Exploration des systèmes d'expression de protéines recombinantes pour la caractérisation d'un anticorps catalytique

Raouia Ben Naya

▶ **To cite this version:**

Raouia Ben Naya. Exploration des systèmes d'expression de protéines recombinantes pour la caractérisation d'un anticorps catalytique. Sciences de l'ingénieur [physics]. Université de Technologie de Compiègne, 2013. Français. NNT : 2013COMP2078 . tel-00913012

HAL Id: tel-00913012

https://theses.hal.science/tel-00913012

Submitted on 3 Dec 2013

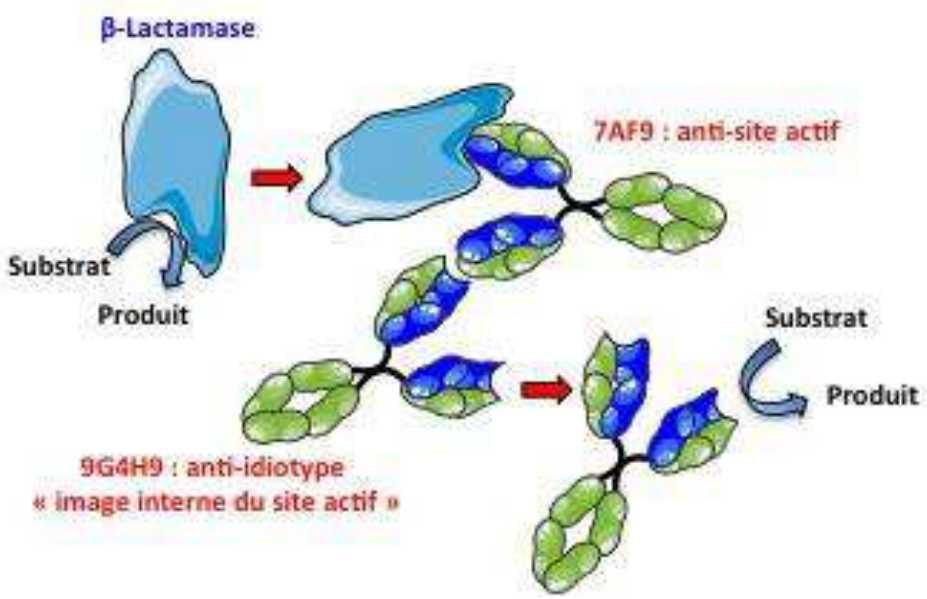
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Par **Raouia BEN NAYA**

Exploration des systèmes d'expression de protéines recombinantes pour la caractérisation d'un anticorps catalytique

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 24 mai 2013
Spécialité : Biotechnologie

D2078

THÈSE DE DOCTORAT

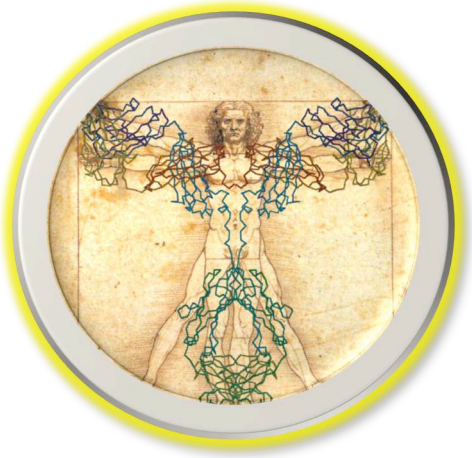
Présentée et soutenue publiquement

à l'Université de Technologie de Compiègne le 24 mai 2013

Par

Raouia BEN NAYA

Exploration des systèmes d'expression de protéines recombinantes pour la caractérisation d'un anticorps catalytique



COMPOSITION DU JURY

Directeurs de thèse :

- Alain FRIBOULET (CNRS FRE 3580 - Compiègne)
- Séverine PADIOLLEAU-LEFEVRE (CNRS FRE 3580 - Compiègne)

Rapporteurs :

- Christian TOURIOL (INSERM UMR 1037 – Toulouse)
- Etienne WEISS (ESBS UMR 7242 – Strasbourg)

Examinateurs :

- Bérangère BIHAN-AVALLE (CNRS FRE 3580 - Compiègne)
- Didier BOQUET (CEA, iBiTecS – Saclay)
- Fatima DKHISSI (CNRS FRE 3511 - Poitiers)
- Daniel THOMAS (CNRS FRE 3580 - Compiègne)

Je dédie cette thèse à :

Mes parents

Mes deux bonhommes Amir et Adem

Mes deux tontons Ali et Mohamed partis trop tôt.

Remerciements

Aux Membres du jury

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail : le Pr. Etienne WEISS, le Dr. Christian TOURIOL, Le Dr. Didier BOQUET et le Dr. Fatima DKHISSI. Je vous remercie pour l'intérêt porté à ce travail et l'échange enrichissant que nous avons eu au cours de la soutenance. Je remercie le Pr. Daniel THOMAS pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie mes deux « Chefs », le Dr. Séverine PADIOLLEAU-LEFEVRE et le Dr. Alain FRIBOULET. Merci de m'avoir choisi et fait confiance pour cette thèse.

Et enfin merci à ma presque-chef le Pr Bérangère BIHAN-AVALLE.

Au cours de ma vie et de mon parcours, de nombreuses personnes sont intervenues et je souhaite les remercier dans ce manuscrit.

A mes meufs

Les meilleures représentantes du girl power. Séverine, Bérangère, Adeline, Emilie, Sylvie, Claire et Melody. Des filles belles et intelligentes avec qui j'ai partagé de super moments.

Sév : Si on m'avait demandé de décrire ma directrice idéale j'aurai décrit une personne 100 fois moins bien que toi. Ton enthousiasme, ton soutien, ton aide, ta compréhension…tu as été géniale avec moi. Tu as aussi été un petit peu impliqué dans l'arrivé de mon petit Adem avec ta phrase : « Raouia, un bébé c'est quand tu le sens ! ». Je n'oublierais jamais tes « Youhouuuu » (avec le bras droit faisant l'hélicoptère !) quand les manips étaient OK, c'est vraiment motivant pour un doctorant. J'espère pouvoir faire de très nombreux Youhouuu à l'avenir. J'ai souvent dit « j'utilise 9G4H9 comme modèle… » mais le véritable modèle au cours de cette thèse, c'était toi. Merci Chef !

Bé : tous les jours vers 11h : moi « j'ai faim », Bé « mange ta main » ! Une des choses que je ne regrette pas, c'est d'avoir déménagé au début de ma thèse du bureau des étudiants vers le bureau des Chefs. Sans ce déménagement je pense que je n'aurais jamais pu autant me rapprocher de toi, car tu es quand même une femme impressionnante. Tu m'as beaucoup appris humainement et scientifiquement. Si j'avais une question sur mon sujet ou dans ma vie, tu as toujours été de bon conseil. Last but not least : qu'est ce que tu m'as fait rire!!! Merci pour tous les bons moments passés avec toi.

Emilie : La doctorante parfaite, la femme parfaite (quel veinard ce Ludo), l'amie parfaite… j'en ai parfois eu quelques complexes ! Merci de m'avoir pris sous ton aile à mon arrivée. J'ai passé des moments extraordinaires avec toi, au labo et à l'extérieure et j'espère pouvoir en passer pleins d'autres. Merci ma petite Milie.

Sylvie : la reine du stand up. Après ta thèse tu aurais pu faire de la scène mais comme tu le vaux bien tu as pris une autre voie ! Je suis arrivé au labo quelques jours avant ta soutenance. On aurait pu juste se croiser mais finalement tu as complètement fait parti de ma vie compiégnoise. Merci Dr. BUN.

Adeline : Sans toi je n'aurais pas pu faire ce que j'ai fais. Tu as été d'une aide indispensable et j'ai toujours pu compter sur toi. Je ne te remercierai jamais assez, d'autant plus que travailler avec toi a toujours été une partie de plaisir. Merci ma belle !

Claire : Bon alors par quoi je vais commencer ? Il faut que je fasse attention à ce que je vais dire car sinon je vais me mettre à chialer et là tu vas te mettre à chialer aussi et ce sera la merde…bon bref ! Je me souviens que quand Bé devait prendre un doctorant je lui avais dit : « il y a trop de filles ici, stp prend un mec » et finalement elle n'aurait pas pu mieux choisir que toi. Je me suis très vite attaché à toi. Et les choses à deux n'ont cessé de se multiplier, c'est limite si on n'était pas siamoises au labo ! Mais la plus belle des choses que j'ai partagée avec toi c'est l'attente de nos petits bouts. Etre enceintes ensemble c'était trop drôle et je ne l'oublierai jamais. Merci gros bidon 2 ! Tu vas trop me manquer mais n'oublies pas que je suis là pour toi, surtout pour ces derniers mois de thèse (mais je sais que tu vas «tout déchirer »)…good luck !

Melody : « Melody tempo harmony, I'll do it for me … » désolé mais je ne peux pas mon empêcher !!! Une étudiante arrive et une autre qui s'en va, ainsi va le cycle des labo ! On ne s'est côtoyé que quelques mois mais ça a suffit pour que je t'apprécie. Je te souhaite de belles choses dans cette superbe équipe.

N'oublions pas les quelques Mâles qui ont fait un passage parmi cette équipe :

Damien : Tu es surement la personne avec qui j'ai passé le plus de temps au L2. On y a eu de très nombreux échanges et je n'était souvent pas d'accord avec toi mais je dois admettre qu'on a passé de bons moments dans la salle bioch et que tu as toujours été là pour me donner un coup de main lorsque j'en avais besoin. Merci.

Cédric : Le couteau suisse de la recherche ! Mr touche à tout. Je suis impressionné par le panel des capacités que tu possèdes. Merci pour tous les moments passé au L2 et les conseils que tu m'as prodigué.

Ravi : Nous n'avons pas échangé beaucoup de choses mais merci à toi d'avoir partagé ta culture indienne avec nous.

A mes collègues : vous avez fait que ces dernières années resteront inoubliables pour moi. Merci à Aude, Karsten, Yolande, Claire R., Pascal, Valérie D., Valérie S., Christiane, Sonia, Bernadette, JB, Madeleine, Elie, Ana, Sébastien, Marie, Pinar, Ophélie, Yannick, Carlo, Zeynep, Amel, Abdel, Bin, Natalya, Jean, Laetitia, Thierry, Marcelina, Mai, Zaineb, Clarisse, Xuan-Anh, Yi et Yingjuan…et bien ! Ca en fait du monde !!!

Un merci au duo Estelle et Amira. Vous avez eu la chance de partager la galère de la thèse à deux. J'admire votre courage et je suis sûre que ça va bien se passer pour la suite.

Je tiens à remercier Cyril pour son aide au BIAcore (et pour ses carrés de Milka !) et le Pr André MATAGNE pour son accueil à Liège et ces précieux conseils sur le DC.

Aux Tunisiens

J'ai parfois cru que Compiègne était une lointaine province tunisienne (au grand plaisir de mon mari). Merci à Slim, Mohamed, Imene, Jihène, Sana, Noa, Fatima, Hejer, Nadhem, Hassen, Kaiss, Hocine et Khawla.

A Compiègne

Ville du nord (oui oui tout ce qui est au dessus de la Seine pour une toulousaine c'est « le nord » !). Compiègne qui m'a fait si peur à mon arrivée mais que je suis triste aujourd'hui de quitter.

Aux Bordelais

Merci à mon équipe d'accueil pour mon stage de M2 au sein de l'U828-INSERM. Particulièrement à Alain PIERRE-GADEAU, Fanny, Betty et Nancy.

Un remerciement particulier à Assia, tous les moments drôles, fous, effrayants, magiques, je les ai passé avec toi, merci d'avoir été une de mes plus belles rencontres sur Bordeaux.

Aux Toulousains

A Alex

Mon encadrant de stage de Master1. A l'époque c'est toi qui étais en thèse, et la passion que tu avais pour ton travail était belle à voir. Merci pour ta façon originale de m'avoir enseigné la recherche en me montrant ce qu'il ne fallait PAS faire !!! J'ai malheureusement/heureusement (au choix) réitérer ce mode d'enseignement avec mes propres stagiaires ! Merci pour ta patience, ta bonne humeur et ton rire si particulier qui résonne encore dans mes souvenirs.

A Hervé

Tu fais partie de ces enseignants que j'admire et qui m'ont donné envie de faire de la recherche. C'est grâce à toi que j'ai effectué mon 1er stage « officiel » dans un laboratoire de recherche en M1 et c'est encore toi qui m'offres la possibilité de clôturer mon apprentissage de la recherche avec ce poste de post Doc, merci pour ta confiance.

A Christian

Merci pour tes conseils et ton soutien. Merci de croire en moi et d'y avoir toujours cru. C'est grâce à toi que j'ai obtenu mon premier « job » dans la recherche. Grâce à ça j'ai pu être auditionnée et sélectionnée pour cette thèse à Compiègne (merci d'avoir accepté de rapporté ce travail et d'être venu pour ma soutenance), et c'est enfin grâce à toi que je retourne à Toulouse…merci mille fois.

A Coco

Un petit bout de femme bien sympathique. Merci pour cette complicité. Tu es la preuve que les années qui passent ne sont pas si importantes.

Je n'oubli pas Cédric, Stéphanie, Nassira, Cathy et Eric qui ont aussi contribué à ce que je me sente comme un poisson dans l'eau.

A mes popines (non il n'y a pas d'erreur. C'est juste une catégorie particulière de copines) : Loubna, Nezha, Sarra et Sihame, un groupe de girls unies comme les 5 doigts de la main. Un peu bruyantes, un peu fofolles mais tout de même studieuses. Je suis fière de voir ce que l'on est devenues aujourd'hui, je suis fière de vous avoir à mes cotés après toutes ces années. Merci loulou pour ton écoute, des heures et des heures au téléphone, grâce à toi SFR s'en est mis plein les poches ! Merci Néné pour tes conseils, tu es

certainement la plus posée de la bande et tes mots m'ont souvent réconforté. Merci Sasa pour ta folie, tu as su relever avec talent tous les défis un peu bébêtes que l'on se lançait et tu as toujours les mots pour me faire rire! Et merci Sisi pour ton honnêteté. Tu as toujours dis directement ce que tu pensais vraiment, tu as toujours été disponible pour moi et aussi super compréhensive et je ne t'en remercierai jamais assez. Merci pour tous les bons moments passé avec vous et pour j'espère pleins d'autres encore.

A mes copines : mes deux plus anciennes copines (que j'ai la chance d'avoir encore aujourd'hui) : Belkyss : nous sommes deux sœurs jumelles, nées sous le signe des gémeaux…la vie nous a séparé et réuni à maintes reprises, mais on sait dans le fond que rien ne nous séparera ! Najat : une autre copine avec qui je pourrai aussi chanter la chanson des demoiselles de Rochefort ! Ma Najatlee, une nana super qui aime les plaisirs simples de la vie mais qui aime aussi simplement les partager avec ses amis. Merci pour toutes les pauses gourmandes ou culturelles. Merci de m'avoir fait découvrir KUCH KUCH HOTA HAI et déclenché une histoire d'amour entre le cinéma indien et moi.

A mes amis

A toutes les autres personnes que j'ai eu la chance de rencontrer ici et là et qui m'apportent encore aujourd'hui beaucoup de choses. Merci à Nadia, Audrey, Romain, Julien, Delphine, Sana, Sylvia, Elodie, Caroline, Sophie, Olivier, Frédérique, Ahmed, Laurentine, Gladys, Pascal & Petra, Salem, Nawel, Sabri, Raouia, Marwa, Imen, Amira, Anne-Marie, Sofia, Soraya… sorry si j'ai oublié quelqu'un !

A ma famille

Je pense à ma très grande famille en France et en Tunisie. Je ne vais pas pouvoir tous les citer sinon le manuscrit ferait 400 pages ! Mais ils savent tous que je les aime.

Merci à **Amir**, à mes coté depuis des années. Merci de m'avoir poussé dans mes études et à avoir fait le sacrifice de me suivre pour que je réussisse. Je sais que ça n'a pas toujours été évident pour toi car la recherche c'est un monde à part qu'il n'est pas évident de comprendre. Tu as su faire avec tout en me permettant d'avoir une vie de famille super qui s'est enrichit par l'arrivée de notre petit bébé. Quand je regarde Adem, je suis la plus heureuse au monde et c'est grâce à toi.

Merci à mes trois « petits » frérots, Elyes, Mohamed et Nader, ainsi qu'à ma grande sista Nadra (avec sa petite tribu : Hichem, Ines et Mohamed-Habib). La vie est tellement plus gaie avec vous à mes cotés.

Enfin, merci à mes parents, Abderrahmane et Latifa, sans qui je ne serais rien (dans tous les sens du terme !!!). Vous avez su me pousser sans me forcer. Merci d'avoir toujours été là pour moi surtout ces derniers mois. Je suis fière d'être votre fille.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES 4

LISTE DES TABLEAUX 6

LISTE DES ABREVIATIONS 7

INTRODUCTION 8

I LES IMMUNOGLOBULINES 10

I.A GENERALITES 10

I.A.1 STRUCTURE DES ANTICORPS 10

I.A.2 GENESE ET DIVERSITE DES ANTICORPS 14

I.A.3 MATURATION DES LYMPHOCYTES B 15

I.A.4 FONCTIONS EFFECTRICES DES ANTICORPS 18

I.A.5 ANTICORPS ET GLYCOSYLATIONS 20

I.B INGENIERIE DES ANTICORPS 23

I.B.1 LES ANTICORPS DE 1ERE GENERATION 23

I.B.2 LES ANTICORPS DE 2NDE GENERATION 24

I.B.3 LES FRAGMENTS D'ANTICORPS 26

I.B.3.a Fragments obtenus par voie enzymatique 26

I.B.3.b Fragments obtenus par les technologies recombinantes 27

I.B.3.b.1 Du Fv au scFv 27

I.B.3.b.2 Le Fab 28

I.B.3.b.3 Les Nanobodies 28

I.B.3.b.4 Les Minibodies 29

I.B.3.b.5 Les protéines de fusion avec la région Fc 29

I.B.3.b.6 Multispécificité et Multivalence 30

I.B.3.c Optimisation des anticorps 31

I.B.4 APPLICATIONS MEDICALES DES ANTICORPS 32

I.B.5 ALTERNATIVES AUX ANTICORPS 35

I.B.5.a Les Affibodies 35

I.B.5.b Les DARPins 36

I.B.5.c Les Anticalines 36

I.B.5.d Les Adnectines 36

I.B.5.e Les VLR et autres structures 36
I.C LE CAS PARTICULIER DES ANTICORPS CATALYTIQUES 38
I.C.1 GENESE D'ANTICORPS CATALYTIQUES : LA VOIE DES TSA 38
I.C.2 GENESE D'ANTICORPS CATALYTIQUES : EXPLOITATION DU RESEAU IDIOTYPIQUE 41
I.C.3 ANTICORPS CATALYTIQUES « NATURELS » 44
I.C.4 EXPLOITATION DU POTENTIEL DES ANTICORPS CATALYTIQUES 45
I.C.5 COMPRENDRE LA COMPLEXITE DES ANTICORPS CATALYTIQUES 46
I.D L'ANTICORPS 9G4H9 COMME MODELE D'ETUDE DES ANTICORPS CATALYTIQUES 47
I.D.1 CHOIX DE L'ACTIVITE B-LACTAMASE ET CONSTRUCTION DU SCFV 9G4H9. 47
I.D.2 CARACTERISATION DE L'ANTICORPS ET DU SCFV 9G4H9 50
I.D.2.a Production et activité 50
I.D.2.b Structure 52
I.D.2.c Inhibition 53

II SYSTEMES DE PRODUCTION DES ANTICORPS RECOMBINANTS 54

II.A LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES 54
II.B L'EXPRESSION PROCARYOTE : *E.COLI* COMME SYSTEME DE CHOIX 56
II.B.1 EXPRESSION CYTOPLASMIQUE 57
II.B.1.a Corps d'inclusions 57
II.B.1.b Protéines solubles 58
II.B.2 EXPRESSION PERIPLASMIQUE 58
II.B.3 EXPRESSION EXTRACELLULAIRE 59
II.C L'EXPRESSION EUCARYOTE 59
II.C.1 LES LEVURES 60
II.C.2 LES CELLULES D'INSECTES ET LE SYSTEME BACULOVIRUS 61
II.C.3 CELLULES DE MAMMIFERES 61
II.C.4 LES PLANTES 62
II.C.5 LES ANIMAUX TRANSGENIQUES 63

III ETUDE DE L'ANTICORPS CATALYTIQUE MODELE ET DE SON DERIVE SCFV ...64

III.A ETAT DES LIEUX 64
III.B MISE EN PLACE DES DIFFERENTS SYSTEMES D'EXPRESSION 64
III.B.1 EXPRESSION EN SYSTEME PROCARYOTE 64
III.B.1.a Exploitation de la voie périplasmique 65
III.B.1.a.1 Clonage, induction et extraction 65
III.B.1.a.2 Purification 66
III.B.1.b Exploitation de la voie cytoplasmique 68
III.B.1.b.1 Extraction et purification 68

III.B.1.b.2 Processus de renaturation 70
III.B.2 EXPRESSION EN SYSTEME EUCARYOTE 72
III.B.2.a Le fragment scFv 9G4H9 74
III.B.2.a.1 Construction du vecteur pour une expression dans les HEK293T 74
III.B.2.a.2 Transfection 77
III.B.2.a.3 Purification 78
III.B.2.b L'anticorps 9G4H9 chimérique 80
III.B.2.b.1 Construction des vecteurs pour une expression dans les cellules HEK293T 80
III.B.2.b.2 Transfection 83
III.B.2.b.3 Purification 84
III.B.2.c Bilan comparatif des différentes productions du scFv 9G4H9 85
III.C CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET STRUCTURALE DE 9G4H9 86
III.C.1 APPROCHE STRUCTURALE PAR DICHROÏSME CIRCULAIRE 86
III.C.2 VALIDATION DE LA FONCTIONNALITE : CONSERVATION DE LA CAPACITE D'INTERACTION 89
III.C.2.a Test de la reconnaissance de Pep90 par le scFv 9G4H9 89
III.C.2.a Test de la reconnaissance de Pep90 par l'anticorps 9G4H9 entier 91
III.C.2.b Caractérisation de l'interaction par résonance plasmonique de surface 93
III.C.3 VALIDATION DE LA FONCTIONNALITE : CONSERVATION DE LA CAPACITE D'HYDROLYSE 95
III.C.3.a La Fluorocilline™ comme substrat de la β-lactamase 96
III.C.3.b Caractérisation de l'hydrolyse de la Fluorocilline™ par 9G4H9 97

IV DISCUSSION ET PERSPECTIVES 101

IV.A COMPARAISONS QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES SYSTEMES D'EXPRESSION 101
IV.A.1 LA PRODUCTION PROCARYOTE PAR VOIE PERIPLASMIQUE 101
IV.A.2 LA PRODUCTION PROCARYOTE PAR VOIE CYTOPLASMIQUE 101
IV.A.3 LA PRODUCTION EUCARYOTE 102
IV.B VERS UNE ETUDE STRUCTURALE 105
IV.C VERS UNE COMPREHENSION ET UNE EXPLOITATION DES ANTICORPS CATALYTIQUES 106

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 108

REFERENCES NETOGRAPHIQUES 133

ANNEXES 134

Liste des figures

Figure I-1 : Structure des anticorps 10
Figure I-2 : Hypervariabilité des régions variables d'anticorps 11
Figure I-3 : Structure des différentes classes d'immunoglobulines 12
Figure I-4 : Rôle de Bip dans le repliement d'une IgG 13
Figure I-5 : Différentiation des lymphocytes B 15
Figure I-6 : Réarrangement de gènes d'immunoglobulines chez l'homme 17
Figure I-7 : Illustration des fonctions effectrices des anticorps 20
Figure I-8 : Sites de glycosylation des immunoglobulines 20
Figure I-9 : Sites d'ancrage des oses lors de la formation des N et O- glycosylations 21
Figure I-10 : Anticorps : de la souris à l'homme 24
Figure I-11 : Techniques d'obtention d'anticorps humains 25
Figure I-12 : IgG et ses différents fragments 26
Figure I-13 : Les différents formats d'anticorps. 27
Figure I-14 : Optimisation des fonctions des anticorps. 32
Figure I-15 : Fragments d'anticorps en imagerie 33
Figure I-16 : Structure des charpentes protéiques non dérivées des immunoglobulines 35
Figure I-17 : Les Affibodies 36
Figure I-18 : Schéma énergétique du processus catalytique 39
Figure I-19 : La voie des TSA 39
Figure I-20 : Genèse d'anticorps anti-idiotypes par exploitation du réseau idiotypique 41
Figure I-21 : De l'ADEPT à l'ADAPT 45
Figure I-22 : Les principales β-lactamines 48
Figure I-23 : Structure tridimentionelle de β-lactamases issues des 4 classes différentes 48
Figure I-24 : Mécanisme général sérine dépendant d'hydrolyse d'une β-lactamine par une β-lactamase 49
Figure I-25 : Exploitation du réseau idiotypique pour générer l'anticorps 9G4H9 50
Figure I-26 : Colliers de perles des domaines variables du scFv 9G4H9 51
Figure I-27 : Superposition des sites actifs de la β-lactamase et de la chaîne légère de 9G4H9 52
Figure I-28 : Modélisation tridimentionnelle de Pep90 53
Figure II-1 : Différents outils de prédictions des modifications post-traductionnelles 55
Figure II-2 : Organisation des bactéries gram négatives 57
Figure III-1 : Séquence protéique du scFv 9G4H9 dans le vecteur pET26b 65
Figure III-2 : Purification sur billes Ni-NTA 66
Figure III-3 : Analyse de la purification du scFv 9G4H9 périplasmique 67
Figure III-4 : Analyse de la purification du scFv 9G4H9 cytoplasmique 69
Figure III-5 : Evaluation de la pureté du scFv 9G4H9 70

Figure III-6 : Processus de renaturation du scFv 9G4H9 72
Figure III-7 : Voie sécrétoire des cellules de mammifères 74
Figure III-8: Séquence protéique du scFv 9G4H9 dans le vecteur pSecTag2C 75
Figure III-9 : Amplification du gène codant le scFv 9G4H9 pour un clonage dans un vecteur d'expression eucaryote. 76
Figure III-10 : Contrôle de la présence du scFv 9G4H9 dans pSecTag2C par restriction 77
Figure III-11 : Cellules HEK-293T en contact avec les précipités ADN/CaP_i 78
Figure III-12 : Analyse de la purification du scFv 9G4H9 cytoplasmique 79
Figure III-13 : Systèmes de co-expression de gènes 80
Figure III-14 : Amplification des séquences codant les domaines VL et VH du scFv 9G4H9 pour un clonage dans les vecteurs d'expression eucaryote pFUSE. 81
Figure III-15 : Séquences protéiques de l'AC_{chi}9G4H9 dans les vecteurs pFUSE 82
Figure III-16 : Contrôle de la présence des séquences variables du scFv 9G4H9 dans les vecteurs pFUSE 83
Figure III-17 : Analyse de la purification de l'AC_{chi}9G4H9 84
Figure III-18 : Bilan quantitatif des productions 85
Figure III-19 : Principaux profils en dichroïsme circulaire dans l'UV lointain 87
Figure III-20 : Spectres DC dans l'UV lointain des scFv 9G4H9 88
Figure III-21 : Interaction scFv-Pep90 (test 1) 89
Figure III-22 : Interaction scFv-Pep90 (test 2) 90
Figure III-23 : Interaction AC_{chi}9G4H9-Pep90 92
Figure III-24 : Principe de la résonance plasmonique de surface 93
Figure III-25 : Analyse de l'interaction entre le scFv 9G4H9 et Pep90 par BIAcore 94
Figure III-26 : Fluorocilline™ et les produits de son hydrolyse 96
Figure III-27 : Hydrolyse de la Fluorocilline™ par la β-lactamase. 97
Figure III-28 : Cinétiques de l'hydrolyse de la Fluorocilline™ par différents catalyseurs 98

Liste des tableaux

Tableau I-1 : Principales caractéristiques des différentes classes d'immunoglobulines 12
Tableau I-2 : Diversité germinale et combinatoire 14
Tableau I-3 : Anticorps et dérivés approuvés pour un usage thérapeutique 34
Tableau I-4 : Comparaison des propriétés des anticorps et quelques protéines alternatives 38
Tableau I-5 : Présentation de quelques anticorps à activité catalytique 43
Tableau I-6 : Anticorps catalytiques « naturels » 44
Tableau I-7 : Hydrolyse de différents substrats par la β-lactamase et l'anticorps 9G4H9 50
Tableau I-8 : Comparaison de paramètres cinétiques de l'enzyme et des différents formats de l'abzyme 9G4H9 51
Tableau II-1 : Comparatif des systèmes d'expression 56
Tableau III-1 : Comparaison technique et financière des systèmes d'expression exploités 86
Tableau III-2 : Paramètres cinétiques de différents catalyseurs sur la Fluorocilline™ 99

Liste des abréviations

A

a.a. : acide aminé
Ab : antibody
ADCC : Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
ADCP : Antibody-Dependent Cell-mediated Phagocytosis
ADN : acide désoxyribonucléique
AID : activation-induced cytidine deaminase
AMM : autorisation de mise sur le marché
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messager

B

Bip : Immunoglobulin Binding protein
BiTE : Bi-specific T cell Engagers
BSA : Bovine Serum Albumine

C

CaP_i: phosphate de calcium
CDC : Complement-Dependent Cytotoxicity
CDR : Complementarity Determining Region
CHO : Chinese Hamster Ovary
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV: Cytomegalovirus

D

DC : Dichroïsme Circulaire
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DO : Densité Optique

E

E. coli : Escherichia coli
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

F

Fab : Fragment antigen binding
Fc : Fragment cristallisable
FcR : Récepteur Fc
FDA : Food and Drug Administration
Fr : framework

G

GSH : glutathion (forme réduite)
GSSG : glutathion (forme oxydée)

H

HACA : Human Anti-Chimeric Antibody
HAMA : Human Anti-Mouse Antibodies
HC : Heavy Chain
HEK : Human Embryonic Kidney
HMS : Hypermutation Somatique
HRP : Horse Radish Peroxidase

I

Ig : Immunoglobuline
IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

K

kDa : kilo Dalton

L

L.O. : Longueur d'Onde
LB : Lymphocyte B
LC : Light Chain

N

Ni-NTA : nickel-nitriloacetic acid
NK (cellule) : Natural Killer
nt : nucléotide

P

pb : paire de base
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR: Polymerase Chain Reaction

R

RAG : Recombination Activating Gene
RE : Réticulum endoplasmique
RPS : Résonnance Plasmonique de Surface
RSS : Recombination signal sequences

S

scFab : single chain Fab
scFv : single chain variable Fragment
sdAb : single domain antibody

T

TdT : Terminale déoxynucléotidyl Transférase
TSA : Transition State Analogue

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VH : Domaine variable de la chaine lourde
VHH : Domaine variable d'immunoglobuline à chaines lourdes uniquement
VL : Domaine variable de la chaine légère

Introduction

Introduction

Les anticorps sont des récepteurs hautement spécifiques impliqués dans la réponse immunitaire humorale. Les anticorps sont donc des protéines indispensables à la défense de l'organisme. L'exploitation de ces protéines pour lutter contre des pathologies ou comme outils s'est fortement développée depuis des travaux ayant abouti à la production d'anticorps monoclonaux (Kohler and Milstein, 1975). Les anticorps sont désormais indispensables à la recherche fondamentale et représentent un outil de choix en thérapie et en diagnostic. Dans ce contexte, l'ingénierie des anticorps ainsi que la maîtrise de différents systèmes d'expression représentent un défi.

Depuis 1989, des anticorps aux propriétés particulières ont été mis en évidence en conditions physiologiques. Ce sont les anticorps catalytiques (Paul et al., 1989). En plus de la fonction de reconnaissance des anticorps, ceux-ci sont doués d'une capacité de catalyse. Ces anticorps catalytiques sont également appelés abzymes, contraction des termes antibody et enzyme. Leur présence est décrite dans de nombreuses pathologies et particulièrement dans les maladies auto-immunes (Wootla et al., 2011). Or à l'heure actuelle, il n'y a pas ou peu d'immunothérapie mise en œuvre contre ces maladies sur le marché. A titre d'exemple, les études de développement d'anticorps contre les maladies auto-immunes en sont au stade clinique avec cinq anticorps candidats (un en phase préclinique, trois en phase I et un en phase II) [1]. De plus, l'effet bénéfique ou néfaste des anticorps catalytiques sur la santé des individus n'est toujours pas connu. La cause de leur présence est également inconnue.

Comprendre l'origine de la présence des anticorps catalytiques permettrait de réguler leur expression physiologique. Malheureusement, la biodisponibilité *in vivo* de ce type d'anticorps est limitée du fait d'une concentration sérique très faible. Maîtriser leur expression en système hétérologue est donc indispensable et permettrait d'étudier leur fonctionnement ainsi que d'exploiter leur potentiel dans diverses applications.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent mes travaux de thèse. L'objectif est de développer des outils utiles à la production, à l'étude et à la caractérisation des anticorps catalytiques. L'ingénierie de ces anticorps permettra de les exploiter au mieux sous un format pertinent. Cet objectif passe par la maîtrise de systèmes d'expression adaptés à la complexité des structures construites.

Ce manuscrit présente une synthèse bibliographique sur les généralités des anticorps, avant de se focaliser sur les particularités des anticorps catalytiques. Les résultats de caractérisation d'un anticorps catalytique modèle, obtenu au laboratoire par exploitation du réseau

idiotypique, sont présentés. L'exploitation de différents systèmes d'expression est détaillée, puis les capacités de liaison et de catalyse sont évaluées. Ces travaux ont permis d'approfondir les données sur l'anticorps catalytique modèle. Ils apportent également des informations sur la pertinence du choix du système d'expression par rapport à la nature et l'utilisation de la protéine étudiée.

Ce travail permet d'appréhender la production d'anticorps catalytiques dans le but de mettre en place les outils nécessaires à l'étude du rôle de ces protéines dans les pathologies, et notamment des maladies auto-immunes.

I

Les Immunoglobulines

A Généralités

B Ingénierie des anticorps

C Le cas particulier des anticorps catalytiques

D L'anticorps 9G4H9 comme modèle d'étude des anticorps catalytiques

I Les Immunoglobulines

I.A Généralités

I.A.1 Structure des anticorps

Les anticorps sont des hétérotétramères de deux chaînes légères (LC pour light chain) et deux chaînes lourdes (HC pour heavy chain) reliées entres elles par des ponts disulfures. Cette organisation de base est présente dans toutes les classes d'anticorps mais une organisation plus complexe aboutit à la formation de multimères pour certaines (IgA et IgM). Dans le cas de l'IgG, la classe d'anticorps la plus étudiée, une chaîne lourde a une masse moléculaire d'environ 50 kDa contre 25 kDa pour une chaîne légère, ce qui rapporte la masse globale à environ 150 kDa. L'organisation de l'anticorps lui confère une structure en forme de « Y » que l'on retrouve pour l'ensemble des monomères des différentes classes d'anticorps.

Les anticorps sont les acteurs de la réponse humorale. Ce sont des protéines de la superfamille des immunoglobulines. Les membres de cette famille sont des protéines membranaires ou solubles composées de domaines. Chaque domaine d'immunoglobuline est composé en moyenne de 110 acides aminés (a.a.) et est structuré en feuillets β organisés de façon antiparallèle. Les domaines sont stabilisés par des ponts disulfures établis entre deux cystéines conservées (Figure I-1.A).

Les chaînes polypeptidiques constituant les immunoglobulines possèdent 2 types de régions :

- Les régions constantes, réparties sur la chaîne légère (C_L) et sur la chaîne lourde (C_H1 à C_H3 ou 4 selon l'isotype).
- Les régions variables, réparties sur les extrémités N-terminales des chaînes légère (V_L) et lourde (V_H).

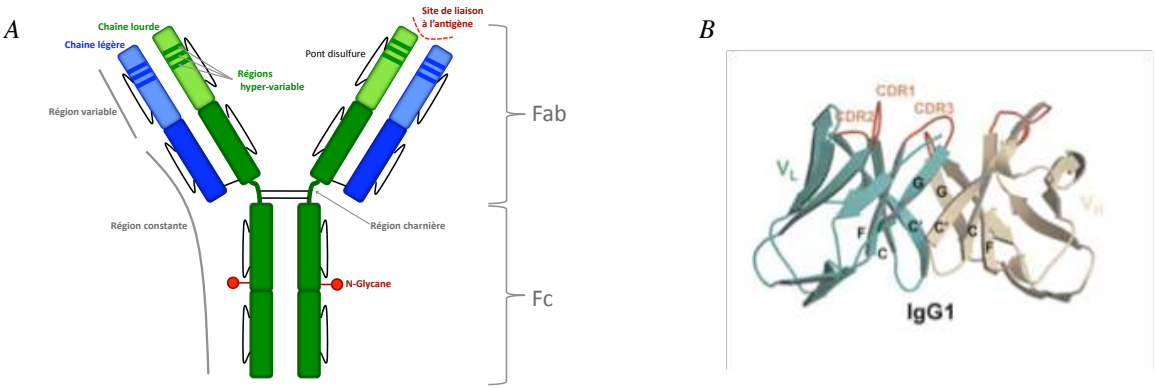


Figure I-1 : Structure des anticorps

A) Schéma d'une immunoglobuline (IgG) inspiré de l'IMGT [1] .
B) Région variable d'une IgG1 de souris : la V_H est représentée en beige et la V_L en vert. Les boucles hypervariables des CDR, formant le site de reconnaissance de l'antigène, sont en rouge. Source : Radaev et al., 2003.

Les régions variables sont composées de régions charpentes relativement conservées (ou FR pour Framework) bordant trois régions hypervariables, les CDR (Complementarity Determining Region) (Figure I-1.B). Ces CDR forment des boucles intervenant dans l'interaction avec l'antigène, formant ainsi le paratope de l'anticorps, c'est-à-dire le site de reconnaissance antigénique. Les CDR, d'une longueur moyenne de 5 à 10 a.a., se caractérisent par une très grande variabilité conférant sa spécificité à chaque anticorps (Figure I-2).

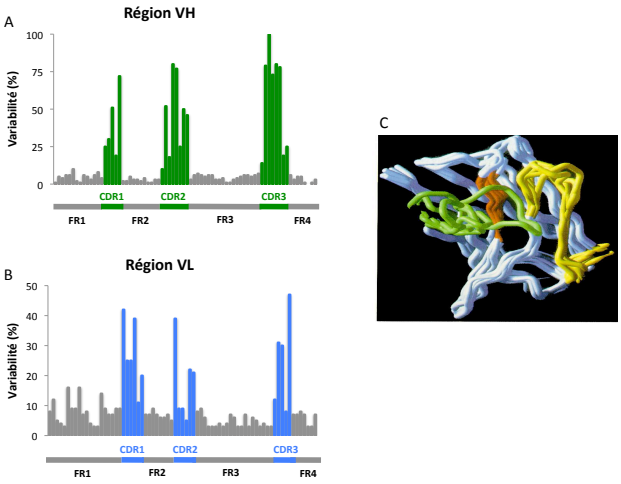


Figure I-2 : Hypervariabilité des régions variables d'anticorps

Analyse de la variabilité des séquences des régions frameworks (FR) et hypervariables (CDR) rencontrées au niveau des domaines variables des chaînes lourdes (V_H) en A) et légères (V_L) en B). Source : Janeway et al., 2003.

C) Illustration de la variabilité structurale des CDR des anticorps. Superposition de 7 domaines V_H. Les FR sont en blanc et les CDR en couleur. Source : Voet and Voet, 1998.

Les caractéristiques décrites précédemment sont identiques pour les cinq classes, ou isotypes, d'anticorps existant chez l'homme (Ig G, A, M, E et D). Ces classes sont définies par la présence de différentes chaînes lourdes : gamma (γ), alpha (α), mu (μ), epsilon (ε) et delta (δ) respectivement. Il existe également des sous-classes. L'IgG, qui est l'immunoglobuline majoritaire du sérum, est aussi la plus étudiée. Elle possède quatre sous classes (IgG1, 2, 3 et 4). L'IgA en possède 2 (IgA1 et IgA2). On retrouve également des déterminants isotypiques pour les chaînes légères, qui peuvent être de type kappa (κ) ou lambda (λ). Cependant, au sein d'un même anticorps, les deux chaînes légères et les deux chaînes lourdes sont identiques entre elles. Les principales caractéristiques des différentes classes d'anticorps sont présentées dans le tableau I-1.

Tableau I-1 : Principales caractéristiques des différentes classes d'immunoglobulines

Classes	IgG	IgA	IgM	IgE	IgD
Poids moléculaire (kDa)	150 (jusqu'à 165 pour IgG3)	160 ou 350	180 ou 950	190	170-180
Structure	Monomère	Monomère ou dimère	Monomère* ou pentamère	Monomère	Monomère*
Valence	2	2 ou 4	2 ou 10	2	2
% totale d'Ig sériques	80	10-15	5-10	0,004	0,2
Demi-vie (en jours)	21-24 (7-8 pour l'IgG3)	4-7	5-10	1-5	0,5-3
Activation du complément	IgG3>IgG2> IgG1>IgG4	+/-	+++	-	-
Interaction avec les récepteurs Fc	FcγR	FcαR	-	FcεR	FcδR

** : forme membranaire. Source : Janeway et al., 2003 et IMGT [1].*

Les IgM et les IgA ont la capacité de former des multimères avec l'implication de la chaîne J (Figure I-3). Cette chaîne est une séquence peptidique de 137 a.a. (soit entre 15 et 16 kDa), elle est indispensable à la sécrétion des dimères d'IgA et des pentamères d'IgM sous forme soluble (Schroeder and Cavacini, 2010).

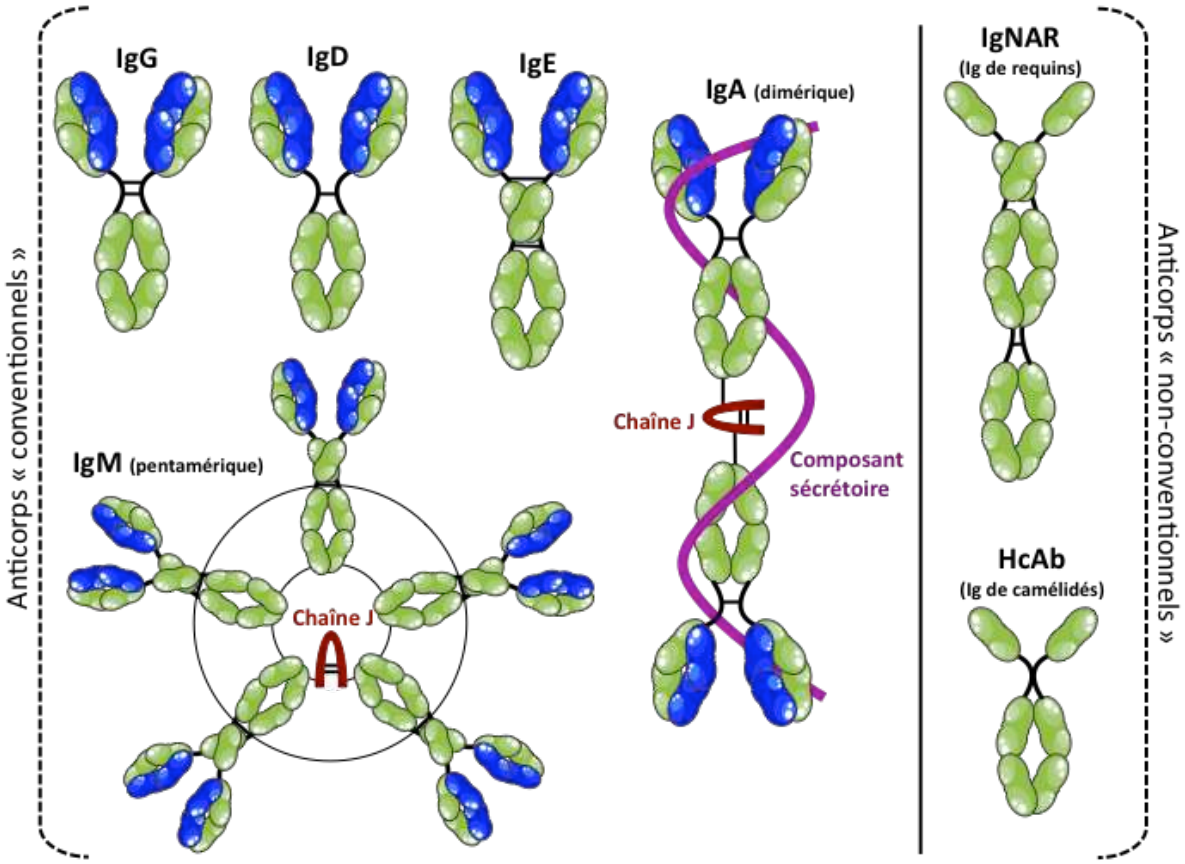


Figure I-3 : Structure des différentes classes d'immunoglobulines

Les anticorps « conventionnels » sont composés de deux chaînes lourdes (représentées en vert) et de deux chaînes légères (représentées en bleu). Les anticorps « non-conventionnels » ne sont composés que de deux chaînes lourdes.

En conditions physiologiques saines, il ne peut y avoir de production de chaînes lourdes seules (Leitzgen et al., 1997). En effet, pour être exprimé à la membrane ou être sécrété, un anticorps doit avoir la structure quaternaire appropriée, c'est-à-dire que les chaînes polypeptidiques qui le composent doivent être correctement repliées et assemblées entre elles. Les chaînes d'immunoglobulines, comme toutes les protéines membranaires ou sécrétées, possèdent un peptide signal d'environ 20 a.a. en position N-terminale. Au cours de la traduction par le ribosome, le peptide signal est reconnu par la SRP (pour Signal Recognition Particle) qui adresse la chaîne polypeptidique naissante au réticulum endoplasmique (RE) via le translocon sec61. Dans le RE, le peptide signal est clivé par la signal peptidase et la protéine est prise en charge par différentes chaperonnes pour favoriser un repliement correct (Paetzel et al., 2002). La protéine chaperonne la mieux caractérisée intervenant dans le repliement et l'assemblage des immunoglobulines est la protéine Bip (pour immunoglobulin Binding protein). Cette dernière interagit fortement avec le domaine C_H1 des immunoglobulines, encore non correctement replié, induisant sa rétention dans le RE (Figure I-4) (Feige et al., 2009). L'équipe de Buchner a en outre montré qu'une augmentation de l'expression de Bip empêche l'interaction puis l'association entre les chaînes lourdes et légères, aboutissant *in fine* à une plus forte rétention de l'immunoglobuline dans le RE (Borth et al., 2005). Des résultats obtenus dès 1987 suggèrent qu'en l'absence du domaine C_H1, il n'y a plus d'interaction avec Bip. Il en découle alors une sécrétion anormale de chaînes lourdes seules ou d'intermédiaires d'immunoglobulines. De plus une chaîne lourde sur trois présente un repliement incorrect dans cette condition (Hendershot et al., 1987).

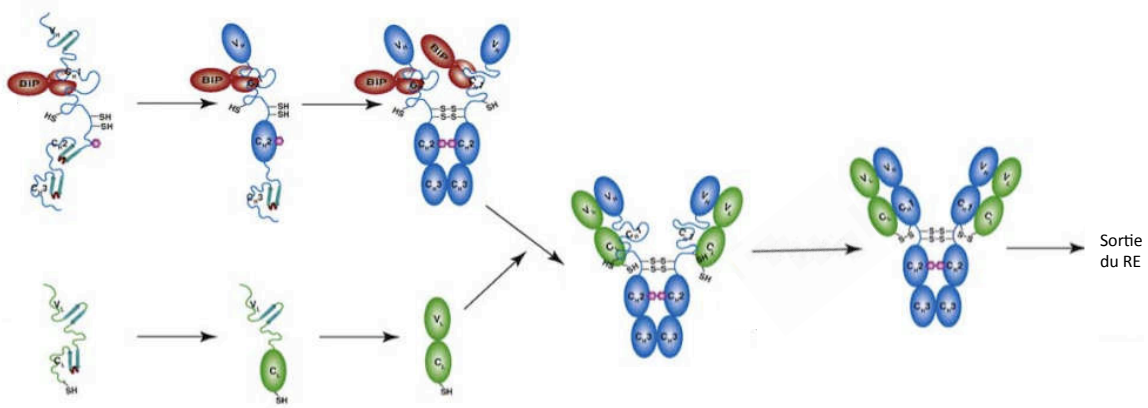


Figure I-4 : Rôle de Bip dans le repliement d'une IgG
Les domaines de la chaîne légère sont en vert et les domaines de la chaîne lourde sont en bleu. La protéine Bip est représentée en rouge. Source : Feige et al., 2010.

L'enzyme PDI (pour Protein Disulfide Isomérase) est une autre protéine impliquée dans le repliement et l'assemblage correct des immunoglobulines. La PDI catalyse le réarrangement et la formation de ponts disulfures inter- et intra-chaînes. Des expériences de surexpression de la PDI dans des cellules CHO (pour Chinese Hamster Ovary) ont montré une augmentation de la sécrétion d'immunoglobulines (Borth et al., 2005).

Enfin, notons qu'il existe des anticorps « non conventionnels » qui échappent à certaines de ces règles, comme les anticorps de requins et de camélidés. En effet ces anticorps ne sont composés que de chaînes lourdes (Hamers-Casterman et al., 1993; Greenberg et al., 1995). Ceci implique que le site de reconnaissance de l'antigène n'est formé que par un domaine variable de chaîne lourde (Figure I-3), appelé VHH pour le différencier du domaine V_H des immunoglobulines « conventionnelles » précédemment décrites. Différentes études ont permis de montrer que, lors de leur évolution, ces espèces semblent avoir perdu l'expression de la chaîne légère ainsi que le système de rétention de la chaîne lourde dans le RE. De manière intéressante, il a été montré chez la souris une expression d'IgH (immunoglobuline à chaînes lourdes uniquement) fonctionnelles lorsque les gènes des chaînes légères (κ et λ) étaient délétés. En outre, les IgH produites avaient perdu le domaine C_H1 (Zou et al., 2001), comme on le retrouve chez les camélidés (Hamers-Casterman et al., 1993), et chez les requins (Rast et al., 1998).

I.A.2 Genèse et diversité des anticorps

Chez l'homme, les gènes codant pour les chaînes lourdes et légères des anticorps sont localisés sur des chromosomes distincts :

- Le chromosome 14 porte le locus du gène codant pour la chaîne lourde, à la position 14q32.33.
- Le chromosome 2 porte le locus du gène codant pour la chaîne légère κ, à la position 2p11.2.
- Le chromosome 22 porte le locus du gène codant pour la chaîne légère λ, à la position 22q11.2.

Chez l'homme, le nombre de gènes codant pour des immunoglobulines sur ces loci est compris entre 303 et 354 en fonction du polymorphisme génétique propre à chaque individu. S'ajoutent à cela 68 orphons, gènes d'immunoglobulines localisés en dehors des trois loci IGH, IGκ et IGλ cités ci-dessus. Le nombre total de gènes codant pour des immunoglobulines chez l'homme est donc de 371 à 422. Mais parmi eux, seuls 153 à 171 gènes sont fonctionnels (Tableau I-2).

Tableau I-2 : Diversité germinale et combinatoire

Locus	Gènes				Gènes fonctionnels	Diversité combinatoire	
	V	D	J	C		minimum	maximum
IGH	38-46	23	6	9	76-84	38×23×6=**5244**	46×23×6=**6348**
IGκ	34-38	0	5	1	40-44	34×5=**170**	38×5=**190**
IGλ	29-33	0	4-5	4-5	37-43	29×4=**116**	33×5=**165**
Total					**153-171**	5244×(170+116) = **$1,5.10^6$**	6348×(190+165) = **$2,3.10^6$**

Données recueillies chez l'homme. Les chiffres sont approximatifs car ils peuvent différer d'un individu à l'autre. Source : IMGT [1].

Les régions constantes et variables sont codées par des gènes différents :

- Les gènes C pour les régions constantes des chaînes lourdes et légères,
- Les gènes V, D et J pour les parties variables des chaînes lourdes et V et J pour les parties variables des chaînes légères, dont l'organisation est détaillée en chapitre I.A.3.

Les anticorps sont capables de reconnaître une quantité considérable d'antigènes en dépit d'une quantité limitée de gènes. La génération de la diversité est apportée par différents mécanismes au cours des processus de maturation des lymphocytes B (LB) puis de sélection clonale, illustrés dans la figure I-5, et décrits dans le chapitre suivant.

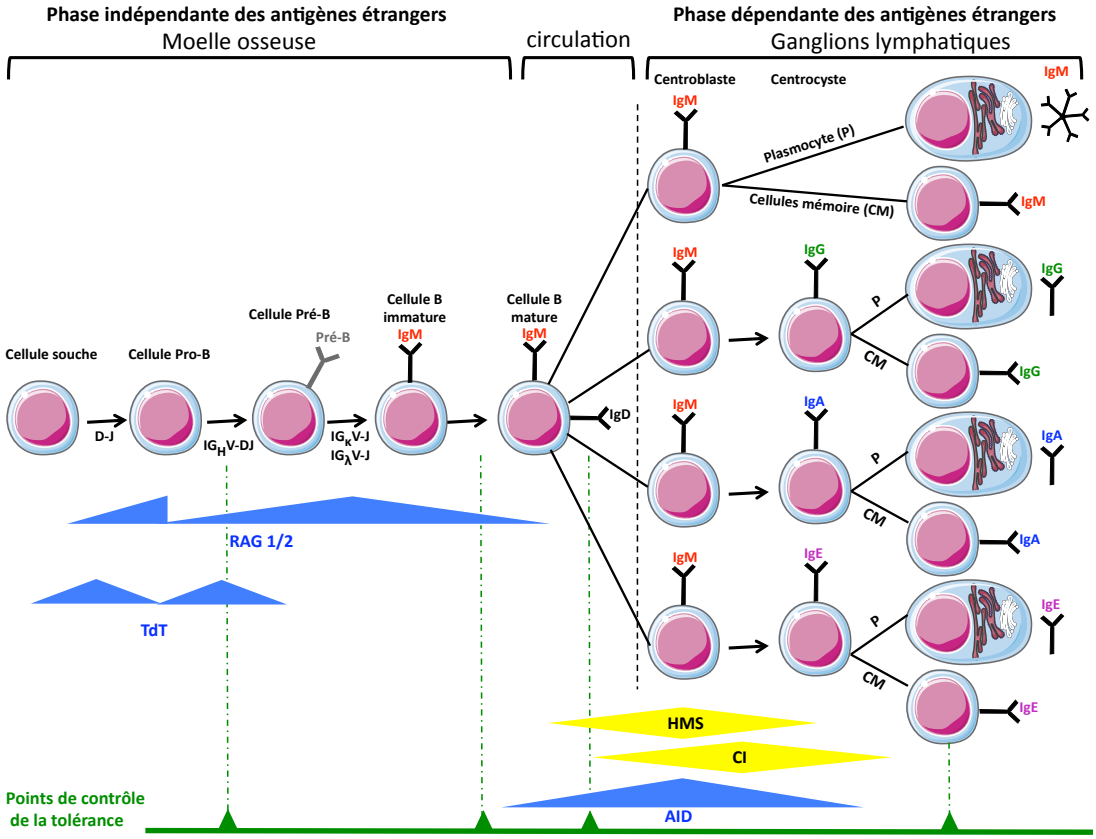


Figure I-5 : Différentiation des lymphocytes B

Représentation schématique des différentes étapes de maturation des lymphocytes B. Les niveaux d'expression des enzymes impliquées sont représentés en bleu. Les processus d'hypermutation somatique (HMS) et de commutation isotypique (CI) sont indiqués en jaune. Les isotypes sont représentés de différentes couleurs. Les points de contrôle de la tolérance sont représentés par des triangles verts.
Ce schéma est inspiré de l'IMGT [1] et des publications de Meffre et al., 2000 et Xu et al., 2007.

I.A.3 Maturation des lymphocytes B

Des cellules souches de la moelle osseuse possèdent un nombre variable de gènes pour chaque région en fonction des espèces (un exemple chez l'homme est détaillé dans le tableau I-2). Cette variabilité génique est appelée diversité germinale.

Les cellules souches myéloïdes peuvent évoluer vers des cellules Pro-B dans lesquelles vont se dérouler les réarrangements D_H-J_H , puis vers des cellules Pré-B avec les réarrangements V_H-DJ_H. Lors de ces deux phases, on observe l'expression de RAG1 et RAG2 (RAG pour recombination activating gene) (Shinkai et al., 1992). Ces protéines interviennent dans les mécanismes de recombinaison des gènes V(D)J. Ces recombinaisons sont possibles grâce à des « séquences signal de recombinaison » (RSS) (McBlane et al., 1995) localisées de part et d'autre des gènes des immunoglobulines. Lors de ces étapes, la diversité est augmentée par :

- La recombinaison: le gène codant pour une chaîne légère est formé par l'assemblage de deux segments : un segment nommé V (pour Variability) est joint à un segment nommé J (pour Joining). Cet ensemble forme le gène V_L qui code pour la région variable de la chaîne légère. Ce segment VJ est ensuite fusionné à un gène C (pour Constant) pour former le gène qui code pour toute la chaîne légère (Figure I-6). Chaque segment existe en plusieurs exemplaires (Tableau I-2) mais un seul exemplaire est utilisé pour coder une immunoglobuline particulière. Cette association combinatoire explique une part importante de la diversité des immunoglobulines. Si seul le phénomène de diversité combinatoire entrait en compte, le nombre total d'immunoglobulines serait estimé entre $1{,}5.10^6$ et $2{,}3.10^6$ (Tableau I-2).
  La même recombinaison a lieu pour la formation du gène de la chaîne lourde avec un élément de diversité supplémentaire apporté par le segment D (pour Diversity). Les gènes D sont localisés entre les gènes V et J. La région variable de la chaîne lourde est donc constituée par un segment VDJ (Figure I-6).
- Les jonctions : lors de la recombinaison des gènes V(D)J, des modifications apparaissent au niveau des « points de jonction » entre les différents segments. La jonction peut induire un décalage dans le cadre de lecture. De plus, un degré supplémentaire de diversité est induit par l'insertion de nucléotides lors de cette étape. Deux types d'insertions existent :

  1) les insertions P : après le clivage par RAG1 et RAG2 au niveau de la jonction, il arrive parfois qu'il reste une courte séquence de simple brin à l'extrêmité de la séquence codante avec quelques nucléotides provenant du brin complémentaire. D'autres enzymes de réparation ajoutent alors des nucléotides complémentaires à ce brin créant une séquence palindromique dans la jonction. Ces nucléotides sont appelés nucléotides P.

  2) les insertions N : après le clivage, la terminale déoxynucléotidyl transférase (TdT) va ajouter jusqu'à 15 nucléotides de façon aléatoire au niveau des jonctions D-J ou V-DJ. Ces séquences sont absentes de la lignée germinale et les nucléotides ajoutés sont appelés nucléotides N.

- L'assemblage entre chaîne légère et chaîne lourde : l'assemblage entre n'importe quelle chaîne légère réarrangée (κ ou λ) et n'importe quelle chaîne lourde réarrangée (α, γ, ε, μ, δ) apporte un degré supplémentaire de diversité.

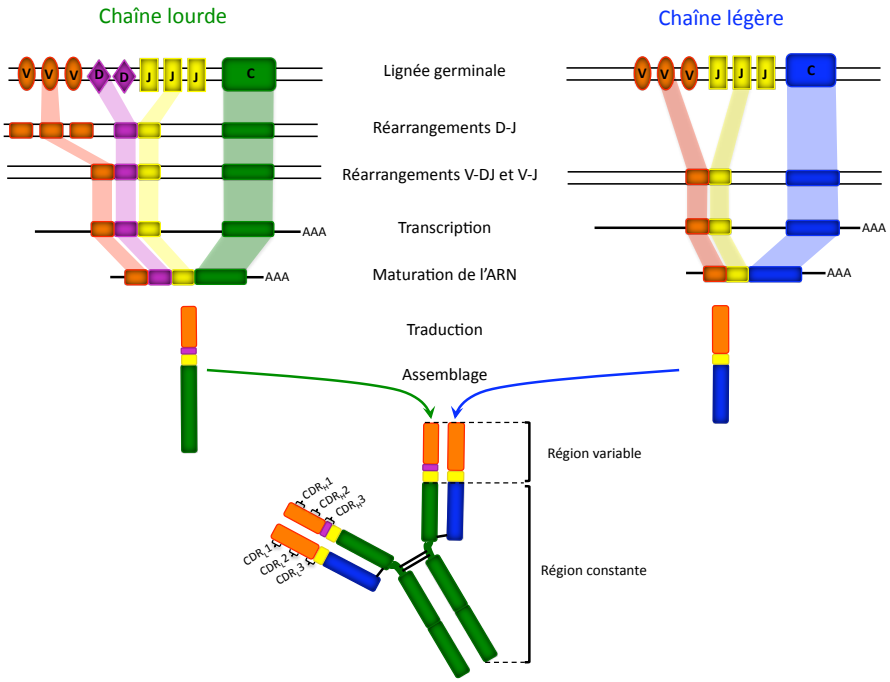


Figure I-6 : Réarrangement de gènes d'immunoglobulines chez l'homme

Représentation schématique du réarrangement des gènes d'immunoglobulines. Les ségments de gènes sont représentés de différentes couleurs. Les régions variables et constantes, ainsi que les CDR, sont indiqués. Inspiré de Janeway et al., 2003.

A ce stade, le LB est dit mature. Il passe dans la circulation puis dans les organes lymphoïdes secondaires où se déroule le phénomène d'hypermutation somatique (HMS). C'est un phénomène ayant lieu après la stimulation antigénique du lymphocyte B mature. Dès la fin des années 1950, Lederberg suppose que la diversité des cellules productrices d'anticorps provient d'un fort taux de mutations spontanées (Lederberg, 1959). Ce processus représente l'introduction d'un grand nombre de mutations ponctuelles au niveau des gènes des régions variables des chaînes lourdes et légères. Ces mutations apparaissent avec une fréquence d'une mutation pour 1000 paires de bases au cours de chaque cycle de division cellulaire (Schroeder and Cavacini, 2010). Les mutations entraînant des changements d'a.a. au niveau de la séquence protéique sont souvent localisées dans les CDR (Figure I-2). Ces mutations modifient légèrement la spécificité et l'affinité de l'anticorps. Ceci a pour conséquence la sélection d'un clone de lymphocytes B produisant un anticorps avec une forte affinité pour sa cible (Ganesh and Neuberger, 2011). L'HMS participe au processus appelé maturation d'affinité. Le point de départ de cette maturation est l'activation de la cytidine déaminase ou AID (pour Activation-Induced cytidine Deaminase) qui va déaminer des cytosines en uraciles ce qui va créer un mésappariement U/G (Begum and Honjo, 2012). Les divers mécanismes de

réparation de l'ADN sont déclenchés et induisent l'apparition de mutations (Teng and Papavasiliou, 2007). Il a été montré qu'en plus du phénomène d'HMS, l'AID était également impliquée dans la commutation isotypique (Muramatsu et al., 2000). Ceci apporte un degré supérieur de diversité puisque ce phénomène correspond à un changement au niveau de la région constante des immunoglobulines afin de produire les différents isotypes aux fonctions effectrices propres.

Au terme de la sélection clonale, on aboutit à deux types cellulaires :

- les lymphocytes B mémoire, caractérisés par une longue durée de vie,
- les plasmocytes, cellules B différenciées sécrétrices d'anticorps. Chaque plasmocyte produit un anticorps avec une spécificité unique.

Au vu de la très grande diversité obtenue, il semble que l'ensemble de ces processus soit très efficace. *In fine*, la diversité est estimée entre 10^{12} et 10^{15} anticorps différents et justifie l'adaptabilité du système immunitaire face aux éléments étrangers.

Il est important de noter qu'il existe néanmoins une grande « perte ». Les recombinaisons, avec des pertes et des gains de matériel génétique, impactent sur le cadre de lecture. Statistiquement, une séquence recombinée sur trois codera finalement pour une immunoglobuline fonctionnelle. On sait également que 10% à 20% des LB immatures quittent la moelle osseuse pour atteindre les organes lymphoïdes secondaires via la circulation lymphatique. Enfin seulement 3% de ces LB immatures constitueront le répertoire B final (Jankovic et al., 2004).

Enfin, les travaux de l'équipe de Tawfik suggèrent qu'il pourrait y avoir une autre source de diversité, la diversité conformationnelle. Un même anticorps pourrait posséder une même séquence peptidique mais une conformation, au niveau du paratope, différente. Cela lui permettrait de reconnaître un substrat avec des affinités différentes ou de reconnaître différents substrats (James et al., 2003). Ce mécanisme inclus dans le phénomène de polyréactivité, est évoqué dans la suite du manuscrit (cf. § I.C.5).

I.A.4 Fonctions effectrices des anticorps

Le rôle de l'anticorps est de protéger l'organisme. Les fonctions décrites ci-après et illustrées en figure I-7 sont celles de l'IgG car c'est l'isotype le plus représenté dans le sérum d'une part, et que c'est la classe la plus étudiée et caractérisée d'autre part.

- La première fonction est de se fixer aux antigènes pour les neutraliser. Cette interaction ne nécessite que l'intervention des domaines variables (formant le paratope) et permet à elle seule de bloquer les éventuelles activités des entités

étrangères (toxine, bactérie, virus…).

- La région Fc intervient dans l'élimination de l'antigène. En effet un pathogène recouvert d'anticorps est plus facilement reconnu par des récepteurs Fc sur les membranes de macrophages ou de neutrophiles, entraînant la phagocytose du complexe. Ce phénomène s'appelle l'opsonisation ou ADCP (pour Antibody-Dependent Cell-mediated Phagocytosis). Une fois internalisé, le pathogène subit un processus de fragmentation et est présenté sous la forme de petits peptides antigéniques, par les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMHII).
- L'interaction anticorps-antigène permet également l'activation des voies cytotoxiques à médiation cellulaire ou ADCC (pour Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity). Le processus ADCC fait intervenir les récepteurs FcγRs. Il en existe plusieurs qui ont différentes affinités en fonction des sous-classes d'IgG avec, à l'exception du FcγRIIb, des fonctions activatrices (Nimmerjahn and Ravetch, 2006). Les cellules du système immunitaire recrutées (macrophages, polynucléaires, cellules dendritiques, monocytes ou mastocytes) co-expriment les FcγRs activateurs et inhibiteurs. Cependant on remarque que l'ADCC est généralement médiée par les cellules NK (pour Natural Killer) qui expriment préférentiellement le récepteur FcγRIIIa. Une fois activé, ce récepteur induit la mort de la cellule cible par le relargage de médiateurs cytotoxiques tels que les granzymes ou les perforines.
- L'activation du complément ou CDC (pour Complement-Dependent Cytotoxicity) est également une conséquence de l'interaction anticorps-antigène. Dans le cas de ce processus, c'est la protéine C1q qui interagit avec le domaine C_H2. Cette interaction déclenche la cascade du complément qui aboutit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire entraînant la lyse de la cellule cible (Gelderman et al., 2004) (Figure I-7).

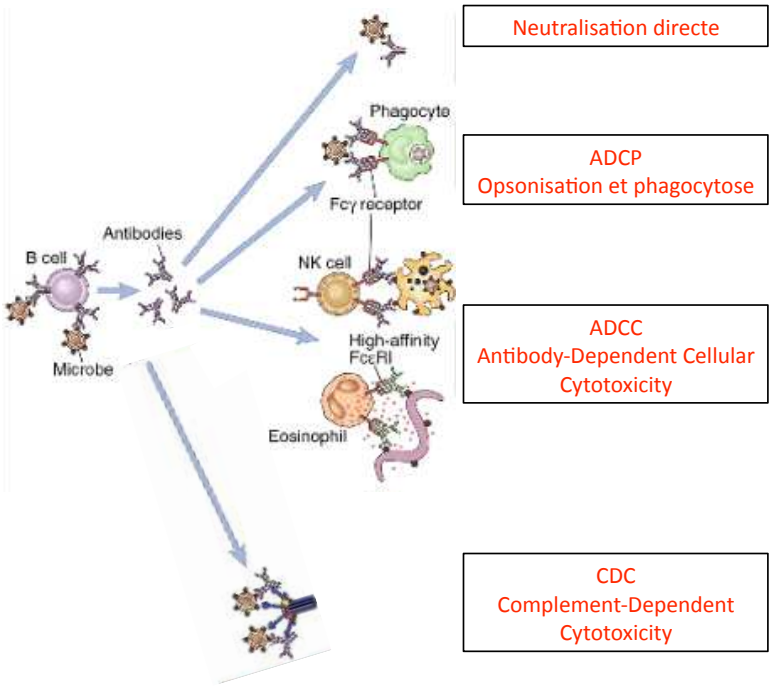


Figure I-7 : Illustration des fonctions effectrices des anticorps
Source : site éducatif de Wenliang [2].

I.A.5 Anticorps et glycosylations

Les anticorps sont des glycoprotéines. Les sites et la nature des glycosylations sont très variables en fonction des isotypes (Figure I-8). Les différentes étapes des glycosylations sont initiées dans le RE et se poursuivent dans l'appareil de Golgi.

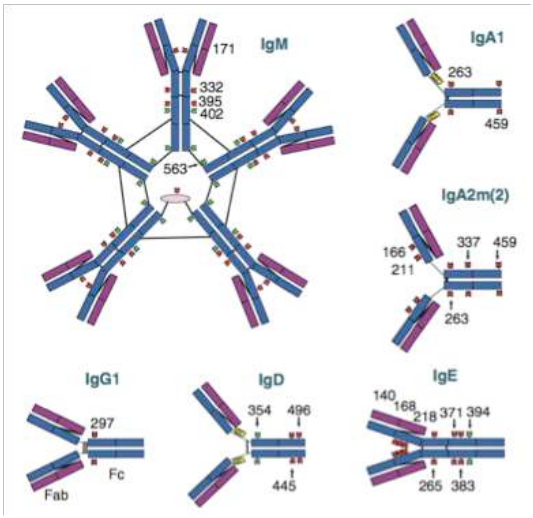


Figure I-8 : Sites de glycosylation des immunoglobulines
Représentation schématique de différents isotypes d'immunoglobuline. La chaîne lourde est représentée en bleu et la chaîne légère en violet. La chaîne J sur l'IgM est présentée en rose. Les positions des glycosylations sont indiquées sur les différentes structures. Les N-glycosylations sont indiquées en rouge (quand elles sont complexes) et vert (quand elles sont riches en mannose). Les O-glycosylations sont indiquées en jaune. Source : Arnold et al., 2007.

Les chaînes d'oses sont liées aux protéines par des liaisons O-glycosidiques ou N-glycosidiques selon leur site d'ancrage (Figure I-9) :

- La O-glycosylation est la liaison établie entre la N-acétylgalactosamine et l'oxygène du groupement hydroxyle de la sérine ou de la thréonine après synthèse de la chaîne polypeptidique.
- La N-glycosylation, est un évènement qui se déroule pendant la traduction et les oses sont fixés à l'azote du groupement amide de l'asparagine. Le sucre immédiatement attaché à l'asparagine est la N-acétylglucosamine.

Contrairement à la O-glycosylation, la N-glycosylation se forme au niveau d'une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr où X peut être n'importe quel a.a. sauf une proline (Moremen et al., 2012).

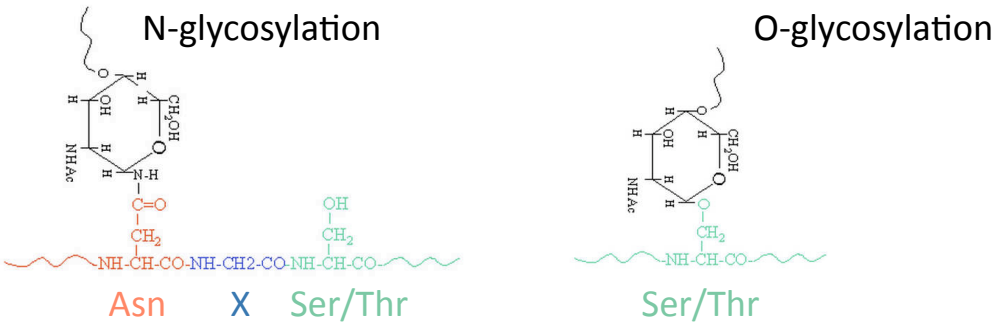


Figure I-9 : Sites d'ancrage des oses lors de la formation des N et O- glycosylations
Source : site ionsource [3].

Les glycosylations jouent un rôle important dans la fonction des protéines. Le profil de glycosylation des anticorps est différent en fonction de l'isotype (Arnold et al., 2007). L'IgG1 étant l'isotype le plus utilisé en thérapeutique, elle est par conséquent la plus étudiée, et le rôle des glycosylations qui la caractérisent est bien documenté dans la littérature. Les IgG1 humaines présentent un site de N-glycosylation au niveau de l'asparagine 297 sur le domaine CH2 de chaque chaîne lourde, sur lequel est fixé un glycane incluant des N-acétylglucosamines, du mannose et, éventuellement, du galactose, du fucose et des acides sialiques.

Les glycosylations des IgG sont majoritairement localisées dans la région Fc. Comme mentionné dans le paragraphe I.A.4, les fonctions effectrices des anticorps sont médiées par cette région. De nombreuses études ont montré l'implication des glycosylations dans ces fonctions. Une perte totale du motif de glycosylation entraîne une diminution des réponses ADCC et CDC (Borrok et al., 2012). Récemment, une équipe a montré que même une perte partielle de la glycosylation avait un impact sur ces réponses (Ha et al., 2011). Ainsi une IgG1 asymétriquement glycosylée perd 20% de sa capacité de liaison à la protéine C1q et diminue fortement son affinité pour le FcγRI, induisant une diminution de la réponse ADCC d'un

facteur de 3,5. Des immunoglobulines entières ont également été exprimées en système *E.coli*, générant donc des protéines hétérologues complètement dépourvues de modifications post-traductionnelles (cf. § II.B) et donc de glycosylations. Ces anticorps « artificiellement » aglycosylés ne peuvent plus déclencher les réponses ADCC et CDC car ils ont perdu leur affinité pour le récepteur FcγRI et la protéine C1q (Tao and Morrison, 1989; Simmons et al., 2002). Néanmoins, des chercheurs ont remarqué qu'en l'absence de glycosylations, certains anticorps conservaient malgré tout l'activation des fonctions effectrices, voire présentaient d'autres propriétés, telle une très grande flexibilité de la région Fc. Ainsi cinq anticorps non glycosylés sont en cours d'essais cliniques (Jung et al., 2011).

Par ailleurs, la composition même du glycane joue un rôle dans l'activation des fonctions de l'anticorps (Raju, 2008). En outre, la modification du métabolisme de synthèse des sucres dans des cellules productrices a permis d'augmenter jusqu'à 10% la réponse ADCC des anticorps produits (Umana et al., 1999; Naso et al., 2010).

Il semblerait que la glycosylation conditionne également la demi-vie des anticorps par l'interaction avec un récepteur particulier (FcRn) impliqué dans le recyclage des anticorps (Roopenian and Akilesh, 2007). Cette hypothèse est cependant controversée. Des études montrent en effet que la liaison au FcRn ainsi que la demi-vie sérique d'IgG1 et de leur variants aglycosylés sont identiques (Hinton et al., 2006).

Enfin il a été montré que les glycosylations peuvent également intervenir dans l'affinité de l'anticorps pour sa cible. Ces glycosylations concernent donc les domaines variables, phénomène peu décrit. Cependant des auteurs stipulent que plus de 30% des IgG humaines sériques possèdent des N-glycosylation (Abès and Teillaud, 2010). Ces sites, normalement absents de la lignée germinale, apparaissent au cours du processus d'HMS (cf. § I.A.2) et peuvent aboutir à l'ajout d'un glycane (Dunn-Walters et al., 2000). Lorsque de tels sites apparaissent dans un CDR, il peut y avoir une modification de l'affinité de façon positive ou négative (Wallick et al., 1988; Wright et al., 1991). Ainsi, même si leur rôle est encore soumis à controverse, les glycosylations semblent modifier la fonction des anticorps. Elles représentent donc un élément clé à prendre en compte lors de la production et l'étude d'un anticorps, sachant que leur modulation peut permettre une optimisation.

Les propriétés des anticorps ont rapidement suscité un intérêt thérapeutique, mais il a fallu attendre la mise au point de systèmes de production performants pour pouvoir les utiliser dans ce domaine. Très rapidement des difficultés sont apparues, comme l'immunogénicité des premiers anticorps utilisés, que seules les avancées en biotechnologie ont permis de dépasser. La possibilité de pouvoir utiliser des fragments dérivés de l'anticorps entier a abouti à une exploitation indépendante des régions de liaison à l'antigène ou de la région effectrice. Les paragraphes suivants retracent l'historique de l'ingénierie des

anticorps, des premières avancées scientifiques aux succès de leur utilisation actuelle en thérapeutique.

I.B Ingénierie des anticorps

I.B.1 Les anticorps de 1ère génération

Avant même leur découverte, l'histoire des anticorps débute par la sérothérapie dans les années 1890 grâce à Berhing et Kitasato. Ils découvrent que l'état d'immunité vis-à-vis d'une toxine pouvait être transmis à des individus « non immunisés » par transfert de sérum d'individus probablement contaminés. Leur travaux ne furent publiés qu'en 1965 (Behring and Kitasato, 1965) mais cette propriété a très vite été attribuée aux anticorps. En 1948, Fagreus identifie les cellules spécialisées dans la sécrétion des anticorps *in vivo*, les plasmocytes (Fagreus, 1948). En plus de ces découvertes, de grandes avancées techniques dans le domaine de la culture cellulaire ont eu lieu, parmi lesquelles les travaux de Barski sur la production de cellules hybrides, de Potter sur l'établissement de lignées myélomateuses et d'Okada sur la fusion cellulaire par le virus de Sendaï (Barski et al., 1960; Potter and Boyce, 1962; Okada, 1962). C'est grâce à ces avancées scientifiques que Köhler et Milstein développent la technologie des hybridomes aboutissant à la production *in vitro* d'anticorps monoclonaux (Kohler and Milstein, 1975). Un hybridome résulte de la fusion de deux cellules : (1) un lymphocyte B conférant la capacité de synthèse et de sécrétion d'anticorps, (2) un myélome apportant la caractéristique d'immortalité. Des étapes de dilutions et de criblages sont réalisées afin de sélectionner des clones sécrétant chacun un anticorps porteur d'une spécificité unique. Un anticorps produit par un clone est appelé anticorps monoclonal. Ces premiers travaux, menés avec des cellules murines, ouvrent la porte de l'ingénierie des anticorps. Les anticorps monoclonaux entrent dans la définition des « balles magiques » de Paul Ehrlich (Bosch and Rosich, 2008) car il permettent de viser spécifiquement une cible avec une grande affinité, et cela sans engendrer de toxicité pour l'organisme. Ces travaux sont à l'origine de ce que l'on appelle aujourd'hui les thérapies ciblées. Le premier anticorps monoclonal thérapeutique murin, le muromonab-CD3 (OKT3™) dirigé contre l'antigène CD3 des lymphocytes T humains, obtient une autorisation de mise sur le marché par la FDA (Food and Drug Administration) en 1986. Mais très rapidement ces anticorps dits de 1ère génération montrent leurs limites. Ils n'interagissent que faiblement avec les récepteurs Fc humains, ce qui entraîne une faible ADCC (Hulett and Hogarth, 1994). Mais surtout, l'origine murine de ces anticorps entraîne une réponse immunitaire caractérisée par la production d'anticorps humains dirigés contre les anticorps de souris. On parle alors des HAMA (pour Human Anti-Mouse Antibody) (Schroff et al., 1985). Plusieurs stratégies ont été menées pour palier ce problème d'immunogénicité, toutes ayant pour objectif de rendre ces anticorps plus « humains ».

I.B.2 Les anticorps de 2nde génération

Grâce aux progrès de la biologie moléculaire dans les années 1980 et notamment avec la mise au point de la PCR (Mullis et al., 1986), l'accès aux séquences des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères des anticorps est devenu possible. Dès lors une seconde génération d'anticorps recombinants se développe, avec une immunogénicité réduite, de meilleures affinités, et des propriétés optimisées ou détournées.

Dès 1984 des anticorps chimériques sont obtenus. Dans de tels anticorps, seuls les domaines V d'origine murine sont conservés, et 75% de la protéine est d'origine humaine (Figure I-10). Cette construction permet de diminuer considérablement leur immunogénicité chez l'homme. L'anticorps formé conserve toutefois les propriétés de liaison spécifique de l'anticorps initial, mais peut désormais se lier aux récepteurs Fc humains. Toutefois, bien que la part murine ne représente que 25% de la protéine totale, cela est suffisant pour induire une réponse immunitaire de type HACA (pour Human Anti-Chimeric Antibodies) (Morrison et al., 1984; Takeda et al., 1985).

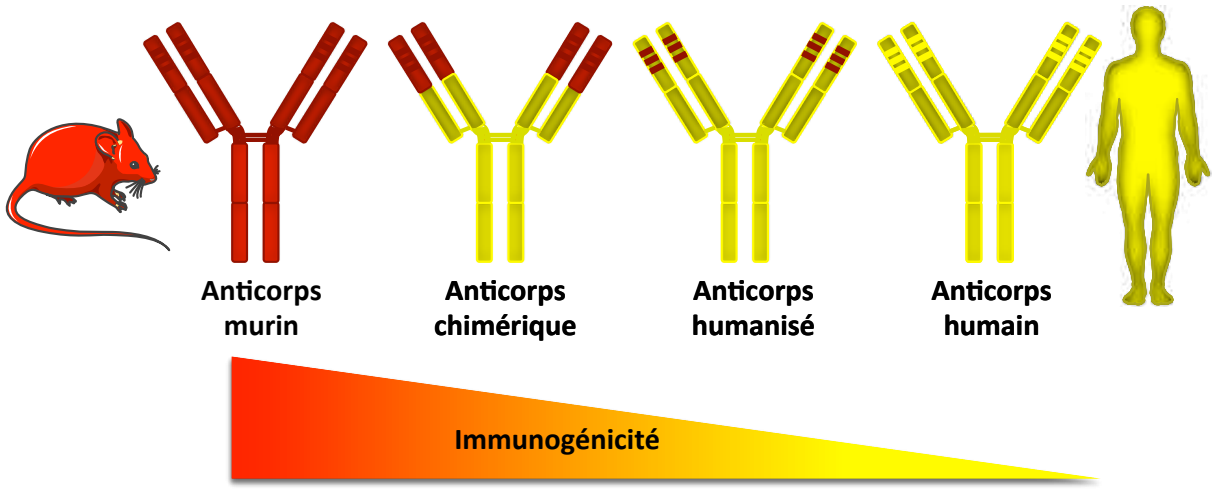


Figure I-10 : Anticorps : de la souris à l'homme

Il existe une DCI (dénomination commune internationale) ou nomenclature pour les anticorps utilisés en thérapeutique. Les noms de ces anticorps se terminent tous par le suffixe mab (monoclonal antibody). Le suffixe complet est spécifique de l'origine de l'anticorps (Omab pour les anticorps murins, Ximab pour les anticorps chimériques, Zumab pour les anticorps humanisés et Umab pour les anticorps humains).

Les chercheurs ont poursuivi l'humanisation des anticorps murins avec la production d'anticorps dit humanisés dès 1986. Dans cette structure, 85 à 90% de la séquence est humaine. Il peuvent être conçus grâce au « CDR grafting », technique où l'on greffe les régions hypervariables murines (formant le paratope) sur une structure d'anticorps humain (Jones et al., 1986; Queen et al., 1989; Co and Queen, 1991). Le succès de l'humanisation n'est pas garanti, les anticorps générés pouvant perdre leur affinité ou leur spécificité. Des mutations ponctuelles au niveau des FR sont souvent nécessaires pour maintenir la spécificité de l'anticorps. Cette classe d'anticorps est la plus utilisée en thérapeutique.

Les travaux se sont ensuite orientés vers la production d'anticorps totalement humains. Diverses approches sont réalisées (Figure I-11) :

- L'approche moléculaire de sélection *in vitro* grâce à la présentation sur phage d'une banque de fragments d'anticorps humains (McCafferty et al., 1990; Marks et al., 1991; Vaughan et al., 1998; Hoogenboom, 2005).

- L'approche génétique via des souris transgéniques humanisées. Dans cette approche, les gènes codant pour les immunoglobulines murines sont substitués par les gènes codant pour les immunoglobulines humaines (Lonberg et al., 1994). Après immunisation de ces souris, l'obtention d'anticorps humains se fait par la technique classique des hybridomes, avec la fusion d'un LB murin exprimant un anticorps humain et un myélome (pour revue : Cogne et al., 2009).

- Par ingénierie cellulaire, avec la fusion de lymphocytes humains et de cellules de myélomes d'autres espèces (souris, rat) ou humaines (Siberil et al., 2005).

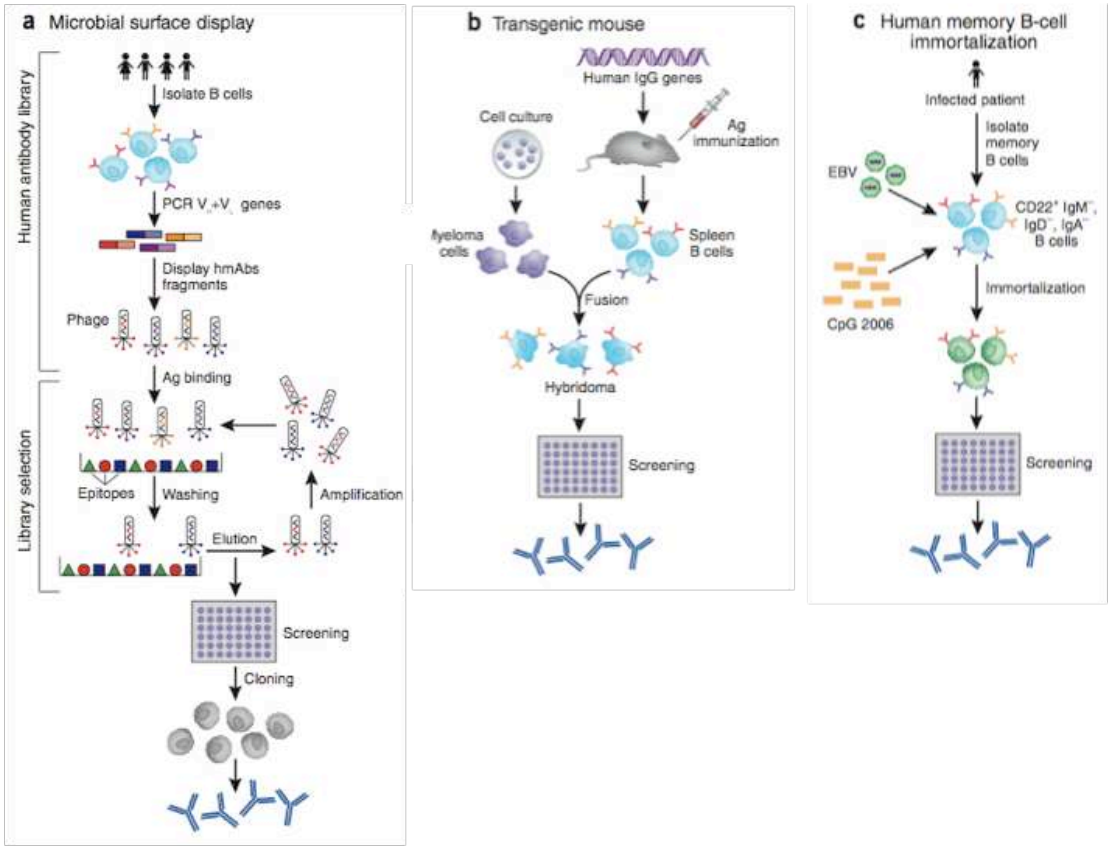


Figure I-11 : Techniques d'obtention d'anticorps humains

Genèse d'anticorps humains par : a) Sélection après expression de fragments d'anticorps sur phages, b) Souris transgéniques et c) Ingénierie cellulaire. Source : Marasco and Sui, 2007.

En dépit de ces avancées technologiques, l'humanisation systématique des anticorps à été remise en cause. En effet il a été suggéré que plus de 20% des anticorps murins induisent une immunogénicité négligeable ou tolérable chez l'homme (Getts et al., 2010). Il serait donc possible de s'affranchir du long, laborieux et coûteux travail d'humanisation pour de tels anticorps. Ainsi, ces travaux suggèrent que le recours à l'humanisation doit être evalué au cas par cas, en tenant compte des caractéristiques biochimiques de l'anticorps et des indications thérapeutiques. Depuis quelques années, différentes approches ont été développées pour prédire l'immunogénicité des protéines à visée thérapeutique, notamment le test iTEM (pour individualized T cell Epitope Measure) permettant l'étude de la réponse des lymphocytes T $CD4^+$ (Bryson et al., 2010; Cohen et al., 2010; Maillere et al., 2012).

Outre le fait de pouvoir moduler l'origine des différentes régions d'un anticorps, il est également possible de générer différents formats afin d'adapter le fragment d'anticorps à l'application désirée.

I.B.3 Les fragments d'anticorps

I.B.3.a Fragments obtenus par voie enzymatique

Certaines enzymes spécifiques permettent d'obtenir divers fragments de l'IgG (Figure I-12). La papaïne permet d'obtenir trois fragments d'environ 50 kDa chacun, dont deux fragments identiques conservant le site de liaison à l'antigène appelés Fab pour « antigen binding Fragment ». Ces fragments sont donc monovalents. Le troisième fragment généré conserve les fonctions effectrices de l'anticorps. Il est appelé Fc pour « Fragment cristallisable ». La pepsine est une enzyme qui coupe en dessous de la région charnière, après les ponts disulfures, libérant ainsi un fragment $F(ab')_2$ tandis que la partie Fc est dégradée. Contrairement au Fab, le F(ab')2 obtenu est bivalent puisqu'il conserve les deux sites de liaison à l'antigène de l'anticorps dont il est issu (Figure I-12).

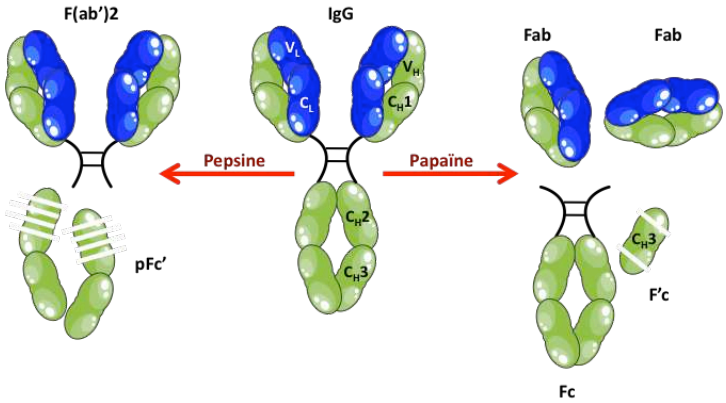


Figure I-12 : IgG et ses différents fragments

Représentation schématique de l'immunoglobuline G et des produits de la digestion à la papaïne (à droite) et à la pepsine (à gauche). Inspiré de l'IMGT [1].

I.B.3.b Fragments obtenus par les technologies recombinantes

Les avancées en biologie moléculaire ont permis de diminuer l'immunogénicité des anticorps pour une utilisation thérapeutique (cf. § I.B.2). Mais cela a également permis de développer tout un arsenal de structures pour diverses utilisations. La figure I-13 illustre les formats les plus classiquement utilisés.

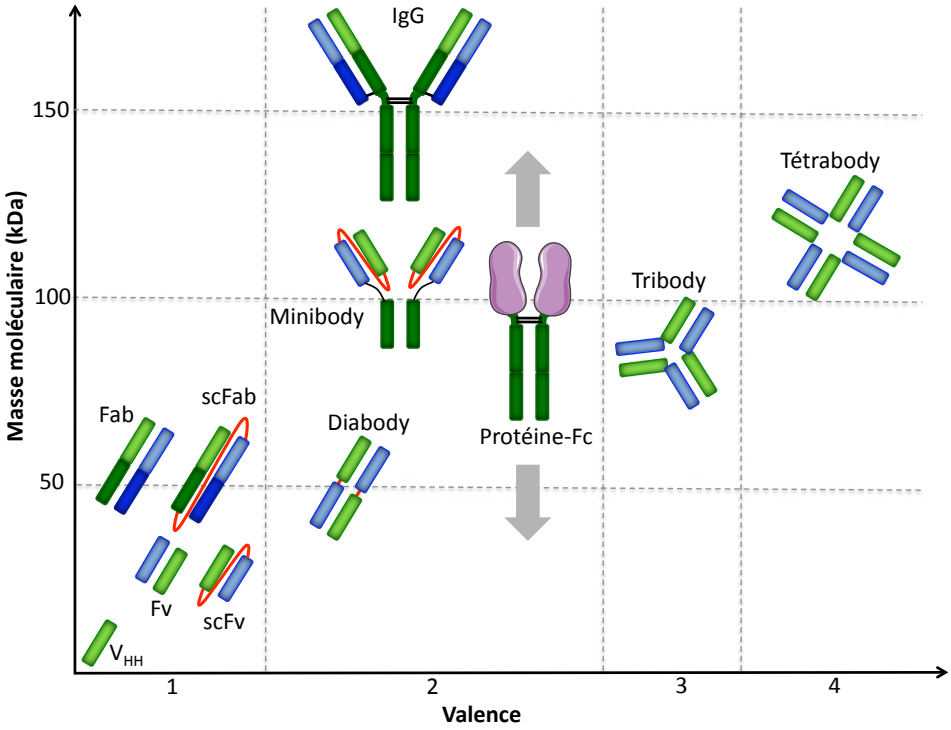


Figure I-13 : Les différents formats d'anticorps.

Représentation schématique des différents formats d'anticorps issus de la biotechnologie. Les domaines de la chaîne légère sont en bleu (bleu claire pour le domaine V_L) et les domaines de la chaîne lourde sont en vert (vert clair pour le domaine V_H). Les peptides espaceurs sont représentés en rouge.
Au niveau de la protéine-Fc, le rose représente la protéine d'intérêt. Les flèches grises indiquent que la masse moléculaire de la protéine de fusion peut varier en fonction de la masse de la protéine d'intérêt. Inspiré de Cuesta et al., 2010.

I.B.3.b.1 Du Fv au scFv

Le fragment Fv, composé des domaines variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère, est le plus petit fragment conservant les propriétés de liaison à l'antigène, avec une masse moléculaire de seulement 25 kDa. C'est un fragment monovalent. L'équipe de Plückthun a produit ce fragment chez *E.coli* (Skerra and Pluckthun, 1988). Un lien protéique, appelé espaceur, peut être ajouté entre les deux domaines variables pour améliorer la stabilité de la protéine (Bird et al., 1988; Huston et al., 1988). La longueur et la composition de cet espaceur ainsi que l'orientation des domaines VH et VL jouent un rôle dans le repliement et la stabilité du fragment, et sur sa fonctionnalité (Ahmad et al., 2012). La protéine n'est donc plus formée que d'une chaîne polypeptidique unique et les fragments obtenus sont appelés scFv pour « single chain variable fragment ». En principe, les scFv gardent la même affinité pour leurs

cibles que les anticorps dont ils dérivent, à la valence près puisqu'ils ne possèdent qu'un site de liaison contre deux pour un anticorps entier. Il existe néanmoins des exemples pour lesquels le scFv a conduit à une diminution ou une perte de l'affinité par rapport à l'anticorps de départ (Ding et al., 2010). Ces modifications d'affinités peuvent découler du choix de la construction (nature de l'espaceur, orientation, localisation de l'expression…), du système d'expression, et/ou du respect de la séquence de l'anticorps dont dérive le scFv lors du processus de clonage.

La chaîne unique du format scFv en fait un bon candidat pour les techniques de sélection *in vitro* faisant appel à : la présentation en surface de phages (Smith, 1985), la présentation en surface de ribosomes (Hanes et al., 2000), la présentation en surface de levures (Boder and Wittrup, 1997), ou encore la présentation en surface de cellules de mammifères (Ho and Pastan, 2009).

Ce format d'anticorps est souvent exprimé en système procaryote, mais très rapidement l'idée d'utiliser des scFv exprimés à l'intérieur de cellules eucaryotes pour inhiber des protéines impliquées dans diverses voies de signalisations voit le jour (Biocca et al., 1994). Ces scFv intracellulaires sont appelés des intrabodies et leurs potentiels thérapeutique et diagnostique sont mis en avant (Lo et al., 2008; Ali et al., 2011; Rinaldi et al., 2013).

I.B.3.b.2 Le Fab

Le fragment Fab peut être obtenu par voie enzymatique (cf. § I.B.3.a), mais également par recombinaison génique. Il est composé de la chaîne légère (domaines V_L et C_L) et des domaines V_H et C_H1 de la chaîne lourde. L'équipe de Plückthun a également produit ce fragment dans la bactérie (Pluckthun and Skerra, 1989). Comme le scFv, le Fab est monovalent et peut être utilisé dans la technique d'expression en surface de phage (Huse et al., 1989). Ce format est réputé plus stable que le scFv grâce aux interactions entre les chaînes lourde et légère. Mais cette idée est controversée et le caractère de stabilité d'un Fab ou d'un scFv reste du cas par cas (Rothlisberger et al., 2005). Pour en faciliter l'expression, le Fab peut également être exprimé sous la forme d'une chaîne unique alors nommé le scFab (Hust et al., 2007).

I.B.3.b.3 Les Nanobodies

La découverte de l'existence d'anticorps composés de chaînes lourdes uniquement est à l'origine des domaines uniques d'anticorps (sdAb pour single domain antibody), appelés VHH pour les camélidés (Hamers-Casterman et al., 1993) et V-NARE pour les requins (Greenberg et al., 1995). Le site de reconnaissance de l'antigène n'est donc formé que d'un domaine. Les sdAb sont également appelés nanobodies. Pour palier l'absence du domaine VL, les sdAb possèdent des CDR beaucoup plus longs, particulièrement au niveau de la boucle du CDR3. La longueur du CDR3 peut par exemple lui permettre d'interagir avec des sites actifs d'enzymes pouvant être enfouis dans une cavité (Muyldermans et al., 2001). Cette

propriété permet d'envisager l'utilisation de sdAb comme inhibiteurs. Il faut noter que ces fragments sont plus hydrophiles (Sidhu and Fellouse, 2006), induisant une expression en cellules hôtes plus aisée que d'autres fragments d'anticorps tels les scFv. Comme les intrabodies, des sdAb ont été utilisés pour inhiber des antigènes intracellulaires (Tanaka et al., 2003).

Les fragments présentés ci-dessus reflètent généralement l'exploitation de l'activité de liaison de l'anticorps. Mais la partie constante suscite également un intérêt important, notamment dans l'activation des voies immunitaires.

I.B.3.b.4 Les Minibodies

Un minibody correspond à deux scFv reliés chacun à un domaine C_H3 (Figure I-13). C'est la raison pour laquelle il est aussi appelé scFv-CH3. Cette protéine conserve à la fois la spécificité de liaison, ainsi qu'une partie des fonctions effectrices des anticorps associées au domaine CH3. Ce format permet une bonne pénétration dans les tumeurs et une meilleure clairance par rapport aux anticorps classiques. Ces caractéristiques sont notamment très importantes en imagerie (Yazaki et al., 2001).

I.B.3.b.5 Les protéines de fusion avec la région Fc

Il est possible d'exploiter les propriétés effectrices des anticorps en fusionnant la région Fc des immunoglobulines avec une protéine d'intérêt. Ces protéines de fusion-Fc sont aussi appelées immunoadhésines. La fusion de la région Fc permet de conférer de nouvelles propriétés à la protéine cible, telles que :

- Une purification simplifiée par chromatographie avec la protéine A. En effet, la protéine A provient de *Staphylococcus aureus* et fixe le fragment Fc. La fusion d'une région Fc avec n'importe quelle protéine d'intérêt permet donc de disposer d'un système de purification simple, performant et universel.
- L'interaction avec les récepteurs Fc et le complément (cf. § I.A.4). Les fonctions effectrices sont donc conservées et la demi-vie est plus courte pour les immunoadhésines allant jusqu'à 70 kDa correspondant au seuil d'élimination rénale, par comparaison avec un anticorps entier (Cuesta et al., 2010).

Selon le même principe, il est possible de réaliser la fusion d'un simple peptide au domaine Fc. Les protéines obtenues sont appelées peptibodies. Un peptibody a récemment reçu un agrément par la FDA (pour Food and Drug Administration) en 2008. Il s'agit du Romiplostim indiqué dans le traitement du Purpura Thrombopénique Idiopathique (Hall et al., 2010) (Tableau I-3).

I.B.3.b.6 Multispécificité et Multivalence

Afin d'augmenter le spectre de spécificité, des anticorps bispécifiques ont été produits. Cette bispécificité permet de reconnaître deux épitopes distincts sur un même antigène ou sur deux antigènes différents. La difficulté dans la production de ces anticorps réside dans l'association aléatoire des chaînes lourdes et légères, pouvant induire la production d'anticorps monospécifiques ou non fonctionnels. Cependant, par un procédé original, une équipe a réussi à obtenir des taux importants d'anticorps bispécifiques fonctionnels (Ruf and Lindhofer, 2001). Ces anticorps sont alors issus d'un quadrome qui est réalisé par la fusion de deux hybridomes (Lindhofer et al., 1995). L'élégance de ce travail tient du fait que les hybridomes proviennent de deux espèces différentes et expriment chacun un anticorps spécifique propre : une IgG2b de rat et une IgG2a de souris. Ainsi, lors de la synthèse de la protéine, les chaînes lourdes et légères d'une même espèce s'associent préférentiellement. Il y a alors statistiquement un anticorps sur trois qui est bispécifique avec un coté « rat » et l'autre « souris », contre un anticorps sur dix pour un quadrome obtenu avec des cellules d'une même espèce. Ces anticorps bispécifiques sont finalement trifonctionnels, leur partie Fc pouvant activer les mécanismes d'ADCC ou d'ADCP (cf. § I.A.4).

L'augmentation de la spécificité des anticorps est intéressante mais leur taille reste problématique, notamment pour des applications en imagerie ou en oncologie. Pour de telles applications, le format scFv est plus largement utilisé. En assemblant plusieurs scFv, la valence de la protéine obtenue est augmentée (diabodies, triabodies et tetrabodies, Figure I-13). Deux grandes méthodes sont utilisées :

- Des domaines d'oligomérisation existants dans des protéines naturelles peuvent être exploités pour induire une multivalence. A titre d'exemple, la fusion de domaines ZIP (leucine zipper) aux scFv permet leur dimerisation. De même le TNFα (tumor necrosis factor alpha) est une cytokine trimérique. Une fusion avec des scFv permet donc d'obtenir des tribodies (Cuesta et al., 2010).

- L'exploitation des liens peptidiques : Contrairement aux espaceurs des scFv monomériques qui présentent au moins 12 a.a. (permettant l'association des deux domaines V_L et V_H), les espaceurs des scFv multimériques font de 3 à 12 a.a. (Hudson and Kortt, 1999). Ces espaceurs plus courts limitent l'interaction entre domaines d'un même scFv. Les interactions entre les domaines se font donc entre les monomères de scFv différents. Ainsi, pour un diabody le domaine V_L d'un scFv va s'associer avec le domaine V_H de l'autre scFv et inversement. En augmentant la valence il est également possible de diversifier la spécificité. Un tétrabody est tétravalent. Il peut donc, par exemple, présenter une unique spécificité au niveau de ses 4 sites de liaison à l'antigène, ou être bispécifique (Kipriyanov et al., 1999), ou même atteindre, en théorie, la tétraspécificité.

La valence a une influence sur l'avidité. Pour rappel, l'affinité caractérise l'interaction paratope-épitope : elle implique des phénomènes d'attraction (ou d'association, définie par le k_{on}) et de répulsion (ou de dissociation, définie par le k_{off}), associés à une valence unique. L'affinité est définie par la relation $K_D = k_{off}/k_{on}$ et représente la concentration molaire nécessaire pour atteindre l'équilibre avec 50% des sites de liaisons occupés et 50% libres (Pathak and Palan, 2005). Dans le cas de protéines multivalentes comme les anticorps, qui sont au moins bivalents, on parle plutôt d'avidité qui tient compte de l'affinité propre à chaque site de liaison. L'avidité est aussi appelée affinité fonctionnelle. Il faut noter que la relation affinité/avidité n'est pas linéaire (Rudnick and Adams, 2009).

I.B.3.c Optimisation des anticorps

Afin d'exploiter au mieux les propriétés des anticorps et de leurs fragments dérivés, diverses stratégies ont été mises en place dans l'objectif d'optimiser la fonction visée, qu'elle soit portée par la région constante ou la région varible. Les localisations et la nature des modifications possibles sont réprésentées sur la figure I-14 et quelques exemples sont cités ci-après (pour revues : Strohl, 2009; Igawa et al., 2011) :

- La réponse induite par l'anticorps est dépendante de l'isotype de l'immunoglobuline. Une modification de l'isotype permet de moduler les réponses déclenchées par l'anticorps d'intérêt.
- La glycosylation joue un rôle important dans le recrutement des récepteurs Fc comme évoqué dans le chapitre I.A.5. Différentes optimisations peuvent découler de la manipulation des sites ou de la nature des glycosylations (fonctions effectrices, temps de demi-vie, taux d'expression ou encore affinité). A titre d'exemple, une modification au niveau du motif glycosylé en position Asn 297 affecte cette interaction et module les réponses effectrices. Shield et collaborateurs ont démontré qu'en l'absence de fucose, l'affinité avec le récepteur Fc est multipliée par un facteur 50, augmentant la cytotoxicité et donc l'efficacité de l'anticorps (Shields et al., 2002).
- Comme mentionné dans le chapitre I.B.2, les anticorps chimériques et humanisés réduisent l'immunogénicité (Hwang and Foote, 2005).
- La modification des régions variables au niveau du site de liaison (paratope) par mutagenèse dirigée ou aléatoire a des conséquences sur l'affinité de l'anticorps et/ou sa spécificité.

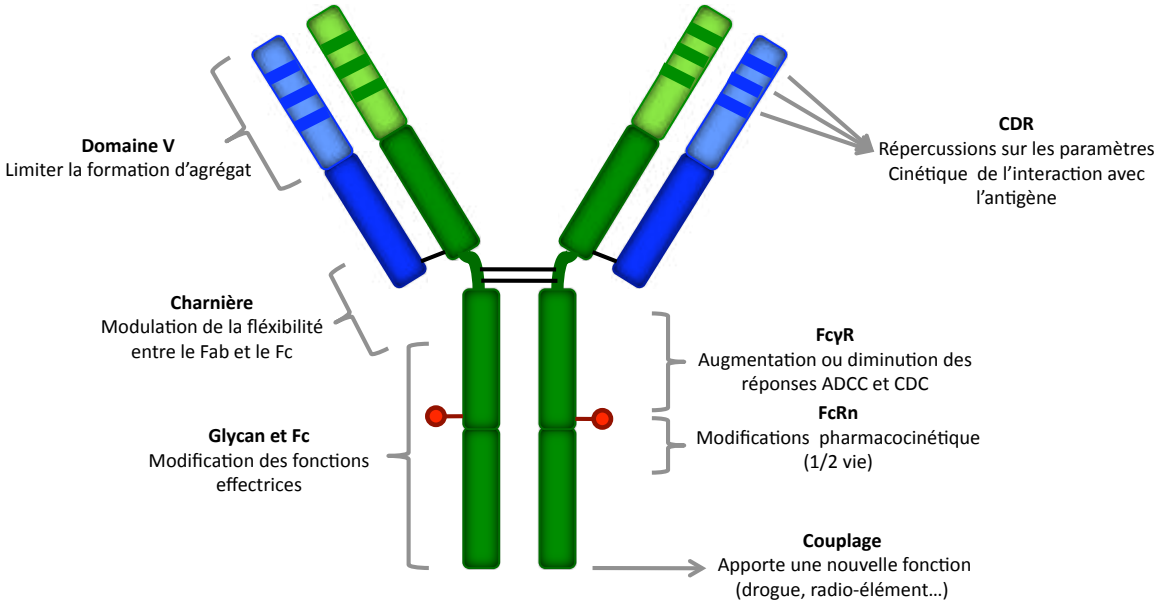


Figure I-14 : Optimisation des fonctions des anticorps.
Schéma représentant une liste non exhaustive des modifications permettant l'optimisation des anticorps. Ces modifications sont également possibles au niveau des fragments d'anticorps. Inspiré de Carter, 2006 et Beck et al., 2010.

L'ensemble des manipulations visant à optimiser les propriétés des anticorps font de ces protéines des outils efficaces et adaptables. Leur plasticité est à l'origine de leurs application tant en thérapie qu'en diagnostic. Le marché des anticorps thérapeutiques est aujourd'hui en pleine expansion.

I.B.4 Applications médicales des anticorps

Les anticorps sont utilisés dans de multiples domaines. Ils sont couramment utilisés en biotechnologie dans des tests de routine tels que la purification, les ELISA ou le Western-Blot. Dans le domaine médical, ils sont à la base de tests diagnostics pour détecter des infections ou des parasites. Des tests similaires sont également utilisés dans l'industrie pour déceler les contaminations dans l'alimentation ou l'environnement.

Il y a également une forte utilisation des anticorps, particulièrement de fragments dérivés, en imagerie. La clairance des anticorps est inversement proportionnelle à la taille des fragments (Rosebrough et al., 1988). Le bruit de fond, paramètre important en diagnostic ciblé par imagerie (Kelloff et al., 2005), s'en trouve alors modifié. En effet, l'utilisation d'un anticorps entier produit des images avec un fort bruit de fond car celui-ci présente une demi-vie sérique de plusieurs jours, alors que les petits fragments sont vite éliminés, permettant ainsi d'obtenir des images de qualité. Pour le diagnostic *in vivo* des tumeurs, le fragment diabody semble être le plus approprié avec un meilleur signal tumoral par rapport au bruit de fond (Cai et al., 2007). A titre d'exemple, des images obtenues par Wu et Senter en 2005 avec différents fragments d'anticorps radiomarqués sont présentées en figure I-15.

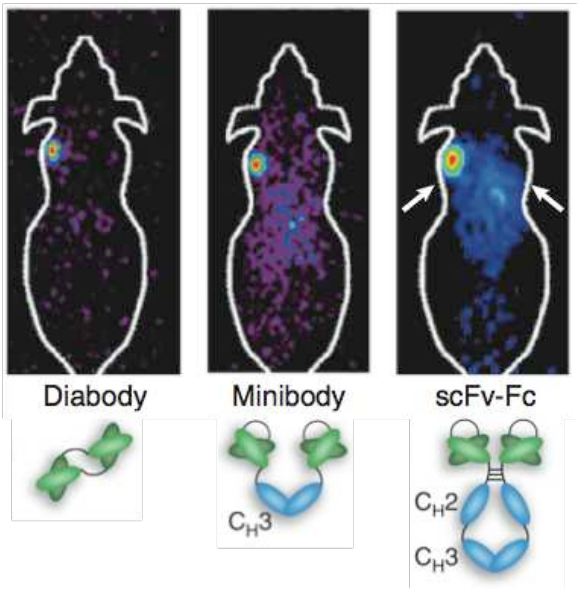


Figure I-15 : Fragments d'anticorps en imagerie

Images de scanner MicroPET de souris avec une tumeur, 18h après mise en contact avec un diabody, un minibody ou un scFv-Fc marqués à l'iode 124. D'après Holliger and Hudson, 2005 et Wu and Senter, 2005.

Mais l'utilisation la plus courante des anticorps à l'heure actuelle est dans le domaine de la thérapie, avec une première mise sur le marché d'un anticorps murin en 1986 (Muromonab-CD3). Les problèmes d'immunogénicité ont vite freiné l'enthousiasme initialement soulevé par l'utilisation de ces premiers anticorps thérapeutiques. Il faudra attendre 1994 pour qu'un anticorps chimérique moins immunogène l'Abciximab dirigé contre la glycoprotéine plaquetaire IIb-IIIa, obtienne un nouvel agrément de la FDA. L'arrivée d'anticorps humanisés et humains a permis d'agrandir l'arsenal d'anticorps thérapeutiques avec aujourd'hui plus d'une trentaine d'anticorps ou de formats dérivés ayant reçu un accord de mise sur le marché aux Etats-Unis et en Europe (Tableau I-3). Environ 350 anticorps ou dérivés sont actuellement en essais cliniques, dont 28 en phase III (Reichert, 2013).

Les fragments multivalents suscitent un intérêt particulier car les fonctions peuvent être multipliées. Les scFv bispécifiques BiTE (pour Bi-specific T cell Engagers) représentent un espoir très important dans le domaine de l'oncologie, en reconnaissant simultanément des récepteurs de la cellule tumorale et du lymphocyte T cytotoxique. Les avancées les plus remarquables ont été obtenues avec le Blinatumomab reconnaissant le CD3 sur le lymphocyte T, entraînant son activation, et le CD19 sur la cellule tumorale. La proximité créée permet au lymphocyte T de détruire la cellule tumorale par lyse cellulaire (Nagorsen and Baeuerle, 2011). De plus, ces travaux ont montré que les doses efficaces sont 10 000 fois inférieures à celles des anticorps classiques.

Tableau I-3 : Anticorps et dérivés approuvés pour un usage thérapeutique

Nom (nom commercial)	Format Classe ou sous-classe	Système de production	AMM	Domaine d'application
ANTICORPS MURINS (omab)				
Muromonab-CD3 (ORTHOCLONE OKT3®)	IgG2aκ	Hybridome	FDA 1986Ø *	Immunologie
Edrecolomab (PANOREX®)	IgG2aκ	Sp2/0	Alle 1995	Oncologie
Capromab (PROSTASCINT®)	IgG1κ	Nd	FDA 1996	Oncologie
Ibritumomab (ZEVALIN®)	IgG1κ	CHO	FDA 2002	Oncologie
Tositumomab (BEXXAR®)	IgG2aλ	Hybridome	FDA 2003	Oncologie
Catumaxomab (REMOVAB®)	IgG2aκ / G2bλ	Quadrome	EMA 2009	Oncologie
Besilesomab (SCINTIMUN®)	IgG1κ	Nd	EMA 2010	Ostéologie
ANTICORPS CHIMERIQUES (ximab)				
Abciximab (REOPRO®)	Fab (IgG1κ)	Sp2/0	FDA 1994	Cardiologie
Rituximab (RITUXAN®)	IgG1κ	CHO	FDA 1997	Oncologie
Basiliximab (SIMULECT®)	IgG1κ	Sp2/0	FDA 1998	Immunologie
Infliximab (REMICADE®)	IgG1κ	Sp2/0	FDA 1998	Immunologie
Cetuximab (ERBITUX®)	IgG1κ	Sp2/0	FDA 2004	Oncologie
Brentuximab vedotin (ADCETRIS™)	IgG1κ	CHO	FDA 2011	Oncologie
ANTICORPS HUMANISES (zumab)				
Daclizumab (ZENAPAX®)	IgG1κ	NS0	FDA 1997Ø	Immunologie
Palivizumab (SYNAGIS®)	IgG1κ	NS0	FDA 1998	Infectiologie
Trastuzumab (HERCEPTIN®)	IgG1κ	CHO	FDA 1998	Oncologie
Gemtuzumab (MYLOTARG®)	IgG4κ	NS0	FDA 2000Ø	Hématologie Oncologie
Alemtuzumab (CAMPATH®)	IgG1κ	CHO	FDA 2001	Hématologie Oncologie
Efalizumab (RAPTIVA®)	IgG1κ	CHO	FDA 2003Ø	Immunologie
Omalizumab (XOLAIR®)	IgG1κ	CHO	FDA 2003	Immunologie
Bevacizumab (AVASTIN®)	IgG1κ	CHO	FDA 2004	Oncologie
Natalizumab (TYSABRI®)	IgG4κ	NS0	FDA 2004	Immunologie
Nimotuzumab (THERACIM®)	IgG1κ	NS0	EMA 2004Ø	Oncologie
Ranibizumab (LUCENTIS®)	Fab (IgG1κ)	*E.coli*	FDA 2006	Ophtalmologie
Eculizumab (SOLIRIS™)	IgG2/4κ	NS0	FDA 2007	Hématologie
Certolizumab pegol (CIMZIA®)	Fab (IgG1κ)	*E.coli*	FDA 2008	Immunologie
Tocilizumab (ACTEMRA™)	IgG1κ	CHO	EMA 2009	Immunologie
Mogamulizumab (POTELIGEO®)	IgG1κ	Nd	MHLW 2012	Hématologie Oncologie
Pertuzumab (OMNITARG™)	IgG1κ	CHO	FDA 2012	Oncologie
ANTICORPS HUMAINS (umab)				
Nebacumab (Centoxin®)	IgMκ	Hybridome	EMA 1999Ø *	Infectiologie
Adalimumab (HUMIRA®)	IgG1κ	CHO	FDA 2002	Immunologie
Panitumumab (VECTIBIX™)	IgG2κ	CHO	FDA 2006	Oncologie
Canakinumab (ILARIS®)	IgG1κ	Sp2/0	FDA 2009	Immunologie
Golimumab (SIMPONI™)	IgG1κ	Sp2/0	FDA 2009	Immunologie
Ofatumumab (ARZERRA™)	IgG1κ	NS0	FDA 2009	Hématologie Oncologie
Ustekinumab (STELARA™)	IgG1κ	Sp2/0	EMA 2009	Immunologie
Denosumab (PROLIA®)	IgG2κ	CHO	FDA 2010	Ostéologie
Belimumab (BENLYSTA®)	IgG1λ	NS0	FDA 2011	Immunologie
Ipilimumab (YERVOY™)	IgG1κ	CHO	FDA 2011	Oncologie
Raxibacumab (ABthrax®)	IgG1λ	NS0	FDA 2012	Infectiologie
IMMUNOADHESINES (cept)				
Etanercept (ENBREL®)	TNFR-Fc(IgG1)	CHO	FDA 1998	Immunologie
Alefacept (AMEVIVE®)	LFA-3-Fc(IgG1)	CHO	FDA 2003	Immunologie
Abatacept (ORENCIA®)	CTLA4-Fc(IgG1)	CHO	FDA 2005	Immunologie
Rilonacept (ARCALYST™)	IL-1R-Fc(IgG1)	Nd	FDA 2008	Immunologie
Aflibercept (EYLEA®)	VEGFR-Fc(IgG1)	Nd	FDA 2011	Ophtalmologie
Belatacept (NULOJIX®)	CTLA-4-Fc(IgG1)	Nd	FDA 2011	Immunologie
PEPTIBODY				
Romiplostim (Nplate®)	Peptide (41 a.a.)-Fc(IgG1)	Nd	FDA 2008	Immunologie

*AMM : première autorisation de mise sur le marché ; FDA : Food and Drug Administration ; EMA : European Medicines Agency for the Evaluation of Medical Products ; MHLW : Japan Ministry of Health, Labour and Welfare ; Alle : approuvé en Allemagne ; Ø : retiré du marché ; * : agrément dans certains pays d'Europe. Le terme Immunologie est utilisé pour rassembler les rejets de greffes, l'arthrose, le psoriasis, l'asthme ou la sclérose en plaques. Sources : IMGT [1], Reichert, 2011 et Reichert, 2012.*

Malgré l'utilisation des anticorps dans de multiples domaines, la complexité de cette protéine (hétérotétramère, ponts disulfures, glycosylations…) a poussé les recherches vers des architectures alternatives. A l'aide d'outils, comme la présentation sur phages, de nouveaux candidats disposant d'une forte affinité pour une cible on été sélectionnés. Certaines de ces nouvelles structures sont décrites dans le paragraphe suivant.

I.B.5 Alternatives aux anticorps

Il existe aujourd'hui près de 50 nouvelles structures sélectionnées pour leur potentiel de liaison à une cible (Gronwall and Stahl, 2009). Elles ont une taille plus petite que les anticorps allant de 4 à 100 kDa (Wurch et al., 2008) et sont composées d'une chaîne polypeptidique unique. Ces caractéristiques rendent plus aisées les productions dans des systèmes procaryotes, qui restent mieux maîtrisés et plus simples à mettre en place que les systèmes eucaryotes, et qui permettent en outre d'obtenir de forts rendements.

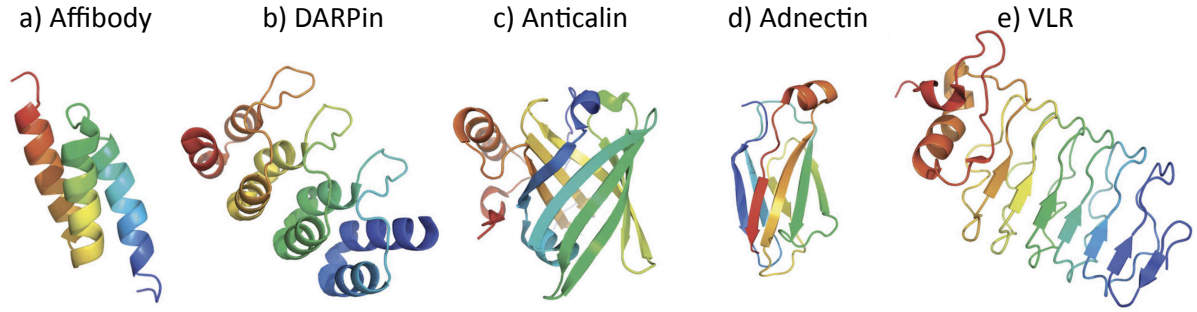


Figure I-16 : Structure des charpentes protéiques non dérivées des immunoglobulines
Structures cristallographiques illustrant la diversité de structures des protéines alternatives « de liaison ». a) affibody (PDB 2B88); b) DARPin (PDB 2JAB); c) anticalin (PDB 1LNM); d) adnectin : FN3 (PDB 2OCF) et e) lamprey variable lymphocyte receptor (PDB 2O6R).
Source : Nuttall and Walsh, 2008.

I.B.5.a Les Affibodies

L' « affibody » est une protéine de 58 a.a. qui dérive du domaine B de la protéine A du *Staphylococcus* (Nygren, 2008). Ce domaine est capable de fixer la région Fc des anticorps (Moks et al., 1986). La structure s'organise en 3 hélices alpha (hélice-α) dans lequelles 13 a.a. répartis sur les hélices 1 et 2, impliqués dans l'interaction, peuvent apporter de la diversité (Figure I-16). Les affibodies ont un avenir prometteur en thérapie ou en imagerie (Figure I-17) et des essais cliniques sont en cours (Gronwall and Stahl, 2009; Lofblom et al., 2011).

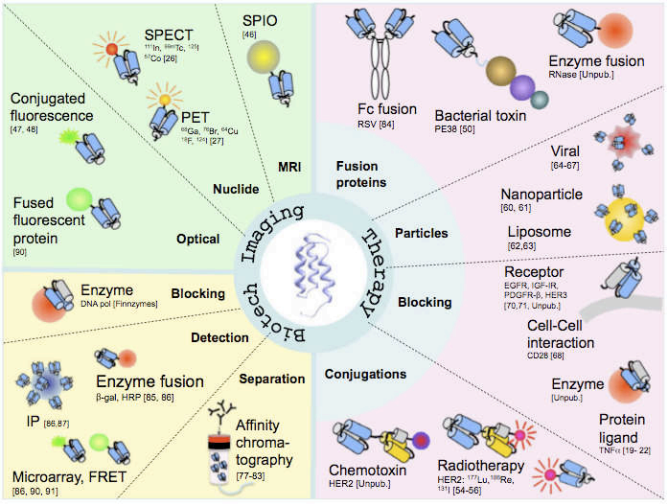


Figure I-17 : Les Affibodies

Vue d'ensemble du potentiel des affibodies dans les domaines de la biotechnologie, de l'imagerie et de la thérapie. Les deux hélices impliquées dans l'interaction avec les cibles sont représentées en bleu.
Source : Lofblom et al., 2010.

I.B.5.b Les DARPins

Les DARPins (pour Designed Ankyrin Repetition Proteins) sont des protéines avec plusieurs répétitions de 33 a.a. formant des hélices α et aboutissant à une structure stable (Figure I-16). Dans cette structure la diversité est apportée par 7 des 33 a.a. du domaine répété.

I.B.5.c Les Anticalines

Les anticalines sont structurées en un tonneau de feuillets β exposant 4 boucles (Figure I-16), conférant une possible diversité. L'utilisation en thérapeutique est envisagée notamment en cancérologie ou en immunothérapie où des essais cliniques ont débuté (Skerra, 2008).

I.B.5.d Les Adnectines

C'est avec l'affibody la structure alternative aux anticorps la plus étudiée. La structure est basée sur un domaine de fibronectine de type III (FN3) de 94 a.a. possédant des homologies avec les domaines des immunoglobulines, notamment la présence de feuillets β reliés par des boucles (Figure I-16). Ces boucles sont utilisées comme source de la diversité (Gronwall and Stahl, 2009). Une Adnectin, le CT-322 qui est spécifique du VEGFR-2, est actuellement en cours d'essais cliniques (phase II) (Tolcher et al., 2011).

I.B.5.e Les VLR et autres structures

Une autre structure a récemment été proposée comme alternative aux anticorps : il s'agit des VLR (pour Variable Lymphocyte Receptors). A la différence des protéines présentées précédemment, le VLR que l'on retrouve chez la lamproie, possède déjà des propriétés de reconnaissance puisque c'est un récepteur lymphocytaire. Une grande diversité existe (répertoire potentiel de 10^{14} récepteurs VLR différents) et de façon surprenante, celle-ci est le résultat d'une recombinaison génique comparable à celle des immunoglobulines dans les

lymphocytes B (Pancer and Mariuzza, 2008) même si chez les lamproies ce phénomène est RAG-indépendant (Saha et al., 2010).

La maturation de l'affinité de ces nouveaux outils est classiquement réalisée par mutagénèse dirigée suivie d'une sélection par présentation sur phage par exemple (Skerra, 2003; Rothe et al., 2006).

Enfin, plus récemment de nouvelles structures novatrices ont vu le jour. Ces structures sont basées sur des molécules chimiques ou biochimiques, plus stables que les protéines et ne nécessitant pas de système d'expression coûteux pour leur production :

- Les aptamères : il s'agit d'oligonucleotides de taille comprise en général entre 15 et 60 nt (soit entre 5 à 20 kDa). La séquence peut être d'origine ARN (Acide ribonucléique) ou ADNsb (acide désoxyribonucléique simple brin) ce qui présente l'avantage d'une faible immunogénicité. L'affinité des aptamères est de l'ordre du nanomolaire, ce qui est comparable à ce que l'on retrouve chez les anticorps (Jenison et al., 1994). Les travaux sur cette structure ont abouti en 2004 à un agrement par la FDA pour une utilisation thérapeutique d'un aptamère interagissant avec plusieurs isoformes du VEGF, le *Pegaptanib*. Actuellement, cinq autres aptamères sont en phase d'essai clinique (Thiel and Giangrande, 2009).
- Les MIPs (pour Molecular Imprinted Polymers) sont des polymères synthétisés en présence d'une cible moléculaire qui sera extraite en fin de processus. Le polymère possède donc des cavités susceptibles de reconnaître la molécule utilisée lors de sa polymérisation (Dickey, 1949). Les composants des MIP n'ont aucune origine biologique, ce qui leur confère une très grande stabilité (Tableau I-4). Des équipes se sont intéressées à ce matériau pour créer des anticorps « en plastique », dont le premier exemplaire fut obtenu en 1993 (Vlatakis et al., 1993).

Le tableau I-4 présente les principales caractéristiques des différents outils de liaison décrits. L'utilisation de ces nouveaux outils est envisagée dans tous les secteurs utilisant aujourd'hui des anticorps, à l'exception des mécanismes exploitant les fonctions effectrices des anticorps (Gebauer and Skerra, 2009; Gronwall and Stahl, 2009).

Tableau I-4 : Comparaison des propriétés des anticorps et quelques protéines alternatives

	Anticorps	Protéines non-Ig	Aptamères (ARN ou ADN simple brin)	MIP
Taille (kDa)	150-160	<30	5-20 (de 15 à 60 nt)	Variable
Sélection	*In vivo*	*In vitro*	*In vitro*	*In vitro*
Production	Animal ou système recombinant	Système recombinant	Synthétique	Synthétique
Stabilité	Plusieurs semaines à 4°C	Variable	ADN: plusieurs années à T° ambiante ARN: plusieurs mois à -80°C	Plusieurs années à T° ambiante
Demi-vie	De jours à semaines	Variable	Quelques secondes à quelques minutes (sans modifications)	Variable

D'après Ruigrok et al., 2011.

Finalement, parmi l'ensemble des structures qui viennent d'être présentées, laquelle peut on désigner comme l'outil de liaison par excellence ? En fait il n'y a pas de réponse unique. On peut considérer que toutes ces structures font partie d'une boîte à outils dans laquelle il est possible de choisir la protéine la plus adaptée à l'application visée.

Alors que la recherche avance dans le développement de nouvelles structures de liaison, des découvertes sont faites au sein même de la famille des immunoglobulines. En effet, dans les années 1980, une nouvelle classe d'anticorps est mise en évidence. Ces anticorps, en plus de la liaison, sont dotés de capacités catalytiques.

I.C Le cas particulier des anticorps catalytiques

Enzymes et anticorps reconnaissent des cibles avec une grande affinité. Alors que les anticorps établissent des interactions réversibles avec des antigènes ou haptènes, les enzymes reconnaissent un substrat et catalysent une réaction chimique pour relarguer un produit de réaction. Dans les années 1980, des chercheurs se sont lancé le défi de créer des anticorps doués de catalyse.

Les paragraphes suivants relatent l'histoire des anticorps catalytiques, régie par les avancées chimiques et biotechnologiques.

I.C.1 Genèse d'anticorps catalytiques : la voie des TSA

A la fin des années 1940, Pauling postule que les enzymes reconnaissent préférentiellement l'état de transition d'une réaction plutôt que le substrat lui-même. L'état de transition est hautement énergétique et par définition très instable. L'interaction avec une enzyme permet d'abaisser la barrière énergétique de la réaction et par conséquent d'en assurer la catalyse (Figure I-18). Ainsi, un anticorps reconnaissant spécifiquement un état de transition devrait, tout comme une enzyme, catalyser la réaction qui lui est associée (Pauling, 1948).

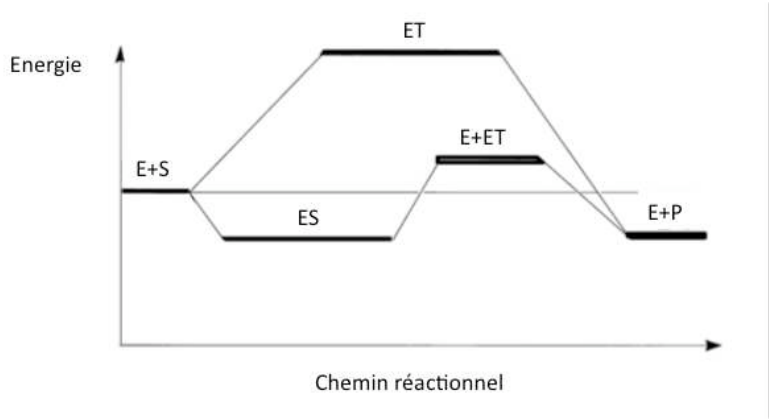


Figure I-18 : Schéma énergétique du processus catalytique
E : enzyme ; S : substrat ; P : produit ; ET : état de transition

Une vingtaine d'années plus tard, Jencks propose d'utiliser des analogues d'états de transition comme immunogènes pour générer ces anticorps (Jencks, 1969). Il s'agit de molécules dont la structure est à la fois stable et proche des états de transition, comme illustré dans la figure I-19. Mais il faudra attendre quelques années encore, et en particulier la mise en place de la technologie des hybridomes (Kohler and Milstein, 1975) et les avancées en chimie permettant la synthèse d'analogues stables de transition (Wolfenden, 1969), pour que des anticorps à activité catalytique soient caractérisés dans deux équipes simultanément. L'équipe de Lerner obtient un abzyme catalysant l'hydrolyse de liaisons esters (Tramontano et al., 1986), et celle de Schultz un abzyme catalysant l'hydrolyse de liaisons carbonates (Pollack et al., 1986). Cette voie de genèse d'anticorps catalytiques a ouvert la possibilité de réaliser des réactions pour lesquelles il n'existe pas de catalyseur naturel, comme la réaction de Diels-Alder (Gouverneur et al., 1993).

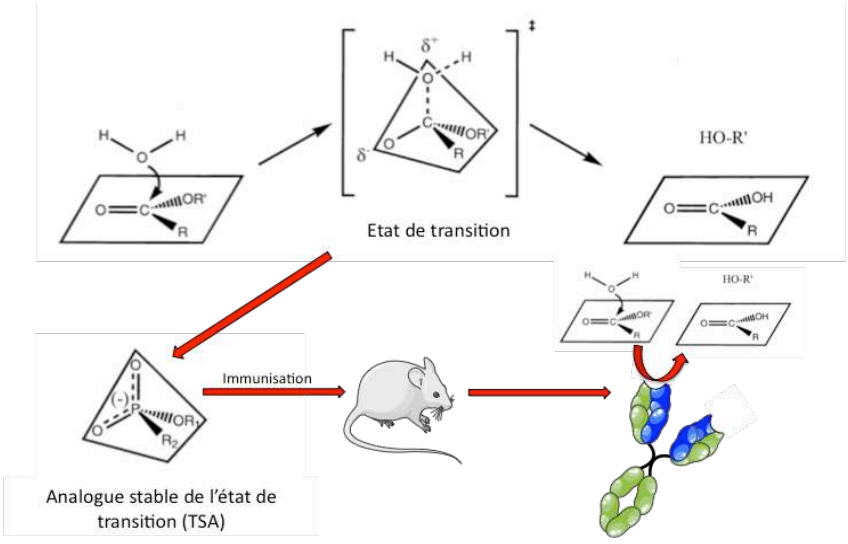


Figure I-19 : La voie des TSA
Genèse d'un anticorps catalytique capable d'hydrolyser une liaison ester

Par la suite, d'autres méthodes chimiques d'obtention d'anticorps catalytiques ont été développées (pour revues : Tellier, 2002; Mahendra et al., 2012) :

- La méthode des puits entropiques : elle repose sur la diminution de la barrière entropique (liée à l'ordre d'un système) pour orienter les partenaires de réaction dans une configuration particulière, favorisant la réaction vers la formation du produit. Cette méthode a permis de générer des anticorps catalysant des réactions d'isomérisation (Hilvert et al., 1988) et de Diels Alder (Romesberg et al., 1998).
- L'approche Bait and Switch consiste à utiliser des haptènes chargés afin de générer des anticorps avec des a.a. portant la charge opposée (Janda, 1990). La réaction ciblée peut être catalysée par le transfert de charges des a.a. du site actif de l'anticorps vers le substrat. L'équipe de Tellier a ainsi obtenu un anticorps à activité isomérase (Goncalves et al., 2000).
- L'immunisation réactive : il s'agit de la méthode la plus récente, basée sur l'immunisation par des haptènes chimiquement réactifs, suceptibles d'induire une liaison covalente avec l'anticorps produit (Wirsching et al., 1995). La sélection n'est plus basée sur l'affinité, mais sur la réactivité chimique. Les anticorps ainsi produits ont des K_M plus élevés que ceux obtenus par les voies exploitées précédemment, et des activités catalytiques plus proches des enzymes (Tanaka and Barbas, 2002). L'exploitation de cette méthode a permis de générer des anticorps à activité aldolase (Barbas et al., 1997).

I.C.2 Genèse d'anticorps catalytiques : exploitation du réseau idiotypique

Une autre méthode de genèse d'anticorps catalytiques par exploitation du réseau idiotypique a été décrite et est illustrée figure I-20. C'est une approche biologique qui fait intervenir la notion « d'image interne » (Jerne, 1974). A partir d'un anticorps de première génération (Ab1) dont l'idiotype est dirigé contre un antigène donné, une deuxième génération d'anticorps peut être obtenue, au sein de laquelle existeront des anticorps Ab2 anti-idiotypes de l'Ab1. D'après ce principe, si l'antigène de départ est une enzyme, il est possible d'obtenir des anticorps Ab2, images internes du site actif de cette enzyme. Ces Ab2 anti-idiotypes peuvent potentiellement être catalytiques puisque leurs paratope mime le site actif de l'enzyme.

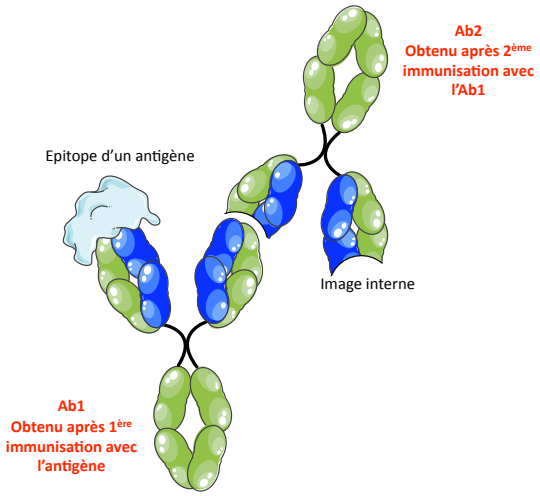


Figure I-20 : Genèse d'anticorps anti-idiotypes par exploitation du réseau idiotypique

Dans cette stratégie, une enzyme est donc utilisée comme immunogène. Concrètement, les souris immunisées produisent des Ab1, parmi lesquels est sélectionné un anticorps pouvant reconnaître et inhiber le site actif de l'enzyme. Cet Ab1 est à son tour utilisé comme immunogène lors de l'immunisation d'une autre souris qui produit des Ab2 dirigés contre l'Ab1. Parmi les Ab2 dirigés contre les idiotopes des Ab1, certains peuvent être doués de la capacité de catalyse de l'enzyme de départ.

D'autres méthodes biologiques d'obtention d'anticorps catalytiques ont également été développées :

- A partir d'un inhibiteur protéique : dans cette méthode, une protéine agissant comme un inhibiteur compétitif d'une enzyme cible est utilisée comme immunogène. Contrairement à la stratégie précédente, la possibilité d'obtenir des anticorps catalytiques se fait donc en une seule étape d'immunisation. C'est ainsi que l'équipe de Tellier a réussi à obtenir des anticorps à activité amylase (Goncalves et al., 2002). L'avantage de l'inhibiteur est qu'il permet d'accéder aux sites actifs enfouis de certaines enzymes.

- A partir d'une banque d'anticorps isolée d'un individu (murin ou humain, et malade ou sain). Cette banque de protéines, exprimée à la surface d'un phage, permet d'effectuer une sélection soit avec le substrat, soit avec l'inhibiteur de l'enzyme de la réaction que l'on souhaite cibler. Par cette approche l'équipe de Barbas a ainsi obtenu deux fragments d'anticorps à activité β-lactamase, les scFv FT6 et FT12, en utilisant le sulfone péname (inhibiteur suicide de la β-lactamase) comme cible de la sélection (Tanaka et al., 1999).

Une association de ces techniques est réalisable. Récemment, une équipe a générée un anticorps catalytique avec une activité alliinase, en exploitant le réseau idiotypique d'un chameau suivi d'une sélection par présentation sur phage du format VHH des anticorps obtenus (Li et al., 2012). La flexibilité de ce format notamment au niveau de la boucle 3 du CDR3 (cf. § I.B.3.b.3) pourrait faciliter le mimétisme du site actif par comparaison avec un anticorps conventionnel.

Une liste non exhaustive des anticorps doués de catalyse générés par ces différentes stratégies est présentée dans le tableau I-5.

Tableau I-5 : Présentation de quelques anticorps à activité catalytique

Nom de l'abzyme	Format Classe ou sous-classe	Activité	Origine
EXPLOITATION DE LA VOIE DES TSA			
43c9	Nd	Amidase	Souris
312D6	IgG2a	Amidase	Souris BALB/c
17E8	IgG2b	Estérase	Souris
CNJ206	IgG2a	Estérase	Souris BALB/c
48G7	IgG	Estérase	Souris BALB/c
7C8	scFv dérivant d'une IgG1	Estérase	Souris BALB/c
D2.3	IgG2a	Estérase	Souris BALB/c
6D9	IgG1	Estérase	Souris BALB/c
39A11	IgG	Diels Alder	Souris
1E9	IgG1	Diels Alder	Souris
9D9	IgG2a	Diels Alder	Souris
13G5	IgG1	Diels Alder	Souris
21D8	IgG1	Décarboxylase	Souris 129 GIX$^+$
15A9	IgG1	Transaminase	Souris
EXPLOITATION DU RESEAU IDIOTYPIQUE			
6B8E12	IgG	Protéase	Souris BALB/c
9G4H9	IgG2b	β-lactamase	Souris Biozzi
9A8	Fab dérivant d'une IgM	Estérase	Souris Biozzi
IMMUNISATION AVEC LA CIBLE			
Anti-VIP	LC dérivant d'une IgG	Peptidase	Souris BALB/c
ECL2B	LC dérivant d'une IgG1	Peptidase	Souris BALB/c
i41-7	IgG1	Peptidase	Souris BALB/c
HpU-18-L	LC dérivant d'une IgG1	Peptidase	Souris BALB/c
HpU-9-L	LC dérivant d'une IgG1	Peptidase	Souris BALB/c
HpU-2-H	HC dérivant d'une IgG1	Peptidase	Souris BALB/c
UA15-L	LC dérivant d'une IgG1	Peptidase	Souris BALB/c
c23.5	LC dérivant d'une IgG	Protéase	Souris BALB/c
41S-2-L	LC dérivant d'une IgG2b	Protéase	Souris BALB/c
H11	Nd	Diels Alder	Souris BALB/c
3D8	IgG	DNase	Souris autoimmunes
Ig 521	IgG	DNase	Souris BALB/c
SELECTION A PARTIR D'UNE BANQUE PRESENTEE SUR PHAGES			
DM508 DM408	scFv, Nd	Peptidase	Patients humains autoimmuns
VL^2-t 2E6 VLt-5D3	VL hétérodimère, Nd VL monomère, Nd	Peptidase	Origine humaine
hk14	Nd	Protéase	Patients humains asthmatiques
FT6 FT12	scFv, Nd	β-lactamase	Souris BALB/c
3F1	scFv, Nd	Estérase	Souris immunisées avec un TSA
IMMUNISATION REACTIVE			
scFv E6 scFv E11	scFv dérivant d'une IgG	Peptidase	Souris autoimmunes
ISOLEMENT			
Yvo	Fab dérivant d'une IgM	Peptidase	Patients atteints de macroglobulinémie de Waldenström

TSA : Analogue stable d'état de transition ; LC : chaîne légère ; HC : Chaîne lourde ; scFv : single chain fragment variable ; Nd : isotype non determiné. Source : Le Minoux et al., 2012

Dès 1989 et de façon étonnante, l'existence d'anticorps catalytiques naturels, c'est-à-dire obtenus sans immunisation volontaire, fut démontrée. La génération d'abzymes artificiels a donc précédé la découverte d'abzymes naturels.

I.C.3 Anticorps catalytiques « naturels »

La première découverte d'anticorps à activité catalytique dans le sérum d'individus n'ayant subi aucune immunisation dans le but de les générer, est attribuable à Paul en 1989 (Paul et al., 1989). Depuis, d'autres anticorps catalytiques ont été décrits, que ce soit en conditions saines ou pathologiques. Les principaux anticorps catalytiques décrits dans la littérature en conditions physiologiques sont présentés dans le tableau I-6.

Tableau I-6 : Anticorps catalytiques « naturels »

Pathologie ou condition	Activité	Références
EFFET DELETERE		
Asthme	**Protéase**	**(Paul et al., 1989)**
*** Lupus érythémateux disséminé**	**Protéase, DNase, RNase**	**(Shuster et al., 1992)**
Myélome multiple	**Protéase**	**(Matsuura et al., 1994)**
*** Sclérose en plaque**	**Protéase, DNase, RNase, amylase**	**(Ponomarenko et al., 2002)**
EFFET BENEFIQUE		
Femmes en lactation	DNase, RNase, amylase, phosphorylation	(Kanyshkova et al., 1997; Kit et al., 1996; Nevinsky and Buneva, 2002)
Individus sains	Protéase (gp120)	(Paul et al., 2005)
Septicémie	**Protéase**	**(Lacroix-Desmazes et al., 2005)**
Néphropathie chronique aiguë	**Protéase**	**(Wootla et al., 2008b)**
Alzheimer	**Protéase**	**(Taguchi et al., 2008)**
EFFET NON DETERMINE OU CONTROVERSE		
*** Thyroïdite de Hashimoto**	**Protéase, DNase**	**(Li et al., 1995)**
*** Hémophilie acquise**	**Protéase**	**(Wootla et al., 2008a)**
Individus sains	Protéase	(Kalaga et al., 1995)

Les états pathologiques sont en gras et une astérisque précise lorsque c'est un contexte auto-immun.

En condition pathologique, on remarque que les abzymes sont fréquemment associés à un contexte auto-immun. Shuster est le premier à établir un lien entre les abzymes et les maladies auto-immunes. Il met en évidence des anticorps portant une activité DNase dans le cadre du Lupus érythémateux disséminé (Shuster et al., 1992). Par la suite, les travaux de Tawfik montrent également ce lien. En effet des souris sensibles à une maladie auto-immune immunisées avec un TSA surexpriment des abzymes (Tawfik et al., 1995). Ces travaux indiquent un lien entre l'autoimmunité et la présence d'anticorps catalytiques, sans apporter pour autant de réponse quant à leur origine et leur rôle, questions qui restent à ce jour largement ouvertes.

Par ailleur, que se soit dans un contexte auto-immun ou sain, le rôle des anticorps catalytiques n'est toujours pas déterminé. Leur présence peut avoir avoir un effet négatif ou positif (Belogurov et al., 2009) (Tableau I-6).

I.C.4 Exploitation du potentiel des anticorps catalytiques

Les abzymes représentent un nouvel outil dans le domaine de la thérapie. Leur capacité de catalyse, associée à leur fonction de reconnaissance, permet d'envisager de nombreuses utilisations (pour revue : Hanson et al., 2005) :

- Protection contre le VIH par un clivage de la protéine gp120 localisée sur l'enveloppe du virus et impliquée dans son internalisation par les cellules cibles (Planque et al., 2008; Zhou et al., 2002).
- Lutte contre la maladie d' Alzheimer par l'élimination des agrégats des peptides amyloïdes (Taguchi et al., 2008).
- Lutte contre l'addiction par la dégradation de la nicotine (Dickerson et al., 2004) ou la cocaïne (Treweek and Janda, 2012).
- Application en oncologie avec l'adaptation du système ADEPT (pour Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy). Cette stratégie à été nommée ADAPT (pour Antibody Directed Abzyme Prodrug Therapy) (Nishi, 2003). Cette approche est basée sur l'utilisation d'un anticorps bispécifique impliquant une fonction de catalyse et une fonction de reconnaissance spécifique des cellules tumorales. Elle permet de convertir une pro-drogue en agent toxique pour la cellule tumorale cible (Figure I-21).

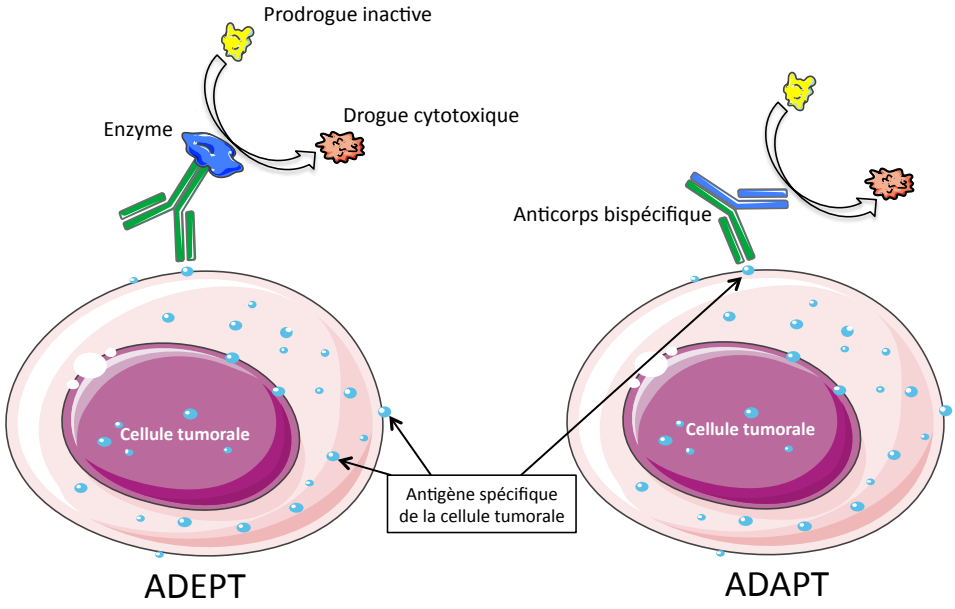


Figure I-21 : De l'ADEPT à l'ADAPT

Dans l'ADEPT, l'anticorps spécifique à un antigène de cellules tumorales est couplé à une enzyme. Dans l'ADAPT, l'anticorps utilisé est bispécifique : un bras de l'anticorps (en vert) reconnaît l'antigène tumoral, l'autre coté (en bleu) porte l'activité catalytique. Inspiré de Tellier, 2002.

Ces applications potentielles justifient la volonté des équipes à optimiser l'activité des abzymes. Parmi les stratégies développées, une augmentation des l'activité (k_{cat}) peut être atteinte par évolution dirigée en phage display (Takahashi et al., 2001). Des travaux ont

montré une augmentation du rapport k_{cat}/K_M jusqu'à 10^3 par rapport à l'abzyme de départ (Cesaro-Tadic et al., 2003).

Potentialiser l'activité des abzymes est un point clé pour exploiter leurs propriétés dans le domaine de la santé. Mais cela n'apporte pas pour autant d'information supplémentaire quant à leur rôle métabolique. Identifier leurs origines et leurs effets positifs ou négatifs dans le cadre des pathologies pourrait permettre de mieux les utiliser (si leur rôle est bénéfique) ou de les neutraliser (si leur rôle est néfaste).

I.C.5 Comprendre la complexité des anticorps catalytiques

Mieux comprendre le rôle et l'origine des anticorps catalytiques permettrait de mieux les maîtriser, voire même les exploiter.

Afin d'apporter des données sur l'origine des anticorps catalytiques, notre équipe vient de mener une étude génétique en utilisant les outils de la banque de données de l'IMGT [1]. Les résultats montrent que les anticorps catalytiques seraient plus fréquemment codés par des gènes rares que ne le sont les anticorps de liaisons. En outre, les séquences codant pour les anticorps catalytiques sont globalement peu mutées (Le Minoux et al., 2012). Les phénomènes de maturation propres à la réponse immunitaire ne sont donc pas favorables à l'acquisition de la fonction catalytique. Cette conclusion est en accord avec l'observation d'une diminution d'anticorps catalytiques lors de processus d'immunisations répétés (Tawfik et al., 1995). Ceci serait la conséquence d'une sélection des lymphocytes B avec une plus forte affinité au détriment de l'activité catalytique.

Kalaga et Tawfik ont également qualifié les anticorps catalytiques d'anticorps polyréactifs, c'est-à-dire capables d'hydrolyser plusieurs substrats. Mais y a-t-il une origine commune entre les anticorps catalytiques et les anticorps polyréactifs ? Il s'avère que les anticorps polyréactifs sont également très proches de la lignée germinale (Mouquet and Nussenzweig, 2012). Ils possèdent de faibles affinités (K_D 10^{-3}-10^{-7} M) contrairement aux anticorps monospécifiques (K_D 10^{-7}-10^{-11} M) produits d'un processus de sélection des lymphocytes B antigène dépendant (Mouquet and Nussenzweig, 2012; Nakamura et al., 1988). Bouvet émet l'hypothèse que les anticorps polyréactifs seraient le vestige d'un système immunitaire primitif et que l'évolution aurait abouti à la diversité et à la spécificité des anticorps actuels (Bouvet and Fischetti, 1999). Ces observations montrent des caractéristiques proches entre les anticorps polyréactifs et les anticorps catalytiques souvent décrits comme polyréactifs.

Une capacité de catalyse faible, une origine de leur présence méconnue, des effets contradictoires et un rôle indéterminé sont des caractéristiques propres aux anticorps catalytiques et justifient les études en cours, impliquant le développement de nouveaux outils.

Notre laboratoire s'intéresse à la mise en place de ces outils afin de mieux comprendre le rôle, l'origine et les propriétés des anticorps catalytiques. C'est dans ce cadre que l'étude de l'anticorps catalytique 9G4H9 présentée dans ce manuscrit a été mise en place.

I.D L'anticorps 9G4H9 comme modèle d'étude des anticorps catalytiques

Notre laboratoire est à l'origine de l'exploitation du réseau idiotypique pour la genèse des anticorps catalytiques.

- Un anticorps à activité estérase a d'abord été produit, l'anticorps 9A8. Il a été généré grâce à un anticorps inhibiteur de l'acétylcholinestérase AE-2 (Izadyar et al., 1993; Kolesnikov et al., 2000).
- Deux anticorps à activité protéase ont été générés à partir de la subtilisine Carlsberg (Pillet et al., 2002; Ponomarenko et al., 2007) : l'anticorps 1C5C2 présentant une activité de type endopeptidase, et l'anticorps 6B8E12 caractérisé par une activité aminopeptidase.
- Enfin, l'anticorps 9G4H9 est un anticorps doué d'une activité de type β-lactamase (Avalle et al., 1998).

L'anticorps 9G4H9 est celui qui a été le plus étudié au laboratoire, et nous l'utilisons à ce titre comme modèle d'étude des anticorps catalytiques. Les propriétés de cet abzyme sont présentées dans les chapitres qui suivent.

I.D.1 Choix de l'activité β-lactamase et construction du scFv 9G4H9.

La découverte des antibiotiques a révolutionné le monde de la médecine. Les β-lactamines sont des antibiotiques contenant un noyau β-lactame. Cette famille d'antibiotiques regroupe quatre grands membres, les Penams, les Cephem, les Monobactames et les Carbapenems (Figure I-22), ainsi que les inhibiteurs des β-lactamases tels que l'acide clavulanique par exemple. Les β-lactamines neutralisent les bactéries $Gram^-$ par l'inhibition de la synthèse de leur paroi en ciblant les PBPs (pour Penicillin Binding Protein). Pour résister à ces antibiotiques, les bactéries ont développé trois types de défense (Babic et al., 2006) : (1) la production de PBPs modifiées, moins sensibles aux antibiotiques ; (2) la production de β-lactamases, enzymes ciblant le cycle β-lactame, et enfin (3) la diminution ou la suppression de protéines de la membrane externe, les OMPs (pour Outer Membrane Proteins), afin de limiter l'entrée des antibiotiques dans l'espace périplasmique.

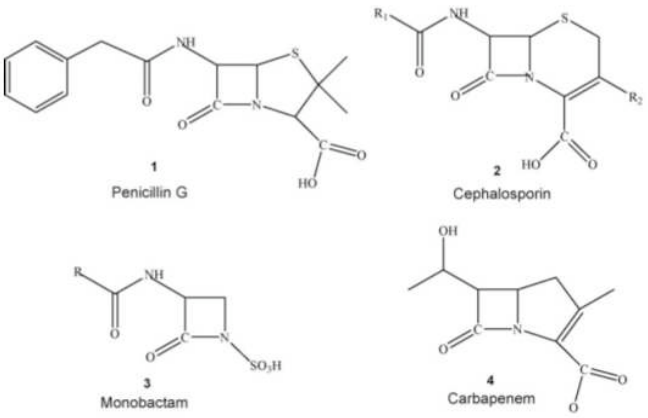


Figure I-22 : Les principales β-lactamines
Source : Babic et al., 2006

Il existe à ce jour plus de 200 β-lactamases différentes, classées en 4 grands groupes en fonction de caractéristiques fonctionnelles et structurales (Bush, 2010) , de la classe A à la classe D. Le mécanisme catalytique des β-lactamases repose généralement sur le rôle principal d'une sérine active, à l'exception de la classe B qui nécessite l'intervention d'un ion métallique bivalent (principalement le zinc) pour hydrolyser le cycle β-lactame. Cette dernière classe est donc dite métallo-dépendante.

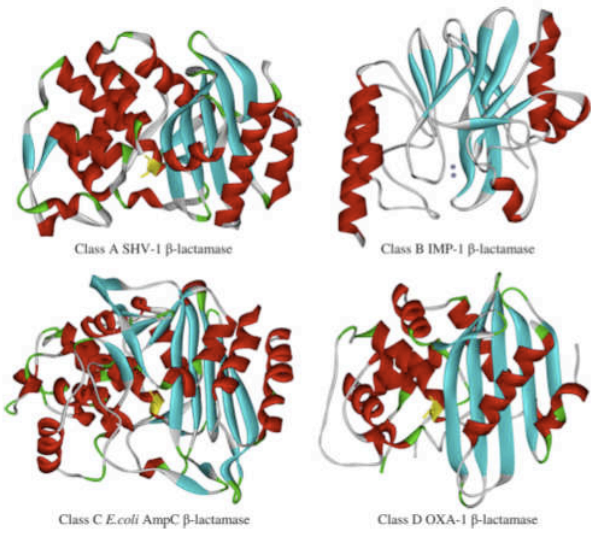


Figure I-23 : Structure tridimentionelle de β-lactamases issues des 4 classes différentes
La sérine active est représentée en jaune pour les classe A,C et D et la position des 2 ions Zn^{2+} est matérialisée par les deux points gris pour la classe B. Source : Drawz and Bonomo, 2010.

L'activité β-lactamase a été choisie pour générer l'anticorps 9G4H9 dans notre laboratoire, obtenu au cours des travaux de thèse de B. Bihan-Avalle (Avalle et al., 1998). La β-lactamase A de *Bacillus cereus*, dont le mécanisme d'hydrolyse est présenté dans la figure I-24, a été utilisée pour immuniser des souris. L'activité de cette enzyme présente l'avantage d'être très bien décrite. De plus, l'activité β-lactamase est exclusivement bactérienne. Ainsi, une activité

β-lactamase retrouvée dans le sérum d'une souris ne peut provenir d'une protéine endogène murine, ce qui permet de lever toute suspicion d'une éventuelle contamination.

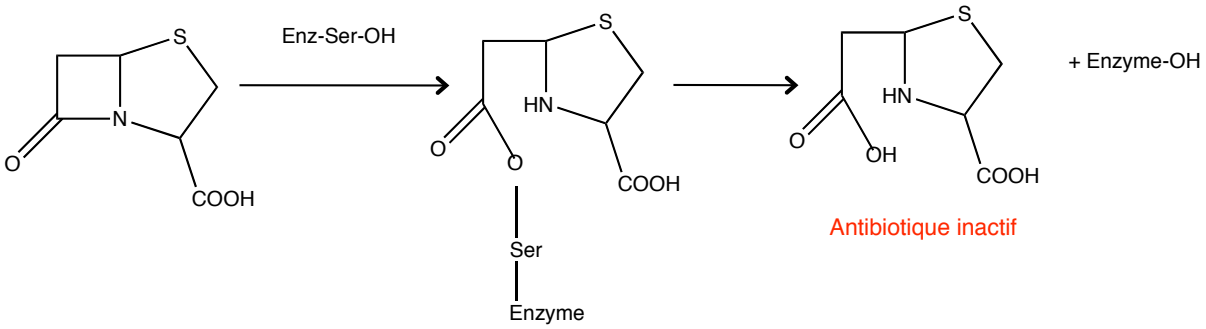


Figure I-24 : Mécanisme général sérine dépendant d'hydrolyse d'une β-lactamine par une β-lactamase

Selon le principe énoncé dans le chapitre I.C.2 et en réponse à l'immunisation, les souris ont produit une première génération d'anticorps. Parmi ces Ab1, une sélection a permis d'isoler un anticorps nommé 7AF9, reconnaissant et inhibant la β-lactamase. Cet anticorps a été utilisé pour une nouvelle immunisation chez un autre animal afin de générer une deuxième génération d'anticorps, les Ab2. Une nouvelle sélection a été réalisée afin d'isoler les anticorps anti-idiotypes de 7AF9. Parmi ces anticorps, le clone 9G4H9 s'est avéré présenter une activité de type β-lactamase (Avalle et al., 1998). La cascade idiotypique ayant abouti à la genèse de 9G4H9 est illustrée en figure I-25.

Cet Ab2 a été utilisé pour une nouvelle immunisation. Les anticorps polyclonaux Ab3, produits lors de cette troisième génération d'anticorps, ont la capacité de reconnaître l'enzyme de *Bacillus cereus* utilisée au départ de cette cascade, sans que la souris n'ait jamais été mise en contact avec celle-ci. Ce résultat valide le mécanisme de transfert de l'information structurale au cours de la cascade idiotypique (Avalle et al., 1998).

L'anticorps 9G4H9 a par la suite été cloné au cours des travaux de thèse de H. Débat. Elle a identifié une chaîne lourde de type γ2b (une des 4 sous-classes d'IgG chez la souris) et une chaîne légère de type κ (Débat et al., 2001). Le format scFv de 9G4H9 a été construit à partir de ces séquences. L'espaceur peptidique reliant les 2 domaines variables de séquence GSTSGSGKPGSGEGSTKG (Whitlow et al., 1993) et l'orientation VL-VH ont été choisi dans le but de conserver au mieux la capacité de liaison de l'anticorps entier (Desplancq et al., 1994). Ces choix ne sont pas systématiques et constituent des éléments à moduler lors de la construction de différents formats dérivés d'anticorps.

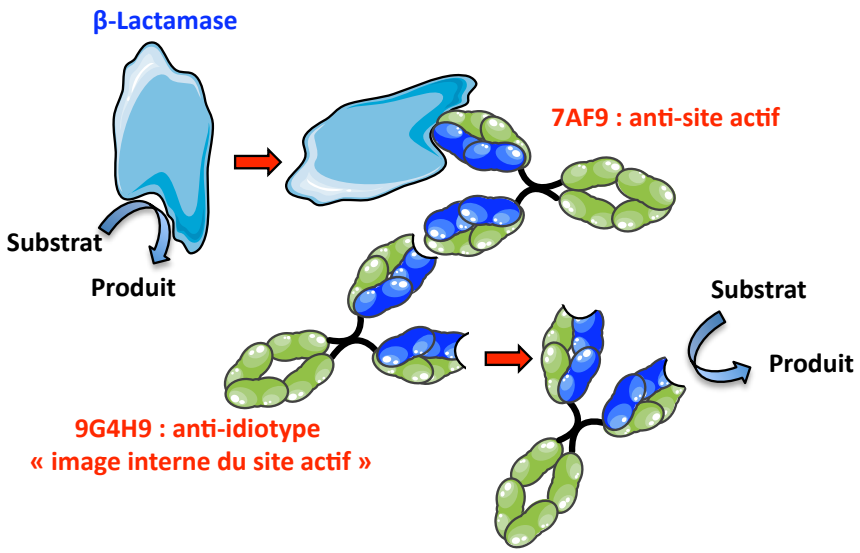


Figure I-25 : Exploitation du réseau idiotypique pour générer l'anticorps 9G4H9

I.D.2 Caractérisation de l'anticorps et du scFv 9G4H9

I.D.2.a Production et activité

Afin d'évaluer l'activité catalytique de 9G4H9 et de la comparer à l'enzyme à l'origine de la cascade idiotypique, l'étude de l'hydrolyse de différents substrats à été menée. Les résultats sont présentés dans le tableau I-7. Les résultats montrent que 9G4H9 n'est pas un aussi bon catalyseur que la β-lactamase. L'explication pourrait provenir du fait que 9G4H9 serait une copie « infidèle » du site actif de l'enzyme. L'information structurale transmise par la cascade idiotypique permet de retrouver une activité catalytique de type β-lactamase mais celle-ci semble avoir perdu de son efficacité au cours du transfert. Afin d'étayer l'étude des relations structure-fonction de l'abzyme, une caractérisation biochimique et moléculaire a été menée.

Tableau I-7 : Hydrolyse de différents substrats par la β-lactamase et l'anticorps 9G4H9

Substrat	Catalyseur	K_M (µM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1}.min^{-1}$)
Ampicilline[1]	β-lactamase	656	$7,3\times10^{4}$	$1,1\times10^{8}$
	9G4H9	4300	2,1	$4,9\times10^{2}$
Methicilline[1]	β-lactamase	790	$5,8\times10^{2}$	$7,3\times10^{5}$
	9G4H9	710	1,42	$2,0\times10^{3}$
PADAC[2]	β-lactamase	22	$7,5\times10^{2}$	$3,4\times10^{7}$
	9G4H9	10	$2,3\times10^{-3}$	$2,3\times10^{-2}$
CENTA[2]	β-lactamase	25	$2,2\times10^{3}$	$8,8\times10^{7}$
	9G4H9	Na	Na	Na

([1]) Famille des Pénicillines, ([2]) Famille des Céphalosporines, Nd : non actif.
Source : Padiolleau-Lefèvre et al., 2003.

Par une approche de Western Blot, il a été montré que les a.a. impliqués dans le mécanisme réactionnel étaient localisés au niveau de la chaîne légère. La réaction de catalyse ne peut néanmoins se faire en l'absence de la chaîne lourde, qui aurait un rôle dans la conformation du site actif. Des expériences de compétition (ELISA et Western Blot) ont également mis en évidence un mécanisme de type suicide. Ainsi après un certain nombre de cycles, le

catalyseur forme une liaison irréversible avec son substrat, entraînant la perte de l'activité catalytique. Un nombre de 175 cycles a été estimé pour 9G4H9 (Lefevre et al., 2001).

C'est dans le but d'approfondir l'étude des relations structure-fonction que l'anticorps 9G4H9 a été cloné au format scFv. La séquence a été identifiée. La figure I-26 illustre les domaines variables sous la forme de colliers de perles.

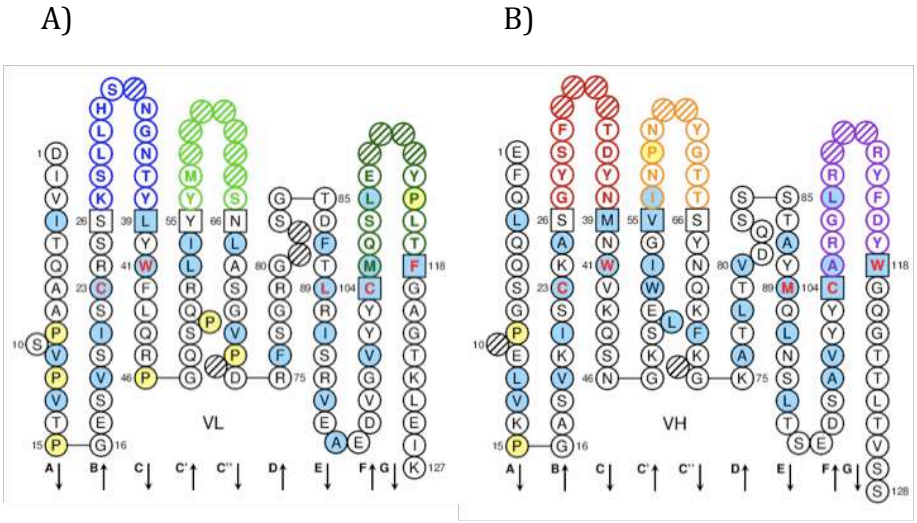


Figure I-26 : Colliers de perles des domaines variables du scFv 9G4H9

Colliers de Perles de VL (A) et VH (B) obtenus avec l'outil de l'IMGT [1]. Les CDR de VH sont colorés : en rouge (CDR1- IMGT), orange (CDR2-IMGT) et violet (CDR3-IMGT). Pour le domaine VL : en bleu (CDR1-IMGT), vert clair (CDR2-IMGT) et vert foncé (CDR3-IMGT). Les acides aminés conservés sont écrits en rouge sur fond bleu. Les acides aminés hydrophobes et les résidus tryptophane présents dans plus de 50% des séquences analysées sont représentés en bleu. Les résidus proline sont en jaune. Les positions délimitant les CDR-IMGT sont représentées sous forme de carrés; ces positions appartiennent aux FR-IMGT. Les positions hachurées correspondent à des positions non occupées dans ce domaine, par rapport à la numérotation unique IMGT. Les flèches indiquent l'orientation des brins.

La production du scFv 9G4H9 a également été mise au point (Padiolleau-Lefèvre et al., 2006). En première intention, le scFv 9G4H9 a été exprimé dans le périplasme d'*E.Coli* afin de valider la fonctionnalité du fragment cloné. L'expression a été réalisée en présence ou en l'absence d'une chaperonne, et des études cinétiques ont été menées afin de les comparer à celles déjà effectuées avec l'anticorps entier et l'enzyme (Padiolleau-Lefevre et al., 2006).

Tableau I-8 : Comparaison de paramètres cinétiques de l'enzyme et des différents formats de l'abzyme 9G4H9

Catalyseur	K_M (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M (M^{-1},min^{-1})
β-lactamase	0,66	$7,3\times10^4$	$1,1\times10^8$
IgG 9G4H9	4,3	2,1	$4,9\times10^2$
scFv 9G4H9[a]	16,8	3,5	$2,1\times10^2$
scFv 9G4H9[b]	2,3	3,5	$1,4\times10^3$

Paramètres cinétiques obtenus par suivi spectrophotométrique en utilisant l'ampicilline comme substrat, en tampon phosphate 0,1M pH 7,4. ([a]) Le scFv 9G4H9 est exprimé seul, ([b]) Le scFv 9G4H9 est co-exprimé avec FkpA. Source : Padiolleau-Lefèvre et al., 2006.

Comme attendu, les paramètres obtenus avec le format scFv sont plus faibles que ceux de l'enzyme. Néanmoins ils sont comparables à ceux obtenus avec l'anticorps entier. Ce format permet donc de conserver toute l'information structurale et fonctionnelle de l'anticorps entier, tout en diminuant la taille de la protéine pour en faciliter la manipulation et l'expression. Un autre élément à prendre en compte est l'importance de la conformation. Les données suggèrent que la présence d'une chaperonne, ici FkpA, lors de la production du scFv semble favoriser sont repliement. En effet, la présence de FkpA modifie les paramètres cinétiques, entraînant notamment la diminution du K_M.

I.D.2.b Structure

Le clonage à partir des hybridomes sécréteurs de 9G4H9 a permis de resoudre sa séquence (Débat et al., 2001). Celle-ci ne montre pas de similarité avec la séquence de la β-lactamase. Un premier modèle 3D a été proposé, qui révèle une potentielle homologie structurale entre le site actif de l'enzyme et certains résidus du paratope de l'anticorps catalytique (Padiolleau-Lefèvre et al., 2003). Ainsi, des résidus impliqués dans la catalyse chez 9G4H9 ont été proposés. L'implication de ces résidus a été par la suite confirmée par mutagénèse dirigée : les a.a. R24, S26, S28 et E98 jouent un rôle dans la réaction catalytique du 9G4H9 (Phichith et al., 2009). Depuis, des modèles plus affinés ont été proposés, notamment pour la chaîne légère qui porte les résidus impliqués dans le site actif. Le modèle le plus récent est illustré en figure I-27.

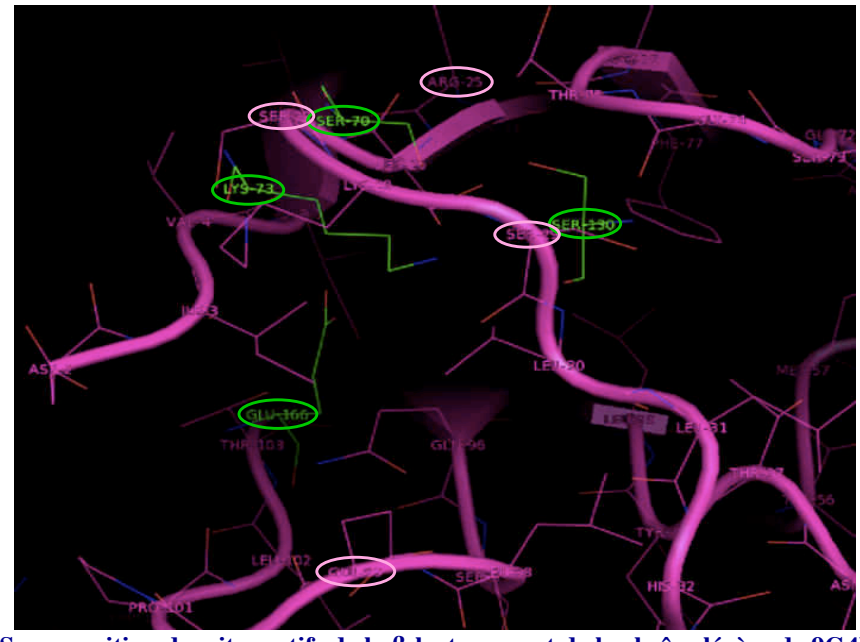


Figure I-27 : Superposition des sites actifs de la β-lactamase et de la chaîne légère de 9G4H9

La chaîne légère de 9G4H9 est modélisée en rose. Les quatre résidus de la β-lactamase impliqués dans le mécanisme réactionnel : la LYS-73, la SER-70, la SER-130 et la GLU-166 sont représentés en vert. Les résidus des sites actifs de chaque catalyseur sont entourés d'un cercle de la couleur correspondante. Source : Phichith et al., 2009.

I.D.2.c Inhibition

Un outil complémentaire a été développé au laboratoire. Il s'agit d'un inhibiteur peptidique de l'activité β-lactamase. La sélection de ce peptide a été réalisée par la technique de présentation sur phage d'une banque de peptides cycliques de 7 a.a., en ciblant l'inhibition de l'activité béta-lactamase de l'anticorps 9G4H9. Le peptide sélectionné nommé Pep90 de séquence CYHFLWGPC présente un K_D de 74 ± 16 nM vis-à-vis de l'anticorps (Yribarren et al., 2003). Un modèle 3D de ce peptide est présenté figure I-28. Il a été montré que ce peptide a également la capacité d'inhiber l'activité catalytique de la β-lactamase (K_i = 333 µM) (Phichith et al., 2010). Ce résultat est un argument supplémentaire attestant du transfert d'information structurale depuis l'enzyme jusqu'à l'abzyme lors de la cascade idiotypique.

Figure I-28 : Modélisation tridimentionnelle de Pep90

Afin d'étendre l'étude et affiner la compréhension des relations structure-fonction, il est indispensable de déterminer le système d'expression approprié. Le chapitre qui suit présente les différents systèmes d'expression pour la production d'anticorps.

II

Systèmes de production des anticorps recombinants

A Les modifications post-traductionnelles

B L'expression procaryote : *E.coli* comme système de choix

C L'expression eucaryote

II Systèmes de production des anticorps recombinants

II.A Les modifications post-traductionnelles

Pour revues : Walsh, 2010; Kamath et al., 2011.

Après leur synthèse, de nombreuses protéines subissent des modifications. Ces modifications sont qualifiées de modifications post-traductionnelles même si certaines comme la glycosylation peuvent être réalisées au cours de la synthèse protéique. Il existe différents types de modifications, parmi lesquelles :

- L'addition d'un groupe fonctionnel : acétylation, alkylation, liposylation, sulfatation, N et O glycosylation,…
- L'addition de groupes peptidiques ou de protéines : ubiquitination, sumoylation…
- Des changements structuraux : formation de ponts disulfures, clivage protéique…

Différents systèmes d'expression existent. La littérature mentionne que 39% des protéines recombinantes sont produites chez *E.coli*, 35% par les cellule CHO, 15% dans les levures, 10% par d'autres systèmes mammaliens et 1% par d'autres bactéries ou d'autres systèmes (Demain and Vaishnav, 2009). Généralement, les protéines naturellement non glycosylées sont produites de façon recombinante dans *E.coli* ou les levures, tandis que les protéines N-glycosylées sont produites dans les cellules de mammifères, cellules capables de mimer les glycosylations humaines. De nombreux outils bioinformatiques ont été développés afin de prédire les éventuelles modifications post-traductionnelles pouvant toucher les protéines recombinantes étudiées. Une liste est présentée en figure II-1.

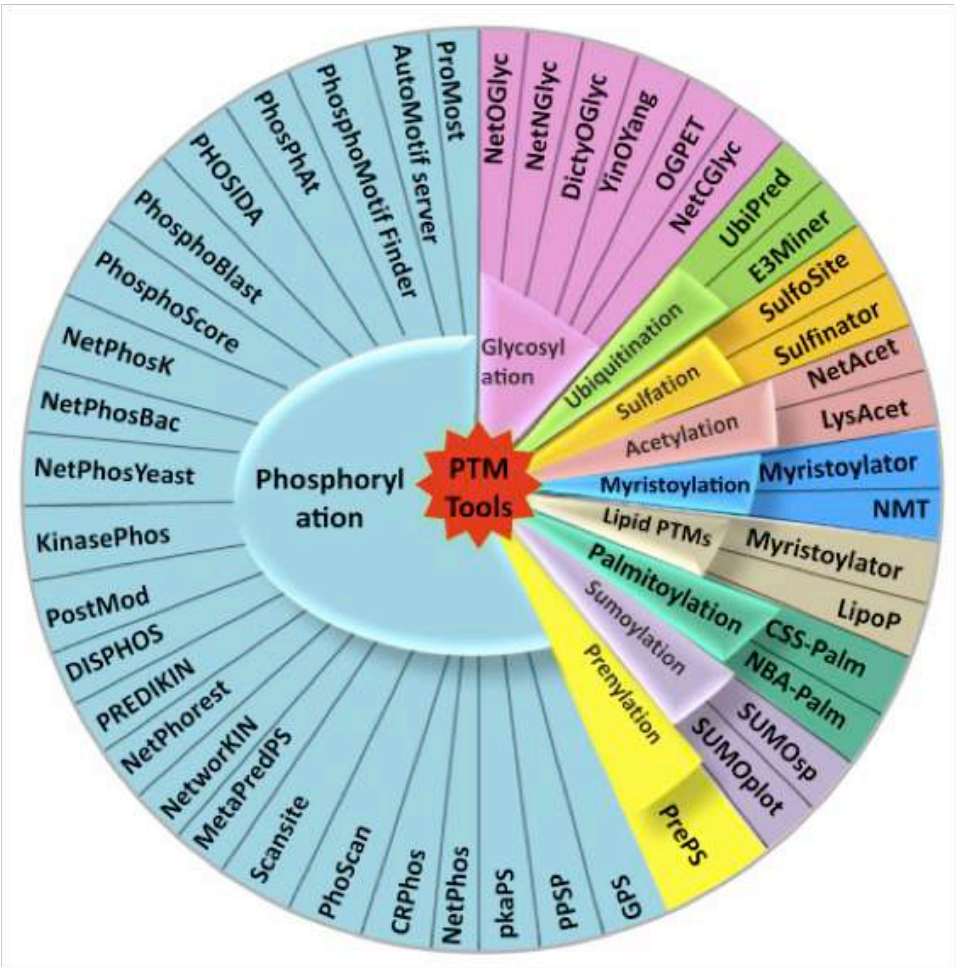
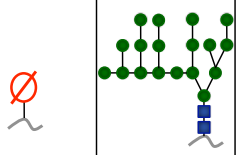


Figure II-1 : Différents outils de prédictions des modifications post-traductionnelles
Pour chaque type de modification, les outils les plus populaires sont cités. Source : Kamath et al., 2011.

Comme évoqué dans le chapitre I.A.5, la modification post-traductionnelle qui concerne les anticorps est la glycosylation. Les systèmes de production eucaryotes semblent donc ceux à privilégier. Pourtant ce n'est pas systématiquement le cas car l'utilisation de ces systèmes est freinée par leur coût. Ainsi, si les modifications post-traductionnelles représentent un des éléments qui oriente le choix du système d'expression, d'autres critères sont néanmoins à prendre en compte. Le tableau II-1 et les chapitres qui suivent présentent les caractéristiques des principaux systèmes d'expression.

Tableau II-1 : Comparatif des systèmes d'expression

	Bactéries	Levures	Insectes	Plantes	Cellules aviaires	Cellules Mammifères
Temps de génération[1]	++++	++++	++	+	++	++
Capacité à produire une IgG[1]	+	++	+	++++	++	+++
Glycoformes [1]						
Fonctions effectrices[1,2]	- Sauf après ingenierie du Fc	-/+ ADCC	+ ADCC, CDC et phagocytose	++ ADCC	++++ ADCC	++ ADCC, CDC et phagocytose
Rendement[2,3,4]	**Fab** 0,8mg-2g/L **scFv** 0,3mg-1,2g/L **sdAb** 10-65mg/L **IgG (S)** 1-2g/L	**Fab** 10-458mg/L **scFv** 1,3-250mg/L **sdAb** 10-100mg/L **IgG1 (S ou T)** 0,05-9mg/L	**Fab** 1,1g/Kg **scFv** 0,1-32mg/L **IgG (S ou T)** *In vitro* : 0,75-100mg/L Dans la larve: 45-800mg/L	**Fab** 0,044-3,6% du poids total **scFv** 5-900mg/Kg **sdAb** 28-136mg/Kg **IgG (S ou T)** 1mg-8g/Kg	**IgG (S)** 1g/L	**IgG (S)** 1-13g/L **IgG (T)** 2,5mg-1g/L

Chaîne polypeptidique · Fucose · Mannose · Galactose · N-acétylglucosamine · Acide sialique · Xylose

S et T désignent les expressions stables et transitoires respectivement. Sources : [1] Olivier and Mehtali, 2009; [2] Cerutti and Golay, 2012; [3,4] O'Connell et al., 2007 et Schirrmann et al., 2008.

Les systèmes qui sont présentés ci-après sont communs à la production de l'ensemble des protéines recombinantes. Cependant ils possèdent chacun des avantages mais également des limites spécifiques aux anticorps.

II.B L'expression procaryote : *E.coli* comme système de choix

Pour revues : Fernandez, 2004; Arbabi-Ghahroudi et al., 2005; Schirrmann et al., 2008.

Actuellement, 30% des protéines recombinantes utilisées en thérapeutique sont produites dans *Escherichia coli* (Huang et al., 2012). Dans les systèmes procaryotes, l'expression par la bactérie *E. coli* est la plus connue puisque c'est l'un des tout premiers organismes utilisés pour la production de protéines recombinantes. *Bacillus* ou *Streptomyces* sont deux autres types bactériens utilisés pour la production de protéines recombinantes mais de façon plus marginale.

Le système procaryote n'est pas adapté pour les protéines glycosylées, même si certaines protéines eucaryotes produites sans glycosylation dans ce système s'avèrent être actives, comme le tPA (pour tissue Plasminogen Activator) humain (Demain and Vaishnav,

2009). L'absence de modifications post-traductionnelles est souvent à l'origine des problèmes de solubilité de certaines protéines recombinantes. Trois voies d'expression, en fonction de l'adressage de la protéine recombinante, sont classiquement exploitées en système procaryote. Les bactéries Gram$^-$ comme *E.coli* possèdent deux membranes visibles sur la Figure II-2 et délimitant trois espaces. La membrane plasmique (MP) est la plus interne et délimite l'espace cytoplasmique. La membrane externe (ME) sépare l'environnement bactérien de l'espace extracellulaire. Enfin, l'espace periplasmique est localisé entre ces deux membranes.

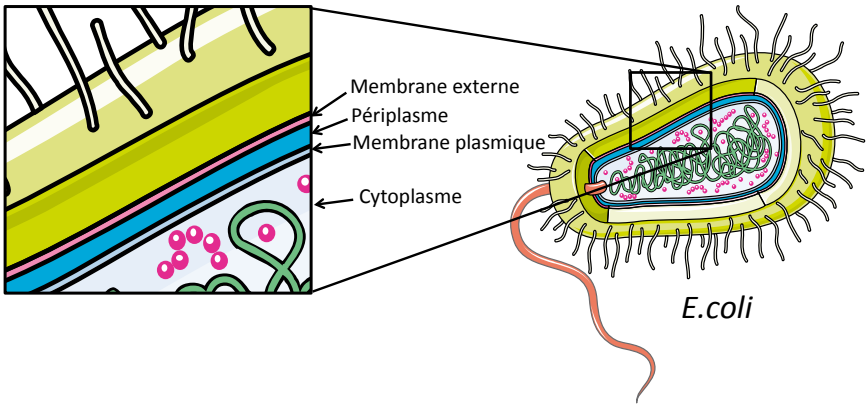


Figure II-2 : Organisation des bactéries gram négatives

II.B.1 Expression cytoplasmique

II.B.1.a Corps d'inclusions

Lors d'une expression cytoplasmique, la localisation finale des protéines recombinantes est le cytoplasme. Une expression trop forte ou l'expression de protéines ne parvenant pas à atteindre leur conformation native (ce qui est souvent le cas des protéines humaines nécessitant des ponts disulfures et/ou des glycosylations) entraîne une agrégation dans le cytoplasme et la formation de corps d'inclusions. On estime que 70% des protéines hétérologues produites se retrouvent dans les corps d'inclusions (Yang et al., 2011). En dépit de l'insolubilité des protéines résultantes, ces corps d'inclusions présentent des avantages non négligeables, telles que la stabilité et la résistance aux protéases, et une purification simplifiée, une simple centrifugation après lyse cellulaire permettant d'obtenir la protéine recombinante pure à près de 90% (Ventura et al., 2006). Mais les corps d'inclusions doivent être traités afin de les rendre solubles, généralement au moyen d'agents chaotropiques induisant la dénaturation des protéines recombinantes. Les étapes permettant de recouvrer leur activité sont très délicates et nécessitent de nombreuses mises aux point souvent très spécifiques de la protéine produite.

Il existe différents systèmes de renaturation (pour revue : Tsumoto et al., 2003(Tsumoto et al., 2003)):

- Sur colonne : l'échantillon est déposé sur une colonne de chromatographie de chélation métallique qui permet une séparation physique des protéines lors de la renaturation directement sur la colonne, limitant donc les réactions d'agrégation.
- Par dilution : l'échantillon est dilué dans une solution de renaturation. La concentration en agents dénaturants diminue fortement permettant un repliement des protéines.
- Par dialyse : l'échantillon est placé entre des membranes de dialyse avec un seuil de coupure suffisamment grand pour éliminer les agents dénaturants mais suffisamment petit pour retenir la protéine d'intérêt. Cette membrane est placée dans un bain de solution de renaturation ou une succession de bains avec une concentration décroissante en agents dénaturants. Cette méthode est la plus classiquement utilisée aujourd'hui.

II.B.1.b Protéines solubles

Certaines protéines exprimées dans le cytoplasme restent solubles et la renaturation n'est alors pas nécessaire. Pour augmenter les taux d'expression il est possible d'intervenir sur des paramètres extérieurs comme la température. En effet une baisse de la température lors de la production permet de diminuer le taux de synthèse protéique, évitant ainsi non seulement une accumulation dans le cytoplasme, mais limitant également les interactions hydrophobes qui initient des agrégats et aboutissent à la formation des corps d'inclusion (Fahnert et al., 2004). La co-expression de protéines chaperonnes permet également d'accroître le taux de protéines correctement repliées. Cependant, cette technique, en sollicitant « la machinerie de synthèse » de l'hôte, peut également diminuer le rendement de production (Rinas et al., 2007).

D'autres stratégies sont utilisées pour obtenir des protéines recombinantes fonctionnelles dans le cytoplasme des bactéries. Certaines équipes ont induit des mutations aléatoires dans les séquences de scFv de façon à rendre leur fonctionnalité moins dépendante de la formation des ponts disulfures. Ainsi, en 1998 un scFv fonctionnel dirigé contre la β-galactosidase est produit avec un taux de 0,5 g de scFv par litre de culture bactérienne (Martineau et al., 1998).

II.B.2 Expression périplasmique

Le périplasme est localisé entre la membrane externe et la membrane plasmique de la bactérie. Ce compartiment constitue un milieu oxydant favorable au repliement des protéines, notamment grâce aux protéines Dsb (pour Disulfide Bond) (Makrides, 1996). Afin d'adresser la protéine vers le périplasme une séquence signal est ajoutée en N-ter de la protéine

recombinante (exemple : séquence pelB) (Ritz and Beckwith, 2001). Des corps d'inclusions peuvent néanmoins se former dans le périplasme (Baneyx and Mujacic, 2004).

La co-expression de protéines chaperonnes peut être exploitée pour optimiser le repliement de la protéine et éviter la formation de corps d'inclusion (Padiolleau-Lefèvre et al., 2006). La première expression périplasmique d'un fragment d'anticorps fonctionnel chez *E.coli* est réalisée en 1988 (Skerra and Pluckthun, 1988).

II.B.3 Expression extracellulaire

Les protéines sécrétées passent par le périplasme avant d'être libérées dans le milieu de culture. Cette voie confère les avantages de l'expression périplasmique décrits ci-dessus (milieu oxydant, protéines solubles et fonctionnelles). Mais des avantages supplémentaires sont apportés par cette expression : (1) très peu de protéines endogènes sont excrétées, ce qui permet d'effectuer une purification plus simple et d'obtenir une bonne qualité ; (2) une faible activité protéase propre au milieu extracellulaire permet d'éviter toute dégradation excessive ; (3) l'excrétion a lieu en continu, évitant l'accumulation des protéines recombinantes surexprimées et la formation des corps d'inclusion ; et enfin (4) la production de protéines dont l'expression cytoplasmique ou périplasmique serait nocive ou toxique pour la cellule se trouve ainsi délocalisée (Stella and Ryan, 2004).

Malgré de bons rendements et un faible coût, ce système reste peu adapté à la production de protéines complexes tels que les anticorps. En thérapie, parmi les 47 anticorps ou dérivés ayant obtenus une autorisation de mise sur le marché, seuls deux Fab sont produits chez *E.coli* (Tableau I-3). Néanmoins, l'exploitation de ce système semble plus adaptée au format scFv, et de nombreux travaux appuient cette affirmation (pour revues : Andersen and Reilly, 2004; Ahmad et al., 2012).

II.C L'expression eucaryote

Les organismes eucaryotes sont des systèmes plus élaborés et mieux adaptés à la production d'un vaste champ de protéines recombinantes complexes, dont les protéines de grande taille et/ou contenant des modifications post-traductionnelles comme les glycosylations. Les cellules sont compartimentées et possèdent une voie d'adressage qui permet de sécréter la protéine recombinante dans une conformation très proche, voire identique à son état natif. Le long de cette voie sécrétoire se trouvent des organites tels que le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi, dotés de mécanismes s'appuyant entre autres sur l'activité de protéines chaperonnes et d'enzymes indispensables au repliement correct des protéines recombinantes. Dans les paragraphes suivants, différents systèmes sont présentés : un système reposant sur

les levures, qualifiées de cellules eucaryotes inférieures ; un système basé sur l'infection de cellules d'insectes ; puis un système exploitant les cellules de mammifère appelées cellules eucaryotes supérieures, en référence à leur position au cours de l'évolution et en corrélation avec leur niveau de complexité ; un système d'expression propre aux cellules végétales et aux plantes ; et enfin l'exploitation d'animaux comme systèmes d'expression.

II.C.1 Les levures

Les levures sont des organismes unicellulaires compartimentés appartenant au règne des champignons. Le membre le plus connu est *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), utilisé depuis des milliers d'années dans l'alimentation (panification et vinification). Depuis plus de 30 ans, *S. cerevisiae* est aussi utilisée dans l'expression de protéines recombinantes (Hitzeman et al., 1981). *Pichia pastoris* et *Schizosaccharomyces pombe* sont deux autres levures utilisées dans l'expression de protéines recombinantes.

Les avantages de ce système sont similaires à ceux d' *E. coli* : les génomes sont connus et il existe plusieurs vecteurs d'expression commerciaux (Yin et al., 2007). C'est un système peu coûteux nécessitant des milieux de culture simples. La croissance est rapide, même à forte densité.

Mais contrairement aux bactéries, les levures assurent certaines modifications post-traductionnelles, car elles possèdent une voie sécrétoire similaire à celle des cellules eucaryotes supérieures (Bill, 2001).

Le principal inconvénient de ce système réside dans la synthèse des chaînes de sucres greffées aux protéines. Celles-ci diffèrent de celles que l'on retrouve chez les eucaryotes supérieurs par une richesse en mannose (Tableau II-1) pouvant perturber les fonctions des protéines recombinantes, et notamment celles des anticorps (Jigami, 2008). Cependant, des travaux sur la glycoingénierie des levures ont abouti à la production de protéines recombinantes avec des N-glycosylations similaires à celles de l'homme (Maras et al., 1999; Wildt and Gerngross, 2005; Hamilton and Gerngross, 2007). Une IgG1 humaine fonctionnelle a ainsi été produite chez *S.cerevisiae* (Rakestraw et al., 2009).

La faible immunogénicité des protéines produites par ce système permet de les utiliser en thérapie chez l'homme. C'est le cas de certains vaccins comme celui de l'hépatite B (DiMiceli et al., 2006).

Dans ce système, les productions de protéines recombinantes atteignent des rendements de plusieurs dizaines de g/L de culture, mais n'ont jamais dépassé les 0,9 g/L pour un anticorps entier (Ward et al., 2004).

II.C.2 Les cellules d'insectes et le système baculovirus

La production de protéines dans les cellules d'insectes repose sur l'infection par le baculovirus. Ce virus fait partie de la large famille des *Baculoviridae* infectant les Arthropodes. Il n'est pathogène ni pour les vertébrés, ni pour les végétaux (Devauchelle and Cerutti, 1999).

L'un des principaux avantages de ce système est que les protéines exprimées ont classiquement une conformation similaire à la conformation native. Ce repliement correct, avec la possibilité de former des ponts disulfures, a permis de produire des anticorps actifs dans ce système (Edelman et al., 1997). Un des plus forts rendements est atteint avec le format Fab, où 1,1 g a été produit par kilo de larves de *Trichoplusia ni* (O'Connell et al., 2007). Différentes IgG sont produites avec des rendements variant de 6 à 18 mg/L de culture. Dans ce système, les protéines hétérologues peuvent représenter de 0,1 à 50% des protéines totales (Schirrmann et al., 2008).

Cependant, au niveau des glycosylations, les chaînes de sucres sont plus courtes chez les insectes (Tableau II-1). Cela entraîne une certaine immunogénicité et une modification de l'activité biologique des protéines produites dans ce système (Altmann et al., 1999).

II.C.3 Cellules de mammifères

Les cellules de mammifères les plus couramment utilisées sont les lignées CHO (Chinese Hamster Ovary cells), et d'une façon moindre les lignées COS (cellules qui dérivent de la lignée CV-1 de singe vert d'Afrique) et HEK (pour Human Embryonic Kidney). Les cellules de mammifères possèdent les mêmes voies d'adressage et de modifications post-traductionelles que les cellules humaines. Ceci permet d'envisager l'expression de toutes les protéines eucaryotes, même les protéines complexes comme les anticorps. Le réticulum endoplasmique est un compartiment oxydant favorisant la formation des ponts disulfures indispensables à la conformation correcte des anticorps (Wilkinson and Gilbert, 2004) .

Les cellules COS et HEK-293T sont optimisées pour une expression hétérologue médiée par des vecteurs plasmidiques. Ces deux lignées cellulaires expriment l'antigène grand T qui permet une réplication épisomale des vecteurs intégrant l'origine de réplication du virus Simian 40 (SV40). Cette réplication aboutit à plus de mille copies du vecteur d'origine en 48 h, optimisant l'expression du gène d'intérêt (Yin et al., 2007). Les cellules COS et HEK transitoirement transfectées sont les systèmes les plus utilisés à l'échelle du laboratoire pour l'expression de protéines complexes telles que les anticorps. Ce système permet une expression d'anticorps de 50 à 300 mg/L de culture en expression de base, mais peut atteindre

le g/L après optimisation (ingénierie des cellules ou des vecteurs, optimisation des transfections avec différents agents…) (Zhang and Shen, 2012).

Pour des productions à plus grande échelle, ce sont les cellules CHO qui sont préférées. Ces cellules s'adaptent relativement facilement à différents types de milieux, même ceux sans sérum. Elles ont également la possibilité d'être cultivées en suspension, ce qui augmente la densité cellulaire et donc la productivité. La production d'anticorps dans ces cellules atteint les 100 à 280 mg/L de culture à l'échelle du laboratoire, et 3-5 g/L pour les productions industrielles (Zhang and Shen, 2012).

De nouvelles lignées cellulaires sont exploitées comme celles des cellules aviaires. Les cellules EB66 par exemple sont des cellules souches embryonnaires de canard immortalisées. Il a été montré que les cellules aviaires ont moins de fucose (Raju et al., 2000) entraînant une augmentation de l'activité ADCC des anticorps ainsi produits de 20 fois par comparaison avec une production dans les cellules CHO (Olivier and Mehtali, 2009).

II.C.4 Les plantes

Pour revue : Hellwig et al., 2004.

Les cellules végétales partagent de nombreuses caractéristiques avec les cellules de mammifères. Il est ainsi possible de produire dans ce type cellulaire des protéines complexes nécessitant des modifications post-traductionnelles. Ce système présente de nombreux avantages. La croissance des plantes ne nécessite que peu de besoins (eau, minéraux et lumière) ce qui limite considérablement le coût de la production. Les pathogènes de la plante lui sont spécifiques et ne présentent pas de risque pour l'homme. Enfin, une augmentation des productions peut facilement être atteinte par un accroissement des surfaces de culture. Le coût de la production d'un anticorps dans les plantes représente 1 à 10% d'une production par hybridomes (Daniell et al., 2001).

Les anticorps produits dans les plantes sont appelés plantibodies. Il est possible de les produire dans des cellules végétales en suspension (Fischer et al., 1999), mais les productions se font classiquement dans des plantes entières et particulièrement chez *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana benthamiana*. Le premier anticorps produit dans le tabac, a été obtenu dès 1989 (Hiatt et al., 1989). Ce système est aussi exploité depuis plus de 15 ans pour produire des vaccins (Rice et al., 2005).

Comme tout système, l'exploitation des plantes comme système de production a ses limites, notamment le problème éthique soulevé par les organismes génétiquement modifiés (OGM). Il existe aussi des glycosylations immunogènes pour l'homme (Doran, 2000). Afin de limiter

cette immunogénicité, certaines équipes ont modifié les voies de biosynthèse des sucres (Cox et al., 2006).

II.C.5 Les animaux transgéniques

Les cellules d'animaux sont utilisées depuis des décennies dans le domaine de la biotechnologie pour produire des protéines recombinantes (CHO, COS, HEK…). Mais l'exploitation d'un individu transgénique est plus récente. Le premier animal transgénique fut une souris produisant une plus grande quantité d'hormone de croissance (Marx, 1982). L'avantage d'utiliser un individu entier est de pouvoir localiser la production dans le lait, le sang, les urines ou le blanc d'un œuf, en utilisant des promoteurs spécifiques d'organes. L'approche la plus classique est de cibler les glandes mammaires afin de purifier les protéines à partir du lait (Clark, 1998). À titre d'exemple, il est possible d'obtenir 0,5 mg d'anticorps chimérique (anti-CD19) par ml de lait de souris (Van Kuik-Romeijn et al., 2000).

Une autre approche également exploitée est l'expression dans le blanc d'œuf. Des chercheurs ont ainsi obtenu 3 mg d'anticorps anti-CD20 avec des glycosylations identiques à celles produites dans les cellules CHO (Zhu et al., 2005). L'avantage de ce modèle est le faible taux en fucose, ce qui dans le cas des anticorps, permet d'augmenter la réponse ADCC (Olivier and Mehtali, 2009). A l'heure actuelle, aucune protéine issue de ce système n'est commercialisée, essentiellement à cause de la difficulté à obtenir des oiseaux transgéniques (Ivarie, 2006).

Une autre possibilité d'exploiter les souris transgéniques est la substitution des gènes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines murines par leurs homologues humaines. Après immunisation, ces souris transgéniques deviennent une source d'anticorps humains exploitable en thérapie (Kuroiwa et al., 2002).

Il est cependant généralement difficile et long d'obtenir des animaux transgéniques, les périodes pouvant varier de 3,5 à 32 mois selon les espèces (Demain and Vaishnav, 2009).

Différents systèmes d'expression existent donc aujourd'hui, chacun présentant des avantages et des limites. Lors d'une expression hétérologue, le choix s'appuie sur des critères particuliers tels le format de l'anticorps (dans le domaine de l'immunobiotechnologie), l'importance des modifications post-traductionnelles, les quantités désirées ou l'application visée.

III

Etude de l'anticorps catalytique modèle et de son dérivé scFv

A Etat des lieux

B Mise en place des différents systèmes d'expression

C Caractérisation biochimique et structurale de 9G4H9

III Etude de l'anticorps catalytique modèle et de son dérivé scFv

III.A Etat des lieux

Mon projet de thèse fait suite aux études citées précédemment sur 9G4H9 réalisées dans notre laboratoire depuis plus de 15 ans. Il constitue également une part importante d'un projet ANR GENOPAT « des maladies rares aux maladies communes », traitant du rôle des anticorps catalytiques en physiopathologie. Ce projet comporte plusieurs axes comme l'identification d'anticorps catalytiques dans des maladies auto-immunes ou la détermination des gènes codant pour ces anticorps. L'objectif principal de ma thèse, inscrite dans ce projet ANR, est de mettre en place des outils d'étude des anticorps catalytiques. Ces outils ont été élaborés grâce à l'anticorps modèle 9G4H9. Deux objectifs principaux ont été visés :

- La comparaison des systèmes d'expression :
  L'anticorps étant une protéine complexe, il est nécessaire de déterminer le système d'expression le plus pertinent pour produire et étudier l'anticorps 9G4H9. Comme évoqué dans le chapitre II, il existe aujourd'hui divers systèmes d'expression permettant de produire des anticorps recombinants et les fragments dérivés issus de la biotechnologie. J'ai initié mon projet de recherche en développant un système d'expression procaryote par la voie cytoplasmique, avant de passer à un système plus sophistiqué qu'est la cellule eucaryote. Il en fut de même concernant le format de l'anticorps. Des mises au point ont été appliquées sur le format scFv, constitué d'une chaîne polypeptidique unique, pour progresser vers l'oligo-tétramère que représente un anticorps, avec ses deux chaînes légères et ses deux chaînes lourdes.
- La caractérisation des anticorps ou des fragments dérivés ainsi produits :
  Par la suite, j'ai initié une étude biochimique et structurale décrite dans le présent manuscrit. L'objectif était de valider (1) la conservation du site de reconnaissance de l'antigène, et (2) le maintien de la capacité de catalyse, afin d'évaluer la fonctionnalité de l'anticorps catalytique 9G4H9 en fonction du format et du système d'expression. Des données structurales ont également été collectées. L'ensemble de ce travail vise à approfondir les relations structure-fonction de ce modèle.

III.B Mise en place des différents systèmes d'expression

III.B.1 Expression en système procaryote

Le laboratoire possède un savoir-faire en ingénierie des anticorps et en particulier pour le format scFv. Le système d'expression mis en place était de type procaryote, chez *E.coli*. Les travaux ont donc été initiés sur la base des conditions préétablies, que ce soit au niveau du format de l'anticorps ou du système d'expression. En dépit de l'aspect simplifié de cette production, elle n'en reste pas moins délicate. La principale difficulté découle de la présence

de ponts disulfures au niveau des deux domaines variables du scFv, responsables de la formation de corps d'inclusion dans la bactérie. Deux stratégies ont été menées. La première est une expression au niveau du périplasme de la bactérie, alors que la seconde repose sur une expression cytoplasmique.

III.B.1.a Exploitation de la voie périplasmique

Comme décrit dans le chapitre II.B.2, le compartiment périplasmique est oxydant ce qui permet un repliement correct du scFv grâce à la formation des ponts disulfures. En principe le scFv 9G4H9 est donc soluble et fonctionnel dans cet espace inter-membranaire. C'est la raison pour laquelle ce système a été choisi en première intention dans le laboratoire (Padiolleau-Lefevre et al., 2006).

III.B.1.a.1 Clonage, induction et extraction

Le vecteur utilisé lors de cette production est le plasmide pET26b. Ses caractéristiques principales sont :

- Un promoteur inductible. Ce promoteur assure la surexpression du gène d'intérêt en présence d'IPTG (pour Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) dans le milieu de culture.
- Une séquence pelB. Cette séquence représente un peptide signal en N-ter permettant l'adressage des protéines dans le périplasme (Figure III-1). Après translocation des protéines dans le périplasme, le peptide signal pelB est clivé par des peptidases (Choi and Lee, 2004; Wiese and Schmitz, 2011).
- Une étiquette polyhistidine (6xHis) en C-ter permettant une purification plus aisée de ce scFv par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel.

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMDIVITQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGNTYLY
WFLQRPGQSPQRLIYYMSNLASGVPDRFSGRGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCMQSLEY
PLTFGAGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGEFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFT
DYNMNWVKQSNGKSLEWIGVINPNYGTTSYNQKFKGKATLTVDQSSSTAYMQLNSLTSED
SAVYYCARGLRRYFDYWGQGTTLTVSSAAALEHHHHHH

Figure III-1 : Séquence protéique du scFv 9G4H9 dans le vecteur pET26b

La séquence signal PelB est représentée en rose. La région variable de la chaîne légère est colorée en bleu. La région variable de la chaîne lourde est en vert. L'espaceur peptidique est indiqué en rouge. L'étiquette 6xHis en C-Term est en jaune. Les deux a.a. en gris proviennent du vecteur pET26b et se trouvent ajoutés à la séquence du scFv. La protéine a une masse moléculaire de 30,48 kDa et 28,27 kDa après clivage du peptide signal.

La séquence codant pour le scFv 9G4H9 a précédemment été clonée dans le vecteur pET26b. Des bactéries BL21 ont été transformées par ce plasmide. L'induction de l'expression de la

protéine recombinante s'effectue par ajout d'IPTG à 2,5 mM et la culture est incubée 3h à 28°C sous agitation. Ces conditions ont été mises au point précédemment au laboratoire et permettent d'obtenir le meilleur rendement dans ce système. Les scFv sont alors synthétisés puis exportés dans l'espace périplasmique grâce à la séquence pelB. Les scFv sont extraits du périplasme par choc thermique, déstabilisant la membrane périplasmique sans agir sur la membrane cytoplasmique. Les détails du protocole sont présentés en annexe B.3.

III.B.1.a.2 Purification

La purification du scFv 9G4H9 périplasmique ainsi produit est réalisée grâce à l'étiquette 6xHis par chromatographie d'affinité sur des billes d'agarose recouvertes de nickel en conditions natives. L'étiquette poly-histidines a une forte affinité pour le Ni-NTA (nickel-nitriloacetic acid) des billes (Figure III-2). Le scFv est ensuite élué grâce à un tampon concentré en Imidazole. L'imidazole étant un analogue structural du noyau imidazole de l'histidine, il entre en compétition avec la protéine. Afin de pouvoir réaliser les analyses ultérieures, l'éluat obtenu est dialysé contre un tampon phosphate à l'aide d'une membrane dont le seuil de coupure est de 12 kDa. L'imidazole contenu dans le tampon d'élution, qui est incompatible avec le test BCA (pour bicinchoninic acid test) ultérieurement utilisé pour mesurer la concentration des protéines, est ainsi éliminé. Le protocole détaillé est présenté en annexe B.3.b.

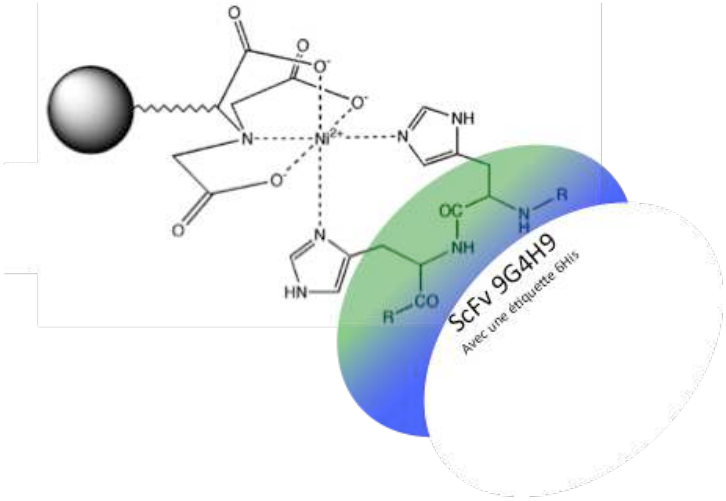


Figure III-2 : Purification sur billes Ni-NTA

Schéma de l'interaction entre l'étiquette 6xHis du scFv 9G4H9 et le Ni-NTA. La bille grise représente la bille d'agarose.

La concentration des protéines contenues dans l'éluat sont donc dosée par la méthode BCA décrite en annexe D.1.

Afin de déterminer la qualité des extraits protéiques isolés, ceux-ci sont séparés sur gel SDS-PAGE et colorés au bleu de Coomassie. Un bilan de purification typique est présenté en figure III-3.

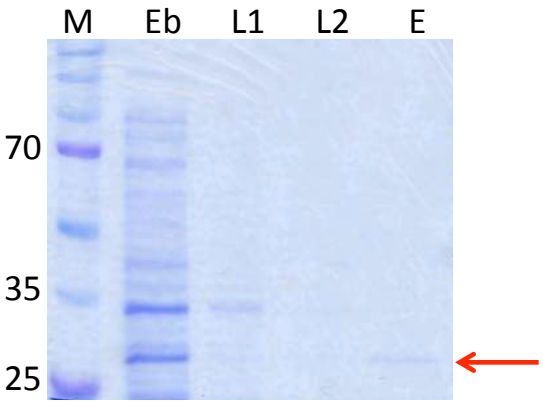


Figure III-3 : Analyse de la purification du scFv 9G4H9 périplasmique

Analyse de la purification du scFv 9G4H9 sur gel SDS-PAGE à 10% révélé au bleu de Coomassie. M représente le marqueur de poids moléculaire exprimé en kDa (Dual Color Standards, Bio-Rad); Eb représente l'ensemble des protéines périplasmiques extraites; L1 et L2 représentent les fractions obtenues après les 2 étapes de lavage; E représente la fraction d'élution contenant le scFv 9G4H9 purifié. La flèche rouge indique la localisation de la bande attribuable au scFv 9G4H9.

On remarque que la quantité de protéines totales extraites du périplasme est faible, ce qui est en corrélation avec le fait que les protéines périplasmiques représentent entre 4 et 16% des protéines totales de la bactérie (Pooley et al., 1996). L'analyse des pistes L1 et L2 montre que ces 2 étapes sont nécessaires car elles permettent l'élimination de protéines de l'extrait brut sans engendrer de perte di scFv. La piste E représentant l'éluat montre une bande à la masse attendue pour le scFv, confirmant la purification de la protéine hétérologue.

Conclusion

Avec 0,24 mg/L de culture bactérienne, la production du scFv 9G4H9 par ce système d'expression est plutôt faible mais elle reste néanmoins du même ordre de grandeur que la production déjà réalisée au laboratoire avec un rendement de 0,36 mg/L en moyenne. A la différence des expressions précédentes (Padiolleau-Lefèvre et al., 2006; Phichith et al., 2009) il n'y a pas ici de co-expression de la chaperonne FkpA. Cela entraîne une diminution de scFv soluble dans le périplasme ne représentant plus que 2,2% des protéines totales extraites contre 3,3% avec FkpA. Elle est aussi comparable à ce que l'on retrouve dans la littérature pour des scFv exprimés dans le périplasme avec des productions variant entre 0,3 et 1 mg/L de culture (Monsellier and Bedouelle, 2006; Quintero-Hernandez et al., 2007). Cette production ne nous autorise pas à envisager l'ensemble des tests de caractérisation, notamment ceux permettant d'avancer dans l'élucidation de la structure du scFv. Elle reste toutefois suffisante pour mettre en place un nouveau système d'évaluation de l'activité de type β-lactamase du scFv 9G4H9 en fluorescence. La fluorescence étant une technique très sensible elle ne nécessite pas beaucoup de matériel au départ.

Le rendement de ce système d'expression périplasmique restant faible, il est indispensable de se tourner vers un nouveau système d'expression plus productif. Nous nous sommes orientés vers une expression cytoplasmique dans ce même système d'expression hétérologue qu'est la bactérie. Comme expliqué précédemment (cf. § II.B.1.a) une forte concentration de protéines recombinantes peut être extraite à partir des corps d'inclusions, à la condition de mettre en place un protocole délicat de renaturation suffisamment efficace pour obtenir de grandes quantités de scFv solubles et correctement repliés.

III.B.1.b Exploitation de la voie cytoplasmique

Pour cette expression, le même vecteur pET26b incluant l'insert scFv 9G4H9 a été utilisé. La majorité de la production s'agrège et forme des corps d'inclusions que ce soit dans le cytoplasme ou le périplasme (Baneyx and Mujacic, 2004). La technique d'extraction décrite ci-dessous permet d'isoler l'ensemble des protéines agrégées quel que soit le compartiment.

III.B.1.b.1 Extraction et purification

Le principe est de lyser les bactéries par sonication afin de pouvoir isoler la fraction insoluble par centrifugation. La fraction insoluble est riche en corps d'inclusion renfermant le scFv sous forme inactive. Un traitement à l'urée permet la solubilisation de ces corps d'inclusion et une purification s'effectue en condition dénaturante comme décrit dans l'annexe B.4.b.

Les scFv ont tendance à précipiter à forte concentration (Tsumoto et al., 1998). Afin d'éviter la formation d'agrégats au cours du processus de renaturation, la concentration du scFv est ajustée à 10 µM après l'évaluation de la concentration protéique par la technique BCA.

Un SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie est effectué pour évaluer la pureté et la qualité de la purification. Afin de s'assurer que la bande proche de 28 kDa représente bien le scFv 9G4H9, un Western Blot est réalisé avec un anticorps anti-histidine permettant d'identifier spécifiquement la protéine recombinante scFv 9G4H9. La figure III-4 illustre les résultats ainsi obtenus au cours du processus de purification du scFv cytoplasmique.

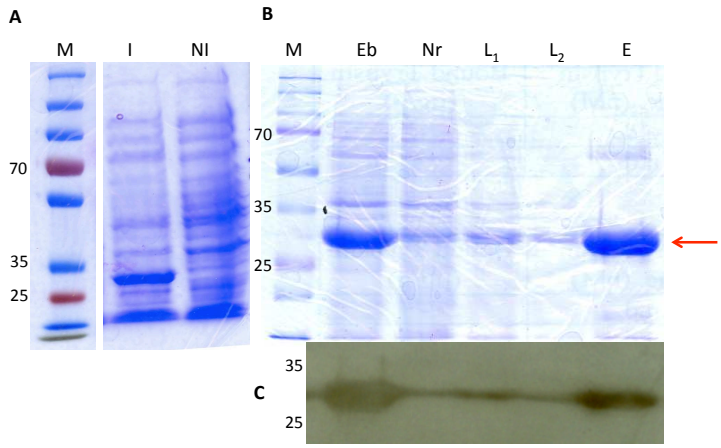


Figure III-4 : Analyse de la purification du scFv 9G4H9 cytoplasmique

A) Analyse de l'effet de l'induction sur les extraits bruts sur gels d'acrylamide gradien 4 à 20% (Pierce), révélés au bleu de Coomassie: M : marqueur de poids moléculaire exprimé en kDa kDa (Dual Color Standards, Bio-Rad); I : fraction de la culture induite avec 1mM d'IPTG; NI : fraction de la culture non induite.
B-C) Analyse des différentes étapes de purification du scFv 9G4H9 sur gel d'acrylamide à 10% révélé au bleu de Coomassie (B) et par Western Blot (C) : M : marqueur de poids moléculaire exprimé en kDa (Dual Color Standards, Bio-Rad) ; Eb : extrait brut total ; Nr : fraction contenant les protéines non retenues ; L1 et L2 : les fractions obtenues après les 2 étapes de lavage; E : fraction d'élution contenant le scFv 9G4H9. La flèche rouge sur le gel B) indique la localisation de la bande attribuable au scFv 9G4H9.

Les résultats de la figure III-4 A. permettent de valider l'induction par l'IPTG, une large bande à 30 kDa mettant en évidence la surexpression du scFv 9G4H9 au niveau de la piste « I » (Extrait brut induit). Lors du processus de purification, on retrouve donc bien cette bande dans l'extrait brut contenant l'ensemble des protéines exprimées par les bactéries (Eb sur le gel B). Lors des étapes d'élimination des protéines non retenues de façon spécifique à la résine Ni-NTA (fraction Nr), et des étapes de lavages (fractions L1 et L2), on remarque qu'il y a une perte du scFv 9G4H9, confirmée par Western Blot. Cette perte reste tout de même relativement faible par rapport à la quantité que l'on retrouve dans la fraction d'élution (E) sous la forme d'une large bande migrant à la taille attendue du scFv. Le Western Blot confirme qu'il s'agit du scFv recombinant puisqu'il y a révélation de l'étiquette 6-His en fusion du scFv. On note cependant qu'il subsiste des contaminants dans la fraction d'élution car on retrouve des bandes de protéines vers 70 et 5 kDa. Afin de tenir compte de ces impuretés dans l'évaluation de la concentration finale du scFv 9G4H9, nous avons déterminé la pureté du scFv. Pour cela, différentes quantités de fraction d'élution ont été déposées sur gel de polyacrylamide à 10% puis coloré au bleu de Coomassie (Figure III-5).

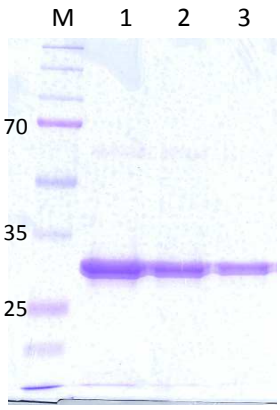


Figure III-5 : Evaluation de la pureté du scFv 9G4H9

Différentes quantités de la solution de scFv purifiée sont déposées sur gel SDS-PAGE à 10% révélé au bleu de Coomassie : 9,44 µg en piste 1, 4,72 µg en piste2 et 3,15 µg en piste 3. Le marqueur de poids moléculaire est visible en piste M (Dual Color Standards, Bio-Rad), il est exprimé en kDa.

La sensibilité des gels colorés au bleu de Coomassie a été évaluée dans notre laboratoire à 225 ng, ce qui est cohérent avec les indications commerciales annonçant 100 ng. Le gel ci-dessus montre qu'on ne détecte plus de protéines contaminantes à partir de 3,15 µg de protéines totales déposées. Le pourcentage de pureté est déduit de la relation suivante :

% pureté = 100 – ((seuil de sensibilité /quantité de protéines totales déposées sur le gel) x 100)

Ce résultat nous permet de définir la pureté à 92 %. Cette méthode a été appliquée à chaque purification et les taux de pureté obtenus sont tous compris entre 87 et 99 %. La concentration finale du scFv 9G4H9 obtenu par BCA est systématiquement ajustée à partir de ce pourcentage de pureté du scFv.

A l'issue de cette purification, le scFv 9G4H9 produit se retrouve complètement dénaturé, le tampon d'élution contenant de l'urée 8M. Le paragraphe suivant décrit le processus de repliement développé pour recouvrer sa fonctionnalité.

III.B.1.b.2 Processus de renaturation

Tsumoto et ses collaborateurs ont beaucoup travaillé sur le repliement des scFv exprimés dans la bactérie *E.coli*. Nous avons mis en place un processus de renaturation en nous inspirant de leurs travaux (Tsumoto et al., 1998; Arakawa and Tsumoto, 2003; Umetsu et al., 2003; Tsumoto et al., 2004; Kudou et al., 2011). Deux principaux critères ont été pris en compte lors de la rationalisation des étapes de renaturation:

- L'extraction du scFv 9G4H9 faisant intervenir l'urée comme agent dénaturant, il est nécessaire de l'éliminer de façon progressive.
- Afin de promouvoir le repliement efficace du scFv, nous avons utilisé différents additifs dont les propriétés sont présentées ci-après.

- **La L-arginine**

L'arginine empêche la formation d'agrégats et permet une répartition monodisperse des protéines permettant d'aboutir à un taux de repliement correct allant de 55 à 78% à partir des corps d'inclusion (Lee et al., 2006). Des études ont déjà montré son efficacité sur le format scFv avec une limitation de la précipitation (Tsumoto et al., 2004; Baynes et al., 2005). Il semble que l'arginine ne stabilise pas à proprement parler les protéines, mais elle empêche leur agrégation (Arakawa and Tsumoto, 2003). Le mécanisme n'est pas élucidé mais il semblerait que l'arginine interagisse avec des parties hydrophobes des protéines (non exposées en condition native), les empêchant d'interagir entre elles et donc de s'agréger (Lee et al., 2006).

- **Le DTT**

Le dithiothréitol (DTT) est un agent réducteur. Il dissocie les agrégats et empêche leur formation. Ajouté en début de procédé de renaturation, il permet d'éviter la formation précoce de ponts disulfures inappropriés. Plusieurs étapes de renaturation permettent de rapprocher des cystéines au sein d'une conformation correcte. La contrainte imposée par la présence du DTT est alors levée afin de permettre la formation des ponts disulfures (Sai Kumar et al., 2009). Son action, couplée à celle de l'arginine, améliore la qualité du repliement. En présence de DTT le taux de protéines fonctionnelles augmente (Wang and Engel, 2009). Des scFv actifs ont été obtenus avec des concentration de 5 mM à 12,5 mM de DTT dans le processus de renaturation (Ortega et al., 2013).

- **Le couple Glutathion**

Le glutathion existe sous forme réduite (GSH) ou oxydée (GSSG). La forme oxydée correspond à l'association de deux molécules de glutathion reliées par un pont disulfure. Le glutathion sous forme réduite et oxydée constitue un couple d'oxydo-réduction qui permet la formation des ponts disulfures (Clark, 2001). Le ratio entre les deux formes est variable en fonction des protéines. Au laboratoire, la valeur efficace testée pour le repliement correct du scFv 9G4H9 et la formation des ponts disulfures entre les cystéines des domaines variables est de 10:1 pour GSH et GSSG respectivement.

- **Le processus de repliement**

L'ensemble de ces critères aboutit au processus de renaturation décrit en figure III-6. Ce processus nécessite cinq jours d'éxécution pour obtenir une quantité exploitable de protéines renaturées. Les différentes étapes sont détaillées en annexe B.4.b.

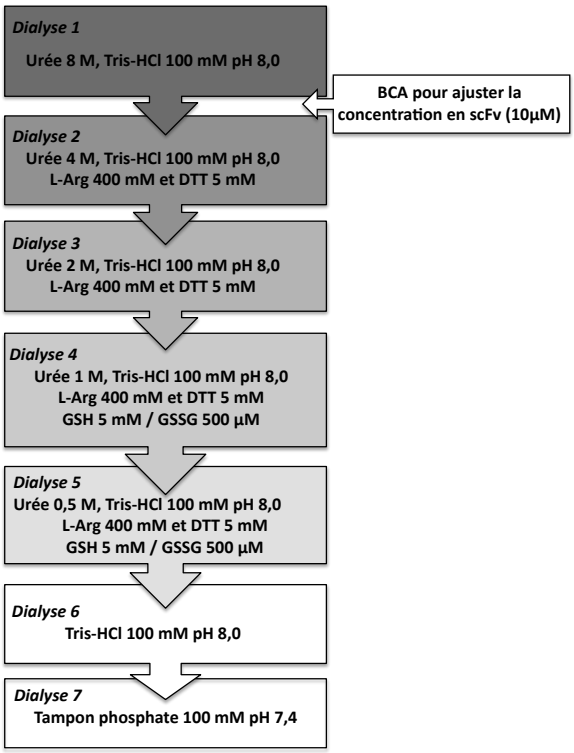


Figure III-6 : Processus de renaturation du scFv 9G4H9

Schéma de la stratégie de renaturation du scFv 9G4H9. GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, DTT : dithiothréitol.

Conclusion

Cette voie d'expression a permis d'obtenir des quantités de plusieurs dizaines de mg de scFv 9G4H9 par litre de culture bactérienne. Ce rendement est en corrélation avec ce que l'on peut retrouver dans la littérature pour des expressions cytoplasmiques de scFv, classiquement annoncées de l'ordre de la dizaine de mg/L (Sandee et al., 2002; Santala and Lamminmaki, 2004; Mahgoub, 2012). Il faut de plus noter que ces productions se font classiquement avec des chaperonnes ou en bioréacteurs (augmentant la densité cellulaire de 100 fois) (Schirrmann et al., 2008). Le rendement de production ainsi obtenu est donc parmi les plus élevés de la littérature, et nous permet d'envisager des tests de caractérisation plus poussés, décrits ultérieurement.

III.B.2 Expression en système eucaryote

Afin de s'affranchir des difficultés associées au repliement du scFv, nous avons mis en place un système d'expression dans des cellules eucaryotes, absent jusqu'alors du laboratoire. Ce système permet de produire des protéines dans un état très proche, voire identique, à celui retrouvé *in vivo* en termes de repliement correct, ou de modifications post-traductionnelles.

Concernant les cellules hôtes, nous nous sommes intéressés aux cellules HEK-293 qui sont des cellules de rein d'embryon humain transformées avec l'ADN d'adénovirus (Graham et al., 1977). Ces cellules étant humaines, l'immunogénicité des protéines recombinantes ainsi produites est limitée, ce qui ouvre donc la porte d'une potentielle application en thérapeutique. Nous avons choisi la lignée HEK-293T adhérente qui exprime l'antigène grand T du virus SV40 permettant une réplication épisomale des plasmides contenant l'origine SV40. Ce processus, en augmentant le nombre de copies du gène, permet d'amplifier la production. Actuellement près de 70% des protéines pharmaceutiques mises sur le marché sont produites dans les cellules CHO (cellules d'ovaires de hamster chinois) (De Jesus and Wurm, 2011) mais nous leur avons préféré les HEK-293T pour les raisons suivantes:

- Les HEK-293 sont largement utilisées à l'échelle du laboratoire.
- Elles sont facilement et efficacement transfectables au phosphate de calcium (CaP_i).
- Enfin, elles s'adaptent à une culture en suspension, permettant d'envisager un passage à une production à plus grande échelle.

Quant à l'expression, nous avons décidé de réaliser une production extracellulaire pour faciliter les étapes de purification, mais également pour que le scFv transite par le réticulum endoplasmique formant un milieu approprié (milieu oxydant, présence de chaperonnes…) afin d'aboutir à la conformation correcte du scFv 9G4H9. Dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, organites présents le long de la voie sécrétoire (Figure III-7), se déroulent les étapes de glycosylation.

Comme évoqué dans le chapitre I.A.5., le motif propre aux N-glycosylations est de type Asn-X-Ser/Thr. L'analyse de la séquence du scFv 9G4H9 permet de constater l'absence de tel site de glycosylation. Néanmoins, nous avons choisi d'installer l'expression eucaryote à partir du scFv 9G4H9 car son mécanisme réactionnel est connu au laboratoire, les paramètres cinétiques ont déjà été caractérisés, et différents outils d'étude ont été développés. Une fois le savoir-faire mis en place, ce système sera ensuite applicable à l'anticorps entier possédant un site de N-glycosylation sur chaque chaîne lourde.

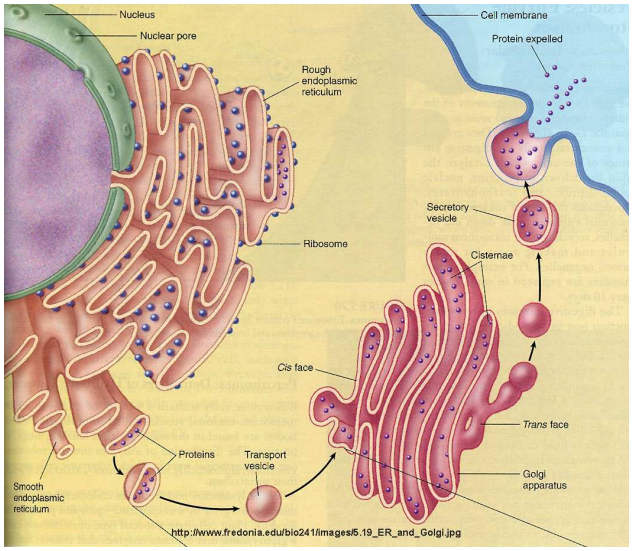


Figure III-7 : Voie sécrétoire des cellules de mammifères

Source : site biology 11 [4].

III.B.2.a Le fragment scFv 9G4H9

III.B.2.a.1 Construction du vecteur pour une expression dans les HEK293T

Le vecteur utilisé pour cette production est le plasmide commercial pSecTag2 présentant les caractéristiques suivantes :

- Une taille de 5167 nucléotides, à laquelle s'ajoute 790 nucléotides propres à l'insert, soit une taille attendue après clonage de 5957 nucléotides.
- Un promoteur constitutif fort : le CMV (Cytomégalovirus).
- La séquence du peptide signal de l'Igκ afin de permettre d'engager la protéine dans la voie sécrétoire de la cellule (Figure III-7).
- Deux étiquettes successives (6xHis et c-myc) en position C-terminale de la protéine recombinante, permettant une purification et une identification plus aisées du scFv.
- Deux gènes de résistance aux antibiotiques, contre l'ampicilline et la zéocine.

On remarque que dans ce vecteur, un des gènes de résistance est celui contre l'ampicilline qui code pour une β-lactamase. Or l'étude porte sur un scFv à activité β-lactamase. Afin d'éviter une éventuelle fuite de l'expression de ce gène, nous l'avons inactivé en utilisant un kit QuickChange™ , dans le but de muter la Ser70 indispensable au maintien de l'activité β-lactamase (Jacob et al., 1991). La vérification de la mutation s'est faite par séquençage d'une part, et par contrôle de la perte de la résistance à l'ampicilline des cultures de bactéries transformées avec le vecteur muté d'autre part. La sélection des clones ayant intégré la bonne construction est réalisée grâce au deuxième gène de résistance à un autre antibiotique : la zéocine.

Ce vecteur pSecTag2 est fourni sous la forme de trois variants de séquence. Ils sont nommés pSecTag2A, pSecTag2B et pSecTag2C, et diffèrent au niveau d'une petite séquence entraînant un décalage dans le cadre de lecture. Ceci évite d'effectuer des modifications sur l'insert, puisqu'il suffit de choisir le plasmide qui permet de conserver le cadre de lecture pour une expression correcte de la protéine d'intérêt. Ici le plasmide permettant de conserver l'alignement de phase entre le peptide signal (sur le plasmide) et la séquence codant le scFv 9G4H9 (sur l'insert) est pSecTag2C.

Même si ce plasmide possède des étiquettes, nous avons fait le choix de transférer le gène codant le scFv 9G4H9 avec l'étiquette 6xHis du plasmide pET26b/scFv9G4H9. Cette démarche évite l'ajout de séquences inutiles entre le gène du scFv et l'étiquette aboutissant à une séquence protéique quasiment identique à celle produite dans le système procaryote (6 a.a. de différence dans la partie N-ter). Ainsi, l'étiquette 6xHis propre au vecteur eucaryote n'est finalement pas utilisée dans notre construction.

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPADIVITQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGNT
YLYWFLQRPGQSPQRLIYYMSNLASGVPDRFSGRGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCMQS
LEYPLTFGAGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGEFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY
SFTDYNMNWVKQSNGKSLEWIGVINPNYGTTSYNQKFKGKATLTVDQSSSTAYMQLNSLT
SEDSAVYYCARGLRRYFDYWGQGTTLTVSSAAALEHHHHHH

Figure III-8: Séquence protéique du scFv 9G4H9 dans le vecteur pSecTag2C

La séquence signal de l'Igκ est représentée en violet. La région variable de la chaîne légère est colorée en bleu. Entre les deux, il y a six a.a. représentés en noir provenant du vecteur pSecTag2C et se trouvant ajoutés à la séquence du scFv. La région variable de la chaîne lourde est en vert. L'espaceur peptidique est indiqué en rouge. L'étiquette 6xHis en C-Term est en jaune. Les deux a.a. en gris proviennent du vecteur pET26b. La protéine a une masse moléculaire de 28,70 kDa après clivage de la séquence signal.

Le clonage a été réalisé par PCR à partir du plasmide pET26b/scFv9G4H9. Les amorces ont été conçues avec des bouts flottants permettant d'ajouter les séquences des sites cibles de l'enzyme de restriction SfiI, afin d'insérer le gène d'intérêt au niveau du site multiple de clonage du plasmide pSecTag2C (annexe A.1. et Figure III-9).

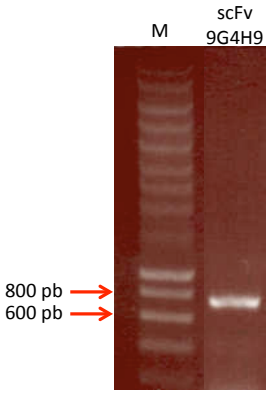


Figure III-9 : Amplification du gène codant le scFv 9G4H9 pour un clonage dans un vecteur d'expression eucaryote.

Analyse sur gel d'agarose 0,8% du résultat de PCR. M : marqueur de taille exprimé en paires de bases (pb) ; scFv 9G4H9 : séquence du scFv amplifiée par PCR.

Les produits de PCR sont difficiles à digérer par les enzymes de restriction lorsque les sites sont localisés aux extrémités de la molécule d'ADN. Afin d'optimiser ces étapes et de visualiser la coupure au niveau des sites de l'enzyme de restriction, nous avons décidé d'utiliser un système de sous-clonage. Nous avons choisi le système pGEM®-T easy (Promega) avec un plasmide ne contenant pas le site de restriction de SfiI. Ce plasmide est stabilisé sous sa forme linéaire et une ligation avec un produit de PCR entraîne sa circularisation. Le produit de la restriction enzymatique par SfiI est finalement visualisable sur gel d'agarose sous la forme d'une bande migrant approximativement à 800 pb, taille attendue du fragment scFv 9G4H9 (790 pb).

Après purification de la bande issue de la restriction par SfiI via le kit Gel Extraction (Qiagen), celle-ci est mise en contact avec le vecteur pSecTag2C qui a été précédemment digéré avec SfiI et déphosphorylé pour empêcher sa re-circularisation sans l'ajout de l'insert. Le produit de la ligation est utilisé pour transformer des bactéries JM109 par choc thermique (annexe B.1.). Seules les bactéries ayant intégré le plasmide pSecTag2C re-circularisé avec l'insert ou non digéré auront la capacité de survivre et de se multiplier dans un milieu contenant de la zéocine pour former une colonie.

Afin de vérifier la présence du plasmide pSecTag2C/scFv9G4H9 parmi les colonies ayant poussé, une PCR sur colonies de contrôle est réalisée. Les clones positifs (ayant intégré l'insert) sont mis en culture pour réaliser une extraction plasmidique (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) afin de contrôler la construction par restriction enzymatique et séquençage.

Ce clonage a ainsi été réalisé avec succès grâce à la validation par le résultat de la digestion enzymatique présenté dans la figure III-10, et par séquençage.

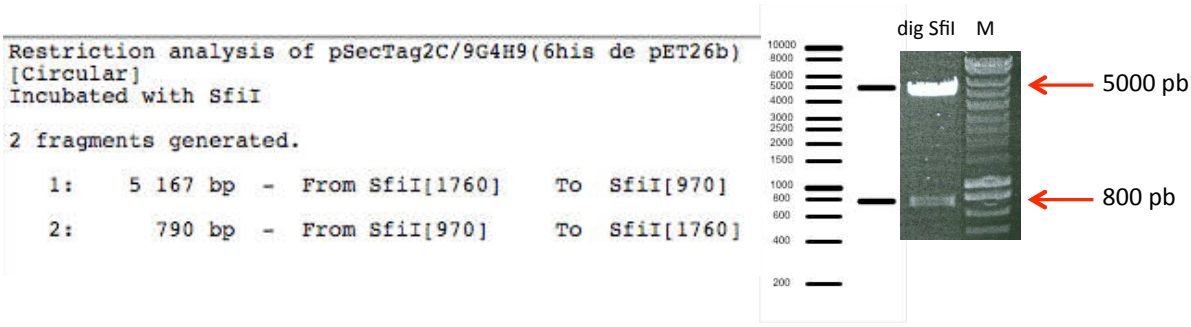


Figure III-10 : Contrôle de la présence du scFv 9G4H9 dans pSecTag2C par restriction

La digestion est simulée grâce au logiciel SerialCloner (à gauche). Après réalisation experimentale, le produit de la digestion est déposé sur gel d'agarose 0,8% (à droite). M : marqueur de taille exprimé en paires de bases (pb) ; dig SfiI : produit de la digestion du vecteur pSecTag2C/scFv9G4H9 par SfII.

III.B.2.a.2 Transfection

Il existe plusieurs façons de livrer des gènes dans une cellule : (1) La transduction via l'utilisation d'un virus, ou (2) la transfection de gènes non médiée par un virus. Ce dernier processus propre aux cellules eucaryotes est l'équivalent de la transformation chez les bactéries. Mais le terme de transformation n'est pas utilisé avec les cellules de mammifères pour désigner le transfert de gènes car il est associé à une prolifération anarchique des cellules animales lors du développement de cancers. Il existe plusieurs méthodes de transfection, les plus classiques étant : la précipitation au phosphate de calcium, l'utilisation de liposomes ou d'agents polycationiques, l'électroporation, le choc thermique, et enfin le bombardement de particules (pour revue : Washbourne and McAllister, 2002).

Nous avons fait le choix d'une tansfection au phosphate de calcium (CaP_i) mise au point dans les années 1970 (Graham and Van der Eb, 1973) car c'est une technique simple (Hopkins et al., 2012; Pham et al., 2006; Washbourne and McAllister, 2002), peu coûteuse et très efficace pour transfecter les cellules HEK-293, atteignant des taux de 80-90% de cellules transfectées (Baldi et al., 2007). La réaction entre le CaP_i et l'ADN entraîne la formation de précipités qui vont être endocytés par les cellules (Pham et al., 2006). Les précipités sont visibles sur la figure III-11. Par un mécanisme encore mal déterminé, le plasmide atteint le noyau et le gène d'intérêt est exprimé en utilisant la machinerie de transcription et de traduction de la cellule hôte.

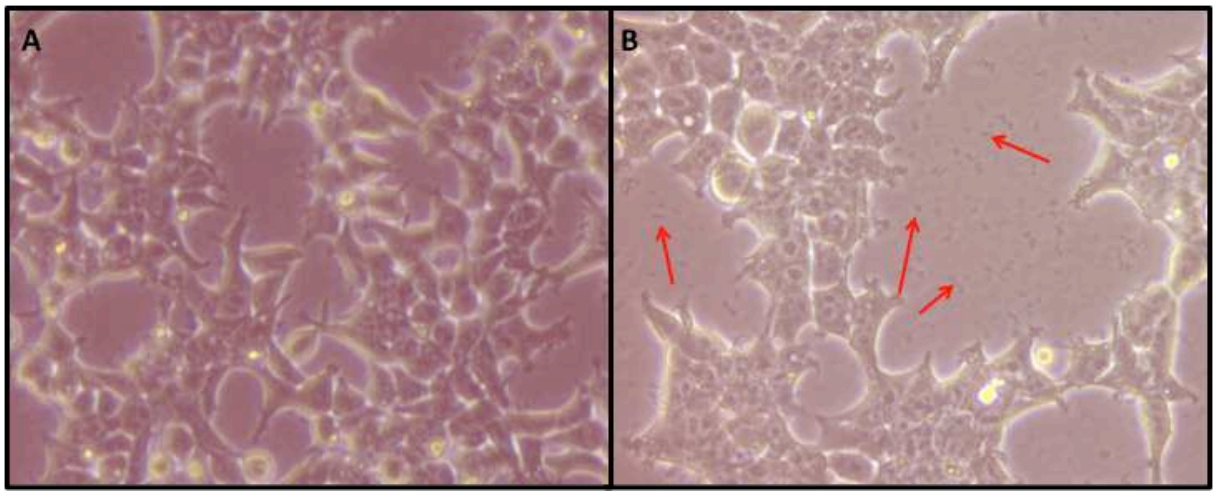


Figure III-11 : Cellules HEK-293T en contact avec les précipités ADN/CaP_i
Observation des cellules HEK-293T au microscope photonique. Photos prises avant (A) et après (B) transfection. Quelques précipités ADN/CaP_i sont ciblés par des flèches rouges. Grossissement : x400.

Des travaux préliminaires ont montré qu'une confluence cellulaire de 80-90% et une quantité de plasmide de 10 µg en boîtes de cultures cellulaires de 10 cm représentent les meilleurs conditions de transfection. Les conditions expérimentales précises de la transfection sont indiquées en annexe C.1.

III.B.2.a.3 Purification

Le principe de la méthode de purification est le même que décrit précédemment, une chromatographie d'affinité avec des billes d'agarose avec du Ni-NTA. Les cellules eucaryotes permettant d'obtenir, en théorie, les protéines avec une conformation correcte, la purification s'effectue donc en condition native. Le protocole expérimental est détaillé en annexe B.2.a.

L'éluat contenant le scFv 9G4H9 est mis en dialyse contre du tampon phosphate 0,1M à 4°C toute une nuit afin d'éliminer l'imidazole grâce à une membrane dont le seuil de coupure est de 12 kDa. Les protéines de l'échantillon sont ensuite dosées par la technique BCA et déposées sur gel de polyacrylamide. Pour vérifier spécifiquement la présence du scFv 9G4H9 dans l'éluat, nous avons également réalisé un Western Blot en utilisant un anticorps anti-6His (Santa Cruz) couplé à la HRP (pour Horse Radish Peroxidase) pour la révélation (annexe D.3.). Un exemple de résultat typique est représenté en figure III-12.

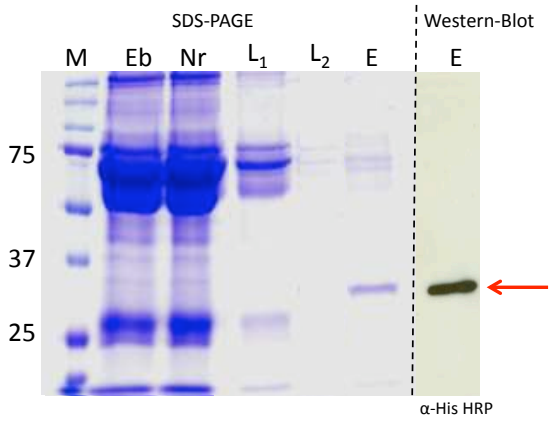


Figure III-12 : Analyse de la purification du scFv 9G4H9 cytoplasmique

Analyse de la purification du scFv 9G4H9 sur gel acrylamide à 10%, révélé au bleu de Coomassie (partie de gauche) et par Western Blot (partie de droite) : M : marqueur de poids moléculaire exprimé en kDa (Dual Color Standards, Bio-Rad); Eb : extrait brut du surnageant cellulaire ; Nr : fraction contenant les protéines non retenues ; L1 et L2 : fractions obtenues après les deux étapes de lavage; E : fraction d'élution contenant le scFv 9G4H9 purifié et localisé par une flêche rouge.

On remarque la présence résiduelle de protéines exogènes. Une modification du milieu de culture cellulaire en diminuant la teneur en sérum de 10 à 2% a permis de diminuer les protéines contaminantes dans l'éluat mais pas de les supprimer complètement. Cela se matérialise par de nombreuses bandes intenses au niveau de la piste Eb sur le gel coloré au bleu de Coomassie. La *quasi* totalité de ces protéines est éliminée dans les fractions Nr, L_1 et L_2. La fraction d'élution (E) contient finalement peu de protéines contaminantes, et une bande relativement intense entre 25 et 37 kDa, absente des autres pistes, ce qui signifie qu'il n'y pas ou peu de perte lors de la purification. Cette bande représente bien le scFv 9G4H9 car elle est révélée par un anticorps anti-6His qui reconnaît l'étiquette 6xHis du scFv.

Le scFv 9G4H9 est ensuite dosé par un test BCA. A la différence du scFv 9G4H9 cytoplasmique, l'évaluation du taux de pureté a été réalisée grâce au logiciel GeneTools (Syngene) qui évalue le rapport entre la taille et l'intensité des différentes bandes du gel de polyacrylamide. Les taux de pureté obtenus dans ces conditions sont compris entre 70 et 95%.

Conclusion

Cette voie d'expression en système eucaryote a permis d'obtenir des quantités de quelques mg/L de culture (classiquement de 0,5 à 80 mg/L). Ce rendement est en corrélation avec ce que l'on peut retrouver dans la littérature pour des expressions dans des cellules de mammifères adhérentes et en expression transitoire (Baldi et al., 2007; Schirrmann et al., 2008; Wurm, 2004). La réussite de l'expression du scFv dans ce système d'expression eucaryote a permis d'envisager la production de l'anticorps 9G4H9 entier.

III.B.2.b L'anticorps 9G4H9 chimérique

III.B.2.b.1 Construction des vecteurs pour une expression dans les cellules HEK293T

La difficulté dans la production d'un anticorps repose sur sa structure polymérique et son organisation génétique particulière, chaque chaîne étant codée par deux gènes indépendants. Il est donc nécessaire d'insérer et de co-exprimer ces deux gènes dans la cellule hôte. Il existe plusieurs systèmes de co-expression de gènes dont les principaux sont cités ci-dessous et illustrés dans la figure III-13 :

- Co-transfection de deux vecteurs indépendants (Norderhaug et al., 1997).
- Transfection d'un vecteur unique à plusieurs promoteurs (Lucas et al., 1996).
- Transfection d'un vecteur unique à IRES (pour Internal Ribosome Entry Site) (Holcik et al., 2000).
- Transfection d'un vecteur unique à épissage alternatif (Fallot et al., 2009).

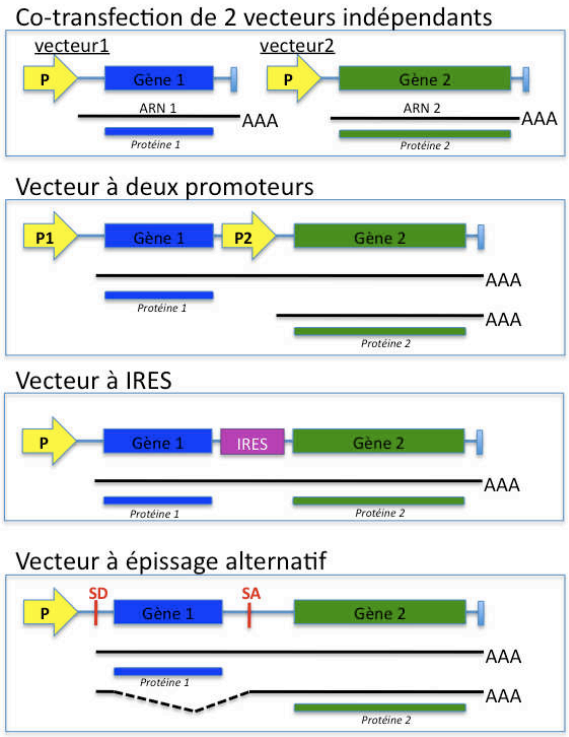


Figure III-13 : Systèmes de co-expression de gènes

Schéma de différents systèmes de co-expression de deux gènes. Les flèches jaunes indiquent les promoteurs. Les lignes noires représentent les ARN messagers polyadénylés (ARNm). SD et SA sur le vecteur à épissage alternatif indiquent respectivement les sites Donneur et Accepteur qui sont utilisés pour l'épissage de l'ARNm.

Nous avons fait le choix d'utiliser deux vecteurs, codant chacun pour une chaîne, en raison de la simplicité de mise en place et de manipulation. L'anticorps 9G4H9 généré chez la souris est une IgG2aκ mais nous avons pris la décision de greffer les domaines variables de 9G4H9 sur une architecture constante d'IgG1 humaine. C'est une immunoglobuline très bien

caractérisée, et la plus utilisée dans le domaine de la thérapie (Tableau I-3). La charpente est de ce fait aisément disponible commercialement. Les deux plasmides utilisés sont des pFUSE de chez InvivoGen :

- pFUSE-HC pour le plasmide contenant la séquence codant pour les 3 domaines constants de la chaîne lourde.
- pFUSE-LC pour le plasmide contenant la séquence codant pour le domaine constant de la chaîne légère.

Les caractéristiques principales de ces vecteurs sont les suivantes :

- Un promoteur constitutif fort : le EF1-α (elongation factor-1 alpha).
- La séquence du peptide signal de l'IL2, permettant d'engager la protéine dans la voie sécrétoire de la cellule (Figure III-7).
- Un gène de résistance à un antibiotique : la zéocine pour pFUSE-HC et la blasticidine S pour pFUSE-LC. La présence de deux gènes de résistance à des antibiotiques différents sur chaque vecteur permet d'envisager une transfection stable.

Le principe est de réaliser une PCR sur le gène du scFv 9G4H9 afin d'amplifier séparément les séquences codant pour les deux domaines variables, puis d'associer ces séquences aux séquences codant les régions constantes des chaînes lourde et légère humaines. On obtient de la sorte un anticorps chimérique noté $AC_{chi}9G4H9$. Pour la conception des amorces nécessaires au clonage, une attention particulière est portée à la conservation de l'alignement de phase entre la séquence signal de l'IL2, la séquence du domaine variable et la séquence de la partie constante de chaque chaîne. Ainsi les domaines variables de l'$AC_{chi}9G4H9$ sont identiques à ceux du scFv 9G4H9.

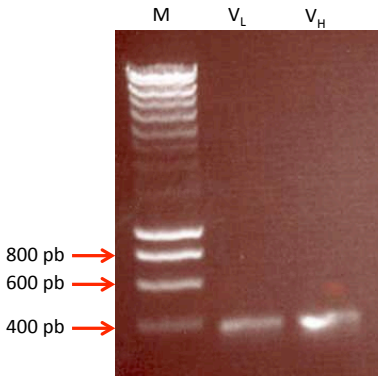


Figure III-14 : Amplification des séquences codant les domaines VL et VH du scFv 9G4H9 pour un clonage dans les vecteurs d'expression eucaryote pFUSE.

Analyse sur gel d'agarose 0,8% des résultats de PCR. M : marqueur de taille exprimé en paires de bases (pb) ; V_L : séquence du domaine V_L du scFv 9G4H9 amplifiée par PCR ; V_H : séquence du domaine V_H du scFv 9G4H9 amplifiée par PCR.

Les étapes de clonage et de sous-clonage sont identiques à celles effectuées lors du clonage du scFv 9G4H9 dans le vecteur pSecTag2C (cf. § III.B.2.a.1). Les plasmides obtenus sont appelés pFUSE-HC/V_H9G4H9 pour l'expression de la chaîne lourde et pFUSE-LC/V_L9G4H9 pour l'expression de la chaîne légère. Les séquences des deux gènes sont indiquées dans la figure III-15.

pFUSE-HC/V_H9G4H9 :

MYRMQLLSCIALSLALVTNSGEFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNMNWVKQSNGKSLEWIGVINPNY
GTTSYNQKFKGKATLTVDQSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARGLRRYFDYWGQGTTLTVSSAAAISSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

pFUSE-LC/V_L9G4H9 :

MYRMQLLSCIALSLALVTNSPVDIVITQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGNTYLYWFLQRPGQSPQRLIYYM
SNLASGVPDRFSGRGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCMQSLEYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC

Figure III-15 : Séquences protéiques de l'AC_{chi}9G4H9 dans les vecteurs pFUSE

La séquence signal de l'IL2 est représentée en marron. La chaîne légère est en bleu (bleu clair pour le domaine V_L) et la chaîne lourde est en vert (vert clair pour le domaine V_H). Les a.a. représentés en noir proviennent des vecteurs pFUSE et se trouvent ajoutés aux séquences. Après clivage de la séquence signal, les protéines ont une masse moléculaire de 49,71 kDa pour la chaine lourde et 24,29 kDa pour la chaine légère.

Les clonages sont validés par restrictions enzymatiques et séquençages des vecteurs pFUSE. Les produits des restrictions enzymatiques sont présentés dans la figure III-16 ci-dessous.

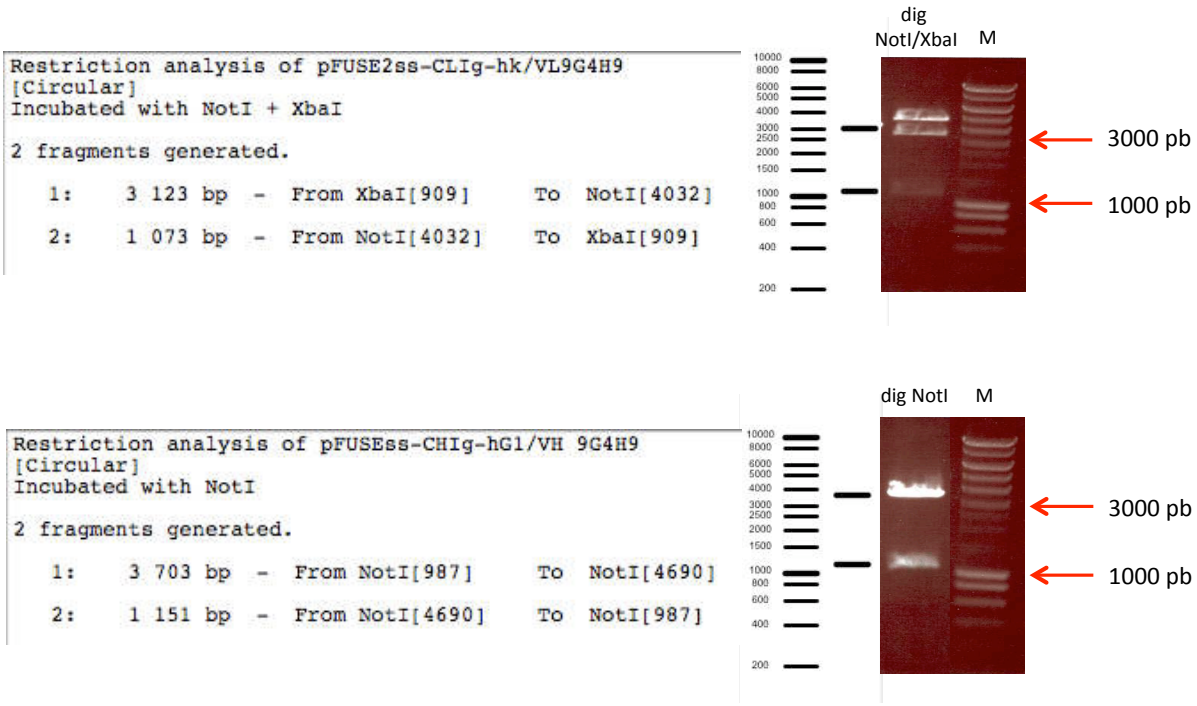


Figure III-16 : Contrôle de la présence des séquences variables du scFv 9G4H9 dans les vecteurs pFUSE
Les digestions sont simulées grâce au logiciel SerialCloner (à gauche). Après réalisation experimentale, les produits des digestions sont déposés sur gel d'agarose 0,8% (à droite). M : marqueur de taille exprimé en paires de bases (pb) ; dig NotI/XbaI : produit de la digestion du vecteur pFUSE-LC/V_L9G4H9 par les enzymes NotI et XbaI (on observe une bande à 4000 pb correspondant au plasmide monodigéré) ; dig NotI: produit de la digestion du vecteur pFUSE-HC/V_H9G4H9 par NotI.

III.B.2.b.2 Transfection

Là encore, la stratégie de transfection utilisée est similaire à l'approche décrite précédemment (cf. § III.B.2.a.2 et annexe C.1.). Cependant, la présence de deux plasmides est à l'origine des modifications suivantes :

- La quantité d'ADN transfectée est répartie équitablement entre les deux constructions : 5 µg de pFUSE-HC/V_H9G4H9 et 5 µg de pFUSE-LC/V_L9G4H9. La raison de cette répartition vient d'une étude montrant que la meilleure productivité d'un anticorps recombinant par des cellules de mammifère est obtenue grâce à un ratio 1:1 des deux gènes co-exprimés (Hotta et al., 2004).
- Le sérum de veau contient des immunoglobulines bovines qui peuvent être co-purifiées avec l'anticorps recombinant AC_{chi}9G4H9. Pour s'affranchir de ce problème, le sérum est déplété en immunoglobulines d'après le protocole décrit dans l'annexe C.3. Une autre possibilité aurait été de s'affranchir du sérum en utilisant des milieux commerciaux sans sérum, afin de permettre la survie des cellules en l'absence totale de protéines dans le milieu. Nous n'avons pas utilisé ce type de milieu car une étude a suggéré la présence résiduelle d'anticorps dans ces milieux (Rasmussen et al., 2005).

III.B.2.b.3 Purification

Contrairement aux constructions précédentes, il n'y a pas d'étiquette sur la protéine recombinante. La purification de l'AC_{chi}9G4H9 s'effectue par chromatographie d'affinité sur protéine A. la protéine A reconnaît spécifiquement les régions Fc des immunoglobulines, en particulier des IgG1, IgG2 et IgG4. Le détail du protocole est présenté en annexe C.2.b. et un exemple de résultat de purification est illustré en figure III-17.

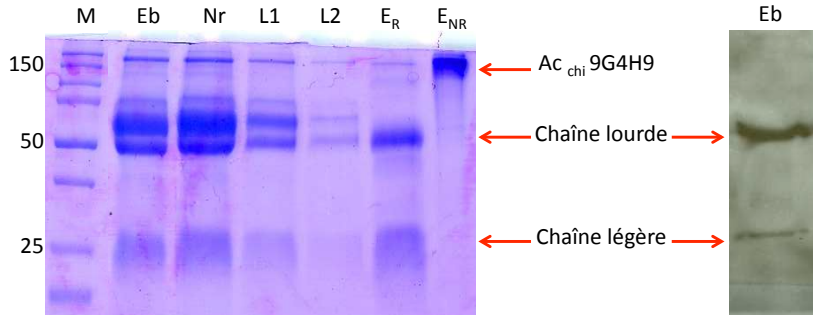


Figure III-17 : Analyse de la purification de l'AC_{chi}9G4H9

Analyse des différentes étapes de purification de l' Ac_{chi} 9G4H9 sur gel d'acrylamide à 10% révélé au bleu de Coomassie et par Western Blot (pour la fraction Eb en conditions réductrices) : M : marqueur de poids moléculaire exprimé en kDa (Dual Color Standards, Bio-Rad); Eb : extrait brut du surnageant cellulaire ; Nr : fraction contenant les protéines non retenues ; L1 et L2 : fractions obtenues après les deux étapes de lavage; E_R : fraction d'élution en condition réductrice ; E_{NR} : fraction d'élution en condition non réductrice . L'AC_{chi} 9G4H9 et les deux chaînes issues de sa réduction par le β-mercaptoéthanol sont localisés par des flêches rouges.

L'observation de ce gel permet de conclure à une purification efficace de l'anticorps chimérique 9G4H9 car il y a une bande unique à environ 150 kDa en piste « E_{NR} ». Après réduction de la protéine et dépôt en piste « E_R », on observe également un profil spécifique des IgG avec deux bandes caractéristiques à 25 et 50 kDa, attribuables à la chaîne légère et à la chaîne lourde respectivement.

Conclusion

Par cette voie d'expression, on obtient des quantités d'anticorps de l'ordre du mg/L de culture, ce qui est comparable à la production du scFv dans ce même système. Des quantités comparables sont mentionnées dans une autre étude utilisant des cellules similaires et des vecteurs portant le même promoteur (Backliwal et al., 2008).

III.B.2.c Bilan comparatif des différentes productions du scFv 9G4H9

Un bilan comparatif des productions dans les différents systèmes exploités est représenté dans la figure III-18. Il en ressort que le rendement optimal est obtenu lors d'une expression procaryote par voie cytoplasmique, avec une moyenne de 32 mg de scFv par litre de culture.

L'expression procaryote par la voie périplasmique ne permet pas d'envisager des études structurales et biochimique poussées. La production par excrétion dans les cellules HEK-293T, comme la production par voie périplasmique dans *E.coli*, permettent d'obtenir la protéine recombinante dans son état natif, à l'exception des modifications post-traductionnelles propres aux cellules de mammifères. Mais le système eucaryote permet une production beaucoup plus élevée que le système périplasmique, avec des rendements plus de 12 fois supérieurs. En outre, le rendement de production des cellules eucaryotes est d'environ 5 mg/L, quel que soit le format d'anticorps produit. Ce rendement reste 6 fois inférieur à celui d'une production procaryote par voie cytoplasmique, mais présente l'avantage de pouvoir produire des protéines complexes comme ici une immunoglobuline entière.

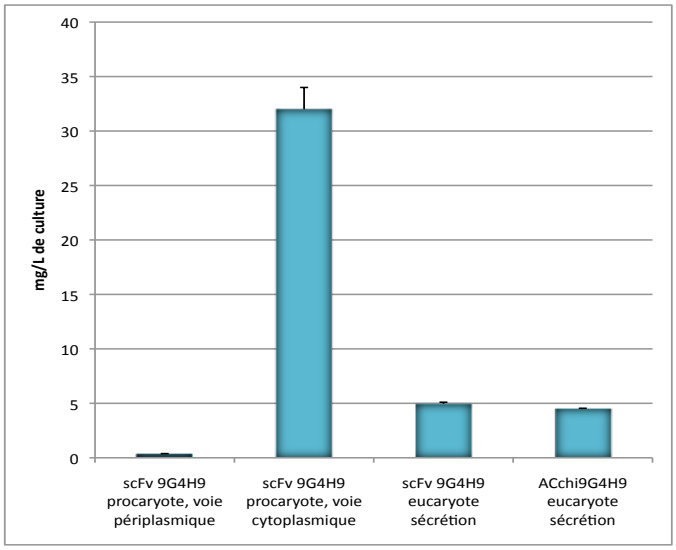


Figure III-18 : Bilan quantitatif des productions

Production de l'AC_{chi}9G4H9 et de son dérivé scFv dans les différents systèmes d'expression exploités. Les moyennes proviennent de différentes expériences (n= 2 à 5 selon les systèmes).

Outre le rendement de production, un autre élément important à prendre en compte est le coût des différentes productions, l'aspect économique représentant un facteur critique en biotechnologie. Les productions réalisées lors de ce projet reposent sur différents systèmes, procédés d'extraction et de purification, et les coûts s'en trouvent impactés. Le coût comparatif ainsi que certains critères spécifiques des protéines produites et des systèmes d'expressions exploités sont présentés dans le tableau III-1. Ainsi, on constate que les productions procaryotes sont moins coûteuses. Néanmoins, lorsqu'une renaturation est nécessaire comme dans le cas d'une production cytoplasmique, il y a une augmentation

considérable du coût et de la durée d'obtention de la protéine d'intérêt dans un état fonctionnel. Dans certains cas, les productions procaryotes peuvent ainsi atteindre des coûts aussi elevés que ceux des productions eucaryotes en cellules de mammifères. Toutefois, les moyens humains et matériels à mettre en place pour des productions chez les bactéries sont les plus simples sur l'ensemble des systèmes d'expression. Ceci explique qu'à l'heure actuelle, ce système reste le plus utilisé pour l'expression de protéines recombinantes (Demain and Vaishnav, 2009).

Tableau III-1 : Comparaison technique et financière des systèmes d'expression exploités

		Système procaryote		Système eucaryote	
		Périplasme scFv	Cytoplasme scFv	Sécrétion scFv	Sécrétion anticorps
Temps de production d'une protéine fonctionnelle [1]		2 jours	6 jours	3 à 4 jours	3 à 4 jours
Qualification du personnel		Faible		Elevée	
Coût	Culture	+	+	+++	+++
	Purification	+	+	+	++
	Renaturation	-	+++	-	-
Type d'application possible		Caractérisation biochimique.	Caractérisation biochimique et structurale. Potentielle application diagnostique.	Caractérisation biochimique et structurale. Potentielle application thérapeutique ou diagnostique.	

[1] *fonctionnelle : conformation tridimensionnelle correcte permettant une activité biologique.*

III.C Caractérisation biochimique et structurale de 9G4H9

L'obtention d'une protéine soluble ne signifie pas nécessairement qu'elle est dans un état fonctionnel. Après avoir produit l'AC_{chi}9G4H9 et son dérivé scFv dans différents systèmes d'expression, nous avons étudié leur fonctionnalité. Dans ce contexte, nous avons développé une première approche structurale, et mis en place des tests fonctionnels visant à caractériser les propriétés de reconnaissance et de catalyse de l'AC_{chi}9G4H9 et de ses fragments dérivés.

III.C.1 Approche structurale par dichroïsme circulaire

Il existe plusieurs techniques pour déterminer la structure des protéines : le dichroïsme circulaire, la cristallographie par diffraction des rayons X et la spectroscopie RMN (pour Résonance Magnétique Nucléaire). Nous avons décidé d'utiliser en première intention le dichroïsme circulaire car cette technique, plus rapide et plus facile à mettre en œuvre, ne nécessite pas de grandes quantités de protéines.

Le principe est le suivant : en fonction de leur organisation, les protéines absorbent de façon inégale la lumière selon que sa polarisation est circulaire droite ou circulaire gauche (Kelly

and Price, 2000). Cette caractéristique permet d'obtenir des spectres reflétant l'organisation secondaire des protéines (Figure III-19).

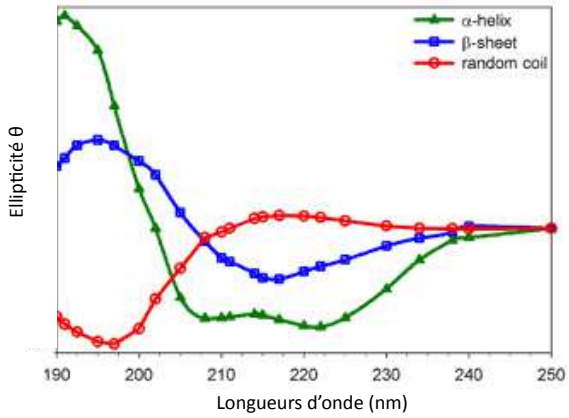


Figure III-19 : Principaux profils en dichroïsme circulaire dans l'UV lointain
En vert : profil du spectre d'une protéine riche en hélices α ; en bleu : profil du spectre d'une protéine riche en feuillets β ; en rouge : profil du spectre d'une protéine non structurée (conformation aléatoire).
Source : site de l'université de Leeds [5].

Deux plages de longueurs d'ondes sont exploitables :

- L'UV lointain (190-250 nm) rend compte de la structure secondaire, car les liaisons peptidiques absorbent majoritairement dans cette gamme de longueur d'onde.
- L'UV proche (260-320 nm) rend compte de la présence ou non d'une structure tertiaire de la protéine. Ce sont essentiellement les chaînes latérales des résidus aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) qui absorbent dans cette région.

L'objectif est de vérifier l'organisation secondaire des scFv produits. Des résultats de cristallographie ont montré la forte organisation en feuillets β des scFv (comme pour toutes les immunoglobulines et dérivés). Les déconvolutions de différents spectres montrent une organisation contenant entre 40 et 50% de feuillets β dans les structures des scFv (Gunnarsen et al., 2010; Song et al., 2011)

Cette technologie n'est pas disponible au laboratoire. Mais cette expérience a pu être réalisée grâce à la mise à disposition du matériel par le Professeur Matagne à l'Institut de Chimie de Liège. Peu d'échantillons ont pu être testés et seuls les spectres du scFv 9G4H9 exprimé en système procaryote par la voie cytoplasmique après le protocole de renaturation et du scFv 9G4H9 sécrété par les cellules eucaryotes ont pu être obtenus. La concentration saline du tampon phosphate dans lequel se trouvent les deux scFv a été diminuée à 10mM afin d'assurer une compatibilité avec cette technique (annexe F.). Le signal lié au tampon phosphate a été retranché et les spectres obtenus sont présentés dans la figure III-20.

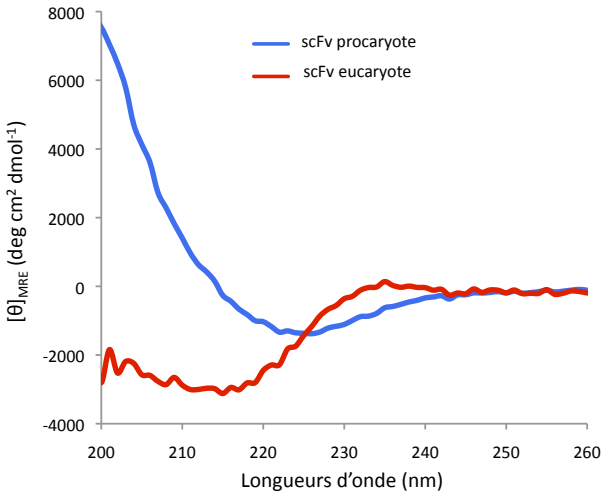


Figure III-20 : Spectres DC dans l'UV lointain des scFv 9G4H9

Le spectre, obtenu par dichroïsme circulaire, du scFv 9G4H9 procaryote en voie cytoplasmique à 300 µg/ml est représenté en bleu. Celui du scFv 9G4H9 eucaryote à 150 µg/ml est en rouge.

Les mesures n'ont pu être réalisées en deçà de 200 nm en raison de la forte absorbance du tampon phosphate dans ces longueurs d'ondes. De plus, le changement de la concentration saline du tampon évoqué précédemment constitue un risque de modification des structures, voire d'agrégation des protéines.

Malgré des séquences quasiment identiques entre ces deux scFv, on observe des spectres totalement différents. Concernant le scFv 9G4H9 exprimé en système procaryote par la voie cytoplasmique, le spectre présente un minimum entre 220 et 230 nm et un maximum aux alentours de 200 nm. Ce profile est similaire à ceux des protéines riches en feuillets β (Figure III-19). Afin de déterminer le pourcentage de feuillets β pour ce scFv, les données sont analysées par un logiciel en ligne : K2D3 (Louis-Jeune et al., 2011) [6]. Ce pourcentage est ainsi évalué à 41,5%, ce qui est en accord avec la littérature (Gunnarsen et al., 2010; Song et al., 2011). Le résultat inattendu de cette étude est le spectre du scFv produit dans les cellules HEK-293T. En effet, celui-ci présente le profil d'une protéine non structurée.

Conclusion

Le spectre du scFv procaryote obtenu en dichroïsme circulaire indique une structure riche en feuillets β, en adéquation avec la structure des scFv natifs. Ce résultat indique que le protocole de repliement qui succède la production et la purification du scFv 9G4H9 après exploitation de la voie cytoplasmique chez *E.coli* est efficace, et permet *in fine* d'obtenir la structure secondaire attendue du scFv 9G4H9. Concernant le scFv eucaryote, le système d'expression a pourtant été choisi pour la capacité des cellules à produire des protéines natives. N'ayant par encore determiné la raison de ce résultat, le travail de caractérisation biochimique a été poursuivi sur les scFv eucaryote et procaryote cytoplasmique.

III.C.2 Validation de la fonctionnalité : conservation de la capacité d'interaction

Des données structurales en faveur d'un scFv riche en feuillets β ne signifient pas forcément un maintien de la fonctionnalité. L'objectif ici est de vérifier le maintien du site de reconnaissance. Nous avons pour cela utilisé l'inhibiteur peptidique de l'activité β-lactamase, nommé Pep90 et décrit dans le paragraphe I.D.2.c.

Deux techniques ont ici été utilisées :

- La confirmation de la capacité de reconnaissance par ELISA (pour EnzymeLinked Immunosorbent Assay)
- L'étude des interactions protéiques par résonance plasmonique de surface (RPS)

III.C.2.a Test de la reconnaissance de Pep90 par le scFv 9G4H9

Divers formats ont été testés avec plus ou moins de succès. Dans ce chapitre sont présentés les deux formats montrant l'interaction entre Pep90 et les scFv issus d'une expression cytoplasmique procaryote ou d'une expression eucaryote. Les détails expérimentaux de ces deux tests sont décrits en annexe E.1.

Immobilisation du scFv (test 1) : le scFv est immobilisé puis mis en interaction avec Pep90 biotinylé. Un anticorps anti-biotine couplé à l'enzyme HRP permet de révéler l'interaction. Les interactions non spécifiques sont évaluées en réalisant un témoin négatif. Ce témoin est réalisé dans les mêmes conditions que le test mais en l'absence de scFv. Le signal du témoin est soustrait aux signaux des essais avec les scFv pour obtenir le signal spécifique de l'interaction. Un scFv témoin est testé en parallèle, il s'agit du scFv SAF34 (Padiolleau-Lefèvre et al., 2007). Ce scFv, spécifique de la protéine prion humaine, nous a été fourni par le Dr Boquet du CEA à Saclay. Il a été produit dans les mêmes conditions que le scFv 9G4H9. Les résultats sont présentés en figure III-21.

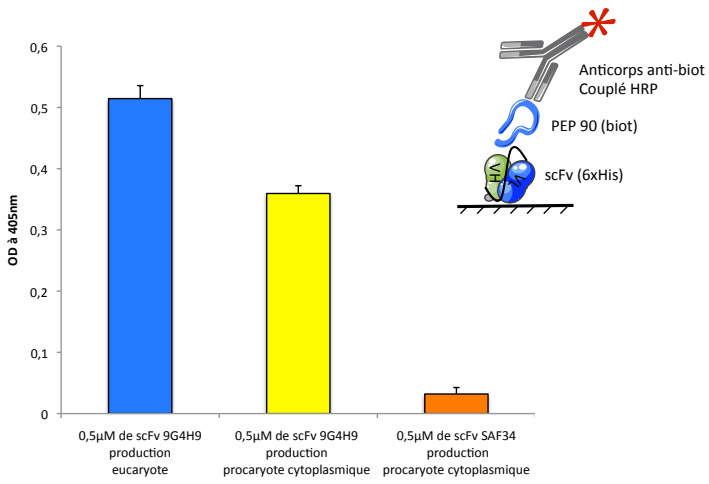


Figure III-21 : Interaction scFv-Pep90 (test 1)

Les signaux obtenus avec le scFv 9G4H9 sont plus de 10 fois supérieurs au test réalisé avec le scFv contrôle SAF34. Les résultats attestent de l'interaction spécifique entre le scFv 9G4H9 et le peptide inhibiteur Pep90. De plus, on note que le signal obtenu avec le scFv produit par les cellules HEK-293T est significativement plus élevé que celui du scFv 9G4H9 produit dans le cytoplasme d'*E.coli* pour une même quantité de scFv déposé lors de l'immobilisation. Deux hypothèses peuvent expliquer cette observation. En effet, ceci pourrait s'expliquer par le fait que les cellules mammifères aboutissent, en théorie, à des protéines natives alors que le scFv procaryote a subi un processus de repliement qui, même s'il semble efficace, n'aboutit pas forcément à 100% de protéines natives. Le taux de scFv incorrectement repliés pourrait être à l'origine de cette différence de signal. Il est également possible que lors de la sensibilisation de la plaque, l'immobilisation des scFv génère des sites de reconnaissance plus ou moins accessibles, et ce de façon aléatoire. Une différence de signal peut alors apparaître. Une telle différence de signal devrait néanmoins s'estomper en reproduisant plusieurs fois l'expérience. Un problème de reproductibilité, discuté ultérieurement en conclusion, ne nous a pas permis de valider cette hypothèse. Quoi qu'il en soit, cela constitue une limite à ce format et justifie notre choix de développer un second type de test.

Capture du scFv (test 2) : Pep90 est immobilisé puis mis en interaction avec le scFv. Un anticorps dirigé contre l'étiquette 6xHis couplé à l'enzyme HRP permet de révéler l'interaction. Le scFv SAF34 est également utilisé comme contrôle, ainsi qu'un témoin négatif réalisé dans les mêmes conditions mais en l'absence de scFv. Comme précédemment, le signal non spécifique du témoin négatif est soustrait aux essais obtenus avec les scFv. Les résultats obtenus avec les scFv procaryotes (voie cytoplasmique suivi d'un protocole de repliement) sont présentés dans la figure III-22. De façon surprenante, ce format n'a jamais permis d'obtenir de résultat exploitable et reproductible pour l'interaction entre le Pep90 et le scFv 9G4H9 produit dans les HEK-293T.

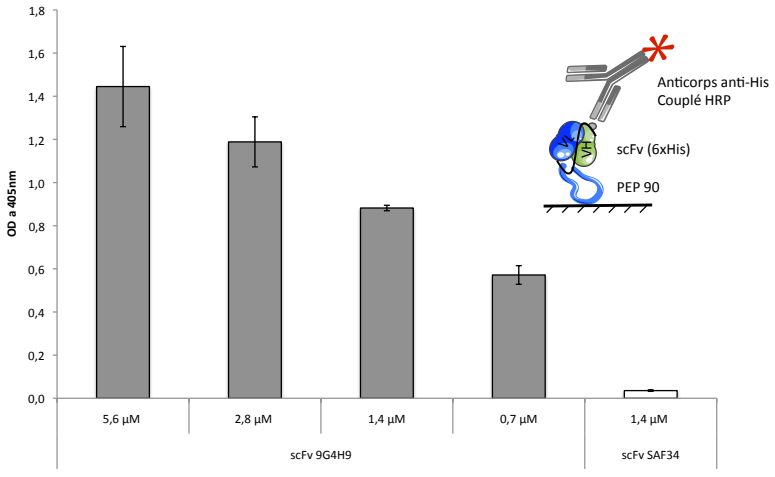


Figure III-22 : Interaction scFv-Pep90 (test 2)

La comparaison des signaux obtenus avec les scFv 9G4H9 procaryotes cytoplasmiques et SAF34 à 1,4 µM est une première indication de la spécificité d'interaction entre le scFv 9G4H9 et Pep90. Un test dose-réponse a été réalisé, montrant une augmentation du signal en corrélation avec une augmentation de la quantité de scFv 9G4H9. Cet effet dose-réponse indique la spécificité de l'interaction.

Conclusion

Ces tests valident l'interaction qui existe entre le scFv 9G4H9 et Pep90 mais soulèvent deux nouvelles questions : (1) quel est le pourcentage de scFv correctement repliés en fin de protocole de renaturation pour le scFv 9G4H9 procaryote ? Même si les scFv ont pu être isolés sous forme soluble, il est difficile de déterminer la part de scFv correctement repliés. (2) Pourquoi les expériences visant à montrer l'interaction entre le scFv 9G4H9 produit par les cellules HEK-293T et Pep90 ne sont pas reproductibles ? En théorie, les cellules eucaryotes permettent un repliement conformationel correct des protéines hétérologues. Or d'après les mesures en dichroïsme circulaire, le scFv 9G4H9 produit dans ce système ne serait pas correctement replié, le spectre obtenu suggérant une protéine non structurée (Figure III-20). Il est possible que selon les productions, le taux de scFv présentant une conformation correcte soit variable, entraînant plus ou moins de succès dans ces tests d'interaction. Il est également envisageable que la fonctionnalité du scFv diffère en fonction du système d'expression exploité. Par exemple, le scFv 9G4H9 eucaryote subirait des modifications post-traductionnelles au sein des cellules HEK-293T qui influeraient sur sa structure et donc la fonctionnalité de la protéine hétérologue. Les différentes hypothèses sont discutées plus en détail dans le chapitre IV.

III.C.2.a Test de la reconnaissance de Pep90 par l'anticorps 9G4H9 entier

La mise en place du système d'expression eucaryote a permis de produire le scFv 9G4H9 mais également l'anticorps entier AC_{chi}9G4H9. Des tests de validation du maintien de la capacité d'interaction avec Pep90 ont également été menés pour ce format plus complexe. Le format ayant préalablement permis de visualiser l'effet dose réponse a été appliqué à l'anticorps entier. La révélation de l'interaction est assurée par un anticorps reconnaissant spécifiquement la région Fc des immunoglobulines humaines. Les résultats de ce test sont présentés en figure III-23.

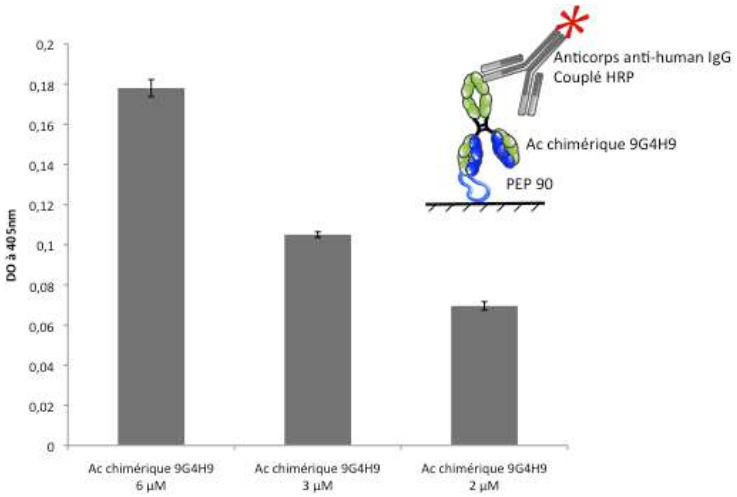


Figure III-23 : Interaction AC_{chi}9G4H9-Pep90

Les résultats attestent de l'interaction entre l' AC_{chi}9G4H9 et Pep90. L'effet dose-réponse permet de confirmer la spécificité de cette interaction. Les quantités obtenues ne nous ont pas permis de tester des concentrations plus élevées. Or, les valeurs des signaux sont faibles, avec une DO maximale de l'ordre de 0,2 pour une concentration de 6 µM. A concentration comparable (5,6 µM), le scFv engendre des signaux à plus de 1,4 de DO. L'encombrement stérique peut être à l'origine de ces faibles signaux. En effet, l'anticorps est cinq fois plus gros que le scFv, masquant probablement un grand nombre de Pep90.

Conclusion

Ce résultat montre la capacité de liaison au niveau de l'anticorps entier ce qui valide la construction moléculaire. Le transfert des domaines variables du scFv 9G4H9 sur une architecture de domaines constants d'IgG humaine conserve donc la capacité de liaison.

III.C.2.b Caractérisation de l'interaction par résonance plasmonique de surface

Afin d'approfondir la caractérisation de l'interaction des différents formats d'anticorps avec l'inhibiteur Pep90, nous avons utilisé la technologie Biacore basée sur la technique RPS schématisée en figure III-24.

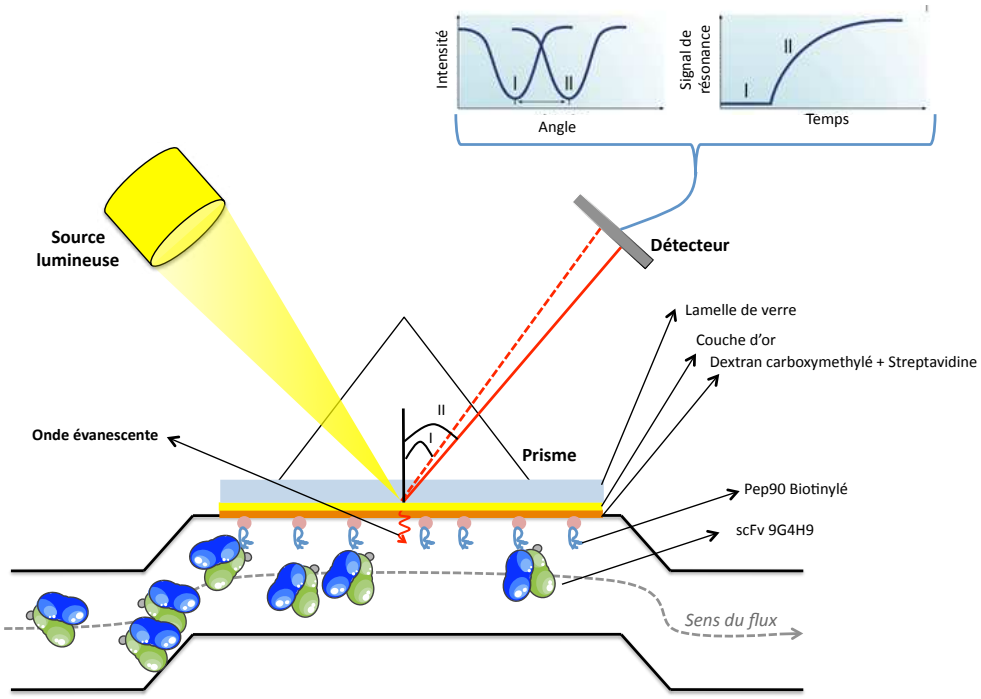


Figure III-24 : Principe de la résonance plasmonique de surface

Pour revues : Cooper, 2002; Willander and Al-Hilli, 2009.

Le principe de la RPS est le suivant : lorsqu'une lumière monochromatique arrive à l'interface de deux milieux avec des indices de réfraction différents, le rayon est en partie réfléchi. A partir d'un certain angle appelé θ, ou angle de résonnance, toute la lumière est réfléchie. Lorsque la surface d'interaction est métallique, les photons de la lumière excitent les électrons libres du métal. Cela crée une onde évanescente (ou plasmon), perpendiculairement à l'interface, qui induit une diminution de l'intensité de lumière, modifiant l'angle θ. La variation de θ dépend de l'environnement du champ évanescent. L'indice de réfraction est relié à la variation de masse à la surface du biocapteur. Cette variation est due à la formation et à la dissociation de complexes moléculaires. En suivant la variation de l'angle de résonance, cette technique nous permet de suivre en temps réel , et sans marquage spécifique, l'association et la dissociation entre le ligand fixé sur la surface métallique et l'analyte circulant. Le signal obtenu se présente sous la forme d'un sensorgramme avec le RU (unité de résonance) comme unité. Une variation de 1000 RU correspond classiquement à une fixation de 1 ng de protéine par mm^2 (Ferjoux et al., 2003).

L'expérience de fixation en temps réel a été réalisée avec le biocapteur Biacore T100 (BIAcore GE-Healthcare) d'après une adaptation des conditions de Phichith décrites en annexe E.3. (Phichith et al., 2009). Les puces fournies par BIAcore sont des lames de verre recouvertes d'une fine couche d'or. Dans le cas de cette étude, la puce est de type SA, où une couche de dextran carboxyméthylé pré-immobilisé avec de la streptavidine recouvre le métal. Cette puce permet d'immobiliser des partenaires d'interaction biotinylés comme ici le Pep90. L'immobilisation de Pep90 biotinylé atteint un signal de 200 RU. Le scFv soluble est injecté à un débit de 10 µl/min pendant 30 min (phase d'association). Cette étape est suivie par un flux de tampon de course seul pendant 20 min (phase de dissociation). Les sensorgrammes sont représentatifs des interactions spécifiques quand la mesure de la fixation non-spécifique (avec le tampon seul) est déduite.

Les sensorgrammes obtenus ont été traités avec le logiciel fourni par BIAcore qui permet un ajustement des données expérimentales à un modèle mathématique. La figure III-25 présente les résultats obtenus lors de l'interaction entre Pep90 biotinylé et différentes concentrations de scFv 9G4H9 procaryote produit par voie cytoplasmique.

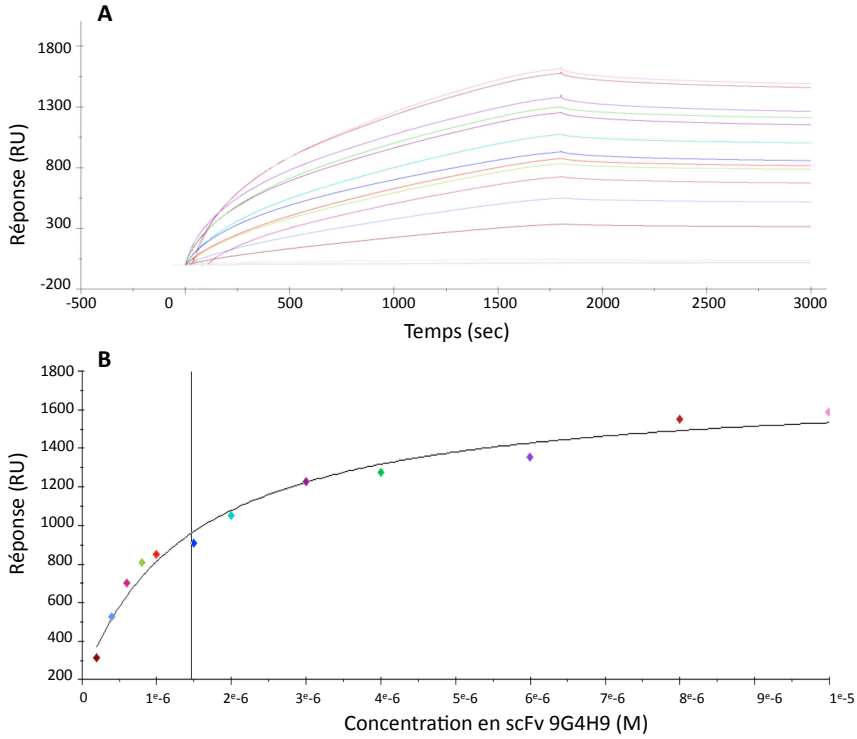


Figure III-25 : Analyse de l'interaction entre le scFv 9G4H9 et Pep90 par BIAcore

A) Analyse par RPS de l'interaction entre Pep90 et le scFv 9G4H9 produit par voie cytoplasmique après renaturation. Les concentrations testées sont : 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1,0 ; 1,5 ; 2,0 ; 3,0 , 4,0 ; 6,0 ; 8,0 ; et 10.0 µM. Sensorgrammes expérimentaux obtenus par la méthode Multi Cycle.
B) Les résultats ont été alignés grâce au modèle « Steady State Affinity ».

On observe pour toutes les concentrations les phases d'association et de dissociation. L'intensité du signal (en RU) augmente avec la concentration en scFv 9G4H9. L'alignement au modèle théorique valide la fiabilité des résultats obtenus. L'analyse de ces résultats a permis de déterminer un K_D de 1,47 ± 0,34 µM.

Cette expérience a également été réalisée dans les mêmes conditions avec l'AC_{chi}9G4H9. Les résultats étant encore préliminaires, il ne sont pas présentés ici mais en appliquant le même modèle mathématique, ils ont permis d'estimer un K_D de 98 ± 0,12 nM.

Conclusion

Ces résultats sont en parfaite adéquation avec ce qui a déjà été obtenu au laboratoire. Le K_D du scFv est comparable à celui obtenu avec le scFv périplasmique co-exprimé avec la chaperonne FKpA qui était de 5,2 µM (Phichith et al., 2009). Cette expérience valide également le système d'expression exploité et le protocole de renaturation associé.

Dans le cas de l'AC_{chi}9G4H9, même si les premiers essais montrent une interaction spécifique avec une affinité plus forte que celle du scFv pour Pep90 biotinylé, les tests doivent être renouvelés. Néanmoins, les valeurs du K_D sont proches de celles obtenus avec l'anticorps murin produit par voie ascitique (74 ± 16 nM, Phichith et al., 2009).

III.C.3 Validation de la fonctionnalité : conservation de la capacité d'hydrolyse

Démontrer la capacité de liaison est suffisant pour valider la fonctionnalité d'un anticorps mais pas pour des anticorps particuliers comme les abzymes où il est nécessaire, en plus, de valider la capacité de catalyse. Notre équipe a été confrontée à un problème majeur concernant le suivi spectrophotométrique de l'hydrolyse de l'ampicilline. En effet, le manque de sensibilité de cette technique, associé aux faibles activités catalytiques des anticorps produits, entraîne un manque de fiabilité et de reproductibilité des résultats. Afin d'obtenir des données plus robustes, nous avons développé une nouvelle technique de détection basée sur la fluorescence.

Le principe repose sur l'utilisation d'un substrat fluorogénique. Ce type de substrat est obtenu par l'association d'une molécule cible d'une enzyme et d'un fluorophore. Cette association empêche l'émission de fluorescence par le fluorophore, telle une sorte de « mise en cage » moléculaire, appelée « quenching » (Yaron et al., 1979; Mitchison, 1989). Cette technique est très sensible (Gao et al., 2003) et donc adaptée à la mesure de faibles activités. C'est la raison pour laquelle le développement de substrats fluorogéniques est en pleine augmentation ces dernières années (Beck and Sherman, 2006; Darrow et al., 2011; Levine and Raines, 2011; Takahashi et al., 2011; van Berkel et al., 2012).

III.C.3.a La Fluorocilline™ comme substrat de la β-lactamase

La Fluorocilline™ est un nouveau substrat fluorogénique développé en 2009 (N° Brevet : US 2009/0047692 A1, 02/19/2009). C'est une Difluorofluorescéine céphalosporine composée d'un « cœur » dérivé de la fluorescéine avec deux atomes de fluor en position 2 et 7, sur lequel sont greffées deux molécules de céphalosporine. La céphalosporine est une β-lactamine incluant un cycle β-lactame. La littérature décrit cette molécule comme un bon substrat pour la β-lactamase (Rukavishnikov et al., 2011). Des études précédentes au laboratoire ont montré que les céphalosporines sont hydrolysables par l'anticorps 9G4H9, même si les efficacités sont plus faibles que celles obtenues avec des pénicillines (Tableau I-7). La réaction de l'hydrolyse de la Fluorocilline™ est représentée dans la figure III-26.

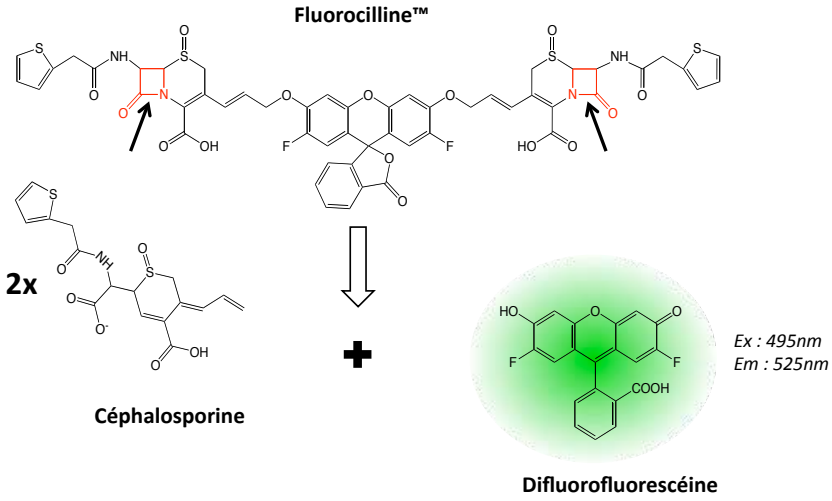


Figure III-26 : Fluorocilline™ et les produits de son hydrolyse

Représentation de la réaction d'hydrolyse de la Fluorocilline™ . Les cycles β-lactames sont colorés en rouge etles flêches noires indiquent les sites cibles des enzymes à activité β-lactamase. La difluorofluorescéine, le fluorophore libéré lors de cette réaction, fluoresce à 525 nm après excitation à 495 nm.

Avant d'utiliser un substrat fluorogénique, il est nécessaire de déterminer la capacité d'« extinction de la fluorescence » ou « quenching efficiency » que nous noterons Q_{eff}. La valeur du Q_{eff} découle de la relation suivante (Peng et al., 2009):

$$\mathbf{Q_{eff} = 100\times((F_{max} - F_0)/(F_{max} - F_{rés}))}$$

Où F_{max} : représente l'intensité de fluorescence maximum atteinte ; F_0 : l'intensité de fluorescence initiale et $F_{rés}$: la fluorescence résiduelle dûe au tampon seul.

Q_{eff} a été determiné expérimentalement. Pour ce faire, nous avons mis en présence 0,5 µM de ce substrat avec la β-lactamase à 100 nM. La solution est excitée à 495 nm et un balayage spectral entre les longueurs d'ondes 500 nm et 600 nm est réalisé avant et après 30 minutes d'hydrolyse. Les deux spectres obtenus sont présentés en figure III-27 et permettent de définir

la plage de longueurs d'onde la plus appropriée pour le calcul de Q_{eff} : il s'agit de la longueur d'onde pour laquelle la différence de l'intensité de fluorescence est la plus élevée, ici 515 nm.

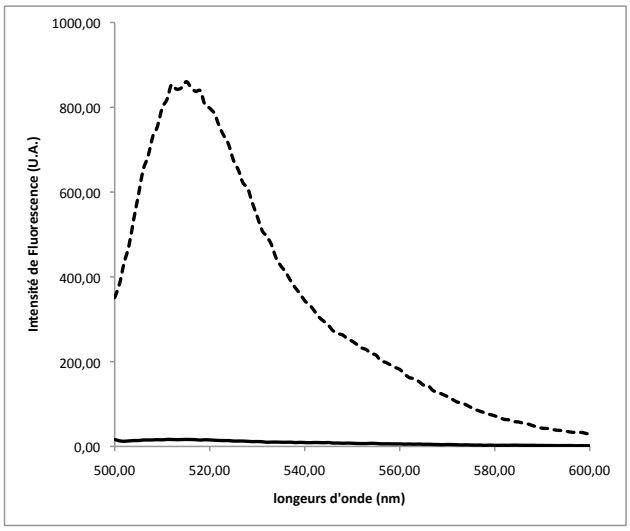


Figure III-27 : Hydrolyse de la Fluorocilline™ par la β-lactamase.
Spectre d'émission de la Fluorocilline™ à 0,5 µM en tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 avant (trait plein) et après (trait en pointillé) traitement avec la β-lactamase.

Ainsi à 515 nm, les données sont les suivantes (en unités arbitraires) :

- $F_{max} = 860{,}42$
- $F_0 = 16{,}54$
- $F_{rés} = 0{,}61$

On observe donc une augmentation de l'intensité de fluorescence d'un facteur 52, associée à un Q_{eff} de 98.15 %. Cette valeur valide l'efficacité de ce substrat fluorogénique dans les conditions d'utilisation appliquées.

III.C.3.b Caractérisation de l'hydrolyse de la Fluorocilline™ par 9G4H9

Les cinétiques d'hydrolyse de la Fluorocilline™ par différents catalyseurs ont été mesurées et sont présentées dans la figure III-28. La quantité de substrat initiale est fixe pour toutes les réactions : 0,5 µM de Fluorocilline™ . Cette valeur a été déterminée expérimentalement, de façon à obtenir une intensité de fluorescence maximale pour une hydrolyse totale du substrat tout en restant au dessous du seuil de saturation du fluorimètre utilisé, ici 1000 U.A.

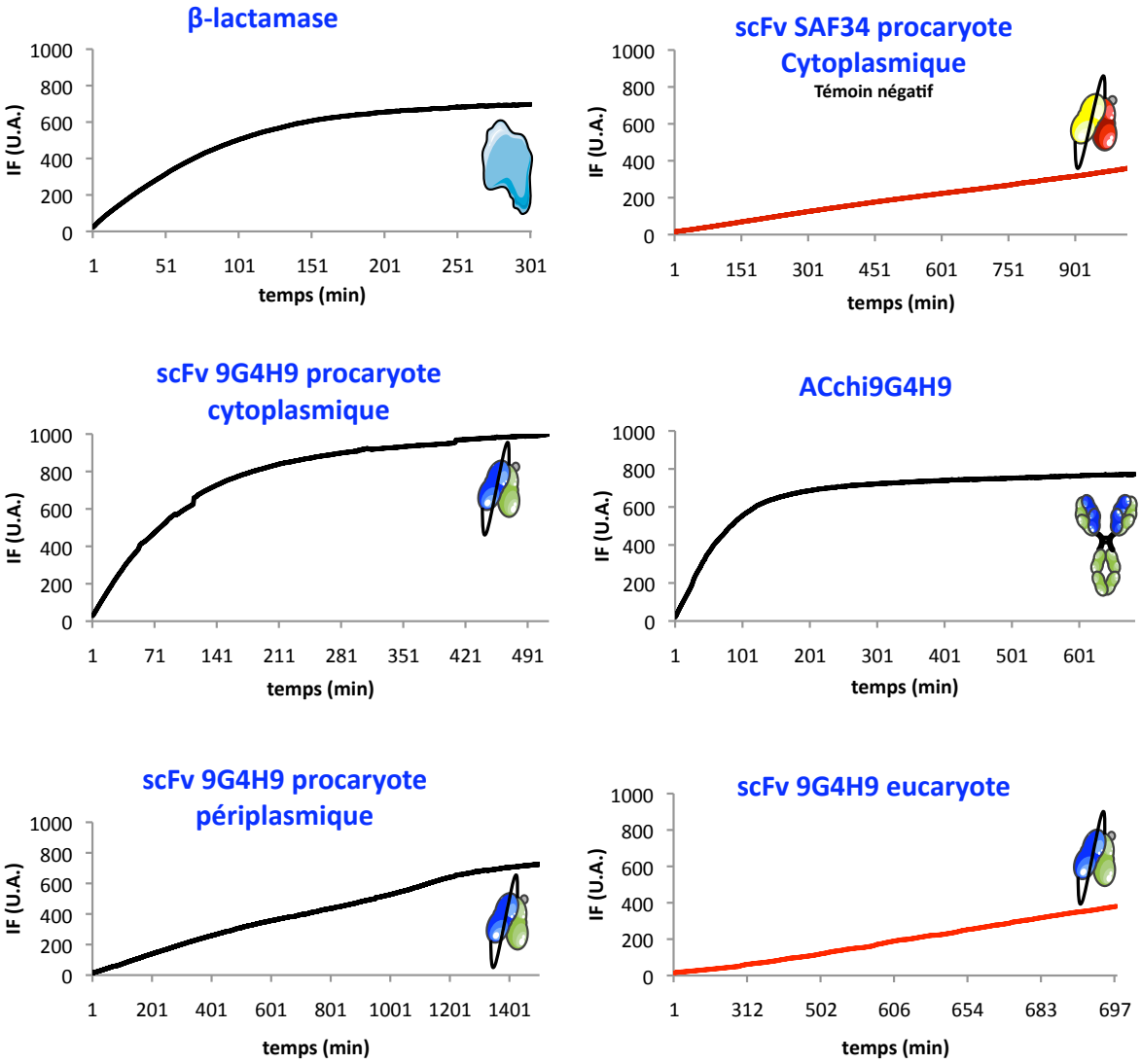


Figure III-28 : Cinétiques de l'hydrolyse de la Fluorocilline™ par différents catalyseurs

Mesure de l'émission de fluorescence à 525 nm après excitation à 495 nm au cours de l'hydrolyse de la Fluorocilline™ par différents catalyseurs : β-lactamase 45nM ; scFv SAF34 procaryote cytoplasmique 1 µM ; scFv 9G4H9 procaryote cytoplasmique 10 µM ; AC_{chi}9G4H9 6 µM ; scFv 9G4H9 procaryote périplasmique 0,85 µM ; scFv 9G4H9 eucaryote 6,5 µM. Les courbes en rouge ne sont pas significativement différentes du témoin négatif (contrôle sans catalyseur).

Nous faisons l'hypothèse que l'hydrolyse du substrat est michaëlienne. Ainsi, le logiciel KaleidaGraph a été utilisé et nous avons pu traiter ces courbes en appliquant le modèle « exponential rise equation » avec l'équation suivante :

$$IF = F_{max}(1-\exp^{(-[E]\,k_{cat}/K_M\,t)})$$

IF : intensité de fluorescence ; F_{max} : intensité de fluorescence maximum atteinte ; [E] : concentration en catalyseur (en M) ; k_{cat}/K_M : constante de second ordre (en $M^{-1}.sec^{-1}$); t : temps (en sec^{-1}).

Le calcul des vitesses initiales a été réalisé sur les 30 premières minutes correspondant à la partie linéaire des courbes. N'ayant pas accès à la quantité de produit issue de la réaction d'hydrolyse de la Fluorocilline™, il n'est pas possible d'obtenir indépendamment chaque paramètre cinétique pour ces réactions. Il est cependant possible de déterminer la constante de second ordre k_{cat}/K_M grâce à la relation suivante (Park et al., 2001):

$$(k_{cat}/K_M)\,[E] = (\Delta IF/\Delta t)/F_{max}\text{-}F_0$$

k_{cat}/K_M: constante de second ordre ; *[E] : concentration en catalyseur ; IF : intensité de fluorescence ;* t : temps *; F_{max} : intensité de fluorescence maximum atteinte ; F_0 : intensité de fluorescence initiale.*

Cette équation est applicable à la condition que la réaction obéisse à une cinétique du premier ordre. Dans ces conditions, la concentration en substrat est plus faible que le K_M (Fersht, 1974). Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer l'ordre « n » de la réaction :

- n correspond à la pente de la droite log V = f (log[E])
- $n = \log (V_2/V_1)/ \log ([E_2]/[E_1])$

La résolution mathématique de ces deux équations a permis de déterminer que dans les conditions appliquées, n=1. De plus le coefficient de corrélation de l'ajustement des données expérimentales par rapport au modèle mathématique confirme également l'ordre 1 de la réaction.

Cette constante de second ordre permet de comparer l'efficacité de catalyse de l'hydrolyse de la Fluorocilline™ par différents catalyseurs. Les résultats sont présentés dans le tableau III-2.

Tableau III-2 : Paramètres cinétiques de différents catalyseurs sur la Fluorocilline™

Catalyseurs	k_{cat}/K_M ($M^{-1}.sec^{-1}$)
β-Lactamase	3361,83 ± 14,78
scFv 9G4H9 périplasmique	16,92 ± 0,10
scFv 9G4H9 cytoplasmique	16,52 ± 0,06
scFv SAF34 cytoplasmique	4,84 ± 0,10
scFv 9G4H9 eucaryote	4,48 ± 0,02
AC_{chi}9G4H9 eucaryote	16,81 ± 0,17

Contrairement au scFv qui ne possède qu'un site catalytique, l'anticorps 9G4H9 est bivalent, et présente donc deux sites actifs. Les résultats ont donc été rapportés aux valences pour déterminer les constantes de second ordre.

Les résultats montrent que les scFv procaryotes, produits par voies périplasmique et cytoplasmique, et l'AC_{chi}9G4H9 eucaryote présentent la même activité catalytique. Ces valeurs sont toutefois plus de 200 fois inferieures à celle obtenue avec la β-lactamase. Cette

observation est classiquement faite pour les abzymes par rapport aux enzymes catalysant ce même type de réactions (Xu et al., 2004). Néanmoins, ces valeurs sont aussi 4 fois supérieurs à celles obtenues avec le scFv non catalytique SAF34 et le scFv 9G4H9 eucaryote qui ne semble pas être fonctionnel. Dans ces deux cas, l'hydrolyse du substrat est indépendante de la présence en scFv, elle est le produit de l'auto-hydrolyse. Malgré cette faible catalyse de l'hydrolyse de la Fluorocilline™ par rapport à son auto-hydrolyse, les profils obtenus, particulièrement pour le scFv 9G4H9 obtenu par voie cytoplasmique et l'AC_{chi}9G4H9, sont en faveur d'une activité catalytique.

Conclusion

Cette expérience indique que l'exploitation du système procaryote via la voie périplasmique et cytoplasmique suivie d'un protocole de renaturation aboutit à la production de scFv catalytiques fonctionnels. Elle confirme également l'absence de catalyse du scFv produit en système eucaryote. Ce résultat corrobore ceux obtenus en ELISA et en dichroïsme circulaire qui avaient respectivement montré l'absence d'interaction avec un inhibiteur et l'absence de structure en feuillets β.

L'activité catalytique est également mise en évidence pour l'anticorps entier (AC_{chi}9G4H9) . Rapporté au nombre de sites actifs, celle-ci est identique à celles des scFv fonctionnels. Ce résultat montre que le transfert de domaines variables sur une charpente constante de type IgG1 ne modifie pas la fonctionnalité du site formé par ces deux domaines.

IV

Discussion et Perspectives

A Comparaisons qualitative et quantitative des systèmes d'expression

B Vers une étude structurale

C Vers une compréhension et une exploitation des anticorps catalytiques

IV Discussion et perspectives

IV.A Comparaisons qualitative et quantitative des systèmes d'expression

Trois systèmes d'expression de protéines recombinantes ont été exploités pour la production de l'anticorps 9G4H9 et son dérivé scFv.

IV.A.1 La production procaryote par voie périplasmique

La production périplasmique représente un système avec un bon compromis entre une production de protéines fonctionnelles et un coût de production faible. La production réalisée lors de ces travaux, de l'ordre de 240 µg/L de culture bactérienne, est comparable à celle effectuée précédemment au laboratoire avec co-expression de la chaperonne FkpA (Padiolleau-Lefèvre et al., 2006). Cependant quand on compare la part de scFv purifiés par rapport à la quantité totale de protéines, la production réalisée lors de ces travaux est peu efficace. Cela peut être attribuable à un problème d'exportation du scFv vers le périplasme ou à la formation de corps d'inclusion, en dépit de la localisation périplasmique (Berkmen, 2012; de Marco, 2009). La production étant faible avec des rendements de l'ordre de la centaine de µg/L, ce système ne semble pas être un choix judicieux pour une étude approfondie des anticorps catalytiques. Cette production a néanmoins permis d'effectuer un test de catalyse. L'hydrolyse de la Fluorocilline™ par le scFv a ainsi pu être vérifiée avec une constante k_{cat}/K_M de 16,92 ± 0,10 $M^{-1}.sec^{-1}$.

IV.A.2 La production procaryote par voie cytoplasmique

La production du scFv 9G4H9 en système procaryote par voie cytoplasmique, suivie d'un protocole de renaturation, a permis d'obtenir de grandes quantités de scFv fonctionnels, de l'ordre de la trentaine de mg/L de culture. La fonctionnalité du scFv a été montrée par trois techniques :

- L'analyse en dichroïsme circulaire montre l'organisation secondaire riche en feuillets β avec un pourcentage de plus de 40%, caractéristique des scFv.
- Des tests ELISA ainsi que des mesures d'interaction par RPS ont mis en évidence l'interaction avec un peptide inhibiteur, Pep90. Cela valide la capacité de liaison du scFv. Le test d'interaction par RPS a permis de déterminer le K_D de l'interaction entre le scFv et Pep90 à 1,47 ± 0,34 µM. Ce paramètre est comparable avec ce qui a déjà été obtenu au laboratoire (5,2 µM ; Phichith et al., 2009). L'avancée ici est que le système

mis en place (expression procaryote par voie cytoplasmique suivie d'un protocole de renaturation) présente un rendement quantitatif 12 fois plus grand que l'expression périplasmique préalablement exploitée.

- Enfin, un test d'hydrolyse d'un substrat fluorogénique a été développé et a permis de mettre en évidence l'activité catalytique du scFv. Ce test a permis de mesurer un k_{cat}/K_M de 16,52 ± 0,06 $M^{-1}.sec^{-1}$ comparable au scFv périplasmique. Il faut cependant garder à l'esprit la structure particulière de la Fluorocilline™ . Cette molécule présente deux cycles β-lactame (Rukavishnikov et al., 2011). L'hydrolyse d'un des deux cycles produit de la fluorescence mais avec un rendement quantique plus faible et un spectre d'excitation plus large. La fluorescence réellement associée au fluorophore est obtenue après hydrolyse des deux cycles et libération complète du fluorophore. Nous avons pourtant souhaité développer un test catalytique avec ce nouveau substrat pour les raisons suivantes : 1) La fluorescence utilisée dans ce test est beaucoup plus sensible que l'absorption de l'ampicilline, utilisée précédemment au laboratoire pour évaluer la capacité de catalyse. 2) Les cinétiques sont suivies sur plusieurs centaines de minutes, et les paramètres obtenus sont calculés à partir des 30 premières minutes. Auparavant, les caractéristiques propres à l'hydrolyse de l'ampicilline (sensibilité de détection basse, mécanisme suicide et faible activité catalytique) imposaient des mesures sur des temps très courts, de l'ordre de 30 secondes, source d'une forte incertitude.

En plus d'un rendement élevé, la voie cytoplasmique a donc permis d'obtenir des protéines fonctionnelles. Ce système est de ce fait adapté à l'étude d'anticorps catalytiques sous un format scFv.

Ces résultats n'excluent néanmoins pas la possibilité d'avoir une part non fonctionnelle de scFv soluble, mais celle-ci est difficilement mesurable.

IV.A.3 La production eucaryote

En ce qui concerne le scFv 9G4H9 produit en système eucaryote dans des cellules de mammifères, les rendements sont de l'ordre de 5 mg/L de milieu de culture. Mais les résultats de dichroïsme circulaire suggèrent un scFv non structuré, montrant un spectre de protéine à structure aléatoire. De plus, les différents tests de fonctionnalité n'ont pas permis de valider l'activité biologique du scFv (absence d'interaction avec Pep90 en ELISA et RPS et absence d'hydrolyse de la Fluorocilline™). Ces résultats expliquent peut être le très faible nombre de travaux exploitant ce système d'expression pour ce format d'anticorps. En effet, les anticorps produits sous le format scFv dans ce type cellulaire sont généralement utilisés pour réaliser de la sélection par présentation en surface de cellules, sur le modèle de la présentation en surface

de phages (Ho et al., 2006). Il y a également une exploitation de ce format en cellules de mammifères pour une application thérapeutique. Dans ce cas, les scFv sont intracellulaires et sont appelés intrabodies. Les cibles visées sont classiquement des protéines impliquées dans des voies de signalisation (Lo et al., 2008; Ali et al., 2011; Moutel et al., 2012; Zhang et al., 2012 ; Rinaldi et al., 2013). Mis à part ces exemples particuliers, le système eucaryote mammifère est peu utilisé pour l'expression de scFv.

Il existe finalement très peu d'études comparant la fonctionnalité d'un scFv produit dans différents systèmes d'expression (Lemeulle et al., 1998; Vendel et al., 2012). A titre d'exemple, l'équipe de Biard-Piechaczyk a comparé l'activité du scFv 1CD (dirigé contre la digoxine) exprimé dans *E.coli* et des cellules d'insectes (Sf9). L'équipe de Demarest a quant à elle comparé l'activité du scFv BIIB4 (dirigé contre l'IGF-1R) produit par *E.coli* et des cellules de mammifère (CHO). Ces travaux montrent une affinité moindre du scFv eucaryote par comparaison avec le scFv procaryote.

Quatre hypothèses peuvent être proposées pour expliquer l'absence de fonctionnalité du scFv 9G4H9 produit dans des cellules eucaryotes :

- Des changements d'a.a. au niveau de la séquence protéique : les séquences codant pour le scFv 9G4H9 portées par les deux plasmides, eucaryote (pSecTag2C) et procaryote (pET26b), ont été séquencées et ne présentent pas de mutation par rapports à la séquence de l'anticorps d'origine. Il y a cependant, dans le vecteur eucaryote, une insertion de 6 a.a. entre la séquence signal (clivée lors de la translocation dans le RE) et la séquence du scFv. Ces 6 a.a. sont le produit de la séquence du site multiple de clonage en amont du site SfiI utilisée pour insérer la séquence du scFv. Bien quelle soit très petite, cette séquence de 6 a.a. peut suffire à modifier la conformation finale du scFv.
- La séquence signal : l'absence de clivage de cette séquence ne peut être exclue, pouvant là aussi modifier la conformation finale du scFv. Il a été montré que cette absence de clivage pouvait se produire dans des cellules eucaryotes ou procaryotes. Un tel phénomène a été décrit indépendamment sur différents types de séquences signal (Paetzel et al., 2002). Plusieurs facteurs peuvent influencer l'efficacité de clivage, comme la position particulière d'un a.a. chargé dans la séquence signal, ou la longueur de la région-h (riche en a.a. hydrophobes) au sein de la séquence signal (Martoglio and Dobberstein, 1998).
- Le système de purification : celui-ci est le même que dans la production procaryote périplasmique, il ne peut donc pas être mis en cause.
- Enfin les modifications post-traductionnelles. En effet, l'ajout de motifs (quelles que soient leur nature) ou la délétion de séquences, peuvent modifier la conformation

tridimensionnelle de la protéine et donc sa fonction biologique. Nous nous sommes intéressés à la glycosylation. L'absence de sites de N-glycosylations sur les séquences des domaines variables a été vérifiée grâce à l'outil NetNGlyc (Figure II-1) [7]. Mais d'autres modifications sont possibles. La probabilité d'avoir des O-glycosylations a également été testée, grâce à l'outil NetOGlyc (Figure II-1) [8]. Cette prédiction *in silico* montre qu'il y a quatre sites potentiels de O-glycosylations, deux sur la séquence du domaine V_L et deux sur l'espaceur peptidique. Cet espaceur étant fortement impliqué dans le repliement du scFv, une telle glycosylation peut entraîner des modifications de conformation et donc de fonctionnalité. Des expériences visant à identifier ces glycosylations pourraient permettre de vérifier cette hypothèse.

Afin de s'affranchir des difficultés inhérentes à la production de scFv eucaryote fonctionnels, certaines équipes ont développé des productions détournées basées sur des structures IgG-like incluant des sites de clivages pour libérer le format scFv (Asano et al., 2010; Vendel et al., 2012). Les travaux de Vendel ont montré, par des mesures de dichroïsme circulaire, que dans ce type de production, le scFv présente une structure secondaire typique, riche en feuillets β. Cette démarche pourrait être envisagée pour la production de scFv catalytiques mais demande de longues mises au point.

Malgré l'échec de la production du scFv en système eucaryote, nous avons poursuivi l'étude avec l'anticorps entier sous une forme chimérique. Des rendements similaires au scFv dans ce même système ont été obtenus, soit 5 mg d'anticorps entier par litre de milieu de culture. La spécificité et l'affinité des anticorps chimériques restent, en général, identiques à celles des anticorps murins à partir desquels on utilise les séquences des domaines variables. Néanmoins, dans certains cas, de légères modifications ont été observées, suggérant que la région constante peut avoir un impact sur la conformation du domaine variable, modifiant alors l'interaction antigène-anticorps (Cooper et al., 1993; Torres et al., 2005). Au regard des premiers résultats obtenus, il semble que ce ne soit pas le cas pour l'AC_{chi}9G4H9 :

- Une première approche par ELISA a mis en évidence une interaction avec Pep90. Cela valide la capacité de liaison de l'AC_{chi}9G4H9. Une expérience préliminaire d'interaction par RPS sur l'AC_{chi}9G4H9 avec Pep90 a permis de déterminer un K_D à 98 ± 0,12 nM. Cette valeur est aussi comparable à celle de l'anticorps 9G4H9 d'origine murine produit par voie d'ascites qui était de 74 ± 16 nM (Phichith et al., 2009). Par ailleurs, le rapport de K_D entre le scFv (pour rappel, de l'ordre de 1,47 ± 0,34 µM) et l'anticorps chimérique est de 15. Ce rapport peut être lié à l'avidité de l'anticorps. L'avidité reflètant l'affinité d'une protéine en tenant compte de la notion de valence. La valence de l'anticorps chimérique est de deux mais le rapport de K_D entre l'anticorps et le scFv est de 15, illustrant l'absence de relation direct entre ces

deux paramètres. Cette observation est cohérente avec la littérature : pour exemple, des travaux de MacKenzie comparant les activités d'un anticorps et de différents scFv dérivés ont montré des rapports de K_D de 17 à 36 (MacKenzie et al., 1996).

Une remarque peut être faite sur le format utilisé en RPS. Ici, un peptide de petite taille entre en jeu, pep90 dont la masse moléculaire est de 2062,07 Da. Cette particularité au niveau des tailles entre les partenaires nous a conduit à immobiliser le peptide sur la puce et à faire circuler le scFv ou l'anticorps chimérique afin de conserver une sensibilité de détection satisfaisante. Nous avons également porté une attention particulière à la quantité de peptide immobilisé afin de s'affranchir d'éventuels problèmes liés au transfert de masse.

- L'hydrolyse de la Fluorocilline™ est catalysée en présence de l'AC_{chi}9G4H9 validant l'activité catalytique. La constante k_{cat}/K_M de l'anticorps est de 16,81 ± 0,17 $M^{-1}.sec^{-1}$. Cette valeur est comparable à celles obtenues avec les scFv 9G4H9 décrits précédemment.

Pour conclure, les productions en système eucaryote ont ici abouti à des conclusions différentes selon le format de l'anticorps. En effet l'anticorps 9G4H9 sous un format scFv semble ne pas présenter de conformation correcte, entraînant une absence de liaison et de catalyse. Il est possible qu'un faible taux de scFv fonctionnel soit produit, mais de façon irrégulière selon les productions, entraînant les faibles signaux ELISA obtenus et l'absence de reproductibilité. Pour l'AC_{chi}9G4H9 les caractéristiques de l'anticorps d'origine sont conservées.

En terme de rendement, les productions dans le système eucaryote sont 6 fois plus faibles que celles du système procaryote par voie cytoplasmique. Pour rendre ce système plus efficace, un travail sur les promoteurs, au niveau des vecteurs d'expression eucaryote, permettrait d'augmenter la production de l'anticorps entier et d'atteindre des rendements atteignant parfois plusieurs dizaines de mg par litre de culture (Backliwal et al., 2008).

IV.B Vers une étude structurale

Les quantités d'anticorps catalytiques fonctionnels produites nous permettent d'envisager des études de structure par une approche cristallographique.

Il est difficile de cristalliser une immunoglobuline entière essentiellement à cause de la très grande flexibilité de la région charnière (Longman et al., 2003). Même si certaines équipes ont toutefois réussi à résoudre les structures tridimensionnelles d'IgG entières de souris (Harris et al., 1992; Harris et al., 1998) et d'homme (Saphire et al., 2001), cette difficulté est généralement écartée grâce à la fragmentation enzymatique des immunoglobulines

(cf. § I.B.3.a) permettant d'obtenir des fragments Fab. Une certaine flexibilité subsiste au niveau des CDR, notamment pour les boucles CDR3 impliquées dans l'interaction avec l'antigène (Zhao et al., 2012). C'est pour cette raison que des ligands (haptènes ou antigènes) sont utilisés en complexe avec les fragments Fab afin d'obtenir des cristaux homogènes (D'Souza et al., 2002; Larsen et al., 2004). Des structures sans ligand ont cependant été obtenues, mais il est important de noter que celles-ci ont été résolues après l'obtention de la structure tridimensionnelle du même fragment avec son ligand (Hotta et al., 2000; Oda et al., 2007). Les structures de fragments recombinants scFv, plus faciles à cloner et à produire, ont également été résolues par ces mêmes démarches. Dans le cas des scFv s'ajoute le problème de l'espaceur qui peut également être à l'origine de cristaux non homogènes, particulièrement quand celui-ci est long (Zdanov et al., 1994). Des domaines variables uniques d'anticorps ont aussi été cristallisés et cela peut être intéressant dans le cas des anticorps catalytiques où les a.a. impliqués dans le mécanisme de catalyse se retrouvent majoritairement sur une seule des deux chaînes (Le Minoux et al., 2012). C'est ce qui a été fait pour l'anticorps 3D8 (Park et al., 2008).

Lors de mon travail, une attention particulière a été portée sur la pureté et la solubilité des protéines produites, car ces points sont critiques tant pour les caractérisations cinétiques menées, que pour une potentielle approche cristallographique (Kovari et al., 1995). La limite pour l'utilisation du scFv 9G4H9 en cristallographie est justement son insolubilité à des concentrations supérieures à 280 µg/ml. Or des concentrations de l'ordre du mg/ml de protéines sont nécessaires pour obtenir des cristaux (Kim et al., 2008). Des concentrations allant de 1 à 5 mg/ml sont fréquemment utilisées dans les études structurales de scFv (Honegger et al., 2005; Kaufmann et al., 2002; Malby et al., 1998; Scotti and Gherardi, 2006). De telles concentrations apparaissent difficiles à atteindre avec le scFv 9G4H9 non complexé à un haptène ou un inhibiteur. L'interaction avec l'un de ces deux partenaires permettrait probablement d'augmenter la solubilité. Quoi qu'il en soit, l'insolubilité observée résulte vraisemblablement de la séquence protéique spécifique du scFv 9G4H9. Cette limitation propre aux scFv nous a conduit à envisager une approche structurale appliquée à l'anticorps entier. L'expression de l'anticorps par un système eucaryote apparaît dès lors comme une possible alternative.

IV.C Vers une compréhension et une exploitation des anticorps catalytiques

Les travaux sur les anticorps catalytiques ont été initiés avec des anticorps murins obtenus par exploitation du réseau idiotypique et aboutissent aujourd'hui à une structure chimérique d'IgG1. Ces travaux constituent une avancée puisqu'ils ont permis de poursuivre la caractérisation de notre anticorps catalytique modèle d'une part, et de mettre en place des

outils indispensables à l'étude des anticorps catalytiques en général d'autre part. Ce travail a mis en évidence des points clés, au niveau des systèmes d'expression utilisés, pour aboutir à une protéine fonctionnelle. En effet, les caractéristiques de l'anticorps modèle sont conservées pour le format scFv exprimé dans *E.coli*, ainsi qu'après transfert des domaines variables murins sur une charpente d'IgG1 humaine et expression dans des cellules humaines (HEK-293T). Le savoir-faire étant installé, ces démarches peuvent désormais être appliquées à d'autres anticorps catalytiques.

L'étude des anticorps catalytiques pourrait permettre une meilleur compréhension de leur implication dans certaines pathologies, notamment des maladies auto-immunes. La mise en évidence de la présence de tels anticorps en conditions pathologiques est menée par nos collaborateurs dans le cadre d'un projet ANR. Ces travaux permettront *in fine* d'élucider le rôle des anticorps catalytiques qui reste jusqu'à présent méconnu. Un éventuel effet bénéfique pourrait être exploité dans le cadre de traitements thérapeutiques. Ces nouveaux types d'anticorps pourraient ainsi venir étoffer et diversifier l'arsenal d'anticorps thérapeutiques déjà disponibles sur le marché.

Une utilisation thérapeutique des anticorps catalytiques a par ailleurs souvent été évoquée (Deng et al., 2002; Jones and Wentworth, 2001; Wentworth et al., 1996), ce qui a orienté notre choix vers une IgG1, isotype le plus fréquemment retrouvé en thérapeutique (Tableau I-3). Au moment de ce choix cet isotype était quasiment le seul à être commercialisé sous la forme de charpente de domaines constants dans un plasmide. Aujourd'hui des sociétés comme InvivoGen proposent ce type de vecteur pour l'ensemble des isotypes humains et murins.

En plus d'une potentielle application thérapeutique, cette structure chimérique, ouvre également plus de possibilités en termes d'optimisation avec l'opportunité de moduler différentes fonctions.

Bibliographie et Netographie

Références bibliographiques

Abès, R., and J.L. Teillaud. 2010. Impact of glycosylation on effector functions of therapeutic IgG. *Pharmaceuticals*. 3:146-157.

Ahmad, Z.A., S.K. Yeap, A.M. Ali, W.Y. Ho, N.B. Alitheen, and M. Hamid. 2012. scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol* 2012, e980250.

Ali, K., A.L. Southwell, C.W. Bugg, J.C. Ko, and P.H. Patterson. 2011. Recombinant intrabodies as molecular tools and potential therapeutics for Huntington's disease. In *Neurobiology of Huntington's Disease: Applications to Drug Discovery*. Lo DC, Hughes RE, editors. Pp 255–266.

Altmann, F., E. Staudacher, I.B. Wilson, and L. Marz. 1999. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj J*. 16:109-123.

Andersen, D.C., and D.E. Reilly. 2004. Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments. *Curr Opin Biotechnol*. 15:456-462.

Arakawa, T., and K. Tsumoto. 2003. The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*. 304:148-152.

Arbabi-Ghahroudi, M., J. Tanha, and R. MacKenzie. 2005. Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev*. 24:501-519.

Arnold, J.N., M.R. Wormald, R.B. Sim, P.M. Rudd, and R.A. Dwek. 2007. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol*. 25:21-50.

Asano, R., K. Ikoma, H. Kawaguchi, Y. Ishiyama, T. Nakanishi, M. Umetsu, H. Hayashi, Y. Katayose, M. Unno, T. Kudo, and I. Kumagai. 2010. Application of the Fc fusion format to generate tag-free bi-specific diabodies. *FEBS J*. 277:477-487.

Avalle, B., D. Thomas, and A. Friboulet. 1998. Functional mimicry: elicitation of a monoclonal anti-idiotypic antibody hydrolizing beta-lactams. *FASEB J*. 12:1055-1060.

Babic, M., A.M. Hujer, and R.A. Bonomo. 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat*. 9:142-156.

Backliwal, G., M. Hildinger, S. Chenuet, S. Wulhfard, M. De Jesus, and F.M. Wurm. 2008. Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions. *Nucleic Acids Res*. 36:e96.

Baldi, L., D.L. Hacker, M. Adam, and F.M. Wurm. 2007. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnol Lett*. 29:677-684.

Baneyx, F., and M. Mujacic. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. *Nat Biotechnol*. 22:1399-1408.

Barbas, C.F., 3rd, A. Heine, G. Zhong, T. Hoffmann, S. Gramatikova, R. Bjornestedt, B. List, J. Anderson, E.A. Stura, I.A. Wilson, and R.A. Lerner. 1997. Immune versus natural selection: antibody aldolases with enzymic rates but broader scope. *Science*. 278:2085-2092.

Barski, G., S. Sorieul, and F. Cornefert. 1960. Production of cells of a "hybrid" nature in culturs in vitro of 2 cellular strains in combination. *C.R. Acad Sci*. 251:1825-1827.

Baynes, B.M., D.I. Wang, and B.L. Trout. 2005. Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry*. 44:4919-4925.

Beck, A., T. Wurch, C. Bailly, and N. Corvaia. 2010. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol*. 10:345-352.

Beck, Z.Q., and D.H. Sherman. 2006. Development of an internally quenched fluorogenic substrate for kinetic analysis of thioesterases. *Anal Biochem*. 349:309-311.

Begum, N.A., and T. Honjo. 2012. Evolutionary comparison of the mechanism of DNA cleavage with respect to immune diversity and genomic instability. *Biochemistry*. 51:5243-5256.

Behring, and Kitasato. 1965. On the development of immunity to diphtheria and tetanus in animals. *Dtsch Med Wochenschr*. 90:2183.

Belogurov, A., Jr., A. Kozyr, N. Ponomarenko, and A. Gabibov. 2009. Catalytic antibodies: balancing between Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Bioessays*. 31:1161-1171.

Berkmen, M. 2012. Production of disulfide-bonded proteins in Escherichia coli. *Protein Expr Purif.* 82:240-251.

Bill, R.M. 2001. Yeast a panacea for the structure-function analysis of membrane proteins? *Curr Genet*. 40:157-171.

Biocca, S., P. Pierandrei-Amaldi, N. Campioni, and A. Cattaneo. 1994. Intracellular immunization with cytosolic recombinant antibodies. *Biotechnology*. 12:396-399.

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

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

Borrok, M.J., S.T. Jung, T.H. Kang, A.F. Monzingo, and G. Georgiou. 2012. Revisiting the role of glycosylation in the structure of human IgG Fc. *ACS Chem Biol*. 7:1596-602.

Borth, N., D. Mattanovich, R. Kunert, and H. Katinger. 2005. Effect of increased expression of protein disulfide isomerase and heavy chain binding protein on antibody secretion in a recombinant CHO cell line. *Biotechnol Prog*. 21:106-111.

Bosch, F., and L. Rosich. 2008. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology*. 82:171-179.

Bouvet, J.P., and V.A. Fischetti. 1999. Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. *Infect Immun*. 67:2687-2691.

Bryson, C.J., T.D. Jones, and M.P. Baker. 2010. Prediction of immunogenicity of therapeutic proteins: validity of computational tools. *BioDrugs*. 24:1-8.

Bush, K. 2010. Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr Opin Microbiol*. 13:558-564.

Cai, W., T. Olafsen, X. Zhang, Q. Cao, S.S. Gambhir, L.E. Williams, A.M. Wu, and X. Chen. 2007. PET imaging of colorectal cancer in xenograft-bearing mice by use of an 18F-labeled T84.66 anti-carcinoembryonic antigen diabody. *J Nucl Med*. 48:304-310.

Caravella, J.A., D. Wang, S.M. Glaser, and A. Lugovskoy. 2010. Structure-Guided Design of Antibodies. *Curr Comput Aided Drug Des*. 6:128-138.

Carter, P.J. 2006. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol*. 6:343-357.

Cerutti, M., and J. Golay. 2012. Lepidopteran cells, an alternative for the production of recombinant antibodies? *MAbs*. 4:294-309.

Cesaro-Tadic, S., D. Lagos, A. Honegger, J.H. Rickard, L.J. Partridge, G.M. Blackburn, and A. Plückthun. 2003. Turnover-based in vitro selection and evolution of biocatalysts from a fully synthetic antibody library. *Nat Biotechnol*. 21:679-685.

Choi, J.H., and S.Y. Lee. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli. *Appl Microbiol Biotechnol*. 64:625-635.

Clark, A.J. 1998. The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 3:337-350.

Clark, E.D. 2001. Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol*. 12:202-207.

Co, M.S., and C. Queen. 1991. Humanized antibodies for therapy. *Nature*. 351:501-502.

Cogne, M., S. Duchez, and V. Pascal. 2009. Transgenesis and humanization of murine antibodies. *Med Sci*. 25:1149-1154.

Cohen, T., L. Moise, M. Ardito, W. Martin, and A.S. De Groot. 2010. A method for individualizing the prediction of immunogenicity of protein vaccines and biologic therapeutics: individualized T cell epitope measure (iTEM). *J Biomed Biotechnol*. 2010:e961752.

Cooper, L.J., A.R. Shikhman, D.D. Glass, D. Kangisser, M.W. Cunningham, and N.S. Greenspan. 1993. Role of heavy chain constant domains in antibody-antigen interaction. Apparent specificity differences among streptococcal IgG antibodies expressing identical variable domains. *J Immunol*. 150:2231-2242.

Cooper, M.A. 2002. Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 1:515-528.

Cox, K.M., J.D. Sterling, J.T. Regan, J.R. Gasdaska, K.K. Frantz, C.G. Peele, A. Black, D. Passmore, C. Moldovan-Loomis, M. Srinivasan, S. Cuison, P.M. Cardarelli, and L.F. Dickey. 2006. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant Lemna minor. *Nat Biotechnol*. 24:1591-1597.

Cuesta, A.M., N. Sainz-Pastor, J. Bonet, B. Oliva, and L. Alvarez-Vallina. 2010. Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends Biotechnol*. 28:355-362.

D'Souza, L.J., B. Gigant, M. Knossow, and B.S. Green. 2002. Remarkable remote chiral recognition in a reaction mediated by a catalytic antibody. *J Am Chem Soc*. 124:2114-2115.

Daniell, H., S.J. Streatfield, and K. Wycoff. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci*. 6:219-226.

Darrow, A.L., M.W. Olson, H. Xin, S.L. Burke, C. Smith, C. Schalk-Hihi, R. Williams, S.S. Bayoumy, I.C. Deckman, M.J. Todd, B.P. Damiano, and M.A. Connelly. 2011. A novel fluorogenic substrate for the measurement of endothelial lipase activity. *J Lipid Res*. 52:374-382.

De Jesus, M., and F.M. Wurm. 2011. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *Eur J Pharm Biopharm*. 78:184-188.

Débat, H., B. Avalle, O. Chose, C.O. Sarde, A. Friboulet, and D. Thomas. 2001. Overpassing an aberrant V(kappa) gene to sequence an anti-idiotypic abzyme with (beta)-lactamase-like activity that could have a linkage with autoimmune diseases. *FASEB J*. 15:815-822.

Demain, A.L., and P. Vaishnav. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv*. 27:297-306.

de Marco, A. 2009. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in Escherichia coli. Microb Cell Fact. 8:26.

Deng, S.X., P. de Prada, and D.W. Landry. 2002. Anticocaine catalytic antibodies. *J Immunol Methods*. 269:299-310.

Desplancq, D., D.J. King, A.D. Lawson, and A. Mountain. 1994. Multimerization behaviour of single chain Fv variants for the tumour-binding antibody B72.3. *Protein Eng*. 7:1027-1033.

Devauchelle, G., and M. Cerutti. 1999. Baculovirus: an example of an insect virus of use to humans. *Med Trop*. 59:517-521.

Dickerson, T.J., N. Yamamoto, and K.D. Janda. 2004. Antibody-catalyzed oxidative degradation of nicotine using riboflavin. *Bioorg Med Chem*. 12:4981-4987.

Dickey, F.H. 1949. The preparation of specific adsorbents. *Proc Natl Acad Sci USA*. 35:227-229.

DiMiceli, L., V. Pool, J.M. Kelso, S.V. Shadomy, and J. Iskander. 2006. Vaccination of yeast sensitive individuals: review of safety data in the US vaccine adverse event reporting system (VAERS). *Vaccine*. 24:703-707.

Ding, L., M. Azam, Y.H. Lin, J. Sheridan, S. Wei, G. Gupta, R.K. Singh, M.H. Pauling, W. Chu, A. Tran, N.X. Yu, J. Hu, W. Wang, H. Long, D. Xiang, L. Zhu, and S.B. Hua. 2010. Generation of high-affinity fully human anti-interleukin-8 antibodies from its cDNA by two-hybrid screening and affinity maturation in yeast. *Protein Sci*. 19:1957-1966.

Doran, P.M. 2000. Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotechnol*. 11:199-204.

Drawz, S.M., and R.A. Bonomo. 2010. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*. 23:160-201.

Dunn-Walters, D., L. Boursier, and J. Spencer. 2000. Effect of somatic hypermutation on potential N-glycosylation sites in human immunoglobulin heavy chain variable regions. *Mol Immunol*. 37:107-113.

Edelman, L., C. Margaritte, H. Chaabihi, E. Monchatre, D. Blanchard, A. Cardona, F. Morin, G. Dumas, S. Petres, and M. Kaczorek. 1997. Obtaining a functional recombinant anti-rhesus (D) antibody using the baculovirus-insect cell expression system. *Immunology*. 91:13-19.

Fagreus, A. 1948. Antibody production in relation to the development of plasma cells: in vivo and in vitro experiments. *Acta Med Scand* Suppl 204. Pp 1.

Fahnert, B., H. Lilie, and P. Neubauer. 2004. Inclusion bodies: formation and utilisation. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 89:93-142.

Fallot, S., R. Ben Naya, C. Hieblot, P. Mondon, E. Lacazette, K. Bouayadi, A. Kharrat, C. Touriol, and H. Prats. 2009. Alternative-splicing-based bicistronic vectors for ratio-controlled protein expression and application to recombinant antibody production. *Nucleic Acids Res*. 37:e134.

Feige, M.J., S. Groscurth, M. Marcinowski, Y. Shimizu, H. Kessler, L.M. Hendershot, and J. Buchner. 2009. An unfolded CH1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies. *Mol Cell*. 34:569-579.

Feige, M.J., L.M. Hendershot, and J. Buchner. 2010. How antibodies fold. *Trends Biochem Sci*. 35:189-198.

Ferjoux, G., F. Lopez, J.P. Esteve, A. Ferrand, E. Vivier, F. Vely, N. Saint-Laurent, L. Pradayrol, L. Buscail, and C. Susini. 2003. Critical role of Src and SHP-2 in sst2 somatostatin receptor-mediated activation of SHP-1 and inhibition of cell proliferation. *Mol Biol Cell*. 14:3911-3928.

Fernandez, L.A. 2004. Prokaryotic expression of antibodies and affibodies. *Curr Opin Biotechnol*. 15:364-373.

Fersht, A.R. 1974. Catalysis, binding and enzyme-substrate complementarity. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 187:397-407.

Fischer, R., Y.C. Liao, and J. Drossard. 1999. Affinity-purification of a TMV-specific recombinant full-size antibody from a transgenic tobacco suspension culture. *J Immunol Methods*. 226:1-10.

Ganesh, K., and M.S. Neuberger. 2011. The relationship between hypothesis and experiment in unveiling the mechanisms of antibody gene diversification. *FASEB J*. 25:1123-1132.

Gao, W., B. Xing, R.Y. Tsien, and J. Rao. 2003. Novel fluorogenic substrates for imaging beta-lactamase gene expression. *J Am Chem Soc*. 125:11146-11147.

Gebauer, M., and A. Skerra. 2009. Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*. 13:245-255.

Gelderman, K.A., S. Tomlinson, G.D. Ross, and A. Gorter. 2004. Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol*. 25:158-164.

Getts, D.R., M.T. Getts, D.P. McCarthy, E.M. Chastain, and S.D. Miller. 2010. Have we overestimated the benefit of human(ized) antibodies? *MAbs*. 2:682-694.

Goncalves, O., T. Dintinger, D. Blanchard, and C. Tellier. 2002. Functional mimicry between anti-Tendamistat antibodies and alpha-amylase. *J Immunol Methods*. 269:29-37.

Goncalves, O., T. Dintinger, J. Lebreton, D. Blanchard, and C. Tellier. 2000. Mechanism of an antibody-catalysed allylic isomerization. *Biochem J*. 346:691-698.

Gouverneur, V.E., K.N. Houk, B. de Pascual-Teresa, B. Beno, K.D. Janda, and R.A. Lerner. 1993. Control of the exo and endo pathways of the Diels-Alder reaction by antibody catalysis. *Science*. 262:204-208.

Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 36:59-74.

Graham, F.L., and A.J. Van der Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 52:456-467.

Greenberg, A.S., D. Avila, M. Hughes, A. Hughes, E.C. McKinney, and M.F. Flajnik. 1995. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*. 374:168-173.

Gronwall, C., and S. Stahl. 2009. Engineered affinity proteins generation and applications. *J Biotechnol*. 140:254-269.

Gunnarsen, K.S., E. Lunde, P.E. Kristiansen, B. Bogen, I. Sandlie, and G.A. Loset. 2010. Periplasmic expression of soluble single chain T cell receptors is rescued by the chaperone FkpA. *BMC Biotechnol*. 10:1-13.

Ha, S., Y. Ou, J. Vlasak, Y. Li, S. Wang, K. Vo, Y. Du, A. Mach, Y. Fang, and N. Zhang. 2011. Isolation and characterization of IgG1 with asymmetrical Fc glycosylation. *Glycobiology*. 21:1087-1096.

Hall, M.P., C. Gegg, K. Walker, C. Spahr, R. Ortiz, V. Patel, S. Yu, L. Zhang, H. Lu, B. DeSilva, and J.W. Lee. 2010. Ligand-binding mass spectrometry to study biotransformation of fusion protein drugs and guide immunoassay development: strategic approach and application to peptibodies targeting the thrombopoietin receptor. *AAPS J*. 12:576-585.

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

Hamilton, S.R., and T.U. Gerngross. 2007. Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Curr Opin Biotechnol*. 18:387-392.

Hampe, C.S. 2012. Protective role of anti-idiotypic antibodies in autoimmunity lessons for type 1 diabetes. *Autoimmunity*. 45:320-331.

Hanes, J., C. Schaffitzel, A. Knappik, and A. Plückthun. 2000. Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nat Biotechnol*. 18:1287-1292.

Hanson, C.V., Y. Nishiyama, and S. Paul. 2005. Catalytic antibodies and their applications. *Curr Opin Biotechnol*. 16:631-636.

Harris, L.J., S.B. Larson, K.W. Hasel, J. Day, A. Greenwood, and A. McPherson. 1992. The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma. *Nature*. 360:369-372.

Harris, L.J., E. Skaletsky, and A. McPherson. 1998. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J Mol Biol*. 275:861-872.

Hellwig, S., J. Drossard, R.M. Twyman, and R. Fischer. 2004. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol*. 22:1415-1422.

Hendershot, L., D. Bole, G. Kohler, and J.F. Kearney. 1987. Assembly and secretion of heavy chains that do not associate posttranslationally with immunoglobulin heavy chain-binding protein. *J Cell Biol*. 104:761-767.

Hiatt, A., R. Cafferkey, and K. Bowdish. 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*. 342:76-78.

Hilvert, D., S.H. Carpenter, K.D. Nared, and M.T. Auditor. 1988. Catalysis of concerted reactions by antibodies: the Claisen rearrangement. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:4953-4955.

Hinton, P.R., J.M. Xiong, M.G. Johlfs, M.T. Tang, S. Keller, and N. Tsurushita. 2006. An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life. *J Immunol*. 176:346-356.

Hitzeman, R.A., F.E. Hagie, H.L. Levine, D.V. Goeddel, G. Ammerer, and B.D. Hall. 1981. Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature*. 293:717-722.

Ho, M., S. Nagata, and I. Pastan. 2006. Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:9637-9642.

Ho, M., and I. Pastan. 2009. Display and selection of scFv antibodies on HEK-293T cells. *Methods Mol Biol*. 562:99-113.

Holcik, M., N. Sonenberg, and R.G. Korneluk. 2000. Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death. *Trends Genet*. 16:469-473.

Holliger, P., and P.J. Hudson. 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*. 23:1126-1136.

Honegger, A., S. Spinelli, C. Cambillau, and A. Plückthun. 2005. A mutation designed to alter crystal packing permits structural analysis of a tight-binding fluorescein-scFv complex. *Protein Sci*. 14:2537-2549.

Hoogenboom, H.R. 2005. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol*. 23:1105-1116.

Hopkins, R.F., V.E. Wall, and D. Esposito. 2012. Optimizing transient recombinant protein expression in mammalian cells. *Methods Mol Biol*. 801:251-268.

Hotta, A., M. Kamihira, K. Itoh, M. Morshed, Y. Kawabe, K. Ono, H. Matsumoto, K. Nishijima, and S. Iijima. 2004. Production of anti-CD2 chimeric antibody by recombinant animal cells. *J Biosci Bioeng*. 98:298-303.

Hotta, K., H. Lange, D.J. Tantillo, K.N. Houk, D. Hilvert, and I.A. Wilson. 2000. Catalysis of decarboxylation by a preorganized heterogeneous microenvironment: crystal structures of abzyme 21D8. *J Mol Biol*. 302:1213-1225.

Huang, C.J., H. Lin, and X. Yang. 2012. Industrial production of recombinant therapeutics in Escherichia coli and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 39:383-399.

Hudson, P.J., and A.A. Kortt. 1999. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *J Immunol Methods*. 231:177-189.

Hulett, M.D., and P.M. Hogarth. 1994. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol*. 57:1-127.

Huse, W.D., L. Sastry, S.A. Iverson, A.S. Kang, M. Alting-Mees, D.R. Burton, S.J. Benkovic, and R.A. Lerner. 1989. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science*. 246:1275-1281.

Hust, M., T. Jostock, C. Menzel, B. Voedisch, A. Mohr, M. Brenneis, M.I. Kirsch, D. Meier, and S. Dubel. 2007. Single chain Fab (scFab) fragment. *BMC Biotechnol*. 7:1-15.

Huston, J.S., D. Levinson, M. Mudgett-Hunter, M.S. Tai, J. Novotny, M.N. Margolies, R.J. Ridge, R.E. Bruccoleri, E. Haber, and R. Crea. 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 USA*. 85:5879-5883.

Hwang, W.Y., and J. Foote. 2005. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods*. 36:3-10.

Igawa, T., H. Tsunoda, T. Kuramochi, Z. Sampei, S. Ishii, and K. Hattori. 2011. Engineering the variable region of therapeutic IgG antibodies. *MAbs*. 3:243-252.

Ivarie, R. 2006. Competitive bioreactor hens on the horizon. *Trends Biotechnol*. 24:99-101.

Izadyar, L., A. Friboulet, M.H. Remy, A. Roseto, and D. Thomas. 1993. Monoclonal anti-idiotypic antibodies as functional internal images of enzyme active sites: production of a catalytic antibody with a cholinesterase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:8876-8880.

Jacob, F., B. Joris, and J.M. Frere. 1991. Active-site serine mutants of the Streptomyces albus G beta-lactamase. *Biochem J*. 277:647-652.

James, L.C., P. Roversi, and D.S. Tawfik. 2003. Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science*. 299:1362-1367.

Janda, K.D. 1990. New strategies for the design of catalytic antibodies. *Biotechnol Prog*. 6:178-181.

Janeway, C.A., P. Travers, M. Walport, and M.J. Shlomchik. 2003. La reconnaissance de l'antigène. 2de ed. In *Immunobiologie*. De Boeck Université. Pp 92-184.

Jankovic, M., R. Casellas, N. Yannoutsos, H. Wardemann, and M.C. Nussenzweig. 2004. RAGs and regulation of autoantibodies. *Annu Rev Immunol*. 22:485-501.

Jencks, W.P. 1969. Catalysis in Chemistry and Enzymology. *Dover Publications, McGraw-Hill, Mineola, NY.*

Jenison, R.D., S.C. Gill, A. Pardi, and B. Polisky. 1994. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*. 263:1425-1429.

Jerne, N.K. 1974. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol*. 125C:373-389.

Jigami, Y. 2008. Yeast glycobiology and its application. *Biosci Biotechnol Biochem*. 72:637-648.

Jones, L.H., and P. Wentworth, Jr. 2001. The therapeutic potential for catalytic antibodies: from a concept to a promise. *Mini Rev Med Chem*. 1:125-132.

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

Jung, S.T., T.H. Kang, W. Kelton, and G. Georgiou. 2011. Bypassing glycosylation: engineering aglycosylated full-length IgG antibodies for human therapy. *Curr Opin Biotechnol*. 22:858-867.

Kalaga, R., L. Li, J.R. O'Dell, and S. Paul. 1995. Unexpected presence of polyreactive catalytic antibodies in IgG from unimmunized donors and decreased levels in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 155:2695-2702.

Kamath, K.S., M.S. Vasavada, and S. Srivastava. 2011. Proteomic databases and tools to decipher post-translational modifications. *J Proteomics*. 75:127-144.

Kanyshkova, T.G., D.V. Semenov, D. Khlimankov, V.N. Buneva, and G.A. Nevinsky. 1997. DNA-hydrolyzing activity of the light chain of IgG antibodies from milk of healthy human mothers. *FEBS Lett*. 416:23-26.

Kaufmann, M., P. Lindner, A. Honegger, K. Blank, M. Tschopp, G. Capitani, A. Plückthun, and M.G. Grutter. 2002. Crystal structure of the anti-His tag antibody 3D5 single-chain fragment complexed to its antigen. *J Mol Biol*. 318:135-147.

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

Kelly, S.M., and N.C. Price. 2000. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci*. 1:349-384.

Kim, Y., L. Bigelow, M. Borovilos, I. Dementieva, E. Duggan, W. Eschenfeldt, C. Hatzos, G. Joachimiak, H. Li, N. Maltseva, R. Mulligan, P. Quartey, A. Sather, L. Stols, L. Volkart, R. Wu, M. Zhou, and A. Joachimiak. 2008. Chapter 3. High-throughput protein purification for x-ray crystallography and NMR. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 75:85-105.

Kipriyanov, S.M., G. Moldenhauer, J. Schuhmacher, B. Cochlovius, C.W. Von der Lieth, E.R. Matys, and M. Little. 1999. Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics. *J Mol Biol*. 293:41-56.

Kit, Y., D.V. Semenov, and G.A. Nevinsky. 1996. Phosphorylation of different human milk proteins by human catalytic secretory immunoglobulin A. *Biochem Mol Biol Int*. 39:521-527.

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

Kolesnikov, A.V., A.V. Kozyr, E.S. Alexandrova, F. Koralewski, A.V. Demin, M.I. Titov, B. Avalle, A. Tramontano, S. Paul, D. Thomas, A.G. Gabibov, and A. Friboulet. 2000. Enzyme mimicry by the antiidiotypic antibody approach. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:13526-13531.

Kovari, L.C., C. Momany, and M.G. Rossmann. 1995. The use of antibody fragments for crystallization and structure determinations. *Structure*. 3:1291-1293.

Kudou, M., D. Ejima, H. Sato, R. Yumioka, T. Arakawa, and K. Tsumoto. 2011. Refolding single-chain antibody (scFv) using lauroyl-L-glutamate as a solubilization detergent and arginine as a refolding additive. *Protein Expr Purif*. 77:68-74.

Kuroiwa, Y., P. Kasinathan, Y.J. Choi, R. Naeem, K. Tomizuka, E.J. Sullivan, J.G. Knott, A. Duteau, R.A. Goldsby, B.A. Osborne, I. Ishida, and J.M. Robl. 2002. Cloned transchromosomic calves producing human immunoglobulin. *Nat Biotechnol*. 20:889-894.

Lacroix-Desmazes, S., J. Bayry, S.V. Kaveri, D. Hayon-Sonsino, N. Thorenoor, J. Charpentier, C.E. Luyt, J.P. Mira, V. Nagaraja, M.D. Kazatchkine, J.F. Dhainaut, and V.O. Mallet. 2005. High levels of catalytic antibodies correlate with favorable outcome in sepsis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:4109-4113.

Larsen, N.A., P. de Prada, S.X. Deng, A. Mittal, M. Braskett, X. Zhu, I.A. Wilson, and D.W. Landry. 2004. Crystallographic and biochemical analysis of cocaine-degrading antibody 15A10. *Biochemistry*. 43:8067-8076.

Le Minoux, D., A. Mahendra, S. Kaveri, N. Limnios, A. Friboulet, B. Avalle, D. Boquet, S. Lacroix-Desmazes, and S. Padiolleau-Lefèvre. 2012. A novel molecular analysis of genes encoding catalytic antibodies. *Mol Immunol*. 50:160-168.

Lederberg, J. 1959. Genes and antibodies. *Science*. 129:1649-1653.

Lee, S.H., J.F. Carpenter, B.S. Chang, T.W. Randolph, and Y.S. Kim. 2006. Effects of solutes on solubilization and refolding of proteins from inclusion bodies with high hydrostatic pressure. *Protein Sci*. 15:304-313.

Lefèvre, S., H. Débat, D. Thomas, A. Friboulet, and B. Avalle. 2001. A suicide-substrate mechanism for hydrolysis of beta-lactams by an anti-idiotypic catalytic antibody. *FEBS Lett*. 489:25-28.

Leitzgen, K., M.R. Knittler, and I.G. Haas. 1997. Assembly of immunoglobulin light chains as a prerequisite for secretion. A model for oligomerization-dependent subunit folding. *J Biol Chem*. 272:3117-3123.

Lemeulle, C., T. Chardes, C. Montavon, H. Chaabihi, J.C. Mani, M. Pugniere, M. Cerutti, G. Devauchelle, B. Pau, and M. Biard-Piechaczyk. 1998. Anti-digoxin scFv fragments

expressed in bacteria and in insect cells have different antigen binding properties. *FEBS Lett*. 423:159-166.

Levine, M.N., and R.T. Raines. 2011. Sensitive fluorogenic substrate for alkaline phosphatase. *Anal Biochem*. 418:247-252.

Li, J.W., L. Xia, Y. Su, H. Liu, X. Xia, Q. Lu, C. Yang, and K. Reheman. 2012. Molecular imprint of enzyme active site by camel nanobodies: rapid and efficient approach to produce abzymes with alliinase activity. *J Biol Chem*. 287:13713-13721.

Li, L., S. Kaveri, S. Tyutyulkova, M.D. Kazatchkine, and S. Paul. 1995. Catalytic activity of anti-thyroglobulin antibodies. *Ann N Y Acad Sci*. 764:570-572.

Lindhofer, H., R. Mocikat, B. Steipe, and S. Thierfelder. 1995. Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. *J Immunol*. 155:219-225.

Lo, A.S., Q. Zhu, and W.A. Marasco. 2008. Intracellular antibodies (intrabodies) and their therapeutic potential. *Handb Exp Pharmacol.* 181:343-373.

Lofblom, J., J. Feldwisch, V. Tolmachev, J. Carlsson, S. Stahl, and F.Y. Frejd. 2010. Affibody molecules: engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications. *FEBS Lett*. 584:2670-2680.

Lofblom, J., F.Y. Frejd, and S. Stahl. 2011. Non-immunoglobulin based protein scaffolds. *Curr Opin Biotechnol*. 22:843-848.

Lonberg, N., L.D. Taylor, F.A. Harding, M. Trounstine, K.M. Higgins, S.R. Schramm, C.C. Kuo, R. Mashayekh, K. Wymore, J.G. McCabe, and et al. 1994. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature*. 368:856-859.

Longman, E., K. Kreusel, S.B. Tendler, I. Fiebrig, K. King, J. Adair, P. O'Shea, A. Ortega, J. Garcia de la Torre, and S.E. Harding. 2003. Estimating domain orientation of two human antibody IgG4 chimeras by crystallohydrodynamics. *Eur Biophys J*. 32:503-510.

Louis-Jeune, C., M.A. Andrade-Navarro, and C. Perez-Iratxeta. 2011. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins*. 80:374-381

Lucas, B.K., L.M. Giere, R.A. DeMarco, A. Shen, V. Chisholm, and C.W. Crowley. 1996. High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. *Nucleic Acids Res*. 24:1774-1779.

MacKenzie, C.R., T. Hirama, S.J. Deng, D.R. Bundle, S.A. Narang, and N.M. Young. 1996. Analysis by surface plasmon resonance of the influence of valence on the ligand binding affinity and kinetics of an anti-carbohydrate antibody. *J Biol Chem*. 271:1527-1533.

Mahendra, A., M. Sharma, D.N. Rao, I. Peyron, C. Planchais, J.D. Dimitrov, S.V. Kaveri, and S. Lacroix-Desmazes. 2012. Antibody-mediated catalysis: Induction and therapeutic relevance. *Autoimmun Rev*. In press.

Mahgoub, I.O. 2012. Expression and characterization of a functional single-chain variable fragment (scFv) protein recognizing MCF7 breast cancer cells in E. coli cytoplasm. *Biochem Genet*. 50:625-641.

Maillere, B., S. Delluc, and G. Ravot. 2012. The prediction of immunogenicity of therapeutic proteins. *Med Sci (Paris)*. 28:82-88.

Makrides, S.C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. *Microbiol Rev*. 60:512-538.

Malby, R.L., A.J. McCoy, A.A. Kortt, P.J. Hudson, and P.M. Colman. 1998. Three-dimensional structures of single-chain Fv-neuraminidase complexes. *J Mol Biol*. 279:901-910.

Maras, M., A. De Bruyn, W. Vervecken, J. Uusitalo, M. Penttila, R. Busson, P. Herdewijn, and R. Contreras. 1999. In vivo synthesis of complex N-glycans by expression of human N-acetylglucosaminyltransferase I in the filamentous fungus Trichoderma reesei. *FEBS Lett*. 452:365-370.

Marasco, W.A., and J. Sui. 2007. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat Biotechnol*. 25:1421-1434.

Marks, J.D., H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths, and G. Winter. 1991. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol*. 222:581-597.

Martineau, P., P. Jones, and G. Winter. 1998. Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *J Mol Biol*. 280:117-127.

Martoglio, B., and B. Dobberstein. 1998. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol*. 8:410-415.

Marx, J.L. 1982. Building bigger mice through gene transfer. *Science*. 218:1298.

Matsuura, K., K. Yamamoto, and H. Sinohara. 1994. Amidase activity of human Bence Jones proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 204:57-62.

McBlane, J.F., D.C. van Gent, D.A. Ramsden, C. Romeo, C.A. Cuomo, M. Gellert, and M.A. Oettinger. 1995. Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell*. 83:387-395.

McCafferty, J., A.D. Griffiths, G. Winter, and D.J. Chiswell. 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. 348:552-554.

Meffre, E., R. Casellas, and M.C. Nussenzweig. 2000. Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol*. 1:379-385.

Mitchison, T.J. 1989. Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence. *J Cell Biol*. 109:637-652.

Moks, T., L. Abrahmsen, B. Nilsson, U. Hellman, J. Sjoquist, and M. Uhlen. 1986. Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur J Biochem*. 156:637-643.

Monsellier, E., and H. Bedouelle. 2006. Improving the stability of an antibody variable fragment by a combination of knowledge-based approaches: validation and mechanisms. *J Mol Biol*. 362:580-593.

Moremen, K.W., M. Tiemeyer, and A.V. Nairn. 2012. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13:448-462.

Morrison, S.L., M.J. Johnson, L.A. Herzenberg, and V.T. Oi. 1984. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81:6851-6855.

Mouquet, H., and M.C. Nussenzweig. 2012. Polyreactive antibodies in adaptive immune responses to viruses. *Cell Mol Life Sci*. 69:1435-1445.

Moutel, S., C. Nizak, and F. Perez. 2012. Selection and use of intracellular antibodies (intrabodies). *Methods Mol Biol*. 907:667-679.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51:263-273.

Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, and T. Honjo. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 102:553-563.

Muyldermans, S., C. Cambillau, and L. Wyns. 2001. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem Sci*. 26:230-235.

Nagorsen, D., and P.A. Baeuerle. 2011. Immunomodulatory therapy of cancer with T cell-engaging BiTE antibody blinatumomab. *Exp Cell Res*. 317:1255-1260.

Nakamura, M., S.E. Burastero, Y. Ueki, J.W. Larrick, A.L. Notkins, and P. Casali. 1988. Probing the normal and autoimmune B cell repertoire with Epstein-Barr virus. Frequency of B cells producing monoreactive high affinity autoantibodies in patients with Hashimoto's disease and systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 141:4165-4172.

Naso, M.F., S.H. Tam, B.J. Scallon, and T.S. Raju. 2010. Engineering host cell lines to reduce terminal sialylation of secreted antibodies. *MAbs*. 2:519-527.

Nevinsky, G.A., and V.N. Buneva. 2002. Human catalytic RNA- and DNA-hydrolyzing antibodies. *J Immunol Methods*. 269:235-249.

Nimmerjahn, F., and J.V. Ravetch. 2006. Fcgamma receptors: old friends and new family members. *Immunity*. 24:19-28.

Nishi, Y. 2003. Enzyme/abzyme prodrug activation systems: potential use in clinical oncology. *Curr Pharm Des*. 9:2113-2130.

Norderhaug, L., T. Olafsen, T.E. Michaelsen, and I. Sandlie. 1997. Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells. *J Immunol Methods*. 204:77-87.

Nuttall, S.D., and R.B. Walsh. 2008. Display scaffolds: protein engineering for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 8:609-615.

Nygren, P.A. 2008. Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. *FEBS J*. 275:2668-2676.

O'Connell, K.P., E. Kovaleva, J.H. Campbell, P.E. Anderson, S.G. Brown, D.C. Davis, J.J. Valdes, R.W. Welch, W.E. Bentley, and N.A. van Beek. 2007. Production of a recombinant antibody fragment in whole insect larvae. *Mol Biotechnol*. 36:44-51.

Oda, M., N. Ito, T. Tsumuraya, K. Suzuki, M. Sakakura, and I. Fujii. 2007. Thermodynamic and structural basis for transition-state stabilization in antibody-catalyzed hydrolysis. *J Mol Biol*. 369:198-209.

Okada, Y. 1962. Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells. I. Microscopic observation of giant polynuclear cell formation. *Exp Cell Res*. 26:98-107.

Olivier, S., and M. Mehtali. 2009. Alternative production systems for therapeutic monoclonal antibodies. *Med Sci (Paris)*. 25:1163-1168.

Ortega, C., A. Herbet, S. Richard, N. Kersual, N. Costa, A. Pelegrin, F. Ducancel, J.Y. Couraud, I. Navarro-Teulon, and D. Boquet. 2013. High level prokaryotic expression of anti-Mullerian inhibiting substance type II receptor diabody, a new recombinant antibody for in vivo ovarian cancer imaging. *J Immunol Methods*. 387:11-20.

Padiolleau-Lefèvre, S., H. Débat, D. Phichith, D. Thomas, A. Friboulet, and B. Avalle. 2006. Expression of a functional scFv fragment of an anti-idiotypic antibody with a beta-lactam hydrolytic activity. *Immunol Lett*. 103:39-44.

Padiolleau-Lefèvre, S., H. Débat, D. Thomas, A. Friboulet, and B. Avalle. 2003. In vivo evolution of a beta-lactamase-like activity throughout the idiotypic pathway. *Biocat. Biotransf.* 21:79-85.

Paetzel, M., A. Karla, N.C. Strynadka, and R.E. Dalbey. 2002. Signal peptidases. *Chem Rev*. 102:4549-4580.

Pancer, Z., and R.A. Mariuzza. 2008. The oldest antibodies newly discovered. *Nat Biotechnol*. 26:402-403.

Park, C., B.R. Kelemen, T.A. Klink, R.Y. Sweeney, M.A. Behlke, S.R. Eubanks, and R.T. Raines. 2001. Fast, facile, hypersensitive assays for ribonucleolytic activity. *Methods Enzymol*. 341:81-94.

Park, S.Y., W.R. Lee, S.C. Lee, M.H. Kwon, Y.S. Kim, and J.S. Kim. 2008. Crystal structure of single-domain VL of an anti-DNA binding antibody 3D8 scFv and its active site revealed by complex structures of a small molecule and metals. *Proteins*. 71:2091-2096.

Paul, S., Y. Nishiyama, S. Planque, S. Karle, H. Taguchi, C. Hanson, and M.E. Weksler. 2005. Antibodies as defensive enzymes. *Springer Semin Immunopathol*. 26:485-503.

Paul, S., D.J. Volle, C.M. Beach, D.R. Johnson, M.J. Powell, and R.J. Massey. 1989. Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody. *Science*. 244:1158-1162.

Pauling, L. 1948. Chemical achievement and hope for the future. *Am Sci*. 36:51-58.

Peng, X., H. Chen, D.R. Draney, W. Volcheck, A. Schutz-Geschwender, and D.M. Olive. 2009. A nonfluorescent, broad-range quencher dye for Forster resonance energy transfer assays. *Anal Biochem*. 388:220-228.

Pham, P.L., A. Kamen, and Y. Durocher. 2006. Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. *Mol Biotechnol*. 34:225-237.

Phichith, D., S. Bun, S. Padiolleau-Lefèvre, S. Banh, D. Thomas, A. Friboulet, and B. Avalle. 2009. Mutational and inhibitory analysis of a catalytic antibody. Implication for drug discovery. *Mol Immunol*. 47:348-356.

Phichith, D., S. Bun, S. Padiolleau-Lefèvre, A. Guellier, S. Banh, M. Galleni, J.M. Frere, D. Thomas, A. Friboulet, and B. Avalle. 2010. Novel peptide inhibiting both TEM-1 beta-lactamase and penicillin-binding proteins. *FEBS J*. 277:4965-4972.

Pillet, D., M. Paon, Vorobiev, II, A.G. Gabibov, D. Thomas, and A. Friboulet. 2002. Idiotypic network mimicry and antibody catalysis: lessons for the elicitation of efficient anti-idiotypic protease antibodies. *J Immunol Methods*. 269:5-12.

Planque, S., Y. Nishiyama, H. Taguchi, M. Salas, C. Hanson, and S. Paul. 2008. Catalytic antibodies to HIV: physiological role and potential clinical utility. *Autoimmun Rev*. 7:473-479.

Plückthun, A., and A. Skerra. 1989. Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in Escherichia coli. *Methods Enzymol*. 178:497-515.

Pollack, S.J., J.W. Jacobs, and P.G. Schultz. 1986. Selective chemical catalysis by an antibody. *Science*. 234:1570-1573.

Ponomarenko, N.A., O.M. Durova, Vorobiev, II, E.S. Aleksandrova, G.B. Telegin, O.G. Chamborant, L.L. Sidorik, S.V. Suchkov, Z.S. Alekberova, N.V. Gnuchev, and A.G. Gabibov. 2002. Catalytic antibodies in clinical and experimental pathology: human and mouse models. *J Immunol Methods*. 269:197-211.

Ponomarenko, N.A., D. Pillet, M. Paon, Vorobiev, II, I.V. Smirnov, H. Adenier, B. Avalle, A.V. Kolesnikov, A.V. Kozyr, D. Thomas, A.G. Gabibov, and A. Friboulet. 2007. Anti-

idiotypic antibody mimics proteolytic function of parent antigen. *Biochemistry*. 46:14598-14609.

Pooley, H.M., R. Merchante, and D. Karamata. 1996. Overall protein content and induced enzyme components of the periplasm of Bacillus subtilis. *Microb Drug Resist*. 2:9-15.

Potter, M., and C.R. Boyce. 1962. Induction of plasma-cell neoplasms in strain BALB/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants. *Nature*. 193:1086-1087.

Queen, C., W.P. Schneider, H.E. Selick, P.W. Payne, N.F. Landolfi, J.F. Duncan, N.M. Avdalovic, M. Levitt, R.P. Junghans, and T.A. Waldmann. 1989. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:10029-10033.

Quintero-Hernandez, V., V.R. Juarez-Gonzalez, M. Ortiz-Leon, R. Sanchez, L.D. Possani, and B. Becerril. 2007. The change of the scFv into the Fab format improves the stability and in vivo toxin neutralization capacity of recombinant antibodies. *Mol Immunol*. 44:1307-1315.

Radaev, S., M. Kattah, B. Rostro, M. Colonna, and P.D. Sun. 2003. Crystal structure of the human myeloid cell activating receptor TREM-1. *Structure*. 11:1527-1535.

Raju, T.S. 2008. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr Opin Immunol*. 20:471-478.

Raju, T.S., J.B. Briggs, S.M. Borge, and A.J. Jones. 2000. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology*. 10:477-486.

Rakestraw, J.A., S.L. Sazinsky, A. Piatesi, E. Antipov, and K.D. Wittrup. 2009. Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in Saccharomyces cerevisiae. *Biotechnol Bioeng*. 103:1192-1201.

Rasmussen, L.K., Y.B. Larsen, and P. Hojrup. 2005. Characterization of different cell culture media for expression of recombinant antibodies in mammalian cells: Presence of contaminating bovine antibodies. *Protein Expr Purif*. 41:373-377.

Rast, J.P., C.T. Amemiya, R.T. Litman, S.J. Strong, and G.W. Litman. 1998. Distinct patterns of IgH structure and organization in a divergent lineage of chrondrichthyan fishes. *Immunogenetics*. 47:234-245.

Reichert, J.M. 2011. Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *MAbs*. 3:76-99.

Reichert, J.M. 2012. Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs*. 4:413-415.

Reichert, J.M. 2013. Which are the antibodies to watch in 2013? *MAbs*. 5:1-4.

Rice, J., W.M. Ainley, and P. Shewen. 2005. Plant-made vaccines: biotechnology and immunology in animal health. *Anim Health Res Rev*. 6:199-209.

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

Rinas, U., F. Hoffmann, E. Betiku, D. Estape, and S. Marten. 2007. Inclusion body anatomy and functioning of chaperone-mediated in vivo inclusion body disassembly during high-level recombinant protein production in Escherichia coli. *J Biotechnol*. 127:244-257.

Ritz, D., and J. Beckwith. 2001. Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 55:21-48.

Romesberg, F.E., B. Spiller, P.G. Schultz, and R.C. Stevens. 1998. Immunological origins of binding and catalysis in a Diels-Alderase antibody. *Science*. 279:1929-1933.

Roopenian, D.C., and S. Akilesh. 2007. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*. 7:715-725.

Rosebrough, S.F., Z.D. Grossman, J.G. McAfee, B.J. Kudryk, G. Subramanian, C.A. Ritter-Hrncirik, L.S. Witanowski, G. Tillapaugh-Fay, E. Urrutia, and C. Zapf-Longo. 1988. Thrombus imaging with indium-111 and iodine-131-labeled fibrin-specific monoclonal antibody and its F(ab')2 and Fab fragments. *J Nucl Med*. 29:1212-1222.

Rothe, A., R.J. Hosse, and B.E. Power. 2006. In vitro display technologies reveal novel biopharmaceutics. *FASEB J*. 20:1599-1610.

Rothlisberger, D., A. Honegger, and A. Plückthun. 2005. Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. *J Mol Biol*. 347:773-789.

Rudnick, S.I., and G.P. Adams. 2009. Affinity and avidity in antibody-based tumor targeting. *Cancer Biother Radiopharm*. 24:155-161.

Ruf, P., and H. Lindhofer. 2001. Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood*. 98:2526-2534.

Ruigrok, V.J., M. Levisson, M.H. Eppink, H. Smidt, and J. van der Oost. 2011. Alternative affinity tools: more attractive than antibodies? *Biochem J*. 436:1-13.

Rukavishnikov, A., K.R. Gee, I. Johnson, and S. Corry. 2011. Fluorogenic cephalosporin substrates for beta-lactamase TEM-1. *Anal Biochem*. 419:9-16.

Saha, N.R., J. Smith, and C.T. Amemiya. 2010. Evolution of adaptive immune recognition in jawless vertebrates. *Semin Immunol*. 22:25-33.

Sai Kumar, R.S., S.A. Singh, and A.G. Rao. 2009. Conformational stability of alpha-amylase from malted sorghum (Sorghum bicolor): reversible unfolding by denaturants. *Biochimie*. 91:548-557.

Sandee, D., S. Tungpradabkul, M. Tsukio, T. Imanaka, and M. Takagi. 2002. Construction and high cytoplasmic expression of a tumoricidal single-chain antibody against hepatocellular carcinoma. *BMC Biotechnol*. 2:1-8.

Santala, V., and U. Lamminmaki. 2004. Production of a biotinylated single-chain antibody fragment in the cytoplasm of Escherichia coli. *J Immunol Methods*. 284:165-175.

Saphire, E.O., P.W. Parren, R. Pantophlet, M.B. Zwick, G.M. Morris, P.M. Rudd, R.A. Dwek, R.L. Stanfield, D.R. Burton, and I.A. Wilson. 2001. Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science*. 293:1155-1159.

Schirrmann, T., L. Al-Halabi, S. Dubel, and M. Hust. 2008. Production systems for recombinant antibodies. *Front Biosci*. 13:4576-4594.

Schroeder, H.W., Jr., and L. Cavacini. 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 125:S41-52.

Schroff, R.W., K.A. Foon, S.M. Beatty, R.K. Oldham, and A.C. Morgan, Jr. 1985. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res*. 45:879-885.

Scotti, C., and E. Gherardi. 2006. Structural basis of affinity maturation of the TEPC15/Vkappa45.1 anti-2-phenyl-5-oxazolone antibodies. *J Mol Biol*. 359:1161-1169.

Shields, R.L., J. Lai, R. Keck, L.Y. O'Connell, K. Hong, Y.G. Meng, S.H. Weikert, and L.G. Presta. 2002. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcgamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem*. 277:26733-26740.

Shinkai, Y., G. Rathbun, K.P. Lam, E.M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A.M. Stall, and F.W. Alt. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*. 68:855-867.

Shuster, A.M., G.V. Gololobov, O.A. Kvashuk, A.E. Bogomolova, I.V. Smirnov, and A.G. Gabibov. 1992. DNA hydrolyzing autoantibodies. *Science*. 256:665-667.

Siberil, S., C.A. Dutertre, C. Boix, and J.L. Teillaud. 2005. Therapeutic monoclonal antibodies: a little history, a lot of engineering, and... some clinical successes. *Transfus Clin Biol*. 12:114-122.

Sidhu, S.S., and F.A. Fellouse. 2006. Synthetic therapeutic antibodies. *Nat Chem Biol*. 2:682-688.

Simmons, L.C., D. Reilly, L. Klimowski, T.S. Raju, G. Meng, P. Sims, K. Hong, R.L. Shields, L.A. Damico, P. Rancatore, and D.G. Yansura. 2002. Expression of full-length immunoglobulins in Escherichia coli: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies. *J Immunol Methods*. 263:133-147.

Skerra, A. 2003. Imitating the humoral immune response. *Curr Opin Chem Biol*. 7:683-693.

Skerra, A. 2008. Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J*. 275:2677-2683.

Skerra, A., and A. Plückthun. 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. *Science*. 240:1038-1041.

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

Song, Y., C. Antoniou, A. Memic, B.K. Kay, and L.W. Fung. 2011. Apparent structural differences at the tetramerization region of erythroid and nonerythroid beta spectrin as discriminated by phage displayed scFvs. *Protein Sci*. 20:867-879.

Stella, J., and M. Ryan. 2004. Glyphosate herbicide formulation: a potentially lethal ingestion. *Emerg Med Australas*. 16:235-239.

Strohl, W.R. 2009. Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr Opin Biotechnol*. 20:685-691.

Taguchi, H., S. Planque, Y. Nishiyama, P. Szabo, M.E. Weksler, R.P. Friedland, and S. Paul. 2008. Catalytic antibodies to amyloid beta peptide in defense against Alzheimer disease. *Autoimmun Rev*. 7:391-397.

Takahashi, N., H. Kakinuma, L. Liu, Y. Nishi, and I. Fujii. 2001. In vitro abzyme evolution to optimize antibody recognition for catalysis. *Nat Biotechnol*. 19:563-567.

Takahashi, S., H. Ono, T. Gotoh, K. Yoshizawa-Kumagaye, and T. Sugiyama. 2011. Novel internally quenched fluorogenic substrates for angiotensin I-converting enzyme and carboxypeptidase Y. *Biomed Res*. 32:407-411.

Takeda, S., T. Naito, K. Hama, T. Noma, and T. Honjo. 1985. Construction of chimaeric processed immunoglobulin genes containing mouse variable and human constant region sequences. *Nature*. 314:452-454.

Tanaka, F., H. Almer, R.A. Lerner, and C.F. Barbas. 1999. Catalytic single-chain antibodies possessing beta-lactamase activity selected from a phage displayed combinatorial library using a mechanism-based inhibitor. *Tetrahedron Lett*. 40:8063-8066.

Tanaka, F., and C.F. Barbas, 3rd. 2002. Reactive immunization: a unique approach to catalytic antibodies. *J Immunol Methods*. 269:67-79.

Tanaka, T., M.N. Lobato, and T.H. Rabbitts. 2003. Single domain intracellular antibodies: a minimal fragment for direct in vivo selection of antigen-specific intrabodies. *J Mol Biol*. 331:1109-1120.

Tao, M.H., and S.L. Morrison. 1989. Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *J Immunol*. 143:2595-2601.

Tawfik, D.S., R. Chap, B.S. Green, M. Sela, and Z. Eshhar. 1995. Unexpectedly high occurrence of catalytic antibodies in MRL/lpr and SJL mice immunized with a transition-state analog: is there a linkage to autoimmunity? *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:2145-2149.

Tellier, C. 2002. Exploiting antibodies as catalysts: potential therapeutic applications. *Transfus Clin Biol*. 9:1-8.

Teng, G., and F.N. Papavasiliou. 2007. Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu Rev Genet*. 41:107-120.

Thiel, K.W., and P.H. Giangrande. 2009. Therapeutic applications of DNA and RNA aptamers. *Oligonucleotides*. 19:209-222.

Tolcher, A.W., C.J. Sweeney, K. Papadopoulos, A. Patnaik, E.G. Chiorean, A.C. Mita, K. Sankhala, E. Furfine, J. Gokemeijer, L. Iacono, C. Eaton, B.A. Silver, and M. Mita. 2011. Phase I and pharmacokinetic study of CT-322 (BMS-844203), a targeted Adnectin inhibitor of VEGFR-2 based on a domain of human fibronectin. *Clin Cancer Res*. 17:363-371.

Torres, M., R. May, M.D. Scharff, and A. Casadevall. 2005. Variable-region-identical antibodies differing in isotype demonstrate differences in fine specificity and idiotype. *J Immunol*. 174:2132-2142.

Tramontano, A., K.D. Janda, and R.A. Lerner. 1986. Catalytic antibodies. *Science*. 234:1566-1570.

Treweek, J.B., and K.D. Janda. 2012. An antidote for acute cocaine toxicity. *Mol Pharm*. 9:969-978.

Tsumoto, K., K. Shinoki, H. Kondo, M. Uchikawa, T. Juji, and I. Kumagai. 1998. Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in Escherichia coli by controlled introduction of oxidizing reagent application to a human single-chain Fv fragment. *J Immunol Methods*. 219:119-129.

Tsumoto, K., D. Ejima, I. Kumagai, and T. Arakawa. 2003. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif*. 28:1-8.

Tsumoto, K., M. Umetsu, I. Kumagai, D. Ejima, J.S. Philo, and T. Arakawa. 2004. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Prog*. 20:1301-1308.

Umana, P., J. Jean-Mairet, R. Moudry, H. Amstutz, and J.E. Bailey. 1999. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotechnol*. 17:176-180.

Umetsu, M., K. Tsumoto, M. Hara, K. Ashish, S. Goda, T. Adschiri, and I. Kumagai. 2003. How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. Spectroscopic evidence for highly efficient refolding of a single-chain Fv fragment. *J Biol Chem*. 278:8979-8987.

Van Berkel, S.S., B. van der Lee, F.L. van Delft, R. Wagenvoord, H.C. Hemker, and F.P. Rutjes. 2012. Fluorogenic Peptide-based substrates for monitoring thrombin activity. *ChemMedChem*. 7:606-617.

Van Kuik-Romeijn, P., N. de Groot, E. Hooijberg, and H.A. de Boer. 2000. Expression of a functional mouse-human chimeric anti-CD19 antibody in the milk of transgenic mice. *Transgenic Res*. 9:155-159.

Vaughan, T.J., J.K. Osbourn, and P.R. Tempest. 1998. Human antibodies by design. *Nat Biotechnol*. 16:535-539.

Vendel, M.C., M. Favis, W.B. Snyder, F. Huang, A.D. Capili, J. Dong, S.M. Glaser, B.R. Miller, and S.J. Demarest. 2012. Secretion from bacterial versus mammalian cells yields a recombinant scFv with variable folding properties. *Arch Biochem Biophys*. 526:188-193.

Ventura, M., C. Canchaya, Z. Zhang, V. Bernini, G.F. Fitzgerald, and D. van Sinderen. 2006. How high G+C Gram-positive bacteria and in particular bifidobacteria cope with heat stress: protein players and regulators. *FEMS Microbiol Rev*. 30:734-759.

Vlatakis, G., L.I. Andersson, R. Muller, and K. Mosbach. 1993. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature*. 361:645-647.

Voet, D., and J.G. Voet. 1998. L'immunité. In *Biochimie*. 2de ed. De Boeck Université. Pp 1207-1234.

Wallick, S.C., E.A. Kabat, and S.L. Morrison. 1988. Glycosylation of a VH residue of a monoclonal antibody against alpha (1----6) dextran increases its affinity for antigen. *J Exp Med*. 168:1099-1109.

Walsh, G. 2010. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discov Today*. 15:773-780.

Wang, X.T., and P.C. Engel. 2009. An optimised system for refolding of human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *BMC Biotechnol*. 9:1-10.

Ward, M., C. Lin, D.C. Victoria, B.P. Fox, J.A. Fox, D.L. Wong, H.J. Meerman, J.P. Pucci, R.B. Fong, M.H. Heng, N. Tsurushita, C. Gieswein, M. Park, and H. Wang. 2004. Characterization of humanized antibodies secreted by Aspergillus niger. *Appl Environ Microbiol*. 70:2567-2576.

Washbourne, P., and A.K. McAllister. 2002. Techniques for gene transfer into neurons. *Curr Opin Neurobiol*. 12:566-573.

Wentworth, P., A. Datta, D. Blakey, T. Boyle, L.J. Partridge, and G.M. Blackburn. 1996. Toward antibody-directed "abzyme" prodrug therapy, ADAPT: carbamate

prodrug activation by a catalytic antibody and its in vitro application to human tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:799-803.

Whitlow, M., B.A. Bell, S.L. Feng, D. Filpula, K.D. Hardman, S.L. Hubert, M.L. Rollence, J.F. Wood, M.E. Schott, D.E. Milenic, and et al. 1993. An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Eng*. 6:989-995.

Wiese, D., and K. Schmitz. 2011. Expression of recombinant human interleukin-8 and its purification using a single buffer system. *J Immunol Methods*. 364:77-82.

Wildt, S., and T.U. Gerngross. 2005. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nat Rev Microbiol*. 3:119-128.

Wilkinson, B., and H.F. Gilbert. 2004. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta*. 1699:35-44.

Willander, M., and S. Al-Hilli. 2009. Analysis of biomolecules using surface plasmons. *Methods Mol Biol*. 544:201-229.

Wirsching, P., J.A. Ashley, C.H. Lo, K.D. Janda, and R.A. Lerner. 1995. Reactive immunization. *Science*. 270:1775-1782.

Wolfenden, R. 1969. Transition state analogues for enzyme catalysis. *Nature*. 223:704-705.

Wootla, B., S. Dasgupta, J.D. Dimitrov, J. Bayry, H. Levesque, J.Y. Borg, A. Borel-Derlon, D.N. Rao, A. Friboulet, S.V. Kaveri, and S. Lacroix-Desmazes. 2008a. Factor VIII hydrolysis mediated by anti-factor VIII autoantibodies in acquired hemophilia. *J Immunol*. 180:7714-7720.

Wootla, B., S. Lacroix-Desmazes, A.E. Warrington, A.J. Bieber, S.V. Kaveri, and M. Rodriguez. 2011. Autoantibodies with enzymatic properties in human autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 37:144-150.

Wootla, B., A. Nicoletti, N. Patey, J.D. Dimitrov, C. Legendre, O.D. Christophe, A. Friboulet, S.V. Kaveri, S. Lacroix-Desmazes, and O. Thaunat. 2008b. Hydrolysis of coagulation factors by circulating IgG is associated with a reduced risk for chronic allograft nephropathy in renal transplanted patients. *J Immunol*. 180:8455-8460.

Wright, A., M.H. Tao, E.A. Kabat, and S.L. Morrison. 1991. Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure. *EMBO J*. 10:2717-2723.

Wu, A.M., and P.D. Senter. 2005. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol*. 23:1137-1146.

Wurch, T., P. Lowe, V. Caussanel, C. Bes, A. Beck, and N. Corvaia. 2008. Development of novel protein scaffolds as alternatives to whole antibodies for imaging and

therapy: status on discovery research and clinical validation. *Curr Pharm Biotechnol*. 9:502-509.

Wurm, F.M. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 22:1393-1398.

Xu, Y., N. Yamamoto, and K.D. Janda. 2004. Catalytic antibodies: hapten design strategies and screening methods. *Bioorg Med Chem*. 12:5247-5268.

Xu, Z., E.J. Pone, A. Al-Qahtani, S.R. Park, H. Zan, and P. Casali. 2007. Regulation of aicda expression and AID activity: relevance to somatic hypermutation and class switch DNA recombination. *Crit Rev Immunol*. 27:367-397.

Yang, Z., L. Zhang, Y. Zhang, T. Zhang, Y. Feng, X. Lu, W. Lan, J. Wang, H. Wu, C. Cao, and X. Wang. 2011. Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. *PLoS One*. 6:e22981.

Yaron, A., A. Carmel, and E. Katchalski-Katzir. 1979. Intramolecularly quenched fluorogenic substrates for hydrolytic enzymes. *Anal Biochem*. 95:228-235.

Yazaki, P.J., A.M. Wu, S.W. Tsai, L.E. Williams, D.N. Ikler, J.Y. Wong, J.E. Shively, and A.A. Raubitschek. 2001. Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and t84.66 minibody: comparison to radioiodinated fragments. *Bioconjug Chem*. 12:220-228.

Yin, J., G. Li, X. Ren, and G. Herrler. 2007. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol*. 127:335-347.

Yribarren, A.S., D. Thomas, A. Friboulet, and B. Avalle. 2003. Selection of peptides inhibiting a beta-lactamase-like activity. *Eur J Biochem*. 270:2789-2795.

Zdanov, A., Y. Li, D.R. Bundle, S.J. Deng, C.R. MacKenzie, S.A. Narang, N.M. Young, and M. Cygler. 1994. Structure of a single-chain antibody variable domain (Fv) fragment complexed with a carbohydrate antigen at 1.7-A resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:6423-6427.

Zhang, C., S. Helmsing, M. Zagrebelsky, T. Schirrmann, A.L. Marschall, M. Schungel, M. Korte, M. Hust, and S. Dubel. 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, R.Y., and W.D. Shen. 2012. Monoclonal antibody expression in mammalian cells. *Methods Mol Biol*. 907:341-358.

Zhao, Z., D. Worthylake, L. Lecour, Jr., G.A. Maresh, and S.H. Pincus. 2012. Crystal structure and computational modeling of the fab fragment from a protective anti-ricin monoclonal antibody. *PLoS One*. 7:e52613.

Zhou, Y.X., S. Karle, H. Taguchi, S. Planque, Y. Nishiyama, and S. Paul. 2002. Prospects for immunotherapeutic proteolytic antibodies. *J Immunol Methods*. 269:257-268.

Zhu, L., M.C. van de Lavoir, J. Albanese, D.O. Beenhouwer, P.M. Cardarelli, S. Cuison, D.F. Deng, S. Deshpande, J.H. Diamond, L. Green, E.L. Halk, B.S. Heyer, R.M. Kay, A. Kerchner, P.A. Leighton, C.M. Mather, S.L. Morrison, Z.L. Nikolov, D.B. Passmore, A. Pradas-Monne, B.T. Preston, V.S. Rangan, M. Shi, M. Srinivasan, S.G. White, P. Winters-Digiacinto, S. Wong, W. Zhou, and R.J. Etches. 2005. Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat Biotechnol*. 23:1159-1169.

Zou, X., C. Ayling, J. Xian, T.A. Piper, P.J. Barker, and M. Bruggemann. 2001. Truncation of the mu heavy chain alters BCR signalling and allows recruitment of CD5+ B cells. *Int Immunol*. 13:1489-1499.

Références netographiques

[1] http://www.imgt.org/

[2] http://wenliang.myweb.uga.edu/mystudy/immunology/ScienceOfImmunology/index.html

[3] http://www.ionsource.com/Card/carbo/nolink.htm

[4] http://bilingualbiology11a.blogspot.fr/2010/12/eukaryotic-cell.html

[5] http://www.fbs.leeds.ac.uk/facilities/cd/index.php

[6] http://www.ogic.ca/projects/k2d3/

[7] http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/

[8] http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/

Annexes

LISTE DES ANNEXES

A. Constructions plasmidiques 2
1. Amorces et produits PCR 2
2. Conditions des PCR 5
3. Conditions des PCR sur colonies 6
B. Protéines recombinantes dans les bactéries *E.coli* 7
1. Transformation 7
2. Biologie moléculaire 8
3. Le scFv 9G4H9 produit dans le périplasmique d'*E.coli* 9
4. Le scFv 9G4H9 produit dans le cytoplasme d'*E.coli* 11
C. Protéines recombinantes dans les cellules HEK-293T 14
1. Transfection 14
2. Purifications 15
3. Déplétion du sérum pour les production de l'AC_{chi}9G4H9. 16
D. Analyses biochimiques 17
1. Dosage BCA 17
2. Electrophorèse 17
3. Western Blot 19
E. Analyses fonctionnelles 21
1. Etude d'interaction par ELISA 21
2. Tests d'hydrolyse de la Fluorocilline™ 22
3. Etude d'interaction par résonance plasmonique de surface 23
F. Analyse structurale par dichroïsme circulaire 24
G. Liste des fournisseurs 25
H. Publication reliée au sujet de thèse 26

A. Constructions plasmidiques

1. Amorces et produits PCR

Clonage du scFv 9G4H9 dans le vecteur pSecTag2C

Amorce sens (S-scFv-pSecTag2C):

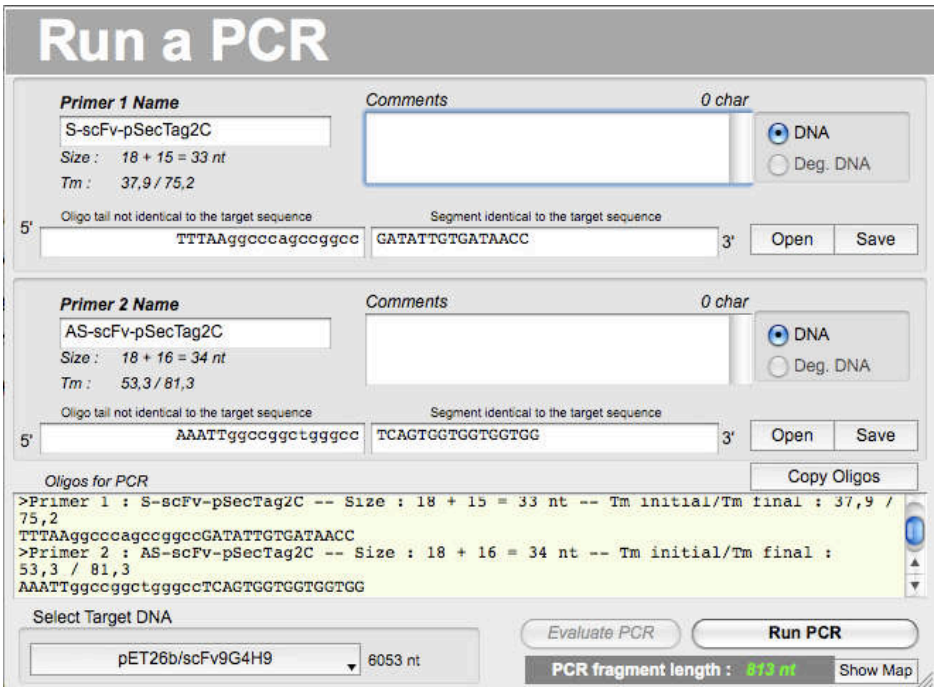
5‘-TTTAA*ggcccagccggcc*GATATTGTGATAACC - 3’ → site SfiI

Amorce anti-sens (AS-scFv-pSecTag2C):

5’- AAATT*ggccggctgggcc*TCAGTGGTGGTGGTGG - 3’ → site SfiI

En vert : la séquence du scFv 9G4H9.

En minuscule italique : les sites des enzymes de restriction.



Simulation de PCR sur SerialCloner avec la taille du produit PCR en vert en bas à droite

Clonage de l'AC$_{chi}$9G4H9 entier avec les vecteurs pFUSE

CHAINE LEGERE

Amorce sens (S-VL- pFUSE2ss-CLIg-hk):

5'- ATTAT*accggt*GGATATTGTGATAACC - 3' → site AgeI

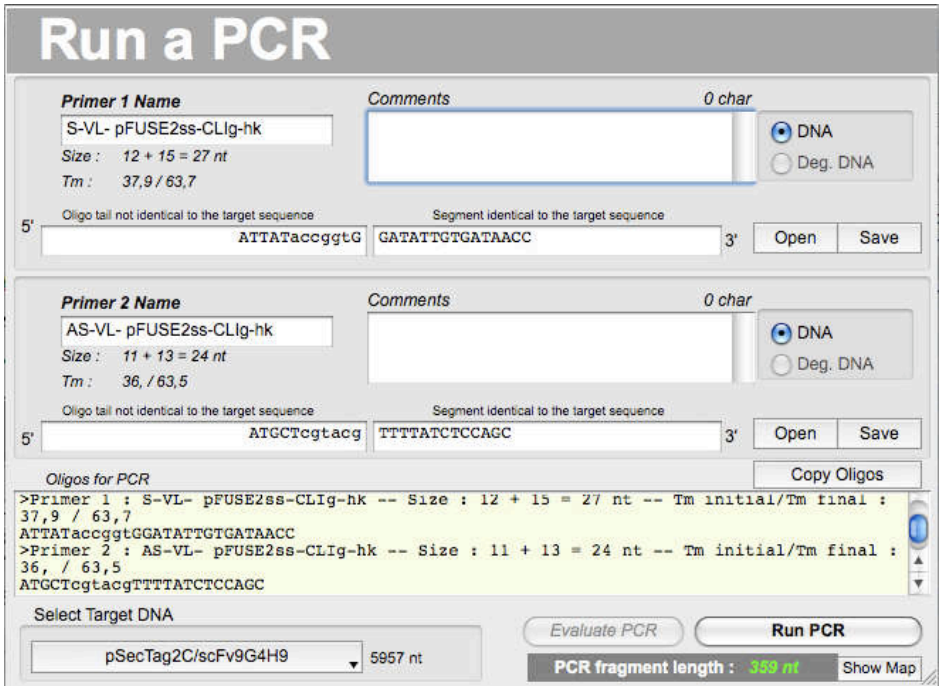
Amorce anti-sens (AS-VL- pFUSE2ss-CLIg-hk):

5'-ATGCTcgtacgTTTTATCTCCAGC - 3' → site BsiWI

En vert : la séquence du scFv 9G4H9.

En rouge : les nucléotides ajoutés pour conserver l'alignement de phase.

En minuscule italique : les sites des enzymes de restriction.



Simulation de PCR sur SerialCloner avec la taille du produit PCR en vert en bas à droite

Clonage de l'AC$_{chi}$9G4H9 entier avec les vecteurs pFUSE

CHAINE LOURDE

Amorce sens (S-VH-pFUSEss-CHIg-hG1):

5'-TGAGT*gaattc*GGGTGAGTTCCAGCTGC - 3' → site EcoRI

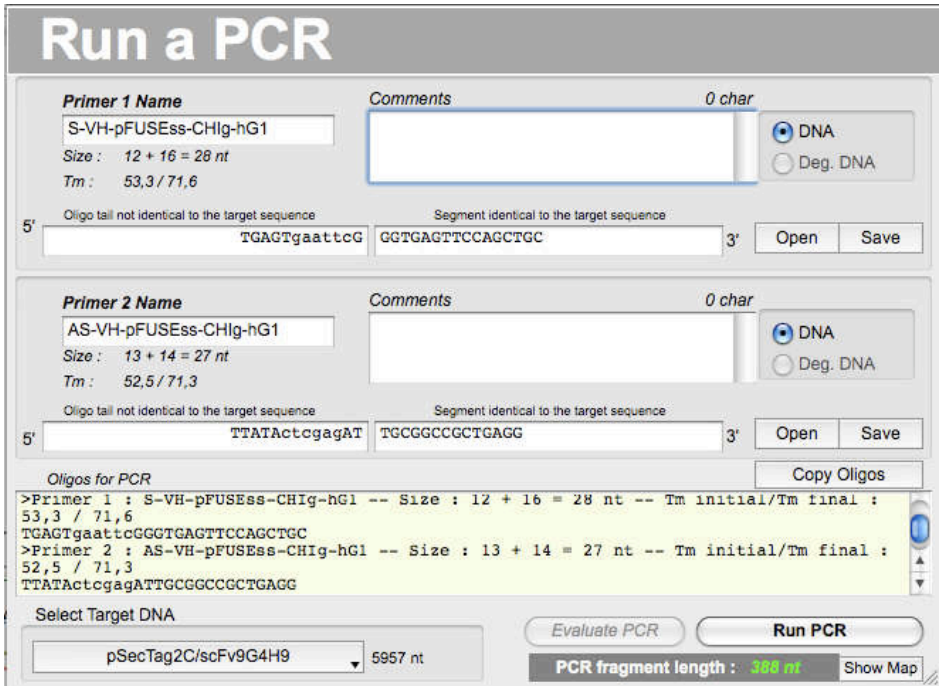
Amorce anti-sens (AS-VH-pFUSEss-CHIg-hG1):

5'- TTATA*ctcgag*ATTGCGGCCGCTGAGG - 3' → site XhoI

En vert : la séquence du scFv 9G4H9.

En rouge : les nucléotides ajoutés pour conserver l'alignement de phase.

En minuscule italique : les sites des enzymes de restriction.



Simulation de PCR sur SerialCloner avec la taille du produit PCR en vert en bas à droite

2. Conditions des PCR

Les réactions de PCR sont réalisées dans des tubes de 250 µl placés dans un thermocycleur Biorad (C1000™ Thermal Cycler).

Les amorces sont préparées à 10µM et les matrices d'ADN à 10ng/ml.

Préparation des mix de PCR :

Mix 1	**Volume (µl)**
Eau MiliQ	17
Mix Nucléotides (mélange de dNTP à 20mM)	0,5
Primer Sens (10µM)	2,5
Primer Anti-Sens (10µM)	2,5
Matrice d'ADN (10ng/ml)	2,5
Mix 2	**Volume (µl)**
Eau MiliQ	19,75
Taq tampon 10X (1,5mM $MgCl_2$ finale)	5
Taq ADN polymérase (5U/µl)	0,25

Programme de PCR :

	Cycles	**Temps**	**Température**
Dénaturation initiale	1	2 min	94°C
Dénaturation 1	10	15 sec	94°C
Hybridation 1		30 ses	**50°C**
Elongation 1		45 sec	72°C
Dénaturation 2	30	15 sec	94°C
Hybridation 2		30 sec	**70°C**
Elongation 2		45 sec	72°C
Elongation finale	1	5 min	72°C
Fin	1	∞	4°C

Le Tm (pour melting temperature) représente la température de demie dénaturation à laquelle 50% d'une séquence d'ADN est sous forme double brin et 50% sous forme simple brin. Au cours de l'amplification, il y a deux séries de cycles alors que classiquement il en suffit d'un. La première série de cycles permet d'optimiser la réaction. En effet la présence des bouts flottants sur les amorces, contenant des séquences non présentes sur la matrice dans le but d'ajouter des sites cibles d'enzymes de restrictions, empêche une parfaite hybridation. Le fait d'utiliser une température plus basse que celle du Tm augmente l'efficacité de l'amplification en favorisant l'hybridation des amorces, malgré la présence de ces bouts flottants. Mais pour limiter l'amplification de séquences non spécifiques, du fait de se placer à un Tm plus bas, cette première série d'amplification se limite à 10 cycles. Lors des 30 cycles suivants, la température est augmentée pour se rapprocher de celle du Tm du couple d'amorces. Ces deux températures d'hybridation sont représentées en gras dans le tableau. Celles indiquées ici correspondent au couple d'amorces utilisé dans l'amplification du scFv 9G4H9 pour un clonage dans le vecteur pSecTag2C. Les températures 35°C/60°C et 35°C/70°C (température d'hybridation 1/température d'hybridation 2) sont utilisées pour l'amplification des domaines VL et VH respectivement dans les vecteurs pFUSE.

3. Conditions des PCR sur colonies

Préparation des mix de PCR :

Mix 1	Volume µl
Eau MiliQ	19,5
Mix Nucléotides (20mM de chaque dNTP)	0,5
Primer Sens (10µM)	2,5
Primer Anti-Sens (10µM)	2,5
Mix 2	**Volume µl**
Eau MiliQ	19,75
Taq buffer 10X (1,5mM $MgCl_2$ finale)	5
Taq ADN polymérase (5U/µl)	0,25

Un cône ayant effleuré une colonie est mis en contact avec le mix réactionnel dans les tubes de PCR.

Le programme de PCR utilisé est le même que celui des PCR classiques (Annexe A.2).

B. Protéines recombinantes dans les bactéries *E.coli*

1. Transformation

Principe :

L'ADN entre dans la cellule grâce à un choc thermique qui perméabilise la membrane bactérienne.

Réactifs :

Bactéries compétentes :

- BL21(DE3) pour les production de protéines recombinantes.
- JM109 pour les étapes de clonage.

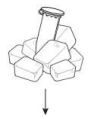
SOC : tryptone 1%, extrait de levure 1%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl2 10mM, $MgSO_4$ 10mM, glucose 20mM.

LB-agar : tryptone 1%, extrait de levure 1%, NaCl 10 mM, 2% agar et un antibiotique pour sélectionner les bactéries ayant intégrées le plasmide d'intérêt (100 µg/ml pour l'ampicilline, 50 µg/ml pour la kanamycine et 25 µg/ml pour la zéocine ou la blasticidine S)

Matériels :

Plasmides, incubateurs Infors, centrifugeuse (Beckman).

Protocole :

	Un tube de bactéries compétentes est placé dans la glace pendant **10-15 minutes.** Dans un tube de 1,5ml, préalablement placé dans la glace, sont déposés : • **100 à 200 ng** de vecteurs • **100 µl** de bactéries
	Le tube reste dans la glace pendant **20** minutes pour permettre l'adsorption de l'ADN sur les bactéries.
	L'entrée de l'ADN se fait par choc thermique : **45** secondes à **42°C.**
	Le tube est de nouveau placé dans la glace pendant **2** minutes.
	900µl de milieu **SOC** sont ajoutés au tube et celui-ci est placé à **37°C,** sous agitation pendant **1h30.**
	100µl de la solution sont étalés sur une boîte de LB-agar. Les boîtes sont placées une nuit à **37°C.**

2. Biologie moléculaire

a) Extraction de plasmides à partir de bactéries transformées

Pour les vérifications des clonages, les plasmides sont isolés à partir de cultures de 3ml grâce au kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen).

Pour les productions des protéines recombinantes chez *E.coli* et HEK-293T, une plus grande quantité d'ADN est nécessaire. Les extractions sont réalisées à partir de 200 ml de culture bactérienne grâce au kit NucleoBond® Xtra Midi (Macherey Nagel). Ce kit, contenant des colonnes exploitant le principe de la chromatographie échangeuse d'ions, permet d'obtenir de l'ADN de meilleur qualité, avec peu de contaminants augmentant l'efficacité des transfections et des transformations.

Les extractions ont été réalisées en respectant les recommandations des fabricants.

b) Restrictions enzymatiques

Les différentes digestions de plasmides, au cours des étapes de clonage, sont menées selon les conditions décrites par New England Biolabs. Quelques exemples sont présentés dans le tableau suivant :

	SfiI	NotI	NotI/XbaI
Plasmide	2 à 5 µg	2 à 5 µg	2 à 5 µg
Tampon Neb	N°2 : 10 µl	N°3 : 10 µl	N°3 : 10 µl
Unité Enzyme (UE)	5 UE/µg	2 UE/µg	2 UE/µg
BSA 10X	10 µl	10 µl	10 µl
H_20	qsp 50 µl	qsp 50 µl	qsp 50 µl
Incubation/T°	4h à 50°C	1h à 37°C	1h à 37°C

c) Conditions des ligations

Après digestion, les plasmides receveurs sont déphosphorilés avec le kit rAPid Alkaline Phosphatase (Roche) de la façon suivante :

- 17 µl de produit de digestion
- 2 µl de tampon
- 1 µl rAPid Alkaline Phosphatase (1UE)

Les tubes sont placés à 37°C pendant 10 minutes, puis l'enzyme est inactivée par un passage de 2 minutes à 75°C.

Cette étape empêche la re-circularisation des plasmides digérés. Seuls les groupements phosphate de l'insert peuvent former une liaison avec les groupements hydroxyl du plasmide, entraînant sa re-circularisation. Cette réaction a lieu lors de la ligation, avec une ligase T4 (promega), qui se déroule ainsi :

- Un rapport 1:3 d'ADN (plasmide et insert respectivement)
- 1 µl de tampon
- 0,1 à 1UE de ligase, en fonction de la quantité d'ADN

Le volume réactionnel est de 10 µl et les tubes sont placés à 16°C pendant une nuit.

3. Le scFv 9G4H9 produit dans le périplasmique d'*E.coli*

a) Induction de la surexpression

Principe :

La surexpression des protéines recombinantes est induite par l'ajout d'IPTG (2,5 mM). Pour une expression périplasmique, le scFv 9G4H9 possède une séquence d'adressage au périplasme : pelB.

Réactifs :

Vecteur pET26b/scFv9G4H9 (résistance à la kanamycine).

IPTG solution mère à 1 M (Sigma-Aldrich).

LB : tryptone 1%, extrait de levure 1%, NaCl 10 mM, et un antibiotique (50 μg/ml de kanamycine).

LB-agar : tryptone 1%, extrait de levure 1%, NaCl 10 mM, 2% agar et un antibiotique pour sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide d'intérêt (50 μg/ml de kanamycine).

Tampon de lyse : NaH_2PO_4 0,1 M, EDTA 3 mM, NaCL 15,2 mM, NaN_3 0,1 %.

Matériels :

Incubateurs Infors, Centrifugeuse (Beckman), agitateur « ping pong ».

Protocole :

J-2 : Un étalement sur boîte de pétri LB-agar est réalisé à partir d'un stock glycérolé de bactéries ayant intégré le vecteur pET26b/scFv9G4H9. La boîte est incubée une nuit à 37°C

J-1 : Une colonie est repiquée dans 100 ml de LB additionné de Kanamycine 50μg/ml. Cette préculture est incubée une nuit à 37°C sous agitation (200 rpm).

J0 : Culture et induction :

- La préculture est diluée au 1/10ème dans du LB + Kanamycine 50μg/ml et incubée à 37°C pendant 1h sous agitation.
- la DO à 600 nm est alors mesurée, elle est attendue vers 0,5.
- La préculture est diluée au 1/100ème dans du LB + Kanamycine 50μg/ml. Le volume final est de 500 ml.
- La DO à 600 nm est mesurée toutes les 30 minutes à 1h.
- Lorsque la DO atteint 0,6, de l'IPTG à une concentration finale de 2,5 mM est ajouté dans la culture pour induire la surexpression du scFv9G4H9
- La culture induite est incubée 3h à 28°C sous agitation.
- Après 3h d'induction, la DO est mesurée, elle est attendue à 2.
- La culture est centrifugée pendant 15 min, 1500 g, à température ambiante.
- Le culot est re-suspendu dans 10 ml de tampon de lyse à 4°C, puis transféré dans un tube COREX préalablement incubé dans la glace.
- Le tube est placé sous forte agitation dans un agitateur pendant 30 minutes, dans la glace.
- La solution est centrifugée pendant 10 minutes à 20 000g, 4°C. Le surnageant ainsi obtenu est congelé à -20°C et correspond à l'extrait brut périplasmique.

b) Extraction et Purification

Principe :

le scFv est extrait et purifié grâce à l'étiquette protéique 6xHis. Deux atomes d'azote du cycle de la chaîne latérale de deux résidus histidines liés interagissent par des liaisons non covalentes avec l'ion Ni^{2+} exposé à la surface de billes d'agarose.

Réactifs :

Tampon de lavage : NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 20 mM, Tween 20 à 0.05%, pH 8,0.

Tampon d'élution : NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 250 mM, Tween 20 à 0.05%, pH 8,0.

Tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4.

Résine Ni-NTA agarose (Qiagen)

Matériels :

Agitateur rotatif (VWR), centrifugeuse (Beckman), centrifugeuse réfrigérée (Eppendorf).

Protocole :

Préparation de la résine :

- 1ml de solution de résine Ni-NTA (correspondant à 500µl « vrais » résine) est placé dans un tube Falcon 15ml et centrifugé pendant une minute à 4000g.
- Le surnageant est éliminé.
- La résine est reprise avec 1ml de tampon de lavage. L'étape est réalisée 2 fois.

Purification :

- 30 µl d'extrait brut (Eb) périplasmique sont prélevés et conservés à 4°C pour les analyses ultérieures. Le culot de résine est re-suspendu dans l'Eb et incubé 1h à température ambiante sous légère agitation (agitateur rotatif).
- Le tube est centrifugé pendant 1minute à 4000g.
- Le surnageant est récupéré soigneusement (sans prendre de résine) et constitue la fraction non retenue (Nr).
- 30 µl de Nr sont prélevés et conservés à 4°C pour les analyses ultérieures.
- Deux lavages successifs sont réalisés avec 1 ml de tampon de lavage. Lors du premier lavage, le culot est transféré dans un tube Eppendorf 1,5ml grâce au tampon de lavage. Les centrifugations sont réalisées pendant 1 minute à 4000g.
- 500 µl de tampon d'élution sont ajoutés au culot de résine puis incubés pendant 10 minutes à température ambiante sous légère agitation.
- Le tube est centrifugé pendant 2 minutes à 4000g, 4°C.
- Le surnageant est récupéré soigneusement et constitue la fraction d'élution (E).
- 30 µl de E sont prélevés et conservés à 4°C pour les analyses ultérieures.
- La solution est dialysée contre du tampon phosphate (Seuil de coupure des membranes de dialyse : 12 kDa) pour éliminer l'imidazole, molécule utilisée lors du processus de purification et incompatible avec les tests d'analyse.

4. Le scFv 9G4H9 produit dans le cytoplasme d'*E.coli*

a) Induction de la surexpression

Principe :

La surexpression des protéines recombinantes est induite par l'ajout d'IPTG (1 mM). Lors de cette surexpression du scFv 9G4H9, celui-ci s'agrège et forme des corps d'inclusion dans le cytoplasme.

Réactifs :

Vecteur pET26b/scFv9G4H9 (résistance à la kanamycine)

IPTG solution mère à 1 M (Sigma-Aldrich)

LB : tryptone 1%, extrait de levure 1%, NaCl 10 mM, et un antibiotique pour sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide d'intérêt (50μg/ml de kanamycine)

Matériels :

Incubateurs Infors, Centrifugeuse (Beckman).

Protocole :

J-2 : Un étalement sur boîte de pétri LB-agar est réalisé à partir d'un stock glycérolé de bactéries ayant intégré le vecteur pET26b/scFv9G4H9. La boîte est incubée une nuit à 37°C

J-1 : Une colonie est repiquée dans 50 ml de LB + Kanamycine 50μg/ml. Cette préculture est incubée une nuit à 37°C sous agitation (180 rpm).

J0 : Culture et induction :

- La préculture est diluée au 1/10ème et la DO à 600 nm est mesurée, elle est attendue vers 3 à 5.
- La préculture est diluée au 1/100ème dans du LB + Kanamycine 50μg/ml et la DO à 600 nm est mesurée, elle est attendue vers 0,03 à 0,05.
- La culture est incubée à 37°C sous agitation. La DO est mesurée toutes les 30 minutes à 1h.
- Lorsque la DO atteint 0,6, de l'IPTG à une concentration finale de 1 mM est ajouté dans la culture pour induire la surexpression du scFv9G4H9. Une culture témoin sans induction est prévue en parallèle.
- La culture induite est incubée 3h à 28°C sous agitation.
- Après 3h d'induction, la DO est mesurée, elle est attendue entre 2 et 3. Théoriquement, la DO de la culture non induite est moins élevée que celle de la culture induite.
- Les deux cultures, induite et non induite, sont réparties dans des tube Falcons de 50ml. Les tubes sont centrifugés pendant 10 min à 2500 g, 4°C.
- les surnageants sont jetés et les culots cellulaires sont conservés à -20°C.

b) Extraction, Purification et Renaturation

Principe :

L'utilisation d'agents chaotropiques permet de solubiliser les corps d'inclusion et d'extraire le scFv grâce à l'étiquette protéique 6xHis.

Réactifs :

Tampon de re-suspension : tampon TRIS HCl 0,1 M, pH 8 additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (un comprimé Complete Mini, Roche pour 10 ml de tampon TRIS).

Tampon de dénaturation : Urée 8M, β-Mercaptoéthanol 10 mM, Tris 0,1M, pH 8.

Tampon d'élution : Urée 8M, β-Mercaptoéthanol 10 mM, Imidazole 200 mM, Tris 0,1 M, pH 8.

Tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4.

Urée, arginine (400 mM), TRIS (0,1 M), DTT (5), Glutathion oxydé (50 × plus concentré que le scFv), Glutathion réduit (500 × plus concentré que le scFv) (Sigma-Aldrich)

Résine Ni-NTA agarose (Qiagen)

Matériels :

Agitateur rotatif (VWR), centrifugeuse (Beckman), centrifugeuse réfrigérée (Eppendorf), sonicateur.

Protocole :

Préparation des échantillons :

- Les culots cellulaires, induits et non induits, sont re-suspendus avec du tampon de re-suspension (5 ml de tampon pour un culot de 50ml de culture).
- Les échantillons sont soniqués pendant 30 secondes en force 2.
- Les échantillons sont placés dans des tubes COREX à vis, puis centrifugés pendant 10 minutes à 6000 g, 4°C.
- Les surnageants sont jetés. Les culots sont re-suspendus avec 5 ml de tampon de dénaturation, puis incubés 1h à 37°C sous agitation.
- Les tubes sont centrifugés pendant 30 min à 6000 g, 4°C.
- Les surnageants sont récupérés et constituent l'extrait brut (Eb, contenant les scFv solubilisés par l'Urée).
- 30µl d'Eb induit et non induit sont prélevés et conservés à 4°C pour les analyses ultérieures.

Préparation de la résine (seulement pour les extraits induits) :

- 1ml de solution de résine Ni-NTA (correspondant à 500µl « vrais » de résine) sont placés dans un Falcon 15ml et centrifugés pendant une minute à 4000g.
- Le surnageant est éliminé.
- La résine est reprise avec 1ml de tampon de dénaturation. L'étape est réalisée 2 fois.

Purification :

- Le culot de résine est re-suspendu dans l' Eb et incubé 1h à température ambiante sous légère agitation (agitateur rotatif).
- Le tube est centrifugé pendant 1minute à 4000g.
- Le surnageant est récupéré soigneusement (sans prendre de résine) et constitue la fraction non retenue Nr.
- 30 µl de Nr sont prélevés et conservés à 4°C pour les analyses ultérieures.
- Deux lavages successifs sont réalisés avec 1 ml de tampon de dénaturation. Lors du premier lavage, le culot est transféré dans un tube eppendorf 1,5ml grâce au tampon de dénaturation. Les centrifugations sont réalisées pendant 1 minute à 4000g.
- 500 µl de tampon d'élution sont ajoutés au culot de résine puis incubés pendant 10 minutes à température ambiante sous légère agitation.
- Le tube est centrifugé pendant 2 minutes à 4000g, 4°C.
- Le surnageant est récupéré soigneusement et constitue la première fraction d'élution E1.
- Cette étape est renouvelée pour obtenir un deuxième éluat, E2.
- 30 µl de E1 et E2 sont prélevés et conservés à 4°C pour les analyses ultérieures.
- Les fractions Eb/Nr/W1/W2/E1/E2 sont analysées sur gel de coomassie.

Etapes des renaturation :

Dialyses		**Urée**	**Arginine 0,4 M**	**Tris 0,1M pH 8**	**Glutathion oxydé (Pour ≈ 10µM de scFv)**	**Glutathion réduit (Pour ≈ 10µM de scFv)**	**DTT 5mM**	**TP phosphate 0,1M pH 7,4**
n°1	Jour 1	**8M**	-	**+**	-	-	-	-
n°2	Jour 2	**4M**	**+**	**+**	-	-	**+**	-
n°3	Jour 2	**2M**	**+**	**+**	-	-	**+**	-
n°4	Jour 3	**1M**	**+**	**+**	**500 µM**	**5mM**	**+**	-
n°5	Jour 3	**0,5M**	**+**	**+**	**500 µM**	**5mM**	**+**	-
n°6	Jour 4	-	**+**	**+**	-	-	**+**	-
n°7	Jour 4	-	-	-	-	-	-	**+**

Seuil de coupure des membranes de dialyse : 12 kDa

La première dialyse vise à éliminer l'imidazole, molécule utilisée lors du processus de purification et incompatible avec le test BCA qui suit. Chaque dialyse dure 8 à 12h et est réalisée à 4°C (à l'exception de la première dialyse en Urée 8M).

Un BCA est réalisé au deuxième jour. La concentration du scFv est ajustée à 10 µM avec du tampon de dialyse n°1.

Au cinquième jour, en fin de processus de renaturation, l'échantillon est centrifugé pendant 10 minutes à 12000g, 4°C. Cette étape permet d'éliminer les éventuels précipitations résiduelles.

C. Protéines recombinantes dans les cellules HEK-293T

1. Transfection

Principe :

L'ADN recombinant est introduit dans les cellules par la technique du précipité au phosphate de calcium. Les précipités ADN/CaP_i sont phagocytés par les cellules. Après quelques heures (4 à 5 heures), celles-ci commencent à sécréter la protéine recombinante dans le milieu de culture.

Réactifs :

DMEM, OptiMEM, SVF decomplémenté (30 minutes à 56°C), L-Glutamine, Pénicilline/Streptomycine.

Tampon HBS 2x à pH 6,95 (HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, Na2HPO4 1,4mM) filtré à 0,2 µm et conservé à -20°C.

$CaCl_2$ 2,5 M filtré à 0,2 µm et conservé à 4°C.

Vecteurs :

- pSecTag2C/scFv9G4H9 pour l'expression du scFv 9G4H9.
- pFUSE-HC/V_H9G4H9 et pFUSE-LC/V_L9G4H9 pour l'expression de l'anticorps 9G4H9 chimérique entier.

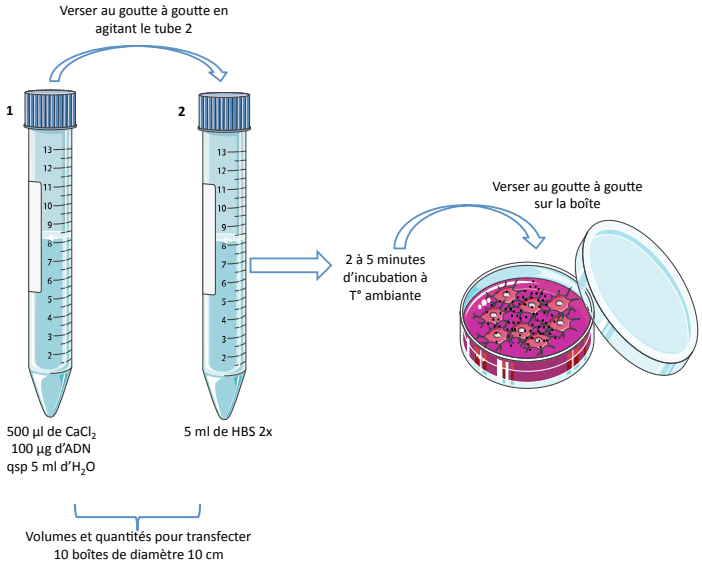
Protocole :

Les cellules HEK-293T sont des cellules adhérentes. Elles sont maintenues en culture dans du DMEM 4,5 g/l, supplémenté en sérum de veau fœtal 10% (SVF), glutamine 1% et antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine). Elles sont incubées à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO_2.

Les cellules sont ensemencées de façon à obtenir une confluence d'environ 80% le jour de la transfection (exemple : pour les cellules HEK293T : 0,9 million de cellules pour une boîte diamètre 10 cm à 3 jours de la transfection).

Le jour de la transfection :

- Le milieu DMEM est remplacé par de l'OptiMEM 2h avant la transfection. Ce milieu permet de diminuer la concentration en sérum à 2% sans conséquence néfaste sur les cellules. Ceci permet d'optimiser la purification de la protéine recombinante d'intérêt. (9 ml d'OptiMEM par boîte diamètre 10cm).
- La transfection est représentée dans le schéma suivant :



- 4 heures après la transfection, le milieu de culture est changé (10 ml OptiMEM par boîte).
- Le milieu de culture, contenant les protéines recombinantes produites par les cellules, est récolté 48 ou 72 heure après la transfection.

2. Purifications

a) scFv 9G4H9 :

Le scFv produit dans les cellules eucaryotes est purifié par chromatographie d'affinité métal chélate en batch, dans les mêmes conditions que la purification du scFv procaryote périplasmique (cf. annexe 1.b.). Une seule différence est à faire au niveau de la résine Ni-NTA où 40 µl de solution de résine (20µl « vrais » de résine) sont utilisés pour 20ml de milieu de culture de cellules transfectées.

b) AC_{chi}9G4H9 :

Principe :

La protéine A (de *Staphylococcus aureus*) a une affinité pour la région Fc de l'anticorps chimérique 9G4H9. C'est cette propriété qui est exploitée pour purifier l'anticorps.

Réactifs :

PBS 1X : NaCl 137mM, KCl 2,7mM, $NaHPO_4$ 10mM, KH_2PO_4 1,8mM.

Tampon d'élution : glycine 0,2 M, pH 2,0.

Tampon de neutralisation : TRIS-HCl 1M, pH 8,5.

Résine protein A Affarose XTreme (Interchim)

Matériels :

Agitateur rotatif (VWR), centrifugeuse (Beckman), centrifugeuse réfrigérée (Eppendorf).

Protocole :

Préparation de la résine de protéine A :

- 40 µl de solution de résine de protéine A (20µl « vrais » de protéine A) pour 20ml de milieu de culture de cellules transfectées, sont placés dans un tube Eppendorf de 1,5 ml.
- Le tube est centrifugé pendant une minute à 4000g.
- La protéine A est reprise avec 1ml de PBS 1X. L'étape est réalisée 2 fois.

Purification :

- Le surnageant récolté correspond à l'extrait brut (Eb). 30 µl d'Eb sont prélevés et conservés à 4°C pour les analyses ultérieures. Le culot de résine de protéine A est re-suspendu dans l'Eb et incubé 4h à 4°C sous légère agitation (agitateur rotatif).
- Le tube est centrifugé pendant 1minute à 4000g, 4°C.
- Le surnageant est récupéré soigneusement (sans prendre de résine) et constitue la fraction non retenue (Nr).
- 30 µl de Nr sont prélevés et conservés à 4°C pour les analyses ultérieures.
- Deux lavages successifs sont réalisés avec 1 ml de PBS 1X. Lors du premier lavage, le culot est transféré dans un tube Eppendorf 1,5ml grâce au tampon de lavage. Les centrifugations sont réalisées pendant 1 minute à 4000g, 4°C.
- 450 µl de tampon d'élution sont ajoutés au culot de résine de protéine A puis incubés pendant 2 minutes à 4°C sous légère agitation.
- Le tube est centrifugé pendant 2 minutes à 4000g, 4°C.
- Le surnageant est récupéré soigneusement et 50 µl de solution de neutralisation sont ajoutés pour augmenter le pH. Cette solution constitue la fraction d'élution (E).
- 30 µl de E sont prélevés et conservés à 4°C pour les analyses ultérieures.
- La solution est dialysée contre du tampon phosphate (Seuil de coupure des membranes de dialyse : 12 kDa) pour se placer dans le même tampon de conservation que les autres protéines recombinantes produites.
- Les fractions Eb/Nr/W1/W2/E sont analysées sur gel de coomassie.

3. Déplétion du sérum pour les production de l'AC_{chi}9G4H9.

Lors de la transfection pour la production de l'AC_{chi}9G4H9, l'OptiMEM utilisé a été déplété en IgG bovines. Pour ce faire, le sérum de veau est mis en contact avec la résine de protéine A pendant 4 heures à 4°C (50 µl « vrais » de résine de protéine A pour 50ml de sérum). Il est ensuite récupéré par centrifugation pendant 2 minutes à 4000g. Les protéines fixées à la protéine A sont éluées selon le même principe que décrit précédemment. L'opération est renouvelé, jusqu'à ne plus observer d'IgG sur les gels de coomassie de contrôle des déplétions. En moyenne, 4 à 5 passages successifs ont été nécessaire.

D. Analyses biochimiques

1. Dosage BCA

Principe :

Cette technique est basée sur une détection colorimétrique à 560 nm. L'absorbance augmente avec la concentration en protéines de l'échantillon. Une gamme d'albumine sérique bovine (BSA) est mesurée en parallèle afin d'obtenir une courbe étalon, permettant de déduire les concentrations en protéines de l'échantillon.

Réactifs :

Kit BCA (Sigma-Aldrich): solution A d'acide bicinchoninic, solution B de sulfate de cuivre (ratio d'utilisation A/B de 50:1).

BSA (Sigma-Aldrich) : solution mère à 1 mg/ml.

Matériels :

Spectrophotomètre, Microplaque 96 puits (Greiner).

Protocole :

- Une gamme BSA est préparée dans de l'eau milliQ à des concentrations de 0 à 500 µg/ml.
- 10 µl de chaque échantillon et de la gamme BSA sont déposés en duplicate dans une plaque 96 puits.
- 200 µl de réactif BCA sont ajoutés dans chaque puits.
- La plaque est incubée 30 minutes à 37°C.
- Les absorbances sont lues à 560 nm.

2. Electrophorèse

Préparation des gels SDS-PAGE (Volumes pour préparer 2 gels de 1,5mm) :

Gel de migration	10%
H_2O	8 ml
Tris-HCl, 1,5 M pH 8.8	5 ml
Acrylamide/Bis-acrylamide(30%)	6,6 ml
10% (w/v) SDS	200 µl
10% (w/v) ammonium persulfate (APS)	200 µl
TEMED	20 µl

Gel de concentration	5%
H_2O	6,8 ml
Tris-HCl 0,5 M, pH 6.8	3 ml
Acrylamide/Bis-acrylamide(30%)	2 ml
10% (w/v) SDS	120 µl
10% (w/v) ammonium persulfate (APS)	120 µl
TEMED	12 µl

Préparation des tampons de charge 4X:

Tampon Laemmli	Tampon non réducteur (nr)
2,4 ml de Tris pH 6,8 à 1 M	2,4 ml de Tris pH 6,8 à 1 M
0,8 g de SDS	-
0.01% de bleu de bromophénol	0.01% de bleu de bromophénol
1ml β-mercaptoethanol	-
2,8 ml d'eau mQ	3,8 ml d'eau mQ

Préparation des échantillons :

30 µl de chaque échantillon sont mélangés à 10 µl de tampon Laemmli. L'ensemble est chauffé à 95°C pendant 2 minutes avant d'être déposé dans les puits du gel de polyacrylamide.

En conditions non réductrices, pour l'analyse des purifications de l'anticorps, le tampon (nr) est utilisé pour préparer les échantillons. Les échantillons ne subissent pas d'étape de chauffage, ils sont déposés directement dans le gel.

Migration et coloration des gels:

Tampon de migration 1X	
Tris	25 mM
Glycine	192 mM
SDS	0,1%
Eau mQ	Qsp 1 L
Solution de décoloration 1 L	
Ethanol	200 ml
Acide acétique	100 ml
Eau mQ	700 ml
Solution de coloration 1 L	
Bleu de coomassie R-250	2 g
Solution de décoloration	1 L

Le gel est placé dans une cuve de migration grâce au système mini-protean de Bio-Rad. Le système est immergé dans la solution de migration. Après avoir déposé le marqueur de poids moléculaire et les échantillons dans les puits, la migration est lancée pendant 45 minutes à 200V.

Après migration, le gel est placé dans la solution de coloration pendant 30 à 60 minutes sous agitation. Plusieurs bains avec la solution de décoloration permettent d'éliminer le bleu de coomassie qui ne s'est pas lié aux protéines. On visualise ainsi les protéines sous la forme de bandes bleues.

3. Western Blot

Principe :

Il permet de révéler la présence des protéines recombinantes grâce à des anticorps ciblant l'étiquette 6xHis pour les scFv 9G4H9 et la région Fc pour l'AC_{chi}9G4H9. Les anticorps sont couplés à une enzyme qui permet la révélation sur film auto radiographique.

Réactifs :

PBS 1X : NaCl 137mM, KCl 2,7mM, $NaHPO_4$ 10mM, KH_2PO_4 1,8mM.

PBST : PBS 1X, 0,05% Tween-20.

PBSTM : PBST, 5% lait en poudre.

Anticorps de révélation : anti-His et anti-IgG humaines couplés HRP (Santa Cruz).

Tampon de migration (cf. annexe D.2).

Tampon de transfert : TRIS 25 mM, pH 8,3, glycine 192 mM, méthanol 20% V/V.

Kit ECL (Enhanced chemiluminescence) Plus (GE Healthcare).

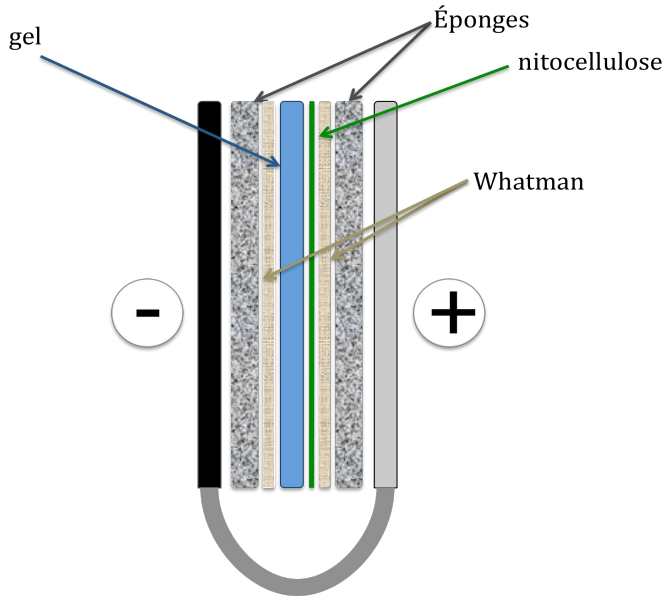
Matériels :

Système d'éléctrophorèse Mini-PROTEAN (Bio-Rad), système de transfert Mini Trans-Blot (Bio-Rad), membrane de nitrocellulose, papier whatman, Agitateur tridimensionnel Polymax.

Protocole :

Préparation des échantillons :

- Une électrophorèse est réalisée dans les conditions décrites dans l'annexe D.2.
- Les protéines du gel de polyacrylamide sont transférées sur membrane de nitrocellulose. Le schéma suivant décrit le montage réalisé :



- Le transfert se déroule pendant 1h à 100V.

Saturation de la membrane :

- Afin de masquer les éventuels sites non spécifiques, la membrane est incubée dans du PBSTM pendant 1h à température ambiante sous agitation.
- La membrane est ensuite lavée grâce à 3 incubations de 5 minutes dans du PBST sous agitation.

Révélation :

Les anticorps utilisés sont couplés à l'HRP, la révélation est donc directe.

- Les anticorps sont dilués au 1/2000ème dans du PBSTM.
- La membrane est incubée dans la solution d'anticorps pendant 1h à température ambiante sous agitation.
- La membrane est ensuite lavée grâce à 3 incubations de 5 minutes dans du PBST sous agitation.
- L'activité peroxydase est révélée à l'aide du kit ECL. La peroxydase oxyde le luminol du substrat, la lumière produite permettant la révélation autoradiographique.

E. Analyses fonctionnelles

1. Etude d'interaction par ELISA

Principe :

Le principe est de révéler l'interaction entre l'AC_{chi}9G4H9 (ou son dérivé scFv) et le peptide inhibiteur Pep90.

Réactifs :

PBS 1X : NaCl 137mM, KCl 2,7mM, $NaHPO_4$ 10mM, KH_2PO_4 1,8mM.

PBST : PBS 1X, 0,05% Tween-20.

PBSTM : PBST, 5% lait en poudre.

Anticorps de révélation : anti-His et anti-IgG humaines couplés HRP (Santa Cruz).

Tampon Carbonate : solution A : Na_2CO_3 0,1M, solution B : $NaHCO_3$ 0,1M (30ml de solution A + 70ml de solution B), pH à 9,6.

ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) :substrat de l'enzyme HRP.

Matériels :

Microplaque 96 puits Maxisorb (Nunc), agitateur tridimensionnel Polymax, Incubateur à 37°C, specrophotomètre.

Protocole :

1) Immobilisation de la plaque
   - Une solution de Pep90 à 5 µM est préparée dans le tampon carbonate.
   - 100 µl sont déposés par puits et la plaque est incubée 2 h à 37 °C.
   - Les puits sont lavés avec 300µl de PBST (3 fois 5 minutes sous agitation).

2) Dépôt des échantillons
   - 100 µl de chaque échantillon sont déposés par puits puis incubés 2h à 37°C.
   - Les puits sont lavés avec 300µl de PBST (3 fois 5 minutes sous agitation).

   Liste des contrôles négatifs déposés en parallèle :
   - Contrôle avec un scFv non catalytique (scFv SAF34 dirigé contre la protéine prion).
   - Contrôle sans échantillon pour évaluer le bruit de fond.

3) Saturation
   - La saturation est réalisée avec 200 µl de PBSTM.
   - La plaque est incubée 1 h à 37 °C.
   - Les puits sont lavés avec 300µl de PBST (3 fois 5 minutes sous agitation).

4) Anticorps révélateur
   - 100 µl de solution d'anticorps est déposée par puits.

   Les révélations impliquant les scFv 9G4H9 sont faites grâce à l'anticorps anti-His au 1/2000ème. Les révélations impliquant l'AC_{chi}9G4H9 sont faites grâce à l'anticorps anti-IgG humaines au 1/2000ème .
   - La plaque est incubée 1 h à 37 °C.
   - Les puits sont lavés avec 300µl de PBST (3 fois 5 minutes sous agitation).

5) Révélation
   - 100 µl d'ABTS sont déposés par puits.
   - La plaque est placée à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. Au contact de l'HRP la solution d'ABTS passe de l'incolore à la couleur verte détectable au spectrophotomètre à 405 nm.
   - La plaque est lue à 405nm pour mesurer la DO de chaque puits.

2. Tests d'hydrolyse de la Fluorocilline™

Principe :

La capacité de catalyse de l'AC_{chi}9G4H9 ou de son dérivé scFv est révélée par l'hydrolyse d'un substrat fluorogénique. Ce substrat n'émet de la fluorescence qu'en cas d'hydrolyse des cycles β-lactames encadrant le fluorophore.

Réactifs :

Fluorocilline™ (Life Technologie).

Tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4.

DMSO (diméthylsulfoxyde).

BSA (bovine serum albumin) à 1mg/ml.

Matériels :

Cuve de 0,5 ml (Quartz-Suprasil, Hellma).

Spectrophotomètre de fluorescence (Varian Cary Eclipse).

Protocole :

La Fluorocilline™ est solubilisée dans 100% de DMSO.

Dans un tube eppendorf sont déposés :

- 449 µl de catalyseur en tampon phosphate.
- 50 µl de BSA à 1%.

5 µl de Fluorocilline™ à 0,5 mM sont ajoutés, le tube est rapidement homogénéisé et la solution est rapidement placée dans la cuve de quartz.

L'échantillon est excité à 495 nm et l'émission de fluorescence est détectée à 525 nm avec un niveau de voltage de détection du PMT (Photomultiplier Tubes) réglé sur moyen.

Les valeurs sont mesurées toutes les minutes pendant au moins 30 minutes.

3. Etude d'interaction par résonance plasmonique de surface

Réactifs et Matériels :

Tampon HBS-EP$^+$ (GE Healthcare).

Puce SA (Streptavidine) (BIAcore).

BIAcore T100 (BIAcore).

Protocole :

Apres purification, les protéines se trouvent dans un tampon phosphate 0,1M. Afin d'assurer une compatibilité avec la technique, ce tampon est remplacé par du Tampon HBS-EP$^+$. Pour ce faire, les échantillons sont centrifugés 5 à 10 minutes à 6000g en utilisant le système Amicon Ultra-4 (10,000 MWCO). Après centrifugation, les protéines sont resolubilisées dans le tampon HBS-EP$^+$.

Immobilisation du peptide inhibiteur :

Pep90 est immobilisé sur la puce SA grâce à son groupement biotine. Pep90 biotinylé est préparé dans du tampon HBS-EP$^+$ à une concentration de 40 µg/ml. Cette solution est injectée avec un flux de 10 µl/min pour atteindre une réponse d'immobilisation de 200 RU.

Enregistrement des sensorgrammes :

Les catalyseurs sont injectés à différentes concentrations en mode « cycle » avec un flux de 10 µl/min pendant 30 minutes. La dissociation est mesurée pendant 20 minutes. La puce est ensuite régénérée par une injection de 60 µl de glycine HCl 10 mM à pH 1,5.

Les constantes d'affinité sont déterminées grâce au logiciel BIAcore T100 evaluation en choisissant le modèle d'interaction Langmuir (response *vs*. concentration). L'alignement des résultats a été réalisé avec le modèle Steady State Affinity.

F. Analyse structurale par dichroïsme circulaire

Principe :

La lumière polarisée linéaire peut être décomposée en deux composantes circulaires gauche et droite. Ces deux composantes ne sont pas absorbées de la même manière par l'échantillon. La mesure de la différence d'absorption des deux composantes de la lumière permet d'obtenir des informations sur la conformation de la protéine d'intérêt.

Matériels :

Cuve de 1 mm (Quartz-Suprasil, Hellma).

Spectropolarimètre Jasco J-810.

Protocole :

L'échantillon est placé dans une cuve en quartz. Les spectres ont été enregistrés à température ambiante à l'aide d'un spectrophotomètre. Pour les deux scFv, les spectres CD ont été obtenus dans les conditions suivantes : λ varie de 260 nm à 190 nm et balayage en mode continu à 10 nm/min. Les spectres observés représentent la moyenne de l'accumulation de 4 balayages. Le tampon utilisé est un tampon phosphate 10 mM à pH 7,4. La contribution du tampon a été soustraite aux spectres des scFv. Les spectres ainsi acquis, correspondant à l'ellipticité θ, sont exprimés en mdeg (millidegrees). Les mdeg sont convertis en deg (degrees) puis en ellipticité molaire par résidu ou $[\theta]_{MRE}$ (pour Mean Residue Ellipticity) en utilisant la relation :

$$[\theta]_{MRE} = ((\theta \times 100 \times MM)/(C \times l))/N_{a.a.}$$

Avec :

θ = l'ellipticité en deg.

$[\theta]_{MRE}$: ellipticité molaire par résidu en $deg.cm^2.dmol^{-1}$.

MM : masse moléculaire de la protéine.

C : concentration de la protéine en mg/ml.

l : la longueur du trajet optique en cm (ici 0,1 cm).

$N_{a.a.}$: nombre d'a.a.

G. Liste des fournisseurs

SIGMA-ALDRICH
Bleu de coomassie R-250
BCA (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination)
L-Glutathione oxidized
L-Glutathione reduced
L-arginine
DTT
LIFE TECHNOLOGIES
D-MEM(500ml) x10
Opti-MEM (500ml)X10
Penicillin-Strepto (100ml)
L-Glutamine 200 mM 100ml
SYBR® Safe
Sérum de veau fœtal, 500ml
Trypsin, 0.05% (1X) with EDTA 4Na
Vecteurs pSecTag2 A, B, & C
Zéocine
ROCHE
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail
Phosphatase
INTERCHIM
Membrane de dialyse
Protein A Affarose XTreme
BIORAD
Marqueur de poids moléculaire (DualColor)
SANTACRUZ
Anti-His HRP
Anti-His
Anti-humain IgG HRP (chèvre)
VWR
Boîte Culture 100 x 20 mm (x200)
Microplaques 96puits Greiner (x100)
Entonnoir de filtration 0,22
MEMBRANE NITROCELLULOSE 0.2 μM
Plaque MaxiSorp, F96 X60
Urée
NEW ENGLAND BIOLABS
Les enzymes de restriction
INVIVOGEN
Vecteurs pFUSE2ss-CLIg-hk et pFUSEss-CHIg-hG1
Blasticidine S
MACHEREY-NAGEL
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi
EUROGENTEC
Bactéries BL21(DE3)
GE HEALTHCARE
ECL plus 3X100ml
QIAGEN
Résine Ni-NTA
Kit de purification d'ADN (miniprep, gel extraction, PCR clean up)
PROMEGA
Vecteurs pGEM-T
Bactéries JM109

Appl Microbiol Biotechnol
DOI 10.1007/s00253-012-4600-4

BIOTECHNOLOGICALLY RELEVANT ENZYMES AND PROTEINS

Efficient refolding of a recombinant abzyme

Structural and catalytic characterizations

Raouia Ben Naya · Kalyankumar Matti · Adeline Guellier · André Matagne · Didier Boquet · Daniel Thomas · Alain Friboulet · Bérangère Avalle · Séverine Padiolleau-Lefèvre

Received: 18 October 2012 / Revised: 12 November 2012 / Accepted: 15 November 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract Catalytic antibodies are currently being investigated in order to understand their role under physio-pathological situations. To this end, the knowledge of structure–function relationships is of great interest. Recombinant scFv fragments are smaller and easier to genetically manipulate than whole antibodies, making them well suited for this kind of study. Nevertheless they are often described as proteins being laborious to produce. This paper describes a highly efficient method to produce large quantities of refolded soluble catalytic scFv. For the first time, the functionality of a refolded catalytic scFv displaying a β-lactamase activity has been validated by three approaches: (1) use of circular dichroism to ensure that the refolded had secondary structure consistent with a native scFv fold, (2) development of enzyme-linked immunosorbant assay and surface plasmon resonance (SPR) approaches for testing that the binding characteristics of an inhibitory peptide have been retained, and (3) proof of the subtle catalytic properties conservation through the development of a new sensitive catalytic assay using a fluorogenic substrate.

R. Ben Naya · K. Matti · A. Guellier · D. Thomas · A. Friboulet · B. Avalle · S. Padiolleau-Lefèvre
Génie Enzymatique et Cellulaire (GEC), UMR 6022 CNRS, Université de Technologie de Compiègne, BP 20529, 60205 Compiègne, France

A. Matagne
Laboratoire d'Enzymologie et Centre d'Ingénierie des Protéines, Institut de Chimie, B6 Sart Tilman, Université de Liège, Liège 4000, Belgium

D. Boquet
SPI Commissariat à l'Energie Atomique, Laboratoire d'Ingénierie des Anticorps pour la Santé (LIAS), iBiTecS, 91191 Gif sur Yvette, France

S. Padiolleau-Lefèvre (✉)
CNRS UMR, 6022 Compiègne, France
e-mail: severine.padiolleau@utc.fr

Published online: 19 December 2012

Keywords Abzymes · Catalytic antibodies · Single chain variable fragment scFv · Cytoplasmic expression · Refolding · β-Lactamase

Introduction

The high-yield production of soluble and functional recombinant proteins is a prerequisite when considering structural and functional studies. The expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* is extensively used due to several advantages: (1) a lot of genetic tools are available, (2) culture conditions are cheap, (3) the biomass accumulates rapidly, and (4) *E. coli* expression system is suitable, whatever the production scale is. Nevertheless, despite the development of several new approaches for the genome-scale engineering of *E. coli* to enhance the expression yield (Makino et al. 2011), only 30 % of recombinant proteins are expressed in soluble form. The remaining 70 % are either degraded, or form insoluble aggregates (inclusion bodies) (Yang et al. 2011). Although inclusion bodies do not provide directly functional proteins, their insolubility constitutes an easy source of high concentration of relatively pure protein.

The propensity to form inclusion bodies concerns also single chain fragments variable (scFv). scFvs are the smallest recombinant antibodies format retaining the antigen binding properties of full-size antibodies. They include the heavy and light variable domains (V_H and V_L, respectively), linked by a flexible polypeptide linker (for review, see Wörn and Plückthun 2001). They also contain the two intramolecular disulfide bonds that are known to be difficult to form correctly in the reductive cytoplasm of bacteria (Ye et al. 2008). Indeed, associated with a high level of expression, these features explain the tendency of scFvs to form inclusion bodies.

scFvs are increasingly used for a range of therapeutic or diagnostic applications (Weisser and Hall 2009). They are smaller than their whole antibody counterpart, facilitating their diffusion into tissues. Despite their small size, they retain the target specificity and can be produced economically. They have a short in vivo half-life in biological fluids (around 10 min; Colcher et al. 1999) a property that is detrimental for certain therapeutic applications, but that can be viewed as a real asset for diagnostic applications (i.e., medical imaging) (Colcher et al. 1998; Olafsen and Wu 2010). Lastly, scFvs are tailor-made for genetic manipulation. Taking together, these characteristics explain the massive use of scFvs.

Catalytic antibodies are immunoglobulins displaying hydrolytic activity. They can be generated by immunization using transition state analog (for review, see Xu et al. 2004), idiotypic network exploitation or by combinatorial approach and high-throughput screening (for review, see Belogurov et al. 2012). The scFv form of a catalytic antibody named 9G4H9 was previously cloned (Débat et al. 2001). It originates from the catalytic IgG2b antibody displaying a β-lactamase-like activity, which has been produced through the idiotypic network (Avalle et al. 1998). scFv 9G4H9 is a relevant model of study of scFv functionality not only because of its ability to cleave β-lactam rings, but also because a specific inhibitory peptide Pep90 is available (Yribarren et al. 2003). Thus, both the available substrates and the inhibitory peptide provide new tools to design relevant functional tests.

scFv 9G4H9 was previously expressed in the periplasm in *E. coli*, and the optimization of its production was achieved by using a coexpression of a chaperone-like enzyme (Padiolleau-Lefèvre et al. 2006). Although this approach improved the production of a functional scFv, yields remained low (less than 250 μg/L of bacterial culture), making the kinetic characterization arduous and structural experiments impossible. To overpass these limitations, we have developed a new expression system allowing to increase significantly the quantity of soluble scFv. It includes (1) an optimized cytoplasmic expression, (2) extraction and purification steps, and (3) a refolding process. For the first time, the secondary structure of the refolded scFv 9G4H9 was analyzed by circular dichroism (CD) allowing to check the global structure of the recombinant antibody. Furthermore, two functional tests were developed to validate its activity. The first one is based on scFv 9G4H9 ability to recognize the inhibitory peptide Pep90. The second one relies on the measurement of kinetic parameters using a new sensitive method. The data gathered in this paper provide a general and efficient strategy to rapidly produce high quantities of soluble and functional catalytic recombinant antibodies.

Material and methods

Periplasmic expression and purification

scFv 9G4H9 was cloned into the pET26b vector as previously described (Padiolleau-Lefèvre et al. 2006). Periplasmic expression system was previously described (Padiolleau-Lefèvre et al. 2006). Briefly, *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) were transformed by the cloned plasmid. scFv expression from pET26b was induced by isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) addition (2.5 mM) for 3 h at 28 °C. Bacteria culture was centrifuged at 1500 g for 15 min and resuspended in 10 ml of ice-cold lysis buffer (0.1 M NaH_2PO_4, 3 mM EDTA, 15.2 mM NaCl, 0.1 % NaN_3). Cells were then shaken on ice for 30 min and centrifuged at 20,000×*g* for 10 min at 4 °C. The purification of scFv 9G4H9 from periplasmic extract was performed by FPLC affinity chromatography on HiTrap chelating column, as previously described. The solution was then dialyzed overnight against 2 l of 100 mM phosphate buffer, pH 7.4, using a 12-kDa membrane (Interchim). The protein concentration was evaluated by a bicinchoninic acid test (BCA; Sigma) as detailed in commercial instructions.

Cytoplasmic expression and purification

E. coli BL21 (DE3) cells, containing expression vector pET26b-scFv 9G4H9, were grown in shaking culture (180 rpm, 37 °C) in 50 ml LB broth containing 50 μg/ml kanamycin. When absorbance at 600 nm reached 0.5–0.6, scFv expression was induced by 1 mM IPTG at 28 °C for 3 h. Induced cells were harvested by centrifugation at 2,500×*g* for 10 min at 4 °C, and then resuspended in 5 ml of 100 mM Tris–HCl, pH 8.0, containing protease inhibitor cocktail (Roche). The cell suspension was sonicated for 30 s and centrifuged at 4,000×*g* for 10 min at 4 °C. In order to solubilize scFv from inclusion bodies, pellet was resuspended with denaturant buffer (8 M urea, 10 mM β-Mercaptoethanol [β-Me], 0.1 M Tris–HCl, pH 8.0), incubated for 1 h at 37 °C with shaking at 180 rpm, and centrifuged at 6,000×*g* for 30 min at 4 °C. Inclusion bodies extract was loaded on a Ni-NTA superflow resin (Qiagen) at room temperature for 1 h to perform batch purification, followed by centrifugation at 4,000×*g* for 1 min at 4 °C. Resin was washed twice with denaturant buffer. The elution was performed with elution buffer (8 M urea, 10 mM β-Me, 200 mM imidazole, 0.1 M Tris, pH 8.0). The purity of the unfolded scFv was checked by SDS PAGE and Western blotting. After overnight dialysis against 2 l urea, 8 M, 100 mM Tris–HCl, pH 8.0, using a 12-kDa membrane (Interchim) in order to remove imidazole and β-Me, the protein concentration was evaluated by a BCA test (Sigma) as detailed in commercial instructions. The molecular weight of the insoluble scFv in the cytoplasm is expected at 30,481.3 Da.

In vitro refolding

After the BCA test, the scFv concentration was adjusted to 10 μM because of their tendency to form aggregates at higher concentrations (Tsumoto et al. 1998). Dilution was performed with the last dialysis buffer (urea 8 M, 100 mM Tris–HCl, pH 8.0). scFv 9G4H9 was refolded by gradual removal of urea by means of seven stepwise dialysis from 8 to 0 M urea, in the presence of 400 mM arginine and 5 mM dithiothreitol (DTT) for dialysis 2 to 6. Each dialysis was performed overday or overnight and lasted at least 12 h, using a 12-kDa membrane (Interchim). During dialysis 4 and 5, reduced and oxidized glutathione (GSH/GSSG) at 5 mM and 500 μM, respectively, were used as "oxido shuffling reagents" to promote proper disulphide bonding. The last dialysis was performed against 100 mM phosphate buffer, pH 7.4. The chronological order of the dialysis is illustrated in Fig. 3. The sample was finally centrifuged at 10,000×*g* for 10 min at 4 °C to remove eventual residual aggregates, and stored at 4 °C prior to analysis.

SDS PAGE and Western blot

Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out in 10 % polyacrylamide gels for scFv purity checking, using Bio-Rad Mini-Trans-Blot apparatus. After migration, the gels were Coomassie blue stained. The transfer on nitrocellulose membrane was done at 100 V and 250 mA for 1 h. For blocking, the membrane was incubated in phosphate-buffered saline (PBS) containing 5 % Milk and 0.05 % Tween, for 1 h. After washes in 0.05 % Tween-PBS, the membrane was incubated with peroxidase-conjugated anti-His antibody diluted 1/2,000 (Santa Cruz Biotechnology), during 1 h. Blots were revealed, after three washes, by incubating with ECL-Plus (GE Healthcare) as substrate, according to the manufacturer instructions.

Circular dichroism

CD measurements were performed at 20 °C, with a Jasco J-810 spectropolarimeter using a 1-mm cuvette (Quartz-Suprasil, Hellma). Spectra were recorded using 10 μM scFv 9G4H9 in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4. Wavelength scans (200–255 nm) were performed in continuous mode at 10 nm/min using a 1-nm bandwidth, and a 4-s D.I.T. The spectra were averaged after four accumulations and corrected by subtraction of the buffer spectrum obtained under the same conditions. Ellipticity measurements in mdeg were converted in molar mean residue ellipticity. CD spectra were further analyzed with the K2D3 program to estimate the secondary structure content (http://www.ogic.ca/projects/k2d3).

ELISA experiments

Detection of scFv and Pep90 (CYHFLWGPC) interaction was performed by an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). Microtitration plate (Maxisorb TM, Nunc) was coated with 5 μM Pep90 during 2 h at 37 °C in 100 mM carbonate buffer pH 9.6, and then saturated with PBS-TM (0.1 % Tween 20 and 5 % Milk) for 1 h at 37 °C. Each reaction step was followed by three washes in PBS containing 0.1 % Tween 20. Increasing concentrations of scFv 9G4H9 (0.7–5.6 μM) were further applied for 1 h at 37 °C. The revelation of bound scFv was carried out using peroxidase-conjugated anti-histidine IgG (Invitrogen), incubated 1 h at 37 °C with 0.55 mM azino-bis(ethylbenzthiazoline sulfonate) (ABTS) in 25 mM citrate buffer pH 5.0 containing 0.01 % H_2O_2 as the substrate. The reaction was then allowed to proceed in the dark for 15 min. The resulting absorbance was measured at 405 nm. The negative control was performed using 1.4 μM of scFv SAF34, an irrelevant scFv recognizing prion protein.

Surface plasmon resonance spectroscopy

Surface plasmon resonance (SPR) analysis was performed with BIAcore T100 (Biacore AB, Sweden). Streptavidin-coated chips (SA chips) and running buffer HBS pH 7.4 containing 100 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA and 0.005 % surfactant P20 were purchased from GE Healthcare Life Sciences. Biotinylated peptide Pep90 (40 μg/ml in HBS) were immobilized on SA chips by requiring a target level at 200 RU. Prior binding experiments, the buffer of refolded scFv 9G4H9 was exchanged from Tris–HCl to HBS buffer by three successive centrifugations at 6,000×*g* for 5–10 min, using Amicon Ultra-4 (10,000 MWCO). Kinetic measurements were performed by injecting several amounts of scFv, ranging from 0.2 to 10 μM in HBS, at flow rate of 10 μl/min for 30 min in order to reach the steady state. Dissociation was followed during 20 min before regeneration. Surfaces were regenerated by injection of 60 μl of 10 mM Glycine HCl pH 1.5. The blank run was subtracted from each sensorgram, prior to data processing using BIAcore T100 evaluation software. Steady-state affinity (K_D) was calculated using the model presented in BIAcore T100 evaluation software (response vs. concentration, model Langmuir 1:1).

Fluorogenic substrate and kinetic measurements

A novel β-lactam fluorogenic substrate, difluorofluorescein cephalosporin (provided by Invitrogen as Fluorocillin, patent US 2009/0047692 A1, 02/19/2009) was used. The fluorescence spectra of 0.5 μM Fluorocillin were measured before and after complete cleavage reaction, using a Varian

Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, with excitation at 495 nm and a scan wavelength emission from 500 to 600 nm. The quenching efficiency was calculated with the following equation (Peng et al. 2009):

$$100 \times \left((F_{\max} - F_0)/(F_{\max} - F_{\text{background}})\right)$$

Kinetic measurements were performed in 0.5-ml quartz cuvettes at room temperature in 100 mM phosphate buffer (pH 7.4), with excitation at 495 nm and emission at 525 nm. The second-order rate constants (k_{cat}/K_m) were determined at substrate concentrations much smaller than K_m value. Under these conditions, the cleavage obeys first-order kinetics (Fersht 1974). The fluorescence intensity (IF) was followed during 300 min and data were analyzed using KaleidaGraph software. Progress curves were fitted to the exponential rise equation:

$$\mathrm{IF} = \mathrm{F}_{\max}\left(1 - \exp^{(-\mathrm{kcat}/\mathrm{Km}\times[\mathrm{E}]\times\mathrm{t})}\right),$$

where F_{max} is the maximum fluorescence intensity and [E] is the total catalyst concentration.

Values of k_{cat}/K_m were determined by linear regression analysis of initial velocity data using the following equation (Park et al. 2001):

$$(k_{cat}/K_m)[E] = (\Delta \mathrm{IF}/\Delta t)/F_{\max} - F_0$$

Results

From periplasmic to cytoplasmic expression in Escherichia coli

The catalytic monoclonal antibody 9G4H9 was previously obtained by exploiting the idiotypic network (Avalle et al. 1998). The derived scFv 9G4H9 was further cloned by successive PCR into pET26b vector (Débat et al. 2001). In order to produce soluble and functional scFv, a periplasmic expression system was initially developed (Padiolleau-Lefèvre et al. 2006). The expression system was optimized by including the coexpression of the chaperone-like enzyme FkpA (Padiolleau-Lefèvre et al. 2006; Phichith et al. 2009). Production yields of both periplasmic approaches (with or without the coexpression of FkpA) are summarized in Table 1 (lines 1–2). Nevertheless, we were rapidly confronted to the weak production yields that are often described for such systems (Arbabi-Ghahroudi et al. 2005). Even if these methodologies allowed producing a functional scFv retaining its catalytic properties, the low rate of production remains a limitation for further structure–function investigations. This led us to develop a cytoplasmic approach. scFv 9G4H9 was cloned including a histidine tag, that was exploited for further purification using a Ni-NTA resin. The high scFv yield obtained by the cytoplasmic procedure (Table 1, line 3) was confirmed by the results of the SDS PAGE showing the scFv quantity during the production steps, from the extraction to the purification from inclusion bodies (Fig. 1). The overexpression of scFv 9G4H9 is clearly visible under the IPTG induction (Fig. 1a, lane 1 vs. lane 2). During the purification process, a weak amount of scFv was lost in the flow-through (Fig. 1b, lane Ft and corresponding Western blot data; Fig. 2, lane Ft) or wash fractions (Fig. 1b, lanes W_1 and W_2, and corresponding Western Blot data; Fig. 2, lanes W_1 and W_2). As expected, the eluted fraction (Fig. 1b, lane Elu) shows large band about 30,000 Da corresponding to the scFv 9G4H9, as confirmed by the Western Blot analysis (Fig. 2, lane Elu). The electrophoresis performed using various quantities of purified scFv (Fig. 1c) allowed the estimation of purity yield. The quantity of purified protein applied to the gel that does not present any contaminating signal corresponds to 3.15 μg (Fig. 1c, lane c). Knowing that the sensitivity threshold of Coomassie Blue staining was experimentally measured at 225 ng, this result suggests that the purification level of scFv 9G4H9 is above 92 %.

Based on the works of Tsumoto and collaborators, an optimized refolding process was further performed (Umetsu et al. 2003; Arakawa and Tsumoto 2003; Tsumoto et al. 2004). A stepwise dialysis refolding process was used. The

Table 1 Production yields of scFv 9G4H9, from crude extract to soluble purified scFv

Expression system	Total protein (mg)	Purified unsoluble scFv (mg)	Soluble scFv (mg)	Yield (%)
Periplasmic, without any coexpression	11.1±0.5[a]	Na	0.24±0.04	2.2
Periplasmic, with coexpression of FkpA	11.1±0.5[a]	Na	0.36±0.05	3.3
Cytoplasmic	240±10[b]	32±2	32±2	13.3

Data were obtained from 1 l of induced bacterial culture, using either periplasmic or cytoplasmic expression system. Data correspond to an average of several extractions (n=2–5). The quantities of total protein in periplasmic expression systems correspond to an average deduced from several independent measurements

Na not applicable since periplasmic proteins are soluble. The yield corresponds to the ratio between soluble scFv and total proteins from crude extract

[a] The quantity of total protein was evaluated by a bicinchoninic acid test on the periplasmic extract

[b] The quantity of total protein was evaluated by a bicinchoninic acid test on the total extract

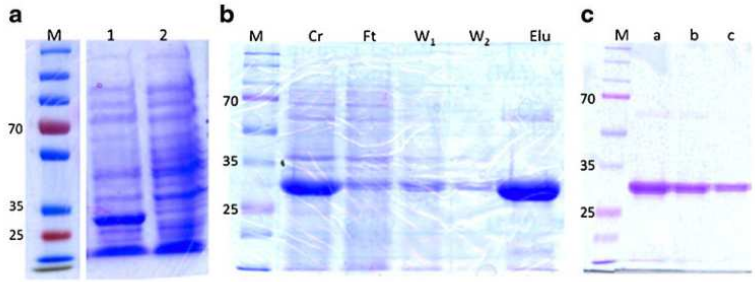


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of scFv 9G4H9 during production steps. Migration of proteins was performed in 10 % acrylamid gel, revealed by Coomassie blue staining. *M* protein molecular-weight marker (Dual Color Standard, Bio-Rad). **a** Crude extract with (*lane 1*) or without (*lane 2*) IPTG induction. **b** Production process of scFv 9G4H9, from the crude extract to the purified scFv. *Lane Cr* induced crude extract, *lane Ft* flow-through fraction, *lanes W_1 and W_2* wash fractions, *lane Elu* eluted scFv. **c** Various quantities of purified scFv were applied: 9.44 µg (*lane a*), 4.72 µg (*lane b*) and 3.15 µg (*lane c*)

complete refolding process is discussed in the Material and methods section and illustrated in Fig. 3. In this way, the production of purified and soluble scFv 9G4H9 is more than 80-fold increased when compared to the periplasmic expression including the coexpression of the chaperone protein (Table 1). The scFv yield after extraction–purification process was from 2.2 % to 3.3 % according to the periplasmic expression systems (Padiolleau-Lefèvre et al. 2006; Phichith et al. 2009), whereas it reaches 13.3 % through the cytoplasmic expression. Moreover, no precipitate after centrifugation of samples is observed after the dialysis refolding process, indicating that the soluble yield of refolded scFv is approximately 100 %. Nevertheless, solubility and functionality are two distinct notions. Some functionality tests are required to confirm the activity of soluble proteins.

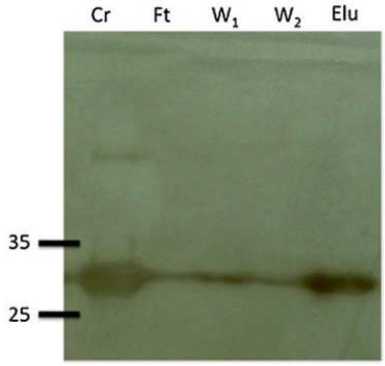


Fig. 2 Western Blot analysis of scFv during purification process. Revelation was performed using anti-His antibody conjugated with peroxydase diluted 1/2,000. *Lane Cr* induced crude extract, *lane Ft* flow-through fraction, *lanes W_1 and W_2* wash fractions, *lane Elu* eluted scFv

Conservation of the scFv 9G4H9 overall structure

The secondary structure content of the refolded scFv was probed by CD measurements. CD spectra in the far UV region allows assessing whether a protein is predominantly

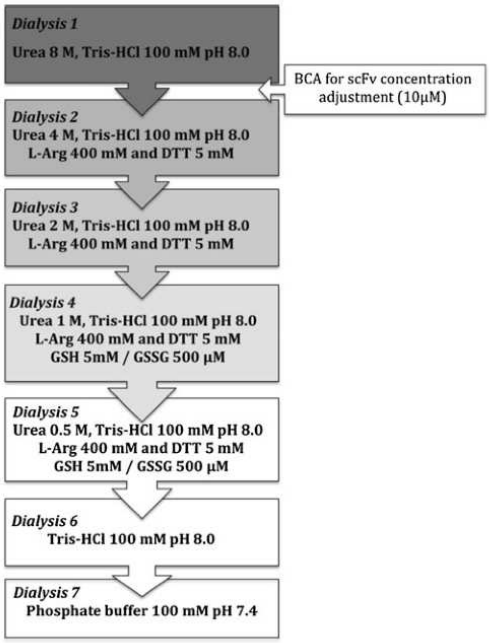


Fig. 3 Scheme of the scFv refolding process. Chronological order of each dialysis step. The grayscale illustrates the gradual decrease in urea concentration

in α-helix, β-sheet or random coil conformation (Greenfield and Fasman 1969). As shown in Fig. 4, the CD spectrum of the refolded scFv 9G4H9 is consistent with that expected for an all β-sheet protein (Venyaminov and Yang 1996), with a characteristic maximum around 200 nm, and, in this case, a minimum centered at about 225 nm. Since no data could be obtained at wavelength values below 200 nm, due to the high absorbency of the buffer, we used the publicly accessible K2D3 Web server (Louis-Jeune et al. 2011) to estimate the secondary structural content of the antibody fragment. The analysis led to 1.2 % α-helix and 41.5 % β-sheet. This result suggests that the refolding process following the cytoplasmic expression yielded the protein under its native conformation. Nevertheless, these data do not exclude the possibility that a fraction of the scFv in solution is actually misfolded.

Validation of the functionality by two distinct binding tests

In order to validate the functionality of the refolded scFv, we developed two binding tests. A cyclic peptide Pep90 was previously selected by phage display technology, using the whole catalytic antibody 9G4H9 as the target (Yribarren et al. 2003). Pep90 was shown to not only inhibit the antibody 9G4H9, but also its scFv counterpart produced by the periplasmic expression system (Phichith et al. 2009), and even TEM-1 β-lactamase, the enzyme at the origin of the idiotypic network (Phichith et al. 2010). We exploited the interaction properties between the scFv 9G4H9 and the inhibitory peptide Pep90 (1) to develop an ELISA test and (2) to perform SPR (BIAcore).

Results of the ELISA approach are shown in Fig. 5. The decreased concentration of scFv 9G4H9 induces a reduction in the resulting signal. These data show that the refolded scFv 9G4H9 conserves its ability to bind Pep90. Moreover, two distinct negative controls were used in this experiment. The first one relied on a similar test without Pep90, in order

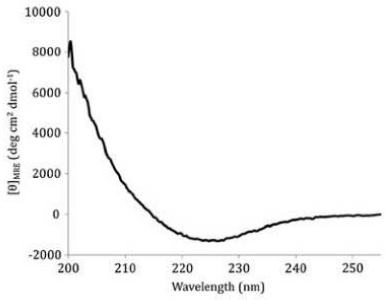


Fig. 4 Far UV CD spectrum of the refolded scFv 9G4H9, displaying a clear β-sheet conformation. Far UV CD spectrum of the refolded scFv 9G4H9 in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4

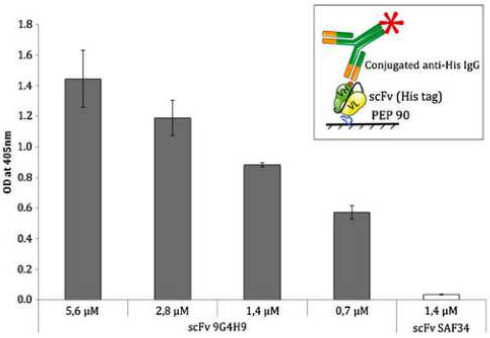


Fig. 5 Binding test by ELISA. Various concentrations of scFv 9G4H9 were tested (*gray bars*) and an irrelevant scFv was used as negative control (*white bar*). *Insert* illustrates the applied ELISA capture format

to evaluate the background of the unspecific interaction between scFv 9G4H9 and the milk proteins saturating the microplate. The obtained signal was retrieved from the specific interaction signal. The second one consisted of the use of an irrelevant scFv, named SAF34. scFv SAF34 was produced in similar conditions and is able to bind the prion protein (Padiolleau-Lefèvre et al. 2007). The signal obtained with scFv SAF34 is very low, and significantly weaker than the scFv 9G4H9 one (OD_{405nm}=0.050 and 0.800, respectively), indicating that scFv SAF34 does not bind Pep90. Taken together, ELISA measurements —including a dose response test — suggest the maintaining of the scFv 9G4H9/Pep90 specific binding.

Previous works based on SPR experiments allowed the estimation of the affinity constant of periplasmic 9G4H9 scFv for Pep90 (K_D=5.2 µM) (Phichith et al. 2009). A similar approach was thus developed to evaluate the K_D of refolded cytoplasmic scFv for Pep90. After the last dialysis of the refolding process, scFv 9G4H9 was diluted in 0.1 M Tris–HCl. However the running buffer used in BIAcore experiment is HBS buffer. Thus, the buffer exchanged was performed by centrifugation using Amicon Ultra. A large range of analyte concentrations was analyzed. Results are illustrated in Fig. 6. By fitting data using the steady-state model, the K_D was estimated at 1.47 µM, i.e., in the same order of magnitude than previous data with periplasmic scFv. These data confirm that the refolding process ensures the production of a functional scFv.

Validation of the functionality by a catalytic test

We further investigated the kinetic properties of the refolded scFv 9G4H9. A sensitive method was adapted to assess the ability of the refolded cytoplasmic scFv to hydrolyze the β-lactam rings. This one relied on a fluorogenic substrate,

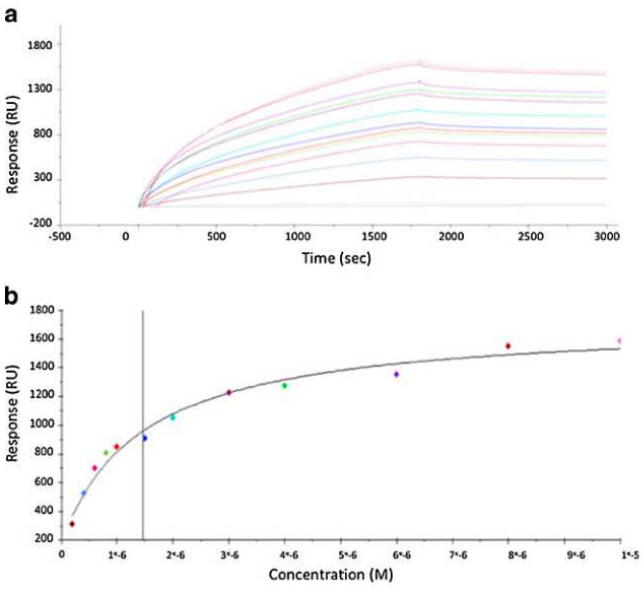


Fig. 6 Surface plasmon resonance spectroscopy analysis of the interaction between cytoplasmic refolded scFv 9G4H9 and immobilized Pep90. **a** Ligand was immobilized on the surface of a streptavidin sensor chip as described in the Materials and methods section. scFv samples were injected at following concentrations: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, and 10.0 μM. A flow rate of 10 μl/min was used. Samples were injected during 30 min and dissociation was followed during 20 min before regeneration. **b** Fitting curve calculated using the steady-state model, Affinity

Fluorocillin, recently described to be sensitive for β-lactamase TEM-1 (Rukavishnikov et al. 2011). Indeed, fluorogenic substrates are considered superior to chromogenic ones in detecting enzyme activity because of the high sensitivity of fluorescence detection (Gao et al. 2003). As illustrated in Fig. 7a, Fluorocillin has two attached cephalosporin moieties. As described by Peng and collaborators (2009), we first analyzed the emission spectrum of Fluorocillin before and after the β-lactamase treatment in order to assess the ratio between signals at 525 nm (Fig. 7b). Results indicate that the fluorescence is 53-fold increased after cleavage by the β-lactamase, so the quenching efficiency is estimated at 98.2 %. This result validates Fluorocillin as a relevant substrate for testing a β-lactamase-like activity. As control, the hydrolysis of Fluorocillin by 45 nM β-lactamase TEM-1 was followed by measuring the fluorescence, as mentioned in the Materials and methods section. The assays were made with substrate concentrations far below K_m to avoid absorptive

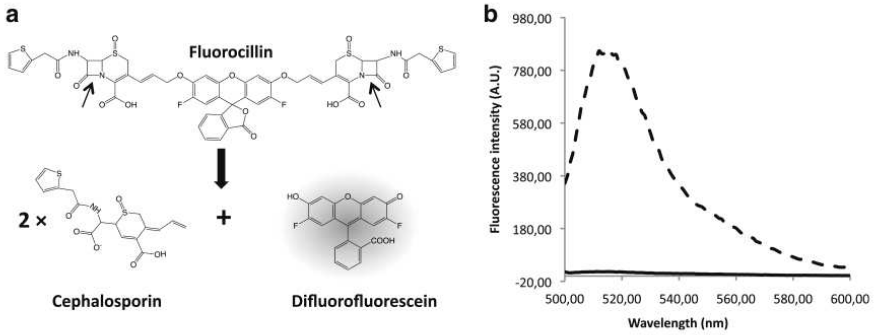


Fig. 7 Fluorogenic substrate characteristics for catalytic assays. **a** Hydrolysis of the difluorofluorescein cephalosporin (Fluorocillin) by β-lactamase-like catalysts release the fluorophore 2,7-difluorofluorescein. *Arrows* indicate the position of cleavage sites. **b** Emission spectra of 0.5 μM Fluorocillin in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 before (*solid line*) and after (*dash dot line*) treatment with β-lactamase

quenching effects. Moreover, under these conditions, the consumption of the substrate was found to be a first-order process. The fluorescence emission was monitored at 525 nm, with excitation at 495 nm (Fig. 8). The change in fluorescence intensity was monitored without catalyst to check the spontaneous hydrolysis of the substrate. According to Park and collaborators (2001), the *initial velocity analysis* was used to calculate k_{cat}/K_m. The second-order rate constant of β-lactamase is thus estimated at 3,361.8±11.2 $M^{-1}s^{-1}$ (Table 2, lane 1), definitely validating the relevance of Fluorocillin as substrate. The hydrolysis of Fluorocillin by 10 μM scFv 9G4H9 was further measured (Table 2, lanes 2 and 3). These data show that the second-order rate constants of catalytic scFv 9G4H9 are similar whatever the expression system (16.5±0.1 $M^{-1}s^{-1}$ for periplasmic expression vs. 16.9±0.2 $M^{-1}s^{-1}$ for cytoplasmic expression). Since periplasmic recombinant proteins were expected to be produced in low quantity but under functional form, this result suggests that the refolded scFv 9G4H9 is under a native conformation. A negative control was performed by testing the activity of the irrelevant scFv SAF34 (data not shown). Results suggest that scFv SAF34 do not display any catalytic properties.

Discussion

The refolding of scFv fragments displaying binding characteristics has been frequently described (for review, see Arbabi-Ghahroudi et al. 2005), but to our knowledge, none describes the refolding of catalytic antibodies fragments. Since catalytic antibodies are suspected to be implied in autoimmune and inflammatory disorders (for review, see Lacroix-Desmazes et al. 2006), the knowledge of experimental conditions allowing high yields of production and kinetic characterization of such antibodies appears as a technological challenge. In this context, a well known catalytic antibody, previously cloned under scFv form, is necessary to be used as a study model. This is the case of the catalytic scFv 9G4H9.

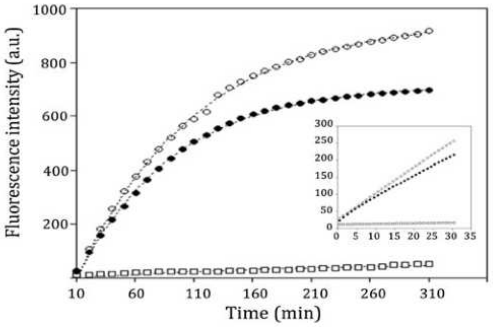


Fig. 8 First-order hydrolysis of Fluorocillin by different catalysts. Measurements were followed at 495 and 525 nm for excitation and emission wavelength, respectively, in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4. Hydrolyses of 0.5 μM Fluorocillin were performed by 10 μM of refolded scFv 9G4H9 (*empty circles*), 45 nM of β-lactamase (*filled circles*) or without catalyst (*empty squares*). Curves were fitted using an exponential rise model. *Insert* shows the initial rates used for the initial velocity analysis, where data were collected during the first 30 min of the reaction

Table 2 Second-order constants for hydrolysis of Fluorocillin by scFv 9G4H9

Catalyst	$k_{cat}/K_m\left(M^{-1}s^{-1}\right)$
β-Lactamase	3361.8±11.2
scFv 9G4H9 from periplasmic expression system	16.9±0.2
scFv 9G4H9 from cytoplasmic expression system	16.5±0.1

Second-order constants (k_{cat}/K_m) were measured for hydrolysis of 0.5 μM Fluorocillin by β-lactamase TEM-1 and scFv 9G4H9 provides either by periplasmic (without FkpA coexpression) or cytoplasmic expression. Measurements were performed in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at 495/525 nm for excitation and emission wavelength, respectively. k_{cat}/K_m values were calculated using an initial velocity analysis

Previous works using periplasmic scFv allowed producing a soluble and functional protein (Padiolleau-Lefèvre et al. 2006). We adapted the culture conditions to limit the rapid biomass accumulation, which could be detrimental to the overexpression of heterologous protein. For this purpose, bacteria were grown 3 h at 28 °C after induction with IPTG, instead of 37 °C. We also optimized the periplasmic production by using the coexpression of the chaperone-like protein FkpA (Padiolleau-Lefèvre et al. 2006). Others alternatives — not exploited in the present study — were described allowing to enhance production of periplasmic scFv: the intrinsic properties of the nucleotide sequence of the gene encoding the scFv, the codon features, or the presence of tightly repressible promoters or upstream elements such as leader sequence all impact the production yield (Arbabi-Ghahroudi et al. 2005). Concerning the catalytic scFv 9G4H9, despite a weak level of production, the yields obtained through the periplasmic way were consistent with data collected from the literature (Wörn and Plückthun 2001; Arbabi-Ghahroudi et al. 2005). The functionality has been validated by demonstrating the ability of periplasmic scFv 9G4H9 to hydrolyze β-lactam rings of ampicillin. The catalytic properties of scFv 9G4H9 have been further compared with that previously described with the full-size IgG 9G4H9 and with the original β-lactamase (Padiolleau-Lefèvre et al. 2006).

Nevertheless, even in the periplasmic space, recombinant proteins can be partially misfolded (Miot and Betton 2004; Ow et al. 2010). This last point is illustrated by the advantage provided when using coexpression of chaperone like proteins.

Moreover, the kinetic characterization was laborious for two reasons: (1) despite the various optimizations proposed to increase the yield of periplasmic scFv, the yield remained low, and (2) the ampicillin is a chromogenic substrate, inducing a poor sensitivity for testing some weak catalytic activities. These limitations are critical for the successful study of structure–function relationship of the catalytic scFv 9G4H9. For this reason, both the expression system of scFv 9G4H9, and the catalytic test were modified. Thus, a cytoplasmic approach as new expression system was chosen, and a new method was developed to evaluate the kinetic parameters, thanks to the use of a fluorogenic substrate.

The cytoplasmic approach requires the solubilization of inclusion bodies in urea 8 M under reducing conditions. The refolding process was performed by means of a stepwise dialysis method inspired from previous works (Padiolleau-Lefèvre et al. 2007) and was further optimized. For this purpose, we adjusted the concentrations of the denaturant agent (urea) and other solvent additives like arginine and reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG, respectively), in order to induce sequential folding and disulfide formation (Fig. 3). Moreover, recent works suggest that (1) aggregation phenomena are reduced in the presence of dithiothreitol (DTT), and (2) DTT helps in the selective reduction of disulfide bonds (Sai Kumar et al. 2009; Ortega et al. 2012). Therefore, DTT was added during the refolding process. The results show that the refolding process leads to high yields of soluble scFv, in quantities comparable with data referenced in the literature (Ye et al. 2008; Tapryal et al. 2010; Yang et al. 2011). Nevertheless, these results are interesting only if the produced scFv is not just soluble and refolded but also functional.

For this purpose, we implemented three distinct approaches. The first was based on the use of CD to control the secondary structure content of the antibody fragment. The second one was binding experiments to assess the ability of scFv 9G4H9 to interact with specific ligands such as the inhibitory peptide Pep90. To this end, two methods were used: ELISA and SPR. Finally, the last approach relied on kinetic measurements to check the upholding of the scFv 9G4H9 amidase function.

The CD spectrum of the refolded cytoplasmic scFv indicates that the recombinant protein is largely native. Indeed, scFvs are β-strands rich proteins, with a typical single minimum expected around 220 nm (Pini et al. 1997; Vendel et al. 2012). Moreover, the calculated secondary structure content (1.2 % and 41.5 % for α-helix and β-sheet, respectively) is in good agreement with published data (Gunnarsen et al. 2010; Song et al. 2011). Thus, the CD spectrum obtained after the refolding process suggests that the antibody fragment is native-like in terms of its secondary structure content.

The ELISA results were consistent with this conclusion since the conformation of scFv allowed retrieving its binding properties against the inhibitory peptide Pep90. Moreover, the observed dose–response curve, added to the negative controls used in this experiment, is characteristic of the binding specificity. The SPR data allowed us to obtain the confirmation of the binding specificity of scFv 9G4H9 and a K_D at 1.47 μM was evaluated. These data are consistent with the K_D of the periplasmic scFv 9G4H9 (i.e., 5.42 μM) previously estimated (Phichith et al. 2009).

Nevertheless, the catalytic assay remains the crucial test for validating the functionality. Indeed, not only the global structure has to be maintained to assume the catalysis, but also the catalytic residues have to conserve a native and accurate orientation.

To this end, a sensitive assay was developed, based on the Fluorocillin, a fluorogenic substrate. The quenching efficiency was evaluated at 98.2 %, indicating that Fluorocillin allows detecting a β-lactamase-like activity. When compared with data of the literature, the quenching efficiency is in the same range of some others fluorogenic substrates characterized for various activities (Knight et al. 1992; Neumann et al. 2004; Peng et al. 2009). We performed experiments using Fluorocillin concentrations far below K_m. According to Park and collaborators (2001), two criteria were applied to ensure that $[S]<<K_m$. First, the V/K ratio$(= (k_{cat}/K_m) \times [E])$ does not change upon doubling the substrate concentration (data not shown). Second, fitting the fluorescence change data to the exponential rise theoretical model does not provide significant residual errors ($R^2>0.998$ with both catalysts, i.e., β-lactamase and refolded scFv 9G4H9). Since the reaction is slow, we opted for an initial velocity analysis to calculate k_{cat}/K_m. Results showed that both periplasmic and refolded cytoplasmic scFv were able to hydrolyze Fluorocillin with similar second-order rate constant values (16.5±0.1 and 16.9±0.2 $M^{-1}s^{-1}$, respectively). Periplasmic scFv are expected to be directly functional and do not require any refolding process. The fact that parameters are similar for periplasmic and refolded cytoplasmic scFv is a strong argument to conclude that ratios of functional scFv are identical, whatever the expression system is. When compared with β-lactamase $\left(k_{cat}/K_m = 3361.8 \pm 11.2 M^{-1}s^{-1}\right)$, the catalytic constants of scFv are around 200-fold lower. This result is nevertheless coherent with data found in literature (Xu et al. 2004). Indeed, catalytic antibodies were frequently described less active than natural enzymes, especially concerning the amide hydrolysis that is known to remain a difficult task due to the fact that an amine is in general a very poor leaving group. Thus, this difference cannot be attributed to the refolding process, but rather to a common characteristic of catalytic antibodies (Tanaka and Barbas 2002).

To conclude, by optimizing the cytoplasmic expression system including an efficient refolding process, high quantities of functional catalytic scFv displaying a β-lactamase activity were produced. For the first time, quantities were sufficient for a structural approach and further functional characterization. We demonstrated that scFv conserved the β-strand rich expected conformation and retained its crucial catalytic properties. The development of a new sensitive catalytic test, added with the validated refolding process, allows envisaging more accurate structure–function studies.

Acknowledgments This work was supported by the European Union for laboratory equipment, by Conseil Regional de Picardie, grant from Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-GENO-028). AM is supported in part by a grant from the Fonds de la Recherche Fondamentale et Collective (contract number 2.4530.09) and by the Belgian program of Interuniversity Attraction Poles initiated by the Federal Office for Scientific Technical and Cultural Affairs (PAI n° P7/xx). We thank Dr. Cyril Crosson for scientific discussions and his help in performing BIAcore experiments.

References

Arakawa T, Tsumoto K (2003) The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. Biochem Biophys Res Commun 304:148–152

Arbabi-Ghahroudi M, Tanha J, MacKenzie R (2005) Prokaryotic expression of antibodies. Cancer Metast Rev 24:501–519

Avalle B, Thomas D, Friboulet A (1998) Functional mimicry: elicitation of a monoclonal anti-idiotypic antibody hydrolizing β-lactams. FASEB J 12:1055–1060

Belogurov AJ, Smirnov I, Ponomarenko N, Gabibov A (2012) Antibody–antigen pair probed by combinatorial approach and rational design: bringing together structural insights, directed évolution, and novel functionality. FEBS Lett 586:2966–2973

Colcher D, Pavlinkova G, Beresford G, Booth BJ, Batra SK (1999) Single chain antibodies in pancreatic cancer. Ann NY Acad Sci 880:263–280

Colcher D, Pavlinkova G, Beresford G, Booth BJ, Choudhury A, Batra SK (1998) Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. Q J Nucl Med 42:225–241

Débat H, Avalle B, Chose O, Sarde CO, Friboulet A, Thomas D (2001) Overpassing an aberrant VK gene to sequence an anti-idiotypic abzyme with β-lactamase-like activity that could have a linkage with autoimmune diseases. FASEB J 15:815–822

Fersht AR (1974) Catalysis, binding and enzyme-substrate complementarity. Proc R Soc Lond B Biol Sci 187:397–407

Gao W, Xing B, Tsien RY, Rao J (2003) Novel fluorogenic substrates for imaging β-lactamase gene expression. J Am Chem Soc 125:11146–11147

Greenfield N, Fasman G (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. Biochemistry 8:4108–4116

Gunnarsen KS, Lunde E, Kristiansen PE, Bogen B, Sandlie I, Loset GA (2010) Periplasmic expression of soluble single chain T cell receptors is rescued by the chaperone FkpA. BMC Biotechnol 10:8

Knight CG, Willenbrock F, Murphy G (1992) A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases. FEBS Lett 296:263–266

Lacroix-Desmazes S, Wootla B, Delignat S, Dasgupta S, Nagaraja V, Kazatchkine MD, Kaveri SV (2006) Pathophysiology of catalytic antibodies. Immunol Lett 103:3–7

Louis-Jeune C, Andrade-Navarro MA, Perez-Iratxeta C (2011) Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. Proteins 80:374–381

Makino T, Skretas G, Georgiou G (2011) Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. Microb Cell Fact 10:32

Miot M, Betton JM (2004) Protein quality control in the bacterial periplasm. Microb Cell Fact 3:4

Neumann U, Kubota H, Frei K, Ganu V, Leppert D (2004) Characterization of Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH_2, a fluorogenic substrate with increased specificity constants for collagenases and tumor necrosis factor converting enzyme. Anal Biochem 328:166–173

Olafsen T, Wu AM (2010) Antibody vectors for imaging. Semin Nucl Med 40:167–181

Ortega C, Herbet A, Richard S, Kersual N, Costa N, Pèlegrin A, Ducancel F, Couraud JY, Navarro-Teulon I, Boquet D (2012) High level prokaryotic expression of anti-Müllerian inhibiting substance type II receptor diabody, a new recombinant antibody for *in vivo* ovarian cancer imaging. J Immunol Methods. doi:10.1016/j.jim.2012.08.003

Ow DSW, Lim DYX, Nissom PM, Camattari A, Wong VVT (2010) Co-expression of Skp and FkpA chaperones improves cell viability and alters the global expression of stress response genes during scFv D1.3 production. Microb Cell Fact 9:22

Padiolleau-Lefèvre S, Alexandrenne C, Dkhissi F, Clément G, Essono S, Blache C, Couraud JY, Wijkhuisen A, Boquet D (2007) Expression and detection strategies for an scFv fragment retaining the same high affinity than Fab and whole antibody: implications for therapeutic use in prion diseases. Mol Immunol 44:1898–1906

Padiolleau-Lefèvre S, Débat H, Phichith D, Thomas D, Friboulet A, Avalle B (2006) Expression of a functional scFv fragment of an anti-idiotypic antibody with a β-lactam hydrolytic activity. Immunol Lett 103:39–44

Park C, Kelemen BR, Klink TA, Sweeney RY, Behlke MA, Eubanks SR, Raines RT (2001) Fast, facile hypersensitive assays for ribonucleolytic activity. Methods Enzymol 341:81–94

Peng X, Chen H, Draney DR, Volcheck W, Schutz-Geschwender A, Olive DM (2009) A non-fluorescent, broad range quencher dye for FRET assays. Anal Biochem 388:220–228

Phichith D, Bun S, Padiolleau-Lefèvre S, Banh S, Thomas D, Friboulet A, Avalle B (2009) Mutational and inhibitory analysis of a catalytic antibody. Implication for drug discovery. Mol Immunol 47:348–356

Phichith D, Bun S, Padiolleau-Lefèvre S, Guellier A, Banh S, Galleni M, Frère JM, Thomas D, Friboulet A, Avalle B (2010) Novel peptide inhibiting both TEM-1 β-lactamase and penicillin-binding proteins. FEBS J 277:4965–4972

Pini A, Spreafico A, Botti R, Neri D, Neri P (1997) Hierarchical affinity maturation of a phage library derived antibody for the selective removal of cytomegalovirus from plasma. J Immunol Methods 206:171–182

Rukavishnikov A, Gee KR, Johnson I, Corry S (2011) Fluorogenic cephalosporin substrates for β-lactamase TEM-1. Anal Biochem 419:9–16

Sai Kumar RS, Singh SA, Rao AG (2009) Conformational stability of α-amylase from malted sorghum (*Sorghum bicolour*): reversible unfolding by denaturants. Biochimie 91:548–557

Song Y, Antoniou C, Memic A, Kay BK, Fung LWM (2011) Apparent structural differences at the tetralerization region of erythroid and nonerythroid beta spectrin as discriminated by phage displayed scFvs. Protein Sci 20:867–879

Tanaka F, Barbas CF III (2002) Reactive immunization: a unique approach to catalytic antibodies. J Immunol Methods 269:67–79

Tapryal S, Krishnan L, Batra JK, Kaur KJ, Salunke DM (2010) Cloning, expression and efficient refolding of carbohydrate-peptide mimicry recognizing single chain antibody 2D10. Prot Expr Purif 72:162–168

Tsumoto K, Shinoki K, Kondo H, Uchikawa M, Juji T, Kumagai I (1998) Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction of oxidizing reagent – application to a human single-chain Fv fragment. J Immunol Methods 219:119–129

Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Philo JS, Arakawa T (2004) Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. Biotechnol Prog 20:1301–1308

Umetsu M, Tsumoto K, Hara M, Ashish K, Goda S, Adschiri T, Kumagai I (2003) How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. J Biol Chem 278:8979–8987

Vendel MC, Favis M, Snyder WB, Huang F, Capili AD, Dong J, Glaser SM, Miller BR, Demarest SJ (2012) Secretion from bacterial versus mammalian cells yields a recombinant scFv with variable folding properties. Arch Biochem Biophys 526:188–193

Venyaminov SY, Yang JT (1996) Determination of protein secondary structure. In: Fasman GD (ed) Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. Plenum, New York, pp 69–107

Weisser NE, Hall JC (2009) Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. Biotechnol Adv 27:502–520

Wörn A, Plückthun A (2001) Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. J Mol Biol 305:989–1010

Xu Y, Yamamoto N, Janda KD (2004) Catalytic antibodies: hapten design strategies and screening methods. Bioorgan Med Chem 12:5247–5268

Yang Z, Zhang L, Zhang Y, Zhang T, Feng Y, Lu X, Lan W, Wang J, Wu H, Cao C, Wang X (2011) Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. PLoS One 6:e22981

Ye T, Lin Z, Lei H (2008) High-level expression and characterization of an anti-VEGF165 single-chain variable fragment (scFv) by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol 81:311–317

Yribarren AS, Thomas D, Friboulet A, Avalle B (2003) Selection of peptides inhibiting a β-lactamase-like activity. Eur J Biochem 270:2789–2795