression des anticorps	47
d) Déroulement d'une sélection par phage display	48
e) Différentes stratégies de criblage par phage display	48
2) Ribosome/RNA display	49
3) Microbial display	50
4) Mammalian display	51
5) Autres types de sélection	52
III/ Banques de fragments d'anticorps et criblage	53
1) Banques immunes	53
2) Banques naïves	54
3) Banques semi-synthétiques et synthétiques	55
a) Banques semi-synthétiques	55
b) Banques synthétiques	56
C/ LES ANTICORPS INTRACELLULAIRES OU INTRACORPS	58
I/ Propriétés des intracorps	58
II/ Développement de banques	59
a) Banques utilisant un scaffold unique	59
b) Autres types de banques	60
III/ Procédés de criblage pour l'obtention d'intracorps	61
1) Sélection par des techniques de double hybride	61
a) Double hybride en levure	61
b) Sélection par l'IAC : capture d'anticorps intracellulaire	62
c) Sélection par le yeast 3-SPLINT	64
d) Sélection en double hybride en bactérie	65

2) Fluorescent hybrid assay _____	65
3) Direct phage to intrabody screening _____	66
4) Sélection d'intracops indépendamment de l'antigène _____	66
5) Sélection par complémentation de fragment protéique _____	67
6) Sélection phénotypique _____	68
7) Sélection rationnelle <i>in vitro</i> suivie d' <i>ex vivo</i> _____	69
8) Sélections potentiellement applicables _____	69
IV/ Fonctionnalisation des intracops _____	70
1) Pour la rétention intracellulaire de l'antigène _____	70
2) Pour la lyse cellulaire _____	71
3) Pour la dégradation de l'antigène et/ou du complexe intracops/antigène _____	71
a) Utilisation de la voie de dégradation de l'auxine _____	72
b) Fusion de l'ODC à un motif de liaison protéine-protéine _____	73
c) PROTACS : proteolysis-targeting chimeric molecule _____	73
d) Fusion directe d'une protéine Fbox à un motif de liaison protéine-protéine _____	75
e) Application des techniques de knockdown protéique aux intracops _____	75
i) Motif PEST _____	75
ii) <i>Suicide Intrabody Technology</i> _____	75
iii) Fusion directe d'une protéine Fbox à un intracops _____	76
V/ Utilisation des intracops _____	78
1) Suivi de la dynamique de protéines intracellulaires _____	78
2) Détermination de fonctions protéiques et de partenaires _____	79
3) Potentiel thérapeutique des intracops _____	81
a) Application en cancérologie _____	81
b) Application aux maladies neurodégénératives _____	81
c) Les voies de delivery des intracops _____	82
Objectifs de la thèse _____	86
Résultats _____	88
Article 1 _____	90
Article 2 _____	100
Article 3 _____	139
Discussion _____	168
1) Conception d'une banque _____	169
2) Optimisation des techniques afin de sélectionner un intracops sélectif de RhoB-GTP _____	171
a) Le phage display _____	171
b) Le criblage direct d'intracops _____	172
c) Fonctionnalisation des intracops _____	173
3) Perspectives envisagées _____	175
a) hs2dAb 6 : co-cristallographie avec RhoB _{L63} _____	175
b) hs2dAb 6 : design d'un futur biosenseur de l'activité de RhoB ? _____	176
c) Applications de l'outil en cancérologie : RhoB-GTP cible thérapeutique potentielle ? _____	176
4) Conclusion générale _____	178
Bibliographie _____	180
Annexes _____	203

Table des abréviations

5-FU : 5-Fluoro-Uracile
 Ac : Anticorps
 AD : Activator Domain
 Ag : Antigène
 ADN : Acide Désoxy-riboNucléique
 ANDc : ADN complémentaire
 ARN : Acide Ribo-Nucléique
 ARNi : ARN interférent
 AP-1 : Activator Protein 1
 CAT : Chloramphenicol Acetyl Transferase
 CDR : Complementary Determining Receptor
 CH : Constant Heavy chain
 CL : Constant Light chain
 CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
 CXCR2 : C-X-C chemokine Receptor type 2
 DBD : DNA Binding Domain
 DLC-1 : Deleted in Liver Cancer 1
 E.coli : Escherichia coli
 EGF : Epidermal Growth Factor
 EGFR : Récepteur à l'EGF
 ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
 ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
 Fab : Fragments antigen-binding
 FACS : Fluorescence Activating Cell Sorting
 FTase : Farnesyl Transférase
 FTI : Farnesyl Transférase
 FRET : Förster Resonance Energy Transfer
 FRW : Framework
 Fv : Fragment variable
 GGase : Geranylgeranyl Transférase
 GGTI : Geranylgeranyl Transférase Inhibitor
 GAP : GTPase-Activating Protein
 GDI : Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
 GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor
 GTP : Guanosine TriPhosphate
 GDP : Guanosine DiPhosphate
 GFP : Green Fluorescent Protein
 GSK-3 : Glycogen Synthase Kinase 3
 HCAb : Heavy Chain Antibody
 HER2 : Human Epithelial growth factor Receptor 2
 HDAC : Histone DeACétylase
 HIV : Human Immunodeficiency Virus
 IACT : Intracellular Antibody Capture Technology
 Ic : Intracorps
 IF : Immunofluorescence
 Ig : Immunoglobuline
 JNK : Jun N-terminal Kinase
 LPA : LysoPhosphatidic Acid
 mAb: Monoclonal Antibody
 MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase, désigne la voie canonique Ras/Raf/MEK/ERK
 MEF : Fibroblastes embryonnaires murins
 miARN : microARN
 MMS : methyl methanesulfonate
 NAR : Novel Antigen Receptor
 Nbs : Nanobodies
 NF-κB : Nuclear Factor-Kappa B
 NOS-2 : Nitric Oxyde Synthase 2
 ODC : Ornithine DéCarboxylase
 PEST : Proline (P), Acide glutamique (E), Acide aspartique (S), Thréonine (T)
 PCR : Polymerase Chain Reaction
 PDGF : Platelet Derived Growth Factor
 PDGFR : Platelet Derived Growth Factor Receptor
 PEG : PolyEthylène Glycol
 PI3K : Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase
 PRK : Protein kinase C-Related Kinase
 RBD : Rho Binding Domain
 RE : Réticulum Endoplasmique
 RFP : Red Fluorescent Protein
 Rho : Ras Homology
 RhoB-F : RhoB farnésylée
 RhoB-GG : RhoB géranylgéranylée
 sdAb : single domain Antibody
 SMAD :
 SCF : Skip-Cullin-Fbox complexe
 scFv : Single Chain Fragment Variable
 shARN : Short-Hairpin ARN
 TGF : Tumor Growth Factor
 TRIO : Triple functional domain protein
 VEGF : Vascular Growth Factor
 VL : Variable Light chain
 VH : Variable Heavy chain
 VHH : Variable Heavy of Heavy chain antibody
 VNTR : Variable Number of Tandem Repeat
 UTR : UnTranslated Region
 UV : rayons Ultra-Violets
 WB : Western Blot
 XPLN : eXchange found in Platelet, Leukemia and Neuronal tissue

Table des illustrations

FIGURES

<i>Figure 1 : Arbre phylogénétique non enraciné de la famille des GTPases Rho.....</i>	<i>7</i>
<i>Figure 2 : Organisation de la structure protéique des Rho.....</i>	<i>8</i>
<i>Figure 3 : Cycle des GTPases Rho</i>	<i>9</i>
<i>Figure 4 : Différents biosenseurs de l'activation des GTPases Rho</i>	<i>33</i>
<i>Figure 5 : Représentation schématique des différents formats d'anticorps.....</i>	<i>39</i>
<i>Figure 6 : Organisation des séquences de VH, V-NAR et VHH avec les régions frameworks</i>	<i>41</i>
<i>Figure 7 : Représentation schématique d'un bactériophage M13 et présentation de protéine à sa surface.</i>	<i>47</i>
<i>Figure 8 : Principe du phage display pour la sélection d'anticorps</i>	<i>49</i>
<i>Figure 9 : Crible de scFv en double hybride.</i>	<i>62</i>
<i>Figure 10 : Principe de fonctionnement du 3-SPLINT.</i>	<i>64</i>
<i>Figure 11 : Sélection par la méthode FLI-TRAP.....</i>	<i>67</i>
<i>Figure 12 : Apoptose dépendante de l'interaction antigène-anticorps.....</i>	<i>71</i>
<i>Figure 13 : Système de dégradation AID</i>	<i>72</i>
<i>Figure 14 : Modèle de dégradation d'une protéine cible par le système ODC/AZ.....</i>	<i>73</i>
<i>Figure 15 : Mode d'action des phosphoPROTACs.....</i>	<i>74</i>
<i>Figure 16 : Modèle de co-dégradation anticorps/antigène</i>	<i>76</i>
<i>Figure 17 : Dégradation d'une protéine cible par un intracorp (Ic) fusionné à un domaine Fbox</i>	<i>77</i>
<i>Figure 18 : Domaine du mHTT ciblé par le Happ1.....</i>	<i>81</i>
<i>Figure 19 : Options pour le delivery d'anticorps intracellulaires aux cellules cibles.....</i>	<i>83</i>

TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Altérations des GTPases Rho dans les cancers</i>	<i>11</i>
<i>Tableau 2 : Principaux effecteurs interagissant avec RhoB in cellulo et leurs fonctions</i>	<i>18</i>
<i>Tableau 3 : Principaux sdAbs en essai clinique.....</i>	<i>44</i>
<i>Tableau 4 : Comparaison des principales plateformes de sélection d'anticorps.....</i>	<i>52</i>
<i>Tableau 5 : Comparaison des différents types de banques d'anticorps de phage display</i>	<i>57</i>
<i>Tableau 6 : Mesures d'affinité pour le hs2dAb 6 contre les trois mutants actifs de Rho</i>	<i>174</i>

Introduction

Notre équipe s'intéresse à la compréhension des mécanismes de dérégulation des voies de signalisation cellulaire dans la progression tumorale, ainsi que leurs conséquences dans la réponse aux thérapies anti-tumorales. Nous nous intéressons particulièrement aux protéines Rho A, B et C. La GTPase RhoB partage 85% d'identité de séquence avec RhoA et RhoC. Ces protéines alternent entre deux conformations : une active liée au GTP et une inactive liée au GDP. A l'état actif, les protéines Rho liées au GTP participent à la régulation de la migration, de l'invasion ou de la survie cellulaire. Des dérégulations de leur expression et de leur activation sont retrouvées dans de nombreux cancers. A ce jour, aucun inhibiteur spécifique et sélectif de ces GTPases n'a pu être développé afin de bloquer l'activité de l'une ou l'autre de ces Rho. Un tel inhibiteur permettrait d'étudier le rôle de l'activité des Rho dans les cellules tumorales et de déterminer si cette activité peut-être une cible thérapeutique.

Actuellement, nous avons isolé au laboratoire plusieurs anticorps biosenseurs de la forme active des GTPases Rho, dont un anti-RhoB-GTP (Chinestra et al., 2014; Goffinet et al., 2008), sans toutefois pouvoir les utiliser dans un contexte intracellulaire (intracorps) les rendant instables. L'objectif de ma thèse était de compléter ce projet par une approche alternative conduisant cette fois à l'obtention d'intracorps fonctionnels, sélectifs de RhoB-GTP et utilisables en tant qu'inhibiteurs de cette activité.

Dans cette introduction, nous présenterons d'abord la famille des GTPases Rho ainsi que leurs méthodes d'étude en détaillant plus particulièrement la GTPase RhoB. Nous aborderons ensuite d'une part les anticorps recombinants et leurs modes d'obtention (leurs modes de sélection et les différentes banques d'anticorps recombinants) et d'autre part nous développerons les intracorps en détaillant leurs propriétés, leurs procédés d'obtention de même que leurs fonctionnalisations et leurs utilisations potentielles en biologie cellulaire et en thérapie.

A/ La GTPase RhoB

I/ La famille des GTPases Rho

1) Organisation de la famille

Les GTPases Rho, pour *Ras homology*, sont une famille de GTPases monomériques constituant la superfamille Ras avec les familles Ras, Ran, Rab et Arf. Ce sont de petites protéines : 20 à 40 kDa (190 à 250 acides aminés) à l'exception des RhoBTB. Ces protéines ont une expression ubiquitaire et sont présentes dans les cellules eucaryotes allant de la levure, aux plantes jusqu'aux mammifères (Boureux et al., 2007). Chez l'Homme, elles forment une famille de 20 membres divisés en 4 groupes et 8 sous familles (**figure 1**) (Boureux et al., 2007; Heasman and Ridley, 2008). Ces GTPases partagent entre 40 et 95% d'identité de séquence (Wennerberg and Der, 2004). Elles ont des localisations cellulaires et subcellulaires variées et différentes selon les Rho, allant du noyau à l'appareil de Golgi, au cytoplasme, aux endosomes ou encore à la membrane plasmique.

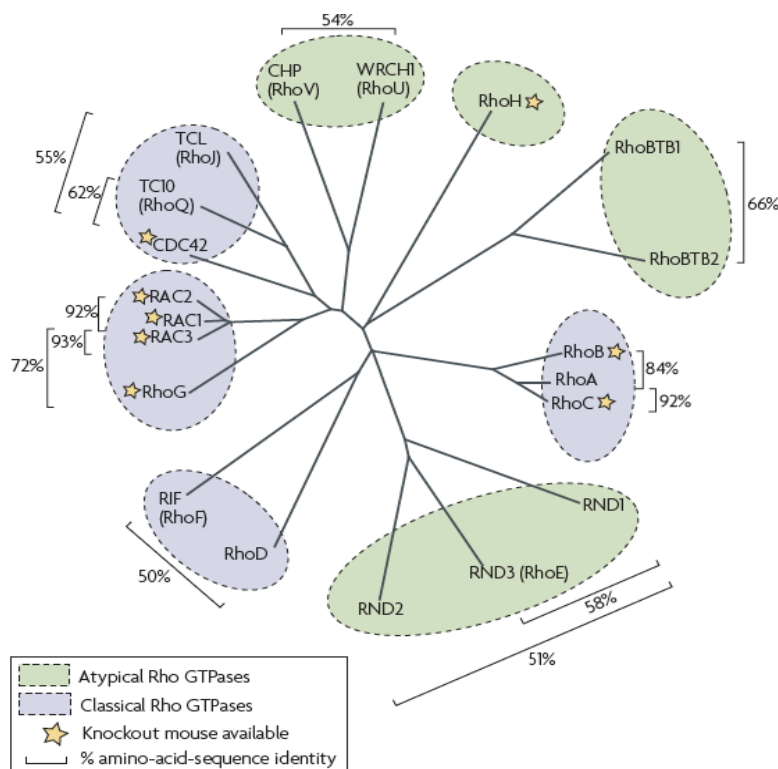


Figure 1 : Arbre phylogénétique non enraciné de la famille des GTPases Rho. Cette famille appartient à la superfamille Ras et contient 20 membres divisés en 4 groupes : groupe I : Rho, Rnd et RhoD/RhoF ; groupe II : Rac/RhoG, Cdc42/RhoQ/RhoJ et RhoV/RhoU ; groupe III : RhoH et groupe IV : RhoBTB et en 8 sous familles dont la sous famille Rho (RhoA, RhoB et RhoC) (Heasman and Ridley, 2008).

Nous allons maintenant axer notre présentation principalement sur la sous famille Rho comprenant les GTPases RhoA, RhoB et RhoC.

2) Structure et domaines des GTPases RhoA, RhoB et RhoC

Les GTPases RhoA, RhoB et RhoC partagent plus de 85% d'identité de séquences primaires : 85% entre RhoA et RhoB et 92% entre RhoA et C (**figure 2A**). La structure des protéines Rho est relativement proche de celle de Ras. Elle comprend plusieurs domaines : la partie amino-terminale (N-terminale), la plus conservée, comprend les résidus impliqués dans la liaison au GTP, un motif de liaison au Mg^{2+} , ainsi que les domaines appelés *switch* I (acides aminés (aa) en position 27 à 42) et II (aa 59 à 78), constituant une signature des GTPases, qui subissent un changement de conformation selon le nucléotide lié (GTP ou GDP) et jouent un rôle important dans la liaison aux effecteurs et aux régulateurs (**figure 2A&B**) (Soundararajan et al., 2008; Wheeler and Ridley, 2004). L'essentiel des différences de séquence primaire entre les protéines Rho se situe principalement dans la région carboxy-terminale (C-terminale), appelée région hypervariable. La CAAX *box*, située en C-terminal, est le lieu de différentes modifications post-traductionnelles telles que la prénylation (Cf. A.II.2.c).

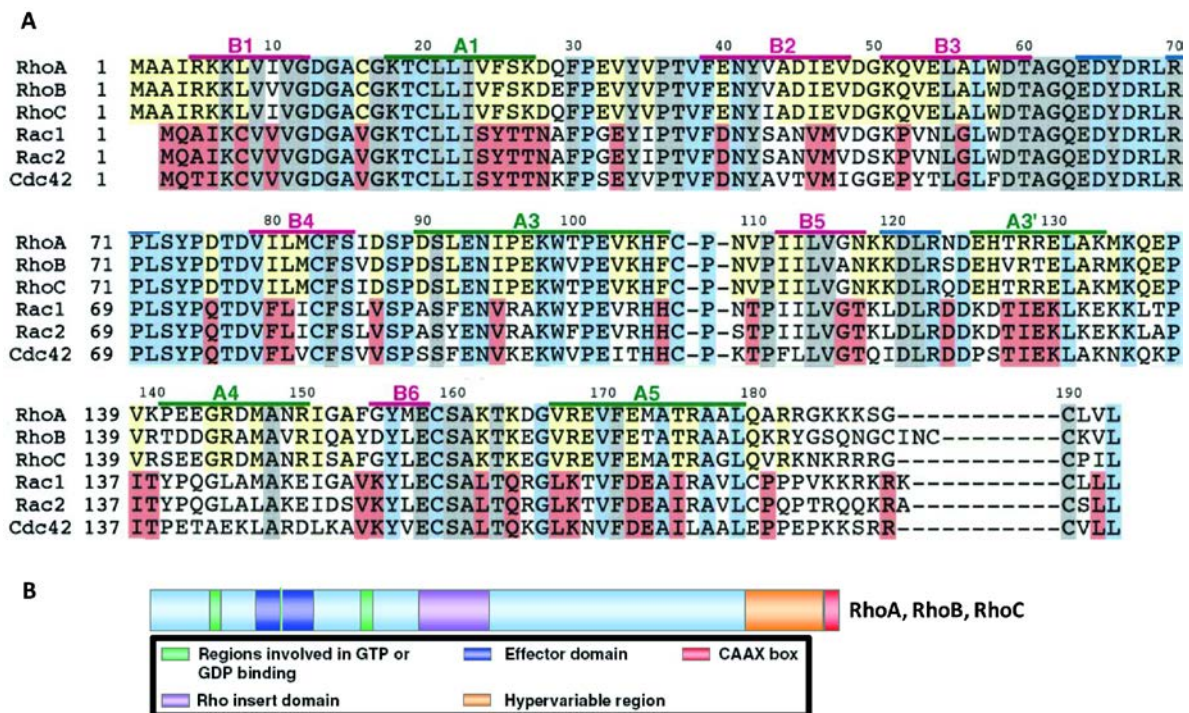


Figure 2 : Organisation de la structure protéique des Rho. (A) Alignement de séquences primaires de la famille Rho. Les résidus conservés sont surlignés en jaune pour la sous famille Rho A, B et C, en rouge pour la sous famille Rac, en bleu pour la famille des GTPases Rho et en gris pour tous les membres de la superfamille Ras. Les principaux éléments de structures secondaires sont indiqués au-dessus des séquences alignées. Les hélices α sont en vert (A3' correspond à l'*insert loop* qui est présente uniquement dans les protéines de la famille Rho et constitue une particularité qui les distingue des protéines de la sous-famille Ras), les feuillets β en rose (Ihara et al., 1998). (B) Structure des GTPases RhoA, RhoB et RhoC. La boîte CAAX est le lieu de modifications post-traductionnelles où C est une cystéine, A, un acide aminé aliphatique et X, un acide aminé quelconque (adapté de (Vega and Ridley, 2008)).

3) Cycle d'activation des Rho

Les petites GTPases sont des commutateurs moléculaires cyclant entre un état "actif" lié au GTP (conformation active) et un état "inactif" lié au GDP (conformation inactive). Le passage d'un état à un autre est finement régulé par trois familles de protéines : les GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factor*), les GAPs (*GTPase Activating Proteins*) et les GDI (*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors*) (**figure 3**). Les GEFs sont une famille de 83 membres permettant l'échange du GDP par du GTP sur les Rho, générant de cette façon la forme active de la GTPase qui pourra alors interagir avec ses effecteurs pour transduire le signal dans la cellule et réguler des processus cellulaires fondamentaux (Cf. A.I.4). Les GAPs, 67 membres chez les mammifères, activent la fonction GTPasique des protéines Rho aboutissant à leur désactivation (Vigil et al., 2010). Les GDIs sont au nombre de 3 chez les mammifères et permettent d'extraire les Rho de la membrane et de les séquestrer dans le cytoplasme. Ces protéines interagissent *via* leur partie N-terminale avec les domaines *switch* des Rho empêchant ainsi l'échange de nucléotide et elles se lient aussi par leur partie C-terminale au groupe isoprénique des Rho, masquant alors ce motif hydrophobe pour maintenir les Rho solubles (Garcia-Mata et al., 2011). Les GDI sont majoritairement liées aux Rho-GDP (Olofsson, 1999) mais aussi plus rarement aux Rho-GTP (Hancock and Hall, 1993).

Ces familles de protéines sont abordées en détail dans le chapitre II.2.e concernant la GTPase RhoB.

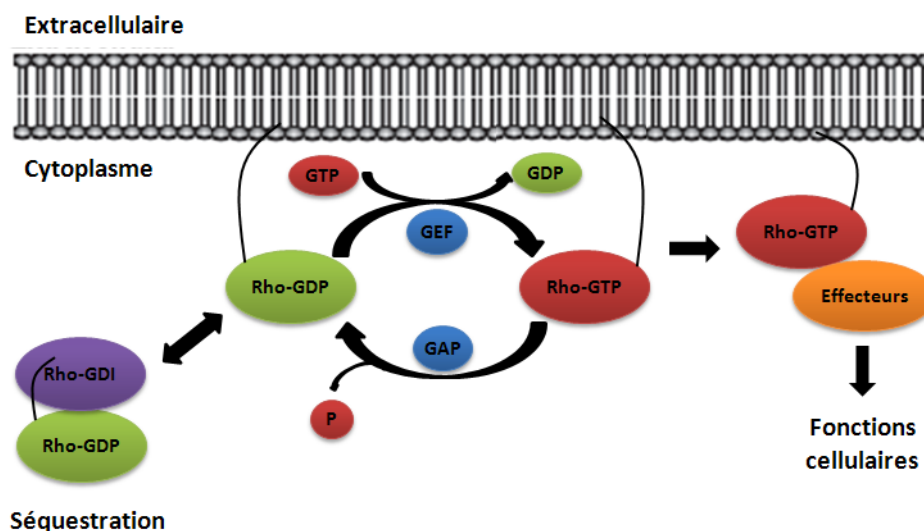


Figure 3 : Cycle des GTPases Rho. Les Rho alternent entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP. Ces protéines sont ancrées aux membranes par leur prényl. Une fois activée, les GTPases interagissent avec leurs effecteurs afin d'induire des fonctions cellulaires spécifiques. Les GTPases sont activées par les GEFs, inactivées par les GAPs et séquestrées dans le cytoplasme par les GDIs (adapté de (Huveneers and Danen, 2009)).

4) Fonctions générales des Rho

A l'état actif, les protéines Rho participent à plusieurs voies de signalisation régulant des processus cellulaires fondamentaux tels que l'organisation du cytosquelette d'actine et de microtubules ce qui les implique dans le contrôle de la motilité, la morphologie et la polarité cellulaire, le trafic vésiculaire ainsi que l'adhésion intercellulaire à la matrice extracellulaire (Jaffe and Hall, 2005). Elles se sont aussi révélées être impliquées dans d'autres processus cellulaires tels que l'expression génique, la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et la balance mort / survie (Burridge and Wennerberg, 2004; Raftopoulou and Hall, 2004).

5) Implication des Rho dans les cancers

Les GTPases Rho sont impliquées dans plusieurs pathologies et en particulier dans les cancers. A la différence des protéines Ras, les protéines Rho sont très rarement mutées dans les cancers, seules RhoH (mutations dans le 5' UTR) (Pasqualucci et al., 2001), Rac1 (Rac1^{P29S}) (Hodis et al., 2012; Krauthammer et al., 2012), Rac2 (Rac2^{P29L}), Cdc42 (Cdc42^{G12V}), RhoT (RhoT^{P30L}) (Hodis et al., 2012) et très récemment RhoA (RhoA^{G17V}) (Yoo et al., 2014) ont été décrites mutées. Cependant, les dérégulations de leur expression et/ou de leur activation sont retrouvées fréquemment dans de nombreux cancers (**tableau 1**) (Karlsson et al., 2009).

Ces dérégulations peuvent être une conséquence d'altérations géniques de leurs régulateurs comme les GEFs ou les GAPs. En effet, une hyperactivation des GTPases Rho peut être liée à sa surexpression, à la perte de l'inactivation des Rho par les GAPs ou à la surexpression de GEFs (Alan and Lundquist, 2013). Trois GEFs sont retrouvées mutées dans certains cancers : (i) une fusion de la GEF LARG (ou ARHGEF12) avec MLL conduit à l'activation de RhoA (Kourlas et al., 2000) ; (ii) la fusion des protéines BCR, qui contiennent notamment un domaine GEF, et ABL1 conduit à l'activation constitutive de la GEF et donc à l'activation de RhoA (Sahay et al., 2008) ; (iii) une autre GEF, TRIO (*triple functional domain protein*) a été retrouvée activée dans les leucémies à cellules T par un épissage alternatif entraînant la troncation de la protéine alors appelée Tgat (Yoshizuka et al., 2004).

Des délétions homozygotes de DLC-1, une GAP de RhoA, RhoB, RhoC et Cdc42, sont également décrites. Ainsi, la délétion de cette GAP entraîne une augmentation de l'activité de RhoA dans des modèles cellulaires de carcinomes hépatocellulaires (Xue et al., 2008) et de cancers du poumon non à petites cellules (Healy et al., 2008).

Tableau 1 : Altérations des GTPases Rho dans les cancers (adapté de (Karlsson et al., 2009))

GTPase Rho	Altération	Cancer
RhoA	Surexpression	Hépatocarcinome Vessie Digestifs Gynécologiques Poumon Testicules
	Mutation inactivatrice (G17V)	Lymphomes à cellules T
RhoB	Perte d'expression	Poumon
	Diminution d'expression	Poumon Tête et cou Glioblastome Gastrique
	Surexpression	Poumon Sein
RhoC	Surexpression	Mélanome Poumon Sein Pancréas Tête et cou Vessie Hépatocarcinome Gynécologiques

Une revue détaille les dérégulations des Rho et de leurs régulateurs dans les cancers (Alan and Lundquist, 2013).

II/ La GTPase RhoB

1) Structure du gène et de la protéine

Le gène RHOB est localisé sur le chromosome 2 (2p24), alors que les gènes RHOA et RHOC sont respectivement localisés sur le chromosome 3 (3p21.3) et sur le chromosome 1 (1p13.1). RHOB est constitué d'un seul exon et ne contient donc pas d'intron. Le promoteur du gène RHOB présente 97% d'homologie avec celui de la souris et du rat. Il possède deux séquences CCAAT (la première dans le sens de lecture et la deuxième inversée, appelée en conséquence iCCAAT pour CCAAT inversée), 2 boîtes TATA, des *Variable Number of Tandem Repeat* (VNTR) ainsi que d'autres sites identifiés par bioinformatique : NF Y, AP2, SP1 et NF-κB (Tovar et al., 2003). L'activité du promoteur de RHOB peut être régulée par différents facteurs décrits dans le paragraphe suivant.

La protéine RhoB est constituée de 6 feuillets β et de 5 hélices α (Soundararajan et al., 2008). Récemment, le cristal de RhoB-GTP a été résolu au laboratoire (données non publiées). Sa structure ne montre pas de différence avec celle de RhoA-GTP (PDB : 1A2B) mise à part la taille de la poche du nucléotide qui semble être plus grande pour RhoA que pour RhoB-GTP (données non publiées).

Contrairement à RhoA et RhoC dont la demi-vie est longue (supérieure à 24h) (Backlund, 1997) et dont l'expression est constitutive, RhoB a une demi-vie courte (environ 2h) tout comme son ARN messager (15 à 60 min selon le type cellulaire) (Fritz et al., 1995; Jahner and Hunter, 1991; Westmark et al., 2005).

Enfin, bien que son expression soit ubiquitaire, il a été décrit que l'expression du taux basal de RhoB est également régulée de manière cellule et tissu spécifique. Par exemple, elle est entre autre très fortement exprimée dans le tissu pulmonaire (Fritz et al., 1999).

2) Régulations de RhoB

En tant que gène de réponse précoce, l'expression de RHOB est modifiée à plusieurs niveaux et par de très nombreux facteurs tels que les facteurs de croissance (sérum, EGF, PDGF), les hormones (glucocorticoïdes, androgènes, œstrogènes), divers stress physiques (UVB, chaleur) ou les génotoxiques (rayonnements ionisants, cytotoxiques (5-FU)...). Les différents mécanismes de régulation de la GTPase RhoB qui permettent un contrôle spatio-temporel précis et nécessaire à son activité et à ses fonctions sont détaillés dans le paragraphe suivant.

a) Régulation transcriptionnelle de l'expression de RhoB

L'expression de RhoB est régulée de manière tissu spécifique, au cours du vieillissement et dans les tumeurs (Mazieres et al., 2004; Wang et al., 2003b). La méthylation des promoteurs au niveau d'îlots CpG est un mécanisme largement répandu de contrôle de l'expression des gènes. Malgré la présence d'îlots CpG sur le promoteur de RHOB aucune méthylation n'a pu être mise en évidence (Mazieres et al., 2007; Yoon et al., 2007). En revanche, la déacétylation des histones, en particulier par l'Histone DéACétylase 1 (HDAC1), semble être un mécanisme prépondérant du contrôle de l'expression de RhoB dans les tumeurs et au cours du vieillissement (Mazieres et al., 2007; Wang et al., 2003b; Yoon et al., 2007). Cependant, il existe des divergences selon les articles concernant la région du promoteur impliquée dans ce mécanisme. En effet, alors que l'article de Wang *et al.* montre que l'iCCAAT est impliquée dans l'extinction de l'expression de RhoB dans des lignées de cancers pulmonaires, celui de Mazières *et al.* montre que la délétion de la région VNTR compromet complètement ce mécanisme.

Les facteurs de croissance et les cytokines tels que l'EGF, le sérum, le TGF- β et le PDGF induisent également l'expression de RhoB au moins en partie *via* une activation transcriptionnelle directe (Jahner and Hunter, 1991). De plus l'activité du promoteur de RHOB est également induite par différents stress génotoxiques ou non tels que la chaleur (Li et al., 2011), les UV (Ahn et al., 2011; Canguilhem et al., 2005; Fritz and Kaina, 2001b; Fritz et al., 1995), les radiations ionisantes (Kim et al., 2010a; Monferran et al., 2008)), le 5-FU (Jiang et al., 2004a), les agents alkylants (Fritz and Kaina, 2000).

Au niveau mécanistique, il semblerait que ces stress induisent l'activation du facteur de transcription c-Jun, qui induirait le décrochage de l'HDAC1 *via* l'iCCAAT du promoteur de RHOB. Il a notamment été montré qu'en réponse aux UV, les facteurs de transcriptions ATF-2 et c-Jun se fixaient au niveau de la iCCAAT et/ou de la CCAAT par un autre facteur de transcription NF-Y, induisant le décrochage de HDAC1 au profit de la protéine de liaison p300, un coactivateur transcriptionnel (Ahn et al., 2011). Ainsi, en fonction des stimuli, différentes voies sont activées telles les voies JNK (Kim et al., 2010b), MEK/ERK (Vasilaki et al., 2010), PPAR γ (*Peroxisome Proliferator Activated Recepto gamma*) (Marlow et al., 2009) ou encore SMAD2/3 (Vardouli et al., 2008) induisant la transcription de la GTPase RHOB. L'expression d'oncogènes tels que Ras, les récepteurs membranaires à tyrosine kinases EGFR ou HER2 (*via* Ras pour EGFR et HER2) induit la perte d'expression de RhoB par une diminution de l'activité de son promoteur *via* un mécanisme dépendant d'AKT, le mécanisme exact et la région du promoteur impliquée n'ayant pas été élucidés (Bousquet, 2009; Jiang et al., 2004a; Jiang et al., 2004b). Ces résultats expliqueraient comment RhoB est sous exprimée dans de nombreux cancers.

b) Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de RhoB

Outre l'activation du promoteur, une augmentation de la quantité d'ARNm peut également être consécutive à la stabilisation de ce dernier. Effectivement, les UV (Canguilhem et al., 2005; Glorian et al., 2011; Westmark et al., 2005), l'EGF (Malcolm et al., 2003), les glucocorticoïdes (Chen et al., 2006), la chaleur (Li et al., 2011) et la camptothécine (Mamouni et al., 2014) augmentent la demi-vie de l'ARNm de RhoB. Westmack *et al.* proposent une implication de la protéine HuR (*Human antigen R*) dans ce mécanisme. HuR est une protéine de liaison à l'ARNm régulant plusieurs aspects du contrôle post-transcriptionnel de l'expression de gènes. De cette manière, sous UV, la protéine HuR est transloquée dans le cytoplasme et serait de ce fait capable de se lier à la région 3'UTR du messager de RhoB et ainsi de le stabiliser.

La quantité d'ARNm de RhoB peut également être contrôlée par des miRNAs. Les miRNAs sont de courts ARNs, non codants, qui contrôlent l'expression des gènes post-transcriptionnellement (Bartel, 2004). Dans la majorité des cas étudiés à ce jour, les miRNAs s'apparient à un ou plusieurs ARNm sur leur partie 3' non traduite (3'UTR) entraînant leur dégradation ou l'inhibition de leur traduction (Bartel, 2004). De nombreux miRNAs ont été impliqués dans la régulation de l'expression des GTPases Rho, jouant de cette façon sur leurs fonctions (Liu et al., 2012). La partie 3'UTR de l'ARNm de RhoB possède plusieurs sites spécifiques de fixation pour différents miRNAs : miRNA-223 (Sun et al., 2010), miRNA-19 (Glorian et al., 2011), miRNA-21 (Connolly et al., 2010; Liu et al., 2011). Le miRNA-21, un miRNA surexprimé dans de nombreux cancers, favorise la prolifération cellulaire, la migration, l'invasion, les métastases et la survie cellulaire, au moins en partie en inhibant l'expression de RhoB (Liu et al., 2011).

c) Régulation post-traductionnelle de l'expression de RhoB

i) La prénylation

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

La boîte CAAX de RhoB est constituée du motif –CKVL (Cystéine, Lysine, Valine, Leucine) qui lui permet d'être indifféremment géranyl-géranylée ou farnésylée (Adamson et al., 1992a; Baron et al., 2000) alors que RhoA et RhoC sont exclusivement retrouvées dans les cellules sous forme géranyl-géranylée. La prénylation de RhoB est importante pour sa localisation cellulaire (Milia et al., 2005), l'interaction avec certaines protéines et sa dégradation (Perez-Sala et al., 2009; Stamatakis et al., 2002; Valero et al., 2010) et est donc indispensable dans la régulation de bon nombre de ses fonctions biologiques. En effet, les fonctions de RhoB peuvent être différentes voire opposées en fonction de sa prénylation (Mazieres et al., 2005; Milia et al., 2005; Rodriguez et al., 2007).

ii) La palmitoylation

RhoB possède, dans sa région C-terminale, 2 cystéines en position 189 et 192, juste en amont de la cystéine prénylée (Cys193) qui seront palmitoylées. La palmitoylation des protéines consiste en l'ajout réversible d'un acide palmitique sur un résidu cystéine par une liaison thioester. Cette modification post-traductionnelle est nécessaire pour les activités anti-tumorales et pro-apoptotiques de RhoB (Wang and Sebti, 2005) ainsi que pour sa localisation subcellulaire (Michaelson et al., 2001), ses fonctions cellulaires (Adamson et al., 1992b; Wang and Sebti, 2005) mais aussi sa dégradation (Perez-Sala et al., 2009; Valero et al., 2010).

iii) La phosphorylation

RhoB est phosphorylée *in vitro* et *in cellulo* sur sa sérine 185 par la Caséine Kinase 1 (CK1). Cette phosphorylation entraîne une diminution de la fraction liée au GTP avec pour effet une baisse d'interaction avec ses effecteurs. Par conséquent, cette phosphorylation inhibe le rôle de RhoB sur la stabilisation de l'EGFR de même que sur la formation des fibres de stress (Tillement et al., 2008).

iv) L'ubiquitylation

Le taux des protéines Rho est régulé notamment par ubiquitylation (liaison d'ubiquitine, peptide de 8 kD, sur une lysine) suivi de l'adressage au protéasome (Visvikis et al., 2010). Ainsi RhoA est ubiquitylée par différentes ubiquitines ligases : sur les lysines en position 6 et 7 par la protéine Smurf1 (Wang et al., 2006), mais également par Cul3/BACURD (Chen et al., 2009) et sur sa lysine 135 par le complexe SCF (Skip-Cullin-Fbox) FBXL19 (Wei et al., 2013). RhoB semble également subir ce type de modification induisant sa dégradation par le protéasome 26S (Engel et al., 1998; Ishida et al., 2004). Très récemment, un article de Wang *et al.* a montré que RhoB était ubiquitylée sur les lysines 6 et 7 par Smurf1 (une ubiquitine ligase E3) permettant de ce fait un contrôle du taux basal de

RhoB dans les cellules (Wang et al., 2014). Ce point est à prendre en considération pour la stratégie de ciblage de RhoB que nous avons mis en œuvre et qui sera exposée dans la partie résultats.

d) Régulation de l'expression de RhoB

La déplétion de RhoA ou de RhoC augmente l'expression protéique de RhoB. Par exemple, l'expression et même l'activité de RhoB est augmentée dans des kératinocytes de souris KO pour RhoA (Jackson et al., 2011). Une compétition entre les 3 homologues pour la liaison à RhoGDI-1 serait une explication potentielle à cette observation. Lorsque les 3 homologues sont présents, la fraction de RhoB liée à RhoGDI-1 est minime et la protéine RhoB est rapidement dégradée. En l'absence de RhoA et/ou RhoC, une plus grande fraction de RhoB est liée à RhoGDI-1 prévenant sa dégradation, augmentant sa demi-vie et conduisant à son accumulation (Ho et al., 2008).

De plus, le traitement au TGF- β conduit aussi à une accumulation de la protéine suite à une inhibition de sa dégradation *via* le protéasome (Engel et al., 1998) (Cf.A.II.2.c.iv). RhoB subit également une dégradation par la voie endo-lysosomiale et ce grâce aux 8 derniers acides aminés de la protéine (Perez-Sala et al., 2009; Valero et al., 2010).

e) Régulation de l'activation de RhoB

Outre leur action sur l'augmentation de l'expression totale de RhoB, la majorité des stress décrits dans les paragraphes précédents induisent également une augmentation de la fraction active. C'est notamment le cas des UV, de l'EGF, de la camptothécine ou du TGF- β (Canguilhem et al., 2005; Gampel and Mellor, 2002; Mamouni et al., 2014; Vardouli et al., 2008). L'hypoxie induit également une activation de RhoB (Skuli et al., 2006).

Si la régulation de l'activité des GTPases Rho dont RhoB par les GEF, les GAP et les GDI est décrite *in vitro* et *in vivo*, peu d'études ont essayé de déterminer quel régulateur était spécifiquement impliqué en réponse à chacun des stress cités. La plupart des régulateurs du cycle d'activation (GEF, GAP et GDI) n'ont été analysés que sur les GTPases Rho les plus étudiées, à savoir RhoA, Rac1 et Cdc42. Les spécificités particulières à l'intérieur d'une sous-famille, notamment au sein de la sous famille Rho, restent encore mal connues. Des expériences de surexpression de la GEF XPLN (*eXchange found in Platelet, Leukemia and Neuronal tissue*) dans les cellules HeLa et NIH-3T3 (fibroblastes embryonnaires murins) montrent que XPLN active RhoB et RhoA mais pas RhoC (Arthur et al., 2002). Aussi, RhoB est-elle activée par la GEF-H1 dans des cellules dendritiques (Kamon et al., 2006) et par les GEFs nucléaires Ect2 et Net1 en réponse aux radiations ionisantes (Srougi and Burridge, 2011). La

GEF Vav2, quant à elle, serait impliquée dans l'activation de RhoB par le TGF- β (Papadimitriou et al., 2012) et l'EGF (Gampel and Mellor, 2002). Au sein des protéines Rho, les régulateurs semblent peu spécifiques au moins *in vitro*. *In cellulo*, une plus grande spécificité pourrait être expliquée par les différences de localisations subcellulaires et de stœchiométries des protéines Rho et des régulateurs.

3) Localisations subcellulaires de RhoB

Alors que RhoA et RhoC sont essentiellement localisées dans le cytosol sous leur forme inactive liée au GDP ou au niveau de la membrane plasmique lorsqu'elles sont activées, RhoB, possède différentes localisations subcellulaires. Elle est principalement retrouvée au niveau de la membrane plasmique (Wherlock et al., 2004) et des endosomes (Adamson et al., 1992b; Steuve et al., 2006; Wallar et al., 2007; Wherlock et al., 2004) mais également, de façon minoritaire, au niveau de l'appareil de Golgi et des vésicules pré-golgiennes (Michaelson et al., 2001) et sur le compartiment prélysosomal (Adamson et al., 1992b). RhoB a aussi été décrite dans le noyau de cellules endothéliales et cette localisation semble être dépendante de ce type cellulaire (Adini et al., 2003; Gerald et al., 2013; Lebowitz and Prendergast, 1998).

En outre, des travaux montrent que la localisation de RhoB dépend de sa prénylation. Effectivement, des mutants mimant spécifiquement les formes RhoB-GG (motif -CLLL) ou RhoB-F (motif -CAIM) ont été utilisés montrant de ce fait que la forme farnésylée de RhoB est localisée à la membrane plasmique alors que sa forme géranylgeranylée est localisée aux endosomes (Milia et al., 2005). Il est intéressant de noter que ses homologues RhoA et RhoC sont géranylgeranylés et associés à la membrane plasmique et que cette localisation est inhibée par des GGTI (inhibiteur de geranylgeranyl transferase) alors que pour RhoB, c'est le traitement des cellules par un FTI (inhibiteur de farnesyl transferase) qui inhibe sa localisation à la membrane plasmique (Wherlock et al., 2004). Cette localisation différentielle de RhoB pourrait être responsable de fonctions spécifiques selon le type de prénylation, associées ou non à sa palmitoylation.

4) Fonctions biologiques de RhoB

Les fonctions cellulaires de RhoB sont dépendantes de la liaison de la forme active de RhoB à des effecteurs qui déclencheront des voies de signalisations contrôlant les fonctions imputées à RhoB. Ces effecteurs interagissent au niveau des *switch* I et II qui présentent une très forte homologie au sein de la famille Rho. Au sein de la sous-famille Rho, la spécificité des effecteurs est mal caractérisée. Les différences de fonctions entre RhoB et ses homologues pourraient certainement

être liées aux différences de localisations subcellulaires vues ci-dessus. A titre d'exemple, les PRKs sont capables d'interagir *in vitro* avec les 3 homologues (Amano et al., 1996; Hutchinson et al., 2013) alors qu'*in cellulo* seule RhoB co-localise avec PRK1 au niveau des endosomes (Mellor et al., 1998).

Les principaux effecteurs décrits pour RhoB ainsi que leurs fonctions sont mentionnés dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Principaux effecteurs interagissant avec RhoB *in cellulo* et leurs fonctions

Effecteurs	Rôles	Références
PKR1	Recrutement aux endosomes Trafic de l'EGFR	(Gampel et al., 1999; Mellor et al., 1998)
Rhopilin-2 (ou p76RBE)	Recrutement aux endosomes	(Mircescu et al., 2002; Steuve et al., 2006)
DB1	Facteur de transcription (pour régulation de l'angiogenèse et la lymphangiogenèse)	(Gerald et al., 2013; Lebowitz and Prendergast, 1998)
TNFAIP1	Apoptose par le TNF α	(Kim et al., 2009)
PP2A	Des études du laboratoire suggèrent un lien fonctionnel direct RhoB-PP2A mais à ce jour seuls Lee <i>at al.</i> ont publié une interaction PP2A/RhoB	(Lee et al., 2007)
MAP1A/LC2	Trafic de l'EGFR	(Lajoie-Mazenc et al., 2008)

a) *RhoB et cytosquelette d'actine*

Comme ses homologues RhoA et RhoC, la protéine RhoB est impliquée dans la formation des fibres de stress d'actine. L'expression exogène d'un mutant constitutivement actif de RhoB (RhoB_{V14}) augmente la formation de fibres de stress d'actine et de points focaux d'adhésion dans des cellules NIH-3T3 (Allal et al., 2002). RhoB est nécessaire au réarrangement du cytosquelette d'actine induit par le TGF- β 1 dans les cellules Swiss-3T3 (Vardouli et al., 2008). Dans les cellules PC12, l'inhibition de RhoB par des petits ARN interférents (ARNi), prévient l'organisation du cytosquelette d'actine induite par le LPA (*lysophosphatidic acid*) (Ishida et al., 2004). Si la prénylation de RhoB est essentielle à sa fonction sur le cytosquelette d'actine (Lebowitz et al., 1997), cette fonction ne semble pas dépendre de la nature du prényl. En effet, un mutant de RhoB exclusivement farnésylable et un mutant RhoB

exclusivement géranylgeranylable présentent la même capacité d'induction des fibres de stress et des points focaux d'adhésion dans les cellules NIH-3T3 (Allal et al., 2002).

b) RhoB, adhérence et migration cellulaire

RhoB participe aux capacités de migration et d'invasion cellulaire, pourtant selon les publications un rôle pro-migratoire ou au contraire anti-migratoire lui est attribuée. Effectivement, l'expression ectopique de RhoB inhibe la migration de cellules NIH-3T3 et l'invasion de cellules de carcinome de pancréas PANC-1 (Jiang et al., 2004a) et diminue les métastases pulmonaires de mélanomes chez la souris (Jiang et al., 2004b). En accord avec ces observations, des études du laboratoire montrent que l'inhibition de l'expression de RhoB par ARNi et shRNA augmente la migration et l'invasion de cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B *via* la voie de signalisation PI3K/AKT (Bousquet, 2009). La même étude montre une augmentation significative du potentiel métastatique de cellules BKR transduites par shRNA RhoB chez la souris (Bousquet, 2009). Des travaux en cours au laboratoire tentent de déterminer les mécanismes moléculaires de cette implication de RhoB (Bousquet et al., Submitted). Dans ce contexte, nous investiguerons le rôle de l'activité de RhoB dans le modèle migratoire des cellules BEAS-2B (Cf. article 3 du manuscrit).

Cependant, des études *in vitro* indiquent que RhoB pourrait au contraire favoriser la migration cellulaire. En effet, des Fibroblastes Embryonnaires Murins (MEFs) RHOB^{-/-} présentent une motilité réduite sur support fibronectine par rapport à des MEFs RHOB^{+/+} (Liu et al., 2001b). De surcroît, la surexpression de RhoB-WT (*Wild Type* ou sauvage) favorise la motilité de cellules cancéreuses prostatiques DU145 *via* GSK-3 (*glycogen synthase kinase 3*) (Yoneda et al., 2010). De plus, son extinction par ARNi a montré son implication dans la migration et l'invasion de cellules cancéreuses de pancréas PC3 *via* l'uPAR (*Urokinase-type plasminogen activator Receptor*) (Alfano et al., 2012). L'implication de RhoB dans la migration pourrait alors dépendre du type cellulaire et surtout du mécanisme induisant la migration.

En revanche, il apparaît clairement que l'expression de RhoB modifie les capacités d'adhésion des cellules et en particulier l'expression des intégrines. Plusieurs publications de même que des travaux du laboratoire ont montré que la perte d'expression de RhoB diminue l'expression de l'intégrine $\beta 1$ (Bousquet et al., Submitted) ; (Liu et al., 2001b; Vega et al., 2012). De manière surprenante ce mécanisme semble être indépendant de l'effet de RhoB sur la migration puisqu'il est observé aussi bien dans des cellules de prostate dans lesquelles la déplétion de RhoB par ARNi diminue la migration (Vega et al., 2012) que dans des cellules pulmonaires dans lesquelles la perte d'expression de RhoB augmente au contraire la migration (Bousquet et al., Submitted).

c) *RhoB et trafic intracellulaire*

Du fait de sa localisation aux endosomes, RhoB participe de façon prépondérante au trafic vésiculaire (Fernandez-Borja et al., 2005). Il a été montré que RhoB participe de manière cruciale au trafic de récepteurs comme l'EGFR (Gampel et al., 1999; Rondanino et al., 2007), le PDGFR (Huang et al., 2007), ou encore du CXCR2 (Neel et al., 2007), mais également au trafic de protéines membranaires et/ou cytoplasmiques telles que le SRC (Sandilands et al., 2004) ou AKT (Adini et al., 2003).

d) *RhoB et mort cellulaire*

Comme nous l'avons vu précédemment (Cf. A.II.2.a), l'expression de RhoB est induite en réponse aux stress, RhoB joue alors un rôle clé dans la réponse à ces différents stress et en particulier dans le contrôle de la balance apoptose/survie. Ce rôle est extrêmement ambigu et dépend encore des modèles cellulaires et des stress appliqués.

Effectivement, selon les stress, le type cellulaire et la stratégie de modulation de RhoB, cette dernière peut jouer un rôle pro-apoptotique ou anti-apoptotique. Au sein des mêmes cellules, les articles de Fritz *et al.* et de Marlow *et al.* montrent clairement que RhoB peut jouer un rôle pro ou au contraire anti-apoptotique, en fonction du stress appliqué aux cellules (Fritz and Kaina, 2000; Marlow et al., 2010). Par exemple, dans l'article de Fritz alors que RhoB joue un rôle pro-apoptotique en réponse aux agents alkylants tels que le mafosfamide et le MMS (methyl methanesulfonate), il devient pro-survie en présence de doxorubicine. En réponse aux UV, alors que plusieurs articles du laboratoire montrent que RhoB favorise la survie (Canguilhem et al., 2005; Glorian et al., 2011; Meyer et al., 2014), les articles d'Ahn *et al.* et de Wang *et al.* montrent que RhoB induit au contraire l'apoptose (Ahn et al., 2011; Wang et al., 2014). En effet, la voie de signalisation ATR/Chk1/Smurf1 déterminerait le devenir des cellules après des dommages à l'ADN en contrôlant le taux de RhoB dans les cellules. Après un traitement UV ou au MMS, Chk1 entraîne la phosphorylation de Smurf1, ce qui augmente son auto-dégradation et résulte en une accumulation de RhoB dans les cellules, promouvant l'apoptose (Wang et al., 2014). Toutefois, il est important de noter encore une fois que les modèles cellulaires utilisés pour l'étude de la mort après UV sont différents : un modèle physiologique (pour l'étude des UV) de cellules HaCaT (kératinocytes humains immortalisés) a été utilisé dans les articles du laboratoire, des cellules Jurkat (lymphocytes T humains immortalisés) et des HeLa pour l'étude d'Ahn *et al.* et de Wang *et al.* respectivement.

De même, l'implication de RhoB dans la réponse aux radiations ionisantes est extrêmement controversée. Quatre articles émanant de quatre équipes différentes montrent que RhoB jouerait un

rôle pro-apoptotique. Les modèles utilisés comprennent des MEFs RHOB^{-/-}, des NIH-3T3 surexprimant RhoB, des lymphocytes et des MCF-7 (cellules tumorales mammaires) déplétées pour RhoB respectivement à l'aide de ARNi et de shARN (Fritz and Kaina, 2000; Kim et al., 2010a; Liu et al., 2001a; Srougi and Burrige, 2011). Au contraire, plusieurs articles de l'équipe des Drs Toulas et Cohen-Jonathan montrent que RhoB, en particulier les mutants activés ou farnésylés, serait impliquée dans la radiorésistance (Ader et al., 2003; Ader et al., 2002; Milia et al., 2005). Ces articles utilisent des clones NIH-3T3 surexprimant la forme sauvage ou les différents mutants RhoB-WT/RhoB-F/RhoB-GG ou RhoB_{N19}/RhoB_{V14}. Si une partie de ces différences peuvent être mises sur le compte de différents modèles utilisés, en revanche les articles de Milia *et al.* et Fritz & Kaina utilisant le même modèle de NIH-3T3 surexprimant de manière stable RhoB-WT, montrent des résultats contradictoires (Fritz and Kaina, 2000; Milia et al., 2005). Ces différences sont peut-être explicables au niveau expérimental : en effet Fritz & Kaina ont quantifié la survie 8 jours après une irradiation de 4 Gy alors que Milia *et al.* ont analysé la mort 6 jours après irradiation de 8 Gy.

e) *RhoB et les facteurs de transcription*

RhoB est impliquée dans la régulation de nombreux facteurs de transcription. Une stratégie de double-hybride a mis en évidence l'interaction de RhoB avec le facteur de transcription DB1 (Lebowitz and Prendergast, 1998), un facteur de transcription ubiquitaire impliqué notamment dans l'activation du promoteur de l'interleukine-3 (Koyano-Nakagawa et al., 1994). RhoB inhibe l'activation de la transcription de l'interleukine-3 induite par DB1, vraisemblablement *via* la séquestration du facteur de transcription (Lebowitz and Prendergast, 1998). RhoB interagit physiquement dans le noyau avec DB1 (aussi appelé VEZF1) régulant ainsi des groupes de gènes impliqués dans la lymphangiogenèse et l'angiogenèse de cellules endothéliales (vasculaires et lymphatiques) (Gerald et al., 2013).

De plus, RhoB réprime la transcription du récepteur au TGF- β de type II en empêchant la liaison du facteur de transcription AP-1 sur le promoteur (Adnane et al., 2002b). En régulant AP-1, il est envisageable que RhoB soit impliquée dans la régulation d'autres gènes. La protéine RhoB est aussi impliquée dans la régulation du facteur de transcription NFkB, responsable de la transcription de nombreux gènes contrôlant l'apoptose. RhoB inhibe l'activation de NFkB induite par l'agent alkylant MMS, notamment en empêchant sa translocation dans le noyau (Fritz and Kaina, 2001a). RhoB augmente la transcription de NOS-2 (*Nitric Oxyde Synthase 2*) induite par des cytokines (Delarue et al., 2001) et NOS-2 est décrite dans l'inhibition de l'invasion et de la formation de métastases *in vitro* et *in vivo*. Par conséquent, en régulant de nombreux facteurs de transcription, RhoB est engagée dans la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes.

RhoB est également impliquée dans d'autres fonctions biologiques importantes non décrites ici telles que la régulation du cycle cellulaire (Zalcman et al., 1995), l'embryogenèse (Liu and Jessell, 1998), l'angiogenèse et la lymphangiogenèse (Gerald et al., 2013; Kazerounian et al., 2013; Sabatel et al., 2011).

5) RhoB et oncogenèse

a) Expression dans les tumeurs

Montrée sur des lignées cellulaires par *microarray* (Wang et al., 2003b), puis confirmée sur des biopsies, l'expression de RhoB est très fréquemment diminuée dans les tumeurs de nombreux cancers tels que les cancers du poumon (Mazieres et al., 2004; Sato et al., 2007), gastriques (Zhou et al., 2011), de la tête et du cou (Adnane et al., 2002a), de la vessie (Kamai et al., 2003; Volanis et al., 2011), du sein hormonaux dépendants (Medale-Giamarchi et al., 2013) et les glioblastomes (Forget et al., 2002). En outre, cette perte d'expression est corrélée à la progression tumorale notamment dans les cancers du poumon (Mazieres et al., 2004) et du sein (Medale-Giamarchi et al., 2013). Pour autant, des études menées dans des tumeurs de seins et des adénocarcinomes de poumons ont montré une augmentation de l'expression de la GTPase RhoB (Fritz et al., 2002; Luis-Ravelo et al., 2014) (**tableau 1**).

Les mécanismes conduisant à cette perte d'expression sont encore mal caractérisés. Ils pourraient notamment faire intervenir ceux décrits plus haut impliquant HDAC1 et les miARNs ciblant RhoB. De plus, des délétions du chromosome 2 affectant RHOB ont également été décrites dans les cancers pulmonaires (Sato et al., 2007). Dans cette étude, près de 30% des biopsies analysées présentent une délétion homozygote et 20% une perte hétérozygote.

b) Mécanismes conduisant à l'oncogenèse

Dès lors que la dérégulation de RhoB dans certaines tumeurs a permis de suggérer que cette GTPase puisse être un suppresseur de tumeur, de nombreuses équipes ont tenté de déterminer la fonction de cette perte d'expression dans l'oncogenèse. Les différentes caractéristiques tumorales dans lesquelles l'intervention de RhoB a été mise en évidence sont développées ci-dessous.

i) Prolifération cellulaire

Tout d'abord, l'effet de RhoB sur la prolifération semble variable en fonction des lignées cellulaires. La surexpression de RhoB induit une diminution de la prolifération des fibroblastes murins NIH-3T3 transformés par Ras (Jiang et al., 2004a), les cellules de cancers humains pulmonaires A549 (Jiang et al., 2004a; Mazieres et al., 2004), gastriques (Zhou et al., 2011), ovariens (Couderc et al., 2008) et thyroïdiens (Marlow et al., 2010). De la même manière, Liu *et al.* ont observé une prolifération plus importante des MEFs RHOB^{-/-} transformées par Ras et E1A (Liu et al., 2001b). Cet effet pourrait dépendre de la présence de l'oncogène Ras activé puisqu'il n'est pas retrouvé dans les cellules épithéliales bronchiques humaines non cancéreuses BEAS-2B ni dans les cellules NIH-3T3 non transformées (Bousquet, 2009; Mazieres et al., 2005).

ii) Transformation

Le rôle de RhoB sur la transformation a été évalué selon les articles de deux manières soit (i) par la formation de colonies après un très faible ensemencement soit (ii) par la capacité à proliférer et à former des colonies en absence d'ancrage lorsque les cellules sont ensemencées sur de l'agar mou.

Le premier modèle a permis de montrer que la réexpression de RhoB diminue les capacités à former des colonies de cellules tumorales A549 ainsi que celles des cellules NIH-3T3 transformées par Ras, EGFR, ERBB2 ou SRC (Jiang et al., 2004a; Mazieres et al., 2004). Concernant le rôle respectif des formes farnésylées et géranyl-géranylées, les publications sont contradictoires. Effectivement, Chen *et al.* ont initialement montré sur un panel de lignées cellulaires tumorales humaines (Panc-1, Hela, C-33A, Saos-2) que l'expression de RhoB sauvage, farnésylée ou géranylgéranylée prévenait de manière équivalente la transformation à l'aide des deux modèles présentés ci-dessus (Chen et al., 2000). Au contraire, il a été montré au laboratoire que la forme farnésylée augmentait le nombre de clones dans les modèles d'agar mou en cellules murines NIH-3T3 (Mazieres et al., 2005). Ces observations contradictoires sont certainement liées aux types de modèles cellulaires utilisés (humain pour le premier et murin pour le second).

iii) Adhésion/Migration/Invasion

RhoB influence les capacités d'adhésion, de migration et d'invasion cellulaire et participe à ce titre à la progression tumorale. Cela a en particulier été montré au laboratoire dans un modèle de cellules pulmonaires en culture et chez l'animal (Bousquet, 2009).

iv) Instabilité génomique

Au sein des tumeurs, la perte de RhoB pourrait participer à l'instabilité génomique. En effet, il a été montré au laboratoire que RhoB est impliquée *in cellulo* dans la réponse et la réparation des dommages à l'ADN *via* la recombinaison homologue (Mamouni et al., 2014). Ces résultats semblent pertinents *in vivo* puisque les tumeurs cutanées développées par des souris RHOB^{-/-} présentent un marquage plus important pour γ -H2AX et 53BP1 signalant des cassures de l'ADN (Meyer et al., 2014).

v) Réponse aux thérapeutiques

Enfin, la protéine RhoB est impliquée dans la réponse aux stress dont ceux induits par des agents génotoxiques largement utilisés dans le traitement des cancers. A ce titre, elle participe à la réponse à ces thérapeutiques mais également à d'autres stratégies thérapeutiques telles que les FTI et les thérapies ciblées. De cette façon, RhoB pourrait également intervenir dans la réponse aux thérapies ciblées visant des oncogènes.

Les seules données disponibles dans la littérature montrent que dans des lignées de cancers ovariens, la combinaison d'Ixabepilone (stabilise les microtubules) et du Sunitinib (un inhibiteur multi-kinases ciblant entre autres le PDGR, le VEGFR et KIT) a un effet synergique et induit l'expression de RhoB. Cette dernière joue un rôle essentiel dans la réponse puisque son inhibition par shRNA prévient complètement l'apoptose induite par cette combinaison (Vishnu et al., 2012).

De surcroît, il a été montré au laboratoire que l'expression RhoB influence la sensibilité de cellules de cancers pulmonaires EGFR mutées à un inhibiteur de l'EGFR, l'Erlotinib. Les cellules exprimant fortement RhoB sont plus résistantes et la surexpression de RhoB dans des lignées sensibles, ayant une faible expression basale de RhoB, diminue également leur sensibilité. Cet effet serait dépendant d'AKT : alors qu'en l'absence de RhoB, l'Erlotinib induit une perte de l'activation d'AKT, en présence de RhoB cette dernière est maintenue. Ces résultats *in vitro* ont été confirmés *in vivo* chez la souris et chez des patients. Chez ces derniers il a été observé que les sujets traités à l'Erlotinib exprimant fortement RhoB dans leur tumeur ont une médiane de survie sans progression de 4 mois contre 18 mois pour les patients exprimant moins de RhoB. De la même façon, la survie globale est également impactée en passant de 6 mois à 24 mois (Mazières et al., en préparation).

Une autre étude réalisée au laboratoire a montré l'implication de RhoB dans la réponse de lignées de mélanomes humains (mutées B-Raf^{V600E}) aux traitements par des inhibiteurs de la voie des MAP kinases ciblant sélectivement B-RAF (PLX4032 ou vemurafenib) ou MEK (AZD6244) (Delmas et al., Submitted). Effectivement, l'action de ces inhibiteurs induit l'expression de RhoB qui est à l'état basal

très faible dans ces lignées. En absence de RhoB, l'effet pro-apoptotique du traitement est significativement accru, une observation suggérant un lien entre la surexpression de RhoB et la résistance des cellules à l'apoptose. De plus, il a été montré qu'il existait chez une petite cohorte de patient une corrélation entre l'expression de RhoB et une moindre sensibilité au vemurafenib (Delmas et al., Submitted).

Ainsi au regard de cette partie RhoB et oncogénèse, il apparaît que RhoB n'est pas un simple suppresseur de tumeur mais qu'il pourrait être un marqueur prédictif de la réponse aux traitements anti-tumoraux et voire même une cible thérapeutique d'intérêt justifiant la volonté du laboratoire d'isoler des ligands sélectifs et inhibant l'activité de cette GTPase.

Différents outils ont été mis au point afin de comprendre les fonctions des GTPases Rho et leurs régulations spatio-temporelles au sein des cellules. Ces techniques vont de l'ARNi à la surexpression de mutants jusqu'à l'utilisation de biosenseurs de leur activité.

III/ Méthodes d'études des GTPases Rho

Dans ce paragraphe nous allons détailler les techniques utilisées pour étudier les GTPases Rho (en particulier RhoB) en allant des outils les plus couramment utilisés (ARNi) aux outils les plus complexes à mettre en œuvre (biosenseurs). Nous verrons à travers cette partie les avantages et inconvénients de ces techniques ainsi que le challenge qu'est d'obtenir un outil spécifique d'une seule des Rho.

1) Modification de l'expression des GTPases Rho

a) Extinction de la protéine

i) Extinction transitoire des GTPases

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

Il est à noter que même si l'ARNi éteint exclusivement l'expression de la GTPase étudiée, la cellule peut mettre en place, en réponse à cette inhibition, une compensation par les autres GTPases et permettre une réponse de la cellule aux stimuli exercés. Par exemple, Boutler *et al.* ont montré qu'une extinction de RhoA entraînait une augmentation de la quantité totale de Rac1 et Cdc42 (Boutler et al., 2010) tout comme une extinction de RhoA ou de RhoC entraîne une augmentation de l'expression de RhoB (Ho et al., 2008) (Cf. A.II.2.d).

ii) Extinction stable des GTPases

Il existe plusieurs modèles de souris dans lesquels les gènes codant des GTPases Rho ont été inactivés de manière constitutive ou inducible (RAC1, RAC2, RAC3, RHOG, RHOB et RHOC) (Bustelo et al., 2007; Heasman and Ridley, 2008). L'étude des animaux KO pour RHOB a permis de proposer un rôle de suppresseur de tumeur pour cette GTPase. La mise en culture de fibroblastes issus de ces animaux a permis de mettre en évidence le rôle de RhoB dans la motilité de ces cellules et le trafic des vésicules endocytaires (Bustelo et al., 2007; Heasman and Ridley, 2008).

Des accidents génétiques peuvent résulter dans la délétion de loci du génome contenant des gènes d'intérêt. C'est le cas des cellules H2882 de cancer de poumon qui ont un génotype RHOB^{-/-} qui en font un outil d'étude des rôles de cette GTPase dans la signalisation cellulaire (Sato et al., 2007). Cependant, la délétion couvre une séquence d'ADN de 3,7 Mb comprenant onze gènes connus dont RHOB. L'interprétation des résultats obtenus avec cette lignée devra donc tenir compte de ce fait.

iii) Techniques envisageables

L'émergence d'endonucléases de type *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALENs) ou *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated* (CRISPR/Cas) pourraient ouvrir la voie à la construction de lignées cellulaires humaines déplétées pour une GTPase donnée.

En effet, ces systèmes sont respectivement caractérisés par une protéine de liaison à l'ADN ou une séquence d'ARN fusionnée ou co-exprimée avec une endonucléase non spécifique. La protéine de liaison à l'ADN ou la séquence d'ARN ainsi construite guide la nucléase sur une séquence cible spécifique dans le génome pour induire une cassure double brin. En conséquence à cette cassure, la machinerie de réparation de l'ADN permet ensuite l'introduction de modifications géniques au site cible telles la délétion, la correction ou l'insertion de nucléotides dans le gène (Wijshake et al., 2014). Néanmoins, il est possible de rencontrer des problèmes de clivage hors cible (*off target*) avec ces

systèmes notamment avec le CRISPR/CAS (Wijshake et al., 2014). Nous venons d'initier un projet de ciblage du début de la séquence codante du gène RHOB par des TALENs, ce projet permettra de produire des lignées KO mais aussi K-IN.

b) Surexpression de la protéine

Différents types de mutants des GTPases Rho ont été construits afin d'étudier le rôle, la localisation ou encore l'interaction avec des partenaires tels que les GEFs.

Une première catégorie de mutants regroupe les mutants dominants positifs. Ces mutants des GTPases RhoA, RhoB et RhoC possédant une substitution de la Gly14 en Val14 ou d'une Gln63 en Leu63 perdent leur capacité d'hydrolyse du GTP et leur sensibilité à la régulation par les GAPs (Longenecker et al., 2003). Ces 2 types de mutants conservent l'état biologiquement activé de la protéine. Ces protéines mutantes provoquent une stimulation persistante des cascades de signalisation lorsqu'elles sont introduites dans les cellules. L'expression du mutant RhoB_{L63} a par exemple permis de visualiser la localisation endosomale de l'effecteur PKR1 suite à son interaction avec cette GTPase activée (Mellor et al., 1998).

Une deuxième catégorie de mutants comporte elle les dominants négatifs des Rho, utilisés pour définir les voies de signalisation qui régulent l'activité des Rho. Le mutant RhoB_{N19}, résultant de la substitution de la thréonine en position 19 par une asparagine, est supposé induire des fonctions de dominants négatifs grâce à son association augmentée avec les GEFs, avec pour conséquence l'inhibition de leurs interactions avec RhoB endogène (Feig, 1999; Prendergast et al., 1995). L'expression de RhoB_{N19} a par exemple permis de montrer que l'activité de RhoB est requise pour le déplacement de CXCR2 dans le compartiment lysosomal après une stimulation prolongée du ligand CXCL8 (Neel et al., 2007).

Une troisième catégorie de mutants a été créée par Arthur *et al.* en 2002. Les auteurs ont substitué la glycine en alanine en position 17 dans RhoA pour former le RhoA_{A17} par analogie à ce qui avait été réalisé avec H-Ras (H-Ras_{A15}). Ce mutant permet de diminuer la liaison au nucléotide et de ce fait d'interagir potentiellement avec des GEFs (Arthur et al., 2002). De cette façon, RhoA_{A17} a permis de montrer que les GEFs impliquées dans l'activation de RhoB suite à des IR étaient Ect2 et Net1 (Srougi and Burridge, 2011).

Une quatrième catégorie de mutant a été sélectionnée pour leur capacité d'échange accélérée du GDP en GTP en conservant leur activité GTPasique, tout comme ils se comporteraient en présence

d'une GEF active de manière constitutive. Ils restent sensibles à la régulation par les GAPs (Lin et al., 1999). Ce mutant consiste en la substitution d'un résidu phénylalanine en un résidu leucine en position 30 (RhoB_{L30}). Ainsi ce type de mutant a permis de montrer un rôle distinct entre RhoA, RhoB et RhoC dans la transformation et la migration cellulaire (Wang et al., 2003a).

Enfin la modification des séquences CAAX des GTPases permet de modifier le type de prénylation que subiront ces protéines (géranylgeranyl ou farnésyl). La surexpression de ces mutants permet de mesurer l'importance du type de prénylation sur l'activité biologique de ces derniers et sur leur localisation intracellulaire (Cf. A.II.3). Une étude du laboratoire a montré que le mutant RhoB-CAIM (boîte -CAAX codant pour la farnésylation) est capable d'augmenter la survie des cellules NIH-3T3 après irradiation par rapport aux mutants RhoB-CLLL (boîte -CAAX codant pour la géranylgeranylation) ou RhoB déplétée de la boîte CAAX (non prénylable) (Milia et al., 2005).

En outre, tous ces mutants peuvent être fusionnés à une protéine fluorescente afin de déterminer la localisation subcellulaire des Rho (Michaelson et al., 2001; Milia et al., 2005).

Cependant, l'expression de protéines exogènes pose la question du contrôle de leur expression. Michaelson et Philips observent des localisations aberrantes des protéines chimères GFP-Rac1 et GFP-Cdc42 lorsqu'elles sont surexprimées. Ils concluent que cela est la conséquence d'une saturation des capacités de séquestration dans le cytoplasme par RhoGDI-1, puisque la surexpression concomitante de ce dernier rétablit une localisation normale des GTPases (Michaelson and Philips, 2006; Michaelson et al., 2001). De plus, une surexpression des mutants RhoA_{N19} et RhoA_{L63} dans les cellules HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293 cells*) entraîne une diminution de l'expression de Rac1 et Cdc42 (Boulter et al., 2010; Garcia-Mata et al., 2011). Ces observations obligent à interpréter avec prudence un bon nombre de résultats obtenus par surexpression de GTPases Rho exogènes aussi bien sauvages que mutantes.

2) Modifications de l'activité des GTPases

a) Toxines bactériennes

Les GTPases Rho sont les cibles de toxines bactériennes dont les effets activent ou inactivent ces protéines (Cui and Shao, 2011; Lerm et al., 2000). La C3 exoenzyme isolée à partir de *Clostridium botulinum* inhibe spécifiquement les protéines RhoA, RhoB et RhoC par ADP-ribosylation de l'asparagine en position 41 (Sekine et al., 1989). Les effets bloquants qui en découlent ne seraient pas dus à la perturbation des interactions des Rho avec les effecteurs et les régulateurs GEFs et GAPs,

mais à la séquestration des Rho dans les complexes Rho/RhoGDI (Lerm et al., 2000). Beaucoup d'études sur l'implication des Rho dans la motilité ont été réalisées en utilisant la C3 exoenzyme (Paterson et al., 1990; Ridley and Hall, 1992; Wheeler and Ridley, 2004).

Il existe aussi des toxines bactériennes activatrices : les CNFs (*Cytotoxique Necrotic Factors*). Les CNFs agissent par déamidation de la glutamine en position 63 de RhoA et en position 61 de Rac et Cdc42. Le CNF1 d'*Escherichia coli* (*E. coli*) et CNFY de *Yersinia pseudotuberculosis* sont des activateurs de RhoA, Rac et Cdc42 *in vitro*, mais leurs non-spécificités divergent selon le contexte cellulaire. Contrairement à CNF1, CNFY n'active que RhoA dans les cellules HeLa et les neurones de l'hippocampe de rat, ceci ayant été confirmé par des études d'immunoprécipitation (Hoffmann et al., 2004). En revanche, aucune donnée n'existe concernant la spécificité du CNFY vis-à-vis des autres membres de la sous-famille, RhoB et RhoC.

b) Inhibiteurs pharmacologiques

Il est possible d'inhiber spécifiquement le type de prénylation en utilisant des inhibiteurs des enzymes responsables de cette modification post-traductionnelle des GTPases : les FTases sont inhibées par les FTI, tandis que les GGTases le sont par les GGTI. L'action de ces agents pharmacologiques a pour conséquence d'altérer les capacités d'ancrage aux membranes des GTPases, inactivant ainsi ces dernières (Walker and Olson, 2005). Des travaux au laboratoire ont montré que le GGTI-298 inhibe l'activité de RhoB et perturbe la formation des fibres de stress et des points focaux d'adhésion dans les cellules NIH-3T3 (Allal et al., 2002).

Toutefois, l'inhibition de la prénylation par ces agents pharmacologiques influence l'activité de toutes les protéines physiologiquement prénylées (Rho, Ras, pré-lamines...). Ils manquent donc de spécificité d'action.

c) Modulation de la quantité des régulateurs et effecteurs des GTPases

Il est possible d'étudier les GTPases Rho en surexprimant leurs régulateurs. La surexpression de la GEF XPLN dans des cellules NIH-3T3 active RhoA et RhoB et provoque une augmentation des fibres de stress et des points focaux d'adhésion (Arthur et al., 2002). Pour autant, cette méthode ne permet pas l'étude d'une GTPase unique par manque de spécificité du régulateur.

Cet inconvénient a été en partie contourné en surexprimant la p190GAP, qui active RhoA, RhoB et RhoC, en fusion avec le domaine C-terminal de chacune de ces GTPases. Le régulateur est alors co-

localisé avec la Rho correspondante, ce qui permet de palier son manque de spécificité (Wang et al., 2003a). Cependant, les auteurs soulignent l'importance du contrôle du taux d'expression de ces chimères qui peut nuire à la spécificité et à l'efficacité de l'outil.

Les protéines Rho transmettent le signal en interagissant avec différents types d'effecteurs. En bloquant l'action des effecteurs ou l'interaction Rho/effecteur, il est possible de bloquer l'effet induit par les protéines Rho. Le composé Y-27632 (Uehata et al., 1997) est capable d'inhiber la famille des ROCKs, des protéines serine-thréonine kinases, effecteurs spécifiques de la sous-famille des protéines RhoA, B et C.

d) Agents / Stress activant les GTPases

Il est également possible d'activer les Rho, dont RhoB, *via* des agents génotoxiques, des facteurs de croissance ou encore différents stress (Cf. A.II.2) afin d'étudier par la suite leurs localisations spatio-temporelles, le rôle de la GTPase activée ou encore de valider des outils détectant la forme active.

3) Etude de l'activité des GTPases Rho

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

a) Quantification de l'activité

Dans le but d'étudier l'activation des protéines Rho endogènes, Ren et ses collaborateurs ont mis au point un système de mesure de la quantité des protéines Rho activées dans un lysat cellulaire (Ren et al., 1999). Ce système, nommé TRBD, permet de précipiter spécifiquement les protéines Rho endogènes liées au GTP. Il est basé sur l'utilisation du *Rho Binding Domain* (RBD) de la Rhotekin, un des effecteurs des protéines Rho. Ce domaine se lie de façon spécifique aux protéines Rho-GTP. Le lysat cellulaire est incubé avec le RBD immobilisé sur des billes par une étiquette GST permettant de précipiter par affinité les protéines Rho actives. Cette incubation se fait en présence d'une forte concentration en NaCl (500 mM) pour limiter les interactions polaires avec les GAPs qui inactivent les

GTPases Rho. Les protéines Rho liées au RBD sont identifiées et quantifiées par immuno-empreinte à l'aide d'anticorps spécifiques de chacune des trois protéines RhoA, RhoB et RhoC.

Cette technique nécessite des conditions strictes de température, de concentration en sel et de temps d'incubation pour être reproductible, le point critique étant la perte de signal due à l'hydrolyse du GTP par les Rho au cours de la manipulation.

b) Etude spatio-temporel des GTPases activées

Dans cette dernière partie, nous allons décrire les principaux biosenseurs de GTPases existants, utilisés afin de mieux comprendre la dynamique d'activation spatio-temporelle de ces GTPases. Actuellement, aucun biosenseur spécifique de RhoB n'a été mis au point, nous verrons donc ce qui a été fait pour les GTPases les plus étudiées que sont RhoA, Rac1 et Cdc42.

i) Fusion de domaines d'effecteurs à une protéine fluorescente

Les domaines de liaison des effecteurs des GTPases Rho peuvent être exprimés en fusion avec la GFP et être utilisés comme biosenseurs pour visualiser la localisation cellulaire et la dynamique d'activation des GTPases (**figure 4A**). Ces biosenseurs ont été notamment utilisés dans des expériences de blessure sur des oocytes de xénope et ils ont mis en évidence une co-localisation de RhoA et Cdc42 au front de migration par micro-injection de sondes constituées des domaines de liaison aux GTPases de la Rhotekin et de N-WASP respectivement (Benink and Bement, 2005). L'inconvénient de ces biosenseurs réside dans leur manque de spécificité pour les membres de chaque sous-famille à cause des domaines effecteurs utilisés. En effet, les domaines de liaison des effecteurs se lient à plusieurs GTPases, rapportant ainsi plusieurs types d'activation. Par exemple, le domaine WASP se lie avec une forte affinité à Cdc42-GTP mais aussi à plus faible affinité à Tc10-GTP (Hemsath et al., 2005) ou encore le domaine RBD se lie à RhoA-GTP, RhoB-GTP et RhoC-GTP (Ren et al., 1999).

Pour résoudre ce problème, une variété de sondes fluorescentes plus sophistiquées a été construite.

ii) Biosenseurs utilisant le FRET

Les sondes présentées à présent sont des sondes fluorescentes dont le principe est basé sur le transfert d'énergie de Förster par résonance (FRET) entre un fluorophore D (donneur) et un fluorophore A (accepteur). Le choix des fluorophores doit satisfaire deux conditions pour que le phénomène de FRET soit possible : (i) les deux fluorophores possèdent des longueurs d'onde d'excitation et d'émission distinctes, (ii) la longueur d'onde d'émission du fluorophore D correspond à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore A de telle sorte que l'excitation du fluorophore D provoque une émission de photons correspondant à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore A. Cet événement ne sera possible que dans le cas où les deux fluorophores sont à une distance inférieure à 5nm l'un de l'autre et dans une orientation adéquate, c'est-à-dire quasiment en contact.

Un senseur bimoléculaire de FRET (**figure 4B**) a permis de visualiser la localisation de l'activation de Rac1. Son activation est confinée au bord des lamellipodes et au niveau des zones de repliement de la membrane plasmique de fibroblastes en migration (Kraynov et al., 2000). Le signal de FRET a lieu lorsque le domaine de PAK marqué avec un Alexa-Fluor-546, exprimé en bactérie et micro injecté dans les cellules, interagit localement avec Rac1-GFP actif exprimé de façon exogène. Pour faciliter la quantification du FRET, un ensemble de sondes unimoléculaires (**figure 4C,D**) a été construit dans lesquels les fluorophores A et D sont fusionnés dans une seule chaîne. Comme les deux fluorophores sont distribués de façon identiques dans la cellule, les contributions sont les mêmes peu importe où la sonde est analysée.

Différentes sondes unimoléculaires existent. Dans les sondes Raichu (*Ras and interacting protein chimeric unit*) (**figure 4C**), le RBD et RhoA sont connectés par un *linker*, encadrés entre les fluorophores donneur et accepteur (Yoshizaki et al., 2003). Cependant ce type de biosenseur ne peut pas interagir avec les GDI et est constitutivement envoyé à la membrane plasmique car la CAAX de RhoA est fusionnée à la partie C-terminale de la GFP. Pour résoudre ce problème, une autre sonde Raichu a été construite dans laquelle le domaine RBD est flanqué avec les fluorophores D et A (**figure 4D**) (Yoshizaki et al., 2003). Dans ce cas, la liaison au RhoA-GTP endogène entraînera un changement conformationnel dans le RBD et une perte du signal FRET. Des biosenseurs Raichu pour Rac1 et Cdc42 avec un design similaire à ces deux types de senseurs décrits ci-dessus existent également (Itoh et al., 2002). De cette manière, ce type de biosenseur a révélé une activation de RhoA non seulement à l'arrière des cellules mais aussi au front de migration de même que dans les extensions cellulaires (lamellipodes, zones de repliement membranaire et filopodes) de cellules HeLa, MDCK et MEF (Kurokawa et al., 2005; Pertz et al., 2006). Les inconvénients de la technique des sondes Raichu

viennent du fait que leurs mises en œuvre nécessitent un matériel performant pour mesurer les variations d'émission des fluorophores, ainsi que de leur manque de spécificité puisque les effecteurs peuvent se lier à plusieurs GTPases d'une même sous-famille (**figure 4A, D, E**). Enfin, les sondes de FRET doivent être généralement exprimées après transfection des cellules et s'exposent alors aux problèmes de contrôles d'expression mentionnés plus haut.

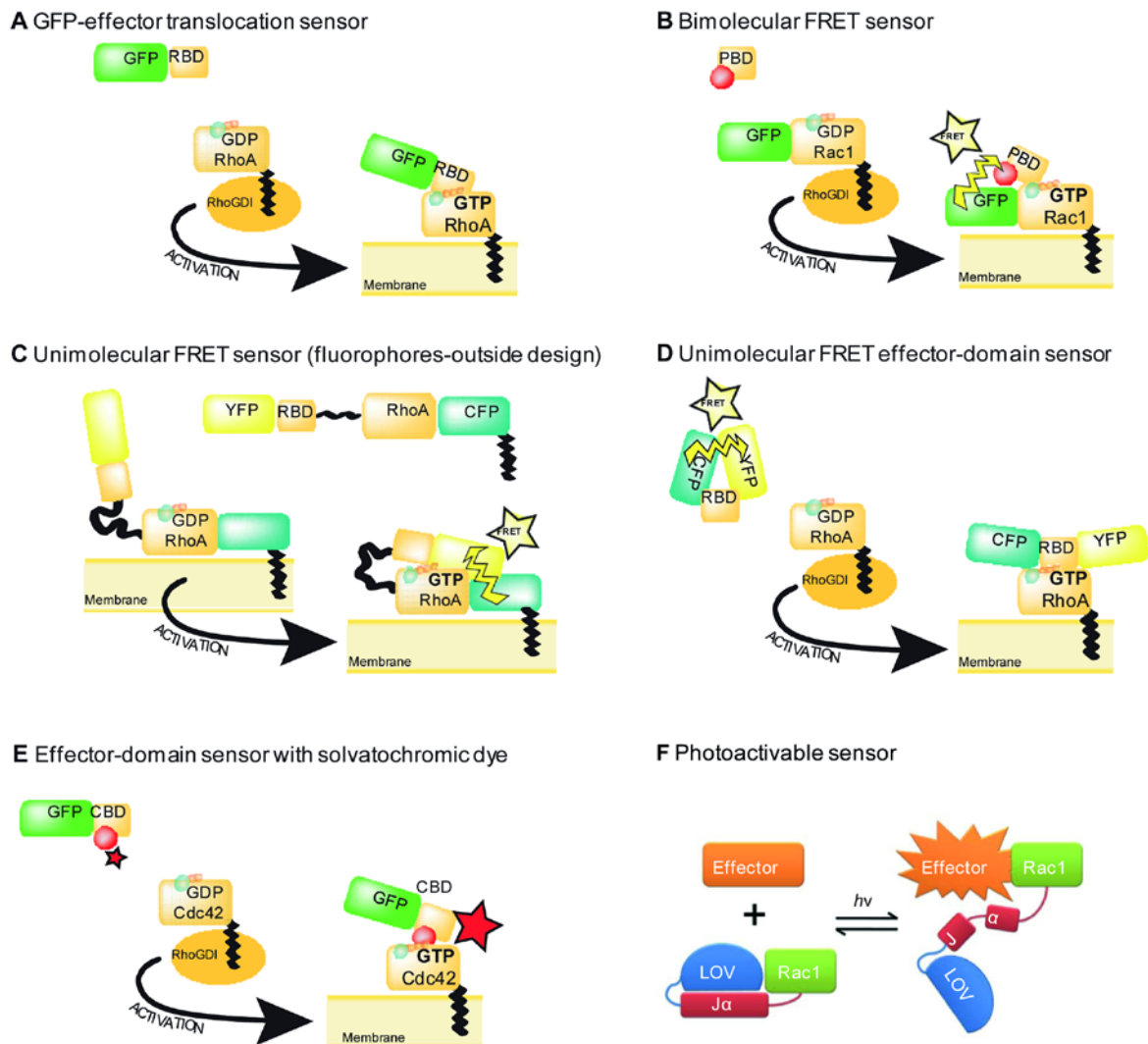


Figure 4 : Différents biosenseurs de l'activation des GTPases Rho. (A) Biosenseur de translocation d'un effecteur en fusion avec une protéine fluorescente. La GTPase étudiée est endogène (Benink and Bement, 2005). (B) Biosenseur bimoléculaire de FRET pour Rac1 (Kraynov et al., 2000). Le cercle rouge représente une dye qui est couplée de façon covalente au *PAK-binding domain* (PBD). (C,D) Biosenseurs unimoléculaire de FRET Raishu pour RhoA. En D, la RhoA activée détectée est endogène (Yoshizaki et al., 2003). RBD, *Rho-binding domain* de la Rhotekin. (E) Biosenseur basé sur une dye solvatochromique (Nalbant et al., 2004). Le cercle rouge représente une dye solvatochromique qui est couplée au domaine de liaison de Cdc42 (CBD) de WASP. L'étoile rouge représente l'augmentation d'émission de fluorescence après liaison de la sonde à Cdc42 activée endogène. (F) Senseur photoactivable (Wu et al., 2009). Des mutants de Rac1 sont fusionnés au domaine photoréactif LOV (*light oxygen voltage*) de la phototropine, bloquant stériquement les interactions avec Rac1 jusqu'à ce que la photo-excitation libère une hélice liant LOV à Rac1. Adapté de (Pertz, 2010).

iii) Biosenseurs alternatifs au FRET

Une première approche alternative au FRET consiste à dériver un domaine d'effecteur, exprimé de façon recombinante, avec une dye solvatochromatique (ici la mérocyanine) qui change d'intensité de fluorescence selon son exposition au solvant versus à un environnement hydrophobe (**figure 4E**) (Nalbant et al., 2004). Lorsque le Cdc42-*binding domain* (CBD) interagit avec le Cdc42-GTP endogène, la dye se retrouvant à proximité du site d'interaction présentera une plus forte fluorescence. Le ratio de fluorescence GFP / mérocyanine soulignera alors les régions où Cdc42 est activée. Cette sonde a révélé la localisation subcellulaire de Cdc42 activée à l'avant de MEF-3T3 (Nalbant et al., 2004). Néanmoins, selon le contexte cellulaire, l'activité de Cdc42 a été aussi clairement observée simultanément dans le compartiment golgien (Nalbant et al., 2004).

Cependant, l'augmentation de fluorescence mesurée n'est que très faible et nécessite un équipement de microscopie adapté. En outre, l'efficacité de ce biosenseur dépend du positionnement du fluorophore sur le domaine de l'effecteur et cette approche est difficilement généralisable. Par ailleurs, le manque de spécificité du RBD pour les Rho ne permet pas d'envisager une telle approche pour RhoA, B ou C.

Une seconde approche consiste à utiliser une dye photoactivable en fusion avec une GTPase. Ce travail a été réalisé sur différents mutants de Rac1 (**figure 4F**) (Wang et al., 2010; Wu et al., 2009). A l'état de base, le domaine LOV2 de la phototropine d'*Avena sativa* interagit avec une extension C-terminale en forme d'hélice ($J\alpha$) en absence de photo-excitation. Cet ensemble a été notamment fusionné à la partie N-terminal des mutants Rac1_{L61} et Rac1_{N17}. Les auteurs ont anticipé le fait que ce domaine bloquerait la liaison d'effecteurs sur Rac1 en absence de photo-excitation par encombrement stérique du domaine LOV/ $J\alpha$. Ainsi une photo-excitation induit l'ouverture de l'hélice $J\alpha$ et relâche l'inhibition stérique menant à l'activation de Rac1. L'énorme avantage de cette approche est la réversibilité du phénomène. Le Rac1 photoactivable (PA-Rac1) peut être activé réversiblement et de façon répétée en utilisant la lumière à une longueur d'onde de 458 ou 473 nm afin de générer de façon localisée des protrusions cellulaires et des repliements de la membrane plasmique. L'activation ou l'inactivation localisée de Rac1 est suffisante pour induire la migration cellulaire et contrôler la direction de migration des cellules (Wu et al., 2009).

Cette technique offre de nombreuses applications dans le guidage et l'établissement de connexions entre cellules. Elle nécessite un appareillage sophistiqué et l'expression ectopique de GTPases chimères.

Tous les types de biosenseurs n'ont pas été décrits ici, de même qu'il existe également des biosenseurs contre d'autres GTPases telles que RhoC (Bravo-Cordero et al., 2011). Une revue décrit les avancées récentes dans le design et l'application de sondes de FRET pour l'étude des GTPases (Donnelly et al., 2014).

Malgré la haute sensibilité de tous ces biosenseurs, ils modifient souvent la physiologie de la cellule. Une approche alternative a consisté à produire des senseurs moléculaires modifiables à la carte et ayant des propriétés d'affinité et de spécificité plus importantes que les méthodes décrites ci-dessus: les anticorps recombinants. Leurs méthodes d'obtention et leurs caractéristiques seront décrites dans le chapitre suivant (B). Pour les GTPases, les anticorps conformationnels sont notamment utilisés car ils ne reconnaissent qu'une seule conformation des GTPases.

iv) Les anticorps conformationnels

Ce type d'anticorps est effectivement difficile à obtenir et peu d'anticorps recombinants conformationnels spécifiques d'une GTPase existent actuellement. La preuve de concept de ciblage intracellulaire d'une GTPase a été réalisée en premier sur Ras. Tout d'abord, la microinjection d'un anticorps neutralisant anti-Ras (Y13-259, (Furth et al., 1982)) dans des cellules de carcinome de poumon H460 par Cochet *et al.* a entraîné la mort de ces cellules (Cochet et al., 1998b). Ensuite les auteurs ont exprimé les fragments variables de cet anticorps sous forme de *single chain Fragment variable* (scFv) (Cochet et al., 1998a) et son expression intracellulaire (intracorps) a induit les mêmes effets que la micro injection de l'anticorps pleine taille, c'est-à-dire la mort cellulaire des H460. Enfin l'expression adénovirale du scFv a diminué la croissance tumoral de HCT116 (cellules de carcinome de colon) en souris *nude* (Cochet et al., 1998b). Par la suite des scFvs anti-Ras ont été isolés par phage display et ont permis d'étudier la protéine Ras *in vitro* (Persic et al., 1999) ou *in cellulo* comme intracorps et ces derniers ne reconnaissent pas spécifiquement la forme active de Ras intracellulaire contrairement au scFv dérivé du Y13-259 (Lener et al., 2000).

Plus récemment, trois anticorps sélectifs d'une conformation d'une GTPase ont été produits. Deux anticorps fonctionnant dans le milieu intracellulaire ont été développés : un anti-Rab6-GTP a été développé par l'équipe de F. Perez (Nizak et al., 2003b) et un anti-H-Ras-GTP par l'équipe du Pr Rabbitts (Tanaka and Rabbitts, 2003). Les méthodes d'obtention, de développement et leur utilisation ont été décrites dans le chapitre C "Intracorps" (Cf. C.IV.7 pour Rab6 et C.IV.1.b pour H-Ras).

Suite à l'émergence des anticorps conformationnels au début des années 2000, le laboratoire a initié le projet de sélectionner des anticorps sélectifs de la conformation active des Rho. Un premier anticorps pan-Rho-GTP a été isolé après une sélection par phage display sur une banque de scFv. Néanmoins ce scFvC1 avait une faible affinité de 3 μM pour RhoA-GTP, inférieur même à celle du RBD (0,2 μM) (Goffinet et al., 2008). C'est pourquoi, Chinestra *et al.*, ont créé une nouvelle banque de scFvs *via* l'évolution moléculaire du scFvC1 et ont réalisé une maturation d'affinité par phage display. Plusieurs scFvs montrant une forte augmentation d'affinité (de l'ordre du nM) ont été obtenus dont le scFvE3 discriminant RhoB de RhoA dans leur conformation active malgré une forte homologie dans leurs régions *switch*. De plus, ce scFv reconnaît sélectivement la forme activée de RhoB d'un extrait cellulaire par *pulldown* (Chinestra et al., 2014). Ces résultats montrent la faisabilité d'obtention d'anticorps spécifiques de RhoB actif, encourageant ainsi l'initiation du projet présenté ici.

Nous verrons que notre projet est d'obtenir des intracorps spécifiques de RhoB sous forme active, afin de pouvoir étudier le rôle de cette forme active dans des modèles physiologiques établis au laboratoire.

Aussi allons-nous à présent aborder le chapitre anticorps recombinants afin de comparer les différents formats d'anticorps de même que leur mode d'obtention et les différents types de banques d'anticorps utilisées en phage display.

B/ LES ANTICORPS RECOMBINANTS ET LEURS MODES D'OBTENTION

Les anticorps monoclonaux (mAbs) représentent la plus importante classe d'outils biologiques et ont un potentiel énorme dans les applications de recherche, de diagnostic et thérapeutique grâce à leur haute spécificité et leur champs d'action étendu. Depuis les 30 dernières années, les avancées en biologie moléculaire ont permis de sélectionner plus rapidement et d'améliorer les mAbs pour obtenir les anticorps recombinants (Boulianne et al., 1984). Les anticorps recombinants sont des anticorps dont le gène (modifié ou non) est cloné dans un vecteur d'expression eucaryote ou procaryote (Better et al., 1988; Skerra and Pluckthun, 1988).

Le format original des anticorps recombinants est l'immunoglobuline pleine taille dont l'isotype presque exclusivement utilisé en thérapeutique est l'IgG. Une molécule complète d'anticorps possède donc la double capacité de se lier à un antigène de façon spécifique et d'entraîner, *via* sa région Fc, différentes fonctions effectrices. Toutefois leur structure complexe (**figure 6**) et leur haut poids moléculaire (≈ 150 kDa) rendent leur production difficile. C'est pourquoi beaucoup d'efforts ont été faits afin de réduire la taille des IgG en fragments plus petits capables de lier l'antigène (Saerens et al., 2008).

Ces différents formats d'anticorps recombinants sont décrits dans le paragraphe suivant.

I/ Différents formats d'anticorps recombinants

1) Fab

Les *Fragments antigen-binding* (Fabs) sont obtenus à partir de l'hydrolyse d'une IgG par la papaïne. Ils correspondent à deux domaines constants CH1 et CL ainsi que deux domaines variables VH et VL d'une IgG et ont un poids moléculaire de 55 kDa (**figure 6**). Dans le fragment Fab, les deux chaînes sont maintenues sous forme d'hétérodimères par les interactions entre domaines VH et VL, mais surtout par la formation d'un pont disulfure à l'extrémité C-terminale des domaines CH1 et CL. Les domaines variables permettent la reconnaissance de l'antigène (Ag) et ce avec la même affinité que l'IgG parentale. En comparaison avec l'anticorps pleine taille, le Fab montre une capacité de pénétration accrue des tissus denses comme les tumeurs solides (Wu and Senter, 2005).

2) scFv

Historiquement la réduction de la taille du Fab en une entité plus petite a permis la construction de fragments Fv (*Fragment Variable*). Ils sont constitués de deux modules variables VH et VL assemblés sous forme fonctionnelle, et interagissent de façon monovalente avec leur antigène. Cependant les domaines variables ont tendance à se dissocier une fois dilués car le fragment Fv est dépourvu des domaines CH1 et CL (Bird et al., 1988; Huston et al., 1988; Skerra and Pluckthun, 1988). En 1988, Bird *et al.* ont proposé de relier les deux domaines par une séquence de liaison flexible de 10 à 25 aa (*linker*). Le résultat a alors été appelé plus tard *single chain Fragment variable* (scFv) (Glockshuber et al., 1990) (**figure 6**). Ce fragment scFv (28 kDa), conserve l'affinité du fragment Fab pour son antigène et peut être aisément exprimé dans plusieurs systèmes de production (Verma et al., 1998). Le peptide de liaison (Gly₄-Ser)₃ est le *linker* le plus classiquement utilisé pour joindre les deux modules VH et VL, mais d'autres séquences peuvent être également utilisées (Bird et al., 1988).

Les scFvs, de par l'absence de fragment Fc et leur petite taille, ont une meilleure pénétration tissulaire, sont plus rapidement éliminés du sang, moins retenus au niveau des reins et ils ne sont pas capables de stimuler de potentielles fonctions immunes effectrices dépendantes du Fc. Ces propriétés sont surtout intéressantes pour la pharmacocinétique et l'administration des drogues (Farajnia et al., 2014).

Néanmoins, la surexpression de scFvs chez *E. coli* est connue pour former parfois des agrégats insolubles à cause du mauvais repliement de ses domaines et par conséquent leur production est faible (Arbabi Ghahroudi et al., 1997; Worn and Pluckthun, 1999). En outre, le scFv contient des ponts disulfures intramoléculaires (un sur chaque domaine) et parfois intermoléculaire (cas des *disulfides stabilize Fv* ou dsFv) qui ne sont pas ou très rarement formés dans un environnement réducteur (Glockshuber et al., 1992; Reiter et al., 1996; Schouten et al., 2002). Ainsi, si le scFv a pour utilisation finale l'expression intracellulaire (intracorporel, Cf. chapitre C), alors sa capacité à se replier correctement dans un environnement réducteur sera très faible sauf s'il est stable malgré l'absence de ponts disulfures.

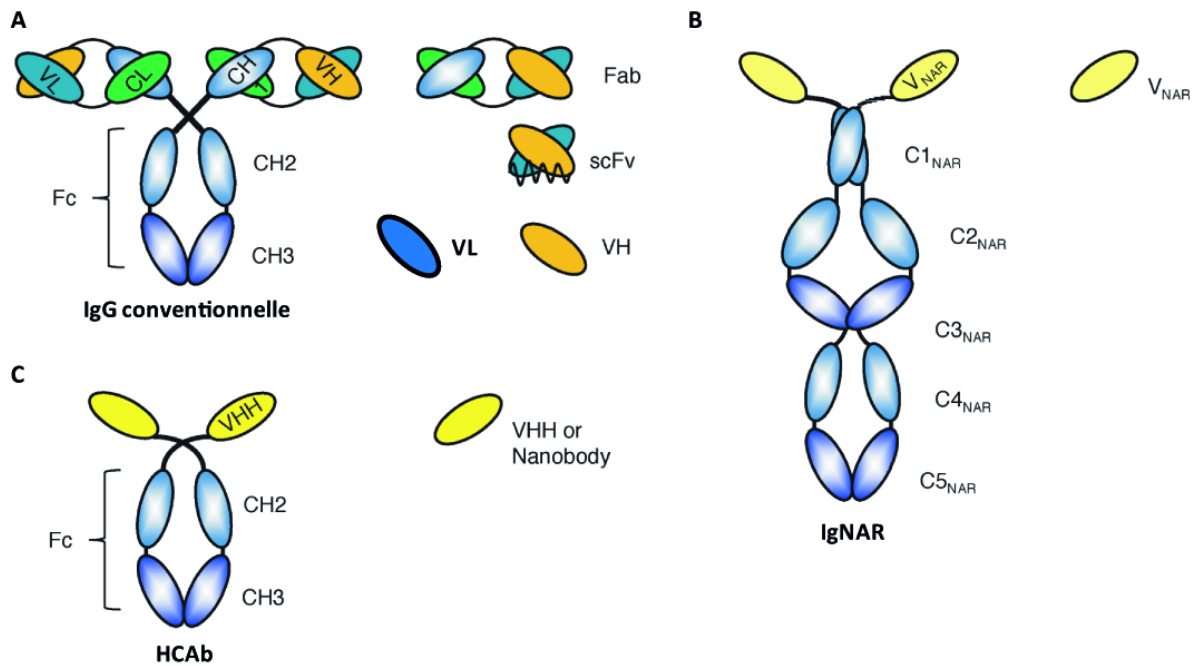


Figure 5 : Représentation schématique des différents formats d'anticorps. (a) IgG conventionnel et les fragments en dérivant. L'IgG classique est formée de deux chaînes légères et de deux chaînes lourdes. La chaîne légère est composée d'un domaine variable (VL) et un domaine constant (CL) alors que la chaîne lourde a un domaine variable (VH) et trois domaines constants (CH1, CH2 et CH3). Les plus petits fragments d'anticorps liant un antigène sont montrés ici : le Fab, le scFv et les anticorps à simple domaine VH et VL (sdAbs). (b) La structure immunoglobuline like appelée immunoglobuline Novel Antigen Receptor (IgNAR) retrouvée chez les requins est construite de deux chaînes lourdes chacune composée de cinq domaines constants (C1_{NAR}, C2_{NAR}, C3_{NAR}, C4_{NAR} et C5_{NAR}) et d'un domaine liant l'antigène, le V-NAR, qui permet de générer un sdAb. (c) L'anticorps à chaîne lourde de camélidé (HCAb) contient seulement deux chaînes lourdes composées chacune d'un domaine variable (VHH) et de deux constants (CH2 et CH3). Le plus petit fragment d'anticorps des HCABs sont les VHHs ou *nanobodies* (Nbs) (Saerens et al., 2008).

3) Anticorps à simple domaine

Les anticorps présentés dans ce paragraphe sont les plus petits domaines de reconnaissance d'antigène dérivant d'Ig. Ils sont monomériques et ont un poids moléculaire moyenne de 15 kDa. Chaque domaine (VH, VL, V-NAR et VHH) contient quatre régions *frameworks* (FRW) conservées et trois *Complementary Determining Regions* (CDR) correspondant aux séquences hypervariables déterminant la spécificité pour l'Ag (**figure 6**).

a) Domaines VH et VL

Les domaines VH et VL proviennent du Fv et sont également appelés dAb (*domain Antibody*) (**figure 5**). L'utilisation d'un tel format a été décrite pour la première fois par Ward *et al.* Plusieurs banques issues de différents gènes VH ont été clonées dans un vecteur d'expression procaryote à partir de l'ADN génomique de cellules de rates de souris immunisées contre le lysozyme. Les VHs ont été

ensuite directement exprimés chez *E. coli* puis sélectionnés par ELISA. L'affinité de deux VHs anti-lysozyme a été mesurée et était de l'ordre de 20nM soit dix fois inférieure à l'anticorps pleine taille. Les auteurs ont proposé le nom d'anticorps à simple domaine (*single domain antibodies* ou sdAbs) pour nommer ce format d'anticorps (Ward et al., 1989).

Cependant, l'affinité de tels anticorps est généralement faible, ils sont peu solubles et souvent sujet à agrégation du fait de leur large surface hydrophobe exposée au solvant. Ceci est dû notamment à la présence d'acides aminés hydrophobes sur le FRW2 (**figure 6**) qui est normalement en interaction avec le VL (Ward et al., 1989). Ces remarques sont applicables lorsque ces VH ou VL proviennent d'un répertoire naturel sans modification de leurs régions FRWs et/ou CDRs (Dottorini et al., 2004; Ward et al., 1989). En effet, par la suite des banques de VH et VL humains ont été créées avec des mutations sur leur FRWs et/ou CDRs afin d'augmenter leur solubilité, stabilité et production en diminuant leur surface hydrophobe (Cf. B.III) (Colby et al., 2004b; Jespers et al., 2004a; Tanaka et al., 2003b).

b) V-NAR

En 1995, Greenberg *et al.* ont découvert un nouveau membre de la superfamille des immunoglobulines des requins nourrices contenant un domaine variable et cinq constants (**figure 5**). Une banque d'ADNc de rate de requins a été criblée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et un clone de 2,4 kb a été isolé. Ce nouvel isotype est retrouvé dans le sérum sous forme d'homodimère à chaîne lourde et est appelée *Novel Antigen Receptor* ou IgNAR (Greenberg et al., 1995). Les IgNARs sont également retrouvés chez d'autres poissons cartilagineux (Shao et al., 2007). Ils sont dépourvus de chaîne légère et leurs domaines variables sont appelés V-NARs. Ce domaine permet à lui seul la reconnaissance de l'Ag. Il présente une particularité que n'ont pas les VH ou VL : leur boucle du CDR3 présente une large surface d'interaction allant de 5 à 23 résidus bien que généralement la moyenne soit de 15 à 17 résidus (**figure 6**) (Dooley and Flajnik, 2005). Ces boucles peuvent être stabilisées par des ponts disulfures (entre le CDR1 et le CDR3) et sont capables d'interagir avec des épitopes peu accessibles comme les sites actifs d'enzymes (Stanfield et al., 2004). Ce type de domaine possède un pont disulfure conservé entre le FRW1 et le FRW3 et présente les mêmes caractéristiques de solubilité, stabilité et expression que les VHHs.

Le V-NAR peut être présenté efficacement à la surface de phage pour sélectionner des *binders* spécifiques d'Ag. Il a été obtenu de la sorte de robustes V-NARs avec des affinités et des spécificités similaires à celles obtenues avec d'autres sdAbs en utilisant des banques immunes et synthétiques (Dooley et al., 2003; Shao et al., 2007).



Figure 6 : Organisation des séquences de VH, V-NAR et VHH avec les régions frameworks (FRW1, FRW2, FRW3 et FRW4) et CDRs (CDR1, CDR2 et CDR3). La signature des VHHs est indiquée dans le FRW2 ainsi que les acides aminés hydrophobes des VH, caractéristiques de l'interaction avec le VL. Les cystéines formant un pont disulfure reliant le FWR1 et le FWR3 de chaque sdAb sont représentés par une étoile verte. Adapté de (Kovaleva et al., 2014; Muyldermans, 2013).

c) VHH

Hamers-Casterman *et al.* ont montré la présence de trois classes d'IgG différentes dans le sérum de chameau. Après purification par chromatographie d'affinité sur protéine A et G et migration des trois fractions obtenues en conditions native et dénaturante, il est apparu qu'une classe d'IgG était pourvue de chaînes légères comme une IgG classique. Néanmoins les deux autres en étaient dépourvues et elles ne possédaient pas le premier domaine constant CH1 (**figure 5**) (Hamers-Casterman et al., 1993). Ces deux dernières classes diffèrent au niveau de leur taille *via* leur région charnière reliant le fragment Fc aux domaines variables. Cette nouvelle classe d'Ig est appelée anticorps à chaîne lourde (*Heavy Chain Antibodies* ou HCAs). Ce type d'anticorps est présent chez certaines espèces de camélidés dont les dromadaires, chameaux, lamas et alpagas et contient un simple domaine variable appelé VHH (*Variable Heavy of Heavy chain antibody*) pour le différencier du VH conventionnel (Muyldermans et al., 1994).

Les VHHs ou *nanobodies* (Nbs) portent des acides aminés spécifiques sur leur séquence primaire formant une signature les distinguant des VHs. Quatre substitutions caractéristiques du FRW2 permettent de classer les VHs et les VHHs dont les signatures respectives sont V37 G44 L45 W47 et F/Y37 E44 R45 G47. Ces dernières substitutions confèrent à ce côté du domaine globulaire un caractère plus hydrophile pour le VHH (Muyldermans et al., 1994; Vu et al., 1997) et semblent diminuer la propension des VHHs à former un hétérodimère avec un VL, leur conférant ainsi une plus forte stabilité, solubilité et un fort taux d'expression. Le groupe de Riechmann a par exemple montré qu'en "camélisant" un VH3 humain sur trois positions (G44E, L45R et W47G), il a pu diminuer l'agrégation du VH exprimé chez *E. coli* en comparaison au VH original (Davies and Riechmann, 1994).

De la même façon que les V-NAR, les VHHs ont la caractéristique d'avoir une plus large surface d'interaction à l'Ag que les VH et VL murins ou humains de par leur boucle CDR3 (et dans une moindre mesure *via* leur CDR1) (**figure 6**). En effet, le CDR3 contient en moyenne 16 acides aminés contre 13 ou 10 pour les VHs humains ou murins respectivement (Muyldermans et al., 1994; Vu et al., 1997; Wu et al., 1993). De plus, un pont disulfure conservé (Cys23 et Cys94) connecte les FRW1 et 3. Beaucoup de séquences de VHH de chameaux ont un pont disulfure additionnel reliant les CDR1 et 3 réprimant de ce fait la flexibilité de la boucle du CDR3 (Govaert et al., 2012). Parfois, le pont disulfure se fait entre le FRW2 et le CDR3 dans les VHHs de dromadaires alors que chez le lama cette liaison est possible entre le CDR2 et le CDR3 (Vu et al., 1997). Cette caractéristique du CDR3 permet aux VHHs, tout comme les V-NARs, d'atteindre des épitopes "cachés" tels que le site actif d'une enzyme, des protéines de l'enveloppe virale,... contrairement aux autres formats (Muyldermans, 2013).

Les VHHs sont souvent obtenus après sélection par phage display de banques immunes (Garaicoechea et al., 2008; Omidfar et al., 2004), naïves (Monegal et al., 2009) et même synthétiques (Koh et al., 2010; Wei et al., 2011) (Cf. B. III). Des *binders* de haute affinité sont généralement obtenus malgré leur monovalence. Par conséquent, de par leur petite taille, robustesse et maniabilité, l'utilisation des Nbs est large et variée allant de l'outil de diagnostic (Stijlemans et al., 2004; Verheesen et al., 2006) ou de recherche fondamentale (Gueorguieva et al., 2006; Herce et al., 2013; Rothbauer et al., 2006; Van Audenhove et al., 2014), à l'agent d'imagerie de tumeurs (Cortez-Retamozo et al., 2004; Vaneycken et al., 2010) ou comme agent thérapeutique (Ablynx). Ablynx possède actuellement quelques *nanobodies* en essai clinique de phase I et II (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ablynx>) (**tableau 3**).

Ainsi, les sdAbs sont facilement manipulables et simples d'utilisation car ils proviennent de la transcription d'une seule séquence d'ADN en comparaison aux autres formats tels que les Fabs ou scFvs. Il est par exemple plus simple de construire une banque de sdAbs car une seule PCR permet d'amplifier directement un sdAb alors qu'il en faut au minimum deux pour un scFv. Ces aspects seront décrits dans le paragraphe B.III.

4) Fragments d'anticorps et applications thérapeutiques

L'utilisation des fragments d'anticorps en thérapeutique se révèle être très intéressante car ces anticorps de petite taille peuvent pénétrer plus facilement les tissus. De plus, ils peuvent être facilement fonctionnalisés à des drogues ou des radiomarqueurs pour l'imagerie (Wu and Senter, 2005).

Evidemment, pour une application en thérapie humaine, l'optimisation majeure à réaliser sur les VHHs et les V-NARs est l'humanisation de ces fragments (Conrath et al., 2005), ce qui semble plus simple pour les VHHs grâce à leur forte identité de séquence primaire avec les VH3 humains (Vu et al., 1997). Une autre optimisation concernera également l'augmentation de la demi-vie de ces fragments dans le sérum qui, à cause de leur petite taille, subissent une élimination rénale rapide. Cet inconvénient limite l'efficacité de ces fragments dans beaucoup d'applications parentérales. De nombreuses entreprises pharmaceutiques travaillent sur cette optimisation en ajoutant des composés pour augmenter leur demi-vie tel que l'albumine, un fragment Fc ou encore l'addition de polyéthylène glycol (PEG). Par exemple, la plateforme Veltis® de l'entreprise biopharmaceutique Novozymes permet l'extension de la demi-vie de biothérapeutiques par ajout d'albumine (<http://www.biopharma.novozymes.com/en/half-life-extension/Pages/default.aspx>). Il est également possible d'augmenter la demi-vie mais aussi l'avidité des fragments d'anticorps en les multimérisant (Holliger and Hudson, 2005) (**tableau 3**).

Il est important de noter qu'à l'heure actuelle seuls les fragments Fab ont reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) (Holliger and Hudson, 2005). Ainsi le RéoPro ou abciximab (anti-glycoprotéine IIb/IIIa) développé par l'entreprise pharmaceutique Lilly a été le premier Fab à avoir obtenu une AMM. D'autres Fab ont également eu une AMM tels que le ranibizumab ou Lucentis, un Fab anti-VEGF développé par Genentech ou encore le certolizumab pegol ou Cimzia un anti-TNF- α fabriqué par UCB Pharma.

Tous ces fragments d'anticorps, spécifiques d'un Ag, sont obtenus à partir de méthodes de sélection majoritairement *in vitro* que nous allons décrire dans le paragraphe suivant.

Tableau 3 : Principaux sdAbs en essai clinique (adapté de (Kovaleva et al., 2014))

Nom	Type de sdAb	Origine	Cible / Indication	Modifications	Phase clinique	Industriel
GSK182771	dAb	Humaine	IL-1 / Arthrite Rhumatoïde	-	I	GSK
GSK 1995057			TNFR1 / Poumons			
ALX-0061	Nanobody	Caméléon	IL6R / Autoimmune	Extension demi-vie (HSA)	IIa	Ablynx / Abbvie
ALX-0081 (Caplacizumab)			Facteur de von Willebrand / cardiovasculaire	-	II	Ablynx
ATN-103 (Ozoralizumab)			TNF α / Arthrite Rhumatoïde	Trivalent Bispécifique (anti TNF et anti-HSA)	II	Ablynx / Eddingpharm
ALX-0171			RSV / Poumons	Trivalent	I	Ablynx
ALX-0141			RANKL / Os	Trivalent Bispécifique (anti RANKL et anti-HSA)	I	Ablynx / Eddingpharm
ALX-0761			IL-17A/F / Immunologie	Bispécifique (anti IL-17A et IL-17F)	I	Ablynx / Merck Serono
BI 1034020			A β -peptide / Alzheimer	Bispécifique (2 anti A β peptide) + Extension demi-vie	I	Boehringer Ingelheim

dAb : *domain Antibody* ; HSA : *Human Serum Albumin* ; RANKL : *Receptor activator of nuclear factor kappa-B Ligand* ; TNF : *Tumor Necrosis Factor* ; RSV : *Respiratory Syncytial Virus* ; GSK : GlaxoSmithKline

II/ Méthodes de sélection des fragments d'anticorps

Différentes méthodes sont utilisées afin de sélectionner un Ac, toutefois la technique du phage display est la méthode de référence pour la sélection d'Ac depuis maintenant près de 25 ans et est utilisée au laboratoire.

La notion de présentation (*display*) en biotechnologie fait référence aux techniques de sélection de cellules ou de virus exprimant une protéine d'intérêt (ici un anticorps) grâce à l'établissement d'un lien physique entre le phénotype et le génotype. Par exemple, un Ac exprimé à la surface d'un bactériophage (ou d'un autre modèle) peut être sélectionné par affinité pour un Ag (étape appelée sélection ou criblage). La répétition des étapes de criblage permet d'enrichir fortement en clones exprimant un Ac qui interagit spécifiquement avec l'Ag. Ensuite chaque clone peut être mis en culture et caractérisé individuellement afin de connaître sa sélectivité vis-à-vis de l'Ag.

1) Phage display

a) Historique du phage display

En 1985, Smith a décrit une méthode de sélection basée sur l'expression de peptides en fusion avec la protéine P3 du bactériophage filamenteux M13, un virus bactérien qui infecte les bactéries *E. coli* munies de l'épisome F', responsable de la présence des pili. Initialement, cette technique a été utilisée pour exprimer des peptides de petite taille à la surface d'un phage (Smith, 1985). Mais, à partir de 1990, le phage display filamenteux M13 a été adapté pour permettre l'expression de protéines de plus grande taille et en particulier des anticorps (banque de 10^6 clones) (McCafferty et al., 1990). Depuis, de nombreuses améliorations ont permis de cribler des anticorps recombinants à partir de banques d'une taille variant de 10^8 à 10^{11} anticorps recombinants différents (Griffiths et al., 1993; Vaughan et al., 1996).

b) Principe

Le principe du phage display repose sur l'expression d'un répertoire protéique à la surface d'un virus de type bactériophage (phage). Pour cela, le gène d'une protéine de surface du phage est fusionné avec les gènes d'une banque de protéine (type Ac). Ainsi, chaque phage exprime à sa surface l'une des protéines du répertoire codée par la banque. Les phages couramment utilisés sont spécifiques de *E. coli* et leur génome est sous forme d'ADN. L'utilisation d'un virus pour développer une stratégie de présentation montre un intérêt majeur : la machinerie d'infection virale étant très efficace, elle permet d'obtenir très facilement des quantités de matériel compatible avec le criblage de banques de grandes tailles (Hoogenboom, 2002).

c) Mise en œuvre du phage display

i) Choix du type de phage pour la présentation de l'anticorps

Dans les années 1990, de nouveaux systèmes de présentation ont été développés. L'utilisation des phages λ , T4 et T7 a été proposée alternativement au phage M13, mais leur utilisation reste marginale. Effectivement, au cours de leur cycle de répllication, ces phages induisent une lyse bactérienne (Castagnoli et al., 2001). A l'inverse, lors de la répllication du phage M13, ses particules s'assemblent dans le cytoplasme et sont sécrétées dans le milieu de culture sans lyse des bactéries. De cette façon, la purification des particules obtenues est simplifiée. Une seule étape de précipitation au PEG permet de récupérer les phages (en opposition aux phages lytiques qui

nécessitent une étape de séparation des particules virales et des débris bactériens). De surcroît, les protéines exprimées par le phage M13 sont repliées efficacement grâce à leur passage dans l'espace périplasmique où le repliement des protéines est amélioré par un certain nombre de chaperonnes, d'oxydo-réductases assurant la formation des ponts disulfures et d'isomérasés.

ii) Choix de la protéine de capsid du bactériophage M13 pour la présentation de l'Ac

La mise œuvre de cette technique nécessite le clonage d'une banque d'anticorps en fusion 5' du gène codant la protéine PIII du bactériophage. En effet, les cinq protéines de la capsid du phage M13 (PIII, PVI, PVII, PVIII, PIX) peuvent être utilisées comme support de présentation pour l'expression de banques de peptides ou de protéines à la surface des particules de phages (**figure 7**). Cependant l'utilisation des protéines PVIII et PIII semble plus efficace (Sidhu et al., 2000).

La protéine majeure du phage, la PVIII, est présente à environ 2700 copies par phage (Souriau et al., 1998). La protéine d'intérêt est fusionnée au niveau de la région N-terminale de PVIII entre le peptide signal et le début de la protéine mature. Toutefois, seuls des peptides de courte taille (6-7 acides aminés) peuvent être exprimés en raison de la restriction de taille imposée par les contraintes géométriques d'assemblage des sous unités PVIII pour former la capsid (Rakonjac et al., 2011). De plus, la présence de nombreuses copies de la protéine chimère à la surface du phage induit la formation d'interactions multiples entre les peptides exprimés par les phages et l'antigène cible utilisé pour le criblage. Cet effet d'avidité favorise la sélection de clones présentant une affinité faible pour la cible.

La PIII, présente à raison de cinq copies à l'extrémité du phage, est la protéine de choix pour l'expression des banques. Son utilisation permet l'expression de protéines plus grosses, et offre un large choix de vecteurs appropriés. Néanmoins, comme pour la PVIII, la fonctionnalité de PIII peut être altérée, entraînant une perte de la capacité du phage à infecter les bactéries.

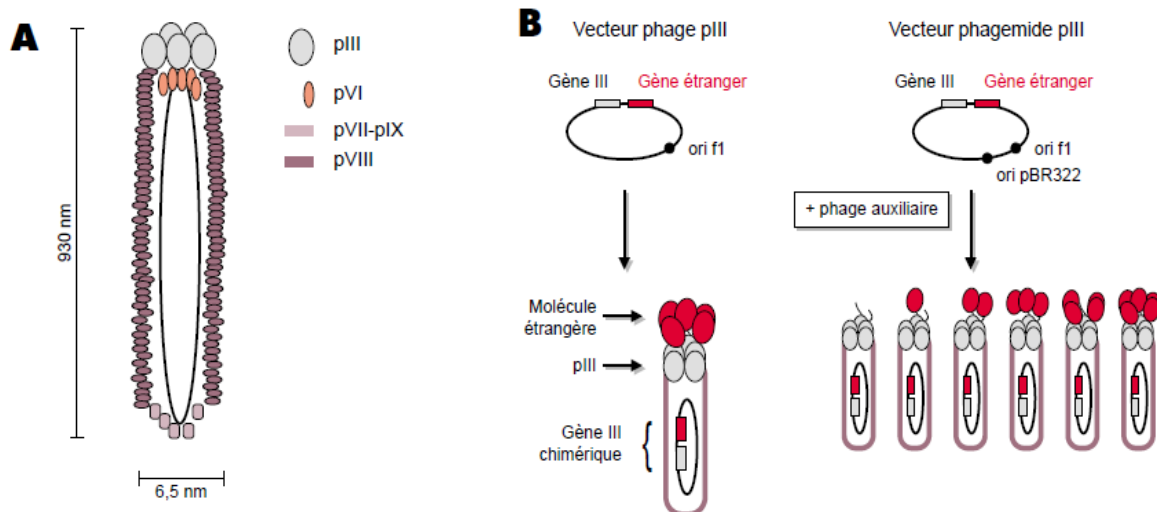


Figure 7 : Représentation schématique d'un bactériophage M13 et présentation de protéine à sa surface. (A) l'ADN simple brin du bactériophage M13 est logé dans un cylindre composé de cinq protéines de capsid. (B) Deux modes d'expression des protéines : par un vecteur phage ou par un vecteur phagémide. (Souriau et al., 1998).

iii) Choix du mode d'expression des anticorps

Deux modes d'expression des anticorps sont possibles : soit le clonage est réalisé dans le génome du phage, soit dans un phagémide (**figure 7**). Pour des raisons d'efficacité de transformation bactérienne, la majorité des répertoires disponibles est construite dans des phagémides (Hoogenboom, 2005). Un phagémide est un plasmide contenant en plus de son origine de réplication propre, une origine de réplication de phage. Dans la bactérie, le phagémide se réplique comme un plasmide normal. Mais lors d'une infection de la bactérie par un phage avec une origine de réplication mutée (défaillante) appelé phage auxiliaire (ou *helper*), l'ADN du phagémide est amplifié et encapsidé préférentiellement dans la particule de phage à la place de l'ADN viral sauvage. Le phage *helper* fournit toutes les protéines nécessaires pour l'assemblage du phage. La pseudo particule virale résultante présente à la fois de la protéine PIII sauvage et la PIII chimère codée par le phagémide dans des proportions variables selon le niveau d'expression et la stabilité des chimères. Les phages ainsi formés permettent la transmission du phagémide à d'autres bactéries par infection mais ne permettent pas la propagation du phagémide sous sa forme pseudo virus en l'absence du génome du phage *helper*.

Des variants de phages auxiliaires dérivant du M13 ont été conçus afin d'améliorer la présentation des anticorps (hyperphage) (Rondot et al., 2001) ou d'éliminer les phages ne présentant pas d'anticorps après élution (KM13) (Kristensen and Winter, 1998). Nous serons amenés à utiliser ces deux types de phages auxiliaires.

d) Déroulement d'une sélection par phage display

Le principe de sélection des clones spécifiques consiste à enchaîner des tours de sélection conduisant à l'enrichissement d'une suspension de phages en clones spécifiques qui seront ensuite testés par criblage (**figure 8**). Les phages présentant un anticorps spécifique sont retenus sur une surface préparée avec l'Ag alors que les phages non adhérents sur l'Ag sont éliminés par les lavages. Les phages liés spécifiquement sont élués et utilisés pour réinfecter des bactéries pour l'étape d'amplification. Cette nouvelle production de phages sera de nouveau sélectionnée sur la cible. Des pressions de sélection peuvent être introduites à chaque tour de sélection. Cette stratégie fondée sur la sélection et l'enrichissement est nettement plus puissante qu'une stratégie de criblage de clones individuels, qui ne peut pas être appliquée à des banques de tailles supérieures à 10^6 clones indépendants. Le criblage final est effectué à partir des clones préalablement sélectionnés. L'opportunité de sélectionner un clone spécifique lors de ce criblage final est donc largement augmentée (Weisser and Hall, 2009).

L'optimisation du protocole de sélection par phage display sera présentée et discutée dans la partie résultats.

e) Différentes stratégies de criblage par phage display

Le phage est un outil biologique stable et robuste qui permet de nombreuses manipulations génétiques et une facilité de mise en place. En outre, la production de ce phage dans *E. coli* est rapide, aisée et peu coûteuse de même que sa purification. Cette technique étant très robuste, elle permet des stratégies de criblage diverses.

Les stratégies de sélection *in vitro* sont les plus répandues où l'antigène est purifié et attaché sur un support (Hoogenboom, 2002). Cependant, d'autres stratégies ont émergé telles que les sélections *ex vivo* directement sur des lignées de cellules tumorales (Cai and Garen, 1995; Palmer et al., 1997) ou une sélection hybride *ex vivo/in vivo* chez la souris (Sanchez-Martin et al., 2013). Les phages sont d'abord sélectionnés deux fois sur des cellules PPC1 (adénocarcinome de prostate) en suspension issues d'une tumeur fraîchement excisée de la souris puis injectés directement dans une souris pour une sélection *in vivo*. Un VH spécifique du *proteasome activator subunit α* (PA28 α) a été ainsi obtenu et a permis d'identifier cette protéine comme marqueur tumoral de cancers humains de la prostate (Sanchez-Martin et al., 2013). Enfin des sélections ont été conduites uniquement *in vivo* chez des patients atteints de cancer au stade IV afin d'obtenir des biomarqueurs spécifiques de tumeurs (Krag et al., 2006; Shukla et al., 2013).

De plus, la technique de sélection par phage display permet d'isoler des anticorps ayant des propriétés favorables (bonne expression, solubilité et stabilité) co-sélectionnées avec l'activité de liaison (Jespers et al., 2004a; Jespers et al., 2004b).

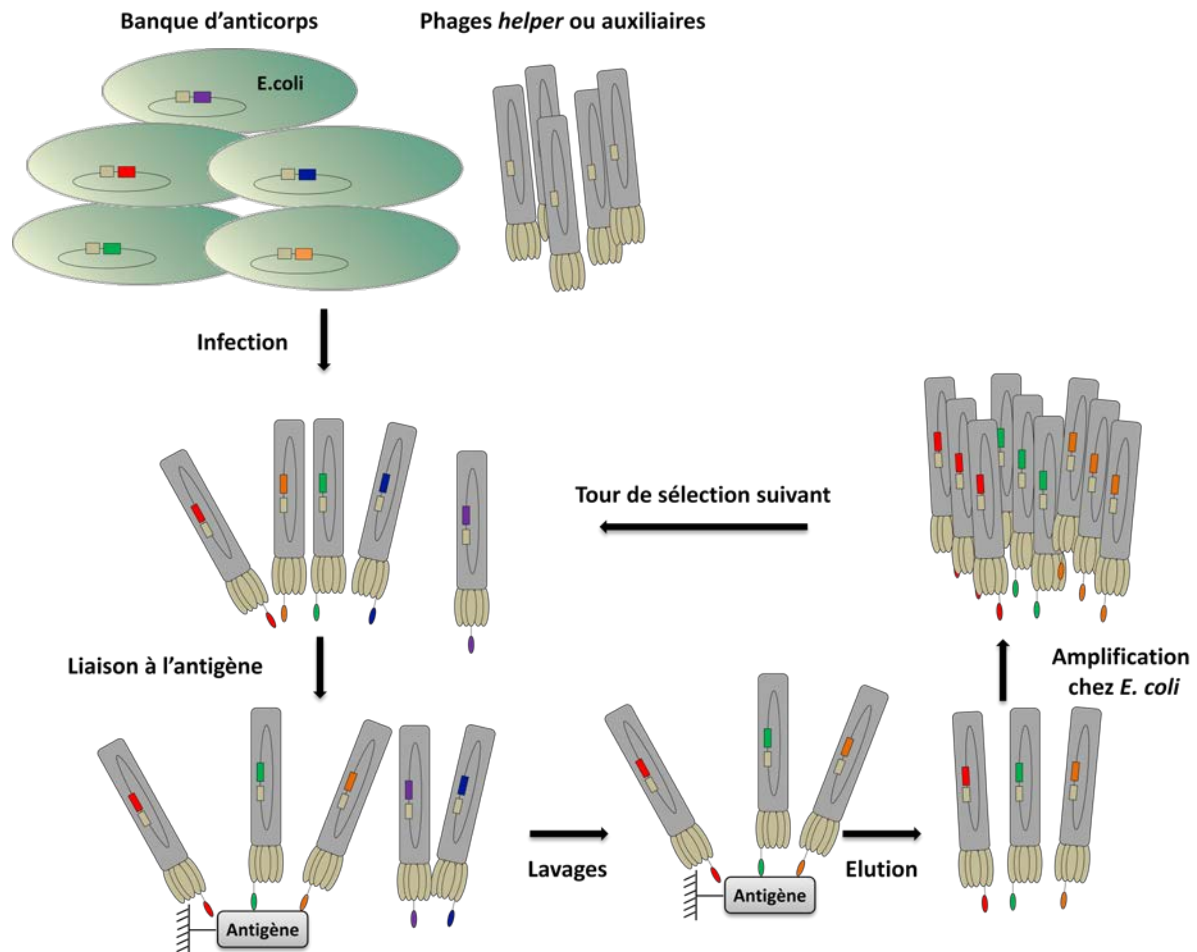


Figure 8 : Principe du phage display pour la sélection d'anticorps. Une banque d'anticorps est clonée dans un phagème puis infectée par des phages auxiliaires. Des phages présentant à leur surface l'anticorps et le phagème correspondant dans leur cylindre sont ainsi produits. Ils sont mis au contact d'un Ag immobilisé sur une surface puis les phages non liés à l'Ag sont lavés. L'éluion permet de libérer les phages liés à l'Ag afin de permettre leur amplification chez *E. coli*. Ces phages amplifiés seront purifiés puis de nouveau mis au contact de l'Ag pour un nouveau tour de sélection. En général, deux à trois suffisent pour obtenir des *binders*.

2) Ribosome/RNA display

L'idée principale de la présentation de banque de protéines en lien avec les ribosomes (*ribosomes display*) repose sur la traduction *in vitro* d'une banque d'ARNm par des ribosomes en conditions stœchiométriques (Hanes and Pluckthun, 1997; Mattheakis et al., 1994). En l'absence de codon stop sur la molécule d'ARNm, celle-ci est traduite par le ribosome mais n'est pas libérée, formant ainsi un

complexe ARNm-Ribosome-Polypeptide. Ce complexe est stabilisé et sélectionné directement contre un antigène cible.

La présentation de banque de protéines en lien direct avec l'ARNm (*mRNA display*) se distingue du *ribosome display* par la nature du lien entre l'ARNm et le polypeptide codé par cet ARNm dans le complexe ARNm-polypeptide (Nemoto et al., 1997; Roberts and Szostak, 1997). Dans la stratégie *mRNA display*, l'extrémité 3' de l'ARNm est liée *via* un court fragment d'ADN à un adaptateur : la puromycine. Ainsi lors de la traduction de l'ARNm le premier acide aminé du polypeptide traduit, est lié à la puromycine, ce qui permet la formation du complexe ARNm-polypeptide (Nemoto et al., 1997; Roberts and Szostak, 1997).

Pour le *ribosome display*, comme pour le *mRNA display*, les molécules d'ARN immobilisées sont éluées et purifiées, puis traduites à nouveau en ADN par transcription reverse. L'amplification par PCR des produits de la transcription reverse génère une grande quantité d'ADN qui peut être utilisée pour synthétiser à nouveau de l'ARN. Ces molécules d'ARN peuvent alors être soumises à une nouvelle étape de sélection. L'étape d'amplification par PCR introduit des mutations aléatoires. Cette propriété souvent gênante pour les clonages classiques peut être exploitée ici en utilisant une polymérase de faible fidélité pour faire évoluer les ARN sélectionnés *in vitro* et permettre de cette manière d'obtenir des mutants encore plus affins pour la cible (Hanes et al., 2000; Jermutus et al., 2001) (pour une revue complète sur les *ribosome* et *mRNA display* voir (Lipovsek and Pluckthun, 2004)).

Ces systèmes *in vitro* n'impliquent pas d'étape de transformation dans un organisme. De ce fait, ils présentent un avantage majeur : ils permettent de générer des banques de très grandes tailles (10^{12} - 10^{13} séquences uniques) (Keefe and Szostak, 2001; Takahashi et al., 2003; Xu et al., 2002). Par contre, la fragilité de l'ARNm limite les possibilités de conditions de criblages et rend cette technique beaucoup plus délicate à mettre en œuvre que le phage display (Cf. ci-dessus).

3) Microbial display

La présentation d'anticorps recombinants à la surface de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) a été utilisée dès 1997. Dans le *yeast display*, les scFvs sont fusionnés à la partie C-terminale de la protéine Agap2 (récepteur d'adhésion présent à la surface des levures). Cette fusion permet l'accrochage de la chimère Agap2-anticorps recombinant à la surface de la levure par un pont disulfure avec la sous-unité Agap1. La sélection se fait par cytométrie en flux grâce à l'étiquette portée par l'Ac et l'Ag

permettant leur marquage par une molécule fluorescente (Boder and Wittrup, 1997). Les premières utilisations de la surface des levures pour la présentation de banque de protéines ont servi à l'isolement et à la caractérisation d'anticorps recombinants à partir de banques mutées de tailles modestes (10^5 - 10^7) (Boder et al., 2000; Boder and Wittrup, 1997). En combinaison avec une mutagenèse aléatoire sur les scFvs (appelée maturation d'affinité *in vitro*), le *yeast display* a permis l'obtention d'un des anticorps de plus haute affinité (anti-fluorescéine, 48 fM) (Boder et al., 2000).

D'autres formats de *microbial display* ont été développés tels que la présentation d'anticorps à la surface d'*E. coli* mais ne sont pas autant utilisés que les précédents formats présentés (Daugherty et al., 1999; Harvey et al., 2004; Mazor et al., 2007). Les Acs (de type scFv ou Ig pleine taille) peuvent être présentés directement à la surface de la membrane externe (Daugherty et al., 1999) ou liés à une lipoprotéine de la membrane interne (Harvey et al., 2004; Mazor et al., 2007). Pour cette dernière méthode, la sélection se fait après perméabilisation de la membrane externe par un mélange EDTA/lysozyme (Harvey et al., 2004).

4) Mammalian display

En 1997, Higuchi *et al.* ont développé le premier *mammalian display*. Ils ont pu exprimer à la surface de cellules COS7 des IgG pleines tailles liées à la membrane plasmique par un domaine transmembranaire du PDGFR fusionné au Fc (Higuchi et al., 1997). En revanche, la taille de la banque construite est petite (environ 10^4). De nouvelles banques, plus grandes (10^6 clones environ), utilisent l'intégration de l'ADN codant pour les Ac avec un système de recombinaison sur un site unique du génome en cellules CHO. La recombinase Flp a par exemple été utilisée (Tomimatsu et al., 2013; Zhou et al., 2010a).

L'avantage principal de la présentation à la surface de cellules bactériennes, de levures ou de mammifères est l'utilisation du tri cellulaire par cytométrie en flux pour la sélection de clones spécifiques. Il est de surcroît possible de sélectionner un clone spécifique puis faire de l'évolution moléculaire sur celui-ci afin d'augmenter son affinité *in vitro* (**tableau 4**).

Tableau 4 : Comparaison des principales plateformes de sélection d'anticorps (adapté de (Hoogenboom, 2005))

Sélection	Phage display	Ribosome / RNAm display	Microbial (Yeast / Bacterial) display	Mammalian display
Valence de la présentation	Monovalent Multivalent	Monovalent	Multivalent	Multivalent
Taille maximale typique des banques	10^7 à 10^{10}	10^{12} à 10^{13}	10^5 à 10^7	10^4 à 10^6
Stratégie de sélection	<i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> , <i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	FACS	FACS
Applications principales	Sélection d'Ac issus de banques immunes, naïves et synthétique Maturation d'affinité Augmentation de la stabilité	Maturation d'affinité Augmentation de la stabilité	Maturation d'affinité Augmentation de l'expression et de la stabilité	Sélection d'Ac (à visé thérapeutique)
Avantages principaux	Techniquement robuste Automatisé Facile d'utilisation, Large panel d'Ac	Mutagenèse intrinsèque Le plus rapide de tous les systèmes	Rapide en combinaison avec la mutagenèse aléatoire Criblage directe pour améliorer les cinétiques de dissociation	Présentation d'Ac pleine taille
Inconvénients principaux	Introduction de diversité par clonage lent Difficulté de création de larges banques	Petit panel d'Ac Techniquement peu robuste	Efficacité de transformation Equipement de tri cellulaire adapté	Petit panel d'Ac Efficacité de transfection
Formats d'anticorps utilisables	scFv, Fab, Fab ₂ , sdAb, diabody	scFv, sdAb	Ig*, scFv*, Fab, sdAb	Ig, scFv

* : seuls formats ayant décrit pour le *bacterial display*. *Diabody* : deux scFv dimérisés.

5) Autres types de sélection

La technique du double hybride en levure mise au point par Fields et Song (Fields and Song, 1989) a été adaptée à la sélection d'anticorps intracellulaire (intracorps) (der Maur et al., 2002; Visintin et al., 1999). Cette technique est décrite dans le chapitre C.IV.1/2 tout comme ses avantages et inconvénients.

L'essai de complémentation de fragment de protéine a été adapté afin de sélectionner des intracorps. Cette méthode est décrite dans le chapitre C.IV.7.

III/ Banques de fragments d'anticorps et criblage

Une des découvertes capitales à l'origine de la construction de banques d'anticorps recombinants est venue en 1989 avec le développement du clonage de gène d'anticorps par PCR avec des oligonucléotides "universels" (Orlandi et al., 1989). L'application directe de cette découverte a donc été la construction de banques d'anticorps permettant d'éviter la construction d'hybridome qui était le moyen traditionnel de fabrication d'Ac monoclonaux. Cette dernière consiste en la production d'Ac par une cellule hybride (ou hybridome) produite par la fusion d'un lymphocyte produisant un Ac et d'une cellule tumorale (Kohler and Milstein, 1975).

Les banques d'anticorps recombinants peuvent être des banques immunes, naïves, semi-synthétiques ou synthétiques (**tableau 5**).

1) Banques immunes

Les banques d'anticorps immunes sont construites avec des pools de gènes réarrangés codant des fragments d'anticorps (VH/VL, V-NAR, VHH par exemple) clonés à partir de cellules B de diverses sources d'organes lymphoïdes (rate, sang périphérique, moelle osseuse ou amygdales). Les fragments sont ensuite clonés dans un vecteur d'expression type phagemide pour une sélection par phage display. Ces lymphocytes B dérivent de plusieurs espèces animales comme la souris (Xu et al., 2003), le mouton (Charlton et al., 2001), le requin (Dooley et al., 2003), le dromadaire (Stijlemans et al., 2004) et aussi l'Homme (Okada et al., 2006). La première banque immune de phage display fut élaborée à partir de souris immunisées contre un haptène en 1991 (Clackson et al., 1991).

Cette approche fait appel à l'immunisation d'un animal et ainsi aux limitations de cette voie : la molécule injectée doit être immunogène (et donc non conservée) et non toxique. De plus, si un anticorps sélectif d'une conformation veut être obtenu, l'intégrité du déterminant antigénique utile doit être assurée. En effet, lors de l'immunisation, l'antigène est fixé par un lymphocyte B possédant à sa surface un anticorps capable de se lier spécifiquement à cet antigène. Le complexe anticorps antigène est alors internalisé et l'antigène dégradé. Des fragments peptidiques de ce dernier sont ensuite présentés sur des molécules CMH de classe II. Des lymphocytes T sensibilisés par ce même antigène activent ce lymphocyte B déclenchant son expansion clonale (Janeway and Travers, 1997). La conséquence de ce processus est que la conservation de la structure tridimensionnelle des déterminants antigéniques peut ne pas être conservée ce qui, dans notre cas, serait rédhibitoire.

Les banques immunes donnent en général des *binders* de haute affinité (de 10^{-7} à 10^{-9} M) (Arbabi Ghahroudi et al., 1997; Dooley et al., 2003; Tabares-da Rosa et al., 2011) grâce à l'étape de maturation d'affinité *in vivo* faite par le système immunitaire de l'hôte. Malgré tout, deux effets négatifs sont liés à cet avantage. Tout d'abord, selon l'Ag, la diversité de la banque est souvent limitée car la banque est biaisée envers l'antigène utilisé pour l'immunisation ($\approx 10^6$ à 10^8 clones (Muyldermans, 2013)). En outre, de nouvelles banques doivent être construites pour chaque nouvel Ag, ce qui rend le processus très fastidieux (Shukra et al., 2014).

Dès lors, les efforts vont être concentrés sur la sélection de fragments d'anticorps par la construction de banques combinatoires naïves et synthétiques permettant de contourner l'étape d'immunisation.

2) Banques naïves

Ce type de banques est issu de fragments d'Ac provenant d'une source de gènes réarrangés non biaisée volontairement ou encore appelée une source naïve (Marks et al., 1991). Les ADN complémentaires (ADNc) codant pour les répertoires de fragments d'anticorps (VH, VL ou VHH) de lymphocytes B d'un donneur non immunisé sont amplifiés par PCR, puis combinés de manière aléatoire afin d'obtenir une plus grande diversité fonctionnelle de la banque (pour une banque de scFv ou de Fab).

La première banque naïve de phage display a été construite par Marks *et al.* en 1991 par PCR des gènes réarrangés VH et VL issus des lymphocytes de sang périphérique humain. Ces fragments ont été insérés dans un phagemide et les vecteurs transformés dans *E. coli* pour générer un répertoire ou banque naïve semi-combinatoire de scFv. La diversité était de 10^7 clones différents et les scFvs isolés à partir de cette banque avaient une affinité de l'ordre de 10^{-6} M (Marks et al., 1991). Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que la création de banques ayant une diversité plus grande permettrait l'obtention de *binders* avec de plus hautes affinités. Effectivement, des scFvs ayant une affinité de l'ordre du subnanomolaire ont été sélectionnés à partir de banques naïves contenant plus de 10^9 scFvs recombinants (Sheets et al., 1998; Vaughan et al., 1996). Ces observations ont donc confirmé l'hypothèse que la taille de la banque est directement proportionnelle à l'affinité des Ac isolés.

L'avantage de ce type de banque est sa versatilité : il est possible de la sélectionner contre divers Ag et d'obtenir des Ac fonctionnant dans différents essais immunologiques (ELISA, Western blot, immunofluorescence...) (Griffiths et al., 1993; Marks et al., 1991; Monegal et al., 2009). Toutefois, nous avons montré au laboratoire en collaboration avec A. de Marco qu'à partir d'une banque naïve de VHH, représentant le répertoire naturel de VHH de lamas, des VHHs ayant des propriétés de

maturation rapide étaient mal exportés dans le périplasme et moins bien présentés lors de sélections par phage display, au profit de VHHs peu solubles et de VHs contaminants la banque (Monegal et al., 2012). Ce biais a déjà été observé pour une autre banque naïve de VHH par une autre équipe (Tanha et al., 2002). Ces résultats montrent donc les limites de l'utilisation de banques très hétérogènes afin de sélectionner des anticorps aux propriétés de maturation rapide et de haute stabilité.

3) Banques semi-synthétiques et synthétiques

Une autre approche de construction de larges banques d'anticorps est de créer synthétiquement des régions CDRs (banque semi-synthétique) ou les FRWs et les CDRs (banque synthétique). Leurs réarrangements sont effectués *in vitro* par PCR. L'hyper-variabilité des anticorps est limitée à un de leurs CDRs ou sur plusieurs CDRs. Par conséquent, l'introduction de mutations par PCR utilisant des amorces dégénérées au niveau des séquences codantes pour les CDRs permet d'augmenter la diversité des chaînes VH, VL, V-NAR et VHH. Les VH et VL sont ensuite combinées de façon aléatoire (dans le cas de banque de scFv ou de Fab). Cette technique permet d'augmenter la diversité des fragments d'anticorps obtenus (Tomlinson et al., 1992). Ces banques permettent d'obtenir des anticorps contre des régions hyper-conservées, des protéines du soi (par exemple des tumeurs) ou encore des protéines cytotoxiques qui pourraient ne pas être présentes dans le répertoire naturel d'un animal immunisé ou non.

a) Banques semi-synthétiques

La première banque semi-synthétique a été réalisée par Barbas *et al.* en 1992. Dans cette banque de Fab, seule la région CDR3 du VH a été mutée et la diversité était de $5 \cdot 10^7$ clones (Barbas et al., 1992). Peu de temps après, Hoogenboom *et al.*, ont créé une banque semi-synthétique mais au format scFv. Ils ont ainsi obtenu deux banques : une avec un CDR3 du VH de 5 résidus et l'autre avec 8 résidus en fusion avec un VL non muté issu d'un anticorps anti-BSA (isolé par Marks *et al.*, 1991). La diversité de ces banques était de 10^7 clones (Hoogenboom and Winter, 1992). Ensuite, ce type de banque s'est répandu avec une randomisation du nombre d'acides aminés dans la boucle CDR3 plus large (Nissim et al., 1994; Ohtani et al., 2013) et même dans les boucles CDR3 du VH et du VL (Desiderio et al., 2001). Ce type de banque a permis par exemple la sélection VHH solubles et résistants à la chaleur (Goldman et al., 2006) mais encore d'anticorps de haute affinité (nM) (Hoet et al., 2005).

b) Banques synthétiques

Les banques synthétiques introduisent de la diversité dans les trois boucles CDRs et les plus récentes reposent souvent sur l'utilisation d'un seul FRW constant, optimisé pour ses qualités de solubilité et de stabilité conférées aux Ac portant ce *scaffold*. Ainsi, l'utilisation du FRW du VH HEL4 (Christ et al., 2007), un *scaffold* très stable, combinée à la randomisation des boucles CDR2 et 3 a permis la construction de la banque Predator (Mandrup et al., 2013). Le groupe de Dimitrov a utilisé le FRW du VH m0 comme *scaffold* unique de greffage de la boucle CDR1 mutée en certains points clés, et des CDR2 et 3 randomisés. Il a été créé de la sorte une large banque de VH humains ($2,5 \cdot 10^{10}$) pour la sélection par phage display (Chen et al., 2008).

Ces banques sont favorables à la sélection d'anticorps stables et solubles (Chen et al., 2008; Mandrup et al., 2013; Prassler et al., 2011; Tiller et al., 2013) et ont généralement une grande diversité fonctionnelle ($>10^9$ clones). De telles banques existent pour des Fabs (Knappik et al., 2000; Lee et al., 2004; Prassler et al., 2011; Tiller et al., 2013; Zhai et al., 2011), des scFvs (Cobaugh et al., 2008; Philibert et al., 2007) ou des VHs (Chen et al., 2008; Mandrup et al., 2013). Le groupe de Dario Neri s'est notamment spécialisé dans la construction de telles banques (au format scFv) avec les banques ETH2 (Pini et al., 1998; Silacci et al., 2005), PHILOs (Villa et al., 2011) et la dernière la PHILODiamond ayant une diversité fonctionnelle de $4 \cdot 10^{10}$ (Weber et al., 2014).

Nous verrons au chapitre suivant que quelques banques synthétiques de fragments d'anticorps ont été construites afin de favoriser la sélection d'intracorps (Philibert et al., 2007; Tanaka et al., 2003a) à partir d'un FRW consensus favorisant la production d'Ac stables et solubles dans le cytoplasme bactérien (Philibert et al., 2007) ou de cellules eucaryotes (Tanaka et al., 2003a).

En conclusion, le message principal à retenir est que plus la taille d'une banque d'anticorps est importante, plus les chances d'obtenir des anticorps spécifiques avec de bonnes caractéristiques de liaison (en termes d'affinité) sont élevées (Visintin et al., 2004a). Cependant, plus que la taille de la banque, le paramètre le plus important pour définir la qualité d'une banque est la diversité fonctionnelle des anticorps la constituant plutôt que la diversité en nombre d'anticorps. En effet, des fragments d'anticorps non fonctionnels diminuent drastiquement la taille réelle de la banque, évaluée normalement en comptant le nombre de colonies obtenues après la transformation de la banque (Visintin et al., 2004a).

Tableau 5 : Comparaison des différents types de banques d'anticorps de phage display

Type de banque	Immune	Naïve	Semi-synthétique / Synthétique
Taille typique des banques	10^6 à 10^8	10^7 à 10^{10}	10^7 à 10^{10}
Ig source	IgG, IgA	IgM, IgG, IgD	-
Origine	Humain, mouton, murine, camélidé, poulet, lapin	Humain, Camélidé, Requin	Humain, Requin, Murine, Camélidé
Principaux avantages	Maturation d'affinité <i>in vivo</i> Ac de plus haute affinité	Tout type d'Ag	Tout type d'Ag Optimisé pour des Ac stables, solubles
Principaux inconvénients	Immunsation Inadaptée à certains types d'Ag	Large banque sinon Ac de faible affinité Pas optimisée pour intracorps	Affinité des Ac obtenus

Après le criblage d'une banque d'anticorps par phage display (ou autre technique de sélection), l'ultime étape consiste en la caractérisation des clones isolés après cette sélection. Dans l'idéal, la caractérisation se fera dans l'application finale de l'anticorps. Ainsi, il est possible d'obtenir des Ac fonctionnant en ELISA, en Western Blot (WB) ou encore en Immunofluorescence (IF) mais il est beaucoup plus complexe d'obtenir des intracorps.

Les propriétés et les différents moyens d'obtention d'intracorps de même que leur utilité en biologie cellulaire et même en thérapie sont discutés dans la prochaine partie.

C/ LES ANTICORPS INTRACELLULAIRES OU INTRACORPS

Historiquement, la micro injection d'anticorps pleines tailles était utilisée afin d'inactiver ponctuellement la fonction de protéines ciblées (ex : Ras, Cf. A.III.3.b.iv) mais cette technique reste limitée car les Ac doivent notamment résister à l'agrégation. L'ingénierie des anticorps a permis de revisiter cette approche en utilisant les anticorps recombinants à simple chaîne directement exprimés par la cellule.

I/ Propriétés des intracorps

Une des applications remarquable des anticorps recombinants à simple chaîne est de pouvoir les exprimer *in cellulo*. Ces anticorps intracellulaires ou intracorps (Ic) sont produits dans des cellules après transfection de l'ADNc correspondant et ils sont dirigés contre un antigène intracellulaire (Biocca et al., 1990; Marasco et al., 1993). Ces Ic peuvent être appliqués à l'étude de la dynamique endogène d'antigène, à la neutralisation et à la perturbation de l'activité de protéines cellulaires, et ce dans une optique soit de recherche fondamentale soit thérapeutique.

Plusieurs formats d'intracorps sont retrouvés. Les scFv sont majoritairement utilisés (Visintin et al., 1999) mais d'autres formats comme les simples domaines dont les VH ou VL (Tanaka and Rabbitts, 2003), les V-NAR provenant de requins (Walsh et al., 2011) ou encore les VHHs de camélidés (Serruys et al., 2009) ont également été employés en tant qu'intracorps.

Les étapes permettant le développement d'un intracorps doivent tenir compte de l'origine, naturelle ou synthétique, de l'anticorps, de ses caractéristiques de liaison à son antigène, de sa résistance aux conditions intracellulaires et de l'application souhaitée. Par conséquent, l'obstacle majeur pour l'obtention d'anticorps intracellulaires fonctionnels est l'environnement réducteur du cytoplasme (Hwang et al., 1992). En effet, les scFvs possèdent des ponts disulfures intra chaînes (tout comme les autres Ac à simple domaine) et parfois inter chaînes qui permettent leur bon repliement (Reiter et al., 1996; Schouten et al., 2002). Néanmoins, ces ponts ne sont pas formés en conditions réductrices retrouvées dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, entraînant ainsi souvent le mauvais repliement et l'agrégation des intracorps (Biocca et al., 1995; Glockshuber et al., 1992; Martineau et al., 1998). De surcroît, ils ne reconnaîtront dans la cellule que la forme native de leur cible, augmentant de ce fait le challenge d'obtention des Ic (Visintin et al., 2004a). En conclusion, ce type

d'anticorps est généralement difficile à obtenir sans optimisation du *scaffold*, de la banque, et surtout des conditions du criblage (Ewert et al., 2004).

Dans cette perspective, plusieurs méthodes d'obtention d'intracorps ont été développées au cours de ces 20 dernières années. Il est possible d'influer sur différents paramètres afin de sélectionner un intracorps : le développement de banque d'intracorps pour phage display ou double hybride en levure, l'optimisation du protocole de phage display et la méthode de criblage des anticorps (après une sélection *in vitro*).

II/ Développement de banques

Des banques d'anticorps semi-synthétique ou synthétique d'Ac à simple chaîne ont été réalisées dans le but de favoriser la sélection d'intracorps fonctionnels. Elles ont été créées, pour la plupart, à partir d'une séquence consensus d'un intracorps dans laquelle la diversité a été insérée dans une ou plusieurs boucles CDRs. Effectivement la diversité limitée rencontrée dans les banques immunes et l'hétérogénéité des banques naïves peuvent être un frein à l'obtention d'intracorps car en étant peu fréquemment présent dans ces types de banques, il sera d'autant plus difficile d'isoler ces Ac.

a) Banques utilisant un *scaffold* unique

En 2003, Tanaka et Rabbitts ont été les précurseurs dans la construction d'une banque d'intracorps au format simple domaine (VH) (Tanaka et al., 2003a) à partir de la connaissance d'une séquence consensus d'anticorps intracellulaire (Tse et al., 2002; Visintin et al., 2002). Cette séquence a également été retrouvée par leur équipe avec l'intracorps anti-RAS (scFv 21133R) (Tanaka and Rabbitts, 2003). Le *scaffold* de cet intracorps a servi de base dans l'élaboration d'une banque à simple domaine (VH). La diversité a été créée dans les boucles CDRs par PCR (*footprint mutagenesis*). Ainsi, deux banques ont été créées : une avec randomisation des boucles CDR 2/3 ayant servi de source pour la création de la 2^{ème} banque où les 3 boucles ont été randomisées, ce qui correspond à la banque finale. La taille des banques est de 10⁶ clones environ car ce sont des banques de double hybride en levure (Tanaka et al., 2003a).

b) Autres types de banques

En 2004, le groupe de Cattaneo a construit une banque naïve d'anticorps intracellulaires (*Single Pot Library of INTracellular antibodies* ou SPLINT) sous le format scFv exprimée directement dans le cytoplasme de la levure. Cette banque exploite le répertoire naïf des régions V naturelles supprimant le besoin de construire un FRW consensus (Visintin et al., 2004a). Une autre banque SPLINT de scFv a été construite par ce même groupe à partir du répertoire d'anticorps des gènes V de souris immunisées contre les agrégats de β -amyloïde (Meli et al., 2009).

Par ailleurs, l'équipe de Pierre Martineau a créé une première banque synthétique humaine de scFv, conçue et optimisée pour une expression intracellulaire chez *E. coli*. La diversité a été insérée dans les boucles CDR 3 (VH et VL) du scFv-13R4 (un intracops anti β -galactosidase (Martineau et al., 1998). Les clones non exprimés ont été supprimés par l'utilisation d'un filtre CAT. La diversité finale obtenue est de 1.5×10^9 (Philibert et al., 2007). Voyant que l'optimisation pour l'expression intracellulaire procaryote n'était pas la meilleure solution pour l'obtention des intracops, Martineau *et al.* ont proposé une nouvelle méthode de construction de banque d'intracops avec l'utilisation d'une fusion GFP-scFv comme rapporteur directe de la solubilité des scFvs dans le cytoplasme de cellules de mammifères. Après transduction de 10^6 clones de leur précédente banque dans un vecteur rétroviral contenant l'EGFP en N-terminale du scFv, les auteurs ont montré que l'intensité de fluorescence liée à la GFP corrélait au niveau d'expression d'EGFP-scFv solubles dans le cytoplasme de cellules de mammifères. La population la plus fluorescente serait donc celle qui contient le plus d'intracops et en triant cette population par FACS puis en randomisant leur VH et VL, il serait possible de construire de la sorte une banque optimisée d'intracops solubles en cellules de mammifères (Guglielmi et al., 2011).

Par la suite, ces banques seront criblées par phage display ou d'autres techniques qui seront décrites ci-dessous. Il est également possible d'optimiser le protocole de phage display afin d'orienter la sélection vers des intracops. Par exemple, au cours d'une sélection par phage display, l'ajout d'un agent réducteur dans le tampon d'élution des phages liés à l'antigène a déjà été employé mais il n'a pas été déterminé si ces conditions seules reproduisent l'environnement intracellulaire correctement. Ce processus a été réalisé avec succès avec le ribosome display en ajoutant un agent réducteur, le DTT (dithiothréitol), pendant les étapes de sélection et d'amplification, permettant ainsi l'obtention de scFv plus stables (Jermutus et al., 2001).

III/ Procédés de criblage pour l'obtention d'intracorps

Les banques et l'optimisation du protocole de phage display permettent d'augmenter les chances d'obtention d'intracorps fonctionnels. Cette probabilité restant relativement faible, - cette proportion pourrait presque être corrélée avec le nombre d'articles caractérisant des intracorps par rapport à la pléthore présentant des anticorps recombinants -, la technique de criblage de clones individuels suite à l'enrichissement par phage display doit aussi se rapprocher des conditions de préservation de la conformation native de l'antigène. C'est pourquoi des stratégies de criblages spécifiquement adaptées à la sélection d'intracorps ont été mises au point.

1) Sélection par des techniques de double hybride

a) Double hybride en levure

En 1999, Visintin a mis au point un crible d'intracorps par double hybride afin d'observer l'interaction intracellulaire Ag-Ac par activation d'un gène rapporteur. Ici le système double hybride de Fields et Song a été adapté (Fields and Song, 1989). Les vecteurs d'expression suivants sont construits : les scFvs fusionnés à un domaine d'activation (AD) transcriptionnel VP16 et l'antigène lié au domaine LexA liant l'ADN (*DNA Binding Domain* ou DBD) (**figure 9**). Ces vecteurs sont co-transformés dans des levures HIS⁻ (ne poussant pas sur milieu sans histidine) mais portant un gène HIS3 sous le contrôle d'un promoteur minimal contenant le domaine de reconnaissance LexA. Si le scFv se lie à l'antigène cible *in cellulo*, un complexe est alors formé et peut lier le promoteur du gène HIS3 (*via* LexA lié à l'Ag) et activer la transcription (par l'AD lié au scFv). Cette activité va restaurer la croissance des levures sur un milieu sans histidine (**figure 9**). De plus, les levures peuvent porter un gène LacZ contrôlé par un promoteur minimal contenant aussi le domaine de reconnaissance LexA. Ainsi la production de β -galactosidase (mesurée par l'activation de la β -galactosidase et l'apparition de colonies bleues) est aussi la conséquence d'une interaction Ag-Ac dans les levures transfectées (**figure 9**). En général, ces deux tests sont utilisés de façon successive, permettant de ce fait de confirmer les résultats obtenus avec le premier test. De cette manière, les auteurs ont montré qu'en "diluant" un scFv positif dans une banque de scFvs négatifs (5.10^5), il était possible de le re-sélectionner par ce système de double hybride (Visintin et al., 1999).

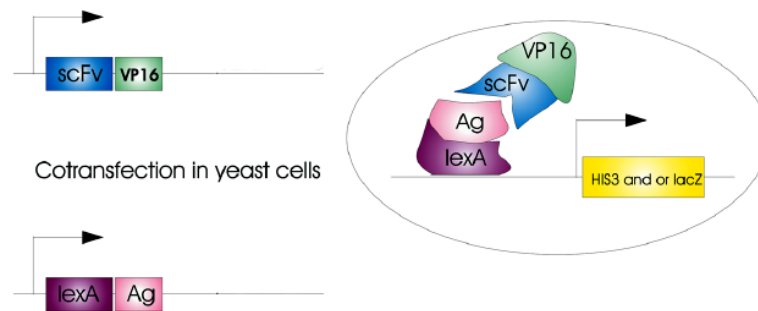


Figure 9 : Crible de scFv en double hybride (Visintin et al., 2004b).

En 2002, l'équipe de Barberis a également utilisé le double hybride pour sélectionner directement des scFvs stables en intracellulaire (der Maur et al., 2002). L'avantage de cette technique est qu'il n'est pas nécessaire de purifier l'antigène comme c'est le cas avec le phage display par exemple mais de nombreux faux positifs sont sélectionnés par cette technique à cause d'une mauvaise activation transcriptionnelle (Fields, 2005).

Par la suite, plusieurs groupes ont basé leur crible à partir de cette technique double hybride en incorporant une étape préalable de phage display : l'*Intracellular Antibody Capture* (IAC) (Tanaka and Rabbitts, 2003; Tse et al., 2002; Visintin et al., 2002).

b) Sélection par l'IAC : capture d'anticorps intracellulaire

En 2002, deux groupes ont développé en parallèle la capture d'anticorps intracellulaire ou IAC : le groupe de Cattaneo (Visintin et al., 2002) et celui de Rabbitts (Tse et al., 2002). L'IAC est une technique permettant la sélection rapide et reproductible d'intracorps. Les anticorps sont sélectionnés sur la base de leurs capacités de bon repliement et de liaison à leur cible dans l'environnement réducteur du cytoplasme. Cette technique dérive du double hybride en levure et comporte quatre (ou cinq pour l'équipe de Rabbitts) étapes principales :

- 1) Utilisation d'une banque non immune de phage display de scFv (Sheets et al., 1998) pour une première étape de sélection *in vitro*.
- 2) Les scFvs issus de la sélection par phage display sont clonés dans un vecteur de levure VP16.
- 3) La sous banque de scFv ainsi créée est sélectionnée en levure.
- 4) Les clones sortant positifs du double hybride (levures ayant une croissance indépendante de l'histidine puis β -galactosidase positive) sont soumis à un test d'empreinte ADN (digestion de l'ADN des scFvs par différentes enzymes de restriction) et les différents *patterns* résultant de cette digestion sont ré-analysés en levure (étape non présente pour Visintin *et al.*).

5) Enfin les clones isolés sont caractérisés *in vitro* (western blot, ELISA) et/ou *in cellulo* (essai de relocalisation de l'anticorps, essai luciférase).

Avec l'IAC, Visintin *et al.* ont notamment sélectionné des intracorps dirigés contre la protéine associée aux microtubules TAU (Visintin *et al.*, 2002) et Tse *et al.* ont sélectionné des intracorps contre ABL et BCR (Tse *et al.*, 2002).

Ensuite Tanaka *et al.* ont appliqué la technique d'IAC afin d'isoler des intracorps anti-HRAS. Après avoir suivi les 5 étapes de l'IAC, trois scFvs spécifiques de H-RAS ont été obtenus (Tanaka and Rabbitts, 2003). L'efficacité de deux des trois scFvs issus de l'IAC, a été confirmée en cellules de mammifères par un test luciférase et en essai de relocalisation. Ces anticorps ont été séquencés et ils appartiennent tous aux sous-groupes VH3 (pour le VH) et Vk1 (pour le VL), comme décrit précédemment, à un acide aminé près (Tse *et al.*, 2002). Ainsi, les auteurs ont conclu que cette séquence consensus du *framework* est très favorable pour l'utilisation de scFv comme intracorps et qu'elle pourra être utilisée pour designer d'autres intracorps (Tanaka *et al.*, 2003b).

L'inconvénient majeur de cette méthode est le re-clonage nécessaire après le premier tour de phage display dans un vecteur pour expression en levure.

C'est pourquoi cette méthode d'IAC a été améliorée avec l'IAC2 (2^{ème} génération) (Tanaka *et al.*, 2003a) et l'IAC3 (3^{ème} génération) (Tanaka and Rabbitts, 2010). L'IAC2 permet d'éviter l'étape de sélection *in vitro* par phage display via la création de banques d'anticorps à simple domaine basée sur les séquences consensus décrites ci-dessus (Cf. C.II). La limitation principale de cette technique est la petite échelle de criblage des banques due à l'efficacité de transformation des levures. L'IAC de troisième génération consiste en la création de sous banques de VH (14 de VH) et une de VL humaines pour la sélection en levure. L'innovation de l'IAC3 réside dans la répétition des cribles en double hybride et la randomisation des CDRs des clones positifs issus du tour 2 et 3 (randomisation du CDR2 pour les clones positifs issus du tour 2 et du CDR1 pour les clones du tour 3), créant une maturation d'affinité *in vitro*. En outre, cette nouvelle méthode permet l'élimination des faux positifs en combinant le système LexA-DBD au 1^{er} tour de sélection et le système Gal4-DBD dans les 2 et 3^{èmes} tours. L'inconvénient majeur de la méthode réside dans le fait de devoir faire une large sélection au 1^{er} tour avec plusieurs banques d'anticorps à simple domaine (jusqu'à 15 banques) pour obtenir des intracorps de haute affinité, ce qui est fastidieux (Tanaka and Rabbitts, 2010).

Bien que l'IAC ait permis d'obtenir des intracorps fonctionnels sous le format scFv et VH/VL, cette méthode présente certains inconvénients liés à la technique du double hybride. D'une part, la taille

limitée des banques double hybride est un frein à la diversité potentielle des anticorps. Il est important de noter que cet inconvénient a été en partie corrigé avec l'IAC3 et la création de banques et sous banques d'anticorps à simple domaine (VH et VL). De plus, il n'est possible de sélectionner que des protéines eucaryotes non homologues et non auto-activables avec ce système.

c) Sélection par le yeast 3-SPLINT

Dans le but d'obtenir une méthode générique permettant la sélection directe d'intracorps perturbant des interactions protéine-protéine, Visintin *et al.* ont développé le yeast 3-SPLINT (**figure 10**). Cette technique a permis d'obtenir notamment un anti-p65 perturbant la voie de signalisation NF- κ B (Visintin *et al.*, 2008).

En partant de ce principe, le développement d'une méthode de criblage afin d'obtenir directement des intracorps perturbant des interactions protéine-protéine, Tanaka *et al.* ont développé un crible d'intracorps en cellules CHO reposant sur le principe du test d'activité luciférase (Tanaka and Rabbitts, 2010, 2012). Ces cellules portent le gène rapporteur Gal4-DNA Binding Site-luciférase (Firefly) et sont cotransfectées par un vecteur codant pour une protéine liée au VP16 et une autre liée au DBD et par un vecteur d'expression d'intracorps. Selon le même principe présenté ci-dessus, si les protéines interagissent entre elles, alors l'activité luciférase sera élevée et si un intracorps perturbe cette interaction alors l'activité luciférase diminuera (Zhang and Rabbitts, 2014).

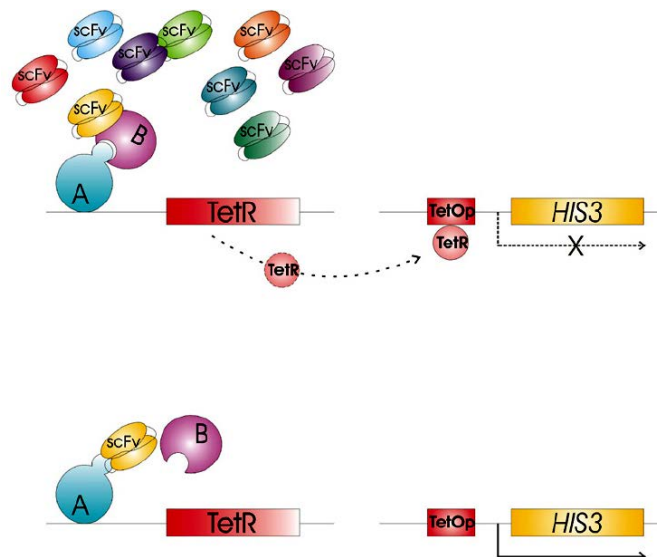


Figure 10 : Principe de fonctionnement du 3-SPLINT. Les protéines d'intérêts sont fusionnées au domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain) LexA (A) et au domaine d'activation transcriptionnelle VP16 (B). Après transformation de la banque 3-SPLINT en levure, en absence de *binder* ou en présence d'anticorps non bloquant, 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. La levure ne pourra donc pas pousser sur un milieu sans histidine (haut). Les cellules contenant un plasmide codant pour un scFv bloquant l'interaction entre les protéines A et B pourront pousser sur un milieu sans histidine (bas) (Visintin *et al.*, 2008).

d) *Sélection en double hybride en bactérie*

Pellis *et al.* ont amélioré l'IACT1 en modifiant les points suivants : le double hybride est réalisé en bactérie pour sa plus grande rapidité de croissance. Ensuite, le format scFv a été remplacé par le format Nbs présentant les avantages déjà décrits dans le paragraphe B.I.3.c. Les auteurs ont d'abord testé leur méthode avec un intracorp connu : le GFP4 (un anti-GFP). Ils l'ont inséré dans un vecteur d'accueil pour le double hybride en bactérie et, après sélection, le GFP4 a été retrouvé. Puis les auteurs ont créé des banques immunes (issues d'immunisation de dromadaire) en format phage display ou double hybride bactérien. Par ces deux techniques, les auteurs ont obtenu des intracorps anti-GFP et dirigés contre l'intégrase du virus HIV-1 d'affinité équivalente (10 à 200 nM). Cependant, cette stratégie ne fonctionnera pas pour des antigènes modifiés post-traductionnellement et elle entraîne la sélection de faux positifs à cause d'une mauvaise activation transcriptionnelle (Pellis *et al.*, 2012).

2) **Fluorescent hybrid assay**

Pellis *et al.* ont utilisé le *fluorescent 2 hybrid assay* (F2H) pour savoir si les anticorps obtenus après sélection par le double hybride bactérien étaient capables de fonctionner dans les cellules de mammifères en tant qu'intracorps. Le F2H consiste en l'expression stable dans le génome de l'opérateur lacO dans une lignée cellulaire de mammifère (ici cellules BHK, *Baby Hamster Kidney*). Après co-expression de la construction GFP-LacI et des *nanobodies* anti-GFP en fusion à la mRFP dans cette lignée cellulaire, la GFP sera recrutée au niveau de l'opérateur (au noyau) et formera un foyer vert et si l'anticorps reconnaît la GFP il co-localisera avec et formera un foyer rouge (Pellis *et al.*, 2012). Ce mode de sélection pourrait être étendu à d'autres antigènes que la GFP en fusionnant en aval de la GFP-LacI une protéine d'intérêt à cibler par les intracorps en fusion avec une protéine fluorescente (Kaiser *et al.*, 2014). L'inconvénient majeur de cette technique est la présence de bruit de fond dans le noyau correspondant à la fluorescence de la GFP. Il faut donc pouvoir distinguer la liaison anticorps/antigène de ce bruit de fond pour être en mesure d'estimer si les intracorps reconnaissent leur cible dans le contexte intracellulaire.

Cette technique a d'ailleurs évolué en F3H afin de pouvoir visualiser des interactions protéine-protéine *in cellulo* à l'aide d'intracorps (Herce *et al.*, 2013) (Cf. C.V.1).

3) Direct phage to intrabody screening

En 2004, Gennari et ses collaborateurs ont mis au point une nouvelle technique de criblage permettant l'obtention d'intracorps dirigés contre un site (*Transformation Effector Site 1* ou TES1) de la protéine membranaire latente du virus d'Epstein Barr (*Latent Membrane Protein 1* ou LMP1) (Gennari et al., 2004). Elle consiste à réaliser des tours de phage display puis un premier criblage par phage ELISA. Les Ac positifs sont regroupés en quatre pools selon les absorbances obtenues en phage ELISA (groupe IV, plus forte densité optique, supérieure à 1,5). Les Ac rentrant dans chacun de ces groupes sont sous clonés dans un vecteur d'expression eucaryote pour un test luciférase. La protéine LMP1 est connue pour activer le facteur de transcription NFκB. Par conséquent, les pools d'Ac sont co-transfectés avec le plasmide contenant le promoteur de NFκB lié au gène rapporteur de la luciférase et différentes versions de l'antigène (LMP1 sauvage, LMP1-TES1 et LMP1-ΔTES1). Une diminution de l'activité luciférase est observée avec les 4 pools pour tous les antigènes sauf pour la construction où est déléetée le site TES1, montrant ainsi la spécificité des Ac obtenus. Ces résultats ont été confirmés ensuite par une co-immunoprécipitation entre les pools d'Ac et LMP1. Les résultats du test luciférase ont été reproduits avec les Ac individuels issus de chacun de ces groupes. Les Ac issus des pools III et IV, donnant une plus forte densité optique, sont les meilleurs inhibiteurs de l'activité luciférase.

L'avantage de cette technique de criblage est le gain de temps car elle permet d'obtenir des intracorps en évitant les étapes de caractérisation *in vitro* des Ac monoclonaux qui n'est pas forcément prédictif du fonctionnement *in cellulo* de l'Ac (Gennari et al., 2004). Néanmoins la sélection par phage ELISA est limitante car il ne peut pas être exclu que des Ac fonctionnant en intracellulaire mais qui ne fonctionnent pas en ELISA soit perdus.

4) Sélection d'intracorps indépendamment de l'antigène

Ce type de sélection permet l'isolement d'intracorps solubles dans le cytoplasme bactérien sans pour autant détecter une interaction Ac-Ag. Le filtre CAT (*Chloramphenicol Acetyl Transferase*) a été utilisé par Philibert *et al.* afin d'isoler des intracorps solubles pour construire une banque optimisée pour l'obtention d'intracorps (Philibert et al., 2007) (Cf C.II.b).

Une autre méthode, dépendante de la machinerie de sécrétion périplasmique TAT (*Twin Arginin Translocation*) d'*E. coli*, a permis d'améliorer la stabilité, la solubilité et même l'affinité d'intracorps déjà existants après évolution moléculaire des scFvs. Le système TAT permet l'export direct de protéines maturées correctement dans le cytoplasme vers le périplasma bactérien (Cf. annexes). Ce

système repose sur la fusion d'un peptide signal du système TAT à des scFvs (en N-terminal) et à une β -lactamase en C-terminal (enzyme conférant une résistance à l'ampicilline), une sélection des scFvs solubles est ainsi possible sur milieu avec ampicilline (Fisher and DeLisa, 2009; Waraho-Zhmayev et al., 2014).

Ce système a également été adapté afin de sélectionner des intracorps spécifiques d'une cible en bactérie en fusionnant d'un côté un intracorps à un peptide signal TAT et d'un autre côté en fusionnant l'antigène à la β -lactamase (Waraho and DeLisa, 2009) (**figure 11**). L'avantage d'un tel système est la sélection potentielle d'intracorps ayant une forte affinité pour leur cible (de l'ordre du nM) car cette méthode permet de discriminer des interactions faibles (μ M) à des interactions fortes (nM).

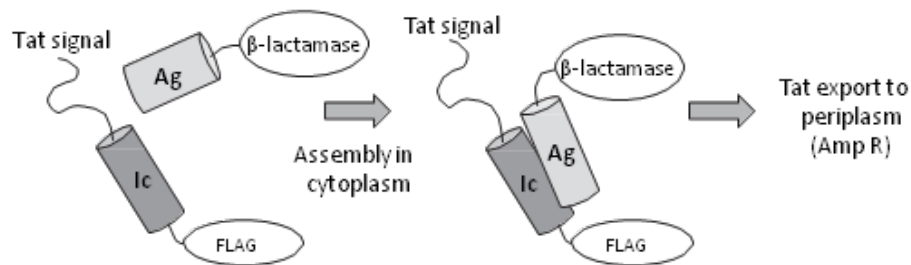


Figure 11 : Sélection par la méthode FLI-TRAP (*Functional Ligand-binding Identification by Tat-based Recognition of Associating Proteins*). Ic : Intracorps ; Ag : Antigène ; FLAG : étiquette ; Amp R : Résistance à l'ampicilline. Adapté de (Waraho and DeLisa, 2009)

5) Sélection par complémentation de fragment protéique

Mossner *et al.* ont adapté la complémentation de fragment protéique (*Protein Complementation Assay* ou PCA), développée en 1998 par Pelletier *et al.* (Pelletier et al., 1998), pour la sélection d'anticorps sous le format scFv chez *E. coli* (Mossner et al., 2001). La dihydrofolate reductase de souris (mDHFR) est divisée en deux parties (mDHFR I et II) correspondant aux séquences amino et carboxy terminales. Le scFv est en fusion avec la mDHFR I et l'Ag avec la mDHFR II. L'interaction Ag-Ac rapproche les deux fragments de la complémentation, reforme une mDHFR et restaure de ce fait l'activité de l'enzyme. De cette manière, la prolifération bactérienne est induite sur milieu minimal complétement en triméthoprime, un antibiotique inhibant la DHFR bactérienne (Mossner 2001). La preuve de concept a été réalisée sur des scFvs déjà présélectionnés par Mossner *et al.* puis Koch *et al.* ont validé ce système pour le criblage direct d'une banque synthétique de scFvs. De cette façon, des scFvs spécifiques de la kinase N-terminale c-Jun 2 (JNK-2) et de la protéine D de la capsid du bactériophage λ ont été isolés (Koch et al., 2006).

L'avantage d'une telle technique est que l'Ag n'a pas besoin d'être produit et purifié et que l'environnement intracellulaire procaryote est favorable à la sélection d'intracorps. Cependant, la longueur des *linkers* reliant Ac/Ag aux fragments de la mDHFR semblent avoir un impact important sur le fonctionnement du système. Ce point doit donc être contrôlé à chaque sélection en fonction de la taille de l'anticorps (scFv, VH, VHH, ...) et de l'antigène. En outre, cette technique se confronte au même inconvénient expliqué en C.IV.4 sur la nature des Ag utilisables : toutes les modifications post-traductionnelles ne sont pas réalisées lorsque la protéine est produite en système procaryote. Enfin, bien que cette approche semble très prometteuse avec des anticorps présélectionnés (Mossner et al., 2001), la validation de la méthode avec une banque synthétique d'anticorps n'a résulté qu'en l'obtention de *binders* de faible affinité (μM) (Koch et al., 2006).

6) Sélection phénotypique

Récemment, Mazuc *et al.* ont développé l'*Intrabody-based Phenotypic Screen* (IBPheS). Ce criblage est basé sur l'expression intracellulaire d'une banque de scFv en cellules eucaryotes et la sélection d'intracorps associés au phénotype désiré, ici la dégranulation de basophiles leucémiques de rat (RBL-2H3). Les intracorps bloquant la dégranulation de ces cellules, induite par de l'IgE monomérique, ont été amplifiés spécifiquement pendant le phage display et un intracorps a été isolé (Mazuc et al., 2014).

L'avantage de cette technique est qu'elle permette l'identification de nouvelle cible thérapeutique car elle repose sur une interaction intracorps-antigène et ce dernier peut être identifié par spectrométrie de masse (Mazuc et al., 2014). Toutefois si l'objectif est la sélection d'un intracorps contre une cible connue alors la conception et l'utilisation d'un tel crible sera délicate car de nombreuses protéines peuvent induire un phénotype similaire.

Ces sélections optimisées pour l'obtention d'intracorps ont été utilisées avec succès, malgré tout de nombreux intracorps ont été sélectionnés par des méthodes rationnelles.

7) Sélection rationnelle *in vitro* suivie d'*ex vivo*

Nizak *et al.* ont obtenu un intracorp anti-Rab6-GTP (sous le format scFv) en criblant, après phage display, directement en immunofluorescence les clones détectant Rab6 endogène. Puis les auteurs ont confirmé par des tests *in vitro* (*pulldown* et immunoprécipitation) la sélectivité de leur anticorps (Nizak *et al.*, 2003b).

L'équipe de Tonks a réalisé un crible en solution par un test phosphatase afin de sélectionner des scFvs inhibant l'activité phosphatase de leur protéine cible : la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) sous sa forme oxydée. Ils ont ensuite montré la sélectivité des anticorps candidats par des tests *in vitro* (*pulldown*, essais phosphatases et mesures d'affinité par *Surface Plasmon Resonance* ou SPR) (Haque *et al.*, 2011).

Une autre équipe ayant obtenue un intracorp phospho-tyrosine spécifique de la protéine STAT3 (pYSTAT3) a initié sa sélection par un test ELISA (STAT3 *versus* pYSTAT3) afin de sélectionner des anticorps phospho-spécifiques. La sélectivité a été confirmée par d'autres essais *in vitro* tels que le WB, l'immunoprécipitation ou encore la mesure d'affinité en SPR (Koo *et al.*, 2014).

8) Sélections potentiellement applicables

Des méthodes de sélection appliquées pour visualiser des interactions protéine-protéine autres qu'antigène-anticorps ont été utilisées et pourraient être applicables pour la sélection d'intracorp.

Kerppola a développé la complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC) (Hu *et al.*, 2002). Elle consiste en la fusion de deux fragments d'une protéine fluorescente (telle que la YFP ou la GFP) à des protéines dont l'interaction est à déterminer. La reconstitution de la YFP ou GFP est observée lorsque les protéines interagissent entre elles. L'inconvénient majeur des techniques de BiFC est le bruit de fond élevé en fluorescence dû à une association spontanée des deux fragments reformant la protéine fluorescente (Kerppola, 2009).

Enfin d'autres techniques telles que le FRET HTRH (*homogeneous time resolved fluorescence*) - la compagnie Cisbio l'utilise pour montrer des interactions protéine-protéine (<http://www.htrf.com/tr-fret-basics>) - ou le split GFP tripartite pourraient être également utilisées (Cabantous *et al.*, 2013).

IV/ Fonctionnalisation des intracorps

Les intracorps peuvent être fonctionnalisés par différents peptides/protéines afin de modifier leur fonction intracellulaire.

1) Pour la rétention intracellulaire de l'antigène

En 1993, Marasco a été un précurseur dans l'utilisation d'intracorps dans le but de lier et inactiver des cibles intracellulaires. Il a fusionné un scFv anti-gp120 à un peptide de rétention au RE afin d'inhiber la formation de l'enveloppe virale du VIH (Marasco et al., 1993).

La méthode a été par la suite améliorée en étiquetant l'anticorps en amino terminal avec un peptide signal du RE et en carboxy terminal par un signal de rétention au RE. Ce signal de rétention (SEKDEL ou KDEL) retient l'anticorps dans la lumière du RE (au niveau du récepteur HERD2) afin qu'il se lie à sa protéine cible sécrétée et empêche le transport de celle-ci vers la surface de la cellule. Il en résulte ainsi un *knockdown* fonctionnel très efficace de la protéine de surface ou sécrétée (Boldicke, 2007).

Plusieurs groupes ont utilisé ce système afin d'étudier le *knockdown* de nombreux récepteurs de surface tels que le VEGFR-2 (Boldicke et al., 2005), l'EGFR (Jannot et al., 1996) ou encore le p75NTR (Zhang et al., 2012), mais également de protéines transmembranaires telles que VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) (Strebe et al., 2009) ou encore de protéines sécrétées comme les MMP-2 et MMP-9 (Heintges et al., 1999).

Cette technique permet l'obtention d'intracorps correctement maturés d'une part *via* l'interaction avec des chaperonnes (BiP et GRP94) et d'autre part *via* l'environnement oxydant du réticulum permettant la formation de ponts disulfures intra domaines des anticorps (Boldicke, 2007). Par conséquent, un intracorps n'étant pas stable dans l'environnement réducteur du cytoplasme pourrait fonctionner dans ce système. Cependant cette méthode est restreinte aux protéines membranaires et aux protéines sécrétées. Il est important de noter que ces anticorps ne sont généralement pas considérés comme des intracorps mais plutôt comme des "anticorps retenus" car ils ne sont pas exprimés dans le cytosol (Marschall et al., 2014).

2) Pour la lyse cellulaire

En 2000, Tse *et al.* ont développé une méthode de mort cellulaire basée sur l'activation de la voie des caspases par fusion d'anticorps intracellulaire à la caspase 3 (**figure 12**). Ils ont de cette façon fusionné le scFv-13R4, un intracorp anti β -galactosidase, à la caspase 3. La liaison des scFvs (un anticorps par sous unité du tétramère de β -galactosidase) engendre la dimérisation et l'auto-activation de la caspase 3 déclenchant ainsi l'apoptose (Tse and Rabbitts, 2000). Cette technique est décrite par les auteurs comme pouvant être efficace pour cibler notamment les cellules tumorales surexprimant un oncogène tel que p53 mutée qui forme souvent un tétramère ou encore des fusions de protéines résultant de translocations chromosomiques (Tse and Rabbitts, 2000).

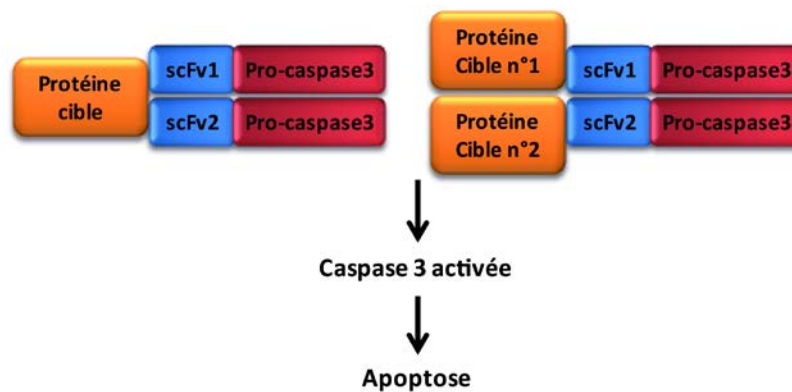


Figure 12 : Apoptose dépendante de l'interaction antigène-anticorps. L'interaction de deux anticorps, exprimés comme protéine de fusion avec une pro-caspase 3, sur leur même cible (sur un épitope différent, à gauche) ou sur deux cibles différentes interagissant ensemble (à droite) va entraîner l'auto-activation des pro-caspases menant à la mort cellulaire.

L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle soit dépendante de la liaison de deux intracorps assez proches sur l'antigène pour permettre l'auto-activation de la caspase 3.

3) Pour la dégradation de l'antigène et/ou du complexe intracorps/antigène

La dégradation sélective de protéines intracellulaires est régulée finement par différentes voies dont la voie de l'ubiquitine. En dérivant ce système "naturel" de dégradation, de nombreux groupes ont pu dégrader des protéines intracellulaires et/ou exogènes. Généralement une protéine impliquée dans la machinerie de dégradation (ex : Fbox) a été fusionnée à un domaine d'interaction spécifique. Plusieurs méthodes ont été développées, toutes n'étant pas dépendantes de la voie de l'ubiquitine, et sont décrites dans les paragraphes suivants. Les premières montrent la faisabilité du système de *knockdown* protéique passant par une dégradation de la cible (a-d) et ensuite est détaillé ce qui a déjà été fait par le biais d'intracorps (e).

a) Utilisation de la voie de dégradation de l'auxine

Les plantes ont développé un système de dégradation de protéines unique dépendant de l'auxine, une hormone induisant directement la dégradation de la famille AUX/IAA de répresseurs de transcription *via* une forme spécifique d'E3 ligase. Nishimura *et al.* ont transposé ce système dans d'autres espèces eucaryotes que les plantes afin d'induire la dégradation de protéines cibles (**figure 13**). Les auteurs ont co-surexprimé en levure une construction comprenant la protéine cible à dégrader en fusion avec un dégron (*Auxin Inducible Degron* ou AID) et TIR1, l'équivalent de la protéine Fbox pour les plantes. Ils sont ainsi capables d'induire la dégradation de protéines cibles telles que GFP-NLS (*Nuclear Localization Sequence*), Mcm4 ou encore CENP-H dès 30 minutes de traitement à l'auxine (Nishimura *et al.*, 2009).

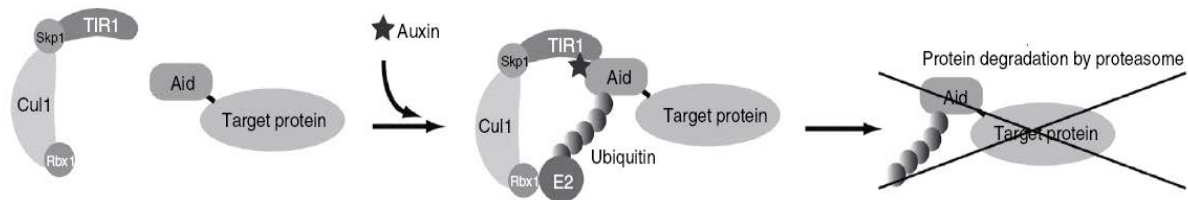


Figure 13 : Système de dégradation AID. L'auxine se lie à TIR1 permet l'interaction entre TIR1 et le dégron AID en fusion avec une protéine cible. Le complexe SCF-TIR1 agit comme une ubiquitine ligase E3 pour recruter une ubiquitine conjugating enzyme E2 entraînant la polyubiquitinylation du dégron AID. Finalement la protéine cible est dégradée par le protéasome (Nishimura *et al.*, 2009).

Cette méthode a été reprise par l'équipe de Don Cleveland en cellules de mammifères. TIR1 a été exprimée de façon stable et constitutive dans différentes lignées cellulaires. Les protéines cibles ont ensuite été exprimées stablement et leur expression était sous le contrôle de la doxycycline. Des protéines cytoplasmiques (polo-kinase 4, cycline B1) et nucléaires (histone H2B, CENP-A, TRF2) ont pu être dégradées de la sorte (Holland *et al.*, 2012). De ce fait, il a été démontré que cette méthode de dégradation était : (i) active contre des protéines nucléaires et cytoplasmiques, (ii) capable de contrôler la stabilité de substrats incorporés dans des complexes macromoléculaires, (iii) suffisamment robuste pour induire une dégradation rapide et totale de toutes les cibles, (iv) active dans toutes les phases du cycle cellulaire et surtout (v) rapidement réversible (après quelques minutes) dès le retrait de l'auxine (Holland *et al.*, 2012).

La surexpression de TIR1 et de la fusion AID-protéine cible constitue un inconvénient majeur de cette méthode car il n'est pas possible de dégrader des protéines endogènes.

b) Fusion de l'ODC à un motif de liaison protéine-protéine

L'ornithine décarboxylase (ODC) est une enzyme se liant directement au protéasome 26S et est dégradée par celui-ci *via* un mécanisme catalysé par l'antienzyme (AZ) de façon indépendante de l'ubiquitine (Murakami et al., 2000). Le groupe de Reed a fusionné l'ODC à différents domaines d'interaction protéiques et testé si ces fusions pouvaient entraîner une dégradation de protéines cibles, dépendante de l'AZ (**figure 14**). Ainsi différentes protéines endogènes ont été dégradées (TRAF6, Rb, IKK β) avec l'ajout d'antienzyme (Matsuzawa et al., 2005).

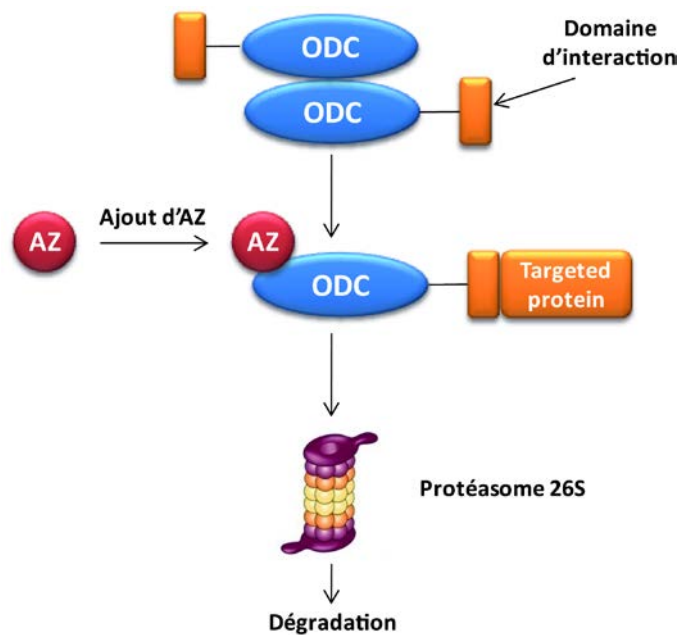


Figure 14 : Modèle de dégradation d'une protéine cible par le système ODC/AZ. Un domaine d'interaction protéine-protéine est exprimé en fusion carboxy terminale à l'ornithine décarboxylase (ODC) avec un linker flexible. ODC est connu pour former des homodimères inactifs. Après ajout d'antienzyme (AZ), la protéine de fusion ODC se lie à sa protéine cible puis est envoyée au protéasome 26S pour dégradation.

c) PROTACS : proteolysis-targeting chimeric molecule

Les PROTACS sont des petites molécules chimériques (de l'ordre du kDa) composées d'une partie peptidique et d'une partie chimique permettant d'envoyer leur cible au protéasome. Le premier PROTAC ayant été construit était dirigé contre la méthionine aminopeptidase 2 (MetAP-2). Les auteurs ont synthétisé cet outil en utilisant un phosphopeptide de 10 aa dérivant d'IkK α comme domaine de liaison au SCF (Cf. C.IV.3.e.ii) et l'ovalicine (un inhibiteur de l'angiogénèse) qui se lie de façon covalente à la MetAP-2. Cet outil a donc permis d'envoyer au protéasome la MetAP-2 (Sakamoto et al., 2001).

Le groupe de Crews a développé la technologie phosphoPROTACS. Deux phosphoPROTACS ciblant des protéines reconnaissant des tyrosines phosphorylées de la région intracellulaire de récepteurs tyrosine kinase (RTK) ont été générés. Dans un premier temps, un *knockdown* du FSR2α (*fibroblast growth factor receptor substrate 2 α*) a été réalisé. FSR2α est un substrat se liant sur une des tyrosines phosphorylées du *nerve growth factor receptor* (ou NGFR) après activation du NGFR au NGF. Pour cela, ils ont construit un phosphoPROTACS comprenant une séquence peptidique dérivant du NGFR (ayant une tyrosine centrale) et spécifique de la liaison du FSR2α au NFGR. Ce peptide est lié à une séquence de liaison au VHL (von Hippel Lindau, protéine étant un composant d'une famille d'E3 ligase) et à la poly-D-arginine augmentant la perméabilité cellulaire du PROTACS (**figure 15**). Après activation au NGF de cellules PC12, le phosphoPROTAC sera phosphorylé et pourra interagir avec le FSR2α (**figure 15**). Une dégradation de la cible ainsi qu'une inhibition de la voie de signalisation en aval (inhibition de phospho ERK1/2) ont été observées. De façon analogue, les auteurs ont ciblé la PI3K se liant à une tyrosine phosphorylée de l'*erythroblastosis oncogene* E3 (ErbB3) et ont observé une dégradation de la PI3K et une inhibition de la voie de signalisation en aval ErbB2/ErbB3/PI3K (inhibition de la phosphorylation d'AKT) (Hines et al., 2013).

Dans ce cas, la dégradation est réalisée par une petite molécule qui n'est pas transfectée dans les cellules. Ainsi la quantité d'inhibiteur est finement ajustable ce qui est un avantage indéniable. D'un autre côté, le rationnel permettant la construction de tels inhibiteurs est plutôt complexe car il repose sur l'étude de structure 3D ou cristallographique de protéines afin de trouver un peptide spécifique de telle ou telle partie de la protéine.

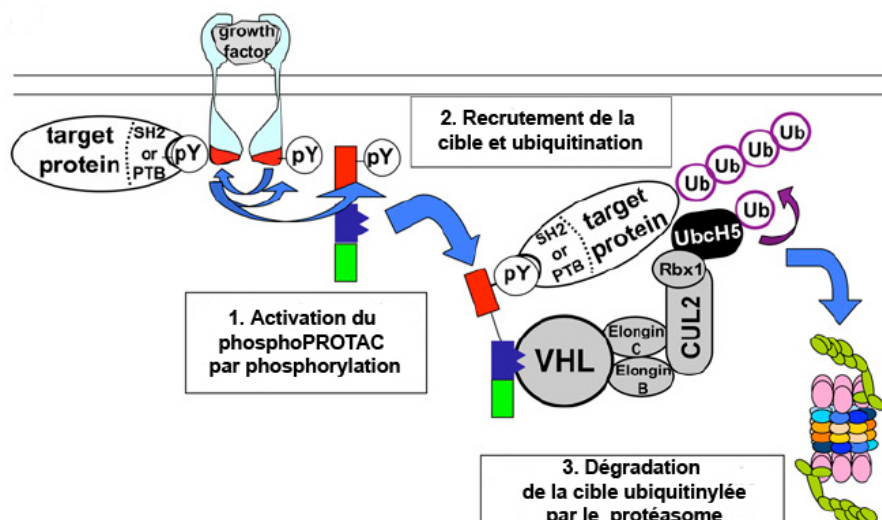


Figure 15 : Mode d'action des phosphoPROTACS. Après activation d'un récepteur d'un facteur de croissance (NGFR ou ErbB2/ErbB3) par son facteur de croissance (respectivement par le NGF et le NRG pour NeuReGulin), le phosphoPROTAC est phosphorylé sur sa tyrosine tout comme le récepteur sur sa tyrosine intracellulaire (en rouge). Il interagit avec sa cible (FSR2α ou PI3K) et induit son ubiquitinylation puis sa dégradation par le protéasome. En bleu : domaine d'interaction avec le von Hippel Lindau (VHL) et en vert : étiquette poly-D-arginine. (Hines et al., 2013)

d) *Fusion directe d'une protéine Fbox à un motif de liaison protéine-protéine*

Zhou a développé une méthode de dégradation protéique en fusionnant un domaine d'interaction spécifique d'une protéine à une protéine Fbox. Une fusion β -TrCP-E7N a permis de dégrader spécifiquement les protéines de la famille Rb (Rb hypophosphorylée, p107 et p130) (Zhang et al., 2003; Zhou et al., 2000). E7 est une oncoprotéine du virus HPV. Sa partie N-terminale contient un peptide spécifique de p107 (appelé E7N) qui a été fusionnée à la Fbox β -TrCP (une Fbox appartenant à la famille des ubiquitines ligases E3) mutée sur des acides aminés clés permettant une interaction spécifique avec p107 et aucun autre substrat de β -TrCP (Zhang et al., 2003; Zhou et al., 2000). De façon similaire, l'oncogène c-myc et la β -caténine ont été dégradés lorsque la β -TrCP était en fusion avec un domaine spécifique de ces protéines (Cohen et al., 2004; Su et al., 2003)

e) *Application des techniques de knockdown protéique aux intracorps*

i) Motif PEST

Plusieurs approches ont été établies afin de permettre la co-dégradation de l'intracorps lié à son antigène. Le groupe de Messer a par exemple fusionné en C-terminal d'intracorps un motif PEST (Proline (P), Acide glutamique (E), Acide aspartique (S), Thréonine (T)). Ce motif est ciblé par le protéasome et induit la dégradation de la protéine portant cette région (**figure 16A**). En utilisant le motif PEST de l'ornithine décarboxylase de souris, ils ont pu démontrer la dégradation effective de fragments mutants N terminaux de l'exon 1 de l'huntingtine (une répétition de 72 glutamines) *via* le protéasome (Butler and Messer, 2011). Ils ont ensuite validé et appliqué cette technique à d'autres intracorps dirigés contre l'alpha synucléine, protéine impliquée dans la maladie de Parkinson (Joshi et al., 2012). Ils ont également montré que la solubilité des intracorps était augmentée après fusion avec un motif PEST. Les auteurs expliquent cette augmentation de solubilité et donc de fonctionnalité des intracorps par une augmentation des charges négatives sur l'intracorps après sa fusion avec une région PEST (Joshi et al., 2012).

ii) Suicide Intrabody Technology

Le groupe de Cattaneo a développé la technologie des intracorps suicides (*Suicide Intrabody Technology* ou SIT) (**figure 16B**). Ils ont utilisé I κ B α un substrat de la protéine β -TrCP dont la dégradation est induite après un stimulus au TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*). En fusionnant cette protéine à des intracorps, la protéine tau et la β -galactosidase ont été dégradées après 30 minutes de traitement au TNF α . Les auteurs ont montré que cette dégradation était dépendante du

protéasome (utilisation de MG132) et spécifique de l'intracorp (utilisation d'un intracorp contrôle) (Melchionna and Cattaneo, 2007).

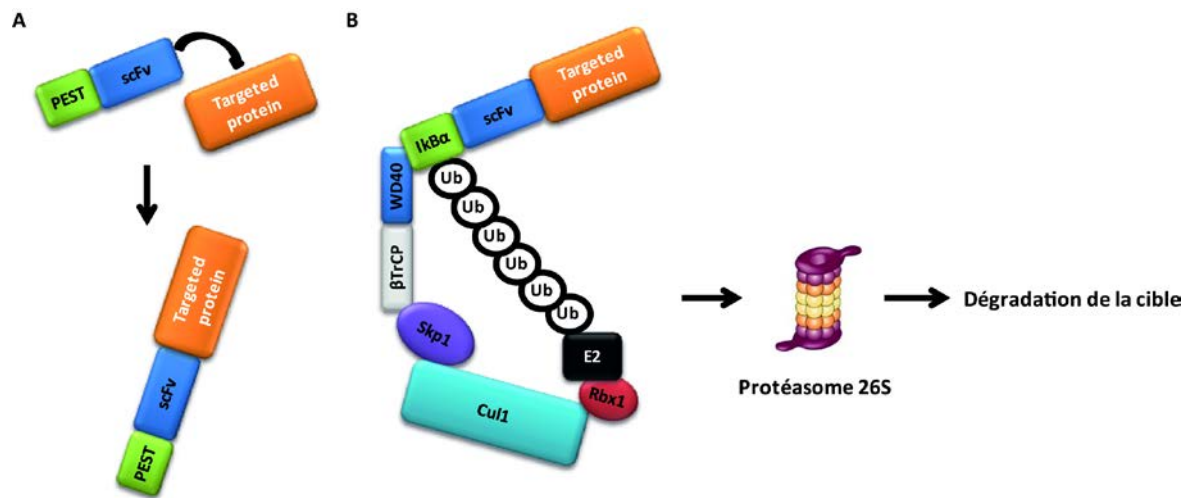


Figure 16 : Modèle de co-dégradation anticorps/antigène. (A) Intracorp suicides : les intracorp (ici au format scFv) sont fusionnés à un domaine (IκBα) interagissant avec le domaine d'interaction protéine/protéine (WD40) de la protéine Fbox β-TrCP afin de recruter le complexe SCF (Skp1-Cullin1-Fbox) correspondant à une famille d'ubiquitine ligase E3. Cette interaction entraîne la polyubiquitination d'IκBα et la dégradation du complexe Ac/Ag par le protéasome 26S. (B) Des intracorp en fusion avec le domaine PEST (partie carboxy terminale de l'enzyme ODC) vont interagir avec leur protéine cible et l'envoyer au protéasome par une voie de dégradation ubiquitine indépendante.

Ces méthodes entraînent la co-dégradation de l'intracorp avec sa cible. Par conséquent, une méthode utilisant un intracorp catalytique (non dégradé et donc réutilisable pour une nouvelle dégradation) serait d'autant plus efficace et souhaitable pour la dégradation de sa cible.

iii) Fusion directe d'une protéine Fbox à un intracorp

Deux groupes ont publié en 2011 des intracorp fonctionnalisés permettant la dégradation spécifique de la protéine ciblée par l'intracorp (**figure 17**). Kuo *et al.* ont utilisé le domaine Fbox de β-TrCP en fusion avec des intracorp, au format VHH, spécifiques de la neurotoxine botulique (chaîne légère, sérotype A et B). Ces toxines ont pu être dégradées par ces constructions chimériques ce qui engendre une résistance à l'infection et une guérison des cellules infectées plus rapide (Kuo *et al.*, 2011). Caussinus *et al.* ont utilisé un domaine Fbox issu de *Drosophila melanogaster* en fusion avec l'intracorp anti-GFP appelé GFP4 (Rothbauer *et al.*, 2006). Différentes fusions GFP ont été dégradées avec ce système, en cellules de mammifères de même qu'en drosophile (Caussinus *et al.*, 2012).

Plus récemment, les ubiquibodies ont été mis au point par Portnoff *et al.* : un domaine C-terminal de la ligase U-box en fusion avec un *monobody* (un anti-maltose *binding protein*) ou un intracorp (le scFv-13R4, anti β -galactosidase). Les U-box sont un type d'E3 ubiquitine ligase qui n'ont pas besoin d'autres facteurs pour lier et transférer l'ubiquitine sur leurs substrats. Ainsi la β -galactosidase et la MBP ont été dégradées par ce système dans différentes lignées cellulaires de mammifères (Portnoff *et al.*, 2014).

Les intracorp et les monobodies ne sont pas les seuls domaines d'interaction spécifiques à avoir été utilisés pour le *knockdown* protéique. Des aptamères peptidiques ont également été fusionnés au domaine Fbox de β -TrCP pour induire la dégradation de la β -caténine et de Notch1 (Yeh *et al.*, 2013).

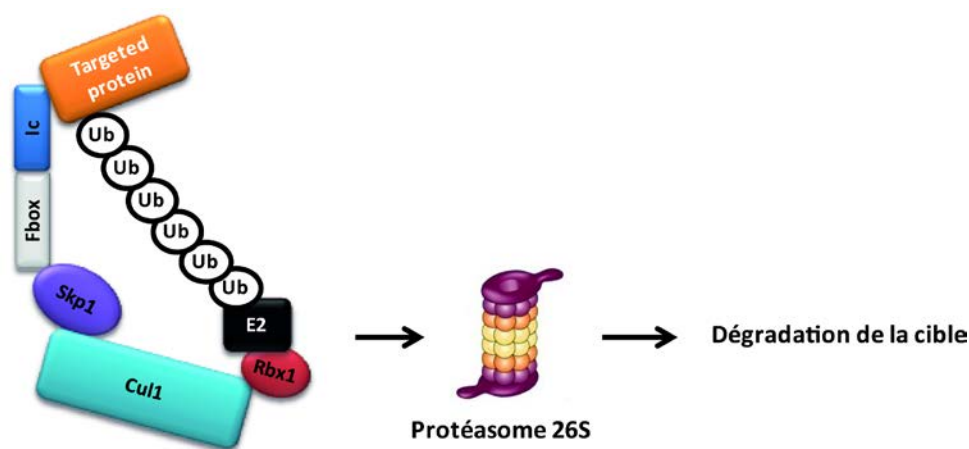


Figure 17 : Dégradation d'une protéine cible par un intracorp (Ic) fusionné à un domaine Fbox. L'intracorp en fusion avec un domaine Fbox se lie à sa cible. La Fbox va reformer le complexe SCF en recrutant Skp1, entraîner l'ubiquitination de la cible et sa dégradation par le protéasome 26S.

Ces anticorps intracellulaires fonctionnalisés ou non sont utilisés dans des applications variées allant du suivi de la dynamique de protéines endogènes, à la perturbation de la fonction d'une protéine ou au ciblage d'une conformation spécifique d'une protéine.

Pour notre projet, nous verrons que combiner la fonctionnalisation d'intracorp avec un domaine Fbox à un criblage direct *in cellulo* peut présenter certains avantages.

V/ Utilisation des intracorps

1) Suivi de la dynamique de protéines intracellulaires

Des intracorps ont été générés afin de suivre la localisation et/ou le devenir de protéines intracellulaires en cellules vivantes. Avec l'objectif de visualiser l'interaction Ic-cible, ces derniers sont fusionnés à une protéine fluorescente telle que la GFP et sont parfois appelés *chromobodies*.

De cette façon la dynamique de la petite GTPase Rab6-GTP a été suivie en cellules HeLa (Nizak et al., 2003b). L'Ic-YFP a montré que Rab6-GTP est présent sur le Golgi et sur toute la longueur des intermédiaires de transports tubulo-vésiculaires. Il a également montré que la géométrie de ces intermédiaires est modulée par le niveau d'expression de Rab6 (Nizak et al., 2003b).

Ce même groupe, en surexprimant en cellules HeLa le scFv TA10 fusionné à une protéine fluorescente, a suivi la dynamique de la giantine, une protéine de la matrice golgienne. Les auteurs ont montré qu'en réponse à la Brefeldine A (drogue perturbant le transport RE/Golgi) et au Nocodazole (dépolymérisation des microtubules) la giantine endogène est une protéine très stablement associée au Golgi et qu'elle ne recycle pas rapidement à travers le RE (Nizak et al., 2003a).

Un autre intracorps anti α -tubuline ne reconnaissant que la conformation "tyrosinée" (une modification post-traductionnelle de la tubuline) en fusion avec la GFP a permis de suivre la dynamique de polymérisation des microtubules (Cassimeris et al., 2013).

Rothbauer *et al.* ont développé les *chromobodies* pour cibler et suivre les antigènes en cellules vivantes. Les *chromobodies* sont des Nbs fluorescents (en fusion avec une protéine fluorescente). Avec ces outils, la dynamique de l'histone H2B-GFP et celle du PCNA-GFP ont été visualisées au cours du cycle cellulaire en *time lapse* avec un intracorps anti-GFP (le GFP4) fusionné avec la mRFP. Des protéines endogènes telles que la cytokératine 8 et la lamine ont également été visualisées par des *chromobodies* (Rothbauer et al., 2006).

Deux intracorps dirigés contre la gankyrine (GK) mais se fixant sur des épitopes différents ont été utilisés en fusion avec deux protéines fluorescentes (l'EGFP et la RFP) afin de visualiser la protéine endogène en cellules vivantes par la technique de FRET-FLIM. Ce système a permis d'observer que la GK est monomérique et distribuée dans le cytoplasme et le noyau de différentes lignées cellulaires cancéreuses (Rinaldi et al., 2013).

A partir du GFP4, Herce *et al.* ont mis au point une méthode de visualisation d'interaction protéine-protéine, le F3H. Ce système repose sur la fusion du GFP4 à une protéine de localisation (nucléaire par exemple) qui s'accumule à cet endroit. Ce complexe recrute à cette localisation particulière une protéine P1 étiquetée GFP. Si la protéine P1 interagit avec une seconde protéine P2 marquée avec une autre protéine fluorescente (mRFP par exemple) alors l'interaction peut être immédiatement visualisée en utilisant un microscope à fluorescence. Les auteurs ont validé cette méthode en visualisant l'interaction p53-HDM2 (p53 en P1 et HDM2 en P2) (Herce et al., 2013).

2) Détermination de fonctions protéiques et de partenaires

L'inhibition d'une fonction protéique par un intracorp peut permettre de mieux comprendre le rôle de protéines dans des fonctions cellulaires spécifiques.

Le *knockdown* de récepteur de surface est possible avec l'utilisation d'intracorp fonctionnalisés avec un peptide de rétention au RE (Cf. C.IV.1). L'expression du récepteur de surface neurotrophine p75 a été supprimée au niveau protéique avec un scFv fusionné au peptide KDEL. Le *knockdown* de cette protéine réduit l'expression de l'ARNm d'un facteur pro-apoptotique : Bcl-xL dans des cellules PC12, et inhibe également le prolongement de neurites induit par un traitement au NGF (Zhang et al., 2012).

Southwell *et al.* ont utilisé des Ic afin de montrer le mécanisme de protéolyse du mutant de l'exon 1 de l'huntingtine (mHDx-1). Un scFv, spécifique de la région riche en proline de mHDx-1, réduit le niveau de mHDx-1 soluble en augmentant sa dégradation. Cette protéolyse est inhibée en présence d'inhibiteur de calpaïne, suggérant que la mHDx-1 est clivée par la calpaïne. Enfin, le site de clivage de la calpaïne sur la mHDx-1 a été confirmé par l'utilisation d'un autre intracorp bloquant ce site (Southwell et al., 2011).

Les anticorps intracellulaires peuvent également inhiber l'activité de leur cible en se fixant sur des épitopes (ou proche d'épitopes) qui permettent l'interaction de la cible avec ses partenaires, empêchant par exemple la bonne localisation de la cible.

La contribution de la fascine et la cortactine pendant la formation d'invadopodium a été élucidée par l'utilisation de deux intracorp bloquant (au format VHH) dirigés contre chacune de ces protéines (Van Audenhove et al., 2014). L'anti-fascine se lie sur le site de liaison de l'actine sur la fascine. En perturbant l'assemblage fascine/F-actine, cet intracorp a permis de souligner l'importance de la

stabilité des fibres d'actine dans l'organisation des invadopodia, dans la dégradation de la matrice et dans l'invasion des cellules cancéreuses. L'anti-cortactine se fixe sur le domaine SH3 de la cortactine et diminue de ce fait le recrutement à la membrane plasmique de cette protéine et d'un de ses partenaires : WIP. Cet intracorp montre que ce domaine SH3 est important dans la formation d'invadopodes bien organisés, dans la sécrétion de MMP9, dans la dégradation de la matrice et dans l'invasion des cellules cancéreuses (Van Audenhove et al., 2014).

Une autre étude a montré la fonction de la *phospho-tyrosine-signal transducer and activator of transcription 3* (pYSTAT3) avec un intracorp sélectif de cette protéine. L'expression de l'intracorp par adénovirus dans des cellules HepG2 et dans des foies de souris bloque l'accumulation nucléaire de pYSTAT3 et la production de protéines de la phase aigüe de l'inflammation induit par l'interleukine 6 (IL-6) (Koo et al., 2014). Cet outil démontre ainsi le potentiel des intracorps pour disséquer les fonctions cellulaires de protéines modifiées post-traductionnellement existant en espèces multiples.

Haque *et al.* ont généré un scFv stabilisant la forme oxydée (forme inactive) de la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B-OX). La PTP1B est un régulateur négatif des récepteurs tyrosine kinase de l'insuline et joue donc un rôle important dans la dérégulation de la signalisation de l'insuline. La stabilisation de la forme oxydée par l'anticorp entraîne une inhibition de la fonction phosphatase de cette enzyme. Cette inhibition engendre une augmentation de phosphorylation de la tyrosine de la sous-unité β du récepteur de l'insuline et de son substrat IRS-1, phosphorylation maintenue dans le temps après stimulation de cellules HEK297T avec de l'insuline. Ces phosphorylations entraînent en aval une activation de la voie PI3K et la stimulation d'effecteurs. De cette façon, un traitement à l'insuline conjugué à une expression du scFv dans ces mêmes cellules induit une augmentation de la phosphorylation de la kinase AKT sur sa thréonine 308 (Haque et al., 2011).

Des dysfonctionnements de la signalisation de l'insuline conduisent à la résistance à l'insuline, ce qui est associé *in fine* à des syndromes métaboliques dont le diabète de type 2 et l'obésité. Ces travaux valident la stabilisation de la conformation inactive de cette phosphatase comme stratégie potentielle thérapeutique (Haque et al., 2011).

D'autres intracorps ont permis de démontrer le potentiel thérapeutique de ces fragments dans diverses applications.

3) Potentiel thérapeutique des intracorps

a) Application en cancérologie

Tanaka *et al.* ont développé des intracorps ayant un effet anti-tumoral *in vivo*. Différentes lignées cellulaires tumorales murines et humaines ont été infectées par un vecteur rétroviral exprimant un I_c anti-HRas bloquant, au format VH. Ces cellules ont été injectées dans des souris *nude* et la taille des tumeurs formées et la formation de métastases pulmonaires ont été observées. Par conséquent, l'anticorps inhibe le développement de tumeurs et de métastases pulmonaires chez la souris (Tanaka *et al.*, 2007). De la même façon, un intracorps bloquant anti-LMO2 inhibe la néoplasie de cellules T - issues d'un modèle transgénique de souris *Lck-Lmo2* de thymome - dans un essai de transplantation en souris *nude* (Tanaka *et al.*, 2011). De nombreux autres intracorps ont été développés et sont résumés dans une revue (Perez-Martinez *et al.*, 2010).

b) Application aux maladies neurodégénératives

L'agrégation anormale de protéines et des inclusions dans le noyau de neurones affectés sont une marque de désordre sévère du système nerveux central. La maladie de Huntington est associée à une répétition étendue de CAG localisée dans l'exon 1 du gène codant l'hungtintine (mHTT). La répétition CAG est traduite en séquence polyglutamine conférant une morphologie fibrillaire à cette protéine quand cette séquence dépasse les 37 glutamines (**figure 18**). La maladie de Parkinson est associée à la formation de corps de Lewy, une inclusion de protéines composée principalement d' α -synucléine (Zhou *et al.*, 2010b). Des intracorps ont été sélectionnés pour cibler les protéines liées à la maladie d'Huntington (scFv anti-htt) (Colby *et al.*, 2004a; Southwell *et al.*, 2008) et de Parkinson (scFv anti- α -synucléine) (Emadi *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2004). Ainsi l'anti-htt Happ1, ciblant la région riche en proline entre deux répétitions de prolines en aval de la région polyQ, prévient l'agrégation et la toxicité de mHTT *in cellulo* (Southwell *et al.*, 2008) et *in vivo* (Southwell *et al.*, 2009). Le scFv D5, anti- α -synucléine, diminue la toxicité et l'agrégation de l' α -synucléine (Emadi *et al.*, 2007).



Figure 18 : Domaine du mHTT ciblé par le Happ1. Une région polyQ précède deux régions polyP séparées par une région riche en P (P : proline, Q : glutamine). (Messer and Joshi, 2013)

Enfin des intracops ciblant l'oligomère A β (OA β) impliqué dans la maladie d'Alzheimer ont été sélectionnés. En fusionnant un scFv au domaine d'adressage au RE, Meli *et al.* ont montré que l'OA β intracellulaire est une cible clé pour le traitement de cette maladie et que l'interférence sélective avec un scFv-KDEL pourrait être une stratégie de ciblage potentielle (Meli et al., 2014).

Les intracops se sont révélés être de potentiels agents thérapeutiques dans de nombreuses autres maladies et applications telles que les maladies virales : VIH (Marasco et al., 1993), hépatite B (Serruys et al., 2009), hépatite C (Heintges et al., 1999), papilloma virus (Doorbar and Griffin, 2007), ... ou encore les transplantations d'organes (Mhashilkar et al., 2002). Tous ces aspects thérapeutiques sont résumés par Marasco and Sui (Marasco and Sui, 2007).

En conclusion les intracops pourraient être utilisés pour de l'immunisation intracellulaire mais l'administration, vectorisation ou encore parfois dénommée profection intracellulaire de protéine reste un challenge à relever. Aussi garderons-nous le terme générique anglais de *delivery* (ou administration en français).

c) *Les voies de delivery des intracops*

Classiquement, il existe deux voies principales pour le *delivery* d'intracops : *via* des vecteurs d'expression d'acides nucléiques codant l'anticops ou directement au format de protéine (**figure 19**).

- Les vecteurs d'expression de l'intracops peuvent être envoyés aux cellules par des vecteurs viraux tels que les adénovirus, les *adeno-associated virus* (AAV) ou encore les lentivirus et rétrovirus. Ces deux derniers présentent l'avantage de permettre une expression de l'anticops à longue durée mais le désavantage d'intégrer la cassette d'expression dans le génome hôte avec une possibilité de créer des mutations délétères telles que l'activation d'oncogènes. L'utilisation d'adénovirus ou d'AAV permet de contrecarrer ce problème d'intégration car l'ADN est relâché sous forme d'épisome mais dans ce cas la durée d'expression est diminuée (Perez-Martinez et al., 2010). Ces différents vecteurs viraux, les rétrovirus (Tanaka et al., 2011; Tanaka et al., 2007), les AAV (Moda et al., 2012; Southwell et al., 2009) ou les adénovirus (Kirschning et al., 2010) ont été utilisés comme vecteurs d'expression d'intracops chez la souris.

Une autre possibilité de *delivery*, non virale, est l'utilisation d'anticorps cargo : le vecteur d'intérêt (cargo) est accroché à la partie C-terminale d'un anticorps (sur le fragment Fc) reconnaissant un antigène de surface des cellules tumorales. Lorsqu'un anticorps lie un récepteur d'internalisation sur la surface de la cellule, le complexe Ac/Récepteur est internalisé dans la cellule avec le cargo. Le cargo sera libéré de l'Ac grâce au changement de pH ou à l'environnement réducteur dans la cellule (Marschall et al., 2014). De cette façon des ARNi ont été envoyés aux cellules (Kumar et al., 2008; Song et al., 2005). Ce succès obtenu pour les ARNi suggère la possibilité de *delivery* de vecteurs d'expression de fragments d'anticorps. Ce mode de *delivery* devrait en principe annuler les effets indésirables de réponses immunitaires et de dégradations enzymatiques tout en augmentant l'efficacité de capture du cargo par les cellules cibles (Zhang and Rabbitts, 2014).

Un mode alternatif de *delivery* consiste en l'utilisation de nanoparticules comme transporteur de cargos. Les liposomes sont une des premières nanoparticules utilisées en médecine, ce sont des vésicules sphériques formées d'une bicouche lipidique dans lesquelles un cargo (vecteur d'expression ou drogue) peut y être stocké. Les immunoliposomes sont des liposomes couplés à des anticorps ou fragments d'anticorps spécifiques d'antigènes de surface (Kirpotin et al., 2012). Ces particules lipidiques ont été développées intensivement ces dernières années. Enfin d'autres nanoparticules ont été développées pour le *delivery* d'acides nucléiques comme les particules d'or ou les polymères (Mirkin et al., 1996; van Vlerken et al., 2007).

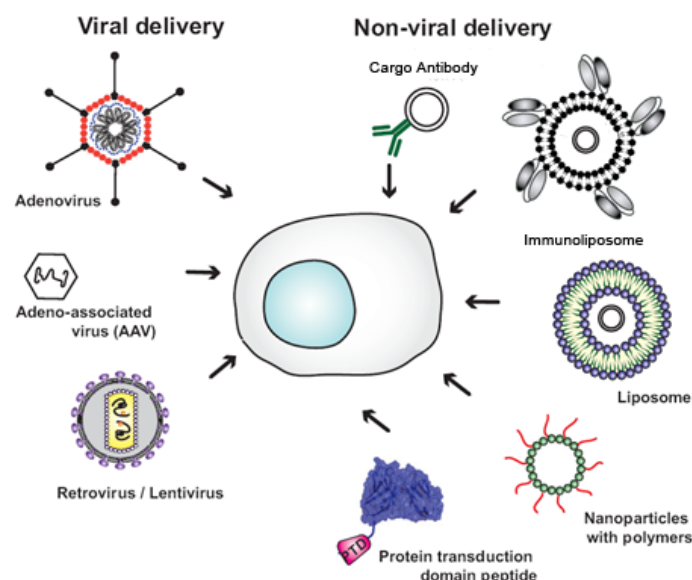


Figure 19 : Options pour le *delivery* d'anticorps intracellulaires aux cellules cibles : *delivery* de vecteur d'expression d'anticorps intracellulaire (virus, anticorps cargo, immuno/liposome et autres nanoparticules) ou *delivery* direct de l'intracorps (*Protein Transduction Domain*, immuno/liposome et nanoparticules). Adapté de (Perez-Martinez et al., 2010)

- Enfin les fragments d'anticorps peuvent être directement délivrés au format de protéine. En général, les nanoparticules peuvent remplir cette fonction (Zhang and Rabbitts, 2014) mais la méthode la plus courante est l'utilisation de peptides pénétrant la membrane plasmique des cellules (*cell penetrating peptides* ou CPP) (Fonseca et al., 2009). Les anticorps peuvent entrer dans la cellule par endocytose. Ainsi des intracorps ont été envoyés dans les cellules en étant en fusion avec le peptide TAT (provenant du HIV-1) (Cohen-Saidon et al., 2003) ou encore avec la penetratine (Avignolo et al., 2008). Cependant la quantité réelle entrée dans la cellule est généralement faible et probablement insuffisante pour avoir un index thérapeutique. En effet, des analyses microscopiques ont révélées une distribution vésiculaire caractéristique des intracorps vectorisés dans le cytoplasme cellulaire indiquant une libération limitée des intracorps des endosomes (Mellert et al., 2012). Un nouveau CPP a été mis au point récemment, un dimère de TAT, et permet un *delivery* très efficace et non toxique pour la cellule. Le *delivery* d'une IgG anti sous-unité α de l'ATP synthase mitochondriale a été réalisé avec succès (Erazo-Oliveras et al., 2014). Toutefois, les fragments d'anticorps seront sensibles à la dégradation sans être produits *de novo* et donc leur faible demi-vie limitera l'utilisation d'un tel *delivery* (Perez-Martinez et al., 2010).

Objectifs de la thèse

Notre équipe s'intéresse à la compréhension des mécanismes de dérégulation des voies de signalisation cellulaire dans la progression tumorale, ainsi que leurs conséquences dans la réponse aux thérapies anti-tumorales. Nous nous intéressons particulièrement aux protéines Rho A, B et C. La GTPase RhoB partage 85% d'identité de séquence avec RhoA et RhoC. A l'état actif, les protéines Rho liées au GTP participent à la régulation de la migration, l'invasion ou la survie cellulaire. Des dérégulations de leur expression et de leur activation sont retrouvées dans de nombreux cancers. A ce jour, aucun inhibiteur spécifique et sélectif de ces GTPases n'a pu être développé afin de bloquer l'activité de l'une ou l'autre de ces Rho. Actuellement, nous avons isolé plusieurs anticorps biosenseurs de la forme active des GTPases Rho (Chinestra et al., 2014; Goffinet et al., 2008), sans toutefois pouvoir les utiliser dans un contexte intracellulaire les rendant instables.

Dans ce contexte, l'objectif initial de ma thèse était de mettre au point une approche innovante permettant d'inhiber l'état activé de la protéine RhoB afin de comprendre si cette activité peut être une nouvelle cible thérapeutique. Cette approche consiste en l'utilisation d'anticorps recombinant exprimée intracellulairement (intracorps). Les objectifs de ma thèse se déclinent en trois parties dont les deux premières ont été nécessaires à la réalisation du dernier objectif de ma thèse.

Le premier objectif consistait en la comparaison des caractéristiques biochimiques d'anticorps issus de sélections par phage display d'une même banque naïve de VHH, un travail effectué en collaboration avec l'équipe du Dr. de Marco. Cette population d'Ac a été comparée afin de connaître la proportion de VHHs solubles dans le cytoplasme bactérien versus VHH ayant une signature de VH (moins solubles). Le but était de déterminer si cette banque était favorable à l'obtention d'intracorps.

Le second objectif de mon travail doctoral a porté sur la validation d'une nouvelle banque synthétique d'anticorps recombinants à simple domaine dont la production avait eu lieu durant la période au cours de laquelle je travaillais sur le premier objectif. J'ai donc participé activement à la validation de cette nouvelle banque sur des cibles génériques (actine, mCherry, FITC, histone H1). Ces travaux ont été menés en collaboration avec l'équipe du Dr. Franck Perez de l'institut Curie dans le but d'utiliser cette banque pour mon projet portant sur l'inhibition sélective de RhoB.

Le dernier objectif de ma thèse a été de mettre au point un criblage innovant afin d'obtenir un intracorps sélectif capable d'inhiber la conformation active de RhoB. Cette approche n'a finalement démarré qu'après validation de la banque synthétique, ce qui s'est avérée être un choix préférable pour initier ce projet. Ce troisième objectif a conduit au développement d'un nouvel outil qui nous a permis d'étudier la fonction de la forme active de RhoB dans un modèle de migration et d'invasion de cellules épithéliales bronchiques où l'implication de la protéine a déjà été montrée (Bousquet, 2009).

Résultats

Article 1 :

Monegal, A., Olichon, A., Bery, N., Filleron, T., Favre, G., and de Marco, A. (2012). **Single domain antibodies with VH hallmarks are positively selected during panning of llama (Lama glama) naive libraries.**

Developmental and comparative immunology 36, 150-156.

En 2010 une nouvelle classe de VHH ayant une signature de VH a été découverte. Les membres de cette classe peuvent être retrouvés chez les Ig conventionnelles et les HCAb (Deschacht et al., 2010). De façon surprenante, tous les *binders* d'une banque naïve de VHH partageaient une signature VH plutôt que les substitutions en acides aminés spécifiques des VHHs (Tanha et al., 2002). Ces résultats étaient surprenant puisque ce type de VHH "*VH like*" représente une faible proportion de la banque. Néanmoins, les résultats ont été interprétés comme la conséquence d'erreurs de PCR lors de la création de la banque (Tanha et al., 2002).

Au laboratoire de même que dans l'équipe d'Ario de Marco, nous disposions chacun d'une banque naïve de VHH (Monegal et al., 2009; Olichon and de Marco, 2012) à partir desquelles nous avons fait différents criblages par phage display et obtenus des anticorps spécifiques. Dans un travail préliminaire, il a été observé que ces Ac sélectionnés après phage display avaient majoritairement une signature *VH like*. Ces observations sont surprenantes car théoriquement ces Ac sont moins stables que les VHHs. Ainsi en collaboration avec l'équipe du Dr. de Marco, nous avons comparé les caractéristiques biochimiques et/ou biophysiques de ces *binders* à des anticorps directement issus de la banque (non criblés par phage display) afin de trouver les explications potentielles de cette sélection positives envers les *VH like*.

Dans ce projet, ma contribution majoritaire portait sur l'identification d'intracops en utilisant le système de résistance au chloramphénicol (ou essai *Chloramphenicol Acetyl Transferase* ou CAT). Cet essai discrimine les Ac très stables et bien exprimés de ceux qui ont tendance à s'agréger dans le cytoplasme bactérien. L'enzyme CAT est liée à la partie C-terminale des VHHs et seules les bactéries exprimant un VHH fonctionnel en fusion avec la CAT (non agrégé, non dégradé) peuvent pousser en présence de haute concentration de chloramphénicol. Nous avons donc montré que les VHs sélectionnés positivement par phage display présentaient en général une solubilité et une thermostabilité plus faible que les VHHs. Ces résultats vont donc dans le sens d'une sélection

négative des VHHs en faveur d'une sélection positive des VHs. L'hypothèse émise est que le système d'export Sec, utilisé pour exporter les Ac post-traductionnellement dans le périplasma bactérien (Cf. annexes), n'est pas adapté à la sélection de VHHs ayant déjà initiés leur repliement tridimensionnel dans le cytoplasme bactérien, c'est-à-dire des VHHs à maturation rapide qui sont généralement les plus stables, voir même très souvent thermostables au point d'être purifiable par la chaleur, et de surcroît de bon intracorps.

Ainsi, à partir de cette banque nous n'avons pas pu obtenir d'intracorps et d'anti-Rho conformationnels lors de cribles précédents. Nous n'avons donc pas la possibilité de répondre à des projets ambitieux et d'atteindre les objectifs de la thèse avec cette banque naïve.

En conclusion, les VHHs les plus thermostables présents dans la banque pouvaient être contre sélectionnés pendant le criblage par phage display à cause d'une plus faible présentation à la surface des phages liée à leur faible niveau de sécrétion périplasmique. Ainsi, des intracorps potentiels pourraient être systématiquement perdus lorsqu'ils sont liés au système de sécrétion Sec. Un système de sécrétion plus favorable aux protéines maturées dans le cytosol, la voie SRP (Cf. annexes), serait au contraire favorable à la sélection d'intracorps mais nécessiterait un sous-clonage de la banque ou la construction d'une nouvelle banque. Une stratégie alternative consistera à produire une banque basée sur un *scaffold* unique afin que la présentation des phages soit plus homogène lors de l'étape de sélection. Cette approche sera une des bases de la conception de la banque présentée dans l'article suivant.



Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dci

Single domain antibodies with VH hallmarks are positively selected during panning of llama (*Lama glama*) naïve libraries

Ana Monegal^a, Aurelien Olichon^{b,c}, Nicolas Bery^{b,c}, Thomas Filleron^c, Gilles Favre^{b,c}, Ario de Marco^{a,d,*}

^a Cogentech – Protein Chemistry Unit, IFOM-IEO Campus, Via Adamello 16, 20139 Milano, Italy

^b Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, UMR 1037, Université de Toulouse, France

^c Institut Claudius Regaud, Département de Biologie, Toulouse, France

^d University of Nova Gorica, Nova Gorica, Slovenia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2011

Revised 24 June 2011

Accepted 26 June 2011

Available online 13 July 2011

Keywords:

Single-domain antibodies

Bacterial secretion

Phage display

ABSTRACT

Independent variable domains with VH hallmarks have been repeatedly identified in immune and pre-immune VHH libraries. In some cases, stable independent VH domains have been also isolated in mouse and human recombinant antibody repertoires. However, we have come to realize that VHs were selected with a higher efficiency than VHHs during biopanning of a pre-immune (VHH) library. The biochemical and biophysical comparison did not indicate a presence of any feature that would favor the VH binders during the selection process. In contrast, selected VHHs seemed to be more stable than the VHs, ruling out the existence of a thermodynamically – favored VH sub-class. Therefore, we reasoned that a certain degree of thermodynamic instability may be beneficial for both displaying and expression of VH(H)s when the Sec-pathway is used for their secretion to avoid the cytoplasmic trapping of fast-folding polypeptides. Indeed, VHHs, but not VHs, were accumulated at higher concentrations when expressed fused to the dsbA leader peptide, a sequence that drives the linked polypeptides to the co-translational SRP secretion machinery. These data suggest that the thermodynamically favored VHHs can be lost during biopanning, as previously observed for DARPins and in contrast to the recombinant antibodies in scFv format.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The complexity of the *Camelidae* antibody sequences has been thoroughly investigated at both gene and cDNA level (Nguyen et al., 1999; Harmsen et al., 2000; Conrath et al., 2003; Deschacht et al., 2010). A common feature of the camelid species is the co-presence of conventional IgG1 antibodies and of single heavy chain IgG2 and IgG3 antibodies (Hamers-Casterman et al., 1993; Vu et al., 1997; Nguyen et al., 1998; van der Linden et al., 2000). The heavy chains of IgG2 and IgG3 (HCABs) do not possess the CH1 region that is removed by a splicing event during mRNA maturation (Nguyen et al., 1999; Woolven et al., 1999). Such mutation prevents both the retention in the endoplasmic reticulum of the heavy chain and its pairing to the light chain. Consequently, the secreted mature antibodies are homodimers formed by the two

Abbreviations: CD, circular dichroism; DLS, dynamic light scattering; HCABs, heavy-chain antibodies; V(H)Hs, variable regions of HCABs; CAT, chloramphenicol acetyl transferase.

* Corresponding author. Address: University of Nova Gorica (UNG), Vipavska 13, P.O. Box 301-SI-5000, Rožna Dolina, Nova Gorica, Slovenia. Tel.: +39 3493542056.

E-mail address: ario.demarco@ung.si (A.de Marco).

0145-305X/\$ - see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.dci.2011.06.016

incomplete heavy chains. The HCAB variable regions (VHHs) present specific amino acid mutations of those hydrophobic residues that in conventional heavy chain variable regions (VHs) interact with light-chain residues. The analysis of VHH crystals confirmed the crucial role of some CDR and framework residues in stabilizing the domain structure, as well as the role of covalent bonds between extra cysteines in CDR3 and in CDR1 or framework 2 that are not usually present in conventional VHs (Desmyter et al., 2002).

The presence of specific amino acid signatures (Lefranc, 2005) has been used to recognize the corresponding VHH sequences in the germlines (Nguyen et al., 1999; Harmsen et al., 2000) and to classify VHHs randomly identified by PCR inside the HCAB repertoire (CH1-deleted immunoglobulin mRNA fraction) into classes with homogeneous features. The representation has been recently enlarged by the discovery of a novel variable domain class with VH signature the member of which can be arranged to both conventional and HCABs (Deschacht et al., 2010). Furthermore, a minority (5–10%) of variable single domains that seem to originate from VH germline genes have been repeatedly identified together with canonical VHHs in immune libraries (Saerens et al., 2004; Harmsen and De Haard, 2007). These unexpected sequences could result

from rearrangement of classical VH domains to IgG2 or IgG3 constant regions (Conrath et al., 2003), but were otherwise interpreted as the result of errors during PCR or PCR product recovery.

However, stable and functional VH domains originating from conventional IgG1 of different species have been identified and exploited for biotechnological applications in the past (Cai and Garen, 1996; Jespers et al., 2004; To et al., 2005; Tanaka et al., 2007; Barthelemy et al., 2008; Chen et al., 2008; Szent-Gyorgyi et al., 2008; de Marco, 2011). Surprisingly, all the binders selected from the first available VHH naïve library shared VH hallmarks rather than VHH specific aminoacid substitutions (Tanha et al., 2002). The results were intriguing since single domain antibodies with VH sequences represent only a minimal part of the whole library. Nevertheless, the data were interpreted as the consequence of errors accumulated during the library generation and no biophysical characterization of the binders was undertaken. Recently, we set a protocol for the production of large llama VHH naïve libraries (Monegal et al., 2009) in which the clones with VH signature were rare, according to the analysis performed on randomly selected and sequenced antibodies. However, a preliminary comparison indicated an unexpectedly high ratio between canonical VHs and VHHs among effective binders selected by biopanning against antigens. The observation was puzzling since the theoretically less stable structure of antibodies with VH hallmarks seemed to be privileged during panning. Therefore, we analyzed some biochemical features of VH and VHH antibodies looking for differences that would explain the reason(s) of the apparent positive selection of VHs over VHHs.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of the expression vectors

The pHEN7, a periplasmic expression vector with the SRP leader peptide, has been created by cloning the sequence corresponding to the *dsbA* leader peptide (SRP pathway) into the vector pHEN6 digested *HindIII-NcoI* to eliminate the original sequence corresponding to the leader peptide *pelB* (Sec-pathway). The insert has been obtained by pairing two phosphorylated and heat-denatured oligonucleotides designed for reproducing the digested-like ends corresponding to *HindIII* and *NcoI*. The primers were: fw-5'AGCTTGCATGCAAATCTATTCAAGGAGACAGTCATAATGAAAAAGATCTGGCTGCGTGGCTGTTAGCGTTTAGCGCATCGGC3'; rev-5'CATGGCCGATGCGCTAAACGCTA AACTAAACCAGCCAGCGCCAGCCAGATCTTTTCATTATGACTGTCTCCTT GAAATAGAATTTGCATGCA3'. The oligonucleotides were mixed, denatured by 3 min incubation at 90 °C in a thermocycler, and their pairing was obtained by cooling down the reaction mixture to room temperature. The resulting insert was finally ligated and the mix plated on ampicillin plates.

The pAO-CAT is a cytoplasmic expression vector that enables to fuse a carboxy-terminal HA-tagged chloramphenicol acetyl transferase (CAT) to the VHH sequences. It has been constructed by cloning a VHH-CAT sequence into the pAOD-Tub1-mGFP vector (Olichon and Surrey, 2008) digested *XbaI* and *KpnI* to remove the DsbC-Tub1-mGFP. The VHH-CAT sequence has been obtained by a multi-step PCR strategy. The VHH was amplified using 5'CCTGATTCTAGAA ATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGCTGATGTCAGCTGCA GGCCT3' (Fw) and 5'CCACCGCTACCGCCGCTGCGCCGCTGAGGAG ACGGTGACCTGGG3' (Rev). Two sequences of CAT were amplified independently using the pRil plasmid as a template to remove an internal *NcoI* site. For the N-term, the following primers were used: 5'GCGGCCGACG GCGCGTAGCGGTGGCGAGAAAAAATCACTGGATATAC C3' (Fw) and 5'GC CCATCGTAAAACGGGGCG3' (Rev). The C-term was amplified

using: 5'CG CCCCCGTTTTCACGATGGGC3' (Fw) and 5'AGAATAGGTACCAGCGTAATCT GGGACATCATAAGGGTAGCCACCCGCCGCCCTGCACTCATCG3' (Rev). The three sequences were assembled with a final PCR and the product was digested *XbaI* and *KpnI* before being ligated into the vector.

2.2. VHH sequence analysis

The DNA corresponding to the VH(H)s was sequenced in house and the resulting data were analyzed using the programs DNAMAN and Protparam (Gasteiger et al., 2005).

2.3. Chloramphenicol resistance assay

Randomly selected VHHs from naïve library were subcloned into pAOCAT using the *NcoI* and *NotI* restriction sites. Chloramphenicol resistance assay was performed using BL21(DE3) cells transformed with the pAOCAT-VHH fusion constructs. Bacteria were used for inoculating 500 µL of LB containing kanamycin (35 µg/mL) and glucose (0.2%), and were grown at 37 °C until OD₆₀₀ was 0.8. The cytoplasmic expression of the VHH-CAT-fusion proteins was induced for 2 h by the addition of 0.2 mM IPTG. At the end of the induction period, bacteria aliquots of 4 µL were plated on LB-agar plates containing IPTG (0.1 mM) and increasing chloramphenicol concentrations. Bacteria were incubated at 30 °C for 20 h before quantification of the colony formation. The resistance level was evaluated according to the colony growth rate at the different chloramphenicol concentrations.

2.4. Expression and purification of antibody domain variable regions

The VHH sequences either randomly chosen from the naïve library (Monegal et al., 2009) or corresponding to binders selected after biopanning were subcloned into the pHEN6 plasmid and expressed in XL1Blue bacteria. Small-scale screening was performed as previously described (de Marco, 2007), with the exception that bacteria were grown and induced at 28 °C. For large scale production, bacteria were grown in Terrific Broth supplemented with 0.1% glucose, 0.1 mg/mL ampicillin, 0.01 mg/mL tetracycline and the recombinant expression was induced with 1 mM IPTG when the culture reached the OD_{600nm} of 0.6. The bacteria were grown further 16 h at 28 °C, harvested, and the periplasmic proteins extracted by osmotic shock before being purified by affinity chromatography on a HiTrap HP chelating column using an ÄKTA FPLC Explorer (GE Healthcare).

Protein purity was evaluated by staining SDS gels with colloidal blue (Instant Blue) and the protein concentration was estimated according to the absorbance of the purified samples measured at 280 nm and applying the corresponding extinction coefficients.

2.5. Biophysical analyses

Circular dichroism (CD) spectra were recorded at 22 °C with a Jasco J-810 spectropolarimeter (Jasco) coupled to a Pelletier system for temperature control and using suprasil precision cuvettes (Hellma). The VHH melting temperature was calculated recording the signal at a fix wavelength (208–210 nm) while increasing the temperature stepwise from 20 to 100 °C. Antibody monodispersity was estimated by gel filtration using a Superdex 75 5/150 GL and a ÄKTA FPLC (GE Healthcare) (Sala and de Marco, 2010), and by dynamic light scattering (DLS) measurements performed at room temperature using a DynaPro 99 (Protein Solutions) instrument. The data were analyzed by means of the Dynamics 5.20.05 software (Protein Solutions).

2.6. Statistical analysis

Quantitative variables were summarized by groups, using median, minimum, and maximum values and the comparisons between groups were performed using the Man–Whitney test. All reported *p*-values were two-sided and differences were considered statistically significant at the 5% level. Statistical analyses were performed using STATA 11.0 software.

3. Results

3.1. Apparent positive selection of binders with VH hallmarks

The framework sequences of heavy chain variable regions from conventional IgG1 (VHs) and from *Camelidae* (VHHs) differ by a few residues that are specifically mutated and are involved in the domain structural stabilization. Such residues are considered salient for classification and discrimination between VHs and VHHs (Suppl. Table 1). We first identified the percentage of single-domain antibodies with VH signature in both the naïve library and among the binders selected after panning.

The sequences of 212V domains randomly chosen from the naïve library indicated a low (11, corresponding to 5%) presence of antibodies with VH hallmarks (Fig. 1 top), in agreement with previous reports (Vu et al., 1997; Harmsen et al., 2000; Tanha et al., 2002). In contrast, we noticed an unexpected fourfold higher amount (33 over 155) of single domains with complete or partial VH hallmarks among the antibodies selected following panning against antigens (Fig. 1 top). The presence of VHs among the effective binders seemed to be antigen-specific since they represented 50% of the binders selected against the kinesin XCTK2, 30% for the cell receptors FGFR1 and CD20, whereas no VH was present among the binders specific for GST, JMJD6 or myosin (Fig. 1 bottom).

There was no statistical difference between the CDR3 length of naïve VHs (median 13; Range: [5; 19]) and the length of the VH binders selected after panning (median: 12, range: [6; 17])

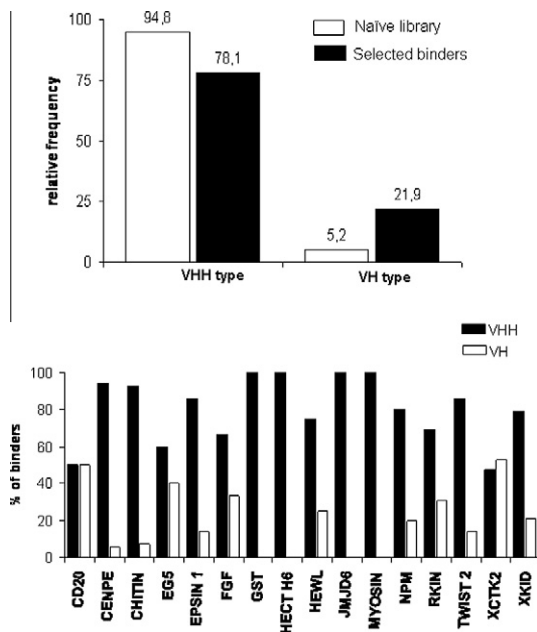


Fig. 1. Distribution of single-domain antibodies with VHH and VH hallmarks in naïve libraries and among selected binders. Antibodies with VH sequences are significantly more represented among effective binders than in the original library (top), but antigen-specific differences are clearly observable among binders selected after panning (bottom).

$p = 0.261$; Fig. 4) (Fig. 2). In the case of the VHHs, 201 clones from the pre-immune library were compared with 122 binders selected after panning. VHH binders had shorter CDR3 ($p < 0.001$) than naïve VHHs. The median length decreased from 18 to 16 residues, mostly because of a binder group with very short CDR3 sequences (9–11 residues). The presence of binders with very short CDR3 and the observed selection of shorter CDR3 during biopanning are not intuitive for single-domain antibodies, since longer CDR3 should compensate for the missing VL contribution to the paratope surface involved in antigen binding. However, we already observed that the VH binders recognizing FGFR1 (Monegal et al., 2009) possessed, in average, affinities similar to those of the VHHs despite their shorter CDR3 regions (Table 1). Therefore, neither CDR3 extension nor affinity can explain the advantage of VHs over VHHs during biopanning and binder recombinant expression.

3.2. The biochemical specificities of the single-domain antibodies

We next compared the biochemical features of antibodies looking for explanations for the positive selection of VHs during panning. The reason could be related to more flexible CDR3 structures with respect to the VHH homologues. CDR3 stabilization by means of non-canonical disulfide bonds has been claimed crucial for the overall structural stability of VHHs (Muyldermans, 2001; Arbabi-Ghahroudi et al., 2009; Doña et al., 2010), whereas less constraints could confer higher flexibility to the VHs and allow for antigen induced fit (Spinelli et al., 1996; Desmyter et al., 2002; Bond et al., 2003). The consequent antigen-dependent increased affinity could be a beneficial factor during the repeated washing steps typical of biopanning and favor VH selection.

The VHs identified in our experiments had always only the two conserved cysteines that link framework 1 to framework 3, in both the pre-immune and the binder groups (Fig. 3B). However, although double disulfide bonds were identified in almost 40% of the naïve VHH antibodies, they almost disappeared among the antigen-specific VHH binders (Fig. 3B). For both single-domain populations the selection is, therefore, in the direction of favoring binders with a single disulfide bond and similar length (Fig. 2), suggesting that the CDR3 characteristics are probably not determinant for conferring a specific advantage to the VHs during the panning procedure.

Both VH and VHH selected binders had predominantly basic *pI* values (median *pI* 9.1 $p = 0.873$) and, in average, they were more

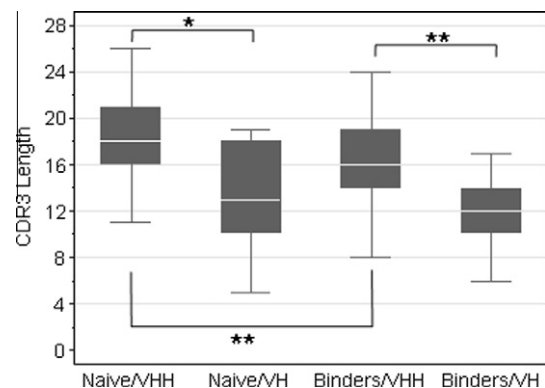


Fig. 2. Analysis of the CDR3 length. The length of the CDR3 of both VHs and VHHs was analyzed sequencing antibodies randomly picked up from the library (left) and binders recovered after panning against antigens (right). A box plot was used for comparing the CDR3 length between groups. The white bar indicates the median, the box shows the interquartile range (25–75%), and the whiskers extend to 1.5 times the interquartile range. Comparisons between groups were performed using the Man–Whitney test. ***p*-Value < 0.001 and **p*-value contained in the interval [0.001–0.05].

Table 1

Biophysical features of VH and VHH binders. The mono-polydispersity and the apparent molecular mass of the purified antibodies at the concentration of 1 mg/mL were measured by dynamic light scattering in PBS buffer, pH 7.3. The affinity data have been measured using a Biacore 2000 (Monegal et al., 2009).

Clones	Distribution – peak mass (kDa)	Affinity (nM)
C8 (VH)	Polydispersed (15–30)	9
H1 (VH)	Polydispersed (15–30)	53
D6 (VH)	Polydispersed (15–30)	336
A11 (VHH)	Monodispersed (15)	41
E1 (VHH)	Monodispersed (15)	138
A7 (VHH)	Monodispersed (15)	156

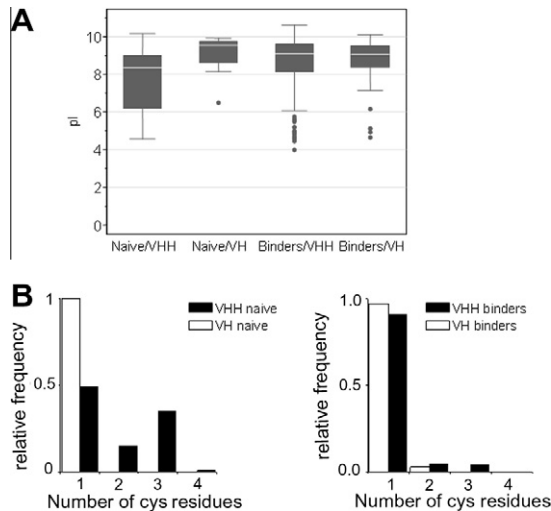


Fig. 3. Single-domain antibody biochemical features. (A) VH and VHH sequences either randomly picked up from the library or corresponding to selected binders were used for calculating the pI values of the antibodies. Data are represented as box plots: horizontal boundaries of the box represent the 25th and 75th percentile. The 50th percentile (median) is indicated by a horizontal white line in the box, upper and lower whiskers extend to the most extreme data point which is no more than 1.5 times the interquartile range from the box. Comparisons between groups were performed using the Man-Whitney test. **p-Value < 0.001 and *p-value contained in the interval [0.001–0.05]. (B) The number of cysteine residues was identified in VH and VHH sequences either randomly picked up from the library (right) or corresponding to selected binders (left).

basic than the VHHs selected from naïve samples (median pI 8.4), whereas naïve VHs were already strongly charged (median pI 9.6) (Fig. 3A). This result is in agreement with recent data concerning the new camelid VH(4) class (Deschacht et al., 2010) and in contrast with past reports concerning both VH and VHH single-domains (Jespers et al., 2004; Arbabi-Ghahroudi et al., 2009), but in both cases it seems that the pI value does not explain the reasons of the VH success during panning process.

The thermal stability and the capacity of refolding after denaturation are factors used for selecting structurally stable VHs (Jespers et al., 2004). The positive VH selection during panning could be, therefore, related to a class of highly thermo-resistant VHs. The melting temperature and the aggregation level of some purified selected VH and VHH binders were consequently analyzed (Table 1). VHs clearly possess lower melting temperatures than selected VHHs and, in contrast to these, did not refold correctly once denatured (Fig. 4), similarly to what previously reported for human V(H)3 domains (Ewert et al., 2002). Furthermore, the DLS analysis indicated that VHHs were exclusively monomeric, whereas a small population of species with masses corresponding to dimers has been identified in the VH samples (Table 1). These data indicating the propensity of VHs to polymerize have been confirmed by analytical gel filtration (data not shown).

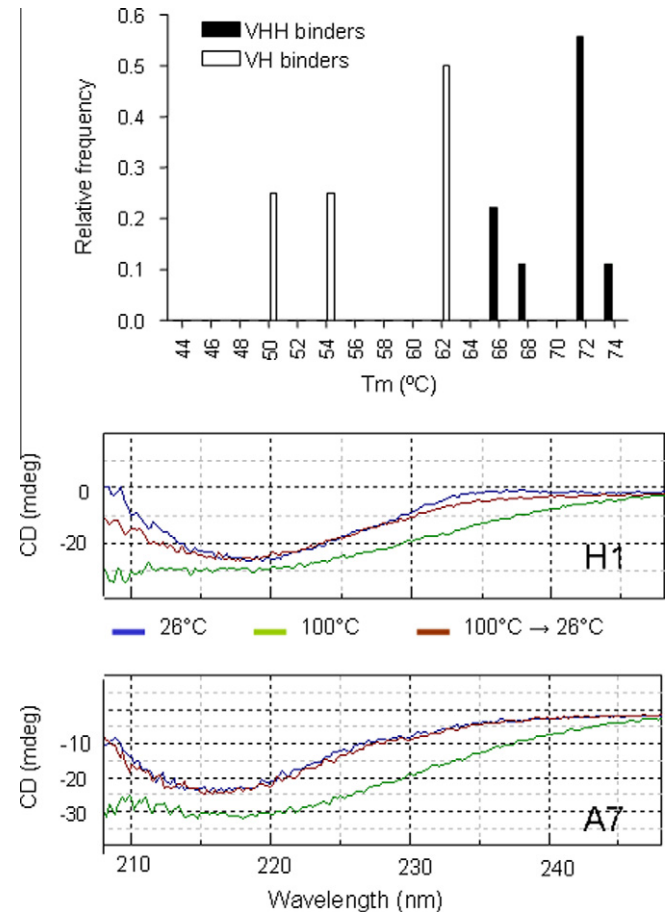


Fig. 4. Melting temperature of selected binders. The melting temperature of VH and VHH antibodies selected after panning was calculated analyzing the loss of secondary structure by CD (top). The spectra of a VH (H1) and of a VHH (A7) were compared before and after heat denaturation.

All together, our experiments confirm that, among the binders selected after panning, VHHs are more thermodynamically stable than VHs and seem to rule out the fact that the VHs possess biochemical characteristics sufficient to confer them an advantage over VHHs. Since the opposite appears being the rule (Fig. 4), panning should select against the VHs present in the naïve library and not, as observed, be favorable to them.

3.3. Effect of the thermodynamic stability on the single-domain selection

For explaining the puzzling contradiction existing between biophysical/biochemical data and the experimentally observed VH fitness, we considered the hypothesis that the difference in VH/VHH ratio observed in the library and among the selected binders was related to the antibody thermodynamic stability and secretion efficiency. In our preliminary experiments (data not shown) we noticed that both VHHs and VH binders selected after panning were sufficiently expressed using pHEN6 (mg protein/L culture medium), although VHs accumulated at higher concentrations (Monegal et al., 2009, Table 2). By contrast, most of the single-domain antibodies randomly recovered from the naïve library produced very low amounts of protein (10–100 µg/L), independently from their pI and the number of disulfide bonds. Therefore, efficient secretion may be a crucial requisite for selecting effective binders. Since VHHs display a higher thermodynamic stability than VHs (Ewert et al., 2002), we evaluated whether they could preferen-

Table 2

Effect of Sec and SRP leader peptides on the yields of single domain antibodies with VHH and VH hallmarks. The sequences corresponding to recombinant antibodies recovered from the naïve library after panning against different antigens were sub-cloned in expression vectors that used the *pelB* (pHEN6) and the *dsbA* (pHEN7) leader peptides, respectively, for secreting the binders into the periplasmic space. The yields obtained using the two systems are the average of three independent purifications.

Binders	Sequence pattern	Expression yields ($\mu\text{g}/\text{mL}$ culture)	
		pHEN6 (Sec-LP)	pHEN7 (SRP-LP)
Hect 3F6	VHH	1.0 \pm 0.2	2.1 \pm 0.3
Myosin 2A2	VHH	1.2 \pm 0.2	2.9 \pm 0.2
FGFR1 A11	VHH	1.1 \pm 0.1	3.1 \pm 0.2
FGFR1 E1	VHH	0.9 \pm 0.2	3.3 \pm 0.4
GST 5A	VHH	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.3
GST 1B	VHH	1.1 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1
Hewl Lz5b	VH	1.8 \pm 0.1	1.8 \pm 0.3
FGFR1 H1	VH	2.4 \pm 0.2	2.3 \pm 0.4
FGFR1 D6	VH	1.9 \pm 0.3	1.8 \pm 0.2

tially commence their folding in the cytoplasm before being secreted. In a first attempt to test this hypothesis, we compared the expression and stability of VH and VHH expressed in the cytoplasm using a CAT-fusion as a carboxy-terminal folding reporter (Maxwell et al., 1999). The enzymatic moiety of the fusion constructs can fold correctly and confer antibiotic resistance to the host bacteria only when the N-term antibody is correctly folded and, consequently, the occurrence of bacterial growth allows for the screening of single-domain antibodies with intrabody features. The method has been used successfully in the past for screening intrabodies (Rothbauer et al., 2008; Olichon et al., 2007) and applied to randomly selected VHs and VHHs from the naïve library showed that whereas most of the VHs enabled the bacteria to grow up to chloramphenicol concentrations of 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the VHHs are more heterogeneously distributed with a median of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, but with a relevant sub-population resistant to concentrations of 250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Fig. 5). These data indicate a significant difference both within the VHH population and between VHHs and VHs. In particular, some VHHs are significantly more thermodynamically favored than VHs in the cytoplasmic reducing milieu.

The antibodies described in this paper were displayed using the pHEN4 phagemid and expressed using the pHEN6 plasmid. Both vectors use the *pelB* leader peptide, a Sec-dependent leader sequence. However, recently it has been reported that high thermodynamic stability can negatively interfere with protein secretion since it favors partial cytoplasmic folding and the resulting structural intermediates are not anymore secretion-competent for the Sec machinery (Steiner et al., 2006). As a consequence, whereas

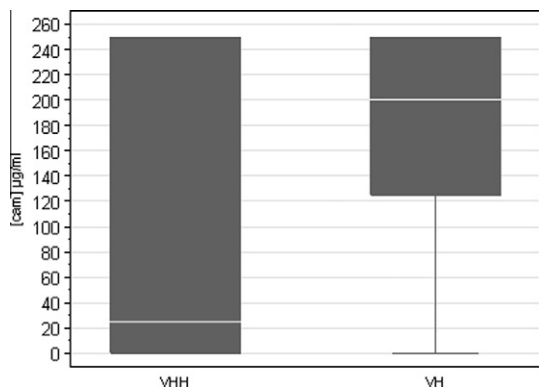


Fig. 5. Identification of intrabodies by means of the chloramphenicol resistance assay. The graph shows the threshold of colony growth at various chloramphenicol dilutions for *E. coli* expressing VHH and VH from the naïve library expressed as a CAT fusion in cytoplasm.

thermodynamically disadvantaged proteins are exported efficiently, fast folding proteins could be counter-selected since they are trapped in the cytoplasm and cannot complete their folding in the periplasm (Steiner et al., 2006; Velappan et al., 2010). For these proteins, translation and secretion should be simultaneous and, as a result, their yield should be increased when expressed as fusions with SRP leader sequences. Sub-cloning the complete naïve library in a SRP-based phagemid is technically difficult to accomplish since several clones may be lost during the procedure, the diversity significantly reduced and, accordingly, the comparison made difficult. Therefore, we envisaged another approach for testing the idea that a SRP leader peptide could modify the secretion efficiency of both VHs and VHHs. We expressed selected binders as recombinant antibodies fused to either the *pelB* leader sequence of pHEN6 (Sec system) or the *dsbA* leader peptide of pHEN7 (SRP system), a specifically designed vector. The results reported in Table 2 show that at least some VHHs accumulated at higher levels when secreted using the SRP machinery, whereas no remarkable difference was observed when VHs were used. This result constitutes a proof-of-principle that the SRP-dependent secretion can specifically increase the VHH export and folding, indirectly indicating that this antibody class can be negatively selected in comparison to VHs when a Sec-dependent system is used. It was not possible to identify cytoplasmic accumulation of VHHs, independently of the expression plasmid used for the experiment (data not shown). This observation suggests that trapped VHHs are quickly degraded instead of precipitating into aggregates.

4. Discussion

The existence of structurally stable and functional VH single-domains deriving from conventional IgGs has been reported on several occasions (Kastelic et al., 2009; Deschacht et al., 2010; Zou et al., 2007; Thanongsaksrikul et al., 2010; de Marco, 2011). However, what we have observed is not just a simple presence of soluble single domain antibodies in large non-immune collections or a possibility to recover some functional VHs from one-pot libraries, but their specific enrichment within the binders selected following panning against specific antigens. Thus, our data indicate a selective advantage of VHs during panning and not a random presence of rare sequences in the initial pool.

A similar VH enrichment among the selected binders has been previously reported, but not thoroughly investigated (Tanha et al., 2002). Conventional VHs usually have a low structural stability when expressed in the absence of their light-chain counterpart and the biophysical characterization of the VHs selected as efficient binders in our trials confirms that they are thermodynamically disadvantaged in comparison to selected VHH binders. Therefore, in case some VHs were randomly inserted to the VHH library during its preparation, they would have a lower chance of being active and positively selected during panning. In other terms, the presence of VHs among binders selected by panning would constitute a highly improbable event.

It can be speculated that somatic hypermutation is more crucial for VHH than for VH maturation. In comparison to VHs, VHHs share an exclusive hypermutation of CDR1 and a mechanism allowing for higher frequency of insertion and deletion of nucleotides that would contribute to the expansion of the primary repertoire (Nguyen et al., 2000; Conrath et al., 2003). Significant adaptation events during antibody *in vivo* maturation have been reported as necessary to overcome the severe limitations of the VHH-H3 loop structural (De Genst et al., 2005) and somatic mutations in VHH-structurally related IgNAR single domains introduce charged residues that have been proposed increasing the molecule stability (Stanfield et al., 2007). In view of this observation, the non-ma-

tured VHHs from a pre-immune library would be outnumbered during panning by VH binders possessing more variable antibody structures. Therefore, VHs could become over-represented because of the VHH negative selection.

Although some VHHs could be lost because of their limited adaptability to the antigen paratopes, one should also consider the possibility that during the panning procedure, the selection may be influenced more by the antibody folding efficiency and optimal display than by its affinity for the antigen. The displaying efficiency of slow-folding scFvs depended on their overall expression rate rather than on the adopted secretion route, but the export of the thermodynamically-favored DARPins was improved significantly for both phage display and periplasmic protein accumulation when the SRP co-translational secretion was chosen instead of the Sec post-translational route (Thie et al., 2008; Scott et al., 2008). In the case of single-domain antibodies, Sec-dependent periplasmic export seems to be efficient for VHs, but detrimental for at least some VHHs (Table 2) and we argue that the phage display effectiveness of the two single-domain classes can be differently influenced. Since VHHs are thermodynamically more favored than VHs (Fig. 4), they could undergo partial folding in the cytoplasm when not exported co-translationally. Consequently, the Sec pathway would impair their optimal display and result in a bias during panning, similarly to what happens with the DARPins (Steiner et al., 2006). By contrast, the slow folding VHs would prevent them from being trapped in the cytoplasm after being expressed, even in the case of Sec-dependent secretion, similarly to what has been reported for scFvs (Thie et al., 2008). Independently of the secretion route, the complete folding and functional display of VHHs with two disulfide bonds could be also difficult to reach, leading to their observed counter selection.

Summarizing, our data seem to indicate a double negative selection of VHHs during panning and not a positive selection of VHs. The presence of low-affinity antibodies in a pre-immune library is expected and their loss has no practical consequences. On the contrary, the take-home message of our analyses is that also the thermodynamically most promising VHHs present in a library may be counter-selected during biopanning because of their rapid folding before secretion. For instance, potential intrabodies could be systematically lost when bound to the Sec-pathway. Therefore, the choice of the leader peptide should be carefully evaluated when phagemids are designed for the preparation of both naïve and immune VHH libraries.

Acknowledgments

This work was supported by Grants provided by the Associazione Italiana Ricerca sul Cancro, the Deutsche Forschungsgemeinschaft, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), and the Institut Claudius Regaud. We further acknowledge L. Ferdou and A. Gurszka for critical advice.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.dci.2011.06.016.

References

Arbabi-Ghahroudi, M., To, R., Gaudette, N., Hirama, T., Ding, W., MacKenzie, R., Tanha, J., 2009. Aggregation-resistant VHs selected by *in vitro* evolution tend to have disulfide-bonded loops and acidic isoelectric points. *Protein Eng. Des. Sel.* 22, 59–66.

Barthelemy, P.A., Raab, H., Appleton, B.A., Bond, C.J., Wu, P., Wiesmann, C., Sidhu, S.S., 2008. Comprehensive analysis of the factors contributing to the stability and solubility of autonomous human VH domains. *J. Biol. Chem.* 283, 3639–3654.

Bond, C.J., Marsters, J.C., Sidhu, S.S., 2003. Contribution of CDR3 to VHH domain stability and the design of monobody scaffolds for naïve antibody libraries. *J. Mol. Biol.* 332, 643–655.

Cai, X., Garen, A., 1996. A melanoma-specific VH antibody cloned from a fusion phage library of a vaccinated melanoma patient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6280–6285.

Chen, W., Zhu, Z., Feng, Y., Xiao, X., Dimitrov, D.S., 2008. Construction of a large phage-display human antibody domain library with a scaffold based on a newly identified highly soluble, stable heavy chain variable domain. *J. Mol. Biol.* 382, 779–789.

Conrath, K.E., Wernery, U., Muyldermans, S., Nguyen, V.K., 2003. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in *Camelidae*. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 87–103.

De Genst, E., Silence, K., Decanniere, K., Conrath, K., Loris, R., Kinne, J., Muyldermans, S., Wyns, L., 2005. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 4586–4591.

de Marco, A., 2007. Protocol for preparing proteins with improved solubility by co-expression with molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Nat. Protoc.* 2, 2632–2639.

de Marco, A., 2011. Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments. *Microbial Cell Factories* 10, 44.

Deschacht, N., De Groeve, K., Vincke, C., Raes, G., De Baetselier, P., Muyldermans, S., 2010. A novel promiscuous class of camelid single-domain antibody contributes to the antigen-binding repertoire. *J. Immunol.* 184, 5696–5704.

Desmyter, A., Spinelli, S., Payan, F., Lauwereys, M., Wyns, L., Muyldermans, S., Cambillau, C., 2002. Three camelid VHH domains in complex with porcine pancreatic α -amylase. *J. Biol. Chem.* 277, 23645–23650.

Doña, V., Urrutia, M., Bayardo, M., Alzogaray, V., Goldbaum, F.A., Chirido, F.G., 2010. Single domain antibodies are specially suited for quantitative determination of gliadins under denaturing conditions. *J. Agric. Food Chem.* 58, 918–926.

Ewert, S., Cambillau, C., Conrath, K., Plückthun, A., 2002. Biophysical properties of camelid V(HH) domains compared to those of human V(H)3 domains. *Biochemistry* 41, 3628–3636.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A., 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the Expasy Server. In: Walker, J.M. (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, New York, NY, pp. 571–607.

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

Harmsen, M.M., De Haard, H.J., 2007. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 13–22.

Harmsen, M.M., Ruuls, R.C., Nijman, I.J., Niewold, T.A., Frenken, L.G.J., de Geus, B., 2000. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol. Immunol.* 37, 579–590.

Jespers, L., Schon, O., James, L.C., Veprintsev, D., Winter, G., 2004. Crystal structure of HEL4, a soluble, refoldable human VH single domain with germ-line scaffold. *J. Mol. Biol.* 337, 893–903.

Kastelic, D., Frković-Grazio, S., Baty, D., Truan, G., Komel, R., Pompon, D., 2009. A single-step procedure of recombinant library construction for the selection of efficiently produced llama VH binders directed against cancer markers. *J. Immunol. Methods* 350, 54–62.

Lefranc, M.-P., 2005. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system(R): a standardized approach for immunogenetics and immunoinformatics. *Immunome Res.* 1, 3.

Maxwell, K.L., Mittermaier, A.K., Forman-Kay, J.D., Davidson, A.R., 1999. A simple *in vivo* assay for increased protein solubility. *Protein Sci.* 8, 1908–1911.

Monegal, A., Ami, D., Martinelli, C., Huang, H., Aliprandi, M., Capasso, P., Francavilla, C., Ossolengo, G., de Marco, A., 2009. Immunological applications of single domain llama recombinant antibodies isolated from a naïve library. *Protein Eng. Des. Sel.* 22, 273–280.

Muyldermans, S., 2001. Single domain camelid antibodies: current status. *J. Biotechnol.* 74, 277–302.

Nguyen, V.K., Muyldermans, S., Hamers, R., 1998. The specific variable domain of camel heavy-chain antibodies is encoded in the germline. *J. Mol. Biol.* 275, 413–418.

Nguyen, V.K., Hamers, R., Wyns, L., Muyldermans, S., 1999. Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire CH1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Mol. Immunol.* 36, 515–524.

Nguyen, V.K., Hamers, R., Wyns, L., Muyldermans, S., 2000. Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V_HH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J.* 19, 921–930.

Olichon, A., Surrey, T., 2008. Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 282, 36314–36320.

Olichon, A., Schweizer, D., Muyldermans, S., de Marco, A., 2007. Heating represents a rapid purification method for recovering correctly folded thermo tolerant VH and VHH domains. *BMC Biotechnol.* 7, 7.

Rothbauer, U., Zolghadr, K., Muyldermans, S., Schepers, A., Cardoso, M.C., Leonhardt, H., 2008. A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 282–289.

Saerens, D., Kinne, J., Bosmans, E., Wernery, U., Muyldermans, S., Conrath, K., 2004. Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen. *J. Biol. Chem.* 279, 51965–51972.

- Sala, E., de Marco, A., 2010. Screening optimized protein purification protocols by coupling small-scale expression and mini-size exclusion chromatography. *Protein Expression Purif.* 74, 231–235.
- Scott, N., Reynolds, C.B., Wright, M.J., Qazi, O., Fairweather, N., Deonarain, M.P., 2008. Single-chain Fv phage display propensity exhibits strong positive correlation with overall expression levels. *BMC Biotechnol.* 8, 97.
- Spinelli, S., Frenken, L., Bourgeois, D., de Ron, L., Bos, W., Verrips, T., Anguille, C., Cambillau, C., Tegoni, M., 1996. The crystal structure of a llama heavy chain variable domain. *Nat. Struct. Biol.* 3, 752–757.
- Stanfield, R.L., Dooley, H., Verdino, P., Flajnik, M.F., Wilson, I.A., 2007. Maturation of shark single-domain (IgNAR) antibodies: evidence for induced-fit binding. *J. Mol. Biol.* 367, 358–372.
- Steiner, D., Forrer, P., Stumpp, M.T., Plückthun, A., 2006. Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display. *Nat. Biotechnol.* 24, 823–831.
- Szent-Gyorgyi, C., Schmidt, B.A., Creeger, Y., Fisher, G.W., Zakel, K.L., Adler, S., Fitzpatrick, J.A., Woolford, C.A., Yan, Q., Vasilev, K.V., Berget, P.B., Bruchez, M.P., Jarvik, J.W., Waggoner, A., 2008. Fluorogen-activating single-chain antibodies for imaging cell surface proteins. *Nat. Biotechnol.* 26, 235–240.
- Tanaka, T., Williams, R.L., Rabbitts, T.H., 2007. Tumour prevention by a single antibody domain targeting the interaction of signal transduction proteins with RAS. *EMBO J.* 26, 3250–3259.
- Tanha, J., Dubue, G., Hiram, T., Narang, S.A., MacKenzie, C.R., 2002. Selection by phage display of llama conventional V_H fragments with heavy chain antibody V_HH properties. *J. Immunol. Methods* 263, 97–109.
- Thanongsakrikul, J., Srimanote, P., Maneewatch, S., Choowongkamon, K., Tapchaisri, P., Makino, S., et al., 2010. A VHH that neutralizes the zinc metalloproteinase activity of botulinum neurotoxin type A. *J. Biol. Chem.* 285, 9657–9666.
- Thie, H., Schirrmann, T., Paschke, M., Dübel, S., Hust, M., 2008. SRP and Sec pathway leader peptides for antibody phage display and antibody fragment production in *E. Coli*. *New Biotechnol.* 25, 49–54.
- To, R., Hiram, T., Arbabi-Ghahroudi, M., MacKenzie, R., Wang, P., Xu, P., Ni, F., Tanha, J., 2005. Isolation of monomeric human VHS by a phage selection. *J. Biol. Chem.* 280, 41395–41403.
- van der Linden, R., de Geus, B., Stok, W., Bos, W., van Wassenaar, D., Verrips, T., Frenken, L., 2000. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of *Lama glama*. *J. Immunol. Methods* 240, 185–195.
- Velappan, N., Fisher, H.E., Pesavento, E., Chasteen, L., D'Angelo, S., Kiss, C., Longmire, M., Pavlik, P., Bradbury, A.R., 2010. A comprehensive analysis of filamentous phage display vectors for cytoplasmic proteins: an analysis with different fluorescent proteins. *Nucleic Acids Res.* 38, e22.
- Vu, K.B., Ghahroudi, M.A., Wyns, L., Muyldermans, S., 1997. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol. Immunol.* 34, 1121–1131.
- Woolven, B.P., Frenken, L.G.J., van der Logt, P., Nicholls, P.J., 1999. The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation. *Immunogenetics* 50, 98–101.
- Zou, X., Osborn, M.J., Bolland, D.J., Smith, J.A., Corcos, D., Hamon, M., Oxley, D., Hutchings, A., Morgan, G., Santos, F., Kilshaw, P.J., Taussig, M.J., Corcoran, A.E., Brüggeman, M., 2007. Heavy chain-only antibodies are spontaneously produced in light chain-deficient mice. *J. Exp. Med.* 204, 3271–3283.

Article 2 :

Sandrine Moutel^{1,2,3§}, Nicolas Bery^{4,5§}, Virginie Bernard¹, Ario De Marco¹, Laura Keller^{4,5,6}, Jean-Christophe Rain⁷, Gilles Favre^{4,5,6}, Aurélien Olichon^{4,5*} and Franck Perez^{1,2*}. **NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies.**

§ : These authors contributed equally to this work

Nous disposions au laboratoire de la banque naïve décrite dans l'article précédent. Connaissant les limites de cette banque sur la possibilité d'obtention d'intracorps et sachant que nous souhaitions isoler des intracorps sélectifs de chaque Rho, notre laboratoire a engagé en collaboration avec l'équipe du Dr. Frank Perez (Institut Curie, Paris), la production d'une nouvelle banque d'anticorps synthétiques à simple domaine (NaLi pour Nanobody Library) optimisée pour l'obtention d'anticorps intracellulaires.

La première étape, après avoir construit une telle banque, est de s'assurer qu'elle présente bien une grande diversité d'anticorps fonctionnels utilisables dans divers tests immunoanalytiques. Cette validation repose sur la sélection d'anticorps par phage display contre des antigènes d'origines variées afin de mesurer la diversité des anticorps obtenus et de montrer leur fonctionnalité. Afin de partager cette étape de validation entre les deux équipes impliquées, nous avons choisi tout d'abord un certain nombre de cibles génériques avant de cribler les cibles favorites de nos thématiques de recherche respectives. Mon travail dans ce projet impliquait la sélection d'anticorps par phage display sur des cibles génériques (β -actine, FITC, histone H1 et mCherry), la caractérisation des anticorps monoclonaux dans différents essais immunologiques (ELISA, IF, WB) et l'expression intracellulaire (intracorps). Bien que ces cribles initiaux aient été importants pour la mise au point des conditions de criblage par phage display de la banque, certains auront essentiellement servi à optimiser les cribles suivant. Aussi les résultats des toutes premières sélections (FITC et histone H1) n'auront pas conduit à une poursuite de la caractérisation des anticorps et ne figureront pas dans la version finale de l'article.

En résumé, j'ai pu obtenir 16 clones anti-actine fonctionnant en ELISA et WB, 7 en IF et un potentiel intracorps mais qui était difficile à imager à cause certainement de l'actine libre présente dans le cytoplasme. J'ai sélectionné un unique anti-FITC qui reconnaît en ELISA le FITC couplé sur différentes protéines. Néanmoins, nous n'avons pas investigué son potentiel en intracorps car nous avons jugé

complexe la mise en œuvre d'un modèle présentant du FITC à l'intérieur de la cellule avec un signal localement concentré pour visualiser une co-localisation. Enfin pour les antigènes histone H1 et mCherry, nous avons obtenu de nombreux clones en ELISA (respectivement 3 et 25), mais aucun intracorps. Or, afin de comparer les protocoles de sélection entre les deux laboratoires de la collaboration, une sélection mCherry en condition native a été réalisée par le groupe de F. Perez et a permis l'obtention de 2 intracorps, ce qui nous a conduit à stopper la caractérisation de nos anti-mCherry.

Par ailleurs, j'ai identifié et caractérisé le fait que les rendements à l'issue des premiers tours de sélections étaient tellement élevés que nous avons fréquemment eu des événements d'infection multiples. La conséquence étant la production de particules encapsidant un phagème mais n'exprimant pas forcément le hs2dAb correspondant à sa surface, et conduisant ainsi à un biais dans la sélection. Nous avons identifié de tels clones car le séquençage donnait une séquence correcte uniquement dans les FRWs et non définie dans les CDR. J'ai rapidement mis en place une adaptation des protocoles standards de phage display afin d'obtenir des événements d'infection unique en augmentant la multiplicité de bactéries par rapports aux phages lors de cette étape de récupération par infection.

La majeure partie de mon travail a consisté à établir les outils moléculaires et les conditions de réalisation d'un *knockdown* protéique. Cette approche repose sur la fonctionnalisation des intracorps anti-GFP avec un domaine Fbox d'une E3 ubiquitine ligase dans le but d'induire la dégradation de la cible de l'intracorps.

Ainsi, au cours de ce projet nous avons montré qu'il était possible d'obtenir des anticorps contre diverses cibles (p53, GFP, mCherry, β -actine, FITC, Her2, Rho-GTP...) fonctionnant dans différentes applications telles que l'ELISA, l'immunofluorescence et l'expression intracellulaire et ayant une affinité de l'ordre de la dizaine de nanomolaire. De plus, cette banque nous a permis d'isoler des anticorps à partir d'une sélection directe sur un antigène de surface cellulaire (Her2) mais aussi d'isoler un anticorps conformationnel (pan Rho-GTP). Cet anticorps pan-Rho a été isolé lors de plusieurs sélections au laboratoire, à la fois dans mon projet ciblant RhoB et dans celui d'une autre étudiante ciblant RhoA. Les résultats de la figure de caractérisation de ce clone correspondent à ses travaux sur RhoA. Toutefois, des résultats tout à fait similaires ont été obtenus sur RhoB, mais nous n'avons pas souhaité les montrer dans cette version de l'article afin de préserver l'aspect original de nos résultats pour l'article suivant ciblant exclusivement RhoB.

En revanche, nous avons souhaité intégrer mes expériences pilotes de fonctionnalisation d'intracorps avec la Fbox dans la validation de la banque. En effet, nous avons pu fonctionnaliser des intracorps

anti-GFP à une Fbox et dégrader de cette façon une fusion H2B-GFP dans une lignée cellulaire. Cette technique pourrait être étendue à d'autres Ag afin d'induire leur dégradation spécifique. Cette collaboration m'a permis d'apprendre dans le laboratoire de Franck Perez certaines techniques propres à l'utilisation des anticorps recombinants en immunofluorescence, et donc de travailler quelques jours sur le site de l'institut Curie.

En résumé nous avons construit une nouvelle banque d'anticorps à simple domaine basée sur un *scaffold* optimisé pour une stabilité et thermostabilité accrues des anticorps. La banque créée a une diversité fonctionnelle importante (4.10^9 clones) et a été criblée afin d'identifier des Ac fonctionnels contre divers Ag. Nous pensons que cette banque universelle pourra servir pour la génération d'anticorps pour des applications en recherche fondamentale et biomédicale. L'innovation portant sur la sélection et l'optimisation du *scaffold*, son humanisation en vue de la conception d'une banque universelle a fait l'objet d'une demande de dépôt de brevet partagée entre l'Inserm transfert et l'institut Curie. Depuis plusieurs projets d'exploitation commerciale sont en cours de développement.

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

AUTHORS:

Sandrine Moutel^{1,2,3§}, Nicolas Bery^{4,5§}, Virginie Bernard¹, Ario De Marco¹, Laura Keller^{4,5,6}, Jean-Christophe Rain⁷, Gilles Favre^{4,5,6}, Aurélien Olichon^{4,5*} and Franck Perez^{1,2*}.

Author information:

¹ Institut Curie, Research Center, 26, rue d'Ulm, F_75248, Paris, France

² CNRS UMR144, 26, rue d'Ulm, Paris, France.

³ Translational Research Department, Institut Curie, 26, rue d'Ulm, F_75248, Paris, France

⁴ Inserm, UMR 1037-CRCT, F-31200 Toulouse, France

⁵ Université Toulouse III-Paul Sabatier, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, F-31062 Toulouse, France

⁶ Institut Claudius Regaud, F-31200 Toulouse, France

⁷ Hybrigenics Service SA, 3-5 impasse Reille, F-75014 Paris - France

§ These authors contributed equally to this work

* To whom correspondence may be addressed. E-mail: Franck.Perez@curie.fr or aurelien.olichon@inserm.fr

Running title: *Synthetic library of functional intrabodies*

ABSTRACT

***In vitro* selection of antibodies represent the most promising approach to obtain highly functional antibodies, rapidly and at lower cost. Here we describe the first fully synthetic phage display library of humanized llama recombinant single domain antibody that can provide high affinity binders and functional intrabodies. It is based on a humanized synthetic single domain antibody (hs2dAb) scaffold optimized for intracellular stability and contains 3.10^9 independent hs2dAb. We challenged the NaLi-H1 (Nanobody Library humanized 1) using several selection schemes against several generic targets (Fluorescent proteins, actin, tubulin), p53 as well as highly selective conformational epitopes such as active Rho. Selected hs2dAb were often usable as fluorescent intrabodies. Functionalization of anti-GFP intrabodies allowed very efficient GFP tagged protein knockdown. In addition, direct selection against the surface of tumor cells produced hs2dAb directed against tumor-specific antigens further highlighting the potential use of this library for therapeutic applications.**

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

The smallest IgG portion capable of binding with high specificity an antigen (Ag) is the Fv fragment consisting of the variable heavy (VH) and the variable light (VL) domains. In the case of single domain antibodies (sdAb), a VH or a VL alone is able to bind its target Ag. Each variable domain contains four conserved framework regions (FRW or framework) and three regions called CDR (Complementarity Determining Regions) corresponding to hypervariable sequences which determine the specificity for the Ag. VH and VL can be fused together using a synthetic linker and produced as a single protein in the form of a single chain Fv (scFv). Easier to manipulate, they can be produced in several bacteria or eukaryote cell types, fused to various tag or functional domains. Interestingly, antibodies called HCAb in *Camelidae*¹ or IgNAR in sharks² have an Ag recognition part composed of only a VH domains. Camelid natural single domain VH, referred as VHH or nanobodies, can be expressed as recombinant fragments and represent attractive alternatives over classical antibody fragments like scFvs because they are easy to manipulate and they are not limited by potential misfolding of the two domains³. It is noteworthy that VHH FRWs show a high sequence and structural homology with human VH domains of family III¹⁵ and VHH have comparable immunogenicity as human VH. Thus, they further constitute very interesting agents for therapeutic applications, some of them are currently in phase II clinical trials (Ablynx Nanobodies®; <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ablynx>).

Recombinant Ab fragments allowed not only to accelerate the identification of unique binders, but also the development of a novel type of tool : in this case, the antibodies are directly expressed in living cells as intracellular antibodies (intrabodies), to trace or inhibit endogenous antigen at the protein level.

Some scFv or sdAb have also been directly expressed into eukaryotic cell as intrabodies to target with high specificity intracellular antigens. Several intrabodies have been used as fluorescent protein fusion to highlight endogenous antigen in cells in a spatio-temporal manner^{6,7}. Intrabodies with intrinsic blocking activity have been reported^{8,9}, and several other approaches have been developed to allow a larger fraction of intrabodies to be used as inhibitory factors: forced colocalization¹⁰, suicide through proteasome targeting^{11,12}, rerouting or sequestration to cell compartment¹³, degradation¹⁴. Depending on the target, such inhibitors may have potential in human therapy. Production of functional intrabodies depend on the stability of the antibody fragments in the reducing environment of the cytosol that does not allow disulfide bond formation between conserved cysteine. In this context, many advantages of the nanobody scaffold have been reported and, in particular, higher solubility , improved stability in a reducing environment⁴, as well as higher expression yield and thermostability⁵. For all these reasons, the nanobody scaffold represents an attractive option to generate functional intrabodies.

Thus, we decided to create a non-immune recombinant antibody library of high diversity, based on a nanobody scaffold that would enable efficient *in vitro* antibody selection against virtually any antigen. Such a library should provide antibodies usable in conventional immune assays and be enriched in antibodies active in the intracellular environment. First, using a fusion assay in *E. coli*, we isolated a family of highly functional VHH scaffolds, optimized for intracellular expression and high thermostability. One particularly stable VHH scaffold consensus scaffold sequence was chosen from these selected antibodies. Additional changes were then introduced to reduce the distance between the *Camelidae* sequence and human VH3 sequences. We confirmed by CDR grafting that this humanized synthetic scaffold (hs2dAb) was robust and functional. Statistics of amino-acid diversity in the CDRs were computed and these information were used to construct a high diversity phage display library of 3.10^9 independent hs2dAb. The library was then screened against diverse targets of various structure and origin. Highly specific antibodies were selected against EGFP, mCherry, β -tubulin, β -actin, GTP-bound Rho, p53 and Her2. Affinity measurement indicated that affinities in the nM range can be obtained using this library. As expected from our design, we further showed that hs2dAb are frequently usable as fluorescent intrabodies to track antigen in cells. We also show that they can be functionalized to induce antigen knockdown. This thus represents the first report of a large and diverse synthetic single domain antibody library enabling fully *in vitro* selection of highly functional antibodies and intrabodies.

RESULTS

Library design

As a first step to construct a single domain antibody library enriched in highly stable and functional antibody fragments, we screened for a robust sdAb scaffold. Previously, we selected from immune or naïve llama VHH libraries several hundreds of clones^{16,17}. From this population, we selected a set of robust scaffold using an assay that discriminates highly stable clones from clones prone to aggregation or unfolding in bacteria cytoplasm¹⁷. This assay is based on the fusion of HA-tagged chloramphenicol acetyl transferase (CAT) to the carboxy-terminus of

VHH sequences (**Fig. 1A**). In these conditions, only bacteria expressing a functional VHH fusion (non aggregating, non degraded) can grow in the presence of high antibiotic concentration. Expression yield, solubility as GFP fusion in mammalian cells cytoplasm was further assessed to select a set of robust Ab scaffold. The most robust VHH framework was represented by clone D10 (hereafter named sdAb^{D10}). When compared to previously reported thermostable nanobodies¹⁸ or intrabodies⁶, sdAb^{D10} was found to provide higher antibiotic resistance in the chloramphenicol filter assay (**Fig. 1A**). Its expression yield in *E.coli* periplasm was in the higher range of VHH fragments, allowing efficient and quantitative purification (**Fig. 1B**). Purified sdAb^{D10} showed excellent solubility, thermostability and we did not observed aggregation when expressed as an intrabody fused to the GFP in mammalian cells (**Fig. 1C**).

To address the question of whether the sdAb^{D10} scaffold composed of the FRW 1 to 4 is robust independently on the CDR sequences, we grafted the CDR loops of the lam1 VHH⁶ directed against laminB into the framework of the sdAb^{D10} (*sdAb^{D10}-anti lamin*). We also tested in parallel if partial humanization of the scaffold affects its intrinsic properties. We designed the synthetic scaffold hs2dAb (*humanized synthetic single domain antibody*) by altering seven residues towards the most represented in human VH3, while keeping unchanged the four VHH-specific amino acids hallmarks in the framework-2 region (positions 42, 49, 50, and 52), which are essential for increased intrinsic solubility properties, and Glutamine in position 103 was also conserved. Grafting the CDR of the anti-lamin into these scaffold we asked whether display on M13 surface, production by *E. coli* and by CHO cells and folding in mammalian cytosol were efficient and whether binding capacity was retained upon grafting. **Fig. 2A** shows that both scaffolds allowed efficient presentation at the surface of M13 phages. Antibody production in culture supernatants from either *E.coli* or mammalian CHO cells were also in the high range and comparable for both scaffolds (**Fig. 2B**). Importantly, both the sdAb^{D10} and hs2dAb scaffold enabled functional display of the grafted CDRs and robust detection of endogenous Lamin was observed by immunofluorescence staining of Hela cells (**Fig. 2C**). Rothbauer et al. showed that the original anti-Lamin VHH was usable as an intrabody after intracellular expression⁶. Similarly, we observed that both the hs2dAb and the sdAb^{D10} scaffolds allowed efficient intrabody use of the synthetic anti-Lamin antibodies (**Fig.2D**). This further indicated that the synthetic scaffolds were robust, non-aggregating and resisted to the reducing conditions found in the cytosol, while allowing proper display of CDR loops. As partial humanization did not affect the properties of the sdAb^{D10} scaffold, we chose the hs2dAb scaffold as a unique framework to construct a diverse library of synthetic nanobodies endowed with the characteristic stability of these single domain antibodies while displaying an amino acid sequence closer to human VH3.

Library construction

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

Synthetic DNA produced by trinucleotide DNA assembly was amplified from $2 \cdot 10^{11}$ different molecules using few cycle of PCR (PCR linearity validated by Q-PCR) to prevent drift during amplification. The synthetic library was

inserted into a modified pHEN2 phagemid vector containing a triple myc-tag and suicide gene (*ccdB*) that allowed positive selection of insert-bearing clones¹⁹. Massive electroporation was carried out using *E. coli* TG1 cells and 430 large agar dishes (140mm) were used to ensure proper plating of the library. $3 \cdot 10^9$ individual recombinant clones were obtained. We named this library NaLi-H1 (for Nanobody Library-Humanized 1 - . We first evaluated the quality of the NaLi-H1 library by sequencing 315 random clones. Only 13 sequences were found to be incorrect (bearing an in-frame stop codon, missing one base, missing a large region (the CDR1 or CDR1-FWR1-CDR2), or being empty). A total of 4,1% of default was observed which is rather low and only marginal in comparison to the $3 \cdot 10^9$ clones obtained. The diversity was then evaluated by sequencing $5.6 \cdot 10^5$ inserts using ion Torrent chips (Life Technologies). This confirmed the quality of the library and showed that the four CDR3 lengths (9, 12, 15 or and 18 amino acids) were present in similar proportions. The diversity and statistical distribution of amino acids in the CDRs were found as expected (**Supplementary Fig. 1**).

Library screening and validation

The NaLi-H1 library was screened against a set of various antigens. Several standard phage display methods²⁰ were used : antigen adsorption on immunotube, native antigen captured on beads, direct selection at the cell surface.

As a first screen to evaluate the quality of the library, we chose to select binders specific for the GFP and mCherry fluorescent proteins. NaLi-H1 phages were panned against biotinylated GFP or mCherry and 3 rounds of selection were carried out. Eighty clones were analyzed, in each screening strategies. From the panning against EGFP, 37 non redundant nanobodies were shown to detect EGFP by phage ELISA. These antibodies were then used for immunofluorescence and 10 of them were found to efficiently stain EGFP in fixed HeLa cells (EGFP-Rab6) (**Fig3A**). Similarly, selection against mCherry led to 6 positive binders (**Fig3B**).

We then screened for hs2dAb binding to Tubulin and β -Actin, two highly and constitutively expressed component of cell cytoskeleton. Antibodies against Tubulin were selected in native condition⁷ using commercial biotinylated tubulin (Cytoskeleton). After two rounds of selection, 3 out of 40 clones analyzed were shown to detect endogenous tubulin by immunofluorescence (**Fig. 3C**). Among phage display methods, selection on antigens directly adsorbed on the surface of immunotube is often used for its cheap cost and ease of use, despite the low capacity and the strong denaturation imposed by non-specific adsorption. A screen against coated β -Actin led to the identification of 16 unique binders positive in phage ELISA. Seven of these antibodies were decorating endogenous actin stress fibers by immunofluorescence in MRC5 cells (**Fig3D**) as well as other cell lines.

Actin and Tubulin are strongly expressed cellular proteins. Another screen was thus performed to select for binders directed against a protein expressed at a lower level, the tumor suppressor p53 protein. The 83 first amino acids of the NP_000537.3 isoform were produced in bacteria fused to a SNAP Tag, biotinylated *in vitro* and used as a target in the phage display selection. Among 12 clones positive in phage ELISA, 6 selected hs2dAb were shown to label endogenous p53 in immunofluorescence on A431 cells (**Fig. 3E**). Specificity of the staining was confirmed by the absence of signal on p53^{-/-} cells (data not shown). Together these results showed that the NaLi-H1 synthetic library can be screened in various conditions against very different purified targets while leading to the rapid identification of diverse and specific binders that can be used in classical antibody-based staining methods.

Selection of conformation-sensitive antibodies

One of the main advantages of full *in vitro* immunization using display technologies is the control of antigen conformation and concentration in order to drive selection towards the desired outcome. For example, selection schemes can be devised to improve the recovery of high affinity binders endowed with low off-rate kinetics²¹, to target specific epitopes^{22,23}, or to identify conformation sensitive-binders⁹. Recombinant antibody fragment library screening have for example provided several binders targeting selectively the active conformation of small GTPase^{7,10}. We hypothesized that our synthetic library had enough diversity and functionality to enable the identification of selective conformational binders. We carried out subtractive panning to select conformation-specific antibodies directed against small GTPases from the Rho subfamily²⁴. Small GTPases are molecular switch that cycle between an inactive and an active state when bound to GDP or GTP nucleotides respectively. Mutant of small GTPases can be designed that adopt stably an active or inactive conformation. A constitutively active mutant RhoA_{L63} was expressed in HEK293 as a bait then freshly pulled down for panning to preserve its native conformation. To enrich in phage specific for GTP-bound RhoA, a depletion step was introduced from the second round of panning using GDP-bound RhoA proteins, to remove generic binders before selecting against the active RhoA_{L63} mutant. After four rounds of selection, clones were analyzed using phage ELISA against either RhoA bound to GTP γ S (a non-hydrolysable analogue of GTP)-loaded RhoA or GDP-loaded RhoA. Forty clones presenting a differential ELISA signal in favor of the GTP loaded RhoA have been sequenced. Clone H12 was found to be enriched and represented more than 50% of the population. The clone H12 was further analyzed by ELISA, using in this case the soluble form of the antibody, on several purified Rho proteins expressed as GST fusion in *E.coli*. We showed that the H12 hs2dAb efficiently bound to the constitutively active mutant RhoA_{L63} as well as to wild type RhoA loaded with GTP γ S. In contrast, no binding was observed to the inactive RhoA_{N19} mutant or to GDP-loaded wild type RhoA (**Fig. 4A**). We then tested whether H12 was able to specifically pull-down GTP-loaded RhoA from mammalian cell extracts. A CBD tagged H12 construct expressed in *E. coli* was immobilized on chitin beads and incubated with a HeLa cell extract pre-treated with either GTP γ S or GDP. The Rho binding domain of Rhotekin fused to GST (GST-RBD) was used as a control. This domain is known to bind to the active conformation of Rho GTPase and is the standard method to assay Rho activity up to now²⁵. The H12 hs2dAb was found to be highly selective of Rho loaded with GTP γ S, giving no signal on the GDP loaded extract (**Fig4B**). We next tested whether H12 specifically detected RhoA active conformation in immunofluorescence. HeLa cells expressing the GFP-RhoA_{L63} active mutant or the inactive GFP-RhoA_{N19} were fixed and stained with the H12 hs2dAb. Overexpression of the inactive mutant GFP-RhoA_{N19}, which has no dominant negative effect on RhoA pathway nor on cell shape, did not lead to an increased signal over the background of untransfected cells. In contrast, a strong staining was selectively obtained on cells expressing the GFP-RhoA_{L63} active mutant. Note that these cells display bundled actin stress fibers²⁶, a characteristic phenotype linked to enhanced RhoA activity (**Fig4C**). Altogether these results showed that the H12 hs2dAb is selective for Rho in its active conformation, highlighting the performance and diversity of the NaLi-H1 library.

Direct selection against cell surface antigens.

The use of antibodies to target cells involved in pathologies like cancers or viral infection is one of the most promising approach to treat human diseases. Antibodies also represent a unique tool to identify novel antigenic targets at the cell surface. We thus decided to challenge the NaLi-H1 library and test whether direct selection against the cell surface of breast tumor cells may lead to the rapid, and cost effective, selection of specific

antibodies. We set-up a competitive selection scheme where phages displaying hs2dAbs were first depleted against a reference cell line before being selected against the target one (**Fig. 4D**). As a target cell line we used the SKBR3 line that is known to overexpress the HER2 cell surface protein while the MCF7 cell line, negative for HER2, was used to pre-adsorb the library. After the third round of bio-panning, 10 clones were found positive by FACS on SKBR3 cells and negative on MCF7 cells. We then tested whether specific anti-SKBR3 antibodies were directed against HER2 by phage ELISA using the extracellular domain of the HER2 (**Fig. 4E**). In this assay, we observed that 6 clones out of 10 recognized HER2.

As shown in Figure 4, these antibodies were efficiently detecting HER2 at the cell surface by immunofluorescence (**Fig. 4F**) or by FACS (**Fig. 4G**). These experiments demonstrated that the NaLi-H1 library will represent a unique tool to discover specific antigens present at the surface of pathological cells.

hs2dAbs as intracellular antibodies.

Single chain antibody fragments of various formats have long been proposed to be useful tools while expressed directly in the intracellular environment as intrabodies. Although several studies report the efficient use of intrabodies (reviewed in ²⁷⁻²⁹), this application is limited to antibody scaffolds that resist to the reducing environment of the cytosol. We evaluated the use of the hs2dAb scaffold to develop intrabodies. Randomly chosen hs2dAbs were fused to a fluorescent protein and observed in living cells. In comparison to our previous experience with scFv or nanobody libraries in which a majority of tested antibodies showed aggregation when expressed in the cytosol as a GFP-fusion, most of the hs2dAbs tested here gave a monodispersed fluorescence, and very few were showing aggregates. Monodispersed fluorescence of the GFP has been proposed to be a convenient indicator of stability and potential use as intrabody³⁰. Several hs2dAbs directed against Actin, Tubulin, GFP or p53 were tested to trace intracellular antigens in living cells. Despite their apparent solubility as GFP or mCherry fusion, none or few clones were clearly labelling actin in live or fixed cells. We reasoned that this poor efficiency may be linked to the antigen denaturing conditions used during the selection. In the case of anti-tubulin or anti-actin antibodies, fluorescence was not strong enough to distinguish the fraction bound to the polymerized cytoskeleton from the unbound hs2dAb or the fraction of antibodies may be bound to free, unpolymerized, actin or tubulin. In contrast several anti-GFP and anti-mCherry hs2dAbs were found to efficiently label Rab6-GFP or Myr-Palm-mCherry fusion proteins, respectively, when observed in living cells (**Fig. 5A**). Similarly, p53-targeting hs2dAbs fused to mCherry were clearly accumulated in the nucleus of SKBR3 cells where endogenous p53 is also localized. This signal was enhanced in cells overexpressing p53-GFP (**Fig. 5B**). We also showed that the anti-p53 intrabody was relocated to the Golgi and plasma membrane in cells overexpressing the 83 N-terminal amino acids peptide of p53, used for the selection, fused to a palmitoylation and myristoylation signal. This illustrates the binding specificity of the hs2dAb anti-p53 in the cytosol (data not shown).

Signal to noise ratio is an essential parameter to detect intrabody binding to its target in cells. In the case of anti-Rho antibodies, the amount and concentration of activated Rho proteins were probably not high enough to allow contrasted detection in living cells. However, our results suggest that the H12 antibody was able to perturb endogenous Rho activity when expressed in the cytosol. First, we co-expressed H12-GFP in HeLa cells together with either the RhoA_{N19} inactive mutant or with the RhoA_{L63} constitutively active one and carried out a co-immunoprecipitation experiment using an anti-GFP monoclonal antibody. Active RhoA was co-immunoprecipitated with H12-GFP while inactive RhoA was not (data not shown). This showed that H12 worked as an intrabody and kept its conformation sensitivity in the cytosol. Because Rho GTPases are involved in signaling pathways that

promotes the actin cytoskeleton polymerization we looked at functional effects induced by H12 overexpression. In contrast to untransfected cells or cells transfected with various non-relevant GFP fused hs2dAb, we observed that cells expressing H12-GFP were totally devoid of actin stress fibers (**Fig. 5C**). This alteration in actin filament organization was associated with marked changes in cell shape characteristic of loss of intracellular mechanical forces and tension (**Fig. 5C**). As RhoA plays a major role in activating myosin II and actin cytoskeleton reorganization, our results suggested that H12 efficiently perturbed Rho-dependent signaling, mimicking the effects induced by the C3 exoenzyme Rho inhibitor³¹.

Identification of blocking antibodies is a challenging task. However, it is possible to functionalize non-blocking intrabodies to inhibit their target function. One approach relies on the ubiquitinylation and degradation of the recognized target as described by Caussinus et al. 2011¹⁴. This approach is based on the fusion of intrabodies to an F-box domain which allows interaction with Skip1, a member of the SCF complex, an E3 ubiquitin ligase of the complex E1/E2/E3 ubiquitinylation machinery, that target proteins to proteasome-dependent cellular degradation¹⁴ (**Fig. 6A**). This approach was initially developed to target several GFP fusion proteins in *Drosophila* using a single anti GFP intrabody, named GFP4, which is a robust high affinity GFP llama intrabody originally isolated from an immune library⁶. To get insight into the relative functionality of hs2dAb for such a protein knockdown approach, we fused several of our anti GFP hs2dAb at their amino terminus to the Fbox domain and compared their efficacy with the efficacy of the Fbox-GFP4 antibody. To detect cells expressing Fbox-intrabody fusion proteins (F-Ib), we constructed a bicistronic vector driving the co-expression of F-Ib together with a mitochondria-targeted mCherry (Mito-mCherry) (**Fig. 6B**). We expressed the F-Ib antibodies in a HeLa clone stably expressing GFP fused to histone H2B³² and looked for GFP-H2B depletion. As expected, F-GFP4, also known as degradFP, induced a strong reduction of H2B-GFP expression as analyzed by western blot (**supplementary Fig. 2**). Accordingly, a strong reduction in nuclear fluorescence intensity was observed in cells expressing F-GFP4 (see Mito-mCherry positive cells, **Fig. 6C ; supplementary Fig. 2**). No effect was observed when expressing either GFP4 alone or a GFP4 fused to a truncated, nonfunctional, Fbox domain (**supplementary Fig. 2**). When we tested anti-GFP clones selected from our novel library, we observed that several hs2dAb that were found to be efficient when used as fluorescent intrabodies failed to degrade H2B-GFP when expressed as F-Ib. This highlights the fact that not all intrabodies can efficiently be functionalized with the F-box. However, one hs2dAb anti-GFP induced a complete disappearance of nuclear H2B-GFP signal when expressed as F-Ib (**Fig. 6C**). FACS analysis showed a fluorescence intensity decreased as much as 70% (**Fig. 6D**). As expected, this effect was reversed in the presence of proteasome inhibitor treatment (**Fig. 6E**). Altogether, these experiments show that the hs2dAb scaffold enables the frequent selection of antibodies that can be expressed in the mammalian cell cytoplasm to be used as fluorescent intrabodies or inhibitory intrabodies.

DISCUSSION

Here we report the production of the first large fully synthetic single domain antibodies library based on a humanized scaffold derived from llama VHH. A set of robust nanobody scaffolds was first identified using a positive expression screening *E. coli* cytosol. One very robust scaffold (sdAb^{D10}) was identified and was used as a base. We then introduced several modifications that aimed at humanizing its primary sequence. The novel scaffold we defined (hs2dAb) is as stable as sdAb^{D10} while being now closer to human VH3. Using CDR grafting experiments we confirmed the efficacy and the stability of the synthetic scaffold to display CDR regions. Based on our prior experience on phage display libraries, immune or naïve llama VHH libraries^{16,17} or from scFv

libraries^{7,33,34} we then rationally designed CDR diversity with fixed CDR1 and CDR2 size and four CDR3 sizes (9, 12, 15 or and 18 amino acids). The power of modern gene synthesis approach permits to reach unlimited genetic diversity, with a desired codon bias and cloning features. However fully random codon combination using NNN or NNK trinucleotide cannot prevent stop codon, undesired cysteine or hydrophobic residues to be incorporated, and it does not lead to controlled probability of aminoacid occurrence at a given position. Therefore we chose a more rational design with define set of codon for each CDR amino acid position, which does not mimic natural diversity like it has been described for recent Fab synthetic libraries^{35,36} but is rather optimized for intrinsic hydrophilicity or solubility. After large scale cloning of synthetic fragments, 3.10^9 independent clones were transformed in the bacteria. Library quality was confirmed by large scale sequencing.

We screened the library against various targets and in each case we obtained specific and highly functional antibodies (**supplementary table 1**). Various selection schemes yielded a large diversity of high affinity and high selectivity binders. Selections were carried out using purified antigen coated on polystyrene, on magnetic beads or directly on cell surface. In many cases, two rounds of selection were sufficient to obtained selective binders. We usually only analyzed 80 randomly picked clones because the diversity of specific binders was systemically high. Since most screening were done using natively folded targets, selected antibodies were, in general, not usable for western blotting. In contrast, antibodies that we selected performed very well in conventional immunoassays like ELISA, FACS, immunoprecipitation or immunofluorescence. We measured the affinity of selected antibodies toward their target and obtained values in the range of 10 to 30 nM which is a rather good affinity for monovalent binders obtained without affinity maturation steps (**supplementary Fig. 3; supplementary table 2**). Simple dimerization of the single domain binders was enough to increase by an order of magnitude their apparent affinity.

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

The synthetic scaffold we defined was based on the selection of a set of VHH able to fold properly in the bacteria cytosol. The goal was not only to define a robust scaffold that would be efficiently produced without aggregation but also to allow frequent selection of functional intrabodies. Intrabodies have been isolated from various antibody libraries^{6,7,37,38} as well as other protein scaffold like Darpin³⁹ or FN3⁴⁰ which are devoid of cysteine. A peculiar feature of the NaLi-H1 library is that it is based on a humanized nanobody-like robust scaffold, stable in a reducing environment, while it still contains the two canonical cysteine residues. Despite several nanobodies or human single domain scaffolds^{41,42} or even libraries^{43,44} reporting enhanced stability,

nobody, to our knowledge, developed a synthetic library based on such a scaffold that would generate at high frequency functional intrabodies.

Almost every hs2dAb antibodies we expressed in mammalian cytosol showed very good solubility and only rarely aggregated, which further supported the idea that the synthetic scaffold we designed is robust and highly resistant to reduction. Previous studies showed that functional intrabody identification often relied on additional steps of selection in a protein–protein interaction reporter system such as PCA⁴⁵ or bacterial 2 hybrid⁴⁶, yeast IACT³⁷ or F2H assays⁴⁷. Using the NaLi-H1 library, we observed that without using particular selection schemes, functional intrabodies were frequently obtained. Although we did not formally compare the NaLi-H1 library to previous llama naïve or semi synthetic libraries, the functionality of selected hs2dAb was compared to a sub-nanomolar affinity intrabody, the GFP4 nanobody, which has been extensively used^{14,48}. We observed by monitoring its signal-to-noise ratio and by using it in a protein knockdown assay that NaLi-H1 can provide highly functional hs2dAb which appeared as good as intrabodies from immune libraries.

Intrabodies can be used in several applications like tracking of intracellular dynamics of endogenous proteins^{6,7,49} but the most appealing application is to use them for rapid protein inactivation in living cells. Intrabodies may be used to directly block their target proteins in cells. One of the conformation-sensitive antibody we selected can be used to inhibit active Rho GTPase signaling in living cells and is as potent as the C3 exoenzyme toxin. Only few intrabodies have been described to be intrinsically inhibitors of protein activity^{9,38}, and our result suggest that the NaLi-H1 library may enable rapid selection of inhibitory antibodies. The next challenge will be to select conformational sensors specifically directed against a particular member of closely related Rho subtypes (RhoA, B, C) which share more than 90% homology in primary sequence. But in any case, our results show that the NaLi-H1 library allows the selection of efficient, conformation-specific, inhibitory intrabodies.

Another way intrabodies may be used to inactivate their target in living cells is to fuse the intrabody to a dominant inhibitory domain. Following an idea pioneered by Affolter and colleagues¹⁴, we showed here that intrabodies selected from the NaLi-H1 library can be fused to proteasome-targeting domains to impose the specific degradation of their respective targets. We validated this using anti-GFP antibodies and we believe that this approach will bring disruptive tools to generate rapid protein knock-down both in cell culture and in the animal.

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

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledged the help of the deep sequencing (ICGEx) and the imaging (PICT) platforms of the Institut Curie as well as the technical support of Aurélie Scheider for the selection of anti-HER2, Alexis Arrial for the selection of anti-mCherry and Selma Djender for the Proteon experiments. We thank Anne-Laure Iscache for precious help in FACS experiments. Part of this work was supported by the Groupe de Recherche of the Claudius Regaud Institute (GRICR). FP is supported by the labex CelTisPhyBio 11-LBX-0038, the Institut Curie and the CNRS. Part of this project has been supported by a grant from the ANR BiotecS (ANR-09-BIOT-005 to FP and JCR) and by a grant from the AVIESAN (Project TABIP to FP). AdM was supported by the AVIESAN and NB was supported by the foundation pour la Recherche Medicale (FRM).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.M. carried out most of the experiments leading to the library construction, designed and set up some of the screening approaches, analyzed the data, prepared the figures and wrote the manuscript. N.B designed and set up some of the screening approaches and conducted the protein knockdown experiments, analyzed the data, prepared the corresponding figures and corrected the manuscript. V.B. carried out deep sequencing. J.C.R. helped for the construction of the library and discussed the data. L.K. designed and set up the GTP-Rho experiments. A.dM. executed some biochemical experiments and analyzed the data. G.F. supported the study and corrected the manuscript. A.O. designed and supervised the study, analyzed the data and wrote the manuscript. F.P. designed and supported the study, directed the work, analyzed the data and wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

F.P., S.M. and A.O. are the authors of a patent application that covers the hs2dAb scaffold and the library commercial use.

METHODS

Plasmids and cloning

Artificial gene synthesis (Mister Gene) composed of a 6His-Tag and a triple c-myc Tag was inserted into the pHEN2 phagemid vector (Griffin 1. library) between NotI and BamHI sites. CcdB gene from pENTRTM4 vector (Invitrogen) was inserted into the pHEN2 vector between NcoI and NotI sites. For mammalian expression vectors, VHH were digested by NcoI and NotI and ligated into the plb-mGFP or the pmCherry vectors (Clontech). (**See supplementary methods**).

CAT filter assay

Previously selected VHHs from naïve or immune libraries were subcloned into pAOCAT¹⁶ using the *NcoI* and *NotI* restriction sites. Chloramphenicol resistance assay was performed using BL21(DE3) cells transformed with the pAOCAT-VHH fusion constructs. (**See supplementary methods**).

Library construction

The amino acids residues of the synthetic CDR1 and CDR2 have been determined by the following rules:

at CDR1 position 1: Y, R, S, T, F, G, A, or D;

at CDR1 position 2: Y, S, T, F, G, T, or T;

at CDR1 position 3: Y, S, S, S F, or W;

at CDR1 position 4: Y, R, S, T, F, G, A, W, D, E, K or N;

at CDR1 position 5: S, T, F, G, A, W, D, E, N, I, H, R, Q, or L;

at CDR1 position 6: S, T, Y, D, or E;

at CDR1 position 7: S, T, G, A, D, E, N, I, or V;

at CDR2 position 1: R, S, F, G, A, W, D, E, or Y;

at CDR2 position 2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, R, Q, L or Y;

at CDR2 position 3: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, Q, P;

at CDR2 position 4: G, S, T, N, or D;

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

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

at CDR2 position 7: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, or V;

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

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

PCR protocol consisted of an initial denaturation step at 98°C for 45sec followed by 20 cycles of 98°C for 10sec, 55°C for 30sec and 72°C for 30sec, and a final step extension at 72°C for 10 min. 7X150µL of PCR were purified on 7 columns of a PCR clean-up kit (Macherey-Nagel). 55µg of the resulting purified fragment of PCR and 80µg of the pHEN2-ccdB-3myc phagemid were digested for 2h at 37°C with NcoI and NotI (NEB) in a total volume of 500µL. A dephosphorylation step was added for the phagemid with a Calf intestinal alkaline phosphatase (Sigma) 30min at 37°C. Digestions were purified on gel with respectively 4 and 6 columns of a gel extraction kit (Macherey-Nagel) in a final volume of 80 and 120µL. Then, purified PCR fragment was ligated into pHEN2-ccdB-3myc, between the PelB leader signal and the pIII gene. 50µg of phagemid and 19,2µg of insert were ligated overnight at 16°C with 10µL of high concentration T4 DNA ligase (NEB) in a total volume of 400µL. Ligation was purified on 6 columns (Macherey-Nagel) with a total volume of 150µL. The ligated DNA material was used to transform electrocompetent E. coli TG1 cells (Lucigen). 20 electroporations with 1µl of ligation were performed according to the manufacturer's instructions (1800V ; 10µF ; 600Ω). Each electroporation was resuspended with 1mL of warm 2XYT, 1% glucose medium and incubated with a shaking agitation for 1H at 37°C. 380mL of 2XYT, 1%glucose was added to the suspension and plated on 430 2xYT-ampicillin agar dishes (140mm) overnight at 37°C. Library size was calculated by plating serial dilution aliquots. The colonies were scraped from the plates with liquid 2xTY and library was stored in the presence of 30% of glycerol at -80°C with 1mL aliquots at OD=38,4. 3.10⁹ individual recombinant clones were obtained.

Ion Torrent sequencing

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

Antigens

Human βActin was purchased from Sigma. RhoA GTPase fused to either an amino terminal Chitin Binding Domain or a streptactin binding peptide were produced in HEK293 cells. GFP (as mCherry) in fusion with a streptavidine binding peptide (SBP) were produced through *in vitro* translation system (Roche) and used directly for screening without the need for purification.

Biotinylated Tubulin was purchased from Cytoskeleton. For p53, the 83 first amino acids of the NP_000537.3 isoform were produced in bacteria with a SNAP and His Tag, purified using Talon® resin and biotinylated *in vitro*. For Her2, the natural receptor was used as membrane protein target on SKBR3 cells.

For more details see **Supplementary Methods**.

Phage display selections

Screening for βactin was performed by panning in immunotubes as described⁵⁰. Screening for GFP, Tubulin and p53 were performed in native condition as described⁵¹. Screening for Her2 was performed on surface cells as described⁵². Screening on Rho was performed in native condition. (**Supplementary Methods**)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Individual clones were screened by monoclonal phage ELISA as described. (**Supplementary Methods**).

Western-Blot

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

Immunofluorescence

Immunofluorescence screenings were performed on HeLa cells as described before⁵¹. (**Supplementary Methods**).

Transient transfection

HeLa Cells cultured on coverslips were transfected according to the CaPO₄ or jet prime procedure with 1 µg DNA per well (24 wells plate) or 10 µg DNA (10cm² diameter dish). Cells can be observed from 12 h posttransfection on.

Flow cytometry

For Her2 immunoassay, cell surface stainings were performed in phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 1% SFV. 100µl of supernatant (80µl phages + 20µl PBS/milk1%) were incubated on 1.10^5 cells for 1h on ice. Phage binding was detected by a 1:300 dilution of anti-M13 Ab (GE healthcare) for 1h on ice followed by a 1:1000 dilution of PE-conjugated anti-Mouse Ab (BD pharmingen.) for 45 min. Samples were analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur using CellQuest Pro software (BD Biosciences, San Jose, CA).

In the protein knockdown experiments, 48h after transfection, at least 10000 HeLa S3 cells were analyzed on a MoFlo Astrios flow cytometer for their mCherry intensity of fluorescence to identify transfected cells. Flow cytometry data were analyzed with Kaluza software (Beckman Coulter). 1 µM of proteasome inhibitor MG132 (Sigma) were used in cell growth medium for 48h. Values reported represent median ± standard deviation (SD) of at least three independent experiments. P values were calculated with GraphPad Prism 6 using a Student's t test. **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p< 0.0001.

Affinity measurement

The experiments for calculating the binding affinity of the VHH antibodies selected from the library and specific for GFP and Her2 were performed at 25°C using a ProteOn XPR36 (BioRad) and a Biacore T200 (GE Healthcare), respectively, and fitted with a 1:1 Langmuir interaction model. The ligand GFP (24 kDa) was diluted to 1,6 μM in sodium acetate buffer (pH 5.0) and immobilized by amine-coupling on a GLC chip (BioRad) at 730 RU. 100 μL of monovalent single-domain antibodies (14 kDa) were used as an analyte and injected at 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ at concentrations between 1000 and 3 μM (60 second injection, 600 second dissociation). The complete kinetic set was collected in a single run (one-shot) and, therefore, there was no need for surface regeneration. Her2 ectodomain-Fc (96 kDa) was diluted to 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in sodium acetate buffer (pH 5.0) and immobilized by amine-coupling on a CM5 chip (GE Healthcare) at 991 RU. Monovalent single-domain antibodies (14 kDa) were diluted in HBS-EP+ buffer and injected as analytes at 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ at concentrations between 300 and 3 μM using the single-cycle modality (120 second injection, 120 second intermediate dissociation, 600 second final dissociation). The kinetics were collected in a unique sequence of injections and surface regeneration (10 mM glycine HCl, pH 2.5, for 30 s at 30 $\mu\text{L}/\text{min}$) took place only between two successive series. The binding experiments of the VHHs specific for p53 were performed using the ProteOn at the conditions described above, but the equilibrium model was used for calculation.

References :

1. Hamers-Casterman, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446–448 (1993).
2. Greenberg, A. S. *et al.* A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* **374**, 168–173 (1995).
3. Wörn, A. & Plückthun, A. Different equilibrium stability behavior of ScFv fragments: identification, classification, and improvement by protein engineering. *Biochemistry (Mosc.)* **38**, 8739–8750 (1999).
4. Wesolowski, J. *et al.* Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **198**, 157–174 (2009).
5. Jobling, S. A. *et al.* Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nat. Biotechnol.* **21**, 77–80 (2003).
6. Rothbauer, U. *et al.* Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat. Methods* **3**, 887–889 (2006).
7. Nizak, C. *et al.* Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors. *Science* **300**, 984–987 (2003).
8. Shin, I. *et al.* Proapoptotic activity of cell-permeable anti-Akt single-chain antibodies. *Cancer Res.* **65**, 2815–2824 (2005).
9. Haque, A., Andersen, J. N., Salmeen, A., Barford, D. & Tonks, N. K. Conformation-sensing antibodies stabilize the oxidized form of PTP1B and inhibit its phosphatase activity. *Cell* **147**, 185–198 (2011).
10. Tanaka, T., Williams, R. L. & Rabbitts, T. H. Tumour prevention by a single antibody domain targeting the interaction of signal transduction proteins with RAS. *EMBO J.* **26**, 3250–3259 (2007).
11. Melchionna, T. & Cattaneo, A. A protein silencing switch by ligand-induced proteasome-targeting intrabodies. *J. Mol. Biol.* **374**, 641–654 (2007).
12. Joshi, S. N., Butler, D. C. & Messer, A. Fusion to a highly charged proteasomal retargeting sequence increases soluble cytoplasmic expression and efficacy of diverse anti-synuclein intrabodies. *mAbs* **4**, 686–693 (2012).
13. Böldicke, T., Weber, H., Mueller, P. P., Barleon, B. & Bernal, M. Novel highly efficient intrabody mediates complete inhibition of cell surface expression of the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/KDR). *J. Immunol. Methods* **300**, 146–159 (2005).

14. Caussin, E., Kanca, O. & Affolter, M. Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 117–121 (2011).
15. Muyldermans, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 775–797 (2013).
16. Monegal, A. *et al.* Single domain antibodies with VH hallmarks are positively selected during panning of llama (*Lama glama*) naïve libraries. *Dev. Comp. Immunol.* **36**, 150–156 (2012).
17. Olichon, A. & Surrey, T. Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **282**, 36314–36320 (2007).
18. Olichon, A., Schweizer, D., Muyldermans, S. & de Marco, A. Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains. *BMC Biotechnol.* **7**, 7 (2007).
19. Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E. M. & Couturier, M. Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene* **148**, 71–74 (1994).
20. Hoogenboom, H. R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1105–1116 (2005).
21. Lee, C. M. Y., Iorno, N., Sierro, F. & Christ, D. Selection of human antibody fragments by phage display. *Nat. Protoc.* **2**, 3001–3008 (2007).
22. Vielemeyer, O. *et al.* Direct selection of monoclonal phosphospecific antibodies without prior phosphoamino acid mapping. *J. Biol. Chem.* **284**, 20791–20795 (2009).
23. Even-Desrumeaux, K. *et al.* Masked selection: a straightforward and flexible approach for the selection of binders against specific epitopes and differentially expressed proteins by phage display. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **13**, 653–665 (2014).
24. Chinestra, P., Lajoie-Mazenc, I., Faye, J.-C. & Favre, G. Use of phage display for the identification of molecular sensors specific for activated Rho. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **827**, 283–303 (2012).
25. Ren, X. D., Kiosses, W. B. & Schwartz, M. A. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* **18**, 578–585 (1999).
26. Mayer, T., Meyer, M., Janning, A., Schiedel, A. C. & Barnekow, A. A mutant form of the rho protein can restore stress fibers and adhesion plaques in v-src transformed fibroblasts. *Oncogene* **18**, 2117–2128 (1999).
27. Lobato, M. N. & Rabbitts, T. H. Intracellular antibodies and challenges facing their use as therapeutic agents. *Trends Mol. Med.* **9**, 390–396 (2003).
28. Stocks, M. Intrabodies as drug discovery tools and therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 359–365 (2005).

29. Kaiser, P. D., Maier, J., Traenkle, B., Emele, F. & Rothbauer, U. Recent progress in generating intracellular functional antibody fragments to target and trace cellular components in living cells. *Biochim. Biophys. Acta* (2014). doi:10.1016/j.bbapap.2014.04.019
30. Guglielmi, L. *et al.* Selection for intrabody solubility in mammalian cells using GFP fusions. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* **24**, 873–881 (2011).
31. Ridley, A. J. & Hall, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389–399 (1992).
32. Silljé, H. H. W., Nagel, S., Körner, R. & Nigg, E. A. HURP is a Ran-importin beta-regulated protein that stabilizes kinetochore microtubules in the vicinity of chromosomes. *Curr. Biol. CB* **16**, 731–742 (2006).
33. Dimitrov, A. *et al.* Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science* **322**, 1353–1356 (2008).
34. Goffinet, M. *et al.* Identification of a GTP-bound Rho specific scFv molecular sensor by phage display selection. *BMC Biotechnol.* **8**, 34 (2008).
35. Prassler, J. *et al.* HuCAL PLATINUM, a synthetic Fab library optimized for sequence diversity and superior performance in mammalian expression systems. *J. Mol. Biol.* **413**, 261–278 (2011).
36. Zhai, W. *et al.* Synthetic antibodies designed on natural sequence landscapes. *J. Mol. Biol.* **412**, 55–71 (2011).
37. Tanaka, T. & Rabbitts, T. H. Protocol for the selection of single-domain antibody fragments by third generation intracellular antibody capture. *Nat. Protoc.* **5**, 67–92 (2010).
38. Vercruyse, T., Pardon, E., Vanstreels, E., Steyaert, J. & Daelemans, D. An intrabody based on a llama single-domain antibody targeting the N-terminal alpha-helical multimerization domain of HIV-1 rev prevents viral production. *J. Biol. Chem.* **285**, 21768–21780 (2010).
39. Tamaskovic, R., Simon, M., Stefan, N., Schwill, M. & Plückthun, A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPin) from research to therapy. *Methods Enzymol.* **503**, 101–134 (2012).
40. Koide, S., Koide, A. & Lipovšek, D. Target-binding proteins based on the 10th human fibronectin type III domain (¹⁰F_n3). *Methods Enzymol.* **503**, 135–156 (2012).
41. Saerens, D. *et al.* Identification of a universal VHH framework to graft non-canonical antigen-binding loops of camel single-domain antibodies. *J. Mol. Biol.* **352**, 597–607 (2005).
42. Christ, D., Famm, K. & Winter, G. Repertoires of aggregation-resistant human antibody domains. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* **20**, 413–416 (2007).
43. Goldman, E. R. *et al.* Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library. *Anal. Chem.* **78**, 8245–8255 (2006).

44. Mandrup, O. A., Friis, N. A., Lykkemark, S., Just, J. & Kristensen, P. A novel heavy domain antibody library with functionally optimized complementarity determining regions. *PLoS One* **8**, e76834 (2013).
45. Koch, H., Gräfe, N., Schiess, R. & Plückthun, A. Direct selection of antibodies from complex libraries with the protein fragment complementation assay. *J. Mol. Biol.* **357**, 427–441 (2006).
46. Pellis, M. *et al.* A bacterial-two-hybrid selection system for one-step isolation of intracellularly functional Nanobodies. *Arch. Biochem. Biophys.* **526**, 114–123 (2012).
47. Zolghadr, K. *et al.* A fluorescent two-hybrid assay for direct visualization of protein interactions in living cells. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **7**, 2279–2287 (2008).
48. Kirchhofer, A. *et al.* Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 133–138 (2010).
49. Nizak, C. *et al.* Recombinant antibodies against subcellular fractions used to track endogenous Golgi protein dynamics in vivo. *Traffic Cph. Den.* **4**, 739–753 (2003).
50. Marks, J. D. *et al.* By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* **222**, 581–597 (1991).
51. Nizak, C., Moutel, S., Goud, B. & Perez, F. Selection and application of recombinant antibodies as sensors of rab protein conformation. *Methods Enzymol.* **403**, 135–153 (2005).
52. Even-Desrumeaux, K. & Chames, P. Phage display and selections on cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **907**, 225–235 (2012).
53. Olichon, A. *et al.* OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ.* **14**, 682–692 (2007).

Figure legends

Figure 1. Robust scaffold identification (A). Chloramphenicol acetyl transferase carboxy terminal fusion is a folding reporter allowing the selection of soluble amino terminal VHH. Top: scheme of the construct expressed from pAO-VHH-CAT-HA vector. Bottom: Relative colony growth of selected VHH on chloramphenicol selection medium (Cam). Serial dilution of *E.coli* culture expressing VHH. **(B)** Clone D10 periplasmic expression in *E.coli*: commassie stained SDS-Page of heat purified sdAbD10. **(C)** HeLa cells expressing a GFP fusion of sdAb-D10 showing homodispersed fluorescence (right) compared to typical aggregating VHH considered as non intrabody (left).

Figure 2: CDR3 loop grafting and synthetic scaffold validation. (A) Phages presenting both scaffold were produced in *E. coli* and supernatant were detected in Western Blot with an anti-pIII antibody (NEB). Two bands are visible, one for pIII and one for the fusion with single domains. **(B)** Production of both scaffolds in *E. coli* periplasm or in CHO cells secretion pathway analyzed by Dot Blot. Serial dilutions of supernatant were revealed with an anti-HisTag antibody (Sigma). **(C)** Immunofluorescence of HeLa cells with recombinant Ab in both scaffolds labelling the nuclear rim structure characteristic of the nuclear lamina. **(D)** HeLa cells were transiently transfected with both intrabodies scaffold expression plasmids as GFP fusion, live cells were imaged after 24H and showed the recognition of the intracellular lamin target.

Figure 3: Selection of functional hs2dAb against various antigens. (A) HeLa cells were transfected with Rab6-GFP, fixed and stained with non-purified hs2dAb against GFP, revealed with anti-Myc-Tag (9E10 hybridoma, homemade) and Cy3 secondary antibodies (Jackson), the overlay shows the co-labeling of the hs2dAb anti-GFP and the GFP. **(B)** HeLa cells transfected with Rab6-mCherry, fixed and stained with non purified hs2dAb against mCherry. **(C)** D5stained microtubules by immunofluorescence in HeLa cells. Cells were fixed and co-stained with a non purified hs2dAb D5 and a mouse monoclonal antibody DM1A (Sigma) revealed by an anti-HumanFcCy3 and an anti-MouseCy3 secondary antibody (Jackson). **(D)** hs2dAb F4 anti beta-Actin labelled actin stress fibers in immunofluorescence. MRC5 cells were fixed with pfa and post fixed with MeOH, then co-stained with non purified F4 and phalloidin that label actin stress fibers. **(E)** hs2dAb B7 anti-p53 labelled endogenous p53 in immunofluorescence on A431 cells. A431 cells were fixed with 3% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton then stained with B7 revealed by an anti-HisTag (Sigma) and an anti-MouseCy3 secondary antibody (Jackson). (scale bar 10 μ m)

Figure 4: Subtractive selection led to conformational or cell type specific hs2dAbs. (A) H12 is a conformational hs2dAb binding only to the GTP bound, activated state of RhoA GTPase. ELISA revealing recombinant GST-RhoA wild type loaded with either 100 μ M GTP gamma S (Black) or 1mM GDP (White), or a purified GST fusion of a RhoA constitutively active mutant Q63L (Check). **(B)** A CBD tagged H12 pull down from HeLa cell extract loaded with 100 μ M GTP gamma S (GTP) or with 1mM GDP as inputs. Western blot reveals RhoA at similar level in 5% of both input but only on the GTP loaded extract in the CBD-H12 pull down. D5 anti tubulin was a used as negative control and the standard GST-RBD (Rho binding domain of Rhotekin) as a

positive control of active Rho pull down. **(C)** immunofluorescence on HeLa cells overexpressing GFP-RhoAT19N inactive mutant or GFP-RhoAQ63L. H12 staining detected using a myc tag antibody revealed only cells overexpressing the constitutively active mutant with a pattern similar to the GFP fluorescence. **(D)** Tumor cell surface subtractive selection. **(E)** ELISA of hs2dAb D10 anti-Her2 on Her2 fused with a rabbit Fc versus binding on rabbit Fc at equimolar concentration. **(F)** hs2dAb D10 anti-Her2 decorated the SKBR3 membrane in immunofluorescence. SKBR3 cells were fixed with 3% paraformaldehyde and stained with D10 revealed by an anti-HisTag (Sigma) and an anti-MouseCy3 secondary antibody (Jackson). **(G)** FACS analysis of D10 anti-Her2 on SKBR3 Her2 positive cells versus MCF10A Her2 negative cells. (scale bar 10 μm)

Figure 5: Fluorescent intrabodies tracking or inhibiting antigens. Intracellular expression of hs2dAb. **(A)**(top) HeLa cells were cotransfected with Rab6-GFP and a hs2dAb-mCherry anti-GFP plasmids. The hs2dAb mCherry anti-GFP colocalized perfectly with the Rab6 golgi staining.(bottom) HeLa cells were cotransfected with Myr-palm-mCherry and a VHH-GFP anti-mCherry plasmids. The VHH-GFP anti-mCherry interacted with its target *in vivo* and colocalized perfectly with the mCherry staining at the plasmic membrane.**(B)** HeLa cells transfected with a control non relevant hs2dAb or the clone H12 anti Rho-GTP expressed as GFP fusion. Cells were fixed 20h hours post transfection and stained with DAPI and Alexa 594 phalloidin to label actin stress fibers. **(C)**SKBR3 cells were transfected with an anti-p53 hs2dAb-mCherry alone (top panel), or together with full length p53-GFP (middle panel) or with a peptide corresponding to the epitope used in the selection (83 N-terminal part of p53). (scale bar 10 μm)

Figure 6: Protein knockdown mediated by Functionalized intrabodies F-Ib. **(A)** Model for F-Ib degradation by fusing Fbox domain to hs2dAb. F-hs2dAb binds a target protein and interacts with Skip1 via the Fbox domain which is a component of the Skip1-Cullin1-Fbox (SCF) complex, an E3 ubiquitin-protein ligase. SCF is recruited and leads to the proteasome dependent degradation of the target protein. **(B)** Schematic illustration of the bicistronic vector pF-Ib-IRES-mtsCherry: Fbox domain is fused to the N terminal part of hs2dAb and a transfection marker, labeling mitochondria, is under the control of an Internal Ribosome Entry Site (IRES). **(C)** Protein Knock down H2B-GFP by F-Ib anti-GFP from Hs2dAb library in comparison to the F-GFP4 VHH (DegradFP). (Scale bars 20 μm) **(D)** Fluorescence decay measurement by fluorescence microscopy (n=100 transfected, from 3 independent experiments). **(E)** HeLa H2B-GFP cells were transfected with F-Ib and treated with 1 μM MG132 or DMSO for 44h. GFP fluorescence was quantified by flow cytometry on mCherry transfected cells. A strong decay corresponding to protein knockdown was observed with F-GFP4 VHH and F-R3TF3 hs2dAb intrabodies.

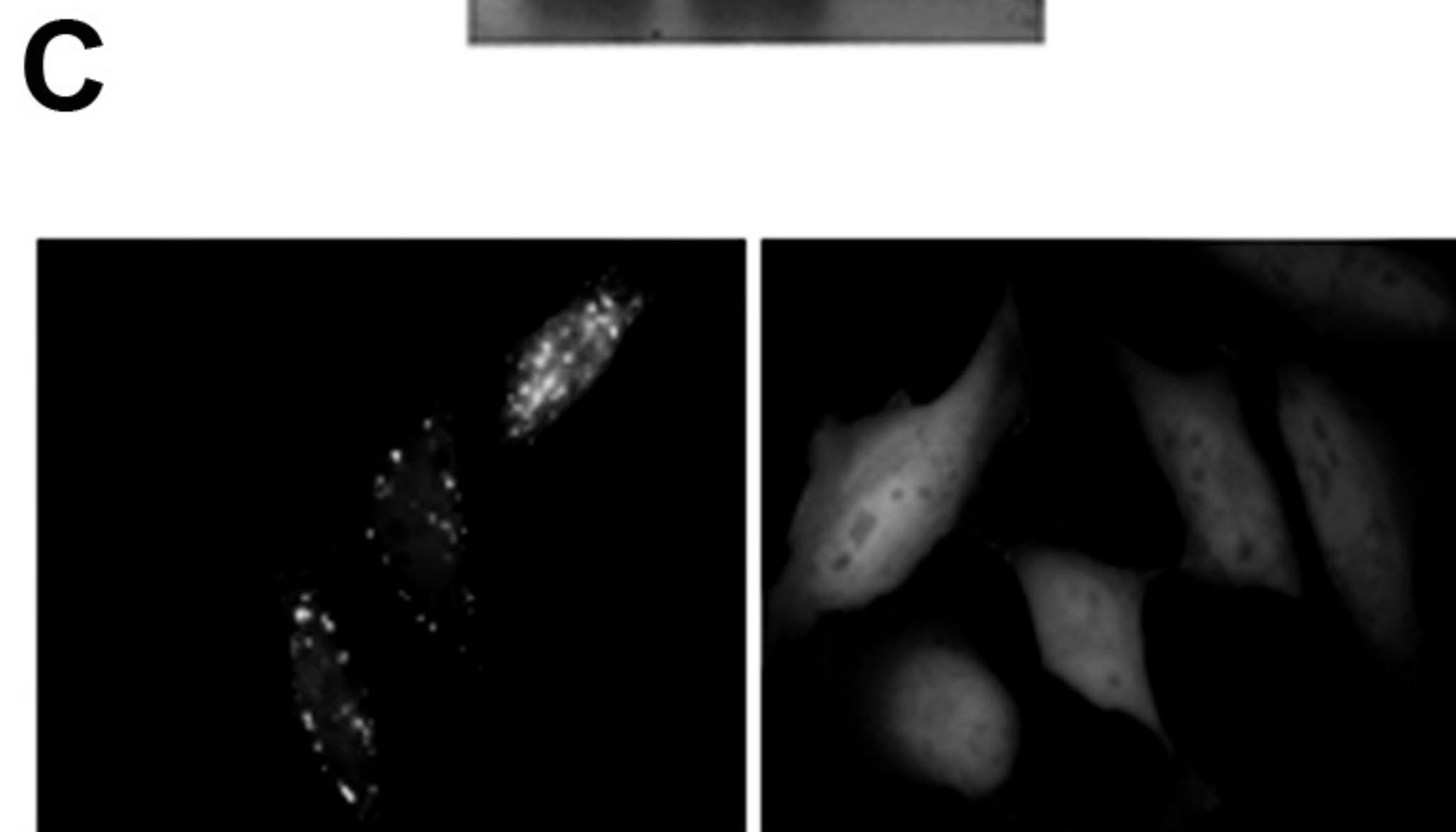
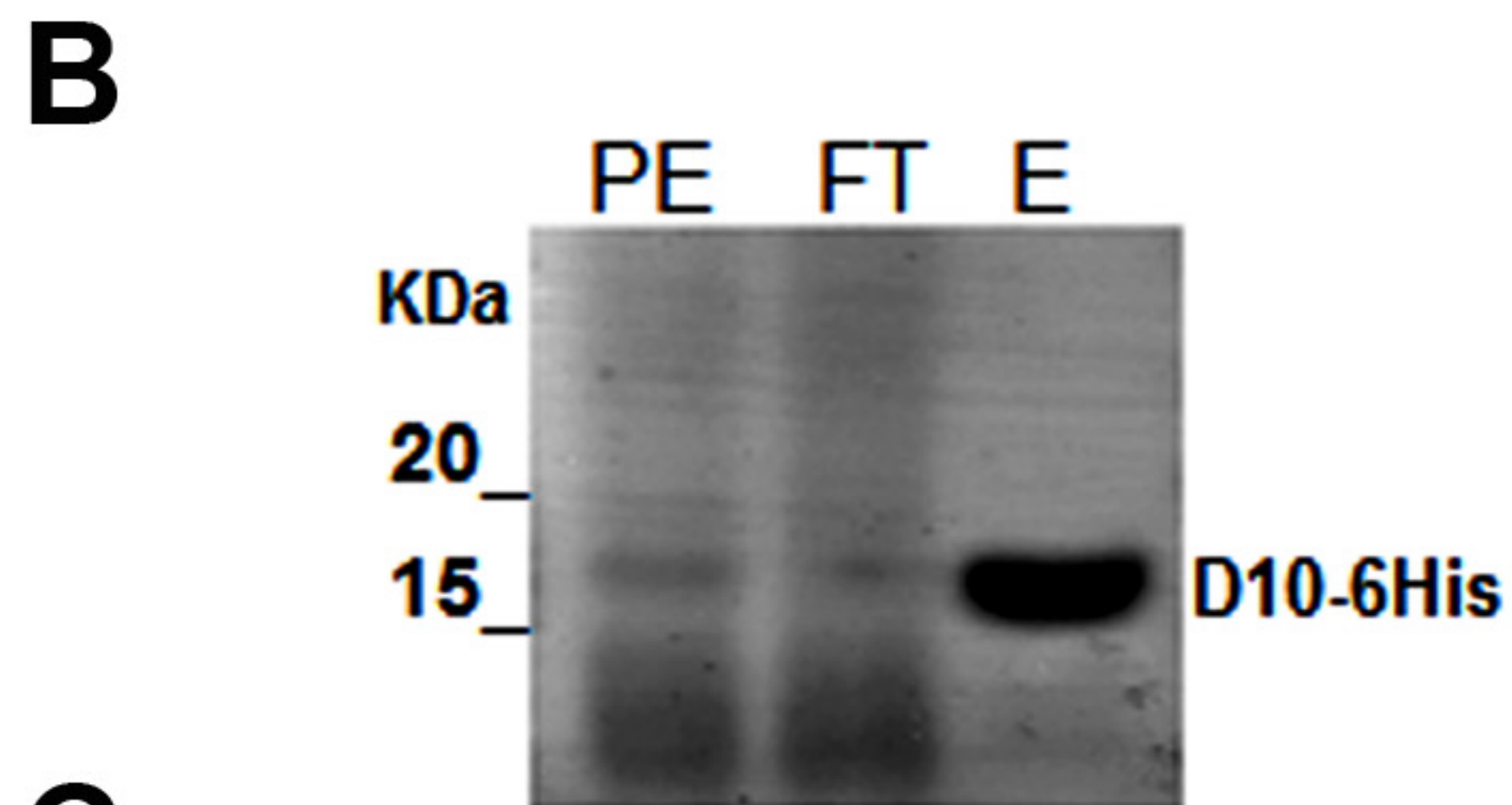
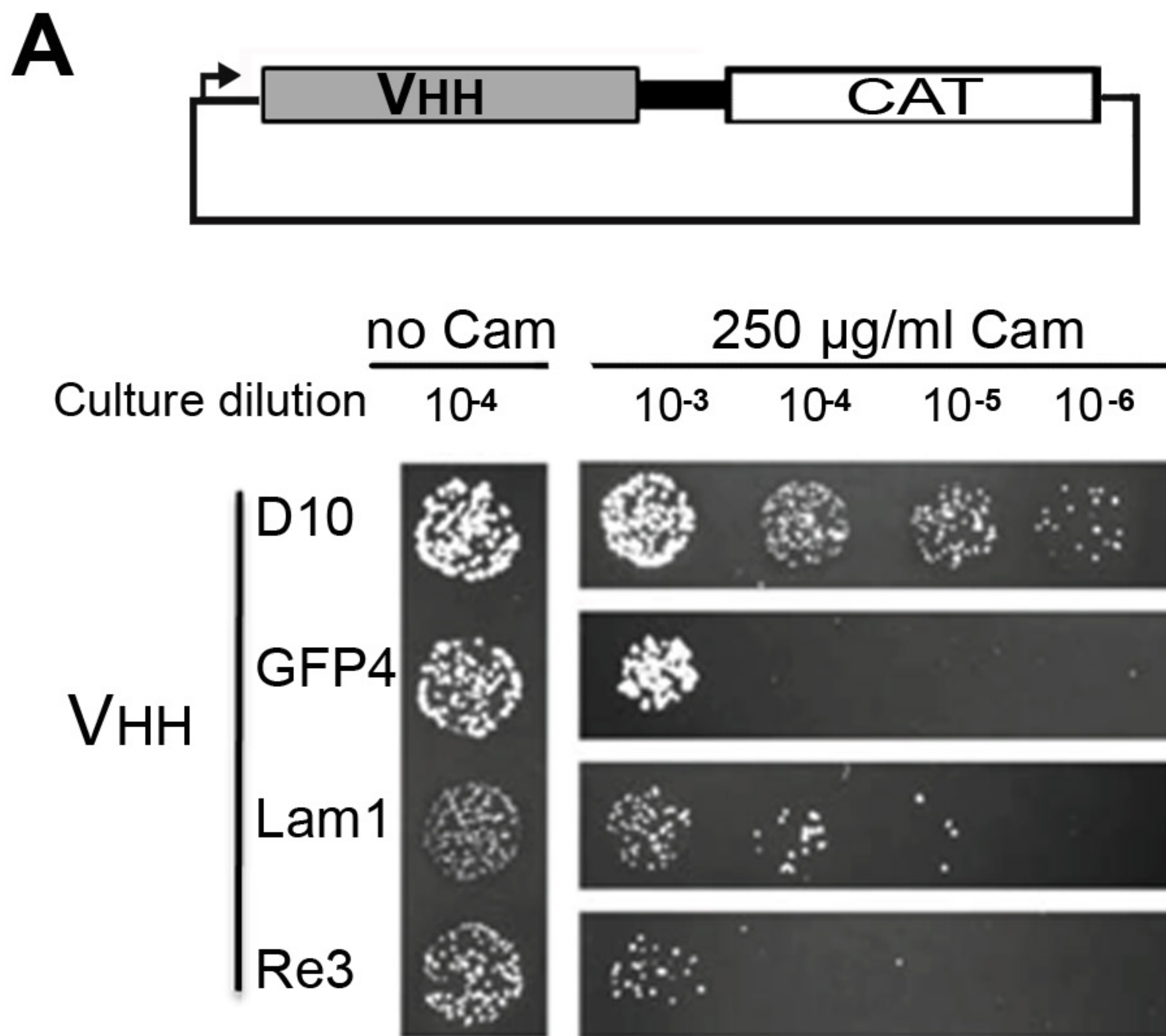


Figure 1 (Perez and coll.)

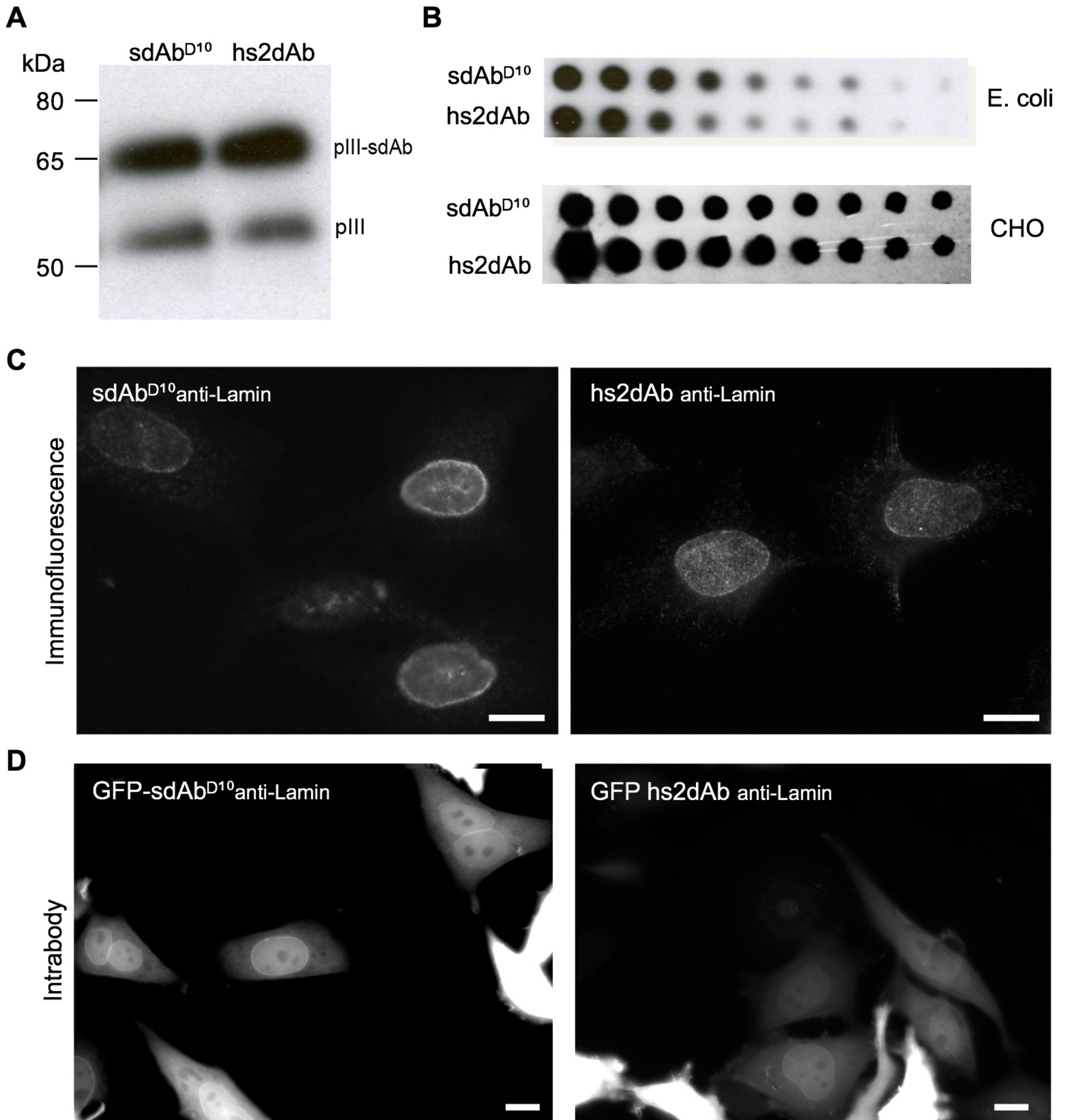


Figure 2 (Perez and coll.)

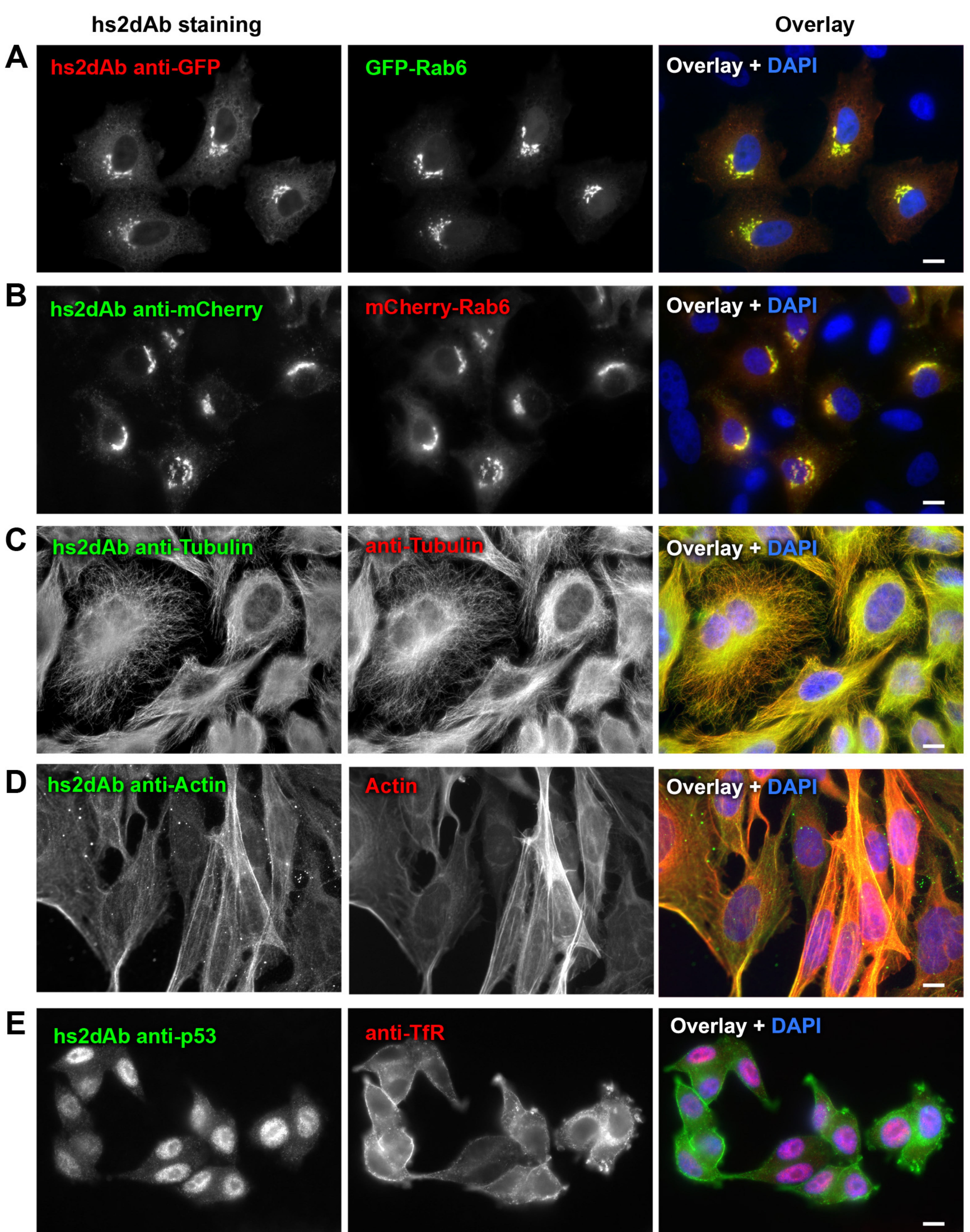


Figure 3 (Perez and coll.)

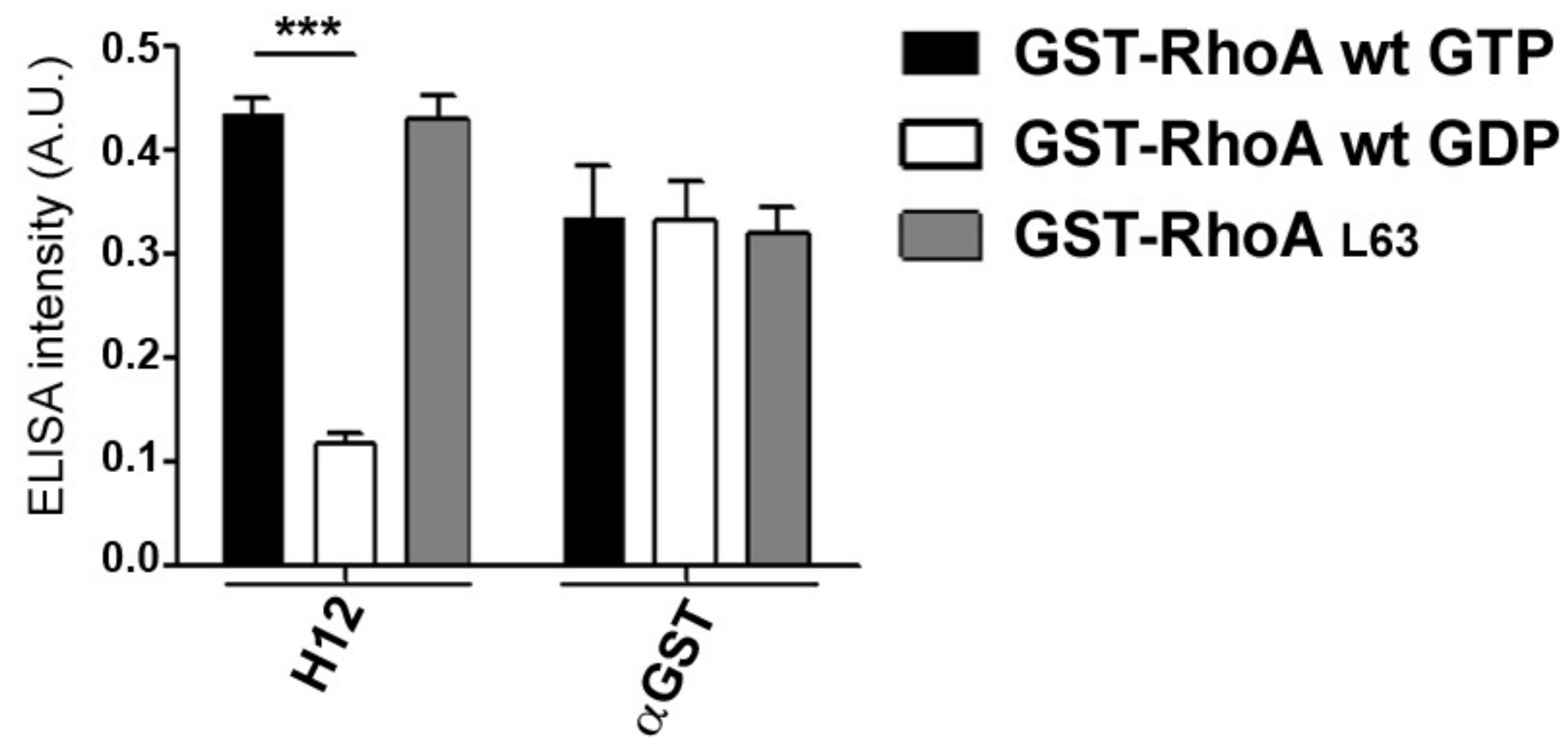
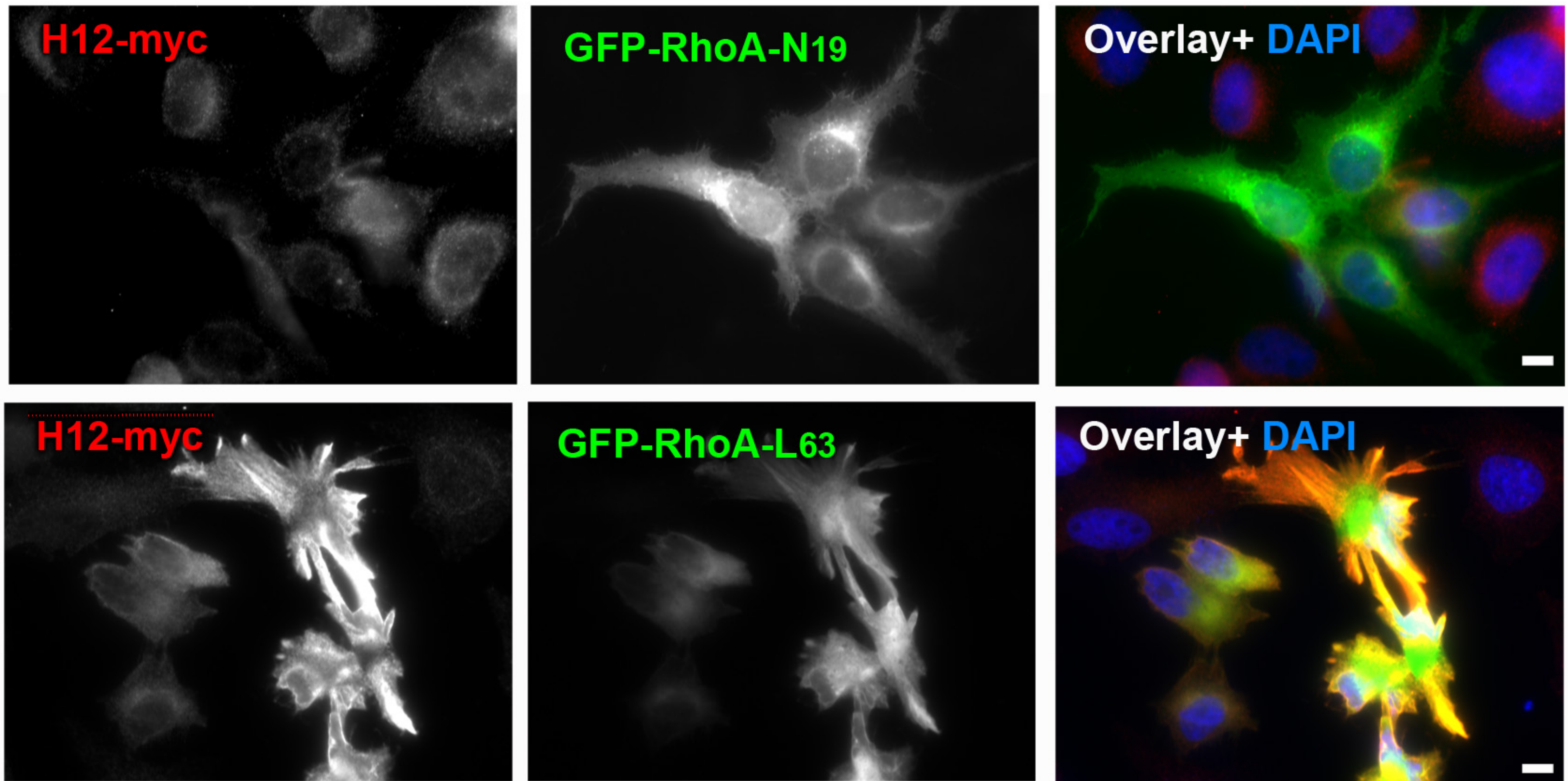
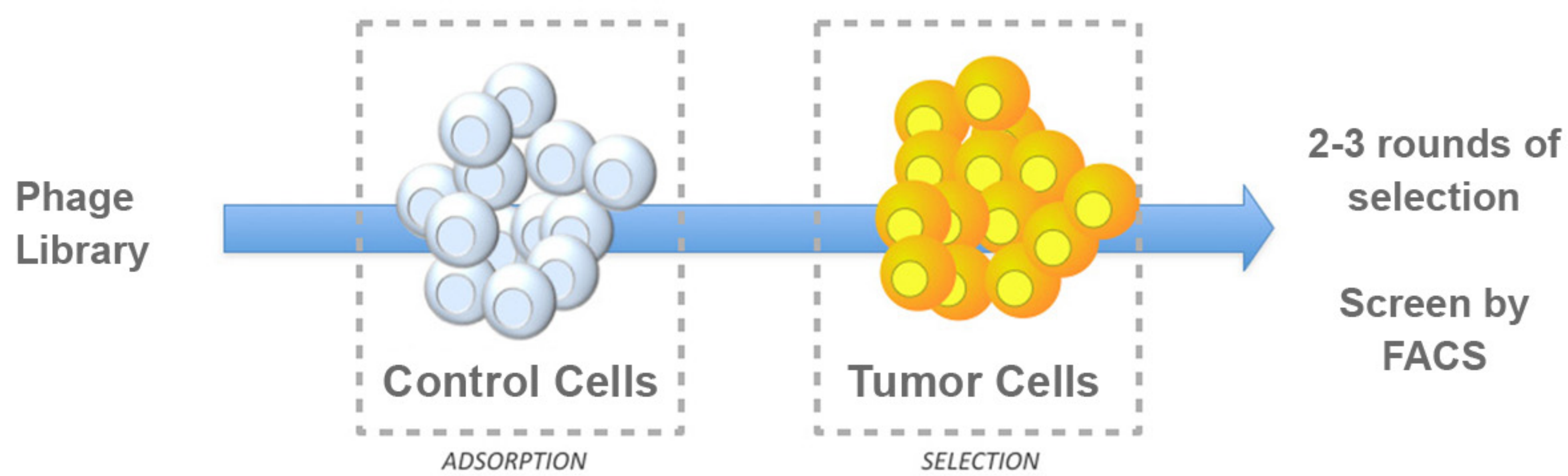
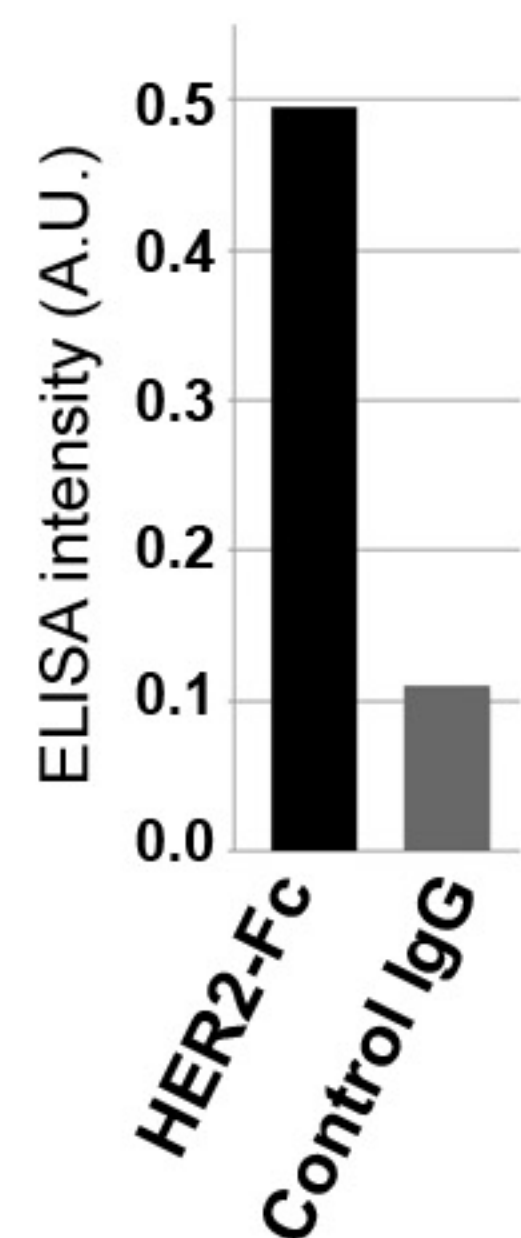
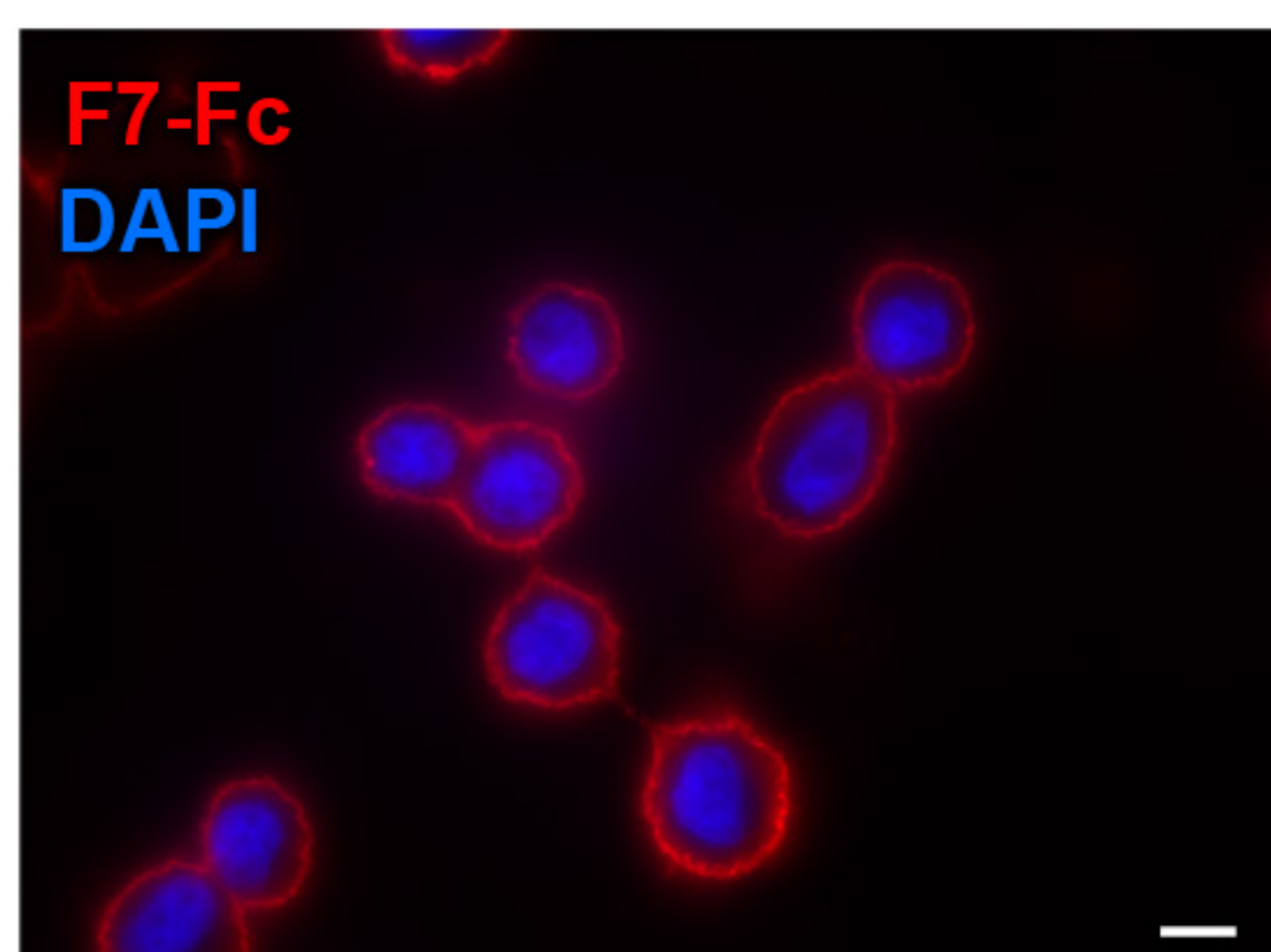
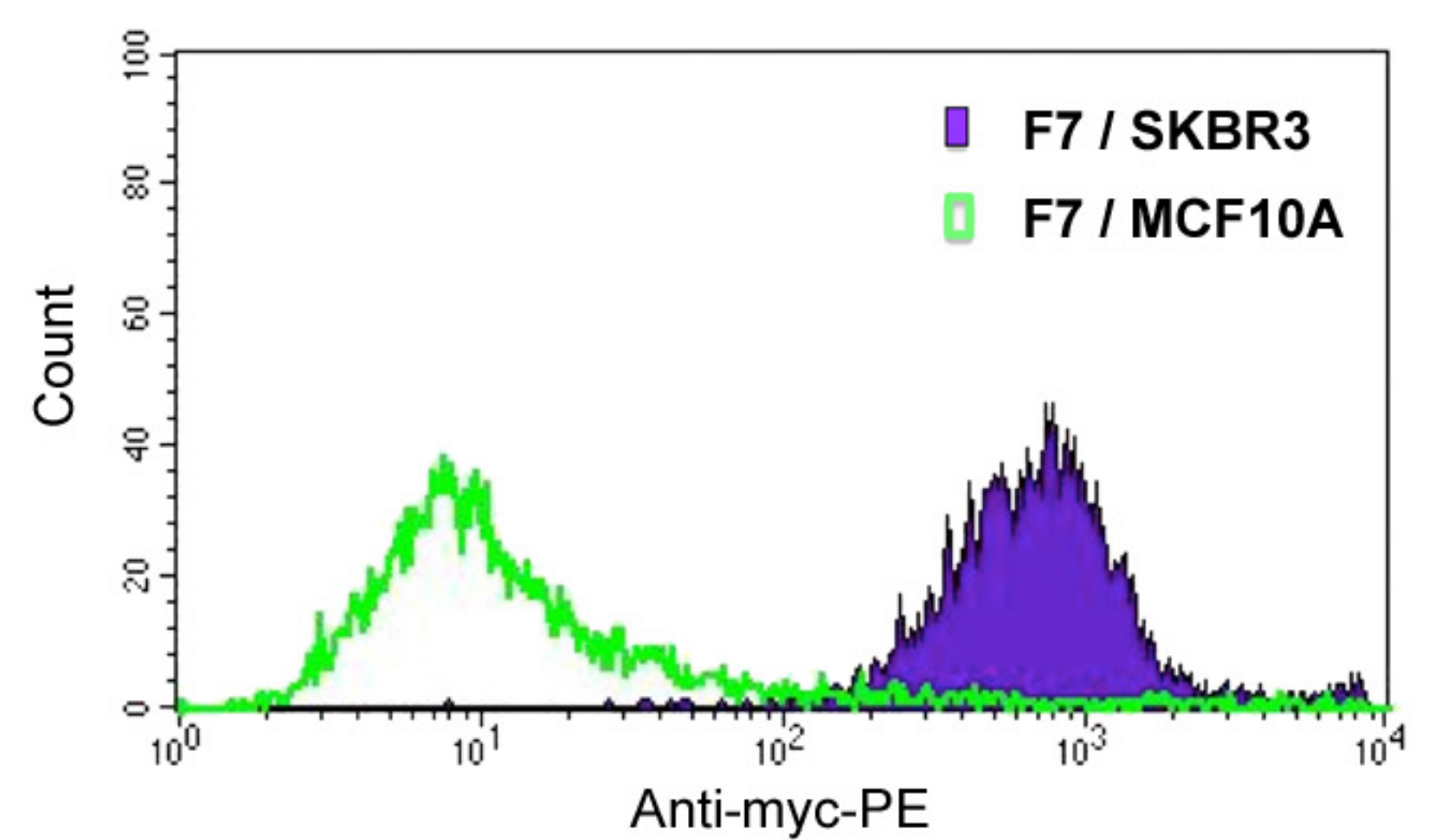
A**B****C****D****E****F****G**

Figure 4 (Perez and coll.)

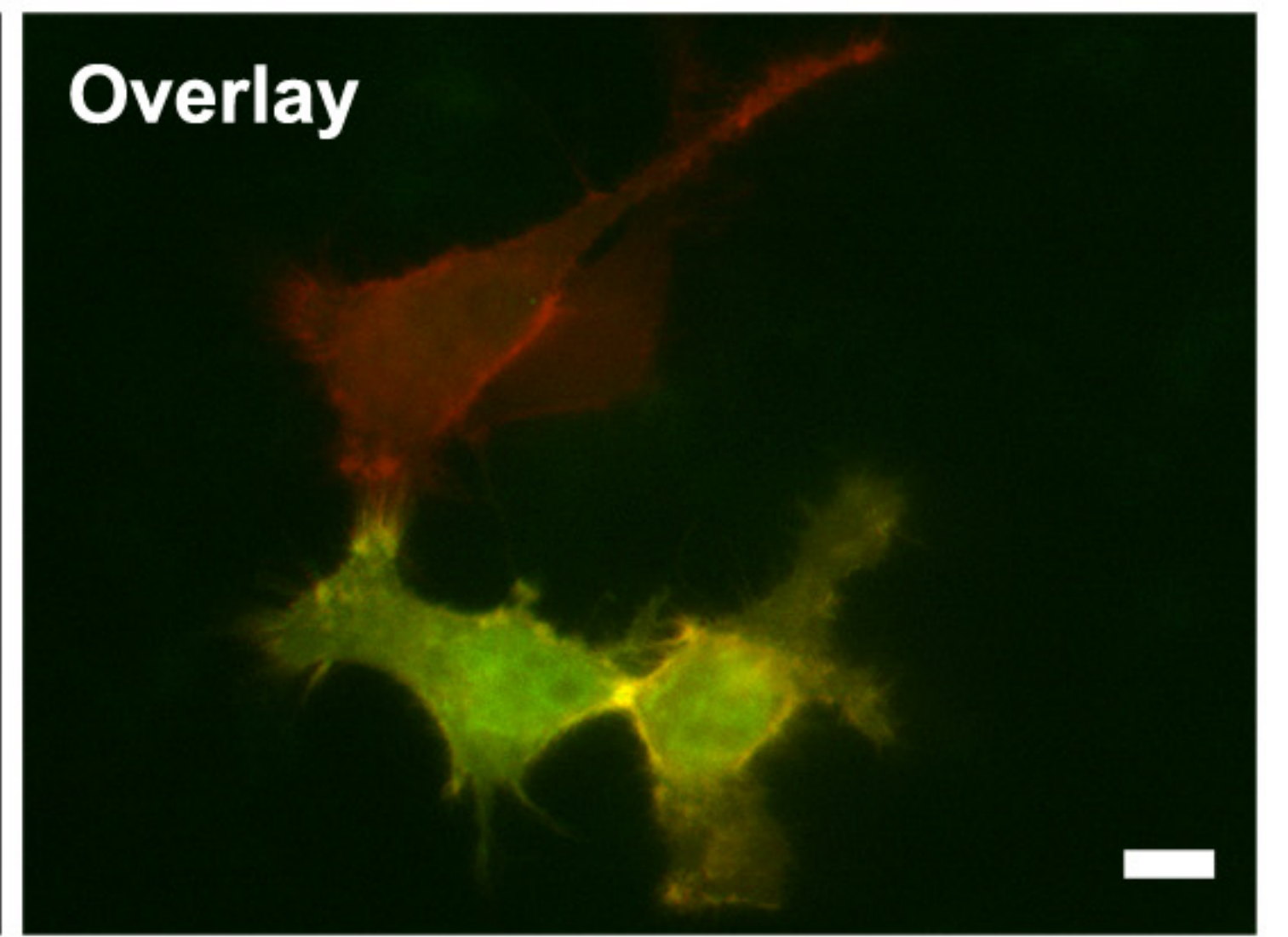
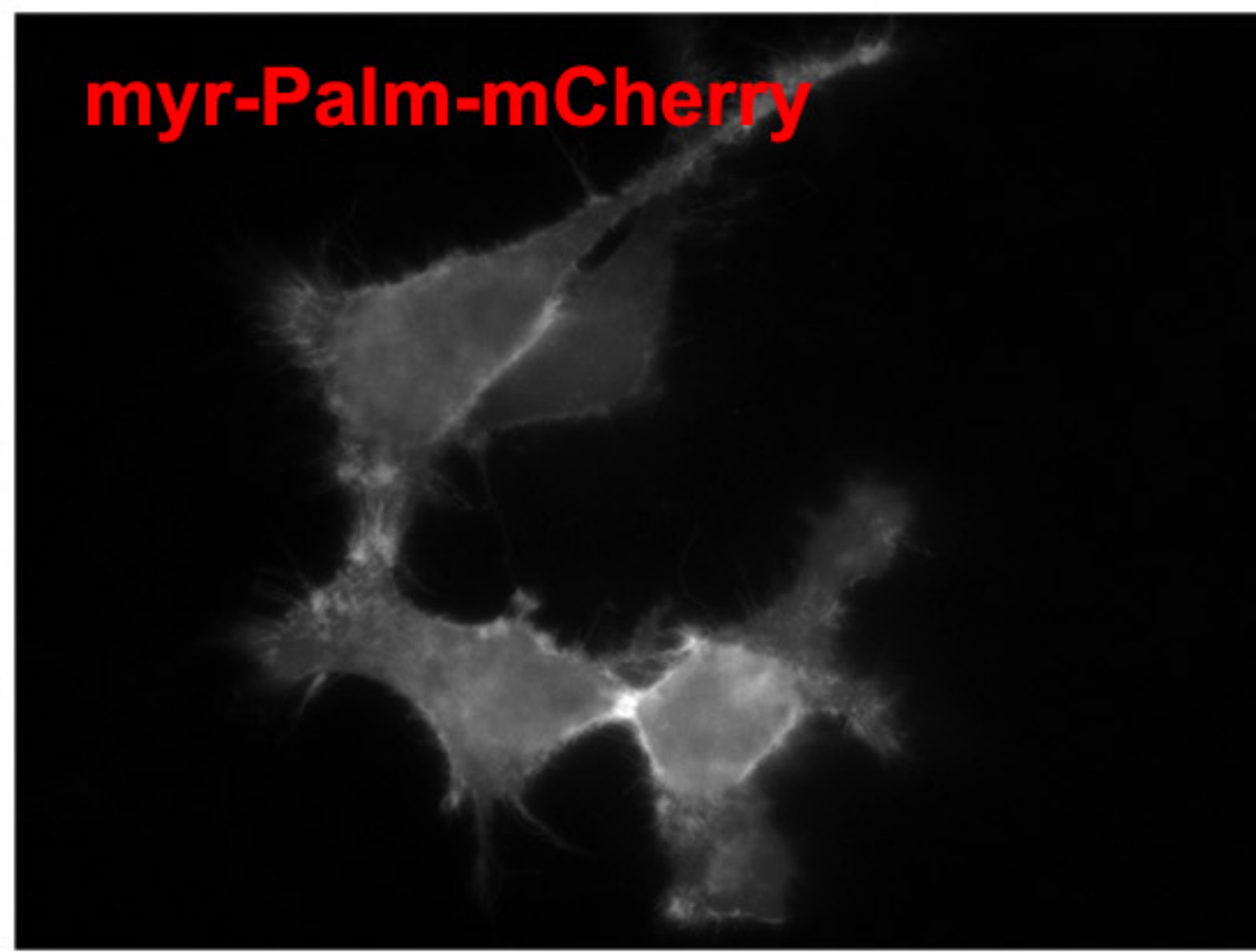
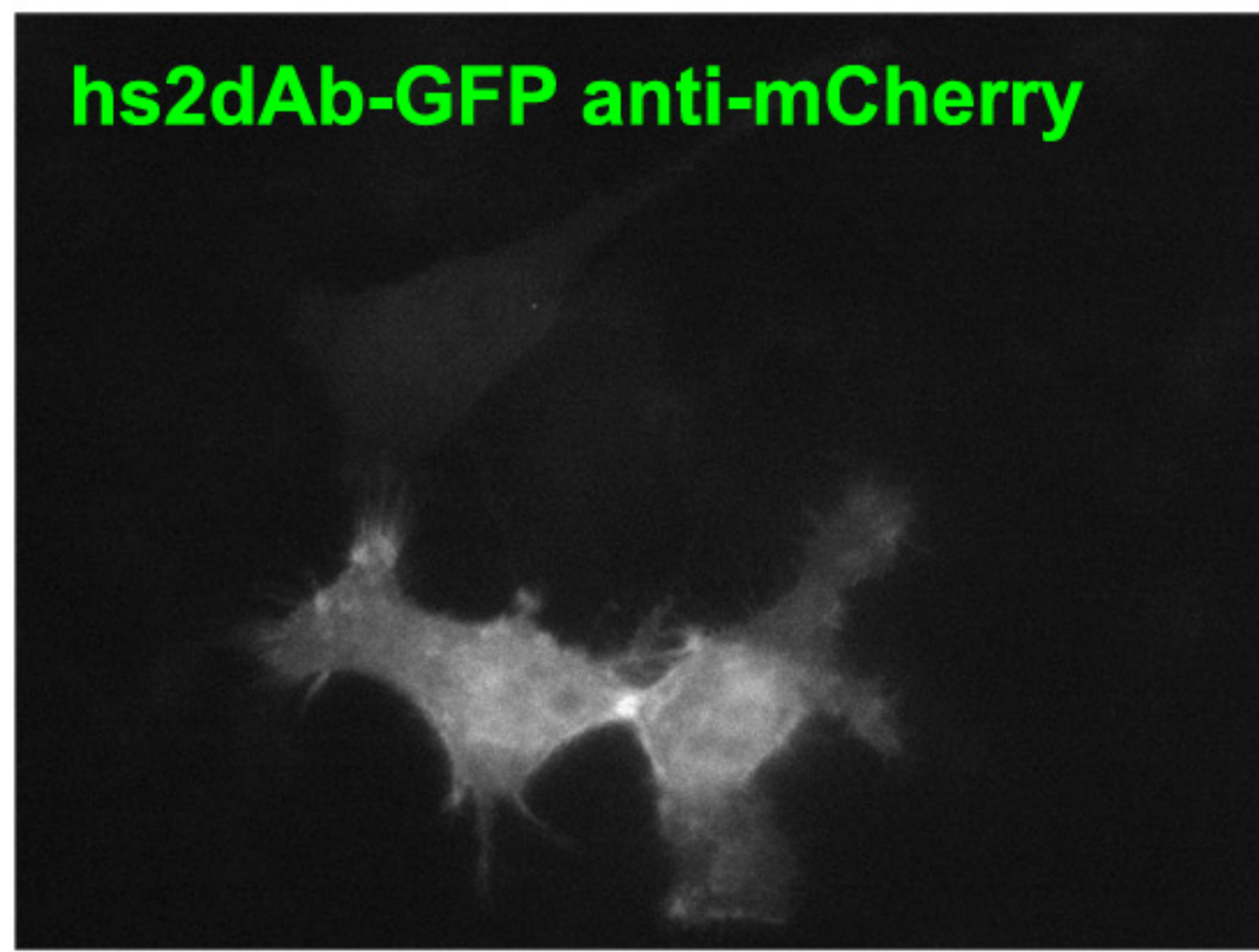
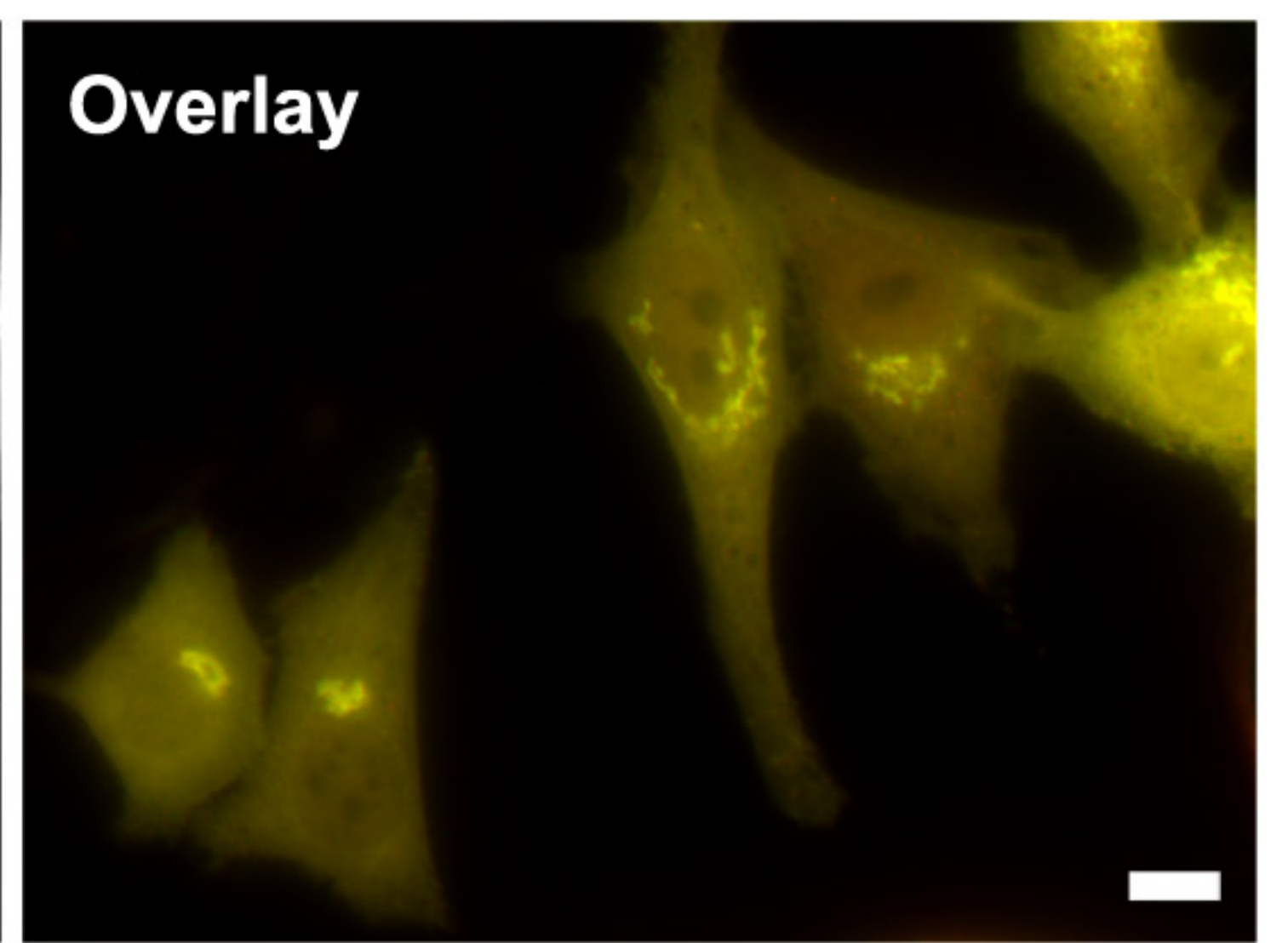
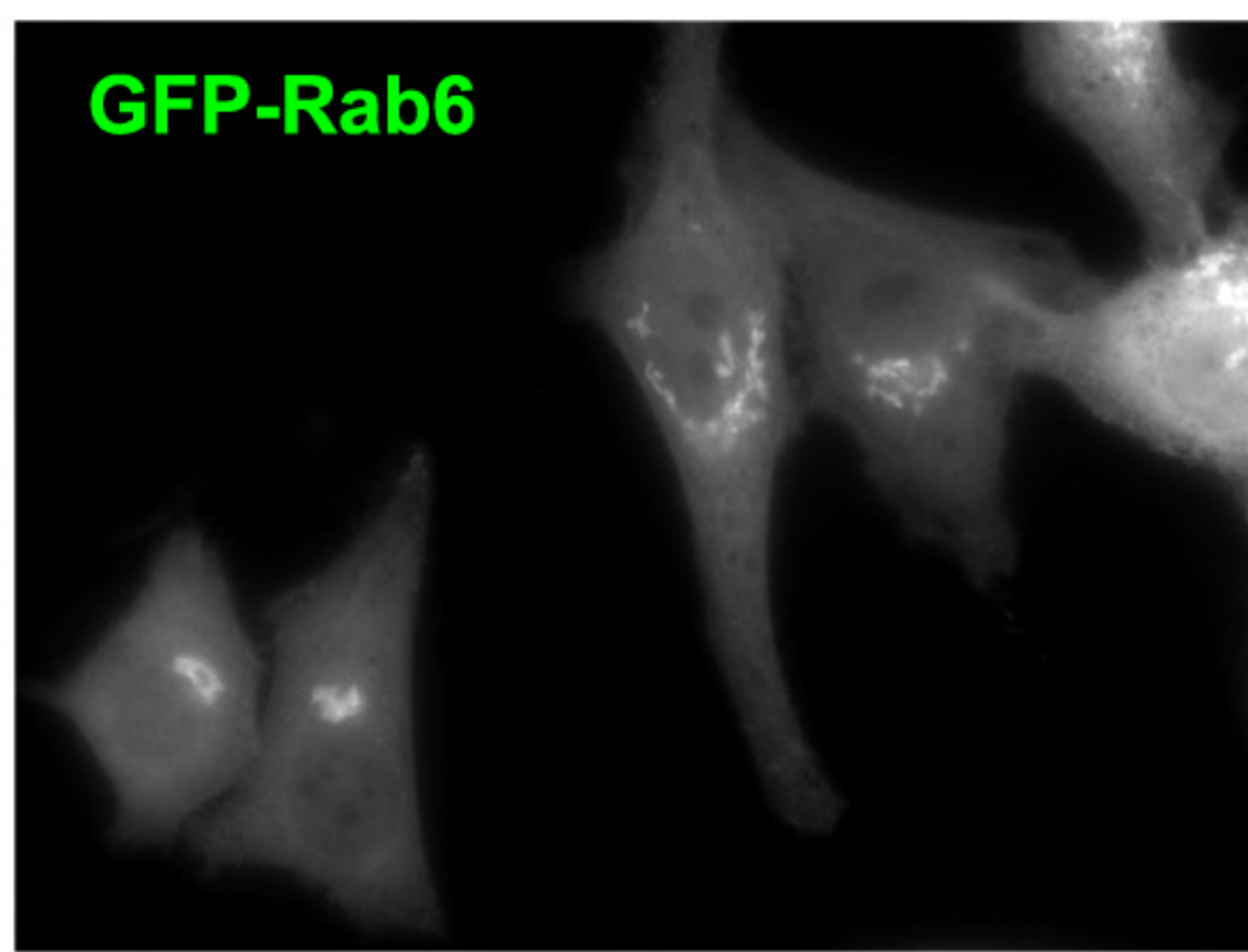
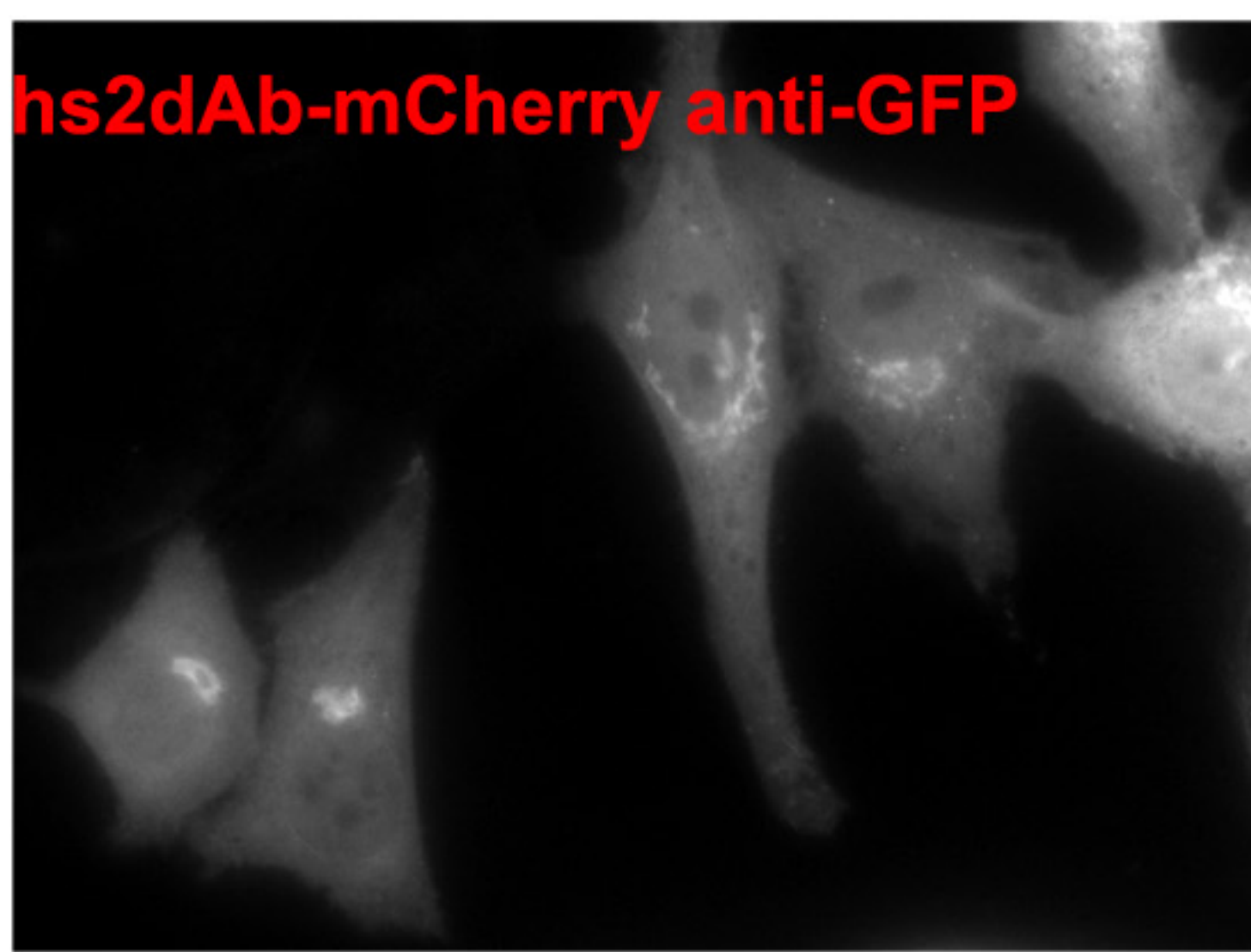
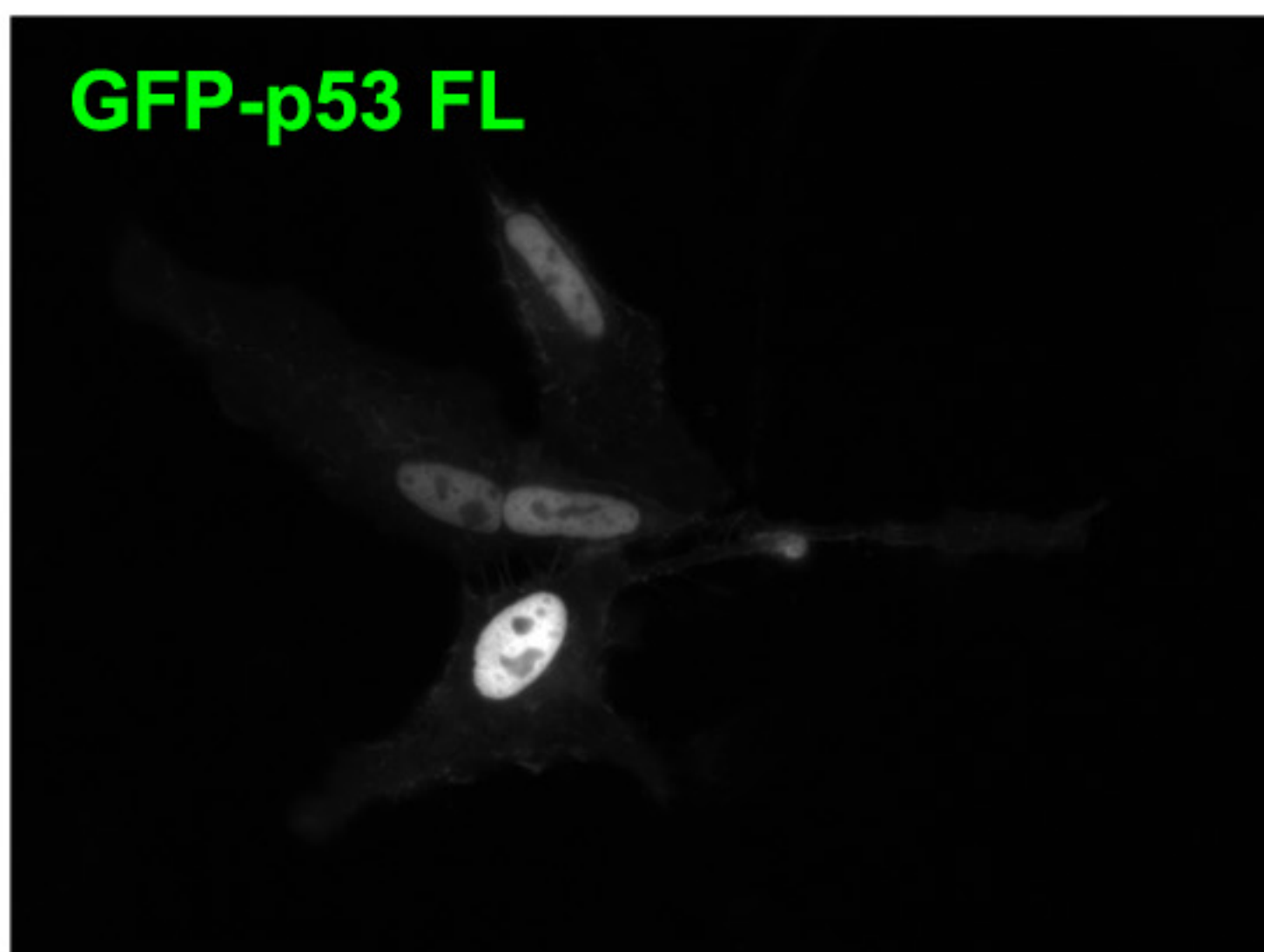
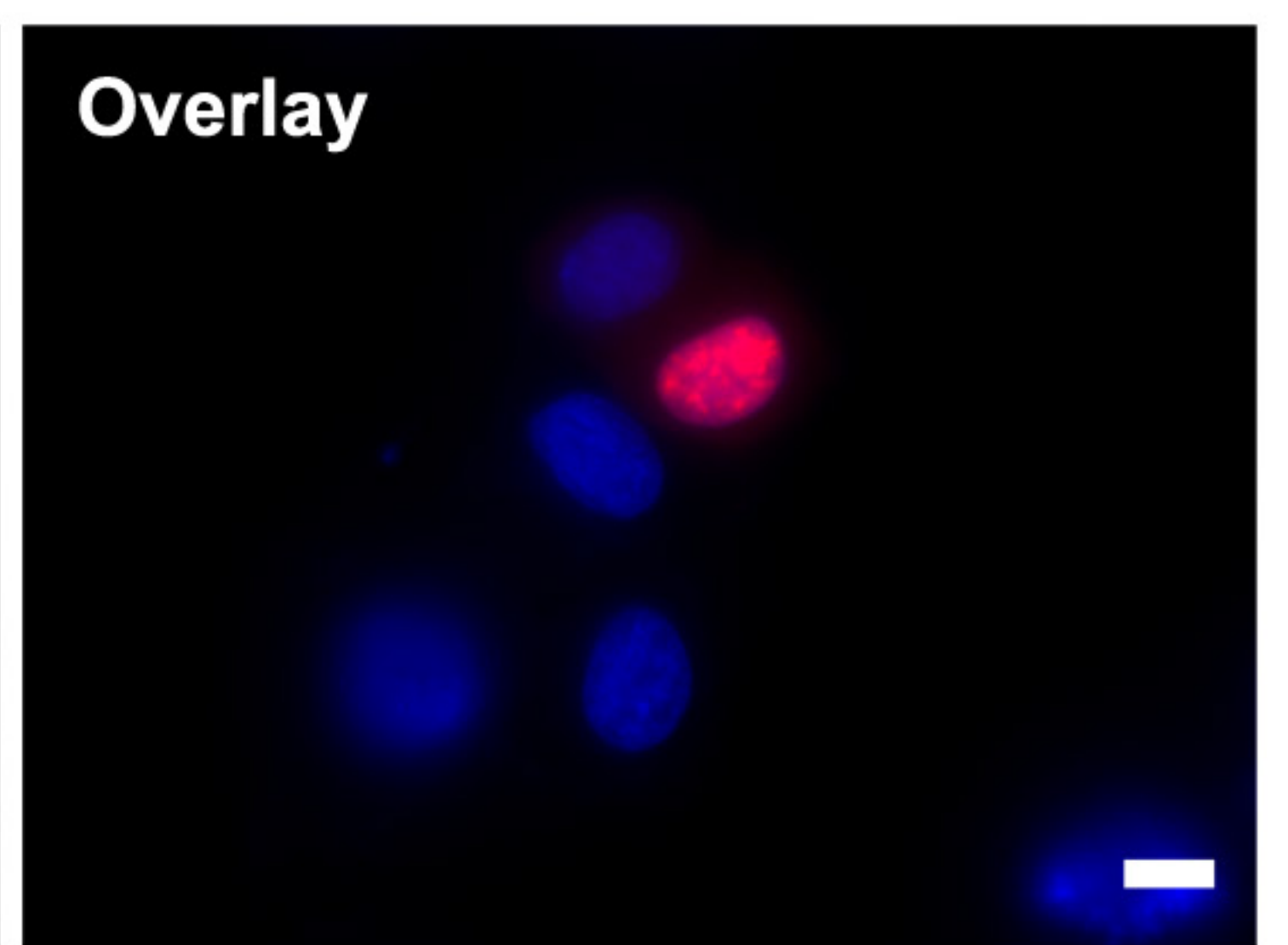
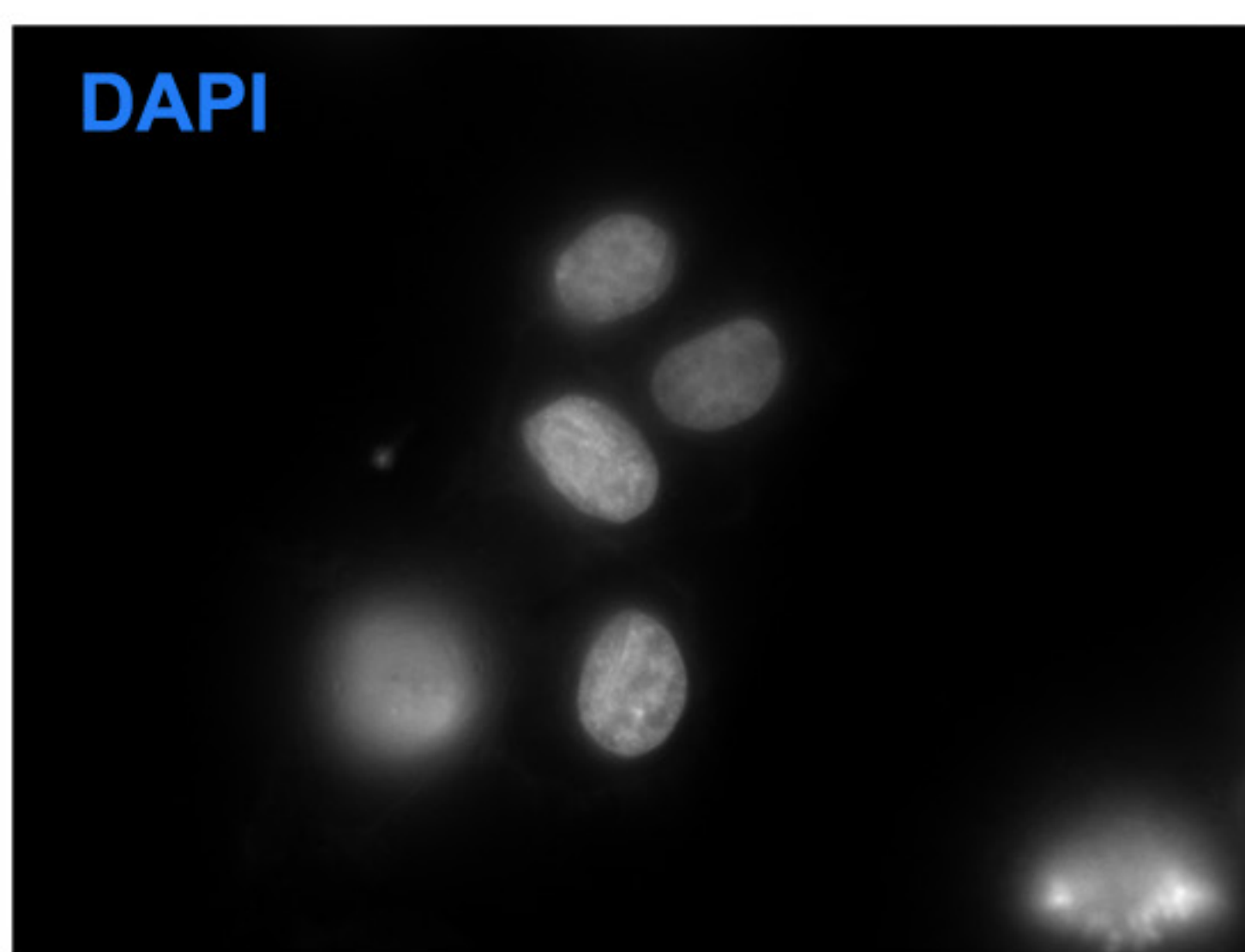
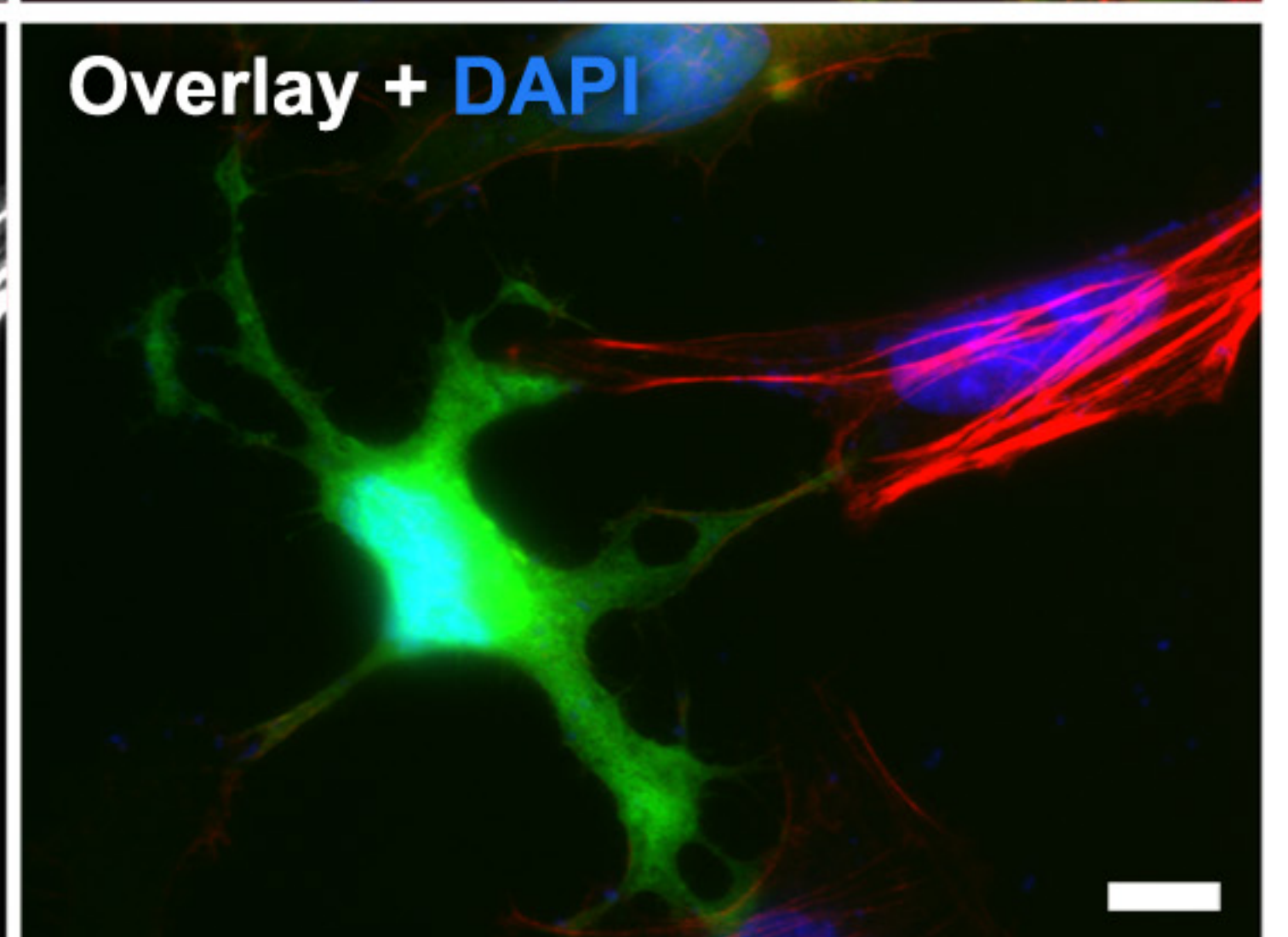
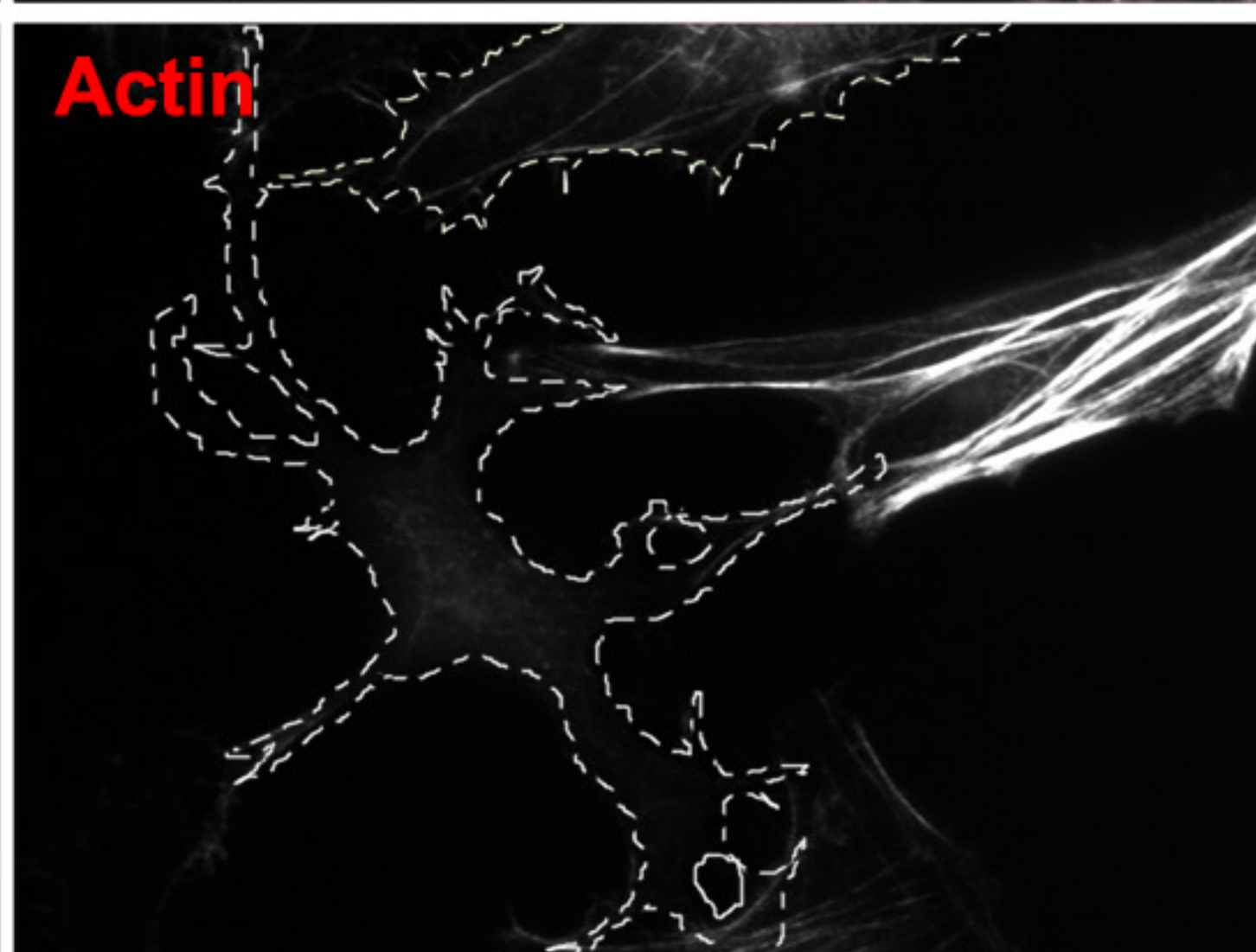
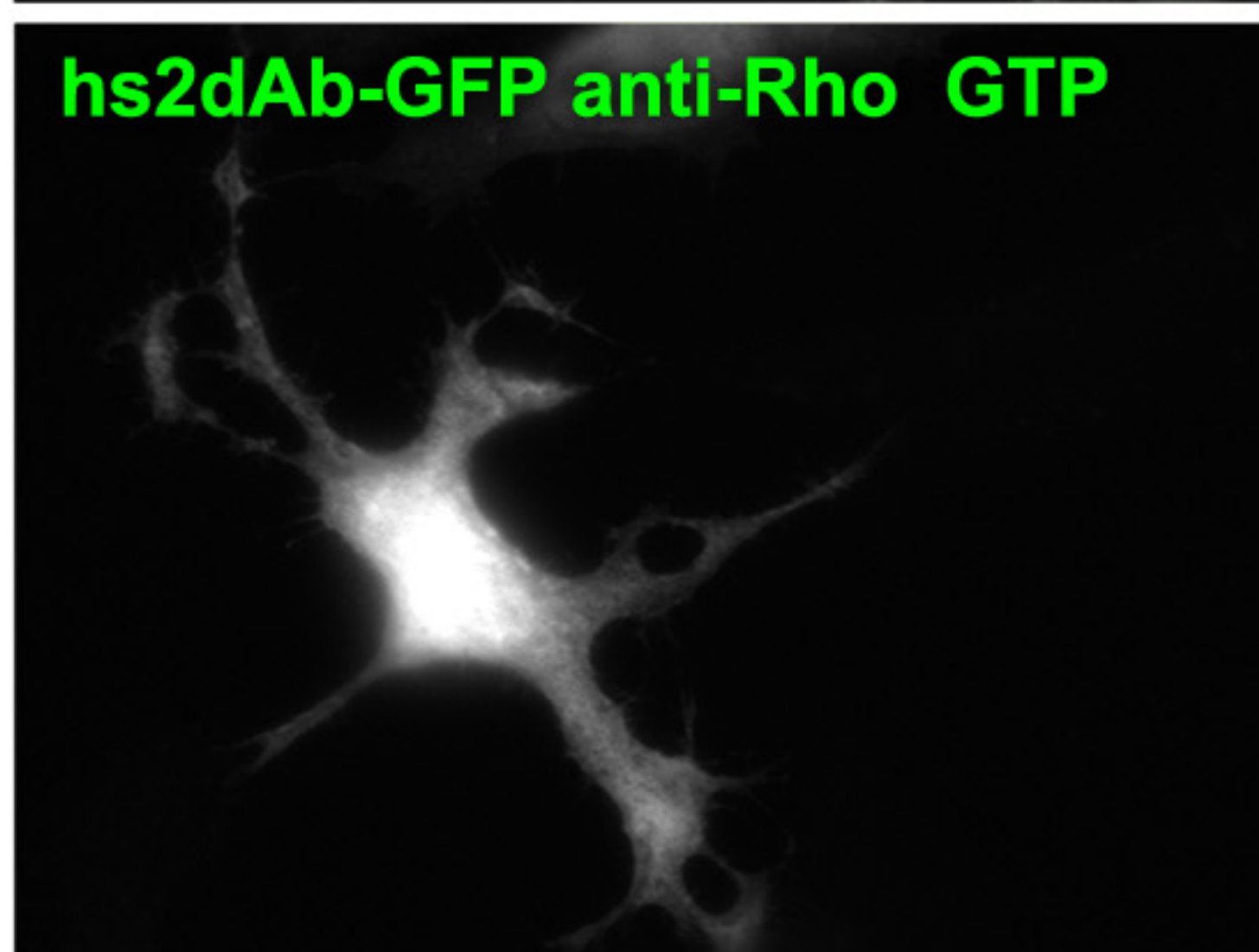
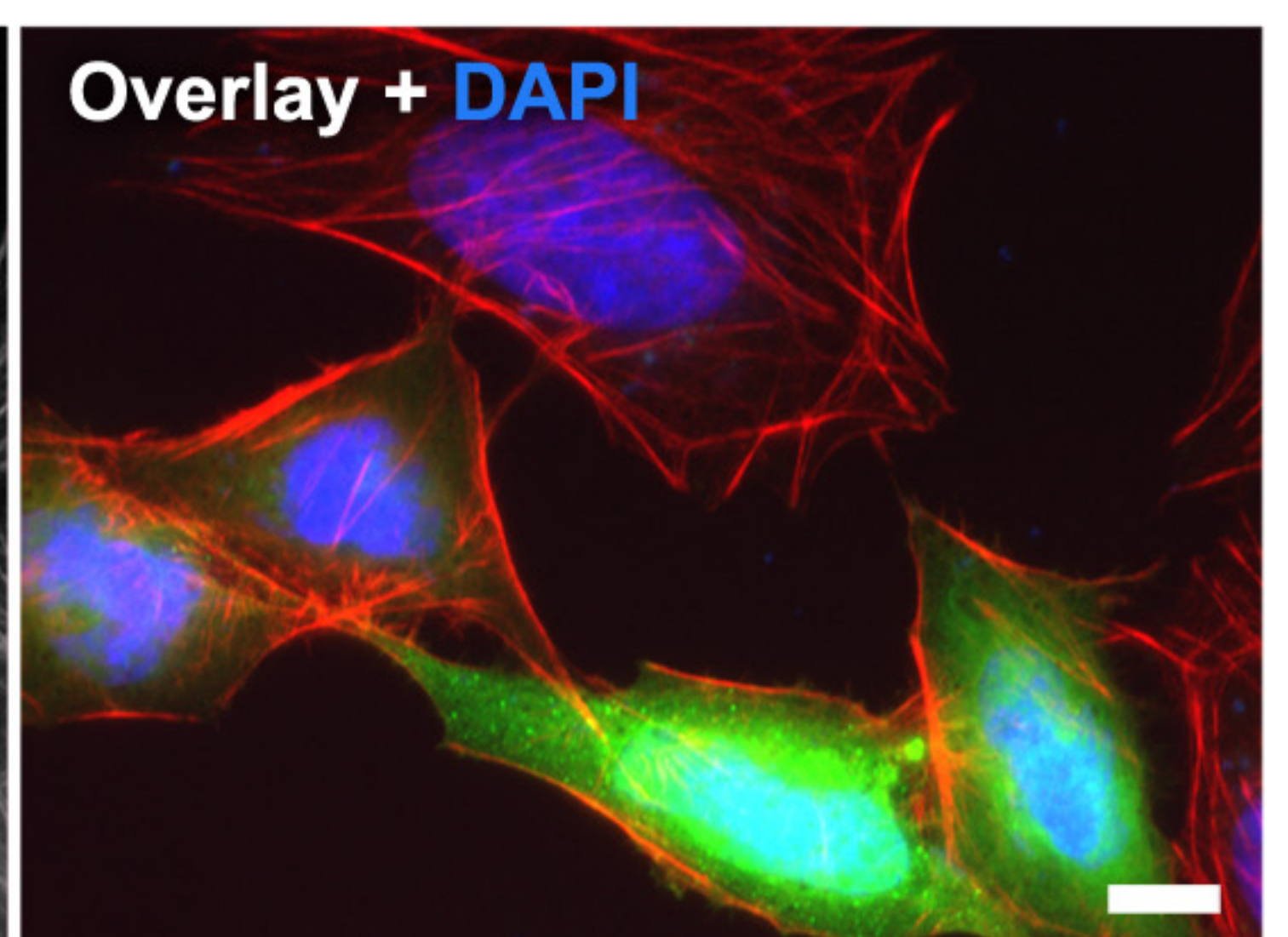
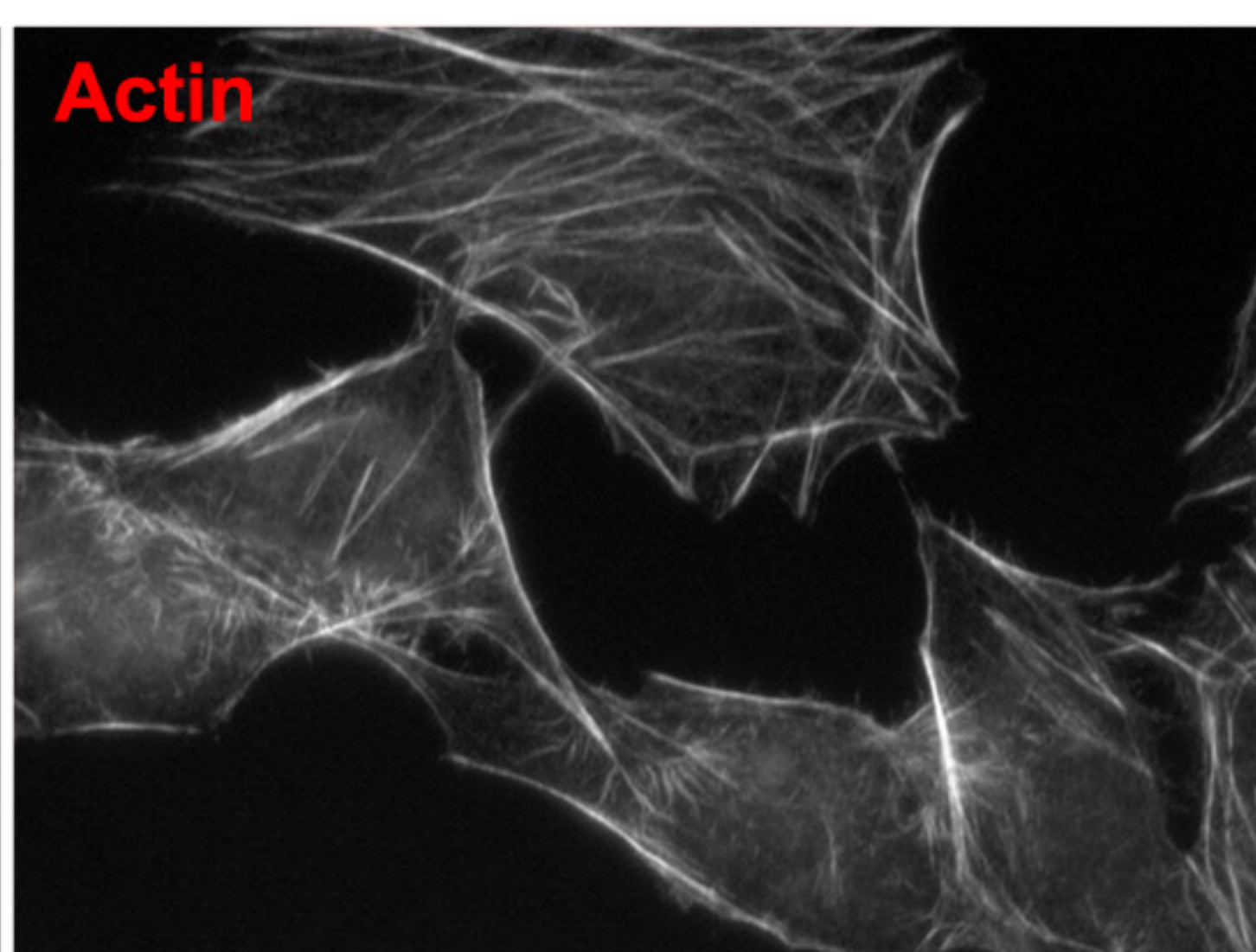
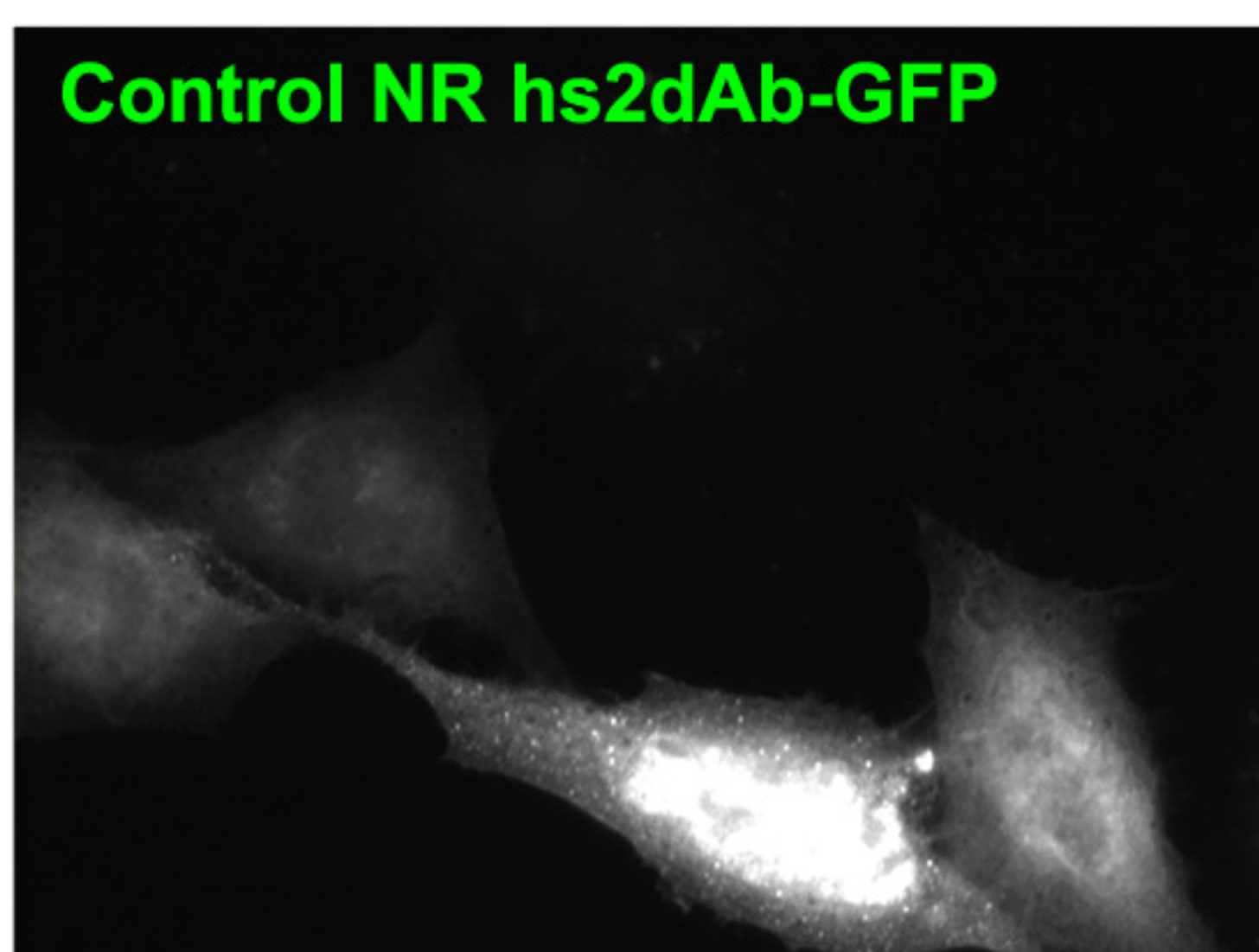
A**B****C**

Figure 5 (Perez and coll.)

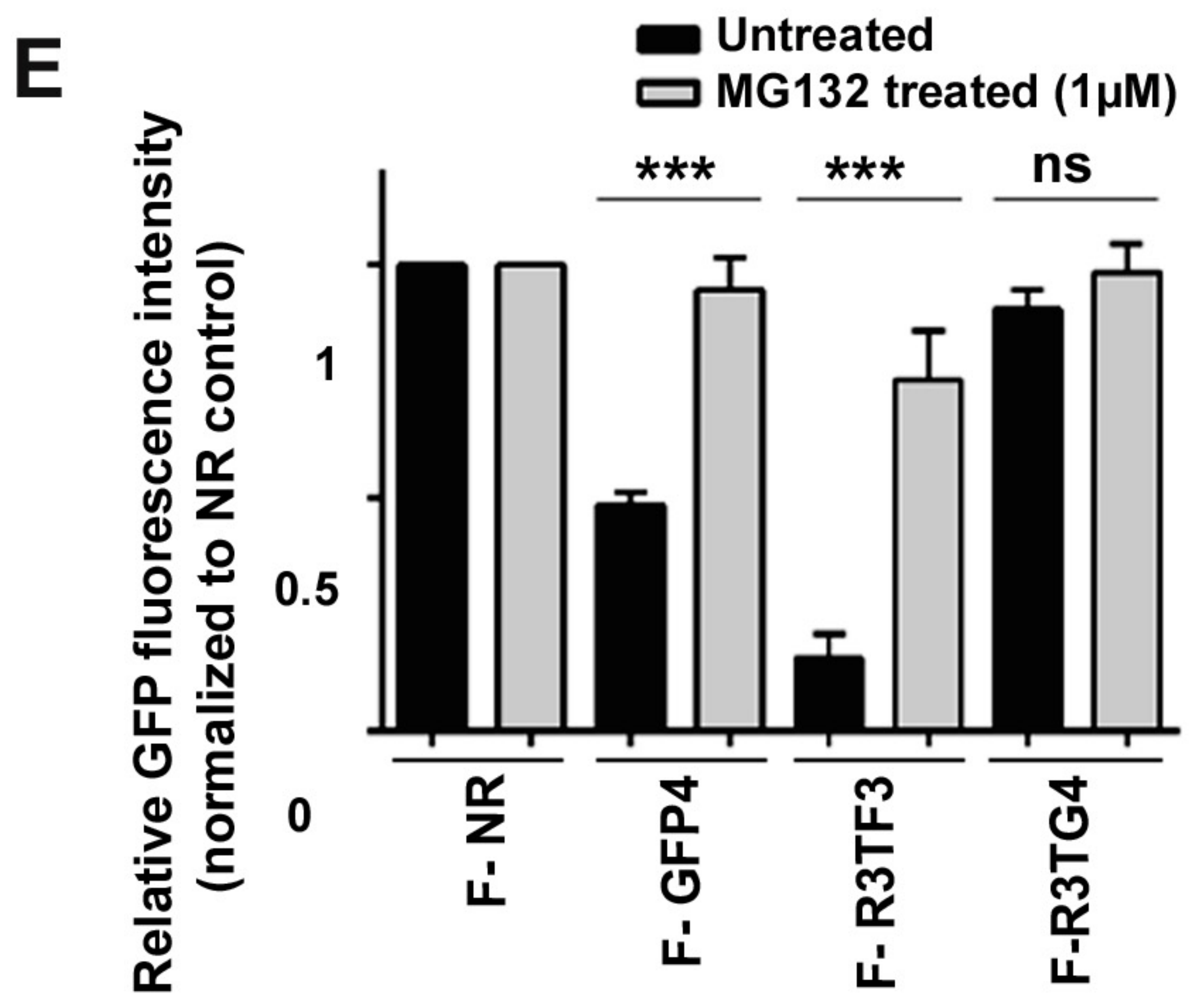
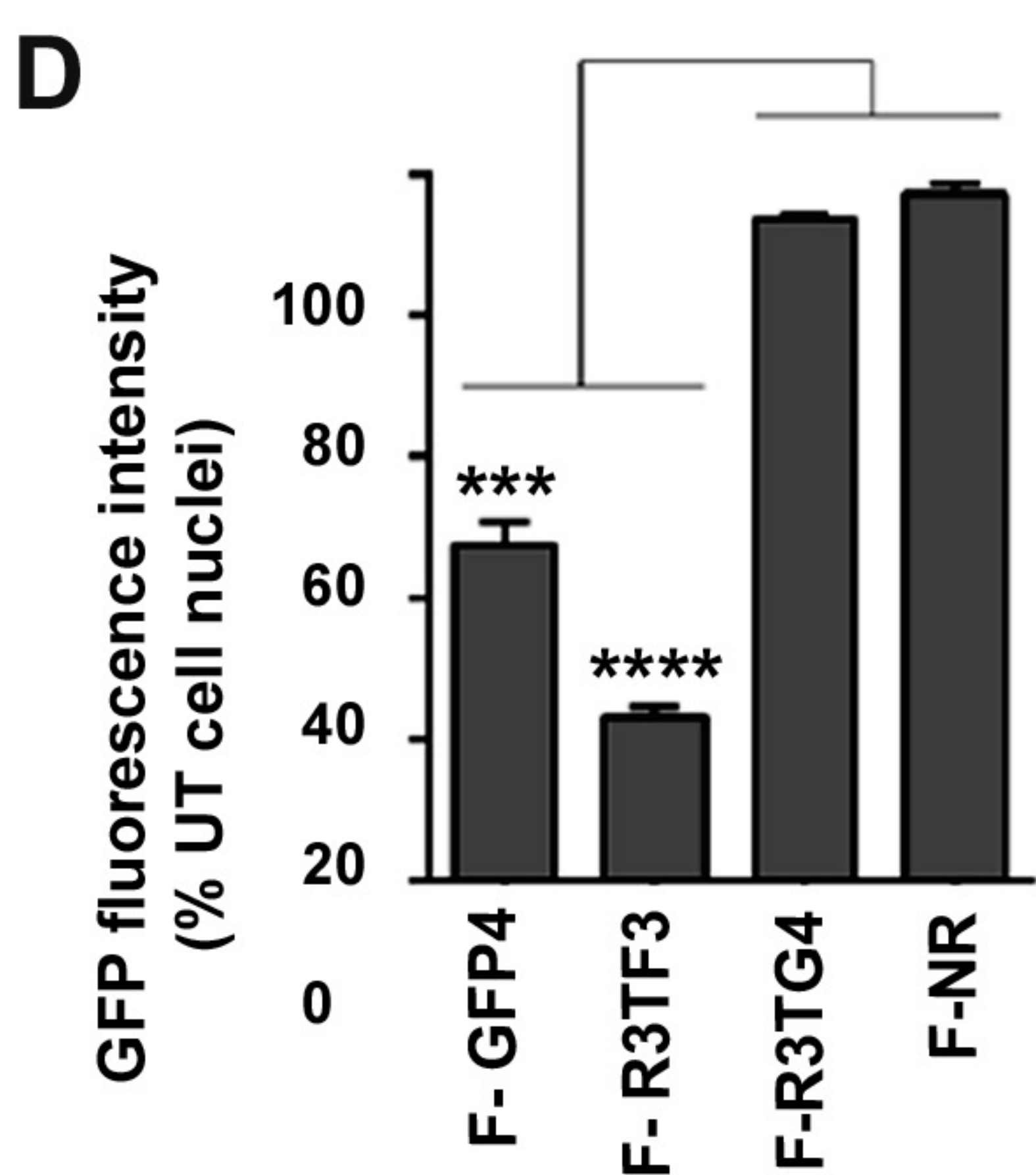
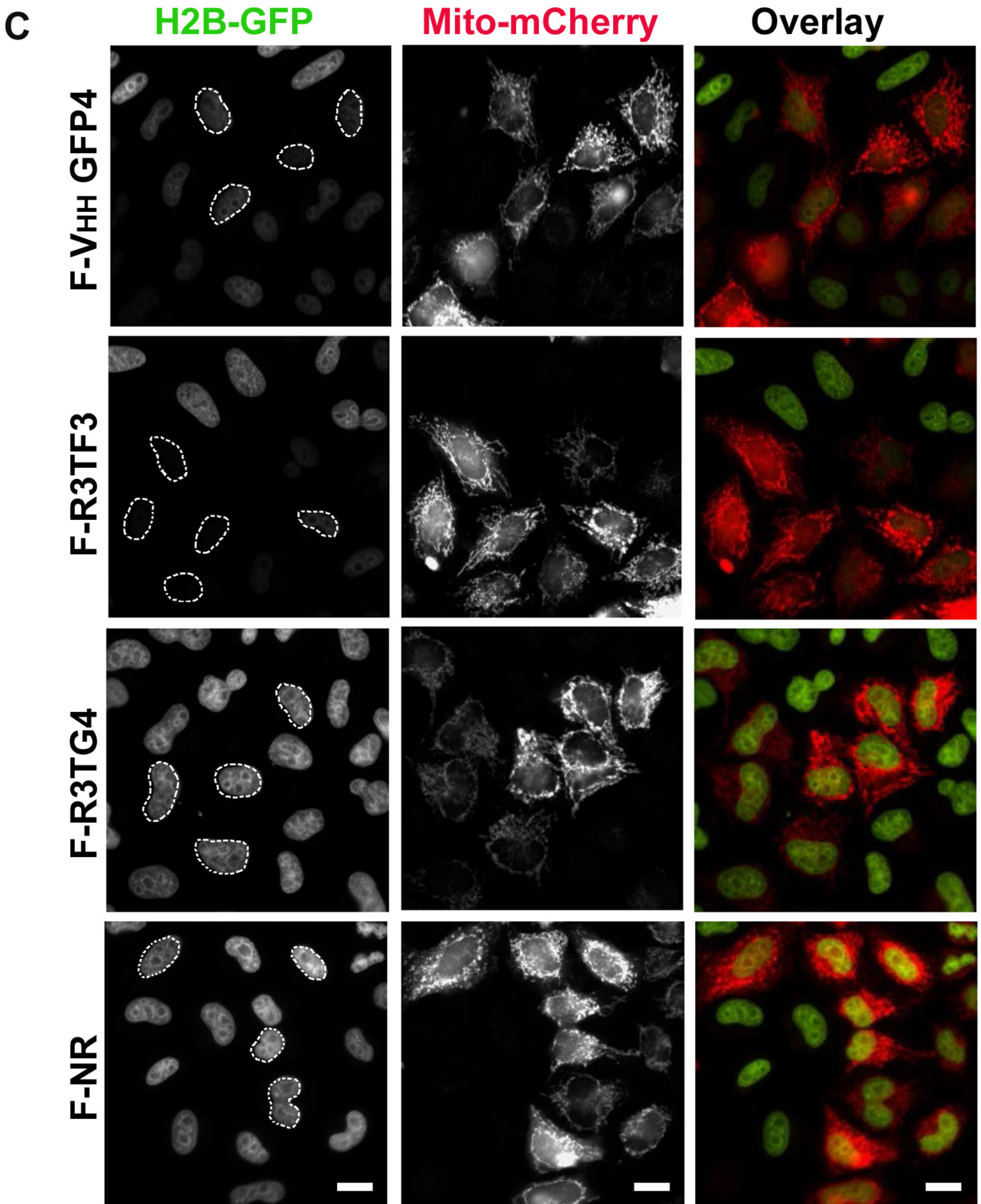
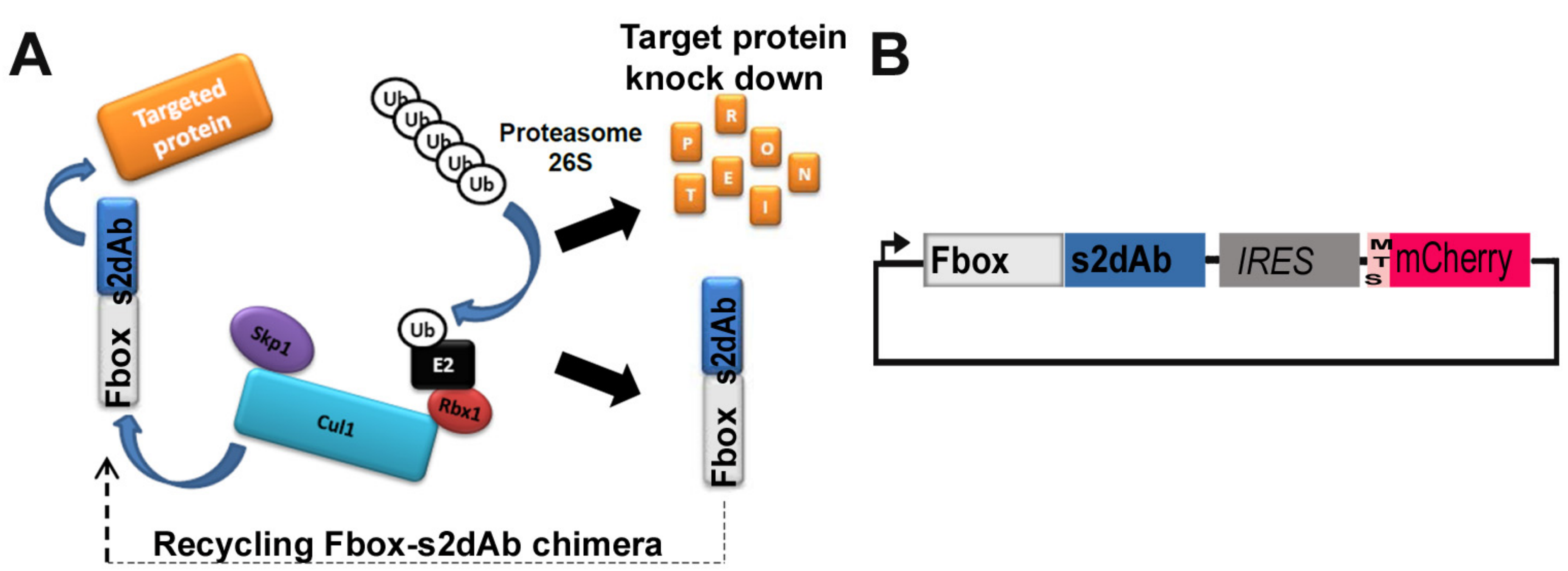


Figure 6 (Perez and coll.)

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Figure 1: Amino acids sequence frequency of the CDR1 (A), CDR2 (B) and the fourth lengths of CDR3 (C) created with Weblogo 3.3 from 5.6×10^5 sequences.

Supplementary Figure 2: protein knockdown set up using F-Ib degradation with anti-GFP intrabodies. (A) Model for F-Ib degradation by fusing Fbox domain to the VHH GFP4 inducing GFP target protein ubiquitinylation followed by proteasome dependent degradation of the target protein. (B) Schematic illustration of the bicistronic vectors: Fbox or NoFbox domain is fused to the N terminal part of hs2dAb and a transfection marker, labeling mitochondria, is under the control of an Internal Ribosome Entry Site (IRES). (C) Fluorescence visualization of H2B-GFP degradation by the degradFP, only F-GFP4 was able to induce GFP degradation in HeLa S3 H2B-GFP cells. (D) Western blot quantification of protein knockdown mediated by F-GFP4. (E) Flow cytometry quantification of protein knock down on mitoCherry transfected cells with or without proteasome inhibitor treatment. (Scale bar $10 \mu\text{m}$)

Supplementary Figure 3: Sensorgrams for the binding of hs2dAb anti-GFP, anti-p53 and anti-Her2 on immobilized antigens. Different concentrations of hs2dAb were run at 25°C and fitted with a 1:1 langmuir interaction model.

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

Supplementary Table1: Summary of screenings showing the number of unique clones giving positive signal. (ND means non determined)

Affinity measurement			
Antigen	k_a	k_d	K_D
Anti-GFP	$1.00 \pm 0.05 \text{E } 8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$3.06 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$	$3.06 \text{E}^{-8} \text{ M}$
Anti-Her2	$8.77 \pm 0.07 \text{E} 5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1.70 \pm 0.01 \text{E} 2 \text{ s}^{-1}$	$1.94 \text{E}^{-8} \text{ M}$
Anti-p53	$3.25 \text{E}^{-8} \text{ M}$

Supplementary Table 2: Binding affinities of three selected hs2dAb measured by surface plasmon resonance.

Supplementary methods

Plasmids and cloning

3 myc-Tags synthetic gene inserted in pHen2 vectort: NotI-HHHHHHGGAAEQKLISEEDLNGAAEQKLISEEDLNGAAEQKLISEEDLNGAA*(tag)-pIII-BamHI.

p53 : TP53 hMDM2 interacting domain (aa 1 to aa 83 ref NP_000537) have been cloned in pEB23, a pEMBL41 derivative in which MBP have been replaced by SNAP tag (NEB). Fusion protein has been purified using Talon resin (Clontech) from 100 ml LB culture induced for 2 hours at 37°C with 1mM IPTG. 1μM of purified protein was biotinylated using 1μM of SNAP-biotin® (S9110S, NEB) for 2 hours at 25°C and purify by G50.

Chitin binding domain (CBD) was amplified from pTYB2 (NEB) using the following oligos CBD_{Agel}fw 5'-TACATTCAACCGGTCGCCACCATGACAAATCCTGGTGTATCCGCTTGG-3' and CBD_{Tev}Rev 5'-CGAACTGAAAGTACAGATTCTCGCTGCCTTGAAGCTGCCA CAAGGCAGG-3'. RhoB cDNA was amplified from pGST-RhoBQ63L with the upstream primer Tev_{Acc}RhoB Fw 5'-GAGAATCTGT ACTTTCAGTT CGGCGGTACC GCGGCCATCC GCAAGAAGCT GG-3'. A single step pcr created the CBD_{tev}RhoB fusion product that was cloned in a pEYFP-RhoB (1) after digestion *Age*I /*Bam*HI, creating the pCBD-RhoB mammalian expression vector. RhoB was further exchange by RhoAQ63L or RhoA T19N using *Acc*65I/*Bam*HI cloning sites. The amino terminal CBD tag was replaced by either a dual Streptag (2S) or the superfolder GFP using *Age*I and *Kpn*I cloning sites. A 2S tag corresponding to a tandem repeat of the streptagII (IBA) separated by a flexible linker was gene

synthesized (Geneart). Superfolder GFP was amplified from pSuperfolder (gift from Cabantous S.) using the AgeI/SFGFPfw 5'-AATGACATACCGGTGCGCCACCATGGTGGAGCAAGGGCGAGGAG-3' and SFGFPkpnIRev 5'-AAGTCAGGTACCGCCACCGCTGCCGCCACCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG-3'.

A CBS-2S dual tag was PCR amplified and cloned at the NotI site downstream of hs2dAb in pHEN6 vector, in order to produce pHEN- hs2dAb-CBD2S.

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

A PCR was performed to extract the Fbox and noFbox sequence from the following plasmid: NSIImb-VHHGFP4 and NSnoFbox-VHHGFP4 using BspHIFboxFw (5' GTTCATGTCATGATGAAAAT GGAGACTG ACAAATAATGG 3') and FboxNcoRev (5' CAAGATCCCATGGCGAGGTGGCGGCCAGTC CGCCAGTTG 3') primers. This fragment was inserted in the p-Ib plasmid (intrabodies expression vector with CMV promoter) by digesting with BspHI and NcoI. The pIb-VHHGFP4, the pIb-Fbox-VHHGFP4 and pIb-NoFboxVHHGFP4 were obtained. Then IRES-MTS-fluorescent protein was inserted by PCR downstream of the VHH. IRES was amplified from pCCEY⁵³ with insertion of flanking downstream restriction sites AgeI, NheI and Acc65I. Then a mitochondrial targeting sequence (MTS) from subunit VIII of human cytochrome c oxidase (pEYFP-MTS, Clontech) was inserted between NheI / AgeI, followed by them Cherry between AgeI / Acc65I., thus creating the p-F-Ib_IRES_mito-mCherry ; p-noF-Ib_IRES_mito-mCherry ; p-Ib_IRES_mito-mCherry in which any hs2dAb can be inserted by NcoI and NotI cloning sites.

CATfilter assay

Previously selected VHHs from naïve or immune libraries were subcloned into pAOCAT¹⁶ using the NcoI and NotI restriction sites. Chloramphenicol resistance assay was performed using BL21(DE3) cells transformed with the pAOCAT-VHH fusion constructs. Bacteria were used for inoculating 500 μ L of LB containing kanamycin (35 μ g/mL) and glucose (0.2%), and were grown at 37°C until OD₆₀₀ was 0.8. The cytoplasmic expression of the VHH-CAT-fusion proteins was induced for 2 hours by the addition of 0.2 mM IPTG. At the end of the induction period, bacteria aliquots of 4 μ L were plated on LB-agar plates containing IPTG (0.1 mM) and increasing chloramphenicol concentrations ranging from 0 to 500 μ g/ml. Bacteria were incubated at 30°C for 20 hours before quantification of the colony formation. The resistance level was evaluated according to the colony growth rate at the different chloramphenicol concentrations. Several VHH that were giving colonies up to 500 μ g/ml were compared to previously characterized intrabodies raised against GFP (nb GFP4) or Lamin (Lam) obtained by gene synthesis (GeneArt) as well as to a thermostable VHH Re3. Liquid culture induced as above during 2 hours were diluted by serial dilution and to 10 μ L were spotted on agar plates containing 250 μ g/ml chloramphenicol (Cam) and 35 μ g/ml kanamycin and incubated at 30°C for 20 hours. Colony were imaged using ChemiDoc™ MP imaging system (Biorad).

The D10 clone was further subcloned into the pHEN6 expression vector, leading to a periplasmic expression higher than 5mg/L of culture in E coli X11blue strain.

Phage display selections

Immunotubes (Nunc) were coated with β Actin at a concentration of 20 μ g.mL⁻¹ in PBS, overnight at 4°C. Immunotubes were then rinsed with PBS and blocked for 2 h at room temperature with 2% w/v BSA or casein in

PBS. After rinsing with PBS, $> 10^{12}$ phage particles in 2% BSA or casein were added to the immunotubes. The immunotubes were first incubated on shaker for 1 h and then for 1 h standing upright at room temperature. Unbound phage was washed away by rinsing the immunotubes fifteen times with PBS 0.1 % Tween 20 and five times with PBS. The bound phage fraction was eluted in 1 mL of 1 mg.mL^{-1} trypsin and inverting the tube for 10 min and then in 1 mL of 100 mM triethylamine and inverting the tube for 10 min. Triethylamine was neutralized by adding 0.5 mL 1M Tris-HCl pH7.4. The eluted phage was used for the infection of exponentially growing *E.coli* TG1.

Biotinylated antigens or SBP-antigen were diluted to obtain a 10–20 nM (1 mL final) and confirm efficient recovery on 50 μL streptavidin-coated magnetic beads (Dyna). As a reference, 10 nM of a 25-kDa protein like GFP represents 250 ng protein/mL (hence per round of selection). Compare fractions of bound and unbound samples by Western blot using streptavidin-HRP or anti-AviTag antibodies. Incubate the adequate amount of biotinylated antigen coated beads for 2 h with the phage library (10^{13} phages diluted in 1 mL of PBS + 0.1% Tween 20 + 2% non-fat milk) Phages were previously adsorbed on empty streptavidin-coated magnetic beads (to remove nonspecific binders). Recover phage bound to streptavidin-coated beads on a magnet. Wash 10 times (round 1) or 20 times (round 2 and 3) with PBS+Tween 0.1% on a magnet. Elute bound phages using triethylamine (TEA, 100 mM): add 500 μL TEA for 10 min, recover TEA + eluted phages on a magnet and neutralize using 1M Tris pH 7.4. Repeat the elution once more. Infect *E. coli* (TG1) with the eluted phages. For round 2 and round 3, only 10^{12} phages were used as input.

Chitin binding domain from chitinase A1 (CBD) or 2strep tag (IBA) fusion of RhoA GTPase active mutant (RhoA_{L63}) were expressed transiently during 24 hours in HEK293 cells and captured freshly after cell lysis on magnetic beads before incubation with the library phages. Chitin magnetic beads (NEB) or streptactin coated magStrep HC (IBA) were use in a similar way as described above with streptavidin beads. A phage display panning alternating rounds on chitin beads with rounds on streptactin beads was performed during 4 rounds. From the second round of panning, a depletion step on GDP loaded wild type RhoA or N19 inactive mutant was included.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Briefly, individual clones from a master plate and harboring phagemids were inoculated into 250 μL of media (2xTY, 1% glucose, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ampicillin) and grown overnight at 37°C. 10 μL of this culture were inoculated into 250 μL of fresh media for 3 h. The culture was infected with KM13 helper phage, and grown overnight in 200 μL 2xTY medium supplemented with $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of ampicillin, $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of kanamycin at 25°C. Supernatants from these cultures were used in phage ELISA assays. Maxisorp ELISA plate were coated with 100 μl per well of protein antigen in 100mM carbonate buffer pH 8.6, 2h at room temperature (RT) or overnight (OVN) at 4°C. Usually 1 μg to 10 μg of antigen per well, a control plate were coated with BSA. Wells were rinsed 1 time with PBS Tween 0.1 %, and block with 200 μl per well of 2% Milk + PBS Tween 0.1 % for 1h at RT or OVN 4°C. Wells were rinsed 5 times in PBS. 20 μl of PBS Tween 0.1 % Milk and 80 μl of the phage containing supernatant were added to each well in each phage ELISA plate for 1h (antigen and blank control). Wells were washed 3 times with PBS Tween 0.1 % and 3 times with PBS.HRP-anti-pIII antibody (GE Healthcare) was added at 1:5,000 in PBS Tween 0,1% + 2% milk and incubated for 40min. Wells were washed 3 times with PBS Tween 0.1 % and 3 times with PBS. Reaction was developed with 100 μL of HRP substrate solution, e.g. ABTS (one drop of each bottle in 2,5ml

of citrate buffer) at RT for 15min and the optic density was read at 405nm. Rho-GTPases ELISA were performed as previously described.

Immunofluorescence

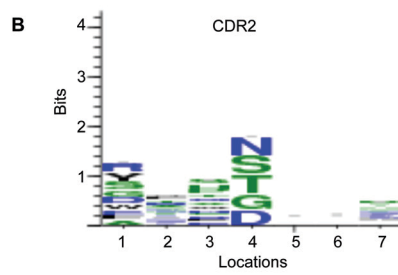
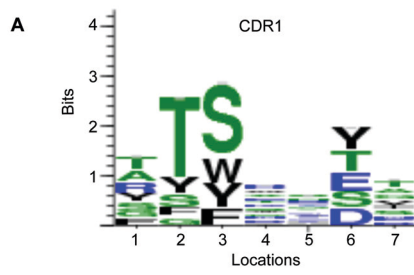
HeLa cells were either fixed in 3% paraformaldehyde and permeabilized with PBS (plus 0.05% saponin and 0.2 % BSA) or fixed and permeabilized with ice cold methanol for 4 min at -20°C. hs2dAb secreted in 600 μ L 2xTY cultures (produced in 96-deep well plates), after overnight induction with 1 mM IPTG at 30°C, were used undiluted without purification and co-incubated with 9E10 anti-myc monoclonal for 90 min. Cells were then rinsed twice and incubated with secondary antibodies for 30 min (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Actin cytoskeleton was stained with Alaxa594 phalloidin (1/1000).

Cells were grown on coverslip and transfected with F-construct 48h following the manufacturer's recommendation. Cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde for 7 min then rinsed twice with PBS and mounted in Mowiol. Data acquisition was carried out on a Nikon Eclipse 90i and image processing with NIS Elements v3 software.

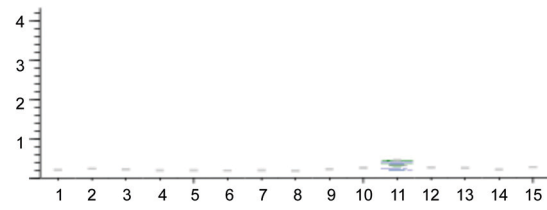
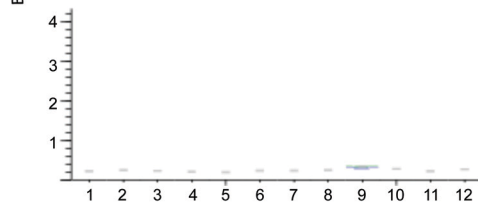
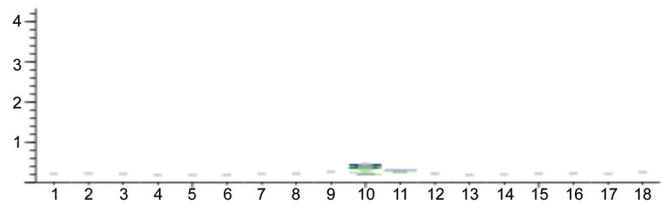
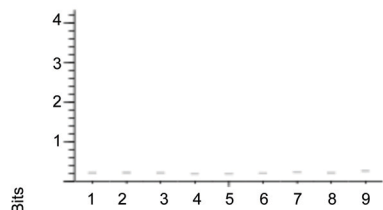
Pull down

Pull down of endogenous Rho proteins loaded in active or inactive state were adapted from well established GST-RBD pull down. HeLa cell ($5 \cdot 10^6$ per immunoprecipitate) were lysed in buffer (50mMTrispH7.4, 500mM NaCl/10mM MgCl₂/0,5% TritonX100). Crude protein lysates Extract was loaded with 0.2 mM GTP γ S or 2 mM GDP in buffer supplemented with 10mM EDTA for 30 min at 30°C. Reaction was stopped by adding 30 mM MgCl₂. For immunoprecipitation, beads bound by freshly captured CBD tag hs2dAb (4 μ g) or GST-RBD (40 μ g) positive control were incubated with loaded protein suspension for 45 min at 4°C. Beads were washed 3 times with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.1% Tween20 and denatured in 2X Laemmli reducing sample buffer, boiled for 5 minutes and separated on 12.5% SDS-PAGE for Western Blot analysis with anti-RhoA followed by HRP-conjugated secondary antibodies.

Co-precipitation of intrabodies (myc-GFP tagged) with Rho active or inactive mutants were performed after transient cotransfection of pCBD-RhoAQ63L or pCBD-RhoAT19N with pAOINT-mGFP in HeLa cells. After 20h, crude cell lysates containing CBD-Rho mutants in buffer (50mMTrispH7.4, 150mM NaCl/10mM MgCl₂/0,5% TritonX100, 10% glycerol) were incubated with chitin beads for 1 hour. Co precipitation was revealed by CBD antibody and myc antibody.

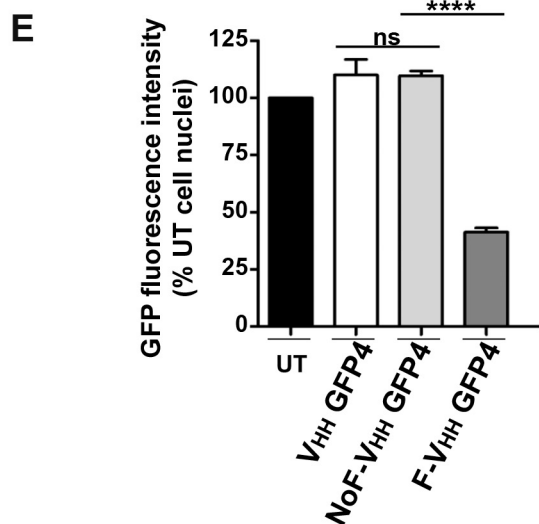
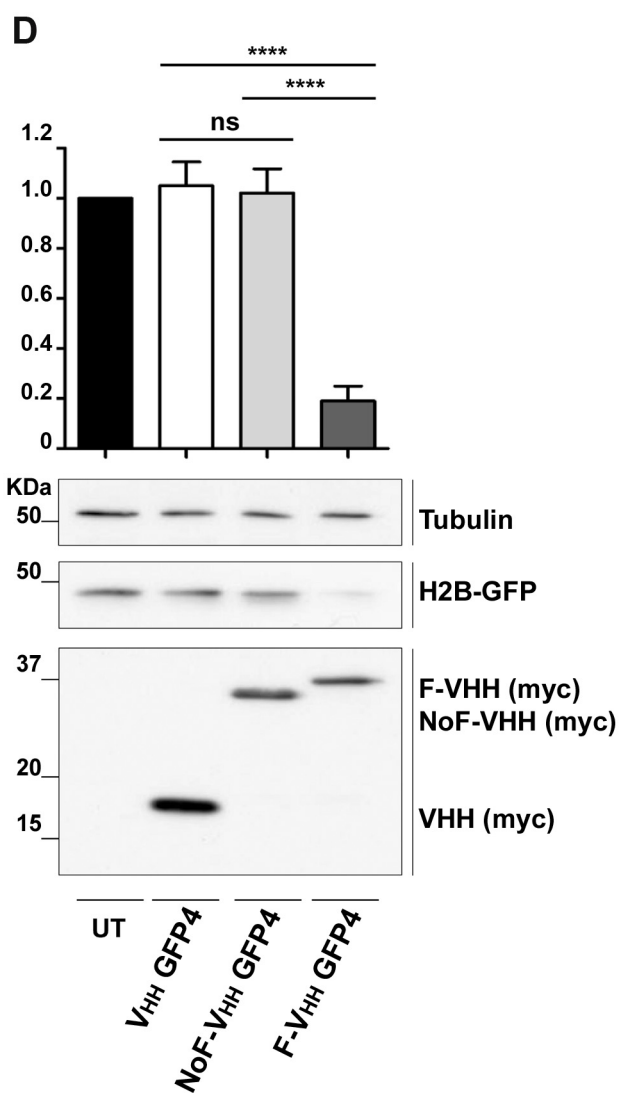
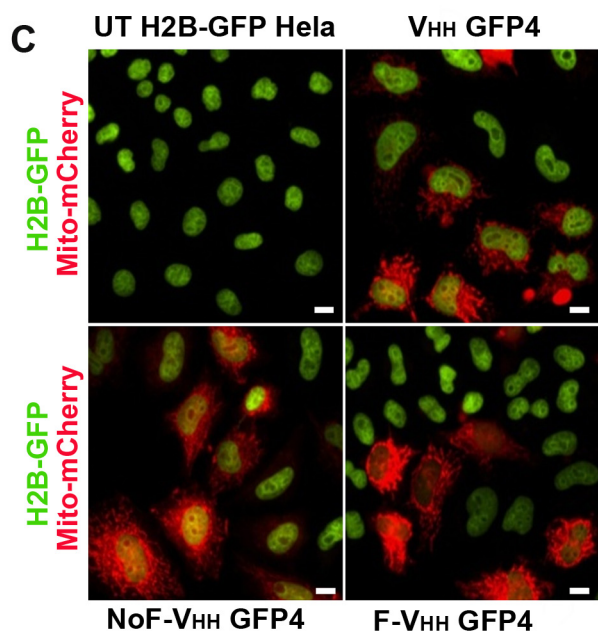
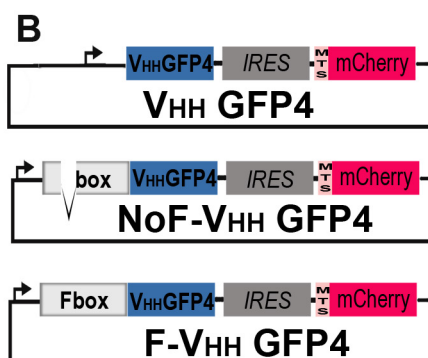
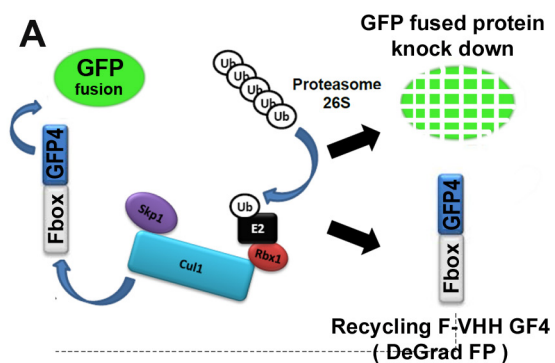


C CDR3s

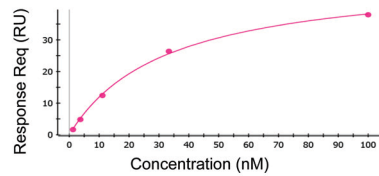
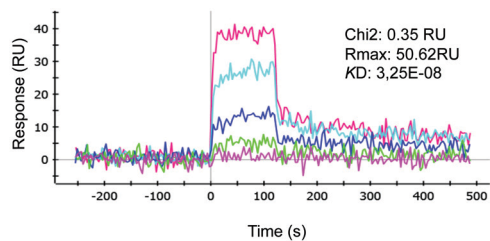
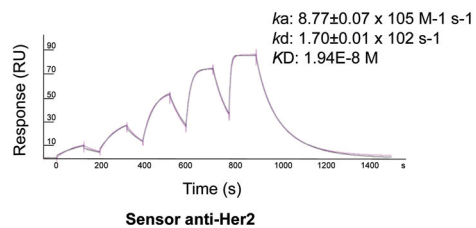
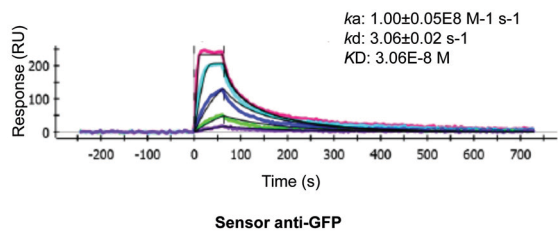


Locations

Supplemental Figure 1 (Perez and coll.)



Supplemental Figure 2 (Perez and coll.)



Supplemental Figure 3 (Perez and coll.)

Article 3 :

Nicolas Bery^{1,2}, Anne-Laure Iscache¹, Laura Keller^{1,2,3}, Rémi Gence^{1,2}, Julia Cherier¹, Gilles Favre^{1,2,3}, Aurélien Olichon^{1,2,4}. **Small GTPase RhoB selective activity knockdown mediated by functionalized conformational single domain intrabody.** Manuscrit en preparation.

Des travaux précédents nous ont permis d'isoler plusieurs anticorps biosenseurs de la forme active des GTPases Rho, dont le scFv E3 spécifique de RhoB, mais ne fonctionnant pas en tant qu'intracorps (Chinestra et al., 2014; Goffinet et al., 2008). Après avoir participé à la validation de la banque NaLi-H1, dans le but d'obtenir cette fois des intracorps, j'ai élaboré une stratégie de sélection de biosenseurs de l'activité de RhoB *via* l'approche de *knockdown* protéique développée pendant la validation de la banque.

En effet, nous avons mis en œuvre une approche de criblage par phage display permettant de sélectionner, à partir de notre banque synthétique, les anticorps capables de se lier sélectivement à la forme active de RhoB. Afin de développer un outil d'inhibition intracellulaire de RhoB, nous avons produit un vecteur permettant de fusionner le domaine Fbox d'une E3 ubiquitine ligase en amont des anticorps, puis nous avons sous cloné les sous-banques issues de sélection pour cribler les intracorps dans ce contexte. Nous avons ainsi identifié les intracorps capables d'induire la dégradation de l'activité de RhoB par le protéasome. A l'issue de ce crible, nous avons obtenu quatre candidats étant potentiellement des intracorps biosenseurs conformationnels de RhoB fonctionnant dans un contexte cellulaire sur-exprimant artificiellement un mutant actif de RhoB.

Pour la première fois, à partir d'un des quatre candidats, nous avons été capable de dégrader sélectivement RhoB-GTP endogène, sans inhiber ses homologues les plus proches RhoA et RhoC. Nous avons pu montrer l'efficacité du système en bloquant l'activation de RhoB par l'EGF, et démontrer la preuve de principe qu'un *knockdown* de l'activité de RhoB induisait un phénotype spécifique de migration et d'invasion de cellules épithéliales bronchiques (BEAS-2B) (Bousquet, 2009). Effectivement, au laboratoire ce modèle de migration/invasion est le plus établi et ses mécanismes moléculaires sont les plus connus. Pour ce modèle, il manquait essentiellement le fait de savoir si les effets de l'inhibition de RhoB (par ARNi et shRNA) sur la migration et l'invasion des BEAS-2B passait directement par l'activité.

En résumé, nous avons obtenu un outil innovant permettant la dégradation sélective de la forme active de RhoB endogène. Cette approche est l'unique moyen d'inhiber une GTPase en interagissant de façon directe avec la forme active, sans interférer avec les régulateurs du cycle. L'approche de

criblage direct d'intracorps et le *knockdown* protéique mis en œuvre ici pour RhoB pourraient être étendus à d'autres GTPases et même à d'autres protéines ayant plusieurs formes d'activités intracellulaires. Les résultats de cette partie seront présentés sous la forme d'une version préliminaire de l'article en préparation.

Small GTPase RhoB selective activity knockdown mediated by functionalized conformational single domain intrabody.

Nicolas Bery^{1,2}, Anne-Laure Iscache¹, Laura Keller^{1,2,3}, Rémi Gence^{1,2}, Julia Cherier¹, Gilles Favre^{1,2,3}, Aurélien Olichon^{1,2,4}

¹Inserm, UMR 1037-CRCT, F-31200 Toulouse, France

²Université Toulouse III-Paul Sabatier, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, F-31062 Toulouse, France

³Institut Claudius Regaud, F-31200 Toulouse, France

⁴To whom correspondence may be addressed. E-mail : aurelien.olichon@inserm.fr

Abstract

Single domain antibodies (sdAb) provide advantages of a small size and a better stability than other recombinant antibody fragments. Therefore, they can be suitable for intracellular applications as intrabodies (Ib) to track or inhibit antigen in living cells. In this way, we developed and characterized the NoLi-H1, a new highly functional synthetic single domain antibodies (hs2dAb) library based on a unique synthetic scaffold optimized for intracellular stability and contains 3.10⁹ independent hs2dAb (Moutel S*, Béry N*, *et al*, submitted). One goal in our lab is to find a way to inhibit selectively the active form of the small GTPase RhoB but not its RhoA and RhoC closest homologs. To this aim, we established a direct *in cellulo* intrabodies screening method by functionalizing hs2dAb with the Fbox domain of an E3 ubiquitin ligase (F-Ib) in order to induce proteasome dependent target degradation. We identified several conformational intrabodies degrading RhoB active mutant (RhoB_{L63}). After further characterization of selected F-Ibs, we found one conformation-specific intrabody selective of endogenous RhoB.GTP and applied this tool to inhibit RhoB activity. We demonstrated that this F-Ib is efficient to inhibit the fast process of RhoB activation mediated by EGF. Finally, we showed that RhoB activity knockdown is critical for motile and invasive phenotypes acquisition of human bronchial cells.

Rho GTPases belong to the family of the 20 small GTPases homologous to Ras which are largely considered as undruggable proteins. Their physiologic activity resides more in a conformational change of the switch I and switch II highly conserved domains than in their guanine nucleotide triphosphate hydrolase very slow catalytic activity. Small G proteins are therefore molecular switch that cycle between an inactive GDP bound state an active GTP bound conformation. The Rho subfamily, which contains RhoA, RhoB and RhoC that share more than 85% sequence identities are pleiotropic proteins involved in a wide range of major cell processes, including the control of actomyosin cytoskeleton, cell adhesion, cytokinesis, cell migration, stress response as well as cell survival or apoptosis¹⁻⁴. These GTPases are post-translationally modified by addition of a carboxy terminal isoprenoid group necessary for their anchorage to cellular membranes, where they can be activated upon various stimuli by an exchange of nucleotide catalyzed by Guanine nucleotide Exchange Factors (GEF). Activation step is then counterbalanced GTP hydrolyses which is enhanced by GTPase Activating Proteins (GAPs). Therefore the cellular pool of activated Rho is maintained at the cellular membrane to limited pool. The major fraction is extracted from the membrane and sequestered in the cytoplasm by Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors (GDI). These large proteins interact by their amino terminal part with the switch domains of Rho, thus preventing the release of the GDP, and also by their carboxy terminal part to the isoprenyl group, shielding this hydrophobic moiety in order to maintain the Rho proteins soluble while excluded from membranes.

Together these regulators maintain the largest fraction of Rho Proteins inactive in the cell, often as much as 95 %, in order to quickly activate a very small population that will interact with effector proteins to initiate cellular transduction pathways. Moreover study of the crosstalk between the 3 GDI and all interacting Rho revealed that overexpression of a single Rho can induce artificially displacement and degradation of others and impair signaling pathways not directly controlled by the transgene⁵. This critical point highlight the complexity of targeting individual Rho in a selective manner.

The peculiar RhoB seems to be involved in different cellular functions and regulations than its closest homologs RhoA and RhoC. RhoB can be palmitoylated and either farnesylated or geranylgeranylated, prenylation which define localization to the plasma membrane or the endosome respectively⁶. Some main RhoB functions in intracellular trafficking and adhesion have been characterized using conventional molecular tools such as overexpression of wild type or mutants or genetic knock down by RNA interference^{7,8}. Other functions have been connected to RHOB gene expression as an immediate early response to cytokines or growth factors⁹ as well as DNA damaging agent^{10,11} or radiation^{12,13}. In addition, RhoB plays paradoxical roles in cancer progression. RhoB can alter tumor formation and is often down regulated in head and neck or lung cancers^{14,15}. Nevertheless RhoB is also promoting tumor angiogenesis¹⁶ and protecting from apoptosis in cells with genomic instability¹⁷. There are now clear evidences that RhoB exert pleiotropic functions which are cells and context dependent. Previous study targeted RhoB at the genetic level by overexpression, RNAi or gene knock out in mice. However these methods altered RhoB functions in a global way, knocking down all RhoB activities in cells, but mostly altering both the GDP bound major fraction which can induce imbalances in the GDI-Rho interactions and the minor GTP bound active pool. To decipher RhoB function without interfering with other Rho activities, it would be necessary to target RhoB at the protein level. Albeit there are no small molecule inhibitors targeting Rho GTPases, the C3 exoenzyme from *Clostridium botulinum* or *Bacillus cereus* are natural inhibitors that induce ADP-ribosylation of Rho, preventing their activation by GEF and further increasing the binding of free Rho to GDI^{18,19}. Actually expression of C3 gene in eukaryotic cells or incubation with cell permeable tat-C3 has been successfully used to alter globally the function of all 3 Rho, leading to a strong phenotype of actin fiber loss and cell rounding^{7,20,21}. Several other bacterial toxin target as well Rho proteins¹⁹. Nevertheless all these toxins lack specificity because they do not discriminate between RhoA, RhoB or RhoC and do not block directly the activated form of Rho.

In our previous studies we established the selection of recombinant single chain antibodies from phage display libraries in order to identify binding molecules selective to the active GTP bound state of Rho proteins. Actually recombinant antibody selected from large display libraries have been used in many biotechnological or biomedical applications. Although most of recombinant antibodies require for stability the canonical disulfide bond within the VH or VL variable domains, some peculiar intracellular antibodies, referred as intrabodies, remains stable in the reducing environment. Thus, depending on the antibody format, the scaffold properties and the library diversities, some rare recombinant antibodies have been reported to be functional while expressed in the cytosol of eukaryotic cells²²⁻²⁴. The first active Rho conformational single chain variable fragment (scFv), named scFvC1, recognized *in vitro* in biochemical assays the GTP bound state of all 3 Rho²⁵. A molecular evolution of scFvC1 led to the identification of the scFvF7, a higher affinity pan active Rho binder than scFvC1, as well as the scFvE3 that preferentially recognizes active RhoB but is not functional as an intrabody (Chinestra et al., accepted). In a following study, we produced together with Perez laboratory the NaLi-H1 library (Moutel et al., Submitted), which is the first fully synthetic library of humanized nanobodies, common name of single domain VH from *camelidae*²⁶. This novel phage display library, based on a unique scaffold optimized for stability, allowed the systematic selection of highly functional binding molecules, which correspond to humanized synthetic single domain antibodies (hs2dAb) (Moutel et al., Submitted). We especially selected towards various targets several functional intrabodies, among which one conformational sensor of the active GTP bound state of Rho proteins, a clone referred as H12 hs2dAb (Moutel et al., Submitted). Nevertheless, as the scFvF7, the H12 hs2dAb is a pan Rho binder that do not discriminate between RhoA, RhoB and RhoC.

Here we propose a novel approach to target and inhibit selectively RhoB activity in cells. This approach can be applied to any Rho GTPase or even to any protein which show various conformations and related activities in cells. The initial strategy was based on the selection, from our large phage display library of synthetic nanobodies, of a set of conformational recombinant

antibodies enriched in binders that recognized RhoB in its GTP bound state. Then we established a visual in-cell screening of functionalized intrabodies that can induce active RhoB protein knock down. A convenient aspect of a direct screen for intrabodies relied in the fact that selected inhibitors will be functional in further characterization assays. The protein knock down was based on the use of an Fbox domain genetically fused to the nanobody, which induce ubiquitinylation of the bound target and subsequent proteasome dependent degradation²⁷. A dual challenge was to identify an intrabody which can physiologically discriminate RhoB from the closest homologs while being selective of the active GTP-bound state. Using cell lines expressing various Rho mutants, we could select a robust genetically encoded RhoB inhibitor selective of its active state and demonstrated the efficiency of this unique tool to knock down endogenous RhoB active fraction, not only depleting its basal activity but also blocking its cellular activation after growth factor treatment. Furthermore, in a proof of principle study we demonstrated that subtle RhoB activity knock down did not displace the whole cellular fraction of RhoB but induced similar phenotype as RNAi on human bronchial epithelial cells migration and invasion²⁸.

RESULTS

Direct selection of intrabodies by visual screen of fluorescent protein knock down

In the goal of interfering with RhoB activity in cells using intrabodies, we established a strategy starting with a phage display selection then followed by in-cell screening aiming at the identification of a functional inhibitory intrabody. In the past decade we established sophisticated phage display selection scheme in order to isolate binders discriminating the GTP conformation of Rho proteins. To preserve the native conformation of RhoB during the selection, bait antigens were expressed in mammalian cells and freshly extracted and used in the nanomolar range during the incubation with the NaLi-H1 library phages. A competitive panning selection was carried out using a constitutively active mutant RhoB_{L63} after a preclearing step in the presence of an excess of GDP loaded wild type RhoB to enrich in binders more selective towards RhoB than its closest homologs (Sup.Fig1). After two round of enrichment, we added a 5 molar excess of RhoA_{L63} and RhoC_{L63} to further compete with the bait. After controlling positive enrichment of binding phages to a bacterially expressed and purified GTS-RhoB_{L63} in phage ELISA, we wanted to develop a direct screening for RhoB intrabodies. We learned from our previous experiences in recombinant antibody technologies that such monoclonal binding domains efficacy can be very assay-dependent, namely that positive one in ELISA screen often failed to work in immunofluorescence or vice versa. We also isolated intrabodies using a selection scheme base on co-localization of a fluorescent fusion of the nanobody with the target. Then when we functionalized a set of these tracking intrabodies, replacing the GFP by a proteasome targeting domain to degrade the antigen, there was surprisingly no correlation between the best tracker and the best degrader (Moutel et al., Submitted). Therefore we reasoned that the best way to identify an intrabody that work in a specific assay would be to screen directly in the final format.

Here we chose to inhibit RhoB by inducing its proteasome mediated degradation. Several functionalization of intrabodies mend to induce degradation of the target^{27,29,30}. One of them consist in fusing the Fbox domain of an Fbox protein. Fbox protein contains two modular domains, one for target recognition and the Fbox domain that interact with Skip1, a component of the SCF E3 ubiquitin ligase complexe, which induce polyubiquitinylation of the Fbox protein target followed by subsequent proteasomal degradation. Replacement of the target binding domain with an intrabody can specify the target, therefore inducing degradation of the antigen (Fig1A). One advantage of that knockdown strategy is that the Fbox-intrabody (F-Ib) act in a catalytic manner and is not co-degraded. Another one resides in the fact that if degradation is observed, this report indirectly the intracellular interaction between the antigen and the nanobody. The main drawback can be that the targeted antigen does not display ubiquitinylation site, but it is not the case for small GTPases or any protein that could be degraded naturally by the proteasome. We have previously tested this strategy for several anti-GFP hs2dAb intrabodies (Moutel et al., Submitted) and constructed a plasmid which allow the expression of an amino terminal Fbox domain from

drosophila slmb gene²⁷ fused to hs2dAb and a carboxy terminal myc tag upstream of a mitochondrial fluorescent reporter gene expressed as a second cistron translated from an IRES. We choose to set up a visual screen of target degradation by fusing RhoB to a fluorescent protein. To mimic active RhoB, we choose to express a constitutively active mutant RhoB_{L63}, which is strongly impaired in catalyzing GTP nucleotide hydrolysis, thus remains in the GTP loaded active state. To avoid binding crosstalk with endogenous RhoB, we used a RHOB^{-/-} lung epithelial cell line H2882³¹. As RhoB_{L63} expression toxicity did not allow us to produce a stable cell line, we constructed a chimera which consist in a sequence coding an amino terminal histone H2B, followed by the mCherry fluorescent protein and a carboxy terminal RhoB_{L63} deleted for the 5 terminal amino acid that correspond to the palmitoylation and prenylation signals. This fusion protein loss the membrane anchorage capacity and was artificially incorporated to the chromatin nucleosomes, giving a fluorescent signal in the nucleus while displaying active RhoB_{L63} mutant at a localization which appeared to be nontoxic to generate a stable cell line, referred as HmB (Sup.Fig2A). To control the binding specificity to RhoB_{L63}, a cell line expressing only H2B-mCherry was generated as well, referred as Hm (Sup.Fig2A). We hypothesized that if a Fbox-hs2dAb is a stable F-Ib, if interaction occurs specifically with RhoB_{L63}, a decrease of nuclear mCherry fluorescence would be observed in the HmB cell line but not in the Hm one. Therefore a fluorescence decay correlated to RhoB_{L63} degradation could be the basis of a visual screening for F-Ib RhoB inhibitors. Chromatin quantity and density is cell-dependent, fluctuating according to the cell cycle, giving a slight heterogeneity in the cell nuclear fluorescence could (Fig1B). Another source of cell-dependant heterogeneity in a screen based on transient plasmid transfection comes from the variable plasmid copy number, the transfection efficiency and the relative expression level of F-Ib. To better assess these parameter, we used our F-Ib bi-cistronic expression vector with a monomeric GFP targeted to the mitochondrial matrix as a reporter gene and set up the assay using two negative hs2dAb in this screening, referred as F-NR that is non relevant to RhoB phage display and the F-20, previously selected towards RhoB but that is not a degrading intrabody. In summary, the visual screen reside in the observation of mCherry nuclear fluorescence decay in cells showing GFP fluorescent mitochondria (Fig1B).

After 4 rounds of panning, hs2dAb sequence were digested in pool and directly inserted in the F-Ib bicistronic vector (Fig1B). Although such polyclonal subcloning could lead to a certain extend to diversity loss compared to the phagemid sublibrary, we reasoned that in conventional phage display strategies, only a set of randomly picked colonies are screened and that the effective enrichment of specific binders during phage selection have less probability to be not transferred during subcloning. After a single cloning step, we screened several hundred of F-hs2dAb, by transient transfection of individual plasmid clones in both cell lines (HmB and Hm), and observed the mCherry fluorescence intensity on an inverted microscope. After sequencing positive hits, we identified four unique clones that induced a strong decay of mCherry fluorescence in HmB cell transfected cells only in comparison with to the two negative internal controls F-NR and F-20 (Fig1B). One of the selected clones was the H12 hs2dAb, which is the pan active Rho that was previously identified from that NaLi-H1 library. The fluorescent decay quantification on some selected field suggested that these F-Ib were inducing degradation of H2B-mCherry-RhoB_{L63} depending on the presence of RhoB_{L63}. Then, these results were further quantified by flow cytometry, confirming that F-H12, F-6, F-15 and F-5 degrade selectively H2BmCherry-RhoB_{L63} and showing that F-H12 and F-6 are the most efficient F-Ib (Fig1C).

Characterization of selected F-Ib

The fusion of a Fbox domain to a peptide³² or an intrabody^{27,30,33} have been reported to mediate target degradation by the proteasome in various cellular context. Despite we observed a clear fluorescence decay in our screen, we wanted to decipher the F-Ib knockdown mechanism in the context of H2882 stable cell lines. We started by controlling localization of Fbox-hs2dAb-myc constructs in HmB stable cell line using immunofluorescence staining of myc tag F-Ib. In contrast to a whole cell staining for the controls F-NR and F-20, we observed a nuclear localization of the staining for each of the for positive F-Ib (F-H12, F-6, F-15 and F-5) (Fig2A).

To confirm whether the presence of the Fbox domain was responsible to the degradation, we expressed hs2dAb alone in Hm and HmB cell lines and observed no decrease in mCherry fluorescence (Fig2B). Next, using the MG132 proteasome inhibitor, we controlled that the observed degradation was proteasome dependent. In comparison to DMSO treatment that barely reduce the 4 F-Ib induced fluorescent decay quantified by flow cytometry, the treatment at 1 μ M of MG132 during 36h restored the mCherry fluorescence almost to the control level (Fig2C). Finally we analyzed whether the fluorescence decay was a direct effect of the F-Ib expression by quantifying the fluorescence after decreasing the quantity of plasmid in the transfection from 2 μ g to 0. A dose-response direct effect was observed for the effective F-H12 and F-6, as the lower was the plasmid concentration the higher was the fluorescence signal (Fig2D). Together these results demonstrated that the F-Ib selected by the direct visual screening were specifically targeting and degrading in a proteasome dependent manner the RhoB_{L63} delta CAAX protein concentrated on the chromatin.

Specificity and conformational selectivity of the selected F-Ib

The H12 hs2dAb is a conformational sensor and a blocking intrabody of the GTP loaded Rho proteins without distinction between RhoA, RhoB, RhoC homologs and even recognizing Rac1 GTPase (Moutel et al., Submitted). The fact that it was enriched and selected again in this study was not surprising as in previous panning its enrichment was very high in the early round of selection as its representation was above 50% of the clones at the third round of panning on RHoA_{L63}. Despite here we introduced competition with active RhoA and RhoC, H12 was not totally eliminated from the selection, suggesting that others newly selected hs2dAb could also be pan Rho as well. Nevertheless H12 enrichment was much lower, suggesting that the new subtractive selection was at least partially efficient. To determine the selectivity of the selected F-hs2dAb, we produced different stable cell lines on the same basis than H2B-mCherry-RhoB_{L63}. Transfection of H2B-mCherry-RHoA_{L63} and H2B-mCherry-RhoC_{L63} failed to produce stable cell line and the heterogeneity of transient expression did not lead to conclusive quantification of fluorescence decay (data not shown). However the generation of a similar cell line was possible with H2B-mCherry-Rac1_{L61}, Rac1 being the closest homolog of the Rho subfamily mainly in the switch domains (Sup.Fig2B). As expected, F-H12 induced a fluorescence decay in the later cell line. Among the other selected F-Ib, F-5 was also affecting the fluorescence level of the H2B-mCherry-Rac1_{L61} but F-6 and F-15 failed to degrade the active form of Rac1 (Fig3A). These results were further confirmed by co-expressing transiently the 4 selected hs2dAb as GFP fusion together with H2B-mCherry or H2B-mCherry-Rac1_{L61} in HeLa cells. Only H12 and 5 were localized in the nucleus while Rac1_{L61} was concentrated on the chromatin (Fig3B). At this point we pursued the study without the hs2dAb 5 or its F-5 functionalization but we kept the hs2dAb H12 as a pan active Rho control. Then we addressed the conformational selectivity of the remaining F-Ib by comparing their effect on a RhoB_{N19} mutant which is supposed to be mainly inactive as the same mutation lead to a GTPase defective in the nucleotide binding for other Ras homologs³⁴. We generated a H2B-mCherry-RhoB_{N19} stable cell line (Sup.Fig2B) in order to determine the conformational selectivity hs2dAb expressed as F-Ib in our fluorescence decay assay. After FACS analysis, all effective F-Ib were degrading only the active mutant of RhoB and not the inactive form (Fig3C). This result correlated with the nuclear localization of GFP fusion of the positive hs2dAb observed while co expressed with H2B-mCherry-RhoB_{L63} but not H2B-mCherry-RhoB_{N19} (Fig3D). These results indicate that F-6 and F-15 are conformational hs2dAb that preferentially recognize RhoB in its active conformation.

Endogenous RhoB activity knockdown

We then investigated whether these intrabodies were able to degrade the endogenous active form of RhoB. To this end we used HeLa S3 cells, a common cell line that express significant amount of RhoB protein with a detectable basal level of active RhoB. The standard method to assay the Rho GTPase activity is based on a pull down using the GST-RBD³⁵. RBD is the Rho Binding Domain from Rhotekin, a common effector of the three Rho which interacts only with the GTP bound

Rho³⁵. After 48h of transient transfection of F-Ib, pull down of RhoB basal active fraction was lower in cells transfected by F-6, F-15 or F-H12 than with the controls F-20 and F-NR. Detection of RhoA and RhoC allowed to assess whether their basal activities were also affected. As expected F-H12 induced a strong decrease in the level of all 3 Rho active fractions. However, the level of the 3 active Rho was not decreased equally for the F-15 and F-6 expression, suggesting that they do not have the same selectivity than F-H12. In contrast to the F-15 hs2dAb that induced degradation of both active RhoB and RhoA, F-6 did not induced apparent modulation of RhoA or RhoC pulled down fractions (Fig4A). Quantifications indicated that F-6 degrades solely RhoB activity in this cellular context and assay conditions (Fig4B). This result is the first example of a molecule which would discriminate RhoB from RhoA in their GTP loaded state and that would enable their cellular proteolysis.

To investigate whether the protein knockdown observed 48h post transfection with the F-6 was direct and specific, we targeted the fast process of cellular activation of Rho proteins. Actually RhoB and RhoA, and to a lesser extend RhoC, have been reported to be activated in few minutes after an EGF treatment³⁶. After 24h of serum starvation, activation kinetics of each Rho by EGF was assessed in HeLaS3 cells. Activation was observed as soon as 5 minutes after stimulation for all 3 Rho and reached a maximum at 15 minutes, which was chosen as activation time for further experiments (Fig5A). We characterized the effect of F-H12 and F-6 on Rho activation and confirmed the selective observed degradation of RhoA/B activity. While F-NR or F-20 controls did not prevent EGF mediated Rho activation, F6 degrades only RhoB activity induced by EGF whereas FH12 inhibit all Rho activities indeed (Fig5B, C & D).

In conclusion, the hs2dAb 6 seems to be a RhoB-GTP very selective intrabody, which is able to block RhoB basal activity as well as its stimulated activation while functionalized as F-Ib, without down regulating major fraction of cellular RhoB.

Determination of RhoB activity role in migration and invasion of human bronchial cells

Our lab has previously shown that RhoB protein is involved in migration and invasion of human bronchial cells (BEAS-2B cells). RNAi targeting selectively RhoB induced an effective down-regulation correlated to an increase in migratory and invasive properties. That study suggested for the first time a link between RhoB extinction in lung cancers and acquisition of a motile and invasive phenotype²⁸. To address whether global extinction of RhoB or only its minority active fraction was directly involved in this phenotype, we analyzed the effect of the F-6 in this model. After reproducing the RNAi knockdown in BEAS-2B cell line (Sup.Fig3), we first determined F-6 functionality and selectivity by transient transfection. Despite a low transfection rate in BEAS-2B cells, which made biochemical analysis of the extinction level difficult, we observed that F-6 induced an apparent increase in migration in the two-dimensional wound-healing assays compared to control F-Ib (Sup.Fig 3). To better control the expression level and to work on a more homogenous cell population, we produced lentivirus expressing either F-NR or the F-6 under the control of an inducible promoter. Dose response of doxycycline induced a selective down-regulation of active RhoB reaching its maximum at $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and corroborating with the relative expression of F-6 (Sup.Fig4). Cell migration was analyzed in a transwell system after 24h doxycycline induction of F-Ib expression. Migration was significantly increased by a factor 2 in cells expressing F-6, suggesting that inhibiting solely RhoB activity was sufficient to induced the phenotype observed by siRNA global knockdown (Fig6A). Next we performed invasion assays in matrigel and demonstrated that RhoB-GTP down regulation mediated by F-6 was directly involved in promoting the invasive phenotype of BEAS-2B cells (Fig6B). We further confirmed the pathways involved downstream of RhoB activity. Actually we reported previously that Akt1 was phosphorylated in BEAS-2B cells treated by RhoB siRNA and that the GTPase Rac1 known to be involved in promoting migration was activated. Accordingly, immunoprecipitation of Akt1 revealed that F-6 expression induced an increase in Akt phosphorylation (Fig6C). Moreover we observed a significant activation of Rac1 upon doxycycline treatment in specifically in cells expressing the F-6 (Fig6D&E). Together these results showed that the F-6 RhoB selective inhibitor is functional in a physiological model and reproduced the whole panel of

characterized phenotypes associated with RNAi down-regulation of RhoB. In addition they demonstrated that the Akt1/Rac1 mediated pathway responsible of the invasive phenotype is tightly regulated by RhoB GTP loaded active conformation. Accordingly, RhoB inactivation more than extinction might be one cause of some lung cancer invasiveness.

Discussion

Deciphering Rho GTPases cellular functions is a challenging task because of a tight cross talk between their major partners, the GDI, which maintain them sequestered in their inactive state. Their activity regulates so crucial cellular processes that their activation is tightly regulated in normal cells and that dysregulation of their expression or regulation is frequently observed at the different stages of cancer progression. RhoB is regulating pathways very different, going from DNA damage response to cell motility, and is supposed to be involved in early stages of cancer progression but to be lost in later invasive stages¹⁷. Noteworthy, RhoB has been studied in tumors at the expression level but not its activity that is responsible of dramatic cellular changes, although weighting a minute fraction. In this study we presented a novel way to study small GTPase function by altering only the active GTP loaded activity using genetically encoded inhibitor. Because of high affinity and specificity properties of nanobodies selected from phage display libraries, we reach the challenge to isolate hs2dAbs that are conformational biosensors of active Rho GTPase, and further identified the clone 6 which showed a clear selectivity towards RhoB. Discriminating proteins among the subfamily of Rho is not obvious because RhoB share more than 85% identities with RhoA and RhoC and this homology even reach 95% in the switch domains. In previous studies we already tried to reach all these challenges but could only select sensors for in vitro applications (Chinestra et al., accepted). We believe that the use of a very large library of highly functional nanobodies allowed the selection of a diversity of binders high enough to implement drastic subtractive selection that is mandatory to isolated an hs2dAb such as the RhoB selective clone 6. In addition, performing a screen directly in cells to select clones which are functional in the final assay format led to the identification of a single hs2dAb that compiles all required features. As this hs2dAb 6 was not enriched like the H12 or the 20 were, it is highly probable that initial in vitro characterization for binding selectivity might have failed to provide a tool that would later work in the functionalization F-Ib format to knockdown RhoB activity. Moreover, the GST-RBD pull down method has a low linearity scale and is very time sensitive, therefore hardly suitable to implement a large scale screening.

Inhibiting RhoB activity, as well as other small G proteins is another long standing challenge. Pharmacological inhibitors of isoprenyl transferase preventing non specifically small G membrane anchorage were initially reported³⁷. Rational drug design led to the identification of a small molecule inhibitor (NSC23766) that interferes with the interaction of Rac1 with only some GEF³⁸. Screening based on displacement of interactions between some specific GEF and Rac1 also allowed the selection of selective GEF inhibitors³⁹. A more generic Rac1 inhibitor destabilizes the nucleotide⁴⁰. For the Rho A, B, C subfamily only some Rho effectors inhibitors have been identified⁴¹ and the non-selective bacterial toxins (tat C3). Another strategy based on p190-RhoGAP engineered with the carboxy terminal region of either RhoA, RhoB and RhoC allowed the rescue of some phenotypes induced by overexpression of RhoA and RhoC active mutants in NIH3T3 cells but did not demonstrate that endogenous proteins were targeted⁴². Our study provides the first example of very selective inhibition of an endogenously expressed single Rho active fraction. Selectivity towards RhoB and efficacy of the functionalized hs2dAb reached the one of RNAi approach but without affecting the whole cellular pool of the protein, therefore preventing displacement of partners shared with other GTPases. Taking advantages of targeting the protein level and being a genetically encoded inhibitor, future engineering of F-6 will allow a better spatio-temporal control of the inhibition, targeting the intracellular local biochemistry of RhoB in order to decipher its various activities at the plasma membrane, endosome or in the nucleus, and in response to stimuli described to activate RhoB. In addition, the Fbox domain used in this study comes from a ubiquitous Fbox protein from *Drosophila* that was already validated to work in some mammalian cell lines. Switching to other Fbox domain from the 69 Fbox proteins available⁴³ may also add the possibility to improve the tool for certain cell types or models.

This study provided a paradigm for the study of RhoB activity by inhibiting very selectively its function in BEAS-2B bronchial cells and demonstrating that RhoB activity knock down is critical for Akt1/Rac1 mediated cell motility and invasiveness properties. Similarly as an single domain intrabody conformational sensor of Ras, which could block Ras pathway and transformation effect in mice while concentrated at Ras localization by a fusion with N-Ras carboxy terminal caax domain²², the F-6 could be expressed in cells xenografted in mice or even used to produce a transgenic mice model in order to delineate *in vivo* the function of RhoB activity in normal or tumor cells. Furthermore, understanding of the interaction mechanism of the hs2dAb 6 that allow the selectivity towards RhoB may require co-crystallization study of the complex between the domain antibody and GTP loaded RhoB. This structure could help for a rational design of a RhoB selective docking small molecule that could be further modified to become a selective pharmacological inhibitor. Alternatively, the hs2dAb 6/RhoB interaction could be the basis for high throughput screening for molecule that displace the interaction. In summary this study paved the way to fine analyses of RhoB small G protein activity and functions and further inhibition in cancer therapy.

Methods

Subtractive Panning for isolating RhoB-GTP specific s2dAb

A subtractive panning protocol was designed to isolate hs2dAb selective for the RhoB-GTP as describe elsewhere for H12 pan-Rho-GTP hs2dAb (Moutel et al., Submitted). Different steps of the subtractive panning protocol are described below:

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

Plasmids Clones

p-F-Ib-IRES-Mito-mGFP and p-Ib-IRES-Mito-mGFP construction's were described elsewhere (Moutel et al., Submitted).

p-H2B-mCherry-RhoBQ63LdeltaCAAX-IRES-Zeo construction: a first PCR using pcDNA3.1 Hygro H2B was performed in order to extract H2B sequence with the NotIH2BFw (5' ATTCTTAGCGCCGCGCCACCATGCCAGAGCCAGCGAAGTCTGCTCCCG 3') and the H2BAgeIRev (5' GACCGGTGAA CCGCCACCGCTGCCACCGCCATCCTTAGCGCTGGTGTACTTGG 3') primers. Then another PCR was performed to extract mCherry sequence from the pAOint4VHH-mCherry plasmid: AgeImCherryFw (5' GCAGCGGTGGCGGTTC ACCGGTGGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG 3') and mCherryBsrGlinkAcc65IRev (5'GCGGAAGGATCCGACCACCTATTAGGTACCGCCTGCGCTACCGCCTGTACACTTGTACAGCTCGTCCATGCC GCC 3'). Then PCR1 + PCR2 were linked with the NotIH2BFor and CherryBsrGlinkAcc65IRev primers to obtain H2b-mCherry.

Then we extracted the IRES-Zeo sequence from the pIRESZeo-RhoB plasmid⁴⁴ with the following primers: IRESFw (5' GCAGGCGGTACCTAATAGGTGGTCCGATCCTTCCGCCCTCTCCCTCCCCC 3') and ZeoPmeI2BglIIRev (5' TACTAAGAGATCTGTTAAACTATTAGTCTGCTCCTCGGCCACGAAGTGCACGCAG 3').

Finally we linked H2B-mCherry and IRESZeo with the NotIH2BFor and ZeoPmeI2BglIIRev primers and inserted this sequence by digesting the pIRES-Zeo-RhoB vector by NotI/BamHI. We obtained the p-H2B-mCherry-IRES-Zeo plasmid. We next inserted the active mutants of RhoB (RhoB_{L63}) and Rac1 (Rac1_{L63}) and the inactive mutant of RhoB (RhoB_{N19}) by digesting the pH2B-mCherry-IRES-Zeo vector by KpnI/BamHI allowing the formation of the following plasmids : p-H2B-mCherry-RhoB_{L63}deltaCAAX-IRES-Zeo ; p-H2B-mCherry-RhoB_{N19}deltaCAAX-IRES-Zeo; p-H2B-mCherry-Rac1_{L63}deltaCAAX-IRES-Zeo.

p-F-Ib-IRES-BFP lentiviral construction: F-Ib-IRES was inserted in the pTRIP-TRE-MCS XNCA lentiviral plasmid (gift from Loic Van Den Berghe) by XbaI / AgeI digestion of the p-F-Ib-IRES-Mito-mGFP plasmid and TagBFP, amplified from pTagBFP-actin plasmid (Evrogen) with the following primers : AgeIBFPFw (5' TTATGCACCG GTGGGTATGA GCGAGCTGAT TAAGG 3') and ClaIBFPRev (5' AAGATCTGTA CATCGATTAC TAATTAAGCT TGTGCCCCAG TTTGC 3'), was inserted after AgeI / ClaI digestion, thus creating p-F-Ib-IRES-BFP lentiviral vector in which any hs2dAb can be inserted by NcoI and NotI cloning site.

Cell culture, transient transfection and treatment

HeLa S3 cell lines (Cervical adenocarcinoma; ATCC, CCL-2.2 obtained from Yvan Martineau) and Human bronchial epithelial cell lines BEAS-2B (ATCC CRL-9609) were grown in DMEM supplemented with 10% FCS and H2882 stable cell lines were grown in RPMI supplemented with 10% FCS at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. Transient transfection of small interfering RNA (siRNA; Eurogentec) and DNA plasmids were performed using the Jet Prime method, as indicated by the supplier (PolyPlus Transfection). The sequences used were two siRNAs against the 3 untranslated region of RhoB siB10 (5'GGCAUUCUCUAAAGCUAUG3') and siB12 (5'GCUAAGAUGGUGUUAUUUA3'), and siCtl (5'UGGUCACAAAGUCGCAUGA3', random sequence from Eurogentec) at 25 nM.

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

Stable cell lines establishment

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

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

Immunofluorescence staining

Transfected cells were either fixed in 3.7% paraformaldehyde and directly mounted in Mowiol, or permeabilized with PBS-Triton 0.1%, blocked with PBS-BSA 8%, incubated with primary antibodies (RhoB, Rac1 or myc antibodies, same antibodies used in western blot experiments) and with an Alexa 488 or 350 secondary antibody (Invitrogen) and mounted in Mowiol. Data acquisition was carried out on a Nikon Eclipse 90i and image processing with NIS Elements v3 software.

Flow cytometry analysis

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

Western blot analyses

Cell extracts were separated on SDS-PAGE and electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes. Blots were probed with a rabbit polyclonal anti-RhoB (Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-RhoA (Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal RhoC (Cell Signalling Technology), rabbit polyclonal anti-phosphorylated AKT (S473, Cell Signalling Technology), mouse monoclonal anti-Akt1 (Cell Signaling), mouse monoclonal anti-myc tag (clone 9E10, a gift from S. Moutel), mouse monoclonal anti-tubulin (Millipore), and rabbit polyclonal anti-Rac1 (Millipore). Detection was performed using peroxidase-conjugated secondary antibodies and chemiluminescence detection kit (Biorad).

Quantification of Rho and Rac1 activation

Pull down of endogenous activated Rho or Rac proteins were performed as established previously^{13,28}. Cells (5.10^6 per pulldown) were lysed in buffer (50 mM Tris^{pH}7.4, 500 mM NaCl / 10 mM MgCl₂ / 0.5% TritonX100) for GST-RBD pulldown or in buffer (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM MgCl₂, 2.5 mM EGTA, and 0.5% sodium deoxycholate) for GST-PAKBD pulldown, each buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors. GST-RBD or GST-PAKBD (30μg) were incubated with cleared lysate for 45 min at 4°C. Beads were washed 3 times with washing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.1% Tween20) and denatured in 2X Laemmli reducing sample buffer, boiled for 5 minutes and separated on 12.5% SDS-PAGE for Western Blot analysis.

Immunoprecipitation

For immunoprecipitation, cells were harvested in cell lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, glycerol 10%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM), supplemented protease and phosphatase inhibitors. Cleared lysate (0.5 mg) was then incubated with 2 μg of antibodies and 50 μL of protein A/G PLUS-Agarose (Repligen) for 4h at 4°C. Beads were washed trice in lysis buffer, and the immunoprecipitates were then analyzed by Western blotting.

Wound healing assay

The wound healing assay has been described previously²⁸. Cells were plated on collagen type I (5 μg/cm², BD Biosciences) in 12 well plate. Two days after transfection, a section of a confluent cell monolayer was produced by scratching with a p200 pipette tip. The ability of cells to migrate into the cleared section was monitored. Percentage of migration was defined by three measures of lengthwise migration.

Migration and invasion assays

The migration assay was performed as describe elsewhere²⁸ with a Transwell system (8-μm pore size, BD Biosciences). Briefly, cells (25.10^3 per well) were added in serum-free medium in the upper compartment of the filter. The bottom chamber was filled with complete medium. At 24 h later, cells on the bottom surface of the filter were counted, after staining, under a Nikon inverted microscope in three randomized fields of 505 mm². Cell invasion assay was performed in conditions similar to above, with wells precoated with Matrigel (BD Biosciences). Forty-eight hours later, cells were fixed, stained, and counted as above.

Statistical analysis

Values reported represent median or mean \pm standard deviation (SD) or standard error of mean (SEM) of at least three independent experiments. P values were calculated with GraphPad Prism 6 using a Student's t test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.000$

References

- 1 Bishop, A. L. & Hall, A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**, 241-255 (2000).
- 2 Jaffe, A. B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-269, doi:10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721 (2005).
- 3 Wennerberg, K. & Der, C. J. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* **117**, 1301-1312, doi:10.1242/jcs.01118 (2004).
- 4 Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635, doi:10.1038/nature01148 (2002).
- 5 Boulter, E. *et al.* Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nat Cell Biol*, doi:ncb2049 [pii] 10.1038/ncb2049 (2010).
- 6 Milia, J. *et al.* Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication. *Cell Death Differ* **12**, 492-501, doi:10.1038/sj.cdd.4401586 (2005).
- 7 Wheeler, A. P. & Ridley, A. J. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res* **301**, 43-49, doi:S0014-4827(04)00479-3 [pii] 10.1016/j.yexcr.2004.08.012 (2004).
- 8 Vega, F. M., Colomba, A., Reymond, N., Thomas, M. & Ridley, A. J. RhoB regulates cell migration through altered focal adhesion dynamics. *Open biology* **2**, 120076, doi:10.1098/rsob.120076 (2012).
- 9 Jahner, D. & Hunter, T. The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol Cell Biol* **11**, 3682-3690 (1991).
- 10 Fritz, G., Kaina, B. & Aktories, K. The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *J Biol Chem* **270**, 25172-25177 (1995).
- 11 Mamouni, K. *et al.* RhoB promotes gammaH2AX dephosphorylation and DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **34**, 3144-3155, doi:10.1128/MCB.01525-13 (2014).
- 12 Monferran, S. *et al.* Alpha5beta3 and alpha5beta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *Int J Cancer* **123**, 357-364, doi:10.1002/ijc.23498 (2008).
- 13 Canguilhem, B. *et al.* RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* **280**, 43257-43263, doi:M508650200 [pii] 10.1074/jbc.M508650200 (2005).
- 14 Adnane, J., Muro-Cacho, C., Mathews, L., Sebti, S. M. & Munoz-Antonia, T. Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* **8**, 2225-2232 (2002).
- 15 Mazieres, J. *et al.* Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin Cancer Res* **10**, 2742-2750 (2004).
- 16 Gerald, D. *et al.* RhoB controls coordination of adult angiogenesis and lymphangiogenesis following injury by regulating VEZF1-mediated transcription. *Nature communications* **4**, 2824, doi:10.1038/ncomms3824 (2013).
- 17 Meyer, N. *et al.* RhoB promotes cancer initiation by protecting keratinocytes from UVB-induced apoptosis but limits tumor aggressiveness. *J Invest Dermatol* **134**, 203-212, doi:10.1038/jid.2013.278 (2014).
- 18 Sekine, A., Fujiwara, M. & Narumiya, S. Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* **264**, 8602-8605 (1989).
- 19 Lerm, M., Schmidt, G. & Aktories, K. Bacterial protein toxins targeting rho GTPases. *FEMS Microbiol Lett* **188**, 1-6 (2000).
- 20 Ridley, A. J. & Hall, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399 (1992).
- 21 Paterson, H. F. *et al.* Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol* **111**, 1001-1007 (1990).

- 22 Tanaka, T., Williams, R. L. & Rabbitts, T. H. Tumour prevention by a single antibody domain targeting the interaction of signal transduction proteins with RAS. *EMBO J* **26**, 3250-3259, doi:7601744 [pii] 10.1038/sj.emboj.7601744 (2007).
- 23 Nizak, C. *et al.* Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors. *Science* **300**, 984-987, doi:10.1126/science.1083911 (2003).
- 24 Meli, G., Visintin, M., Cannistraci, I. & Cattaneo, A. Direct in vivo intracellular selection of conformation-sensitive antibody domains targeting Alzheimer's amyloid-beta oligomers. *J Mol Biol* **387**, 584-606, doi:10.1016/j.jmb.2009.01.061 (2009).
- 25 Goffinet, M. *et al.* Identification of a GTP-bound Rho specific scFv molecular sensor by phage display selection. *BMC Biotechnol* **8**, 34, doi:1472-6750-8-34 [pii] 10.1186/1472-6750-8-34 (2008).
- 26 Muyldermans, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annual review of biochemistry* **82**, 775-797, doi:10.1146/annurev-biochem-063011-092449 (2013).
- 27 Caussin, E., Kanca, O. & Affolter, M. Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nature structural & molecular biology* **19**, 117-121, doi:10.1038/nsmb.2180 (2012).
- 28 Bousquet, E. *et al.* Loss of RhoB Expression Promotes Migration and Invasion of Human Bronchial Cells Via Activation of AKT1. *Cancer research* **69**, 6092-6099 (2009).
- 29 Melchionna, T. & Cattaneo, A. A protein silencing switch by ligand-induced proteasome-targeting intrabodies. *J Mol Biol* **374**, 641-654, doi:10.1016/j.jmb.2007.09.053 (2007).
- 30 Kuo, C. L., Oyler, G. A. & Shoemaker, C. B. Accelerated neuronal cell recovery from Botulinum neurotoxin intoxication by targeted ubiquitination. *PLoS One* **6**, e20352, doi:10.1371/journal.pone.0020352 (2011).
- 31 Sato, N. *et al.* RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. *Int J Cancer* **120**, 543-551, doi:10.1002/ijc.22328 (2007).
- 32 Su, Y., Ishikawa, S., Kojima, M. & Liu, B. Eradication of pathogenic beta-catenin by Skp1/Cullin/F box ubiquitination machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12729-12734, doi:10.1073/pnas.2133261100 (2003).
- 33 Portnoff, A. D., Stephens, E. A., Varner, J. D. & DeLisa, M. P. Ubiquibodies, synthetic E3 ubiquitin ligases endowed with unnatural substrate specificity for targeted protein silencing. *J Biol Chem* **289**, 7844-7855, doi:10.1074/jbc.M113.544825 (2014).
- 34 Feig, L. A. Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol* **1**, E25-27, doi:10.1038/10018 (1999).
- 35 Ren, X. D., Kiosses, W. B. & Schwartz, M. A. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* **18**, 578-585, doi:10.1093/emboj/18.3.578 (1999).
- 36 Gampel, A. & Mellor, H. Small interfering RNAs as a tool to assign Rho GTPase exchange-factor function in vivo. *Biochem J* **366**, 393-398, doi:10.1042/BJ20020844 (2002).
- 37 Kohl, N. E. *et al.* Selective inhibition of ras-dependent transformation by a farnesyltransferase inhibitor. *Science* **260**, 1934-1937 (1993).
- 38 Gao, Y., Dickerson, J. B., Guo, F., Zheng, J. & Zheng, Y. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7618-7623, doi:10.1073/pnas.0307512101 (2004).
- 39 Bouquier, N. *et al.* A cell active chemical GEF inhibitor selectively targets the Trio/RhoG/Rac1 signaling pathway. *Chemistry & biology* **16**, 657-666, doi:10.1016/j.chembiol.2009.04.012 (2009).
- 40 Shutes, A. *et al.* Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *J Biol Chem* **282**, 35666-35678, doi:10.1074/jbc.M703571200 (2007).
- 41 Deacon, S. W. & Peterson, J. R. Chemical inhibition through conformational stabilization of Rho GTPase effectors. *Handbook of experimental pharmacology*, 431-460, doi:10.1007/978-3-540-72843-6_18 (2008).
- 42 Wang, L., Yang, L., Luo, Y. & Zheng, Y. A novel strategy for specifically down-regulating individual Rho GTPase activity in tumor cells. *J Biol Chem* **278**, 44617-44625, doi:10.1074/jbc.M308929200 (2003).
- 43 Skaar, J. R., Pagan, J. K. & Pagano, M. Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 369-381, doi:10.1038/nrm3582 (2013).
- 44 Baron, R. *et al.* RhoB prenylation is driven by the three carboxyl-terminal amino acids of the protein: evidenced in vivo by an anti-farnesyl cysteine antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11626-11631, doi:10.1073/pnas.97.21.11626 (2000).

Figure legends

Figure 1. Direct selection of intrabodies by visual screen of fluorescent protein knock down (A). Scheme for F-Ib degradation by fusing Fbox domain to hs2dAb. F-hs2dAb binds a target protein and interacts with Skip1 via the Fbox domain which is a component of the Skip1-Cullin1-Fbox (SCF) complex, an E3 ubiquitin-protein ligase. SCF is recruited and leads to the proteasome dependent degradation of the target protein. **(B)** Strategy of the direct intrabodies screen. The sub-library of the 4th round of phage display was sub-cloned into the p-F-Ib-IRES-Mito-mGFP plasmid. These constructions were then transfected in a stable cell line expressing H2B-mCherry-RhoB_{L63}deltaCAAX mutant and several hundred of clones were screened. The mCherry fluorescence intensity was monitored on an inverted microscope: if an intrabody is able to interact specifically with RhoB (F-H12, F-6, F-15 and F-5), the Fbox domain will recruit the SCF complex, the H2B-mCherry-RhoB construction will be degraded by the proteasome 26S and consequently a decrease of the mCherry fluorescence in the nucleus will be visualized. If there is no interaction (F-NR and F-20) or no transfection, the nuclear fluorescence will be intact. **(C)** mCherry fluorescence quantification by flow cytometry in Hm and HmB cell lines. After 48h of F-Ib transfection in the Hm and the HmB cell lines, the mCherry fluorescence was quantified in the transfected subpopulation and in the non transfected subpopulation for each F-Ib. The ratio of each median of fluorescence (transfected versus non transfected population) gives a percentage of mCherry fluorescence intensity for one F-Ib. Median \pm SD is shown. Scale bar: 10 μ m.

Figure 2: Characterization of selected F-Ib. **(A)** Subcellular localization of each F-Ib is shown by immunostaining of F-Ib (on its myc tag) in HmB cell line. After F-Ib transfection and immunofluorescence staining, localization of each intrabody was monitored on an epifluorescence microscope. A whole cell staining is observed for control F-Ib (F-NR and F-20) whereas a nuclear staining is observed for the positive clones (F-H12, F-6, F-15 and F-5). **(B)** Fbox domain is responsible of RhoB degradation in HmB cell line. F-hs2dAb and hs2dAb were transfected in HmB cell line. The median of mCherry fluorescence was determined by flow cytometry as in figure 1. A decrease of mCherry fluorescence is only observed with the F-Ib whereas the hs2dAb alone are not able to induce such a decay **(C)** Degradation in HmB cell line is proteasome dependant. HmB cells were transfected with F-Ib and treated 36h with 1 μ M of MG132 (a proteasome inhibitor) or DMSO. MG132 treatment restores the fluorescence level nearly to the control level. Median of fluorescence are normalized to the NR control. **(D)** A dose response direct effect is shown. 0, 0.5, 1 or 2 μ g of plasmid were transfected in HmB cells. mCherry fluorescence was then monitored by flow cytometry. For each F-Ib, the median of fluorescence is normalized to the no plasmid point. Median \pm SD is shown on each histogram. Scale bar: 10 μ m.

Figure 3: Specificity and conformational selectivity of the selected F-Ib. **(A)** F-H12 and F-5 degrade Rac1 mutant. After 48h of F-Ib transfection, the mCherry fluorescence was quantified by flow cytometry in Hm, HmB and H2B-mCherry-Rac1_{L61} cell lines as describe in figure 1 and median of fluorescence for each cell line was normalized to the NR control. F-H12 and F-5 induce a significant decrease of mCherry fluorescence in Rac1_{L61} cell line compared to the other F-Ib. **(B)** Rac1 selectivity was further confirmed by a re-localization assay. hs2dAb fused to GFP were co-transfected with Hm or H2B-mCherry-Rac1_{L61} plasmids in HeLa cells. hs2dAb H12 and 5 were able to re-localize to the nucleus when Rac1 active mutant was over-expressed but not the negative controls or the RhoB positive hs2dAb 6 and 15. **(C)** All RhoB positive F-Ib are conformational sensitive, selective towards the active mutant RhoB_{L63}. As describe above, the mCherry fluorescence was quantified by flow cytometry after F-Ib transfection in Hm, HmB and H2B-mCherry-RhoB_{N19} cell lines and median of fluorescence for each cell line was normalized to the NR control. No significant decrease in mCherry fluorescence was observed in RhoBN19 cell line compared to the control cell line Hm for each F-Ib. **(D)** Intrabodies specificities were confirmed by a re-localization assay. hs2dAb fused to GFP were co-transfected with HmB or H2B-mCherry-RhoB_{N19} plasmids in HeLa cells. No Ib-GFP were able to re-localized in the nucleus when RhoB_{N19} was over-expressed in this sub-cellular compartment. Median \pm SD is shown on each histogram. Scale bar: 10 μ m.

Figure 4: Basal endogenous RhoB activity knockdown. (A) HeLa S3 cells were transfected 48h with F-Ib plasmids. A GST-RBD pulldown was performed for each F-Ib to control Rho-GTP level (lines RhoB-GTP, RhoA-GTP and RhoC-GTP) and the total level of Rho proteins was revealed by loading 2% of input (lines total RhoB, total RhoA and total RhoC). F-Ib production is shown with myc tag revelation and tubulin is the loading control. (B) Quantification of three independent GST-RBD pulldown experiments. F-6 seems to degrade more selectively RhoB-GTP than RhoA or RhoC. F-H12 and F-15 are pan Rho binders. Relative activity was calculated as the ratio between GTP level to input level normalized to tubulin. Normalized means \pm SEM are shown.

Figure 5: Endogenous RhoB cellular activation knockdown. (A) RhoB activation kinetic after an EGF treatment. HeLa S3 cells were transfected with F-NR control 48h including 24h of serum starvation. At 48h of transfection, cells were treated at an EGF concentration of 50 ng.mL^{-1} for indicated times. A GST-RBD pulldown was performed to monitor the Rho-GTP induction following this treatment. RhoB is activated within 5 min until 30 min and a second wave of activation is shown at 120 min. RhoA and RhoC are activated only between 5 and 30 min with a maximum at 5 min. (B, C, D) After 15 min of EGF treatment and 48h of cells transfection by F-Ib, RhoB-GTP (B), RhoA-GTP (C) and RhoC-GTP (D) levels were checked. F-H12 and F-6 are able to inhibit RhoB activation following an EGF treatment compared to the negative control. F-H12 inhibits partially RhoA activation (50 %) and nearly decreases RhoC-GTP level to the basal level (without treatment) under EGF treatment whereas F-6 has no inhibitory effect after EGF treatment on these two RhoGTPases activation. Quantification is shown with normalized means \pm SEM.

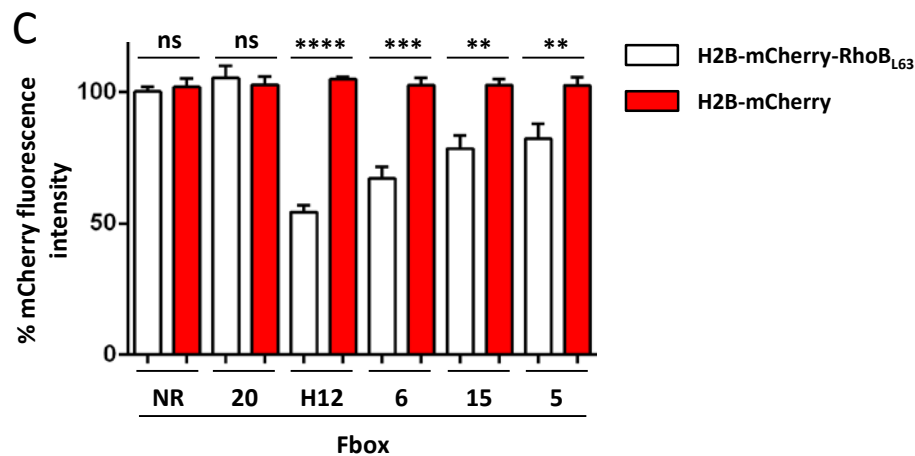
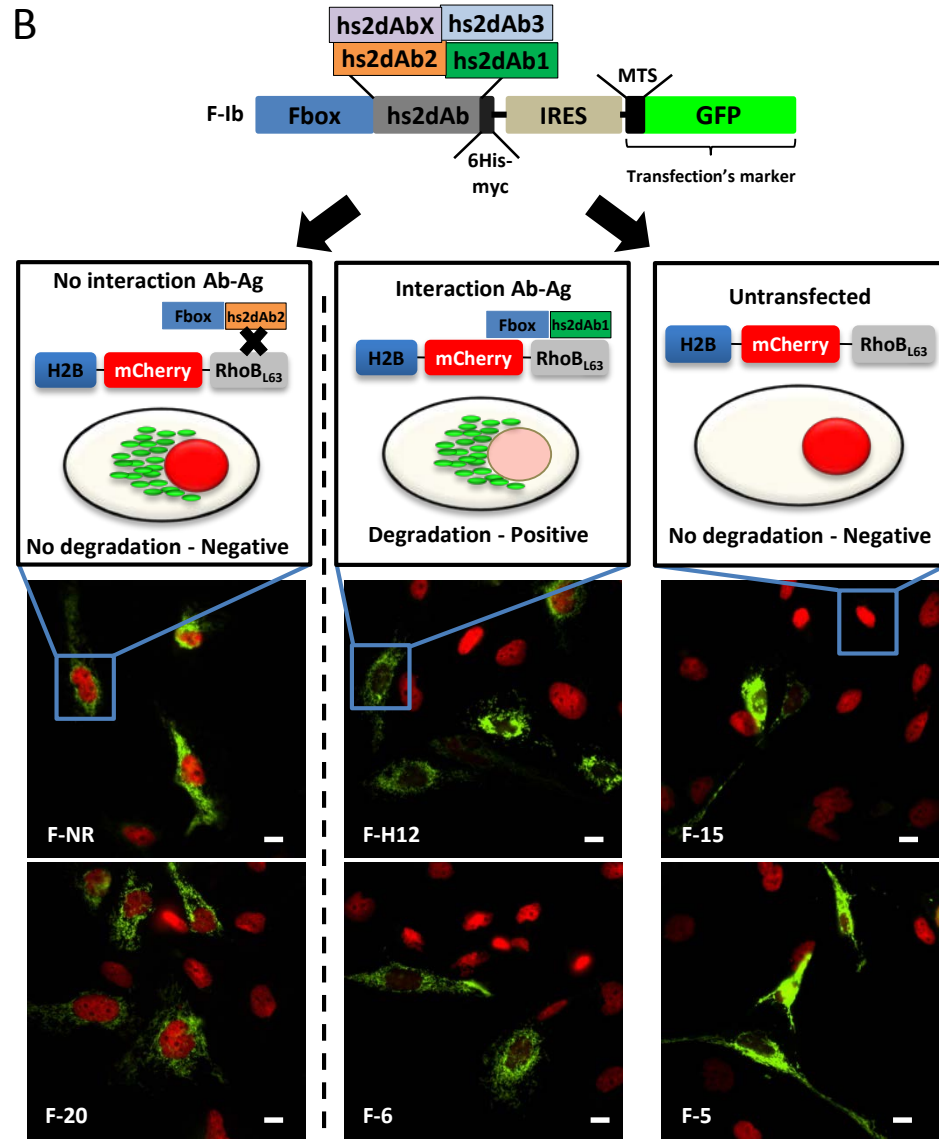
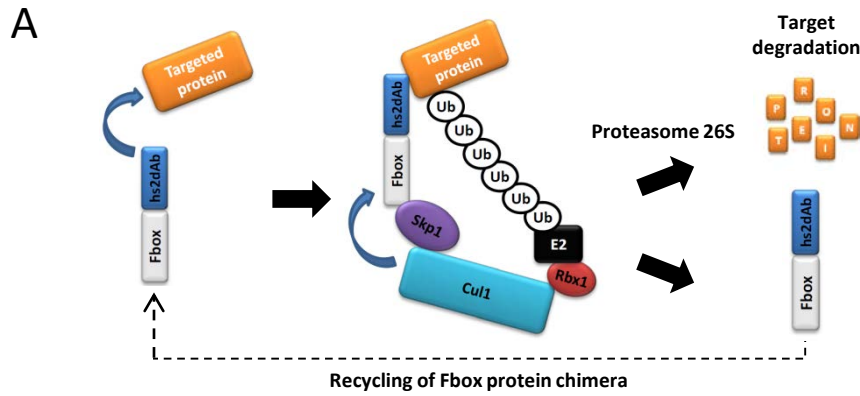
Figure 6: RhoB activity knockdown increases migration and invasion of BEAS-2B cells. After induction of F-Ib expression with doxycyclin ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), (A) measurement of motility was performed in transwell system with percentage of motility represented. (B) Invasion was evaluated with Matrigel assays and percentage of invasion is represented. (C) Implication of AKT pathway in RhoB regulation of migration in BEAS-2B cells. Cells were lysed and immunoprecipitated with an antibody against Akt1 isoform, followed by immunoblotting of the immunoprecipitates with P-AKT (S473) antibody. $20\mu\text{g}$ of input was loaded to observe AKT1 level and F-Ib expression. P-AKT is increased after F-6 induction. (D, E) Role of Rac1 in RhoB regulation of migration in BEAS-2B cells. After 48h of F-Ib induction, cells were lysed, and a GST pull-down was performed to precipitate Rac-GTP (D). Rac1 activity is increased after F-6 induction. Quantification is shown in (E). Normalized means \pm SEM are shown.

Supplementary Figure 1: A subtractive panning to enrich RhoB-GTP specific hs2dAb. Infection of NaLi-H1 library with a helper phage (KM13) enabled bacteria to make phage particles expressing the hs2dAb fused to surface protein pIII. Molar excess (up to 5) of GDP loaded wild type RhoB was introduced at the 2nd round of panning and kept for the other rounds, followed by RhoB_{L63} mutant to enrich in Rho-GTP binders. At the 3rd and 4th round, a molar excess of RhoA_{L63} and RhoC_{L63} was added, followed by RhoB_{L63} mutant in order to enrich in RhoB-GTP binders. Phage-hs2dAb were then isolated by magnetic beads. The phage-hs2dAb were washed, eluted, amplified, and used for subsequent rounds of panning.

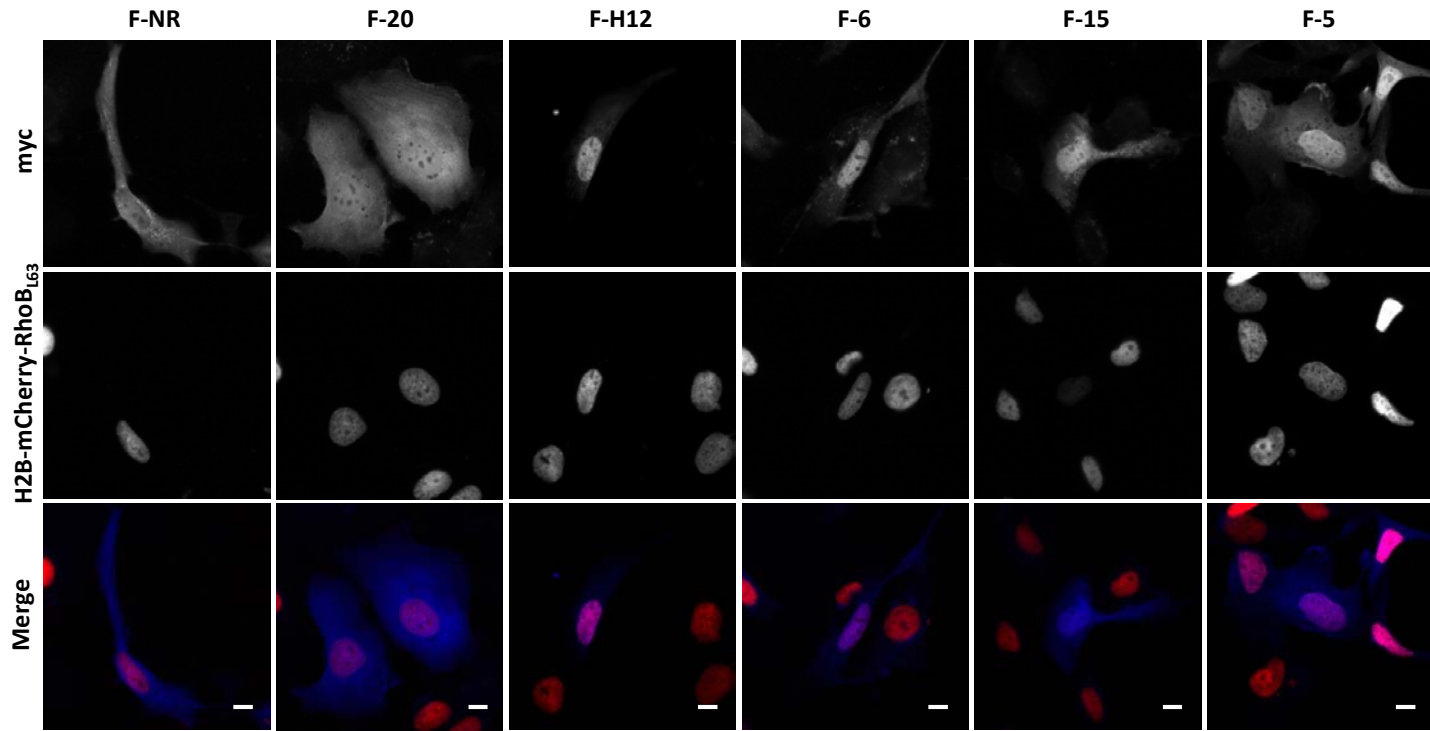
Supplementary Figure 2: Characterization of stable cell lines. (A) Immunofluorescence of H2882-H2B-mCherry and H2882-H2B-mCherry-RhoB_{L63}deltaCAAX cell lines. Labeling cells with an anti-RhoB antibody shows the good localization of RhoB_{L63} mutant in the nucleus. In H2B-mCherry cell line, no labeling is visible because H2882 are RHOB KO. (B) Immunofluorescence of H2882-H2B-mCherry-RhoB_{N19}deltaCAAX and H2882-H2B-mCherry-Rac1_{L61}deltaCAAX. Each mutant is visualized in the nucleus and stained with its respective antibody (RhoB and Rac1). All these stable cell lines are homogenous in the mCherry signal as shown with their respective FACS histogram (A, B). Scale bar: 10 μm .

Supplementary Figure 3: RhoB inhibition increases motility and invasion of BEAS-2B cells. (A) Extinction of RhoB protein was checked after RNAi treatment. Inhibition of RhoB expression by RNAi increases migration of BEAS-2B cells as shown in a wound healing assay (B, C) and in a transwell assay (D). Invasion is also enhanced after RhoB extinction (E). Transient transfection of F-6 induces a knockdown of RhoB-GTP in BEAS-2B cells (F) as shown with the quantification (G) and increases migration of these cells in a wound healing assay (H, I). Normalized means \pm SEM are shown.

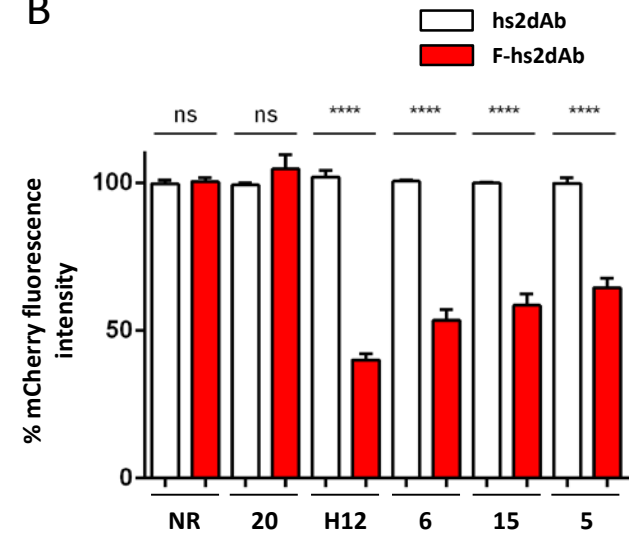
Supplementary Figure 4: Characterization of stable cell lines with tetracycline inducible (Tet-On) F-Ib expression. (A) Percentage of BFP cells was quantified by flow cytometry after doxycyclin induction of F-Ib expression for 24 or 48h. A dox concentration of at least $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ induced more than 90% of BFP cells. (B) % of BFP cells was correlated to the production of F-Ib by western blot analyses. The maximal expression of F-NR and F-6 is visualized 48h after induction at 1 or $2.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectively. A dose response effect is shown. After 48h of induction at various dox concentration, Rho-GTP levels were followed with a GST-RBD pulldown (C). Quantification is shown for a dox induction of $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (D). RhoB-GTP selectivity of F-6 is still conserved at a dox dose of $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Normalized means \pm SD are shown.



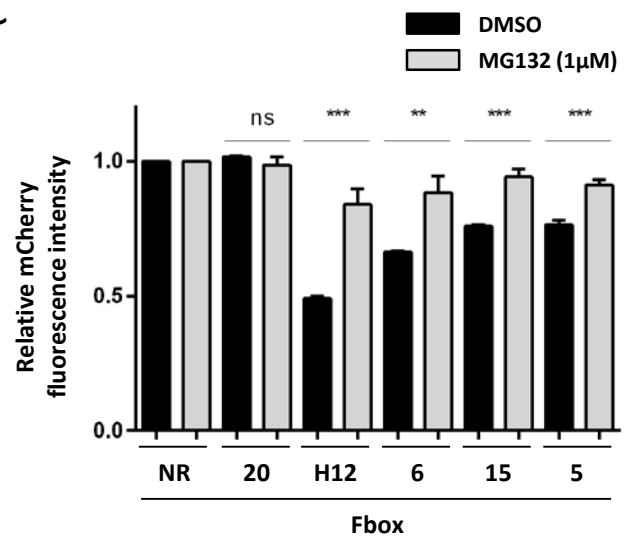
A



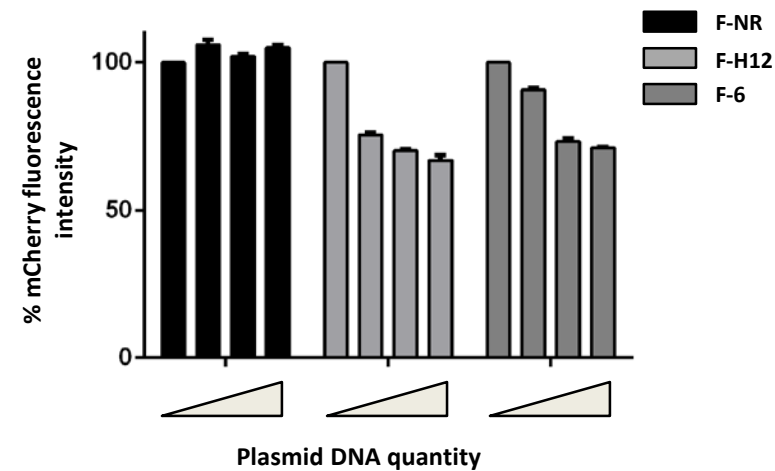
B



C



D



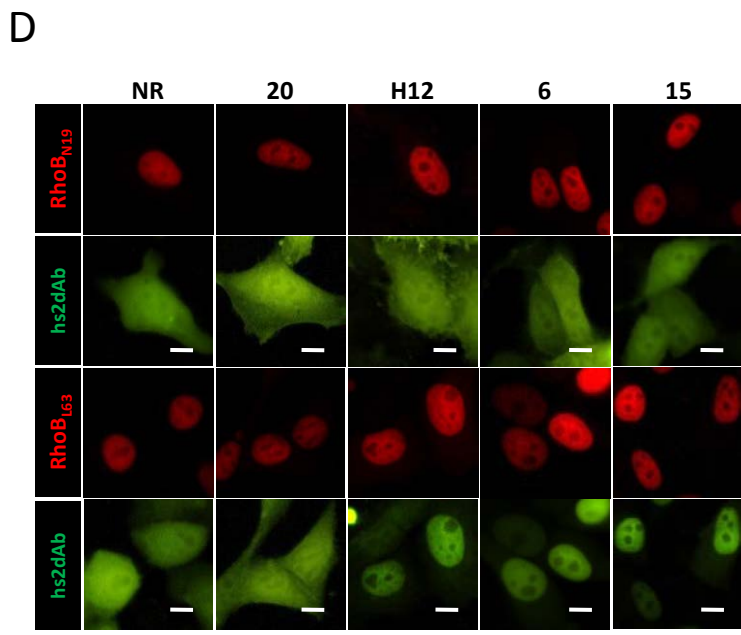
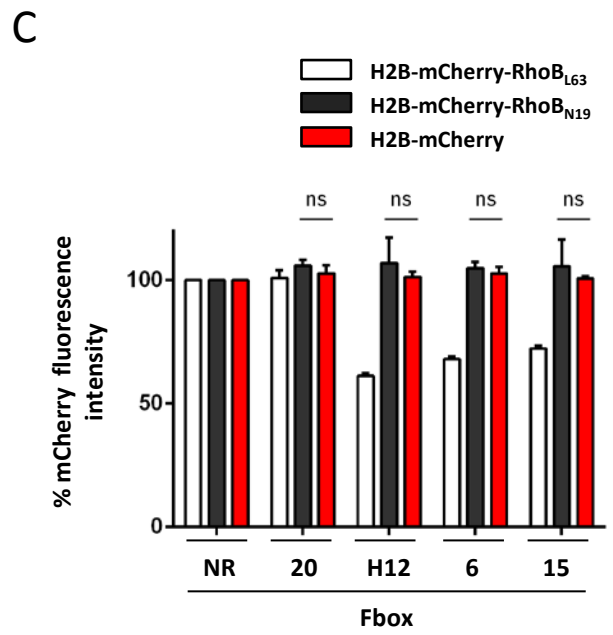
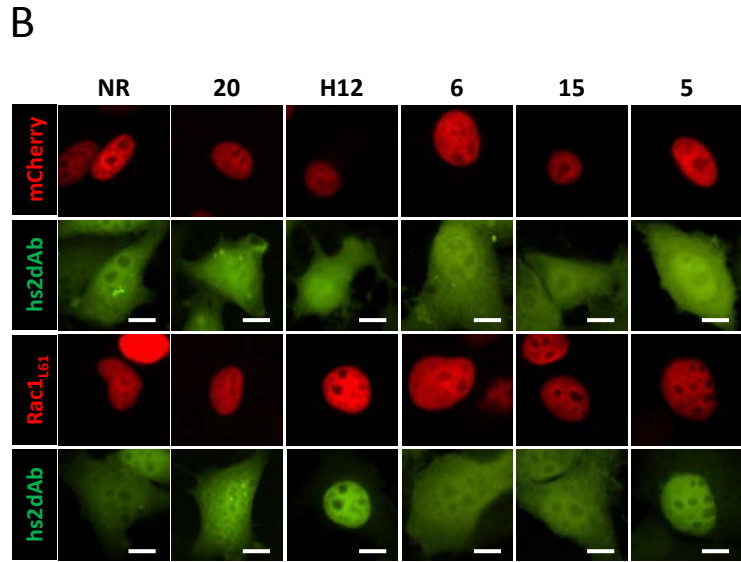
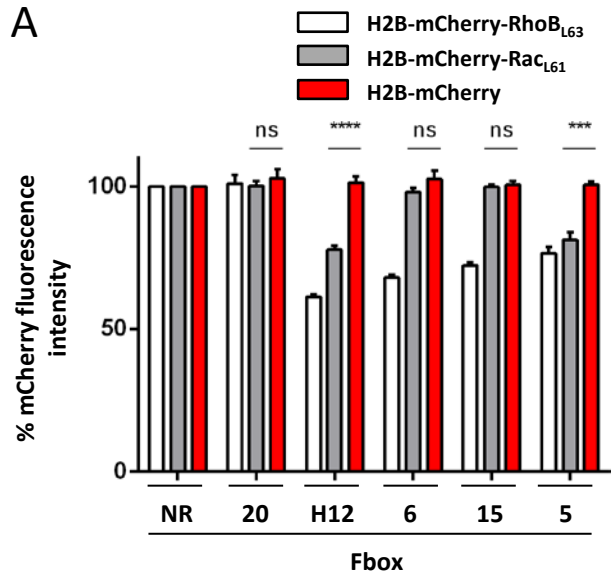
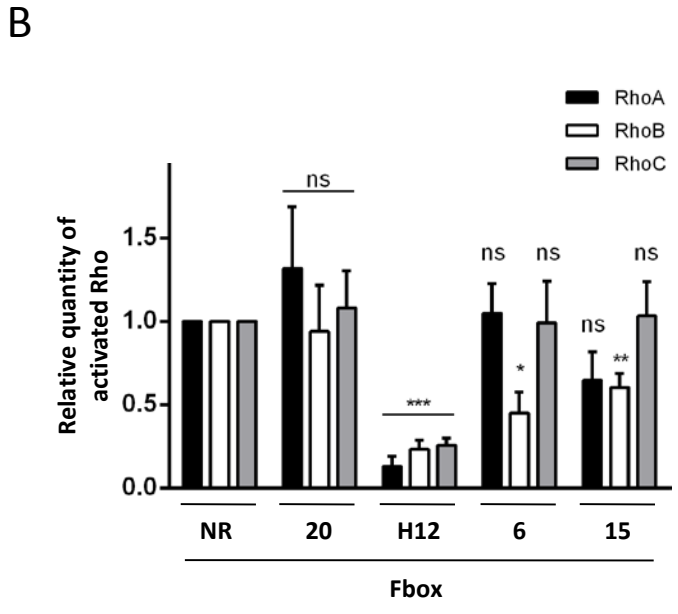
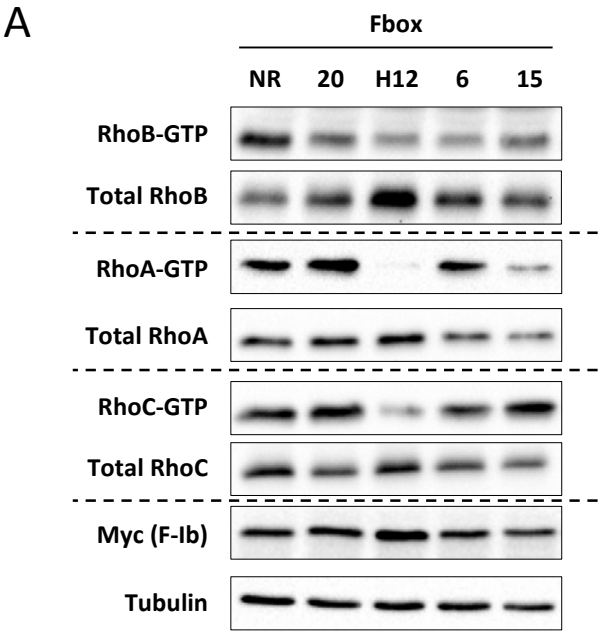
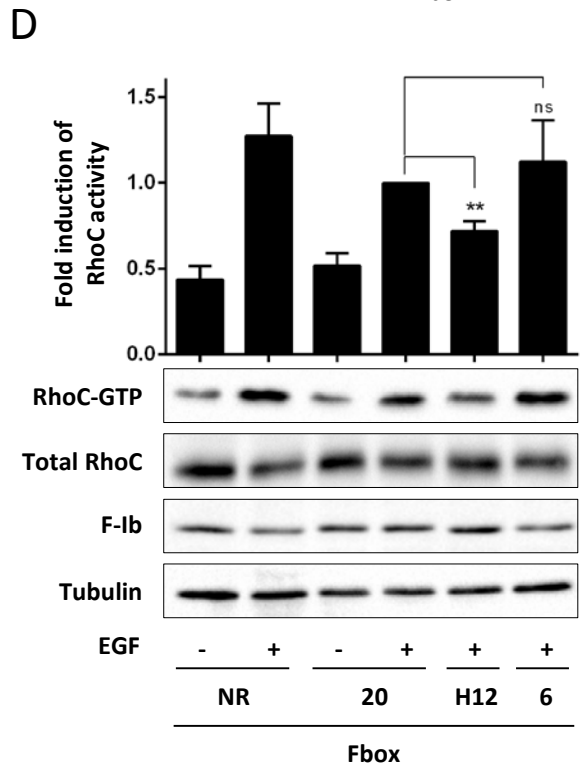
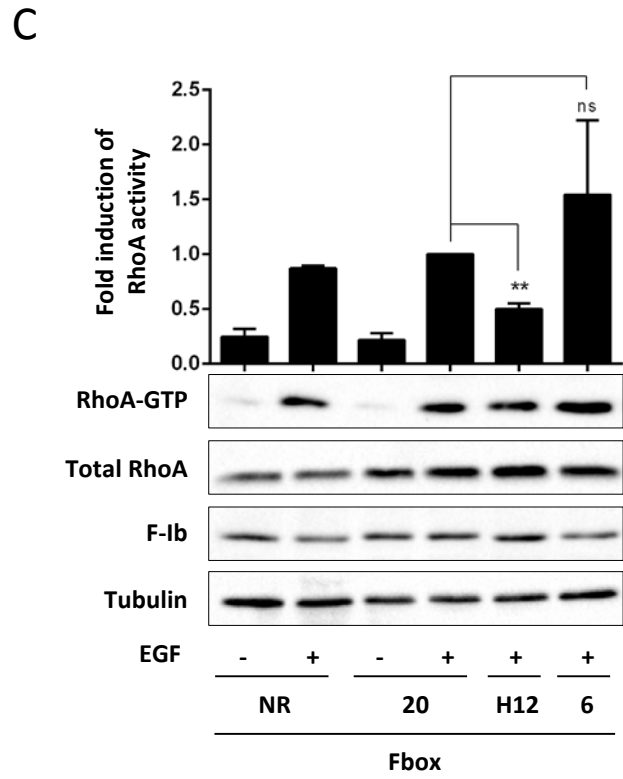
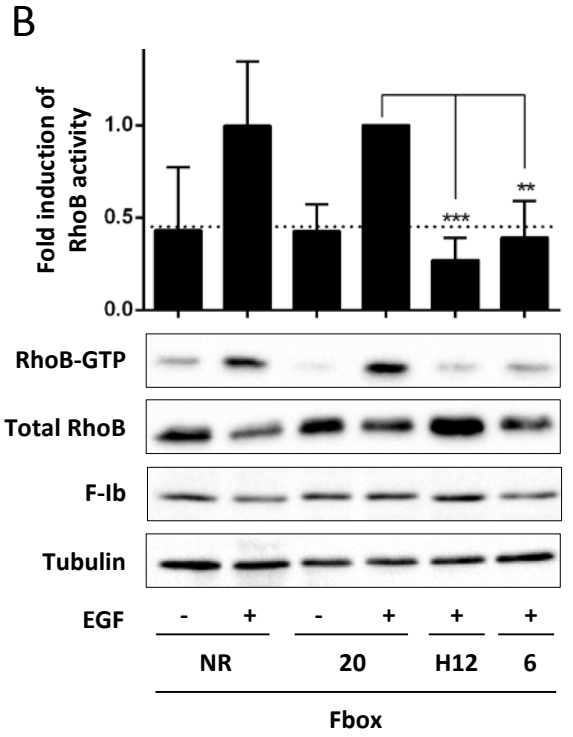
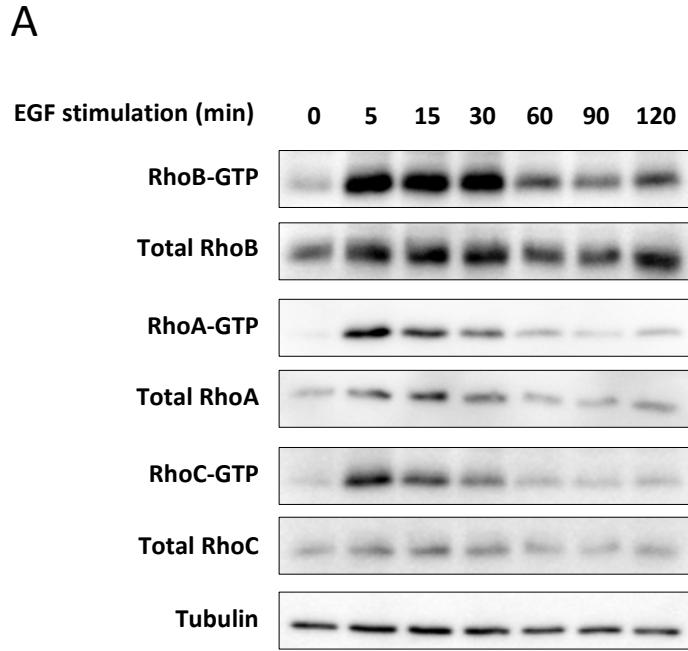
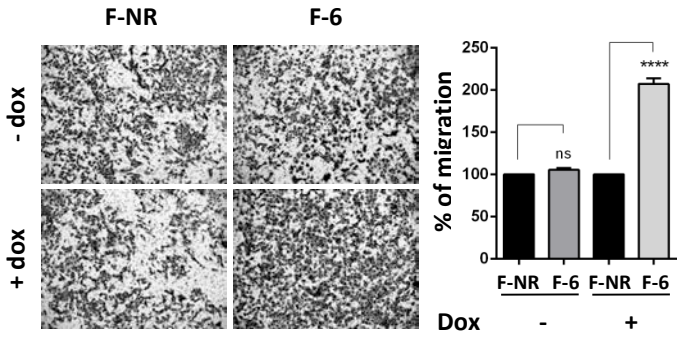


Figure 4

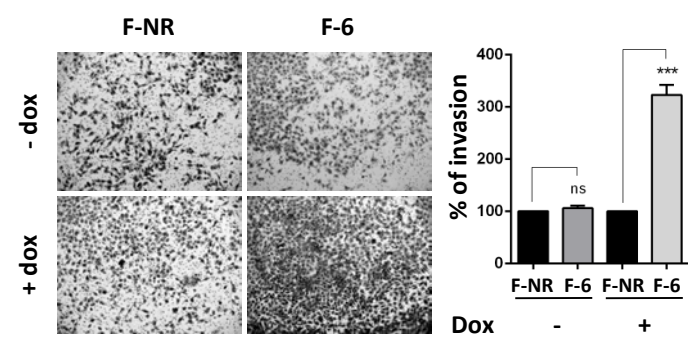




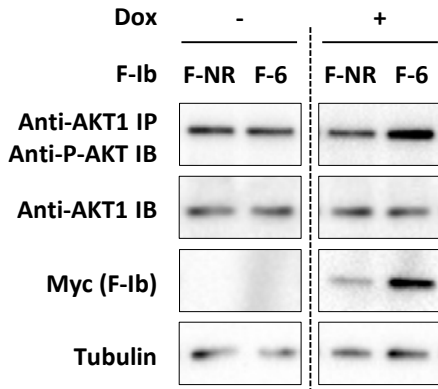
A



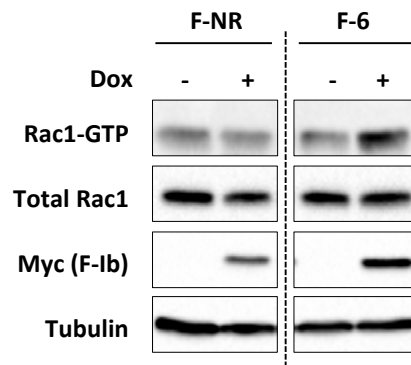
B



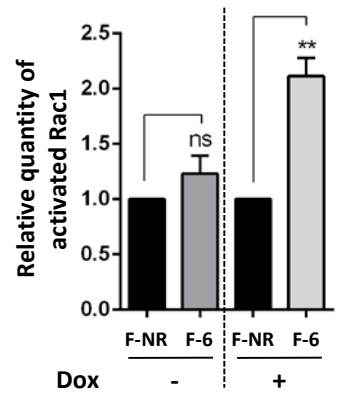
C

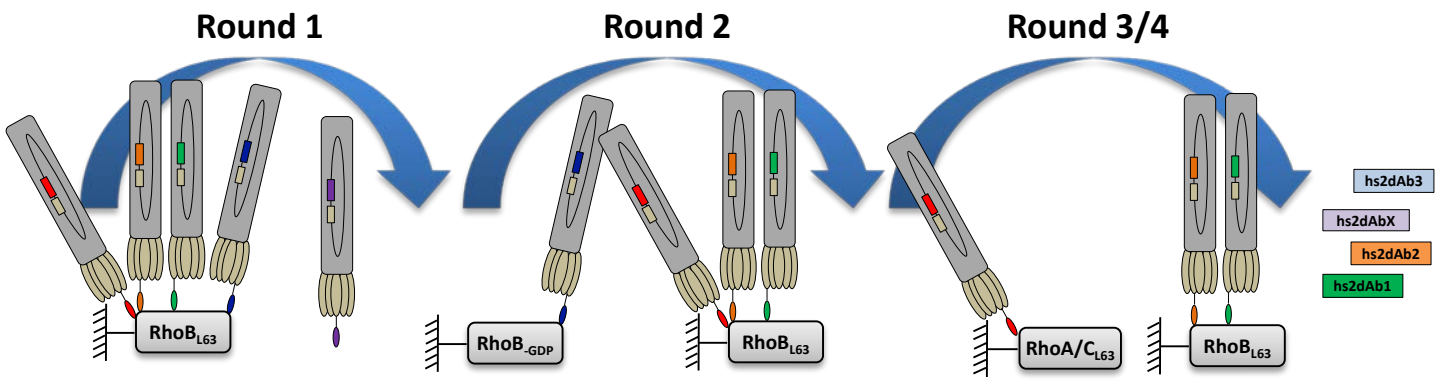


D

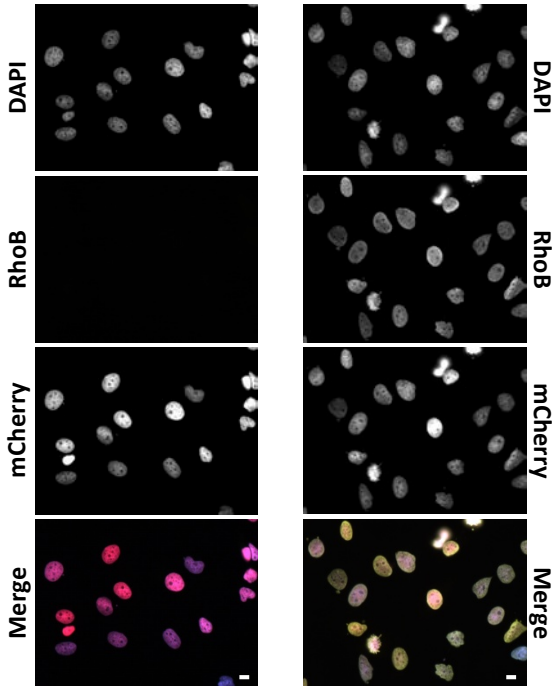
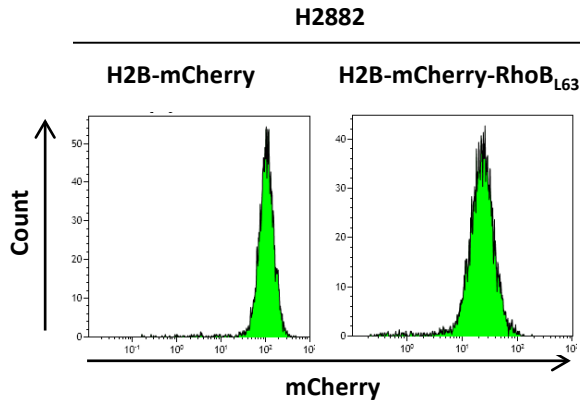


E

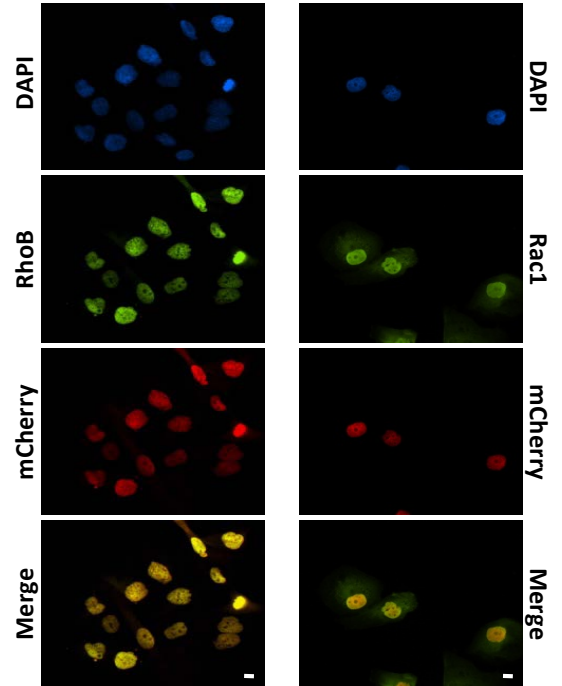
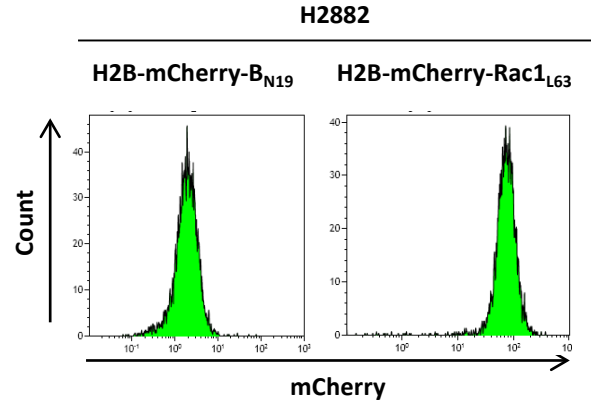


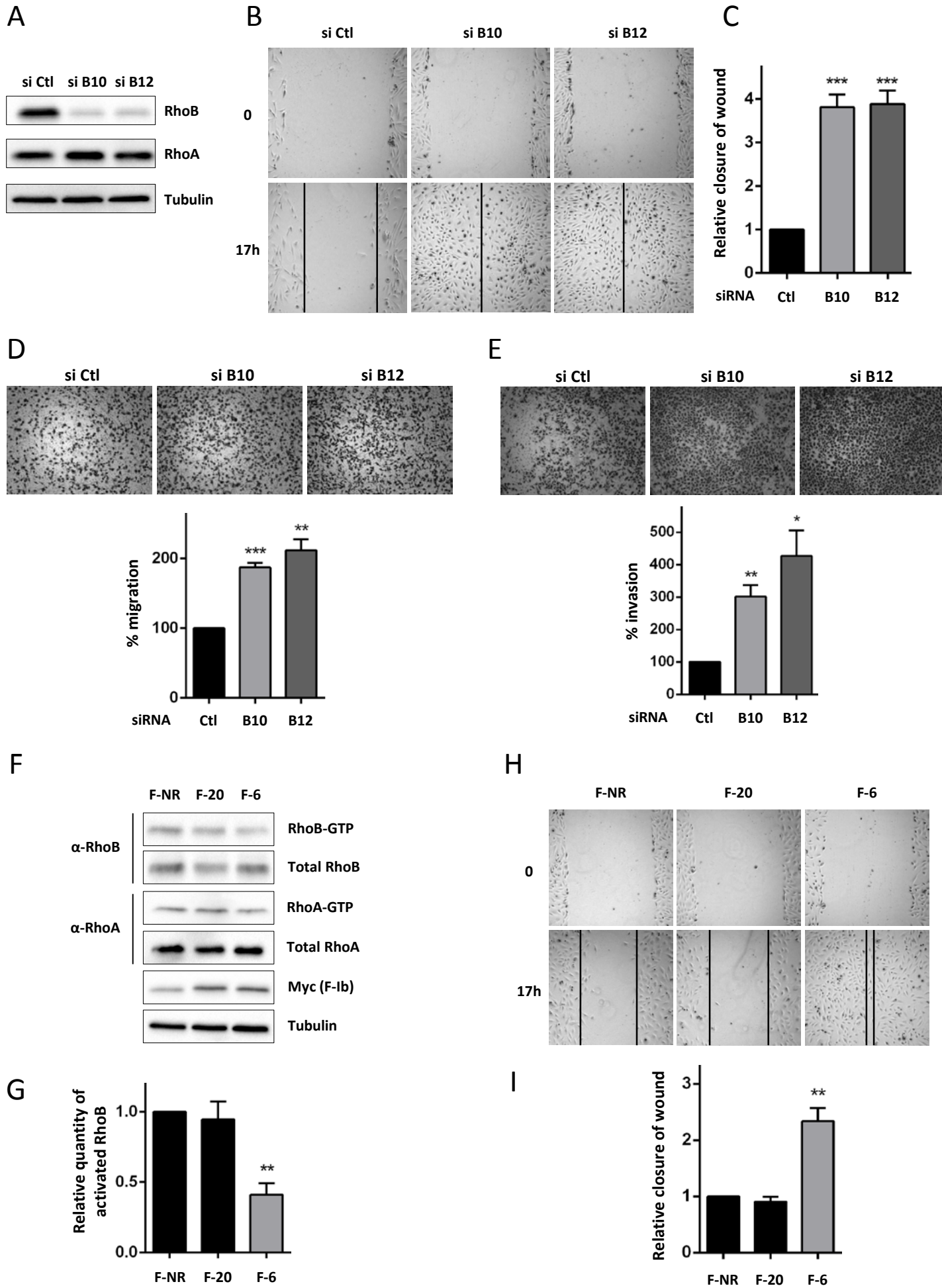


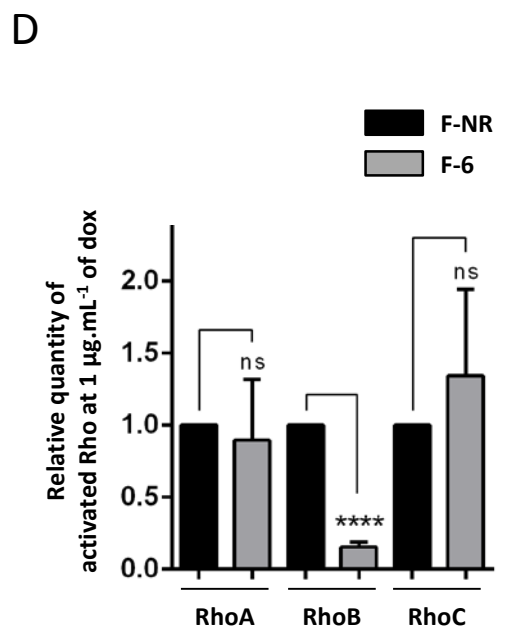
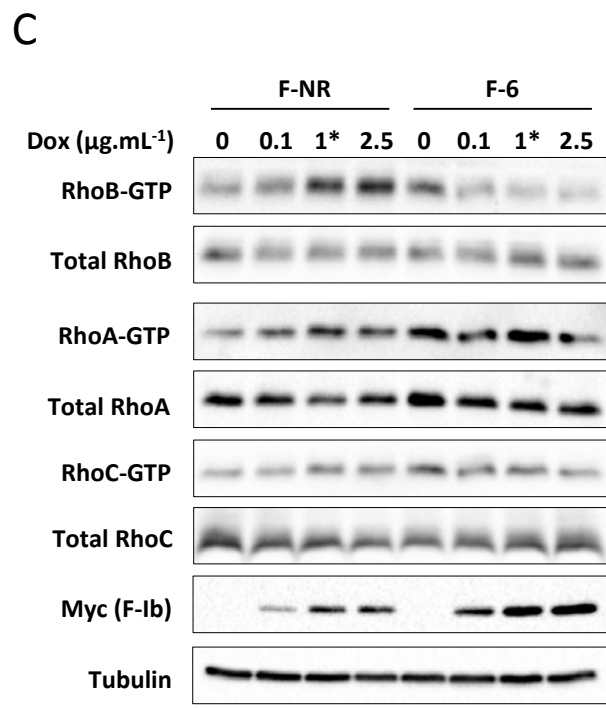
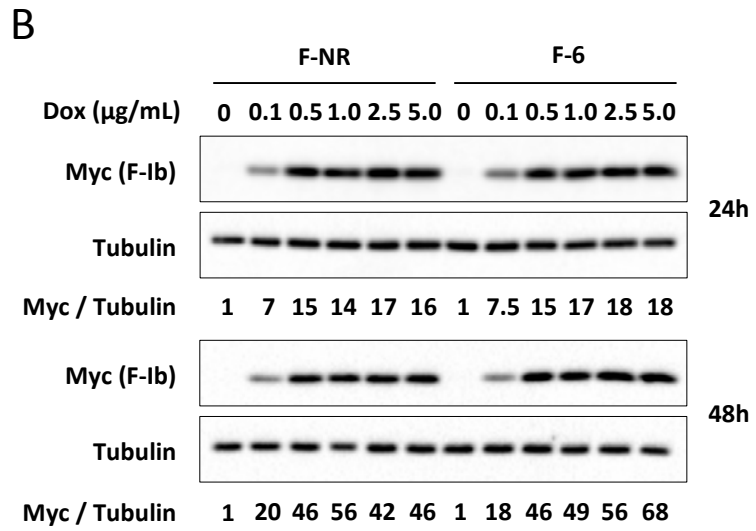
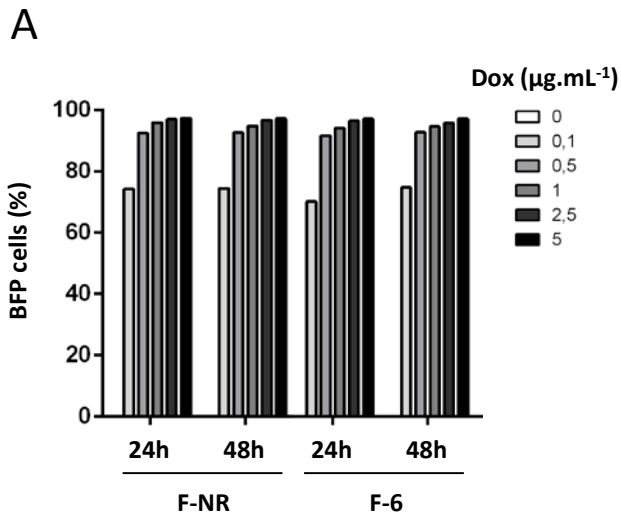
A



B







Discussion

L'objectif initial de ma thèse était de mettre au point une approche innovante permettant d'inhiber l'état activé de la protéine RhoB *in cellulo* afin de comprendre si cette activité pouvait être une nouvelle cible thérapeutique. L'originalité de notre approche a reposé sur une technologie pour laquelle le laboratoire possède une longue expertise et sur l'utilisation d'outils uniques qui ont été récemment développés et validés. Le criblage d'anticorps recombinants par phage display nous a permis d'isoler des anticorps à simple chaîne de plusieurs formats contre de multiples antigènes (Garaicoechea et al., 2008; Goffinet et al., 2008; Monegal et al., 2012). Nous avons notamment isolé plusieurs anticorps biosenseurs de la forme active des GTPases Rho, sans toutefois pouvoir les utiliser dans un contexte intracellulaire qui les rend instables. Comme nous souhaitons inhiber sélectivement l'activité de RhoB dans la cellule. Alors l'outil qui nous est apparu le plus adapté pour remplir cet objectif a été l'anticorps exprimé intracellulairement ou intracorps.

Pour atteindre cet objectif, plusieurs challenges ont dû être relevés car le laboratoire ne possédait ni l'expertise ni certains outils essentiels à l'obtention d'intracorps :

- 1) Concevoir et valider une banque optimisée pour la sélection d'anticorps stable dans un contexte intracellulaire car la banque précédente (naïve de VHH) n'était pas adaptée.
- 2) Développer une technique permettant une sélection directe d'intracorps plutôt qu'un criblage conventionnel des anticorps issus du phage display.

Nous commencerons par discuter des choix des outils que nous avons utilisé afin d'obtenir l'intracorps inhibiteur sélectif de l'activité de RhoB.

1) Conception d'une banque

Ce travail de thèse a permis de montrer que la banque naïve de VHH dont nous disposons au laboratoire et à partir de laquelle j'ai initié mon projet n'est pas adaptée pour la sélection d'intracorps. En effet, les VHHs les plus stables sont sélectionnés négativement au cours du phage display. Ce phénomène est certainement dû à la fusion de la séquence leader *peIB* aux anticorps de la banque, permettant leur envoi post-traductionnel vers le périplasme bactérien, lieu de leur maturation, *via* la voie de sécrétion Sec. Par conséquent, les anticorps les plus solubles (type VHH) qui seraient maturés directement dans le cytoplasme, ne pourraient pas être exportés efficacement vers le périplasme et ne seraient donc pas présentés à la surface des phages pour une sélection.

Afin de remédier à cet écueil, deux solutions sont envisageables. Nous aurions pu construire une nouvelle banque naïve en modifiant le phagemide avec une séquence leader de type SRP permettant

une sécrétion co-translationnelle des anticorps produits vers le périplasme bactérien. Néanmoins l'hétérogénéité des clones retrouvés dans une banque naïve en terme de solubilité et stabilité a conduit le laboratoire, en collaboration avec l'équipe du Dr Franck Perez, à une autre solution : la construction d'une banque synthétique d'anticorps à simple domaine reposant sur un *framework* unique pour tous les anticorps de la banque. En outre, la diversité d'une banque naïve peut être limitée par des contaminations de matériels dérivant de cellules B activées lors de sa construction mais aussi par le fait que le répertoire de ces banques soit biaisé vers le non soi de l'animal. Ainsi, ces banques ne permettent pas l'obtention d'une grande diversité d'anticorps contre des cibles conservées avec leurs orthologues de l'espèce d'origine de la banque. Au contraire, une banque synthétique présente un répertoire universel réellement diversifié et non biaisé (Barbas et al., 1992).

Ce type de banque a déjà fait ses preuves comme par exemple les banques de VH du groupe du Pr. Rabbitts, dont le FRW unique est issu d'une séquence consensus retrouvée après l'obtention de plusieurs intracorps (Tanaka et al., 2003a). Ces banques ont ensuite débouché sur l'obtention de différents intracorps dirigés contre H-Ras-GTP (Tanaka et al., 2007) ou encore LMO2 (Tanaka et al., 2011).

L'avantage de la banque créée au laboratoire repose notamment sur le FRW sélectionné et optimisé afin de conférer une solubilité et une stabilité aux anticorps, nivelant de cette façon l'hétérogénéité des clones au minimum. Par conséquent, comme les clones de cette banque sont globalement homogènes, l'utilisation de la séquence leader *peIB* n'est donc plus un inconvénient. Un autre atout majeur de cette banque a été sa synthèse rationalisée. Les trois boucles CDRs ont été randomisées en nature d'acides aminés mais pas avec n'importe quels acides aminés : la présence des acides aminés les plus hydrophobes a été réduite de même que les cystéines ont été évités dans ces boucles CDRs. La longueur du CDR3 est également variable (9, 12, 15 ou 18 acides aminés). Ainsi nous avons obtenu une large banque fonctionnelle optimisée pour une stabilité intracellulaire des anticorps.

En effet, la validation de la banque contre divers antigènes a mis en évidence la possibilité d'isoler fréquemment des intracorps. Cependant, il est important de noter que chaque sélection effectuée en condition dénaturant l'Ag (par adsorption sur immunotube) a considérablement diminué la diversité de sélection d'intracorps capables de reconnaître un épitope sur la protéine native. Aucun intracorps probant n'a pu être obtenu pour l'histone H1 ou la mCherry, et un seul anti β -actine. Cet intracorps n'est pas utilisable à des fins d'imagerie de la dynamique du cytosquelette car une étape d'extraction préalable à la fixation des cellules est nécessaire afin de visualiser les fibres de stress d'actine décorées par l'intracorps fusionné à la GFP.

En conclusion, nous avons obtenu un outil hautement favorable à l'obtention d'intracorps lorsque l'enrichissement est effectué sur un antigène le plus proche possible des conditions natives. Il a fallu ensuite mettre au point une stratégie permettant la sélection d'intracorps sélectifs de la forme activée de RhoB.

2) Optimisation des techniques afin de sélectionner un intracorps sélectif de RhoB-GTP

a) *Le phage display*

Une sélection de phage display a été mis au point au laboratoire afin de favoriser l'enrichissement d'anticorps sélectifs des GTPases Rho. Pour cela, nous sommes partis d'un protocole établi au laboratoire et ayant déjà fait ses preuves pour l'isolement d'anticorps sélectif de GTPase Rho (Chinestra et al., 2012). Il repose sur une sélection soustractive à partir du 2ème tour de sélection par phage display : un épuisement sur du RhoB chargé avec du nucléotide GDP suivi d'un enrichissement sur le mutant RhoB_{L63} puis l'introduction d'une nouvelle étape d'épuisement sur les homologues les plus proches de RhoB : RhoA_{L63} et RhoC_{L63}. Ce type de protocole a conduit à la sélection de scFvs pan-Rho-GTP mais aussi du scFv E3 anti-RhoB (Chinestra et al., 2014; Goffinet et al., 2008). Ce dernier ne reconnaissant pas RhoB activée en expression intracellulaire, nous avons donc pensé à modifier le protocole décrit ci-dessus afin de favoriser la sélection d'anticorps capable de reconnaître les Rho endogènes eucaryotes. Pour cela, nous sommes partis, non pas de protéines Rho délétées de leur partie C-terminale produites en bactérie, mais de lysats cellulaires eucaryotes frais contenant une Rho pleine taille surexprimée transitoirement mis directement en contact avec les phages. Nous avons pris la décision d'utiliser un antigène produit en eucaryote plutôt que procaryote afin qu'il puisse porter toutes les modifications post-traductionnelles normalement retrouvées *in cellulo*. Néanmoins, cette sélection a conduit à l'obtention de peu de clones spécifiques de RhoB-GTP et elle pourrait être améliorée de plusieurs manières : d'une part en augmentant la stringence du crible en accroissant la quantité de protéines Rho compétitrices (RhoA et RhoC). Aussi la compétition réalisée lors de nos travaux a certainement été trop prudente. Dans cette situation il serait même envisageable d'utiliser une production bactérienne où les quantités seront largement supérieures et plus contrôlables qu'avec un lysat eucaryote. D'autre part il est possible de mettre en place d'une sélection masquée dont le principe repose sur l'ajout en excès d'un pool d'anticorps solubles dirigés contre un épitope non désiré de l'antigène lors de la sélection par phage display. Notamment, Even-Desrumeaux *et al.* ont sélectionné de nouveaux anticorps dirigés contre des épitopes pertinemment ciblés par cette approche judicieuse (Even-Desrumeaux et al., 2014). Aussi pourrions-nous appliquer cet outil en ajoutant un excès du clone pan-Rho-GTP H12 afin de le contre sélectionner et d'enrichir

en clones plus sélectif de RhoB. Sans oublier que l'obtention de *binders* reconnaissant des épitopes distincts simultanément sur la protéine cible permettrait de développer des combinaisons bi-spécifiques de très fortes avidités et peut-être encore davantage discriminant des trois Rho.

b) *Le criblage direct d'intracorps*

L'étape suivante correspondait à la mise au point d'une technique de crible des anticorps, issus du phage display, directement dans l'application d'utilisation voulue : en tant qu'inhibiteur intracellulaire. En effet, des intracorps ont été obtenus en utilisant des criblages classiques (Gueorguieva et al., 2006; Koo et al., 2014; Nizak et al., 2003b) : caractérisation biochimique *in vitro* des anticorps (ELISA, *pulldown*, IF) puis expression intracellulaire mais ce type de criblage est long et peut entraîner la perte de clones intéressants qui ne fonctionnaient pas dans un test biochimique donné mais en intracorps. C'est pourquoi les criblages spécifiques sont les plus prometteurs notamment ceux mettant en évidence l'interaction antigène-anticorps *in cellulo*. De tels cribles ont permis d'isoler de nombreux intracorps (Meli et al., 2009; Paoletti et al., 2012; Tanaka and Rabbitts, 2003; Tanaka et al., 2011; Tse et al., 2002). D'autres criblages sont aussi prometteurs comme l'IBPheS qui repose sur un changement phénotypique des cellules induit par l'interaction d'un intracorps avec sa cible (Mazuc et al., 2014). Cependant ce type de crible ne serait pas applicable aisément aux protéines Rho par exemple. Effectivement, imaginons un crible se basant sur la perte des fibres de stress d'actine (le plus simple qui pourrait être mis en œuvre à l'échelle d'un criblage). RhoA, RhoB et RhoC sont toutes les trois impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine et l'inhibition de l'une des trois Rho peut entraîner la compensation des deux autres, ainsi la perte des fibres de stress signifierait la sélection d'un anticorps pan-Rho-GTP voir RhoA-RhoC-GTP spécifique. Ainsi le crible phénotypique doit être choisi judicieusement selon les antigènes.

Le choix de l'hôte du criblage est déterminant : la bactérie ne reproduit pas toutes les modifications post-traductionnelles rencontrées dans une cellule eucaryote et ne permet pas de compartimenter un antigène toxique dans une localisation subcellulaire où il ne le serait plus. Comme nous souhaitons un intracorps fonctionnant en cellule de mammifère, nous avons choisi ce type de cellules plutôt que des levures ou des bactéries. Ce choix est d'autant plus justifié car comme vu précédemment, les Rho subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles et leur surexpression est généralement toxique (surtout RhoB). De cette manière, en relocalisant la Rho dans une localisation subcellulaire spécifique nous pourrions éviter cet inconvénient.

Nous avons donc choisi de sur-exprimer un mutant actif de RhoB en fusion à une protéine fluorescente dans le noyau d'une lignée RHOB KO afin de visualiser un signal délocalisé et d'éviter la toxicité liée à la surexpression de RhoB_{L63}. Le choix de la lignée RHOB KO nous apparaissait le plus logique car nous souhaitions éviter toute interférence entre RhoB endogène et le crible. Or ce choix est discutable sur plusieurs points : d'une part cette lignée ne se transfecte pas facilement en comparaison à d'autres lignées (HeLa, HEK, etc...) rendant le crible plus fastidieux, de plus RhoB surexprimée dans le noyau est présente dans une quantité tellement importante et supérieure à ce qui peut être retrouvée dans une lignée RHOB^{+/+} qu'une interférence de l'endogène est peu probable (voir les résultats des essais de relocalisation en HeLa Figure 3 de l'article 3). En effet, la quantité de RhoB activée endogène représente en général moins de 5% de la protéine totale, qui est souvent elle-même très faible dans la plupart des lignées. Par conséquent cette quantité est beaucoup plus faible que celle obtenue avec une surexpression du mutant RhoB_{L63} par un promoteur CMV tel que nous l'avons fait.

c) *Fonctionnalisation des intracorps*

Après avoir créé une lignée cellulaire pour le crible, il a fallu choisir un système montrant une interaction entre l'intracorps et sa cible. Dans notre cas, une simple fusion de la GFP avec l'intracorps n'aurait pas suffi car il arrive souvent que des intracorps se retrouvent localisés au noyau et il aurait alors fallu construire une nouvelle lignée avec une localisation différente de RhoB_{L63} pour s'assurer de la spécificité de l'intracorps, ce qui est difficile compte tenu de la toxicité de cette protéine. De plus, nous souhaitions produire un intracorps inhibiteur de l'activité de RhoB et pas uniquement un intracorps pour faire du *tracking* de RhoB activée. Aussi avons-nous choisi de fusionner les intracorps à un domaine Fbox (Caussin et al., 2012), ce qui permet la dégradation de la cible par le protéasome. La faisabilité de ce système a été confirmée sur des intracorps anti-GFP issus de notre banque (Moutel et al., Submitted). Toutefois, il est important de noter que la Fbox utilisée dans notre étude était la même que celle de Caussin *et al.*, c'est-à-dire une Fbox d'une protéine de drosophile. Cette Fbox a permis la dégradation partielle de l'activité de RhoB (de 60 à 85% selon le taux de transfection et le type cellulaire) dans toutes les lignées cellulaires que nous avons utilisées jusqu'à présent. Cependant cela ne concernait que trois lignées et il est possible que cette Fbox ne soit pas universelle malgré sa très forte homologie avec les Fbox humaines (plus de 80% d'homologie de séquence primaire avec la Fbox humaine β -TrCP (Jiang and Struhl, 1998)). En outre, la quantité des autres enzymes (E1 et E2) impliquées dans la machinerie de dégradation par le protéasome 26S

fluctue d'une lignée cellulaire à une autre ce qui implique qu'elles puissent être plus ou moins saturées, entraînant de ce fait une dégradation différentielle entre les lignées cellulaires.

Par conséquent, il serait intéressant de cribler parmi les 69 Fbox humaines existantes (Skaar et al., 2013), les Fbox déjà décrites pour dégrader dans toute la cellule (cytoplasme et noyau), et les sélectionner sur leur capacité à induire la dégradation d'une H2B-GFP après leur fusion avec les intracops anti-GFP par exemple.

Tableau 6 : Mesures d'affinité pour le hs2dAb 6 contre les trois mutants actifs de Rho (deux mesures indépendantes)

Anticorps	Antigènes	Constantes		
		Ka ($M^{-1}.sec^{-1}$)	Kd (sec^{-1})	KD (M)
NB6	RhoA _{L63}	1.022 ⁺⁶	6.73 ⁻⁴	6.59 ⁻¹⁰ = 0.659nM
	RhoB _{L63}	1.01 ⁺⁶	1,60 ⁻³	1.61 ⁻⁹ = 1.61nM
	RhoC _{L63}	1.27 ⁺⁶	5.37 ⁻⁴	4.20 ⁻¹⁰ = 0.420nM
	RhoA _{L63}	1.10 ⁺⁶	1,24 ⁻³	1.12 ⁻⁹ = 1.12nM
	RhoB _{L63}	1.20 ⁺⁶	1,50 ⁻³	1.29 ⁻⁹ = 1.29nM
	RhoC _{L63}	1.59 ⁺⁶	7.12 ⁻⁴	4.46 ⁻¹⁰ = 0.446nM

Ka : constante d'association ; Kd : constante de dissociation ; KD : constante d'affinité

Enfin la mesure de l'affinité de l'anticorps 6 a été réalisée récemment par SPR. De manière surprenante, cet anticorps a une affinité équivalente pour les trois Rho-GTP (l'ordre du nM, Cf. **tableau 6**). Plusieurs explications peuvent expliquer cette différence entre les résultats obtenus dans un contexte intracellulaire eucaryote et ces résultats *in vitro*. D'une part les Ag produits pour la SPR sont produits en bactérie impliquant tous les biais expliqués plus haut, d'autre part l'anticorps est sorti du contexte cellulaire dans lequel il était sélectif et sans la fusion à la Fbox. Néanmoins l'influence potentielle de la Fbox sur la sélectivité de l'anticorps semble être exclue car la sélectivité du H12 en fusion avec la Fbox reste intacte (pan-Rho-GTP) en comparaison aux résultats obtenus *in vitro* (Moutel et al., Submitted). La complexité du contexte intracellulaire dans lequel se trouve l'intracops et RhoB (ancrage de RhoB à la membrane, interaction avec des partenaires...) peut vraisemblablement expliquer ce différentiel de sélectivité important retrouvé entre les résultats *in vitro* et *in cellulo*.

Ce résultat justifie donc pleinement notre choix de criblage direct plutôt qu'une sélection conventionnelle par des tests biochimiques.

En conclusion, nous avons pu isoler des intracorps inhibiteurs de l'activité de RhoB et obtenir un intracorps inhibant sélectivement l'activité de RhoB d'une part grâce à la création d'une nouvelle banque et au protocole de phage display optimisé et d'autre part grâce au système de criblage direct d'intracorps.

Nous allons maintenant discuter des possibilités qu'ouvrent l'obtention d'un tel outil.

3) Perspectives envisagées

a) *hs2dAb 6* : co-cristallographie avec *RhoB_{L63}*

Une des premières questions qu'entraînent nos résultats est de savoir où se fixe l'anticorps sur RhoB. En effet, bien que les résultats d'affinité *in vitro* nous donnent une sélectivité pan-Rho-GTP pour l'*hs2dAb 6*, cela n'empêche pas d'imaginer qu'il puisse se fixer sur des épitopes déterminants pour la sélectivité des Rho *in cellulo*. C'est pourquoi des essais de co-cristallisation du *hs2dAb 6* avec *RhoB_{L63}* ont été initiés au laboratoire.

Avec les résultats issus de cette co-cristallisation, il sera possible de réaliser à plus long terme des approches de criblage de petites molécules capables de se lier spécifiquement à RhoB et empêchant éventuellement son association avec les effecteurs. Deux approches peuvent ainsi être envisagées, l'une par modélisation virtuelle *in silico* de petites molécules pouvant mimer ou déplacer l'interaction (*molecular* ou *computational docking*), et l'autre directement par des criblages de chimiothèques ou de banques de peptides déplaçant l'interaction Ac-Ag. Il existe déjà de telles molécules pour la GTPase Rac1 montrant la faisabilité d'un tel projet. La molécule EHT 1864 s'associe fortement avec Rac1 (mais aussi ses autres isoformes de façon plus modérée) et cause la libération du nucléotide lié à Rac, empêchant de cette façon l'interaction avec les effecteurs *in vitro* et *in vivo* (Shutes et al., 2007). Une autre petite molécule NSC23766, identifiée par *docking*, s'associe à Rac1 sur le site de fixation des GEFs et inhibe ainsi des fonctions requérant l'activité de Rac1 (Gao et al., 2004). Les acides aminés permettant l'interaction Rac1-Tiam (une GEF de Rac) ont été déterminés après l'analyse d'une structure 3D de cette interaction. Ils ont permis la modélisation *in silico* d'une poche de liaison aux inhibiteurs et l'utilisation d'une base de donnée 3D a entraîné l'identification des composés dont les conformations s'adaptent à la poche (Gao et al., 2004).

b) *hs2dAb 6 : design d'un futur biosenseur de l'activité de RhoB ?*

Jusqu'à présent, seul le domaine RBD était disponible afin de construire des biosenseurs de l'activité des Rho (biosenseur de FRET ou non FRET). A présent, nous disposons d'un domaine de liaison spécifique de RhoB-GTP, le hs2dAb 6, ainsi le greffage d'une dye solvatochromique (type mérocyanine) peut être envisagé afin de créer un biosenseur de l'activité de RhoB et d'étudier son activation spatio-temporelle. Dans ce cas l'anticorps deviendrait plus fluorescent lorsqu'il serait en interaction avec sa cible comme cela a été fait par Nalbant *et al.* pour le domaine CBD lié à la mérocyanine qui est capable de devenir plus fluorescent lorsqu'il interagit avec Cdc42-GTP endogène (Nalbant *et al.*, 2004). Il est vrai que le couplage ciblé d'une telle dye se fait généralement par une réaction entre un groupe maléimide du fluorophore activé et le groupe thiol d'une cystéine de la protéine cible. Cette réaction chimique a été réalisée avec succès sur des DARPin (*Designed Ankyrin Repeat Proteins*) qui sont des petites protéines stables intracellulairement car dépourvues de cystéine interne. Une cystéine C-terminale a été ajoutée à une DARPin afin d'y greffer une dye Alexa 488 (Simon *et al.*, 2012). Les intracorps de type hs2dAb étant stables dans l'environnement intracellulaire et leurs cystéines n'étant pas engagées dans la formation d'un pont disulfure, ceci nous permet d'émettre l'hypothèse qu'ils puissent toujours fonctionner après mutations de leur cystéine en alanine ou autre résidu. Ainsi de tels hs2dAb dépourvus de cystéine permettraient l'ajout d'une nouvelle cystéine unique afin de cibler le couplage covalent à des fluorophores de type solvatochromique ou autre. Ce type de greffage pourrait être ensuite généralisé à tous les hs2dAb, puisqu'ils partagent les mêmes FRW.

c) *Applications de l'outil en cancérologie : RhoB-GTP cible thérapeutique potentielle ?*

Une autre perspective directe sera d'utiliser l'outil afin de répondre aux questions portant sur le rôle de la forme active ou de l'activation de RhoB dans des contextes propres à la cancérologie. Notamment nous cherchons à déterminer quel est le rôle de l'activation de RhoB suite à des stress génotoxiques comme les UVB (Canguilhem *et al.*, 2005) et la camptothécine (Mamouni *et al.*, 2014). Nous avons déjà établi les lignées cellulaires exprimant de façon inductible et stable l'expression du F-6. Des résultats préliminaires montrent même que l'activation de RhoB par la camptothécine est inhibée par le F-6 et que le modèle cellulaire HaCaT utilisé pour étudier l'activation de RhoB par les UVB permet une dégradation de l'activité basale de RhoB par le F-6. Cependant le plus gros du travail reste à faire afin de comprendre le rôle de ces activations.

Une application future de cet outil sera de répondre à l'objectif initial de ma thèse qui était de déterminer si l'activité de RhoB peut être une nouvelle cible thérapeutique. Au laboratoire, nous avons démontré dans deux modèles de cancers l'implication de RhoB dans la résistance aux thérapies anti-tumorales (Cf. A.II.5.v). Une première étude réalisée au laboratoire a montré l'implication de RhoB dans la réponse de lignées de mélanomes humains (mutées B-Raf^{V600E}) aux traitements par des inhibiteurs de la voie des MAP kinases ciblant sélectivement B-RAF (PLX4032 ou vemurafenib) ou MEK (AZD6244). Lorsque l'induction de RhoB est prévenue par des ARNi, les cellules de mélanomes deviennent davantage sensibles au vemurafenib. Cette observation suggère un lien entre la surexpression de RhoB et la résistance des cellules à l'apoptose (Delmas et al., Submitted). L'utilisation de notre outil dans ces lignées cellulaires permettra de savoir si la dégradation de l'activité de RhoB confère également une sensibilité aux cellules de mélanomes traitées par le vemurafenib. Si cette hypothèse s'avère exacte, alors l'activité de RhoB sera bien une cible thérapeutique afin de diminuer la résistance au vemurafenib.

Ce même type de raisonnement pourra être réalisé sur un autre modèle puisqu'il a été montré au laboratoire que l'expression RhoB influence la sensibilité de cellules de cancers pulmonaires à un inhibiteur de l'EGFR, l'Erlotinib. En effet, les cellules exprimant fortement RhoB sont plus résistantes et la surexpression de RhoB dans des lignées sensibles, ayant une faible expression basale de RhoB, diminue également leur sensibilité (Mazières et al., en préparation).

Bien entendu l'outil en tant que tel ne peut être utilisé comme agent thérapeutique, sauf dans le cadre de thérapie génique, mais plutôt comme preuve de principe pour obtenir des molécules mimant son interaction avec RhoB-GTP (voir paragraphe de la cristallographie). D'un autre côté il serait possible d'inverser le problème et plutôt que d'inhiber la GTPase, inhiber la GEF impliquée dans son activation comme cela a été fait avec l'inhibiteur ITX3 de la GEF TrioN (domaine N-terminale de la GEF Trio), responsable de l'activation de RhoG et Rac1 (Bouquier et al., 2009). Néanmoins, des GEFs différentes pourraient être responsables de l'activation de RhoB pour des contextes cellulaires différents rendant la recherche d'inhibiteurs de GEF plus complexe.

L'approche de criblage direct d'intracorps et le *knockdown* protéique mis en œuvre ici pour RhoB pourraient être étendus à d'autres GTPases et même à d'autres protéines ayant des conformations différentes dans la cellule. Des projets ciblant ses homologues RhoA et RhoC seront initiés au laboratoire.

Pour une visée thérapeutique directe, le système de *knockdown* protéique serait certainement plus adapté en utilisant des petites molécules, liées à un domaine d'interaction avec une E3 ubiquitine ligase, et spécifiques de protéines anormalement retrouvées dans les cellules (BCR-ABL, les mutations de Ras sur la glycine 12, ...) comme ce qui est fait avec les PROTACs (Hines et al., 2013; Sakamoto et al., 2001).

4) Conclusion générale

Depuis maintenant une dizaine d'année, le laboratoire a développé une thématique "anticorps conformationnels sélectifs des GTPases Rho". Récemment, un scFv anti RhoB-GTP a été obtenu sans toutefois fonctionner en tant qu'intracorps. Ce travail doctoral a donc permis de poursuivre cette thématique et d'apporter ne serait-ce que des outils moléculaires encore plus performants à plusieurs niveaux de la technologie : (i) une banque d'anticorps à simple domaine hautement fonctionnelle ; (ii) de nouveaux outils pour la sélection et le criblage d'intracorps ; (iii) des lentivecteurs d'expression inductibles d'intracorps fonctionnalisés ou non. A partir de ces outils, les premiers intracorps sélectifs conformationnels et inhibiteurs de l'activité de RhoB ont été isolés et permettront de répondre à de nombreuses questions fondamentales mais aussi cliniques sur cette protéine. Cette approche sera ensuite appliquée à RhoA et RhoC au laboratoire. Ces anticorps seront probablement des outils biochimiques qui seront amenés à remplacer les méthodes standards de mesure d'activité des Rho par TRBD et pourront également être transposés dans des senseurs de FRET.

Ce travail a ainsi apporté une nouvelle boîte à outils moléculaires pour le laboratoire mais aussi peut-être pour d'autres laboratoires étudiant les GTPases.

Bibliographie

- Adamson, P., Marshall, C.J., Hall, A., and Tilbrook, P.A. (1992a). Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem* 267, 20033-20038.
- Adamson, P., Paterson, H.F., and Hall, A. (1992b). Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol* 119, 617-627.
- Ader, I., Delmas, C., Bonnet, J., Rochaix, P., Favre, G., Toulas, C., and Cohen-Jonathan-Moyal, E. (2003). Inhibition of Rho pathways induces radiosensitization and oxygenation in human glioblastoma xenografts. *Oncogene* 22, 8861-8869.
- Ader, I., Toulas, C., Dalenc, F., Delmas, C., Bonnet, J., Cohen-Jonathan, E., and Favre, G. (2002). RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death. *Oncogene* 21, 5998-6006.
- Adini, I., Rabinovitz, I., Sun, J.F., Prendergast, G.C., and Benjamin, L.E. (2003). RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development. *Genes Dev* 17, 2721-2732.
- Adnane, J., Muro-Cacho, C., Mathews, L., Sebti, S.M., and Munoz-Antonia, T. (2002a). Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 8, 2225-2232.
- Adnane, J., Seijo, E., Chen, Z., Bizouarn, F., Leal, M., Sebti, S.M., and Munoz-Antonia, T. (2002b). RhoB, not RhoA, represses the transcription of the transforming growth factor beta type II receptor by a mechanism involving activator protein 1. *J Biol Chem* 277, 8500-8507.
- Ahn, J., Choi, J.H., Won, M., Kang, C.M., Gyun, M.R., Park, H.M., Kim, C.H., and Chung, K.S. (2011). The activation of p38 MAPK primarily contributes to UV-induced RhoB expression by recruiting the c-Jun and p300 to the distal CCAAT box of the RhoB promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 409, 211-216.
- Alan, J.K., and Lundquist, E.A. (2013). Mutationally activated Rho GTPases in cancer. *Small GTPases* 4, 159-163.
- Alfano, D., Ragno, P., Stoppelli, M.P., and Ridley, A.J. (2012). RhoB regulates uPAR signalling. *J Cell Sci* 125, 2369-2380.
- Allal, C., Pradines, A., Hamilton, A.D., Sebti, S.M., and Favre, G. (2002). Farnesylated RhoB prevents cell cycle arrest and actin cytoskeleton disruption caused by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298. *Cell Cycle* 1, 430-437.
- Amano, M., Mukai, H., Ono, Y., Chihara, K., Matsui, T., Hamajima, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996). Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N. *Science* 271, 648-650.
- Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R., and Muyldermans, S. (1997). Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett* 414, 521-526.
- Arthur, W.T., Ellerbroek, S.M., Der, C.J., Burridge, K., and Wennerberg, K. (2002). XPLN, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and RhoB, but not RhoC. *J Biol Chem* 277, 42964-42972.
- Avignolo, C., Bagnasco, L., Biasotti, B., Melchiori, A., Tomati, V., Bauer, I., Salis, A., Chiossone, L., Mingari, M.C., Orecchia, P., *et al.* (2008). Internalization via Antennapedia protein transduction domain of an scFv antibody toward c-Myc protein. *FASEB J* 22, 1237-1245.
- Backlund, P.S., Jr. (1997). Post-translational processing of RhoA. Carboxyl methylation of the carboxyl-terminal prenylcysteine increases the half-life of RhoA. *J Biol Chem* 272, 33175-33180.
- Barbas, C.F., 3rd, Bain, J.D., Hoekstra, D.M., and Lerner, R.A. (1992). Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4457-4461.
- Baron, R., Fourcade, E., Lajoie-Mazenc, I., Allal, C., Couderc, B., Barbaras, R., Favre, G., Faye, J.C., and Pradines, A. (2000). RhoB prenylation is driven by the three carboxyl-terminal amino acids of the protein: evidenced in vivo by an anti-farnesyl cysteine antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11626-11631.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.

- Benink, H.A., and Bement, W.M. (2005). Concentric zones of active RhoA and Cdc42 around single cell wounds. *J Cell Biol* *168*, 429-439.
- Better, M., Chang, C.P., Robinson, R.R., and Horwitz, A.H. (1988). Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* *240*, 1041-1043.
- 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. *Bio/technology* *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.
- Boder, E.T., Midelfort, K.S., and Wittrup, K.D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 10701-10705.
- Boder, E.T., and Wittrup, K.D. (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol* *15*, 553-557.
- Boldicke, 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.
- Boldicke, T., Weber, H., Mueller, P.P., Barleon, B., and Bernal, M. (2005). Novel highly efficient intrabody mediates complete inhibition of cell surface expression of the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/KDR). *J Immunol Methods* *300*, 146-159.
- Boulianne, G.L., Hozumi, N., and Shulman, M.J. (1984). Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* *312*, 643-646.
- Boulter, E., Garcia-Mata, R., Guilluy, C., Dubash, A., Rossi, G., Brennwald, P.J., and Burridge, K. (2010). Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nat Cell Biol*.
- Bouquier, N., Vignal, E., Charrasse, S., Weill, M., Schmidt, S., Leonetti, J.P., Blangy, A., and Fort, P. (2009). A cell active chemical GEF inhibitor selectively targets the Trio/RhoG/Rac1 signaling pathway. *Chemistry & biology* *16*, 657-666.
- Boureux, A., Vignal, E., Faure, S., and Fort, P. (2007). Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* *24*, 203-216.
- Bousquet, E.e.a. (2009). Loss of RhoB Expression Promotes Migration and Invasion of Human Bronchial Cells Via Activation of AKT1. *Cancer research* *69*, 6092-6099.
- Bravo-Cordero, J.J., Oser, M., Chen, X., Eddy, R., Hodgson, L., and Condeelis, J. (2011). A novel spatiotemporal RhoC activation pathway locally regulates cofilin activity at invadopodia. *Curr Biol* *21*, 635-644.
- Burridge, K., and Wennerberg, K. (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* *116*, 167-179.
- Bustelo, X.R., Sauzeau, V., and Berenjeno, I.M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* *29*, 356-370.
- Butler, D.C., and Messer, A. (2011). Bifunctional anti-huntingtin proteasome-directed intrabodies mediate efficient degradation of mutant huntingtin exon 1 protein fragments. *PLoS One* *6*, e29199.
- Cabantous, S., Nguyen, H.B., Pedelacq, J.D., Koraichi, 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. *Scientific reports* *3*, 2854.
- Cai, X., and Garen, A. (1995). Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 6537-6541.
- Canguilhem, B., Pradines, A., Baudouin, C., Boby, C., Lajoie-Mazenc, I., Charveron, M., and Favre, G. (2005). RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* *280*, 43257-43263.

- Cassimeris, L., Guglielmi, L., Denis, V., Larroque, C., and 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.
- Castagnoli, L., Zucconi, A., Quondam, M., Rossi, M., Vaccaro, P., Panni, S., Paoluzi, S., Santonico, E., Dente, L., and Cesareni, G. (2001). Alternative bacteriophage display systems. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* *4*, 121-133.
- Caussinus, E., Kanca, O., and Affolter, M. (2012). Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nature structural & molecular biology* *19*, 117-121.
- Charlton, K., Harris, W.J., and Porter, A.J. (2001). The isolation of super-sensitive anti-hapten antibodies from combinatorial antibody libraries derived from sheep. *Biosensors & bioelectronics* *16*, 639-646.
- Chen, W., Zhu, Z., Feng, Y., Xiao, X., and Dimitrov, D.S. (2008). Construction of a large phage-displayed human antibody domain library with a scaffold based on a newly identified highly soluble, stable heavy chain variable domain. *J Mol Biol* *382*, 779-789.
- Chen, Y., Yang, Z., Meng, M., Zhao, Y., Dong, N., Yan, H., Liu, L., Ding, M., Peng, H.B., and Shao, F. (2009). Cullin mediates degradation of RhoA through evolutionarily conserved BTB adaptors to control actin cytoskeleton structure and cell movement. *Molecular cell* *35*, 841-855.
- Chen, Y.X., Li, Z.B., Diao, F., Cao, D.M., Fu, C.C., and Lu, J. (2006). Up-regulation of RhoB by glucocorticoids and its effects on the cell proliferation and NF-kappaB transcriptional activity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *101*, 179-187.
- Chen, Z., Sun, J., Pradines, A., Favre, G., Adnane, J., and Sebti, S.M. (2000). Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J Biol Chem* *275*, 17974-17978.
- Chinestra, P., Lajoie-Mazenc, I., Faye, J.C., and Favre, G. (2012). Use of phage display for the identification of molecular sensors specific for activated Rho. *Methods Mol Biol* *827*, 283-303.
- Chinestra, P., Olichon, A., Medale-Giamarchi, C., Lajoie-Mazenc, I., Gence, R., Inard, C., Ligat, L., Faye, J.C., and Favre, G. (2014). Generation of a Single Chain Antibody Variable Fragment (scFv) to Sense Selectively RhoB Activation. *PLoS One* *9*, e111034.
- Christ, D., Famm, K., and Winter, G. (2007). Repertoires of aggregation-resistant human antibody domains. *Protein engineering, design & selection : PEDS* *20*, 413-416.
- Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., and Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* *352*, 624-628.
- Cobaugh, C.W., Almagro, J.C., Pogson, M., Iverson, B., and Georgiou, G. (2008). Synthetic antibody libraries focused towards peptide ligands. *J Mol Biol* *378*, 622-633.
- Cochet, O., Kenigsberg, M., Delumeau, I., Duchesne, M., Schweighoffer, F., Tocque, B., and Teillaud, J.L. (1998a). Intracellular expression and functional properties of an anti-p21Ras scFv derived from a rat hybridoma containing specific lambda and irrelevant kappa light chains. *Mol Immunol* *35*, 1097-1110.
- Cochet, O., Kenigsberg, M., Delumeau, I., Virone-Oddos, A., Multon, M.C., Fridman, W.H., Schweighoffer, F., Teillaud, J.L., and Tocque, B. (1998b). Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression. *Cancer Res* *58*, 1170-1176.
- Cohen-Saidon, C., Nechushtan, H., Kahlon, S., Livni, N., Nissim, A., and Razin, E. (2003). A novel strategy using single-chain antibody to show the importance of Bcl-2 in mast cell survival. *Blood* *102*, 2506-2512.
- Cohen, J.C., Scott, D.K., Miller, J., Zhang, J., Zhou, P., and Larson, J.E. (2004). Transient in utero knockout (TIUKO) of C-MYC affects late lung and intestinal development in the mouse. *BMC developmental biology* *4*, 4.
- Colby, D.W., Chu, Y., Cassady, J.P., Duennwald, M., Zazulak, H., Webster, J.M., Messer, A., Lindquist, S., Ingram, V.M., and Wittrup, K.D. (2004a). Potent inhibition of huntingtin aggregation and cytotoxicity by a disulfide bond-free single-domain intracellular antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 17616-17621.

- Colby, D.W., Garg, P., Holden, T., Chao, G., Webster, J.M., Messer, A., Ingram, V.M., and Wittrup, K.D. (2004b). Development of a human light chain variable domain (V(L)) intracellular antibody specific for the amino terminus of huntingtin via yeast surface display. *J Mol Biol* **342**, 901-912.
- Connolly, E.C., Van Doorslaer, K., Rogler, L.E., and Rogler, C.E. (2010). Overexpression of miR-21 promotes an in vitro metastatic phenotype by targeting the tumor suppressor RHOB. *Molecular cancer research : MCR* **8**, 691-700.
- Conrath, K., Vincke, C., Stijlemans, B., Schymkowitz, J., Decanniere, K., Wyns, L., Muyldermans, S., and Loris, R. (2005). Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH. *J Mol Biol* **350**, 112-125.
- Cortez-Retamozo, V., Backmann, N., Senter, P.D., Wernery, U., De Baetselier, P., Muyldermans, S., and Revets, H. (2004). Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res* **64**, 2853-2857.
- Couderc, B., Pradines, A., Rafii, A., Golzio, M., Deviers, A., Allal, C., Berg, D., Penary, M., Teissie, J., and Favre, G. (2008). In vivo restoration of RhoB expression leads to ovarian tumor regression. *Cancer gene therapy* **15**, 456-464.
- Cui, J., and Shao, F. (2011). Biochemistry and cell signaling taught by bacterial effectors. *Trends in biochemical sciences* **36**, 532-540.
- Daugherty, P.S., Olsen, M.J., Iverson, B.L., and Georgiou, G. (1999). Development of an optimized expression system for the screening of antibody libraries displayed on the Escherichia coli surface. *Protein engineering* **12**, 613-621.
- Davies, J., and Riechmann, L. (1994). 'Camelising' human antibody fragments: NMR studies on VH domains. *FEBS Lett* **339**, 285-290.
- Delarue, F.L., Taylor, B.S., and Sebt, S.M. (2001). Ras and RhoA suppress whereas RhoB enhances cytokine-induced transcription of nitric oxide synthase-2 in human normal liver AKN-1 cells and lung cancer A-549 cells. *Oncogene* **20**, 6531-6537.
- der Maur, A.A., Zahnd, C., Fischer, F., Spinelli, S., Honegger, A., Cambillau, C., Escher, D., Pluckthun, 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.
- Deschacht, N., De Groeve, K., Vincke, C., Raes, G., De Baetselier, P., and Muyldermans, S. (2010). A novel promiscuous class of camelid single-domain antibody contributes to the antigen-binding repertoire. *J Immunol* **184**, 5696-5704.
- Desiderio, A., Franconi, R., Lopez, M., Villani, M.E., Viti, F., Chiaraluce, R., Consalvi, V., Neri, D., and Benvenuto, E. (2001). A semi-synthetic repertoire of intrinsically stable antibody fragments derived from a single-framework scaffold. *J Mol Biol* **310**, 603-615.
- Donnelly, S.K., Bravo-Cordero, J.J., and Hodgson, L. (2014). Rho GTPase isoforms in cell motility: Don't fret, we have FRET. *Cell adhesion & migration* **8**.
- Dooley, H., and Flajnik, M.F. (2005). Shark immunity bites back: affinity maturation and memory response in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *European journal of immunology* **35**, 936-945.
- Dooley, H., Flajnik, M.F., and Porter, A.J. (2003). Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. *Mol Immunol* **40**, 25-33.
- Doorbar, J., and Griffin, H. (2007). Intrabody strategies for the treatment of human papillomavirus-associated disease. *Expert opinion on biological therapy* **7**, 677-689.
- Dottorini, T., Vaughan, C.K., Walsh, M.A., LoSurdo, P., and Sollazzo, M. (2004). Crystal structure of a human VH: requirements for maintaining a monomeric fragment. *Biochemistry* **43**, 622-628.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.
- Emadi, S., Barkhordarian, H., Wang, M.S., Schulz, P., and Sierks, M.R. (2007). Isolation of a human single chain antibody fragment against oligomeric alpha-synuclein that inhibits aggregation and prevents alpha-synuclein-induced toxicity. *J Mol Biol* **368**, 1132-1144.

- Engel, M.E., Datta, P.K., and Moses, H.L. (1998). RhoB is stabilized by transforming growth factor beta and antagonizes transcriptional activation. *J Biol Chem* 273, 9921-9926.
- Erazo-Oliveras, A., Najjar, K., Dayani, L., Wang, T.Y., Johnson, G.A., and Pellois, J.P. (2014). Protein delivery into live cells by incubation with an endosomolytic agent. *Nat Methods* 11, 861-867.
- Even-Desrumeaux, K., Nevoltris, D., Lavaut, M.N., Alim, K., Borg, J.P., Audebert, S., Kerfelec, B., Baty, D., and Chames, P. (2014). Masked selection: a straightforward and flexible approach for the selection of binders against specific epitopes and differentially expressed proteins by phage display. *Mol Cell Proteomics* 13, 653-665.
- Ewert, S., Honegger, A., and Pluckthun, A. (2004). Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods* 34, 184-199.
- Farajnia, S., Ahmadzadeh, V., Tanomand, A., Veisi, K., Khosroshahi, S.A., and Rahbarnia, L. (2014). Development trends for generation of single-chain antibody fragments. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 1-12.
- Feig, L.A. (1999). Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol* 1, E25-27.
- Fernandez-Borja, M., Janssen, L., Verwoerd, D., Hordijk, P., and Neefjes, J. (2005). RhoB regulates endosome transport by promoting actin assembly on endosomal membranes through Dia1. *J Cell Sci* 118, 2661-2670.
- Fields, S. (2005). High-throughput two-hybrid analysis. The promise and the peril. *FEBS J* 272, 5391-5399.
- 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.
- Fonseca, S.B., Pereira, M.P., and Kelley, S.O. (2009). Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Advanced drug delivery reviews* 61, 953-964.
- Forget, M.A., Desrosiers, R.R., Del, M., Moumdjian, R., Shedid, D., Berthelet, F., and Beliveau, R. (2002). The expression of rho proteins decreases with human brain tumor progression: potential tumor markers. *Clin Exp Metastasis* 19, 9-15.
- Fritz, G., Brachetti, C., Bahlmann, F., Schmidt, M., and Kaina, B. (2002). Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer* 87, 635-644.
- Fritz, G., Gnad, R., and Kaina, B. (1999). Cell and tissue-type specific expression of Ras-related GTPase RhoB. *Anticancer Res* 19, 1681-1688.
- Fritz, G., and Kaina, B. (2000). Ras-related GTPase RhoB forces alkylolation-induced apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 784-789.
- Fritz, G., and Kaina, B. (2001a). Ras-related GTPase RhoB represses NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* 276, 3115-3122.
- Fritz, G., and Kaina, B. (2001b). Transcriptional activation of the small GTPase gene rhoB by genotoxic stress is regulated via a CCAAT element. *Nucleic Acids Res* 29, 792-798.
- Fritz, G., Kaina, B., and Aktories, K. (1995). The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *J Biol Chem* 270, 25172-25177.
- Furth, M.E., Davis, L.J., Fleurdelys, B., and Scolnick, E.M. (1982). Monoclonal antibodies to the p21 products of the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus and of the cellular ras gene family. *J Virol* 43, 294-304.
- Gampel, A., and Mellor, H. (2002). Small interfering RNAs as a tool to assign Rho GTPase exchange-factor function in vivo. *Biochem J* 366, 393-398.
- Gampel, A., Parker, P.J., and Mellor, H. (1999). Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Curr Biol* 9, 955-958.
- Gao, Y., Dickerson, J.B., Guo, F., Zheng, J., and Zheng, Y. (2004). Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7618-7623.

- Garaicoechea, L., Olichon, A., Marcoppido, G., Wigdorovitz, A., Mozgovoij, M., Saif, L., Surrey, T., and Parreno, V. (2008). Llama-derived single-chain antibody fragments directed to rotavirus VP6 protein possess broad neutralizing activity in vitro and confer protection against diarrhea in mice. *J Virol* *82*, 9753-9764.
- Garcia-Mata, R., Boulter, E., and BurrIDGE, K. (2011). The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nature reviews Molecular cell biology* *12*, 493-504.
- Gennari, F., Mehta, S., Wang, Y., St Clair Tallarico, A., Palu, G., and Marasco, W.A. (2004). Direct phage to intrabody screening (DPIS): demonstration by isolation of cytosolic intrabodies against the TES1 site of Epstein Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) that block NF-kappaB transactivation. *J Mol Biol* *335*, 193-207.
- Gerald, D., Adini, I., Shechter, S., Perruzzi, C., Varnau, J., Hopkins, B., Kazerounian, S., Kurschat, P., Blachon, S., Khedkar, S., *et al.* (2013). RhoB controls coordination of adult angiogenesis and lymphangiogenesis following injury by regulating VEZF1-mediated transcription. *Nature communications* *4*, 2824.
- Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I., and Pluckthun, A. (1990). A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry* *29*, 1362-1367.
- Glockshuber, R., Schmidt, T., and Pluckthun, A. (1992). The disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding in vitro, and functional expression in *Escherichia coli*. *Biochemistry* *31*, 1270-1279.
- Glorian, V., Maillot, G., Poles, S., Iacovoni, J.S., Favre, G., and Vagner, S. (2011). HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ* *18*, 1692-1701.
- Goffinet, M., Chinestra, P., Lajoie-Mazenc, I., Medale-Giamarchi, C., Favre, G., and Faye, J.C. (2008). Identification of a GTP-bound Rho specific scFv molecular sensor by phage display selection. *BMC Biotechnol* *8*, 34.
- Goldman, E.R., Anderson, G.P., Liu, J.L., Delehanty, J.B., Sherwood, L.J., Osborn, L.E., Cummins, L.B., and Hayhurst, A. (2006). Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library. *Anal Chem* *78*, 8245-8255.
- Govaert, J., Pellis, M., Deschacht, N., Vincke, C., Conrath, K., Muyldermans, S., and Saerens, D. (2012). Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments. *J Biol Chem* *287*, 1970-1979.
- Greenberg, A.S., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E.C., and Flajnik, M.F. (1995). A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* *374*, 168-173.
- Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Marks, J.D., Bye, J.M., Embleton, M.J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K.P., Gorick, B.D., Hughes-Jones, N.C., *et al.* (1993). Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J* *12*, 725-734.
- Gueorguieva, D., Li, S., Walsh, N., Mukerji, A., Tanha, J., and Pandey, S. (2006). Identification of single-domain, Bax-specific intrabodies that confer resistance to mammalian cells against oxidative-stress-induced apoptosis. *FASEB J* *20*, 2636-2638.
- Guglielmi, L., Denis, V., Vezzio-Vie, N., Bec, N., Dariavach, P., Larroque, C., and Martineau, P. (2011). Selection for intrabody solubility in mammalian cells using GFP fusions. *Protein engineering, design & selection : PEDS* *24*, 873-881.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., and Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* *363*, 446-448.
- Hancock, J.F., and Hall, A. (1993). A novel role for RhoGDI as an inhibitor of GAP proteins. *EMBO J* *12*, 1915-1921.
- Hanes, J., and Pluckthun, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 4937-4942.

- Hanes, J., Schaffitzel, C., Knappik, A., and Pluckthun, A. (2000). Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nat Biotechnol* *18*, 1287-1292.
- 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.
- Harvey, B.R., Georgiou, G., Hayhurst, A., Jeong, K.J., Iverson, B.L., and Rogers, G.K. (2004). Anchored periplasmic expression, a versatile technology for the isolation of high-affinity antibodies from *Escherichia coli*-expressed libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 9193-9198.
- Healy, K.D., Hodgson, L., Kim, T.Y., Shutes, A., Maddileti, S., Juliano, R.L., Hahn, K.M., Harden, T.K., Bang, Y.J., and Der, C.J. (2008). DLC-1 suppresses non-small cell lung cancer growth and invasion by RhoGAP-dependent and independent mechanisms. *Molecular carcinogenesis* *47*, 326-337.
- Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews Molecular cell biology* *9*, 690-701.
- Heintges, T., zu Putlitz, J., and Wands, J.R. (1999). Characterization and binding of intracellular antibody fragments to the hepatitis C virus core protein. *Biochem Biophys Res Commun* *263*, 410-418.
- Hemsath, L., Dvorsky, R., Fiegen, D., Carlier, M.F., and Ahmadian, M.R. (2005). An electrostatic steering mechanism of Cdc42 recognition by Wiskott-Aldrich syndrome proteins. *Molecular cell* *20*, 313-324.
- Herce, H.D., Deng, W., Helma, J., Leonhardt, H., and Cardoso, M.C. (2013). Visualization and targeted disruption of protein interactions in living cells. *Nature communications* *4*, 2660.
- Higuchi, K., Araki, T., Matsuzaki, O., Sato, A., Kanno, K., Kitaguchi, N., and Ito, H. (1997). Cell display library for gene cloning of variable regions of human antibodies to hepatitis B surface antigen. *J Immunol Methods* *202*, 193-204.
- Hines, J., Gough, J.D., Corson, T.W., and Crews, C.M. (2013). Posttranslational protein knockdown coupled to receptor tyrosine kinase activation with phosphoPROTACs. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 8942-8947.
- Ho, T.T., Merajver, S.D., Lapiere, C.M., Nusgens, B.V., and Deroanne, C.F. (2008). RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGDIalpha. *J Biol Chem* *283*, 21588-21598.
- Hodis, E., Watson, I.R., Kryukov, G.V., Arold, S.T., Imielinski, M., Theurillat, J.P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., *et al.* (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* *150*, 251-263.
- 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.
- Hoffmann, C., Pop, M., Leemhuis, J., Schirmer, J., Aktories, K., and Schmidt, G. (2004). The *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxic necrotizing factor (CNFY) selectively activates RhoA. *J Biol Chem* *279*, 16026-16032.
- Holland, A.J., Fachinetti, D., Han, J.S., and Cleveland, D.W. (2012). Inducible, reversible system for the rapid and complete degradation of proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, E3350-3357.
- Holliger, P., and Hudson, P.J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* *23*, 1126-1136.
- Hoogenboom, H.R. (2002). Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods Mol Biol* *178*, 1-37.
- Hoogenboom, H.R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* *23*, 1105-1116.

- Hoogenboom, H.R., and Winter, G. (1992). By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J Mol Biol* 227, 381-388.
- Hu, C.D., Chinenov, Y., and Kerppola, T.K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular cell* 9, 789-798.
- Huang, M., Duhadaway, J.B., Prendergast, G.C., and Laury-Kleintop, L.D. (2007). RhoB regulates PDGFR-beta trafficking and signaling in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2597-2605.
- Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Brucoleri, R.E., Haber, E., Crea, R., *et al.* (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.
- Hutchinson, C.L., Lowe, P.N., McLaughlin, S.H., Mott, H.R., and Owen, D. (2013). Differential binding of RhoA, RhoB, and RhoC to protein kinase C-related kinase (PRK) isoforms PRK1, PRK2, and PRK3: PRKs have the highest affinity for RhoB. *Biochemistry* 52, 7999-8011.
- Huvneers, S., and Danen, E.H. (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* 122, 1059-1069.
- Hwang, C., Sinskey, A.J., and Lodish, H.F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257, 1496-1502.
- Ihara, K., Muraguchi, S., Kato, M., Shimizu, T., Shirakawa, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K., and Hakoshima, T. (1998). Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J Biol Chem* 273, 9656-9666.
- Ishida, H., Zhang, X., Erickson, K., and Ray, P. (2004). Botulinum toxin type A targets RhoB to inhibit lysophosphatidic acid-stimulated actin reorganization and acetylcholine release in nerve growth factor-treated PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 310, 881-889.
- Itoh, R.E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N., and Matsuda, M. (2002). Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol* 22, 6582-6591.
- Jackson, B., Peyrolier, K., Pedersen, E., Basse, A., Karlsson, R., Wang, Z., Lefever, T., Ochsenbein, A.M., Schmidt, G., Aktories, K., *et al.* (2011). RhoA is dispensable for skin development, but crucial for contraction and directed migration of keratinocytes. *Mol Biol Cell* 22, 593-605.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.
- Jahner, D., and Hunter, T. (1991). The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol Cell Biol* 11, 3682-3690.
- Janeway, C. A., Travers, P., 1997. La réponse immune humorale., in: *Immunobiologie*. De Boeck & Larcier s.a., pp. 309–24.
- 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.
- Jermutus, L., Honegger, A., Schwesinger, F., Hanes, J., and Pluckthun, A. (2001). Tailoring in vitro evolution for protein affinity or stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 75-80.
- Jaspers, L., Schon, O., Famm, K., and Winter, G. (2004a). Aggregation-resistant domain antibodies selected on phage by heat denaturation. *Nat Biotechnol* 22, 1161-1165.
- Jaspers, L., Schon, O., James, L.C., Veprintsev, D., and Winter, G. (2004b). Crystal structure of HEL4, a soluble, refoldable human V(H) single domain with a germ-line scaffold. *J Mol Biol* 337, 893-903.
- Jiang, J., and Struhl, G. (1998). Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature* 391, 493-496.

- Jiang, K., Delarue, F.L., and Sebti, S.M. (2004a). EGFR, ErbB2 and Ras but not Src suppress RhoB expression while ectopic expression of RhoB antagonizes oncogene-mediated transformation. *Oncogene* 23, 1136-1145.
- Jiang, K., Sun, J., Cheng, J., Djeu, J.Y., Wei, S., and Sebti, S. (2004b). Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis. *Mol Cell Biol* 24, 5565-5576.
- Joshi, S.N., Butler, D.C., and Messer, A. (2012). Fusion to a highly charged proteasomal retargeting sequence increases soluble cytoplasmic expression and efficacy of diverse anti-synuclein intrabodies. *mAbs* 4, 686-693.
- Kaiser, P.D., Maier, J., Traenkle, B., Emele, F., and Rothbauer, U. (2014). Recent progress in generating intracellular functional antibody fragments to target and trace cellular components in living cells. *Biochim Biophys Acta*.
- Kamai, T., Tsujii, T., Arai, K., Takagi, K., Asami, H., Ito, Y., and Oshima, H. (2003). Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 9, 2632-2641.
- Kamon, H., Kawabe, T., Kitamura, H., Lee, J., Kamimura, D., Kaisho, T., Akira, S., Iwamatsu, A., Koga, H., Murakami, M., *et al.* (2006). TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation. *EMBO J* 25, 4108-4119.
- Karlsson, R., Pedersen, E.D., Wang, Z., and Brakebusch, C. (2009). Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1796, 91-98.
- Kazerounian, S., Gerald, D., Huang, M., Chin, Y.R., Udayakumar, D., Zheng, N., O'Donnell, R.K., Perruzzi, C., Mangiante, L., Pourat, J., *et al.* (2013). RhoB differentially controls Akt function in tumor cells and stromal endothelial cells during breast tumorigenesis. *Cancer Res* 73, 50-61.
- Keefe, A.D., and Szostak, J.W. (2001). Functional proteins from a random-sequence library. *Nature* 410, 715-718.
- Kerppola, T.K. (2009). Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. *Chemical Society reviews* 38, 2876-2886.
- Kim, C.H., Won, M., Choi, C.H., Ahn, J., Kim, B.K., Song, K.B., Kang, C.M., and Chung, K.S. (2010a). Increase of RhoB in gamma-radiation-induced apoptosis is regulated by c-Jun N-terminal kinase in Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 1182-1186.
- Kim, D.M., Chung, K.S., Choi, S.J., Jung, Y.J., Park, S.K., Han, G.H., Ha, J.S., Song, K.B., Choi, N.S., Kim, H.M., *et al.* (2009). RhoB induces apoptosis via direct interaction with TNFAIP1 in HeLa cells. *Int J Cancer* 125, 2520-2527.
- Kim, D.M., Won, M., Chung, C.S., Kim, S., Yim, H.J., Jung, S.H., and Jeong, S. (2010b). JNK-mediated transcriptional upregulation of RhoB is critical for apoptosis of HCT-116 colon cancer cells by a novel diarylsulfonylurea derivative. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 15, 1540-1548.
- Kirpotin, D.B., Noble, C.O., Hayes, M.E., Huang, Z., Kornaga, T., Zhou, Y., Nielsen, U.B., Marks, J.D., and Drummond, D.C. (2012). Building and characterizing antibody-targeted lipidic nanotherapeutics. *Methods Enzymol* 502, 139-166.
- Kirschning, C.J., Dreher, S., Maass, B., Fichte, S., Schade, J., Koster, M., Noack, A., Lindenmaier, W., Wagner, H., and Boldicke, T. (2010). Generation of anti-TLR2 intrabody mediating inhibition of macrophage surface TLR2 expression and TLR2-driven cell activation. *BMC Biotechnol* 10, 31.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhof, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A., and Virnekas, 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., Grafe, N., Schiess, R., and Pluckthun, A. (2006). Direct selection of antibodies from complex libraries with the protein fragment complementation assay. *J Mol Biol* 357, 427-441.
- Koh, W.W., Steffensen, S., Gonzalez-Pajuelo, M., Hoorelbeke, B., Gorlani, A., Szynol, A., Forsman, A., Aasa-Chapman, M.M., de Haard, H., Verrips, T., *et al.* (2010). Generation of a family-specific

- phage library of llama single chain antibody fragments that neutralize HIV-1. *J Biol Chem* 285, 19116-19124.
- Kohler, 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.
- Kourlas, P.J., Strout, M.P., Becknell, B., Veronese, M.L., Croce, C.M., Theil, K.S., Krahe, R., Ruutu, T., Knuutila, S., Bloomfield, C.D., *et al.* (2000). Identification of a gene at 11q23 encoding a guanine nucleotide exchange factor: evidence for its fusion with MLL in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2145-2150.
- Kovaleva, M., Ferguson, L., Steven, J., Porter, A., and Barelle, C. (2014). Shark variable new antigen receptor biologics - a novel technology platform for therapeutic drug development. *Expert opinion on biological therapy* 14, 1527-1539.
- Koyano-Nakagawa, N., Nishida, J., Baldwin, D., Arai, K., and Yokota, T. (1994). Molecular cloning of a novel human cDNA encoding a zinc finger protein that binds to the interleukin-3 promoter. *Mol Cell Biol* 14, 5099-5107.
- Krag, D.N., Shukla, G.S., Shen, G.P., Pero, S., Ashikaga, T., Fuller, S., Weaver, D.L., Burdette-Radoux, S., and Thomas, C. (2006). Selection of tumor-binding ligands in cancer patients with phage display libraries. *Cancer Res* 66, 7724-7733.
- Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B.H., Evans, P., Bacchiocchi, A., McCusker, J.P., Cheng, E., Davis, M.J., Goh, G., Choi, M., *et al.* (2012). Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nature genetics* 44, 1006-1014.
- Kraynov, V.S., Chamberlain, C., Bokoch, G.M., Schwartz, M.A., Slabaugh, S., and Hahn, K.M. (2000). Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* 290, 333-337.
- Kristensen, P., and Winter, G. (1998). Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Folding & design* 3, 321-328.
- Kudva, R., Denks, K., Kuhn, P., Vogt, A., Muller, M., and Koch, H.G. (2013). Protein translocation across the inner membrane of Gram-negative bacteria: the Sec and Tat dependent protein transport pathways. *Research in microbiology* 164, 505-534.
- Kumar, P., Ban, H.S., Kim, S.S., Wu, H., Pearson, T., Greiner, D.L., Laouar, A., Yao, J., Haridas, V., Habiro, K., *et al.* (2008). T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. *Cell* 134, 577-586.
- 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.
- Kurokawa, K., Nakamura, T., Aoki, K., and Matsuda, M. (2005). Mechanism and role of localized activation of Rho-family GTPases in growth factor-stimulated fibroblasts and neuronal cells. *Biochemical Society transactions* 33, 631-634.
- Lajoie-Mazenc, I., Tovar, D., Penary, M., Lortal, B., Allart, S., Favard, C., Brihoum, M., Pradines, A., and Favre, G. (2008). MAP1A light chain-2 interacts with GTP-RhoB to control epidermal growth factor (EGF)-dependent EGF receptor signaling. *J Biol Chem* 283, 4155-4164.
- Lebowitz, P.F., Du, W., and Prendergast, G.C. (1997). Prenylation of RhoB is required for its cell transforming function but not its ability to activate serum response element-dependent transcription. *J Biol Chem* 272, 16093-16095.
- Lebowitz, P.F., and Prendergast, G.C. (1998). Functional interaction between RhoB and the transcription factor DB1. *Cell adhesion and communication* 6, 277-287.
- Lee, C.V., Liang, W.C., Dennis, M.S., Eigenbrot, C., Sidhu, S.S., and Fuh, G. (2004). High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. *J Mol Biol* 340, 1073-1093.
- Lee, W.J., Kim, D.U., Lee, M.Y., and Choi, K.Y. (2007). Identification of proteins interacting with the catalytic subunit of PP2A by proteomics. *Proteomics* 7, 206-214.

- 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.
- Lerm, M., Schmidt, G., and Aktories, K. (2000). Bacterial protein toxins targeting rho GTPases. *FEMS Microbiol Lett* 188, 1-6.
- Li, Y.D., Liu, Y.P., Cao, D.M., Yan, Y.M., Hou, Y.N., Zhao, J.Y., Yang, R., Xia, Z.F., and Lu, J. (2011). Induction of small G protein RhoB by non-genotoxic stress inhibits apoptosis and activates NF-kappaB. *J Cell Physiol* 226, 729-738.
- Lin, R., Cerione, R.A., and Manor, D. (1999). Specific contributions of the small GTPases Rho, Rac, and Cdc42 to Dbl transformation. *J Biol Chem* 274, 23633-23641.
- Lipovsek, D., and Pluckthun, A. (2004). In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *J Immunol Methods* 290, 51-67.
- Liu, A., Cerniglia, G.J., Bernhard, E.J., and Prendergast, G.C. (2001a). RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6192-6197.
- Liu, A.X., Rane, N., Liu, J.P., and Prendergast, G.C. (2001b). RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol* 21, 6906-6912.
- Liu, J.P., and Jessell, T.M. (1998). A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. *Development* 125, 5055-5067.
- Liu, M., Bi, F., Zhou, X., and Zheng, Y. (2012). Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. *Trends in cell biology* 22, 365-373.
- Liu, M., Tang, Q., Qiu, M., Lang, N., Li, M., Zheng, Y., and Bi, F. (2011). miR-21 targets the tumor suppressor RhoB and regulates proliferation, invasion and apoptosis in colorectal cancer cells. *FEBS Lett* 585, 2998-3005.
- Longenecker, K., Read, P., Lin, S.K., Somlyo, A.P., Nakamoto, R.K., and Derewenda, Z.S. (2003). Structure of a constitutively activated RhoA mutant (Q63L) at 1.55 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59, 876-880.
- Luis-Ravelo, D., Anton, I., Zanduetta, C., Valencia, K., Pajares, M.J., Agorreta, J., Montuenga, L., Vicent, S., Wistuba, II, De Las Rivas, J., *et al.* (2014). RHOB influences lung adenocarcinoma metastasis and resistance in a host-sensitive manner. *Molecular oncology* 8, 196-206.
- Malcolm, T., Ettehadieh, E., and Sadowski, I. (2003). Mitogen-responsive expression of RhoB is regulated by RNA stability. *Oncogene* 22, 6142-6150.
- Mamouni, K., Cristini, A., Guirouilh-Barbat, J., Monferran, S., Lemarie, A., Faye, J.C., Lopez, B.S., Favre, G., and Sordet, O. (2014). RhoB promotes gammaH2AX dephosphorylation and DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 34, 3144-3155.
- Mandrup, O.A., Friis, N.A., Lykkemark, S., Just, J., and Kristensen, P. (2013). A novel heavy domain antibody library with functionally optimized complementarity determining regions. *PLoS One* 8, e76834.
- 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 U S A* 90, 7889-7893.
- Marasco, W.A., and Sui, J. (2007). The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat Biotechnol* 25, 1421-1434.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D., and Winter, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222, 581-597.
- Marlow, L.A., D'Innocenzi, J., Zhang, Y., Rohl, S.D., Cooper, S.J., Sebo, T., Grant, C., Mclver, B., Kasperbauer, J.L., Wadsworth, J.T., *et al.* (2010). Detailed molecular fingerprinting of four new anaplastic thyroid carcinoma cell lines and their use for verification of RhoB as a molecular therapeutic target. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 5338-5347.

- Marlow, L.A., Reynolds, L.A., Cleland, A.S., Cooper, S.J., Gumz, M.L., Kurakata, S., Fujiwara, K., Zhang, Y., Sebo, T., Grant, C., *et al.* (2009). Reactivation of suppressed RhoB is a critical step for the inhibition of anaplastic thyroid cancer growth. *Cancer Res* 69, 1536-1544.
- Marschall, A.L., Zhang, C., Frenzel, A., Schirrmann, T., Hust, M., Perez, F., and Dubel, S. (2014). Delivery of antibodies to the cytosol: debunking the myths. *mAbs* 6, 943-956.
- 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.
- Matsuzawa, S., Cuddy, M., Fukushima, T., and Reed, J.C. (2005). Method for targeting protein destruction by using a ubiquitin-independent, proteasome-mediated degradation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14982-14987.
- Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R., and Dower, W.J. (1994). An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9022-9026.
- Mazieres, J., Antonia, T., Daste, G., Muro-Cacho, C., Berchery, D., Tillement, V., Pradines, A., Sebti, S., and Favre, G. (2004). Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin Cancer Res* 10, 2742-2750.
- Mazieres, J., Tillement, V., Allal, C., Clanet, C., Bobin, L., Chen, Z., Sebti, S.M., Favre, G., and Pradines, A. (2005). Geranylgeranylated, but not farnesylated, RhoB suppresses Ras transformation of NIH-3T3 cells. *Exp Cell Res* 304, 354-364.
- Mazieres, J., Tovar, D., He, B., Nieto-Acosta, J., Marty-Detraves, C., Clanet, C., Pradines, A., Jablons, D., and Favre, G. (2007). Epigenetic regulation of RhoB loss of expression in lung cancer. *BMC cancer* 7, 220.
- Mazor, Y., Van Blarcom, T., Mabry, R., Iverson, B.L., and Georgiou, G. (2007). Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 25, 563-565.
- 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, e104998.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., and Chiswell, D.J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.
- Medale-Giamarchi, C., Lajoie-Mazenc, I., Malissein, E., Meunier, E., Couderc, B., Berge, Y., Filleron, T., Keller, L., Marty, C., Lacroix-Triki, M., *et al.* (2013). RhoB modifies estrogen responses in breast cancer cells by influencing expression of the estrogen receptor. *Breast cancer research : BCR* 15, R6.
- Melchionna, T., and Cattaneo, A. (2007). A protein silencing switch by ligand-induced proteasome-targeting intrabodies. *J Mol Biol* 374, 641-654.
- Meli, G., Lecci, A., Manca, A., Krako, N., Albertini, V., Benussi, L., Ghidoni, R., and Cattaneo, A. (2014). Conformational targeting of intracellular Abeta oligomers demonstrates their pathological oligomerization inside the endoplasmic reticulum. *Nature communications* 5, 3867.
- 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.
- Mellert, K., Lamla, M., Scheffzek, K., Wittig, R., and Kaufmann, D. (2012). Enhancing endosomal escape of transduced proteins by photochemical internalisation. *PLoS One* 7, e52473.
- Mellor, H., Flynn, P., Nobes, C.D., Hall, A., and Parker, P.J. (1998). PRK1 is targeted to endosomes by the small GTPase, RhoB. *J Biol Chem* 273, 4811-4814.
- Messer, A., and Joshi, S.N. (2013). Intrabodies as neuroprotective therapeutics. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 10, 447-458.
- Meyer, N., Peyret-Lacombe, A., Canguilhem, B., Medale-Giamarchi, C., Mamouni, K., Cristini, A., Monferran, S., Lamant, L., Filleron, T., Pradines, A., *et al.* (2014). RhoB promotes cancer initiation by protecting keratinocytes from UVB-induced apoptosis but limits tumor aggressiveness. *J Invest Dermatol* 134, 203-212.

- Mhashilkar, A.M., Doebis, C., Seifert, M., Busch, A., Zani, C., Soo Hoo, J., Nagy, M., Ritter, T., Volk, H.D., and Marasco, W.A. (2002). Intrabody-mediated phenotypic knockout of major histocompatibility complex class I expression in human and monkey cell lines and in primary human keratinocytes. *Gene therapy* 9, 307-319.
- Michaelson, D., and Philips, M. (2006). The use of GFP to localize Rho GTPases in living cells. *Methods Enzymol* 406, 296-315.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M., and Philips, M.R. (2001). Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol* 152, 111-126.
- Milia, J., Teyssier, F., Dalenc, F., Ader, I., Delmas, C., Pradines, A., Lajoie-Mazenc, I., Baron, R., Bonnet, J., Cohen-Jonathan, E., *et al.* (2005). Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication. *Cell Death Differ* 12, 492-501.
- Mircescu, H., Steuve, S., Savonet, V., Degraef, C., Mellor, H., Dumont, J.E., Maenhaut, C., and Pirson, I. (2002). Identification and characterization of a novel activated RhoB binding protein containing a PDZ domain whose expression is specifically modulated in thyroid cells by cAMP. *Eur J Biochem* 269, 6241-6249.
- Mirkin, C.A., Letsinger, R.L., Mucic, R.C., and Storhoff, J.J. (1996). A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* 382, 607-609.
- Moda, F., Vimercati, C., Campagnani, I., Ruggerone, M., Giaccone, G., Morbin, M., Zentilin, L., Giacca, M., Zucca, I., Legname, G., *et al.* (2012). Brain delivery of AAV9 expressing an anti-PrP monovalent antibody delays prion disease in mice. *Prion* 6, 383-390.
- Monegal, A., Ami, D., Martinelli, C., Huang, H., Aliprandi, M., Capasso, P., Francavilla, C., Ossolengo, G., and de Marco, A. (2009). Immunological applications of single-domain llama recombinant antibodies isolated from a naive library. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 22, 273-280.
- Monegal, A., Olichon, A., Bery, N., Filleron, T., Favre, G., and de Marco, A. (2012). Single domain antibodies with VH hallmarks are positively selected during panning of llama (*Lama glama*) naive libraries. *Developmental and comparative immunology* 36, 150-156.
- Monferran, S., Skuli, N., Delmas, C., Favre, G., Bonnet, J., Cohen-Jonathan-Moyal, E., and Toulas, C. (2008). AlphaVbeta3 and alphaVbeta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *Int J Cancer* 123, 357-364.
- Mossner, E., Koch, H., and Pluckthun, 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.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Hayashi, S., Tanahashi, N., and Tanaka, K. (2000). Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 1-6.
- Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annual review of biochemistry* 82, 775-797.
- Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J.A., and Hamers, R. (1994). Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein engineering* 7, 1129-1135.
- Nalbant, P., Hodgson, L., Kraynov, V., Toutchkine, A., and Hahn, K.M. (2004). Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells. *Science* 305, 1615-1619.
- Neel, N.F., Lapierre, L.A., Goldenring, J.R., and Richmond, A. (2007). RhoB plays an essential role in CXCR2 sorting decisions. *J Cell Sci* 120, 1559-1571.
- Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Husimi, Y., and Yanagawa, H. (1997). In vitro virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro. *FEBS Lett* 414, 405-408.
- Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T., and Kanemaki, M. (2009). An auxin-based degreen system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nat Methods* 6, 917-922.

- Nissim, A., Hoogenboom, H.R., Tomlinson, I.M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D., and Winter, G. (1994). Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J* *13*, 692-698.
- Nizak, C., Martin-Lluesma, S., Moutel, S., Roux, A., Kreis, T.E., Goud, B., and Perez, F. (2003a). Recombinant antibodies against subcellular fractions used to track endogenous Golgi protein dynamics in vivo. *Traffic* *4*, 739-753.
- Nizak, C., Monier, S., del Nery, E., Moutel, S., Goud, B., and Perez, F. (2003b). Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors. *Science* *300*, 984-987.
- Ohtani, M., Hikima, J., Jung, T.S., Kondo, H., Hirono, I., and Aoki, T. (2013). Construction of an artificially randomized IgNAR phage display library: screening of variable regions that bind to hen egg white lysozyme. *Marine biotechnology* *15*, 56-62.
- Okada, T., Akada, M., Fujita, T., Iwata, T., Goto, Y., Kido, K., Okada, T., Matsuzaki, Y., Kobayashi, K., Matsuno, S., *et al.* (2006). A novel cancer testis antigen that is frequently expressed in pancreatic, lung, and endometrial cancers. *Clin Cancer Res* *12*, 191-197.
- Olichon, A., and de Marco, A. (2012). Preparation of a naive library of camelid single domain antibodies. *Methods Mol Biol* *911*, 65-78.
- Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* *11*, 545-554.
- Omidfar, K., Rasaei, M.J., Modjtahedi, H., Forouzandeh, M., Taghikhani, M., and Golmakani, N. (2004). Production of a novel camel single-domain antibody specific for the type III mutant EGFR. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* *25*, 296-305.
- Orlandi, R., Gussow, 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.
- Palmer, D.B., George, A.J., and Ritter, M.A. (1997). Selection of antibodies to cell surface determinants on mouse thymic epithelial cells using a phage display library. *Immunology* *91*, 473-478.
- Paoletti, F., Malerba, F., Konarev, P.V., Visintin, M., Scardigli, R., Fasulo, L., Lamba, D., Svergun, D.I., and Cattaneo, A. (2012). Direct intracellular selection and biochemical characterization of a recombinant anti-proNGF single chain antibody fragment. *Arch Biochem Biophys* *522*, 26-36.
- Papadimitriou, E., Vasilaki, E., Vorvis, C., Iliopoulos, D., Moustakas, A., Kardassis, D., and Stournaras, C. (2012). Differential regulation of the two RhoA-specific GEF isoforms Net1/Net1A by TGF-beta and miR-24: role in epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene* *31*, 2862-2875.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R.S., Kuppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* *412*, 341-346.
- Paterson, H.F., Self, A.J., Garrett, M.D., Just, I., Aktories, K., and Hall, A. (1990). Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol* *111*, 1001-1007.
- Pelletier, J.N., Campbell-Valois, F.X., and Michnick, S.W. (1998). Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 12141-12146.
- Pellis, M., Pardon, E., Zolghadr, K., Rothbauer, U., Vincke, C., Kinne, J., Dierynck, I., Hertogs, K., Leonhardt, H., Messens, J., *et al.* (2012). A bacterial-two-hybrid selection system for one-step isolation of intracellularly functional Nanobodies. *Arch Biochem Biophys* *526*, 114-123.
- Perez-Martinez, D., Tanaka, T., and Rabbitts, T.H. (2010). Intracellular antibodies and cancer: new technologies offer therapeutic opportunities. *Bioessays* *32*, 589-598.
- Perez-Sala, D., Boya, P., Ramos, I., Herrera, M., and Stamatakis, K. (2009). The C-terminal sequence of RhoB directs protein degradation through an endo-lysosomal pathway. *PLoS One* *4*, e8117.
- Persic, L., Horn, I.R., Rybak, S., Cattaneo, A., Hoogenboom, H.R., and Bradbury, A. (1999). Single-chain variable fragments selected on the 57-76 p21Ras neutralising epitope from phage antibody libraries recognise the parental protein. *FEBS Lett* *443*, 112-116.

- Pertz, O. (2010). Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now? *J Cell Sci* 123, 1841-1850.
- Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R.L., and Hahn, K.M. (2006). Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 440, 1069-1072.
- Philibert, P., Stoessel, A., Wang, W., Sibler, A.P., Bec, N., Larroque, C., Saven, J.G., Courtete, 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.
- Pini, A., Viti, F., Santucci, A., Carnemolla, B., Zardi, L., Neri, P., and Neri, D. (1998). Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem* 273, 21769-21776.
- Portnoff, A.D., Stephens, E.A., Varner, J.D., and Delisa, M.P. (2014). Ubiquibodies, synthetic E3 ubiquitin ligases endowed with unnatural substrate specificity for targeted protein silencing. *J Biol Chem* 289, 7844-7855.
- Prassler, J., Thiel, S., Pracht, C., Polzer, A., Peters, S., Bauer, M., Norenberg, S., Stark, Y., Kolln, 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.
- Prendergast, G.C., Khosravi-Far, R., Solski, P.A., Kurzawa, H., Lebowitz, P.F., and Der, C.J. (1995). Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* 10, 2289-2296.
- Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental biology* 265, 23-32.
- Rakonjac, J., Bennett, N.J., Spagnuolo, J., Gagic, D., and Russel, M. (2011). Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Current issues in molecular biology* 13, 51-76.
- Reiter, Y., Brinkmann, U., Lee, B., and Pastan, I. (1996). Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments. *Nat Biotechnol* 14, 1239-1245.
- Ren, X.D., Kiosses, W.B., and Schwartz, M.A. (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* 18, 578-585.
- Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.
- Rinaldi, A.S., Freund, G., Desplancq, D., Sibler, A.P., Baltzinger, M., Rochel, N., Mely, 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.
- Roberts, R.W., and Szostak, J.W. (1997). RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12297-12302.
- Rodriguez, P.L., Sahay, S., Olabisi, O.O., and Whitehead, I.P. (2007). ROCK I-mediated activation of NF-kappaB by RhoB. *Cell Signal* 19, 2361-2369.
- Rondanino, C., Rojas, R., Ruiz, W.G., Wang, E., Hughey, R.P., Dunn, K.W., and Apodaca, G. (2007). RhoB-dependent modulation of postendocytic traffic in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Traffic* 8, 932-949.
- Rondot, S., Koch, J., Breitling, F., and Dubel, S. (2001). A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat Biotechnol* 19, 75-78.
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Tillib, S., Nowak, D., Schermelleh, L., Gahl, A., Backmann, N., Conrath, K., Muyldermans, S., Cardoso, M.C., *et al.* (2006). Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat Methods* 3, 887-889.
- Sabatel, C., Malvaux, L., Bovy, N., Deroanne, C., Lambert, V., Gonzalez, M.L., Colige, A., Rakic, J.M., Noel, A., Martial, J.A., *et al.* (2011). MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells. *PLoS One* 6, e16979.
- Saerens, D., Ghassabeh, G.H., and Muyldermans, S. (2008). Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 8, 600-608.
- Sahay, S., Pannucci, N.L., Mahon, G.M., Rodriguez, P.L., Megjugorac, N.J., Kostenko, E.V., Ozer, H.L., and Whitehead, I.P. (2008). The RhoGEF domain of p210 Bcr-Abl activates RhoA and is required for transformation. *Oncogene* 27, 2064-2071.

- Sakamoto, K.M., Kim, K.B., Kumagai, A., Mercurio, F., Crews, C.M., and Deshaies, R.J. (2001). Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 8554-8559.
- Sanchez-Martin, D., Martinez-Torrecedrada, J., Teesalu, T., Sugahara, K.N., Alvarez-Cienfuegos, A., Ximenez-Embun, P., Fernandez-Perianez, R., Martin, M.T., Molina-Privado, I., Ruppen-Canas, I., *et al.* (2013). Proteasome activator complex PA28 identified as an accessible target in prostate cancer by in vivo selection of human antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 13791-13796.
- Sandilands, E., Cans, C., Fincham, V.J., Brunton, V.G., Mellor, H., Prendergast, G.C., Norman, J.C., Superti-Furga, G., and Frame, M.C. (2004). RhoB and actin polymerization coordinate Src activation with endosome-mediated delivery to the membrane. *Developmental cell* *7*, 855-869.
- Sato, N., Fukui, T., Taniguchi, T., Yokoyama, T., Kondo, M., Nagasaka, T., Goto, Y., Gao, W., Ueda, Y., Yokoi, K., *et al.* (2007). RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. *Int J Cancer* *120*, 543-551.
- Schouten, A., Roosien, J., Bakker, J., and Schots, A. (2002). Formation of disulfide bridges by a single-chain Fv antibody in the reducing ectopic environment of the plant cytosol. *J Biol Chem* *277*, 19339-19345.
- Sekine, A., Fujiwara, M., and Narumiya, S. (1989). Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* *264*, 8602-8605.
- Serruys, B., Van Houtte, F., Verbrugge, P., Leroux-Roels, G., and Vanlandschoot, P. (2009). Llama-derived single-domain intrabodies inhibit secretion of hepatitis B virions in mice. *Hepatology* *49*, 39-49.
- Shao, C.Y., Secombes, C.J., and Porter, A.J. (2007). Rapid isolation of IgNAR variable single-domain antibody fragments from a shark synthetic library. *Mol Immunol* *44*, 656-665.
- Sheets, M.D., Amersdorfer, P., Finnern, R., Sargent, P., Lindquist, E., Schier, R., Hemingsen, G., Wong, C., Gerhart, J.C., and Marks, J.D. (1998). Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 6157-6162.
- Shukla, G.S., Krag, D.N., Peletskaya, E.N., Pero, S.C., Sun, Y.J., Carman, C.L., McCahill, L.E., and Roland, T.A. (2013). Intravenous infusion of phage-displayed antibody library in human cancer patients: enrichment and cancer-specificity of tumor-homing phage-antibodies. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* *62*, 1397-1410.
- Shukra, A.M., Sridevi, N.V., Dev, C., and Kapil, M. (2014). Production of recombinant antibodies using bacteriophages. *European journal of microbiology & immunology* *4*, 91-98.
- Shutes, A., Onesto, C., Picard, V., Leblond, B., Schweighoffer, F., and Der, C.J. (2007). Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *J Biol Chem* *282*, 35666-35678.
- Sidhu, S.S., Weiss, G.A., and Wells, J.A. (2000). High copy display of large proteins on phage for functional selections. *J Mol Biol* *296*, 487-495.
- Silacci, M., Brack, S., Schirru, G., Marlind, J., Ettorre, A., Merlo, A., Viti, F., and Neri, D. (2005). Design, construction, and characterization of a large synthetic human antibody phage display library. *Proteomics* *5*, 2340-2350.
- Simon, M., Zangemeister-Wittke, U., and Pluckthun, A. (2012). Facile double-functionalization of designed ankyrin repeat proteins using click and thiol chemistries. *Bioconjugate chemistry* *23*, 279-286.
- Skaar, J.R., Pagan, J.K., and Pagano, M. (2013). Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nature reviews Molecular cell biology* *14*, 369-381.
- Skerra, A., and Pluckthun, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* *240*, 1038-1041.
- Skuli, N., Monferran, S., Delmas, C., Lajoie-Mazenc, I., Favre, G., Toulas, C., and Cohen-Jonathan-Moyal, E. (2006). Activation of RhoB by hypoxia controls hypoxia-inducible factor-1alpha

- stabilization through glycogen synthase kinase-3 in U87 glioblastoma cells. *Cancer Res* 66, 482-489.
- Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Song, E., Zhu, P., Lee, S.K., Chowdhury, D., Kussman, S., Dykxhoorn, D.M., Feng, Y., Palliser, D., Weiner, D.B., Shankar, P., *et al.* (2005). Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 23, 709-717.
- Soundararajan, M., Turnbull, A., Fedorov, O., Johansson, C., and Doyle, D.A. (2008). RhoB can adopt a Mg²⁺ free conformation prior to GEF binding. *Proteins* 72, 498-505.
- Souriau, C., Hua, T.D., Lefranc, M.P., and Weill, M. (1998). Présentation à la surface de phages filamenteux : les multiples applications du phage display. *médecine/sciences ; 14*: 300-9
- Southwell, A.L., Bugg, C.W., Kaltenbach, L.S., Dunn, D., Butland, S., Weiss, A., Paganetti, P., Lo, D.C., and Patterson, P.H. (2011). Perturbation with intrabodies reveals that calpain cleavage is required for degradation of huntingtin exon 1. *PLoS One* 6, e16676.
- Southwell, A.L., Khoshnan, A., Dunn, D.E., Bugg, C.W., Lo, D.C., and Patterson, P.H. (2008). Intrabodies binding the proline-rich domains of mutant huntingtin increase its turnover and reduce neurotoxicity. *J Neurosci* 28, 9013-9020.
- Southwell, A.L., Ko, J., and Patterson, P.H. (2009). Intrabody gene therapy ameliorates motor, cognitive, and neuropathological symptoms in multiple mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci* 29, 13589-13602.
- Srougi, M.C., and BurrIDGE, K. (2011). The nuclear guanine nucleotide exchange factors Ect2 and Net1 regulate RhoB-mediated cell death after DNA damage. *PLoS One* 6, e17108.
- Stamatakis, K., Cernuda-Morollon, E., Hernandez-Perera, O., and Perez-Sala, D. (2002). Isoprenylation of RhoB is necessary for its degradation. A novel determinant in the complex regulation of RhoB expression by the mevalonate pathway. *J Biol Chem* 277, 49389-49396.
- Stanfield, R.L., Dooley, H., Flajnik, M.F., and Wilson, I.A. (2004). Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme. *Science* 305, 1770-1773.
- Steuve, S., Devosse, T., Lauwers, E., Vanderwinden, J.M., Andre, B., Courtoy, P.J., and Pirson, I. (2006). RhoB is targeted to late-endosomal structures of the vesicular machinery in the presence of activated RhoB. *Exp Cell Res* 312, 3981-3989.
- Stijlemans, B., Conrath, K., Cortez-Retamozo, V., Van Xong, H., Wyns, L., Senter, P., Revets, H., De Baetselier, P., Muyldermans, S., and Magez, S. (2004). Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *J Biol Chem* 279, 1256-1261.
- Strebe, N., Guse, A., Schungel, M., Schirrmann, T., Hafner, M., Jostock, T., Hust, M., Muller, W., and Dubel, S. (2009). Functional knockdown of VCAM-1 at the posttranslational level with ER retained antibodies. *J Immunol Methods* 341, 30-40.
- Su, Y., Ishikawa, S., Kojima, M., and Liu, B. (2003). Eradication of pathogenic beta-catenin by Skp1/Cullin/F box ubiquitination machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12729-12734.
- Sun, G., Li, H., and Rossi, J.J. (2010). Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3'UTR. *Nucleic Acids Res* 38, 239-252.
- Tabares-da Rosa, S., Rossotti, M., Carleiza, C., Carrion, F., Pritsch, O., Ahn, K.C., Last, J.A., Hammock, B.D., and Gonzalez-Sapienza, G. (2011). Competitive selection from single domain antibody libraries allows isolation of high-affinity antihapten antibodies that are not favored in the llama immune response. *Anal Chem* 83, 7213-7220.
- Takahashi, T.T., Austin, R.J., and Roberts, R.W. (2003). mRNA display: ligand discovery, interaction analysis and beyond. *Trends in biochemical sciences* 28, 159-165.
- Tanaka, T., Chung, G.T., Forster, A., Lobato, M.N., and Rabbitts, T.H. (2003a). De novo production of diverse intracellular antibody libraries. *Nucleic Acids Res* 31, e23.
- Tanaka, T., Lobato, M.N., and Rabbitts, T.H. (2003b). Single domain intracellular antibodies: a minimal fragment for direct in vivo selection of antigen-specific intrabodies. *J Mol Biol* 331, 1109-1120.

- 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. *Nature protocols* 5, 67-92.
- Tanaka, T., and Rabbitts, T.H. (2012). Intracellular antibody capture (IAC) methods for single domain antibodies. *Methods Mol Biol* 911, 151-173.
- Tanaka, T., Sewell, H., Waters, S., Phillips, S.E., and Rabbitts, T.H. (2011). Single domain intracellular antibodies from diverse libraries: emphasizing dual functions of LMO2 protein interactions using a single VH domain. *J Biol Chem* 286, 3707-3716.
- 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.
- Tanha, J., Dubuc, G., Hiram, T., Narang, S.A., and MacKenzie, C.R. (2002). Selection by phage display of llama conventional V(H) fragments with heavy chain antibody V(H)H properties. *J Immunol Methods* 263, 97-109.
- Tillement, V., Lajoie-Mazenc, I., Casanova, A., Froment, C., Penary, M., Tovar, D., Marquez, R., Monsarrat, B., Favre, G., and Pradines, A. (2008). Phosphorylation of RhoB by CK1 impedes actin stress fiber organization and epidermal growth factor receptor stabilization. *Exp Cell Res* 314, 2811-2821.
- Tiller, T., Schuster, I., Deppe, D., Siegers, K., Strohn, R., Herrmann, T., Berenguer, M., Poujol, D., Stehle, J., Stark, Y., *et al.* (2013). A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties. *mAbs* 5, 445-470.
- Tomimatsu, K., Matsumoto, S.E., Tanaka, H., Yamashita, M., Nakanishi, H., Teruya, K., Kazuno, S., Kinjo, T., Hamasaki, T., Kusumoto, K., *et al.* (2013). A rapid screening and production method using a novel mammalian cell display to isolate human monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 441, 59-64.
- Tomlinson, I.M., Walter, G., Marks, J.D., Llewelyn, M.B., and Winter, G. (1992). The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. *J Mol Biol* 227, 776-798.
- Tovar, D., Faye, J.C., and Favre, G. (2003). Cloning of the human RHOB gene promoter: characterization of a VNTR sequence that affects transcriptional activity. *Genomics* 81, 525-530.
- Tse, E., Lobato, M.N., Forster, A., Tanaka, T., Chung, G.T., and Rabbitts, T.H. (2002). Intracellular antibody capture technology: application to selection of intracellular antibodies recognising the BCR-ABL oncogenic protein. *J Mol Biol* 317, 85-94.
- 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.
- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., *et al.* (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389, 990-994.
- Valero, R.A., Oeste, C.L., Stamatakis, K., Ramos, I., Herrera, M., Boya, P., and Perez-Sala, D. (2010). Structural determinants allowing endolysosomal sorting and degradation of endosomal GTPases. *Traffic* 11, 1221-1233.
- Van Audenhove, I., Boucherie, C., Pieters, L., Zwaenepoel, O., Vanloo, B., Martens, E., Verbrugge, C., Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Vandekerckhove, J., Cornelissen, M., *et al.* (2014). Stratifying fascin and cortactin function in invadopodium formation using inhibitory nanobodies and targeted subcellular delocalization. *FASEB J* 28, 1805-1818.
- van Vlerken, L.E., Vyas, T.K., and Amiji, M.M. (2007). Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. *Pharmaceutical research* 24, 1405-1414.
- Vaneycken, I., Govaert, J., Vincke, C., Caveliers, V., Lahoutte, T., De Baetselier, P., Raes, G., Bossuyt, A., Muyldermans, S., and Devoogdt, N. (2010). In vitro analysis and in vivo tumor targeting of a

- humanized, grafted nanobody in mice using pinhole SPECT/micro-CT. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 51, 1099-1106.
- Vardouli, L., Vasilaki, E., Papadimitriou, E., Kardassis, D., and Stournaras, C. (2008). A novel mechanism of TGFbeta-induced actin reorganization mediated by Smad proteins and Rho GTPases. *FEBS J* 275, 4074-4087.
- Vasilaki, E., Papadimitriou, E., Tajadura, V., Ridley, A.J., Stournaras, C., and Kardassis, D. (2010). Transcriptional regulation of the small GTPase RhoB gene by TGF{beta}-induced signaling pathways. *FASEB J* 24, 891-905.
- Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Earnshaw, J.C., McCafferty, J., Hodits, R.A., Wilton, J., and Johnson, K.S. (1996). Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol* 14, 309-314.
- Vega, F.M., Colomba, A., Reymond, N., Thomas, M., and Ridley, A.J. (2012). RhoB regulates cell migration through altered focal adhesion dynamics. *Open biology* 2, 120076.
- Vega, F.M., and Ridley, A.J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* 582, 2093-2101.
- Verheesen, P., de Kluijver, A., van Koningsbruggen, S., de Brij, M., de Haard, H.J., van Ommen, G.J., van der Maarel, S.M., and Verrips, C.T. (2006). Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated aggregation of nuclear polyA-binding protein with a single-domain intracellular antibody. *Human molecular genetics* 15, 105-111.
- Verma, R., Boleti, E., and George, A.J. (1998). Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J Immunol Methods* 216, 165-181.
- Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 10, 842-857.
- Villa, A., Lovato, V., Bujak, E., Wulhfard, S., Pasche, N., and Neri, D. (2011). A novel synthetic naive human antibody library allows the isolation of antibodies against a new epitope of oncofetal fibronectin. *mAbs* 3, 264-272.
- Vishnu, P., Colon-Otero, G., Kennedy, G.T., Marlow, L.A., Kennedy, W.P., Wu, K.J., Santoso, J.T., and Copland, J.A. (2012). RhoB mediates antitumor synergy of combined ixabepilone and sunitinib in human ovarian serous cancer. *Gynecol Oncol* 124, 589-597.
- 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.
- 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., 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. *J Mol Biol* 317, 73-83.
- 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.
- Visvikis, O., Maddugoda, M.P., and Lemichez, E. (2010). Direct modifications of Rho proteins: deconstructing GTPase regulation. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 102, 377-389.
- Volanis, D., Zaravinos, A., Kadiyska, T., Delakas, D., Zoumpourlis, V., and Spandidos, D.A. (2011). Expression profile of Rho kinases in urinary bladder cancer. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology* 16, 511-521.
- Vu, K.B., Ghahroudi, M.A., Wyns, L., and Muyldermans, S. (1997). Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol* 34, 1121-1131.

- Walker, K., and Olson, M.F. (2005). Targeting Ras and Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics. *Curr Opin Genet Dev* 15, 62-68.
- Wallar, B.J., Deward, A.D., Resau, J.H., and Alberts, A.S. (2007). RhoB and the mammalian Diaphanous-related formin mDia2 in endosome trafficking. *Exp Cell Res* 313, 560-571.
- Walsh, R., Nuttall, S., Revill, P., Colledge, D., Cabuang, L., Soppe, S., Dolezal, O., Griffiths, K., Bartholomeusz, A., and Locarnini, S. (2011). Targeting the hepatitis B virus precore antigen with a novel IgNAR single variable domain intrabody. *Virology* 411, 132-141.
- Wang, D.A., and Sebt, S.M. (2005). Palmitoylated cysteine 192 is required for RhoB tumor-suppressive and apoptotic activities. *J Biol Chem* 280, 19243-19249.
- Wang, H.R., Ogunjimi, A.A., Zhang, Y., Ozdamar, B., Bose, R., and Wrana, J.L. (2006). Degradation of RhoA by Smurf1 ubiquitin ligase. *Methods Enzymol* 406, 437-447.
- Wang, L., Yang, L., Luo, Y., and Zheng, Y. (2003a). A novel strategy for specifically down-regulating individual Rho GTPase activity in tumor cells. *J Biol Chem* 278, 44617-44625.
- Wang, M., Guo, L., Wu, Q., Zeng, T., Lin, Q., Qiao, Y., Wang, Q., Liu, M., Zhang, X., Ren, L., *et al.* (2014). ATR/Chk1/Smurf1 pathway determines cell fate after DNA damage by controlling RhoB abundance. *Nature communications* 5, 4901.
- Wang, S., Yan-Neale, Y., Fischer, D., Zeremski, M., Cai, R., Zhu, J., Asselbergs, F., Hampton, G., and Cohen, D. (2003b). Histone deacetylase 1 represses the small GTPase RhoB expression in human non-small lung carcinoma cell line. *Oncogene* 22, 6204-6213.
- Wang, X., He, L., Wu, Y.I., Hahn, K.M., and Montell, D.J. (2010). Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement in vivo. *Nat Cell Biol* 12, 591-597.
- Waraho-Zhmeyev, D., Meksiriporn, B., Portnoff, A.D., and DeLisa, M.P. (2014). Optimizing recombinant antibodies for intracellular function using hitchhiker-mediated survival selection. *Protein engineering, design & selection : PEDS*.
- 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., Gussow, 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.
- Weber, M., Bujak, E., Putelli, A., Villa, A., Matasci, M., Gualandi, L., Hemmerle, T., Wulhfard, S., and Neri, D. (2014). A highly functional synthetic phage display library containing over 40 billion human antibody clones. *PLoS One* 9, e100000.
- Wei, G., Meng, W., Guo, H., Pan, W., Liu, J., Peng, T., Chen, L., and Chen, C.Y. (2011). Potent neutralization of influenza A virus by a single-domain antibody blocking M2 ion channel protein. *PLoS One* 6, e28309.
- Wei, J., Mialki, R.K., Dong, S., Khoo, A., Mallampalli, R.K., Zhao, Y., and Zhao, J. (2013). A new mechanism of RhoA ubiquitination and degradation: roles of SCF(FBXL19) E3 ligase and Erk2. *Biochim Biophys Acta* 1833, 2757-2764.
- Weisser, N.E., and Hall, J.C. (2009). Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnology advances* 27, 502-520.
- Wennerberg, K., and Der, C.J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 117, 1301-1312.
- Westmark, C.J., Bartleson, V.B., and Malter, J.S. (2005). RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light. *Oncogene* 24, 502-511.
- Wheeler, A.P., and Ridley, A.J. (2004). Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res* 301, 43-49.
- Wherlock, M., Gampel, A., Futter, C., and Mellor, H. (2004). Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase. *J Cell Sci* 117, 3221-3231.
- Wijshake, T., Baker, D.J., and van de Sluis, B. (2014). Endonucleases: new tools to edit the mouse genome. *Biochim Biophys Acta*.

- Worn, A., and Pluckthun, A. (1999). Different equilibrium stability behavior of ScFv fragments: identification, classification, and improvement by protein engineering. *Biochemistry* 38, 8739-8750.
- Wu, A.M., and Senter, P.D. (2005). Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* 23, 1137-1146.
- Wu, T.T., Johnson, G., and Kabat, E.A. (1993). Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* 16, 1-7.
- Wu, Y.I., Frey, D., Lungu, O.I., Jaehrig, A., Schlichting, I., Kuhlman, B., and Hahn, K.M. (2009). A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* 461, 104-108.
- Xu, L., Aha, P., Gu, K., Kuimelis, R.G., Kurz, M., Lam, T., Lim, A.C., Liu, H., Lohse, P.A., Sun, L., *et al.* (2002). Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display. *Chemistry & biology* 9, 933-942.
- Xu, L., Jin, B.Q., and Fan, D.M. (2003). Selection and identification of mimic epitopes for gastric cancer-associated antigen MG7 Ag. *Mol Cancer Ther* 2, 301-306.
- Xue, F., Takahara, T., Yata, Y., Xia, Q., Nonome, K., Shinno, E., Kanayama, M., Takahara, S., and Sugiyama, T. (2008). Blockade of Rho/Rho-associated coiled coil-forming kinase signaling can prevent progression of hepatocellular carcinoma in matrix metalloproteinase-dependent manner. *Hepatol Res* 38, 810-817.
- Yeh, J.T., Binari, R., Gocha, T., Dasgupta, R., and Perrimon, N. (2013). PAPTi: a peptide aptamer interference toolkit for perturbation of protein-protein interaction networks. *Scientific reports* 3, 1156.
- Yoneda, M., Hirokawa, Y.S., Ohashi, A., Uchida, K., Kami, D., Watanabe, M., Yokoi, T., Shiraishi, T., and Wakusawa, S. (2010). RhoB enhances migration and MMP1 expression of prostate cancer DU145. *Experimental and molecular pathology* 88, 90-95.
- Yoo, H.Y., Sung, M.K., Lee, S.H., Kim, S., Lee, H., Park, S., Kim, S.C., Lee, B., Rho, K., Lee, J.E., *et al.* (2014). A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nature genetics* 46, 371-375.
- Yoon, Y.S., Choo, J.H., Yoo, T., Kang, K., and Chung, J.H. (2007). RhoB is epigenetically regulated in an age- and tissue-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 164-169.
- Yoshizaki, H., Ohba, Y., Kurokawa, K., Itoh, R.E., Nakamura, T., Mochizuki, N., Nagashima, K., and Matsuda, M. (2003). Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J Cell Biol* 162, 223-232.
- Yoshizuka, N., Moriuchi, R., Mori, T., Yamada, K., Hasegawa, S., Maeda, T., Shimada, T., Yamada, Y., Kamihira, S., Tomonaga, M., *et al.* (2004). An alternative transcript derived from the trio locus encodes a guanosine nucleotide exchange factor with mouse cell-transforming potential. *J Biol Chem* 279, 43998-44004.
- Zalcman, G., Closson, V., Linares-Cruz, G., Lerebours, F., Honore, N., Tavitian, A., and Olofsson, B. (1995). Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. *Oncogene* 10, 1935-1945.
- Zhai, W., Glanville, J., Fuhrmann, M., Mei, L., Ni, I., Sundar, P.D., Van Blarcom, T., Abdiche, Y., Lindquist, K., Strohner, R., *et al.* (2011). Synthetic antibodies designed on natural sequence landscapes. *J Mol Biol* 412, 55-71.
- Zhang, C., Helmsing, S., Zagrebelsky, M., Schirrmann, T., Marschall, A.L., Schungel, M., Korte, M., Hust, M., and Dubel, S. (2012). Suppression of p75 neurotrophin receptor surface expression with intrabodies influences Bcl-xL mRNA expression and neurite outgrowth in PC12 cells. *PLoS One* 7, e30684.
- Zhang, J., and Rabbitts, T.H. (2014). Intracellular antibody capture: A molecular biology approach to inhibitors of protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta*.
- Zhang, J., Zheng, N., and Zhou, P. (2003). Exploring the functional complexity of cellular proteins by protein knockout. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14127-14132.

- Zhou, C., Emadi, S., Sierks, M.R., and Messer, A. (2004). A human single-chain Fv intrabody blocks aberrant cellular effects of overexpressed alpha-synuclein. *Mol Ther* *10*, 1023-1031.
- Zhou, C., Jacobsen, F.W., Cai, L., Chen, Q., and Shen, W.D. (2010a). Development of a novel mammalian cell surface antibody display platform. *mAbs* *2*, 508-518.
- Zhou, J., Zhu, Y., Zhang, G., Liu, N., Sun, L., Liu, M., Qiu, M., Luo, D., Tang, Q., Liao, Z., *et al.* (2011). A distinct role of RhoB in gastric cancer suppression. *Int J Cancer* *128*, 1057-1068.
- Zhou, P., Bogacki, R., McReynolds, L., and Howley, P.M. (2000). Harnessing the ubiquitination machinery to target the degradation of specific cellular proteins. *Molecular cell* *6*, 751-756.
- Zhou, W., Long, C., Reaney, S.H., Di Monte, D.A., Fink, A.L., and Uversky, V.N. (2010b). Methionine oxidation stabilizes non-toxic oligomers of alpha-synuclein through strengthening the auto-inhibitory intra-molecular long-range interactions. *Biochim Biophys Acta* *1802*, 322-330.

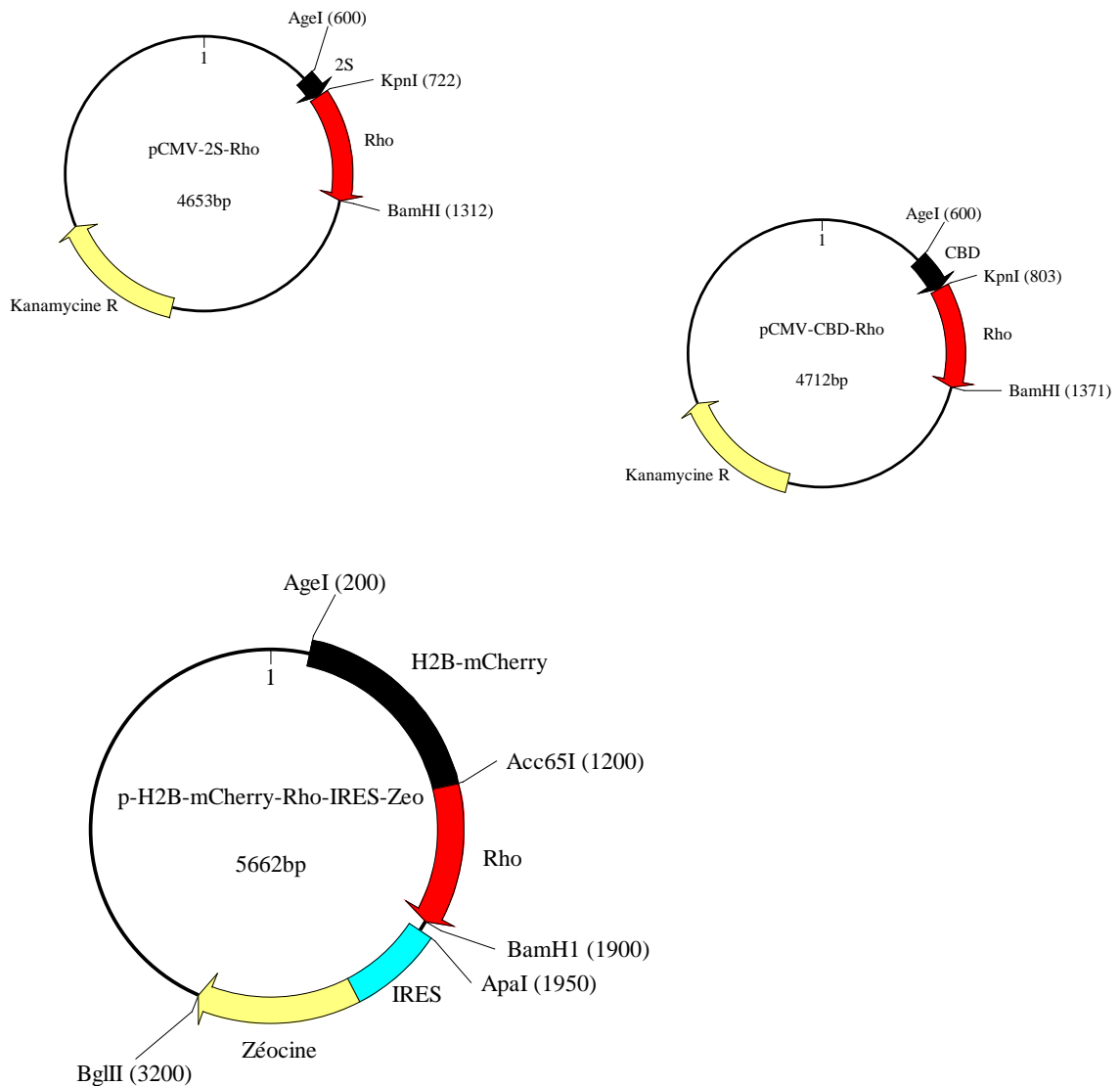
Annexes

Code international des acides aminés

Code à une lettre	Code à trois lettre	Nom complet	Hydrophobicité
G	Gly	Glycine	NC
P	Pro	Proline	Hydrophobe
A	Ala	Alanine	
V	Val	Valine	
L	Leu	Leucine	
I	Ile	Isoleucine	
M	Met	Méthionine	
C	Cys	Cystéine	
F	Phe	Phénylalanine	
Y	Tyr	Tyrosine	
W	Trp	Tryptophane	
H	His	Histidine	Hydrophile
K	Lys	Lysine	
R	Arg	Arginine	
Q	Gln	Glutamine	
N	Asn	Asparagine	
E	Glu	Acide glutamique	
D	Asp	Acide aspartique	
S	Ser	Sérine	
T	Thr	Thréonine	

NC : Non Classifié

Cartes des plasmides utilisés pour l'expression des Rho en eucaryote.



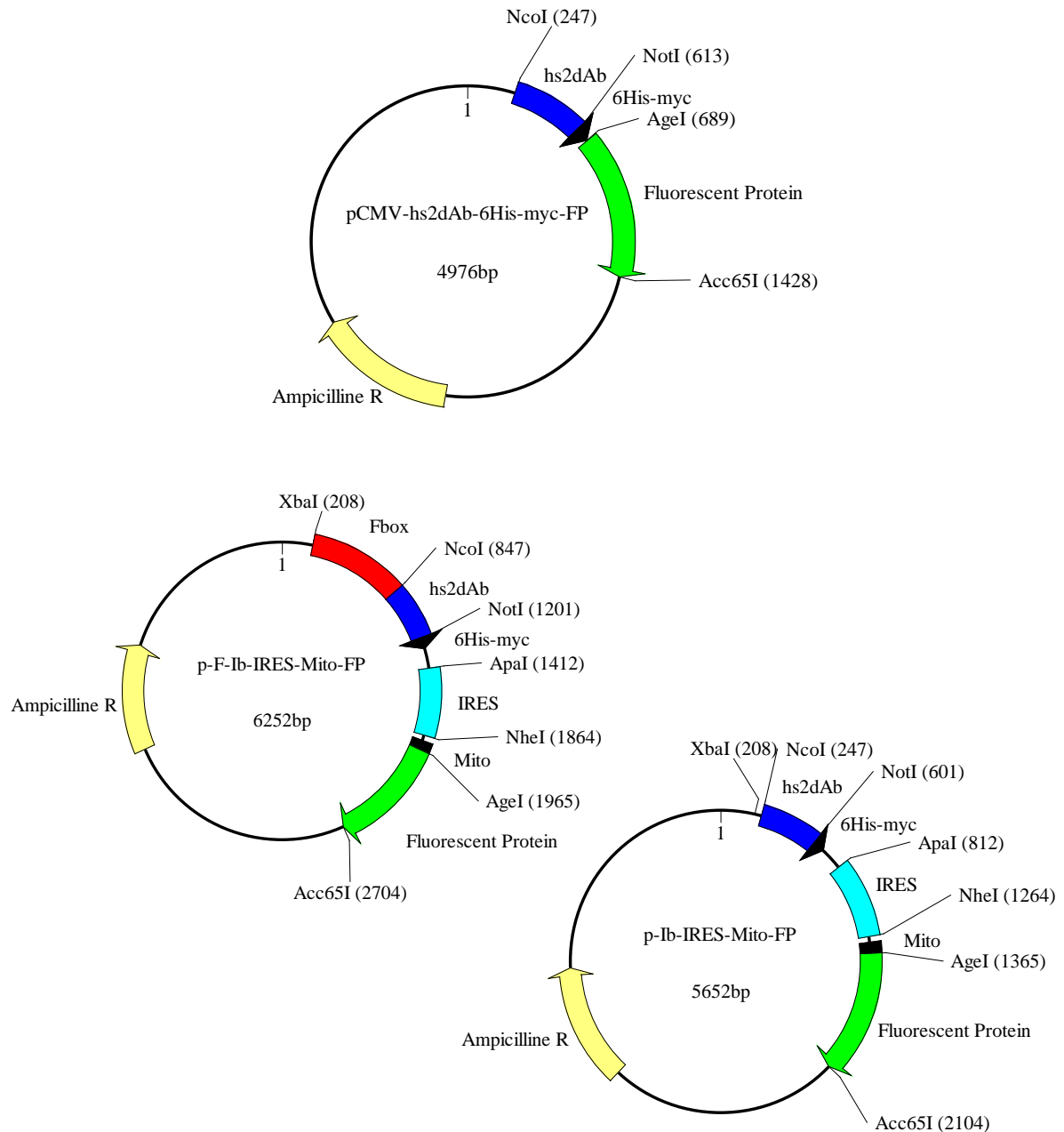
Légende : vecteurs d'expression eucaryote

En noir : Etiquette : double *Strep-tag* (2S), *Chitin Binding Domain* (CBD) et H2B-mCherry

En rouge : Rho existe en version RhoA_{L63}, RhoA_{N19}, RhoB_{WT} (uniquement pour le phage display), RhoB_{N19}, RhoB_{L63}, RhoC_{L63} ou Rac1_{L63} chacune en version prénylée (CAAX) ou non prénylée (CAAX déléetée) pour le phage display (vecteurs du haut) et l'établissement de lignées stables ou l'expression transitoire (vecteur du bas).

En jaune clair : Résistance à un antibiotique pour amplification du plasmide en bactérie (kanamycine) ou établissement de lignées stables (zéocine).

Cartes des plasmides utilisés pour l'expression intracellulaire des intracorp en eucaryote.



Légende : vecteur d'expression eucaryote

En rouge : Fbox (une version NoFbox a été construite également)

En noir : Etiquettes (Mito : *Mitochondrial Targeting Sequence*)

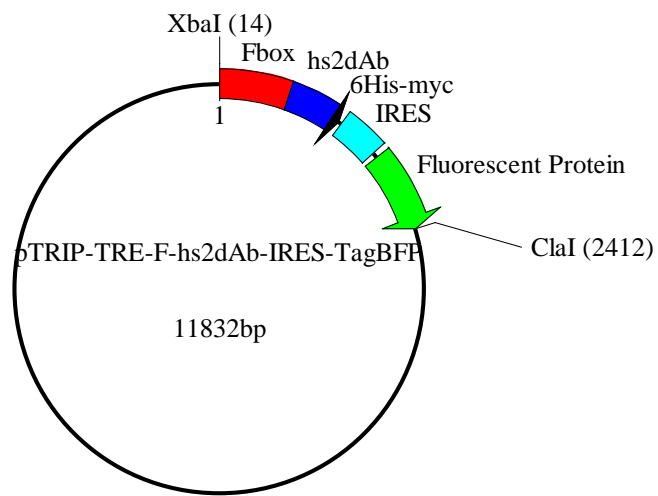
En bleu foncé : hs2dAb

En bleu clair : IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*)

En vert : Fluorescent protein (FP) : existe en version mGFPC48V et mCherry

En jaune clair : Résistance à un antibiotique pour amplification du plasmide en bactérie

Carte de plasmide utilisé pour la construction de lignées stables inducibles (vecteur lentiviral).



Légende :

En rouge : Fbox (une version hs2dAb seul a été construite)

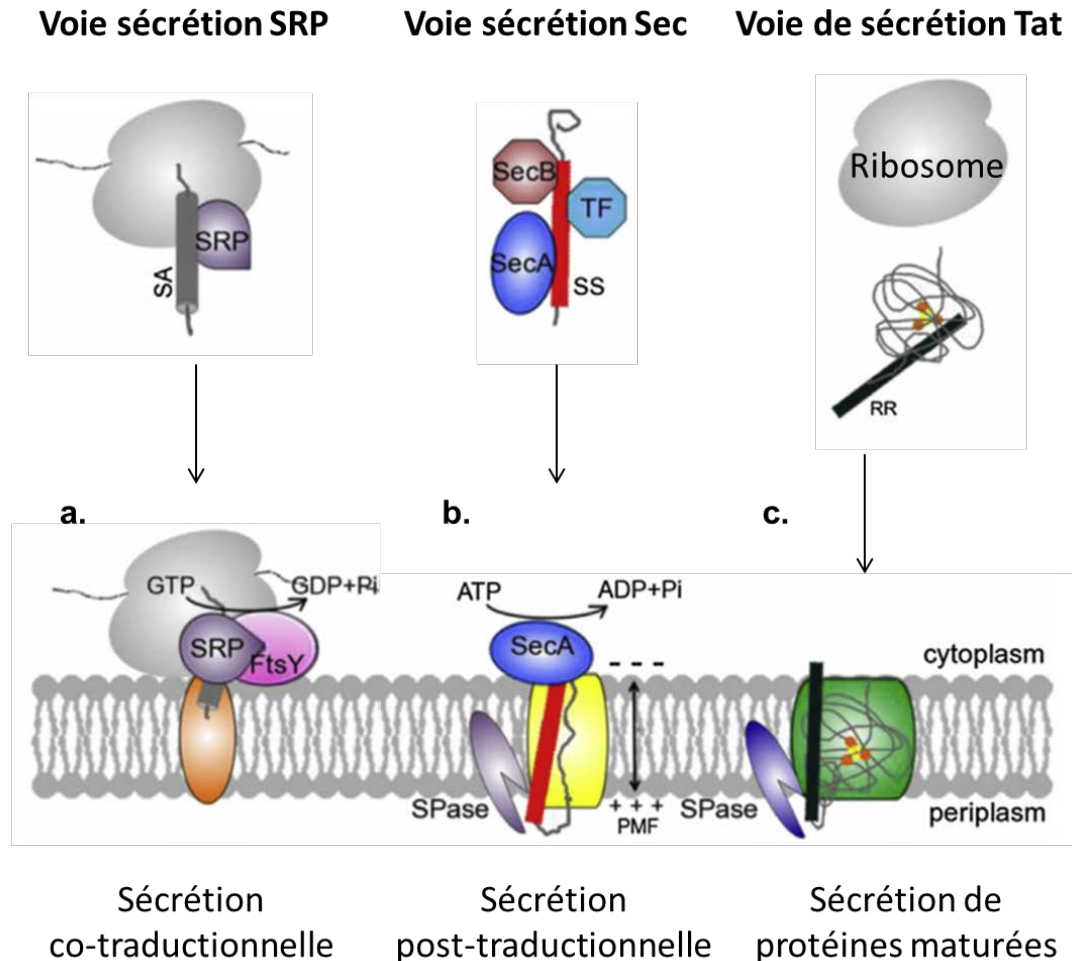
En noir : Etiquette

En bleu foncé : hs2dAb

En bleu clair : IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*)

En vert : Fluorescent protein (FP) : ici une TagBFP

Voies majeures de transport des protéines dans les bactéries Gram -



Voies majeures d'export de protéines du cytoplasme vers le péricytoplasme de bactéries Gram négative. (a) La voie de sécrétion SRP est une voie permettant l'export de protéines de façon co-traductionnel. Si une séquence signal d'ancrage (SA) émerge du tunnel de sorti du ribosome, alors le SRP reste accroché au ribosome et envoie le complexe (ribosome / chaîne naissante) aux récepteurs SRP ancrés à la membrane (FtsY). (b) La voie de sécrétion Sec. Si une séquence signal d'une protéine soluble (SS) est exposée sur la chaîne naissante, SecA remplace SRP sur le ribosome. SecB maintient le substrat dans un état transloqué et permet le transport post-traductionnel de protéines. (c) Le système Tat utilise uniquement le transport de protéines mûrées du cytoplasme au péricytoplasme. Les séquences signals des protéines transloquées par les voies Sec et Tat sont enlevées dans le péricytoplasme par des peptidases signal (SPases) accrochées à la membrane interne péricytoplasmique. TF : *Trigger Factor*, une chaperone. Adapté de (Kudva et al., 2013).

AUTEUR : Nicolas BERY

TITRE : Nouvelle stratégie de ciblage de la GTPase RhoB : développement d'intracorps conformationnels sélectifs et leur fonctionnalisation en tant qu'inhibiteurs intracellulaires de l'activité de RhoB.

DIRECTEURS DE THESE : Dr Aurélien OLICHON et Pr Gilles FAVRE.

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE :

RESUME

La GTPase RhoB partage 85% d'homologie avec RhoA et RhoC. Ces protéines alternent entre deux conformations : une active liée au GTP et une inactive liée au GDP. Des dérégulations de leur expression et de leur activation sont retrouvées dans de nombreux cancers. A ce jour, aucun inhibiteur sélectif de ces GTPases n'a pu être développé afin de bloquer l'activité de l'une ou l'autre de ces Rho. Ce travail doctoral a permis de mettre au point une approche innovante ciblant sélectivement l'état activé de la protéine RhoB. Suite à la caractérisation d'une nouvelle banque d'anticorps à simple domaine, sa validation par phage display contre divers antigènes a fourni de nombreux anticorps de haute fonctionnalité dans plusieurs applications. L'établissement d'une stratégie de sélection directe d'anticorps intracellulaire (intracorps) dirigés contre RhoB a permis d'identifier plusieurs intracorps conformationnels de la forme active de RhoB, dont un discriminant RhoB de ses homologues RhoA et RhoC. La fonctionnalisation d'intracorps par un domaine Fbox conduisant une dégradation de la cible a ensuite fourni la première stratégie efficace d'inhibition sélective de l'activité de RhoB. Ces travaux ont notamment démontré que l'extinction de l'activité de RhoB par intracorps fonctionnalisés augmente la migration et l'invasion de cellules pulmonaires. Ainsi cette avancée permettra de déterminer si l'activité de RhoB peut être une nouvelle cible thérapeutique et ouvre de nouvelles perspectives d'étude fine de l'activité des GTPases.

TITLE: A new way to target RhoB GTPase: set up of selective conformational intrabodies and their functionalization to promote inhibition of small GTPase RhoB cellular activity.

SUMMARY

RhoB GTPase shares more than 85% of homology with RhoA and RhoC. These proteins switch between an active conformation bound to GTP and an inactive one bound to GDP. Deregulations of their expression and/or their activity are often found in many cancers. To date, no selective inhibitor of these GTPases has been developed in order to block selectively Rho's activity. This project showed an original approach targeting RhoB's activity. After a new single domain antibody library characterization, its validation using the phage display technology against various antigens gave many highly functional antibodies in many applications. Set up of a new direct screening strategy of intracellular antibody (intrabody) raised against RhoB allowed us to identify several conformational intrabodies of RhoB active form, one of them discriminating RhoB from its homologs RhoA and RhoC. Intrabody functionalization with an Fbox domain driving target to degradation led to the identification of the first efficient selective RhoB activity inhibitory strategy. These work demonstrated that RhoB activity knockdown with functionalized intrabodies increased migration and invasion of pulmonary cells. In conclusion this tool will allow to determine if RhoB activity could be a new therapeutic target and open new perspectives to study GTPases activity.

MOTS-CLES : RhoB, GTPase, intracorps, inhibition de l'activité

DISCIPLINE : Cancérologie, biotechnologie

LABORATOIRE D'ACCUEIL : Equipe 3 - CRCT : Rho GTPase in tumor progression - Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT UMR1037 Inserm/Université Toulouse III-Paul Sabatier/CNRS) - 2 avenue Hubert Curien Oncopole entrée C 31037 TOULOUSE CEDEX 1