

Mémoire

Auteur : Props, Charles-Henri

Promoteur(s) : Dumoulin, Mireille

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

Année académique : 2023-2024

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/21061>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Université de Liège

Centre for Protein Engineering (CIP) - InBIOS

Nano-antibodies to Explore Protein Structure and Functions (NEPTUNS)

Sélection et caractérisation de Nanobodies[®] dirigés contre TFIP11 et LasB

Charles-Henri PROPS

S195871

Mémoire

Université de Liège ; Faculté des Sciences ;

2^{ème} Master en Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire

Promoteur : Mireille Dumoulin

Encadrant : Jonathan Vaneyck

Année académique 2023-2024

Table des matières

1. Introduction.....	8
1.1. Tuftelin-interacting protein 11 (TFIP11)	8
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et LasB	9
1.3. Les Nanobodies®.....	11
1.3.1. Définition et propriétés	11
1.3.2. Sélection des Nanobodies®	12
2. Objectifs du travail.....	15
3. Matériel et méthodes.....	16
3.1. Milieux, solutions et tampons	16
3.1.1. Milieux.....	16
3.1.2. Solutions	16
3.1.3. Tampons	18
3.2. Phagémide pMECS, banques de phages et souches d' <i>Escherichia coli</i>	19
3.2.1. Phagémide pMECS.....	19
3.2.2. Banques de phages.....	19
3.2.3. Souches d' <i>E. coli</i>	20
3.3. Sélection des Nanobodies® par phage display	20
3.3.1 Panning.....	20
3.3.2. Screening	24
3.3.4. Transformation par choc thermique d' <i>E. coli</i> WK6.....	28
3.4. Production des Nanobodies® et extraction périplasmique des Nanobodies®	29
3.5. Purification des Nanobodies®.....	30
3.5.1. Purification IMAC.....	30
3.5.2. Purification CET.....	31
3.6. Caractérisation des Nanobodies®.....	32
3.6.1. ELISA	32
3.6.2. Bio-layer interferometry (BLI).....	33
3.7. Western Blot (WB).....	34
3.8. Test d'activité de LasB.....	35
4. Résultats	36
4.1. Sélection et caractérisation des Nbs contre TFIP11	36
4.1.1. Panning contre DM2.....	36
4.1.2. Screening contre DM2	37

4.1.3. Production et purification du Nb D108	39
4.1.4. Test de spécificité du Nb D108 par ELISA	42
4.1.5. Test de liaison de Nb D108 via des mesures BLI	43
4.1.6. Conclusions des Nbs contre DM2	44
4.2. Sélection et caractérisation des Nbs contre LasB	45
4.2.1. Panning contre LasB	45
4.2.2. Screening contre LasB.....	45
4.2.3. Production et purification du Nb L276	48
4.2.4. Analyse par Western Blot du Nb L276 après purification.....	51
4.2.5. Test de liaison du Nb L276 via des mesure BLI	52
4.2.6. Test de liaison du Nb L276 via des mesure BLI en présence d'un inhibiteur de LasB	53
4.3. Test d'activité de LasB immobilisée par adsorption sur plaque Multisorp.....	54
5. Discussions et perspectives	55
5.1. G-Patch de TFIP11.....	55
5.2. LasB.....	57
6. Bibliographie.....	59
7. Annexes	65
7.1. Amorces.....	65
7.2. Cycle pour la cPCR	65
7.3. Exemple de tests lors du screening	65
7.4. Représentation des puits par clone lors d'un ELISA	65
7.5. Substrats : ELISA, WB et LasB	66
7.6. Spectre d'absorbance du Nb D108	66
7.7. Spectre d'absorbance du Nb L276.....	66

Résumé :

Sélection et caractérisation de Nanobodies® dirigés contre TFIP11 et LasB

Charles-Henri Props (mémorant), Mireille Dumoulin (promoteur), Jonathan Vaneyck (encadrant) ; Laboratoire NEPTUNS (CIP), 2023-2024.

Mon mémoire est scindé en deux projets distincts ayant pour point commun la sélection et la caractérisation de Nanobodies® (Nbs). Les Nbs sont des fragments d'anticorps dit à chaînes lourdes que l'on retrouve dans le sang des Camélidés. Découvert en 1989, les Nbs possèdent de nombreuses propriétés intéressantes qui ont conduit à leur utilisation accrue aussi bien pour la recherche fondamentale que pour des applications biotechnologiques ou encore médicales. Le premier projet concerne TFIP11. TFIP11 est une protéine impliquée dans de nombreuses interactions notamment, via son G-Patch, avec plusieurs composants importants du splicéosome. Les interactions avec ceux-ci ne sont pas toujours possibles dû à la présence ou à l'absence de modifications post-traductionnelles réversibles ce qui implique que l'épissage ne sera pas effectué. Actuellement, on ne connaît pas les modifications post-traductionnelles nécessaires et suffisantes pour assurer la fonction de TFIP11 au sein du splicéosome. Ce premier projet vise à sélectionner des Nbs visant le G-Patch et plus particulièrement deux modifications post-traductionnelles de celui-ci. Ces Nbs permettront de réaliser des expériences telles que de la visualisation *in vivo* des modifications post-traductionnelles et ainsi mieux comprendre leur rôle pour la formation du splicéosome. Afin de réaliser la sélection des Nbs, un panning par phage display à partir d'une banque immune de gène de Nbs puis un screening par ELISA ont été réalisés. Les Nbs sélectionnés, ont été produits dans *Escherichia coli* et purifiés avant de caractériser leur capacité à se lier à TFIP11. Lors de ce projet, un seul Nb a été sélectionné, le Nb D108, mais après test de caractérisation par ELISA et interférométrie bio-couche (BLI), il ne se lie malheureusement pas au G-Patch de TFIP11. Le second projet concerne la métalloprotéase LasB de *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* est une bactérie, pathogène opportuniste, dans le top 3 des souches résistantes aux antibiotiques responsable de plus de 500 000 décès en 2019. La protéase LasB est une métalloprotéase à zinc et est l'un des principaux facteurs de virulence sécrété par *P. aeruginosa* causant des dommages aux tissus de l'hôte et diminuant la réponse immunitaire. Aucun inhibiteurs efficaces et sélectifs n'a pas été encore trouvé. Ce second projet vise à sélectionner des Nbs ciblant LasB et plus particulièrement inhibant spécifiquement et efficacement LasB selon la même stratégie que celle utilisé pour générer des Nbs contre TFIP11. Lors de ce projet, un seul Nb a été sélectionné, le Nb L276, mais après caractérisation par BLI, il ne se lie, malheureusement, pas à LasB.

Mots clés : TFIP11 ; LasB ; *Pseudomonas aeruginosa* ; Nanobody® ; Phage display.

Summary :

Selection and characterization of Nanobodies® against TFIP11 and LasB

Charles-Henri Props (master student), Mireille Dumoulin (promotor), Jonathan Vaneyck (daily supervisor) ; Laboratory NEPTUNS (CIP), 2023-2024.

My master thesis is divided into two distinct projects with a common focus on the selection and characterization of Nanobodies® (Nbs). Nbs are binding domains of heavy-chains antibodies found in the blood of Camelidae. Discovered in 1989, Nbs possess many interesting properties that have led to their increased use in both fundamental research and in biotechnological and medical applications. The first project focuses on TFIP11. TFIP11 is a protein involved in numerous interactions, particularly via its G-Patch, with several important components of the spliceosome. These interactions are not always possible due to the presence or the absence of reversible post-translational modifications, which means that splicing may not occur. Currently, the necessary and sufficient post-translational modifications required to ensure TFIP11's function within the spliceosome are unknown. This first project aims to select Nbs targeting the G-Patch, specifically focusing on two post-translational modifications. The goal is to conduct experiments such as *in vivo* visualization to determine the presence or the absence of post-translational modifications and better understand their role in the formation of the spliceosome. To achieve the selection of Nbs, a panning by phage display was carried from an immune library of Nbs genes, followed by a screening via an ELISA have be performed. The selected Nbs were produced in *E. coli* and purified before being characterized. In this project, only one Nb, D108, was selected, but after characterization by ELISA and Biolayer interferometry (BLI), it does not unfortunately bind to the G-Patch. The second project concerns the LasB metalloprotease from *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* is an opportunistic pathogenic bacterium in the top 3 of antibiotic-resistant strains responsible for more than 500,000 deaths in 2019. The LasB protease is a zinc metalloprotease and is one of the main virulence factors secreted by *P. aeruginosa*, causing damage to host tissues and affecting the immune response. No effective and selective inhibitors have yet been found. This second project aims to select Nbs targeting LasB, specifically inhibiting LasB effectively and selectively. To achieve this aim, the same strategy as that described above for TFIP11 was carried out. The selected Nbs were produced and purified and their ability to bind/inhibit LasB were investigates. In this project, only one Nb, L276, was selected, but after characterization tests (BLI), it does not unfortunately bind to LasB.

Keywords : TFIP11 ; LasB ; *Pseudomonas aeruginosa* ; Nanobody® ; Phage display.

Remerciements : Tout d'abord, j'exprime ma gratitude envers Madame le Docteur Mireille Dumoulin pour son accueil au sein du CIP dans le laboratoire NEPTUNS et ses précieux conseils durant ce mémoire.

Mes remerciements s'adressent aussi aux personnels de la plateforme « Robotein » et « Protein Factory » ainsi qu'aux doctorants du CIP, avec lesquels j'ai partagé d'excellents moments, surtout lors des temps de midi.

Je remercie également mes parents et ma famille, spécialement mon frère, Pierre-Julien, qui m'a tracé la route lors de mes années à l'Université de Liège. Je remercie aussi mes amis, notamment mes voisines : Elise et Louise, ainsi que mon chien, Kali, pour leur soutien au quotidien.

Et enfin, je tenais à remercier particulièrement mon encadrant, Jonathan Vaneyck, qui m'a beaucoup appris et pris sous son aile durant ce mémoire.

Abréviations :

Abs : Absorbance

Amp : Ampicilline

BSA : Bovine serum albumin (Albumine de sérum bovin)

CDR : Complementarity-determining regions (Boucles déterminant la complémentarité)

CET : Chromatographie par exclusion de taille

cPCR : PCR sur colonies

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

EP : Extrait périsplasmique

Fab : Fragments de liaison à l'antigène d'une immunoglobuline G classique

HA : Hémagglutinine

HIS₆ : Hexa-histidine

IgG : immunoglobuline G

IMAC : Immobilized metal affinity chromatography (Chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés)

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

Kana : Kanamycine

kD : kilo Dalton

LB : Luria-Bertani

Nb : Nanobody[®]

NBT : bleu nitré de tétrazolium

O/N : Overnight (Toute la nuit)

pb : Paires de base

PBS : Phosphate buffered saline (Tampon phosphate salin)

PBS-T : PBS -Tween

PEG : Polyéthylène glycol

pNPP : 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexa hydraté

RPM : Révolutions par minute

TA : Température ambiante

TB : Terrific broth

TEA : Triméthylamine

TES : Tris-EDTA-sucrose

TFIP11 : Tuftelin-interacting protein 11

Tris : Trisaminométhane

TY : Tryptone-yeast (Tryptone-levure)

WB : Western blot

ZID : Zones intrinsèquement désordonnées

1. Introduction

1.1. Tufelin-interacting protein 11 (TFIP11)

TFIP11 est une protéine de 770 acides aminés qui fait partie du spliceosome (Jurica & Moore, 2003). Le spliceosome est un large complexe, composé de protéines et d'ARN, qui a pour but d'éliminer les introns des pré-ARN messagers. TFIP11 est localisé dans le noyau où le spliceosome s'assemble (Wen et al., 2005). TFIP11 va favoriser l'évacuation de l'intron pendant l'épissage (Yoshimoto et al., 2009). La fonction de TFIP11 est très importante dans le spliceosome et conservée chez de nombreuses espèces (Bennett et al., 1992). Cela met en évidence le fait que TFIP11 effectue une activité non redondante cruciale pour la survie des organismes.

Une étude récente (Duchemin et al., 2021) a démontré que TFIP11 est nécessaire pour maintenir la structure du spliceosome. Au sein de la protéine, on trouve un « G-Patch » (Figure 1A) qui va interagir avec plusieurs composants importants du spliceosome. Le G-Patch est flanqué de deux des trois zones intrinsèquement désordonnées (ZID); ces 3 zones ont été prédites par des algorithmes et par l'analyse des caractéristiques de TFIP11 (Figure 1C). Au sein du G-Patch, deux résidus sont sujet à des modifications post-traductionnelles : un résidu Y162 (Figure 1B) a été identifié comme site de phosphorylation (Tannukit et al., 2009) et un résidu R166 (Figure 1B) a été identifié comme site de méthylation (Tannukit et al., 2009). Ces sites sont sujet à de la réversibilité impliquant un changement de propriétés biochimiques de la protéine tel que le changement du point isoélectrique (Darling & Uversky, 2018). Le rôle de ces modifications post-traductionnelles pour la fonction de TFIP11 est peu connu. Actuellement, on ne connaît pas les modifications post-traductionnelles nécessaires et suffisantes pour que le G-Patch réalise sa fonction.

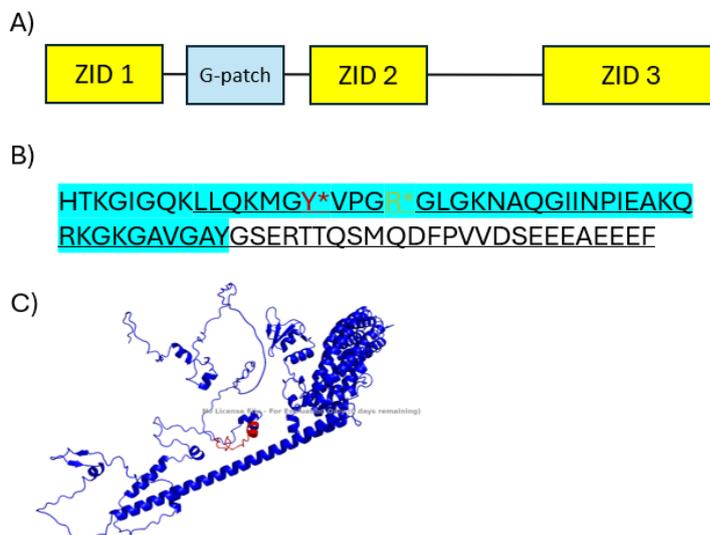


Figure 1 : TFIP11 et G-patch. A) Structure schématique des éléments de TFIP11, B) Séquence du G-Patch en bleu, site de phosphorylation Y162 en rouge avec * (Y*), site de méthylation R166 en vert avec * (R*) et séquence de TFIP11 couplée à KHL soulignée, C) Structure de TFIP11, G-Patch en rouge entouré de ZID.

1.2. *Pseudomonas aeruginosa* et LasB

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram -, pathogène opportuniste qui est le principal responsable des maladies nosocomiales, causant, par exemple, des pneumonies ou des infections urinaires chez les patients hospitalisés pour d'autres pathologies (Banerjee & Stableforth, 2000). *P. aeruginosa* a été responsable de plus de 500 000 décès en 2019 (Ikuta et al., 2022). Cette bactérie est dans le top 3 des souches résistantes aux antibiotiques. Lors d'une infection, les traitements sont très complexes vu la capacité de la bactérie à s'adapter aux antibiotiques. L'OMS l'a classifiée dans le groupe critique des pathogènes nécessitant d'urgence le développement de nouveaux traitements (*L'OMS met à jour la liste des bactéries résistantes aux médicaments qui représentent la plus grande menace pour la santé humaine*, n.d.).

LasB, également connue sous le nom d'élastase B, est une métalloprotéase à zinc. Cette enzyme de 33 kilo Dalton (kD) est l'un des principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (Moriyama et al., 1965). Elle constitue l'une des protéines les plus abondantes dans le sécrétome de cette bactérie (Saint-Criq et al., 2018). LasB hydrolyse une large gamme de protéines, provoquant des dommages aux tissus de l'hôte et perturbant la réponse immunitaire (Galdino et al., 2019). Ainsi, par exemple, LasB hydrolyse l'élastine (composant clé de l'élasticité des tissu conjonctifs) (Yang et al., 2015), les composants du complément (Schultz & Miller, 1974) et le lysozyme des voies respiratoires humaines (Jacquot et al., 1985). De plus, LasB joue un rôle crucial dans l'invasion des tissus de l'hôte en clivant des composants essentiels des tissus conjonctifs tels que le collagène (Heck et al., 1986).

Dans leur étude, Saint-Criq et al. (2019) démontrent que, lors d'une infection pulmonaire par *P. aeruginosa*, LasB est le principal agent responsable de la dégradation des cellules épithéliales, entraînant ainsi une perte de leur fonction. Cette action permet à *P. aeruginosa* de franchir la barrière immunitaire innée des cellules épithéliales et de coloniser les poumons des individus sensibles, notamment ceux atteints de mucoviscidose provoquant une infection bactérienne chronique.

La structure tridimensionnelle de LasB a été résolue en 1991, elle est composée de sept hélices α et de deux feuillets β antiparallèles et contient un ion zinc et un ion calcium (Thayer et al., 1991). L'ion Zn, qui est chélaté par les chaînes latérales de l'H140 et de l'H144, et la chaîne latérale du E164 sont les éléments principaux de la réaction d'hydrolyse (Figure 2A). D'autres acides aminés (Figure 2A) ainsi que l'ion calcium vont participer à la stabilité et la sélectivité du site actif. Le site d'hydrolyse préférentiel de l'enzyme est la liaison peptidique après une sérine ou une thréonine. L'hydrolyse par

LasB est réalisée via la consommation d'une molécule d'eau provoquant l'hydrolyse de la liaison peptidique (Figure 2B) (Chen et al., 2019).

Plusieurs inhibiteurs de LasB ont été étudiés dont le phosphoramidon (Figure 2C). Cet inhibiteur de LasB vient occuper le site catalytique, en interagissant avec l'ion zinc, et donc inhiber LasB (Figure 2D), mais il n'est pas sélectif car il cible de nombreuses métalloenzymes dont celles des mammifères (Kessler & Spierer, 1984). D'autres inhibiteurs, naturels ou synthétiques, visant à chélater l'ion zinc du site actif ou à bloquer le site actif, ont soit une faible activité soit un manque de sélectivité (Everett & Davies, 2021). Ce manque d'inhibiteur efficace et sélectif est un problème car, comme mentionné, LasB est l'un des principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*.

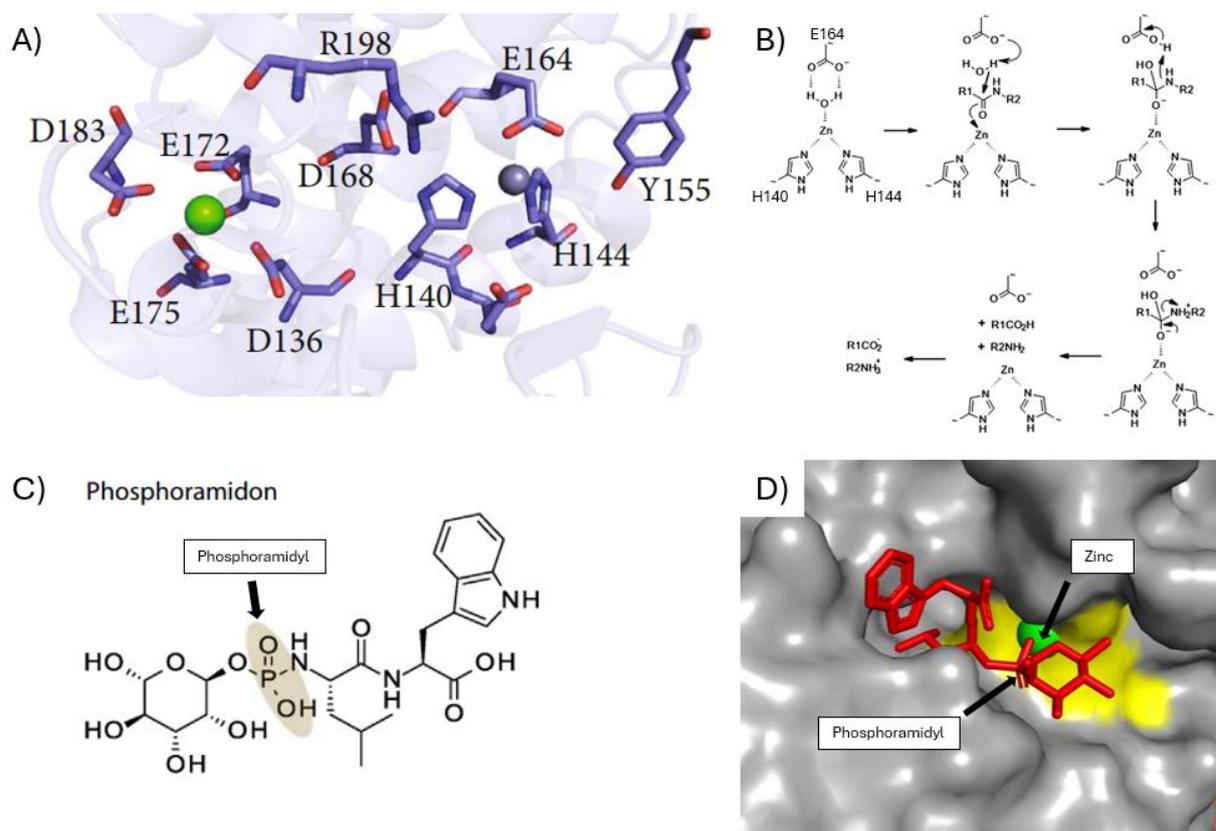
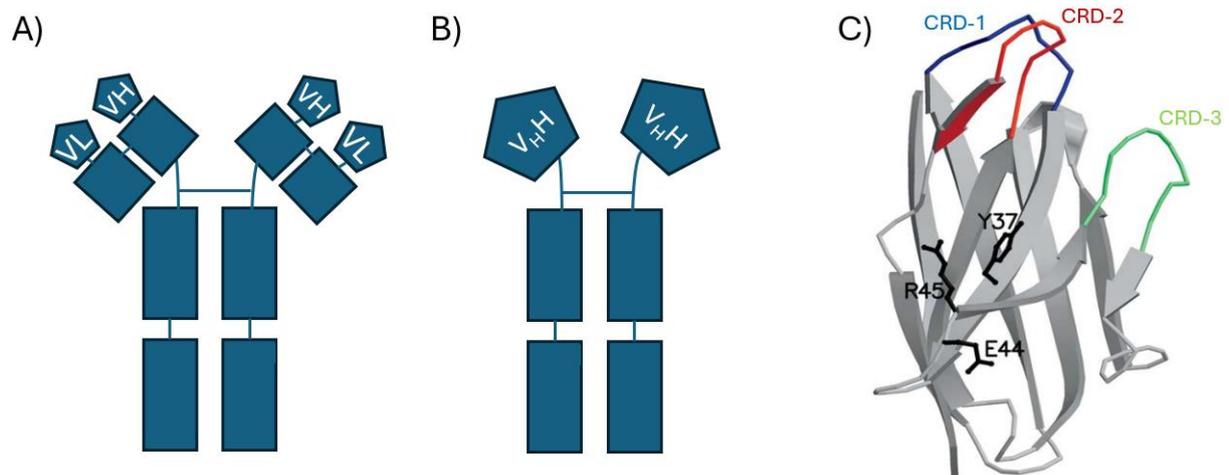


Figure 2 A) Site actif de LasB (acides aminés du site actif, boule verte : ion calcium, boule grise : ion zinc), B) Réaction d'hydrolyse de LasB par l'ion zinc, l'H140, l'H144 et l'E164, C) Structure du phosphoramidon (zone beige (Phosphoramidyl) : zone d'interaction avec l'ion zinc) et D) Complexe LasB-phosphoramidon dans le site actif, en jaune : les acides aminés du site catalytique et l'ion zinc et en rouge : le phosphoramidon. Référence PDB de LasB-phosphoramidon : 3DBK. Figure A reprise de Rigan et al., 2020, figures B et C de Everett & Davies, 2021.

1.3. Les Nanobodies®

1.3.1. Définition et propriétés

Les Nanobodies® (Nbs) sont de petits fragments d'anticorps dérivés des anticorps IgG ne possédant que deux chaînes lourdes, présents dans le sang des camélidés comme les chameaux et les alpagas (Hamers-Casterman et al., 1993; Muyldermans, 2013). Découvert par Raymond Hamers, Cécile Casterman et Serge Muyldermans en 1989. Ces anticorps, dit anticorps à chaînes lourdes, diffèrent des IgG conventionnels trouvés chez les humains et chez les autres mammifères, qui sont des molécules composées de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères (Shinde et al., 2024) (Figure 3A). Les Nbs correspondent aux domaines variables des anticorps dits à chaînes lourdes et ont un poids moléculaire d'environ $\pm 12-15$ kD (i.e. ± 125 acides aminés) (Kinoshita et al., 2022) (Figure 3A et B).



Les fragments d'anticorps recombinants, comme les fragments de liaison à l'antigène d'une immunoglobuline G classique (Fab) ou les Nanobodies®, sont reconnus comme des lieux d'antigènes efficaces. Ils conservent la spécificité des anticorps monoclonaux tout en offrant de meilleures propriétés pour diverses applications diagnostiques, thérapeutiques et biochimiques (Holliger & Hudson, 2005; Pillay & Muyldermans, 2021). Les Nanobodies® bénéficient, en plus de leur petite taille, de propriétés biochimiques favorables, telles qu'une haute thermo-stabilité (Dumoulin et al., 2002), une pénétration élevée dans les tissus (Jumapili et al., 2023), une faible immunogénicité (Muyldermans, 2013) ainsi qu'une solubilité plus élevée que les Fab (Conrath et al., 2005). Cette solubilité élevée est due à la présence d'acides aminés hydrophiles, sur le Nanobody® (Nb) situés à la

place d'acides aminés (hydrophobes) interagissant avec la chaîne légère des anticorps conventionnels (Figure 3A) et au recouvrement des acides aminés hydrophobes par la boucles déterminant la complémentarité (CDR) 3 du Nb (Conrath et al., 2005).

Le site de liaison des Nanobodies[®] est composé de trois CDR (CDR 1 à 3) (Figure 3C) (Muyldermans et al., 2001). La boucle CDR-3 est la plus variable, allant de 10 jusqu'à 20 résidus, et contribue majoritairement aux interactions avec l'antigène (Zavrtanik et al., 2018 ; Muyldermans et al., 2001). Le reste du Nb est composé de régions dont les séquences et les structures sont très conservées, comprenant des feuillets bêta sandwich reliés par un ponts disulfures, ceux-ci assurent la stabilité de la protéine (Figure 3C) (Muyldermans, 2013).

Les Nbs peuvent être produits économiquement en grandes quantités via des systèmes d'expression bactérienne comme décrit dans ce mémoire (3.4. Production des Nanobodies[®] et extraction périplasmique des Nanobodies[®]). L'ensemble de leurs caractéristiques favorables ont conduit à leur utilisation accrue remplaçant les anticorps conventionnels (Bathula et al., 2021) aussi bien pour la recherche fondamentale que pour des applications biotechnologiques ou encore médicales (Muyldermans, 2021).

1.3.2. Sélection des Nanobodies[®]

Il y a plusieurs stratégies pour sélectionner des Nanobodies[®] spécifiques d'une cible donnée telles que le « surface display » sur bactérie (Fleetwood et al., 2013) mais le « phage display » suivis d'un screening reste la stratégie la plus accessible (Muyldermans, 2013; Riechmann & Muyldermans, 1999). Cette technique permet d'enrichir puis de sélectionner des Nanobodies[®] spécifiques d'une cible donnée à partir de larges banques de gènes de Nanobodies[®] construites à partir des lymphocytes B de camélidés immunisés (banque immune) contenant en moyenne 10^8 séquences différentes, non-immunisés (banque naïve) contenant en moyenne 10^9 séquences différentes ou à partir d'une séquence optimale de Nb amplifiée avec des insertions de mutations aléatoires au sein essentiellement du CDR 3 (banque synthétique) pouvant contenir de 10^{11} à 10^{14} séquences différentes (Li et al., 2022).

Le phage display est une technique de biologie moléculaire permettant d'exposer une protéine ou un peptide au milieu extérieur en étant fusionné avec une protéine du manteau de phage. Cette technique permet de relier le gène du Nb (génotype) au Nb (phénotype) (Smith, 2019) (Figure 4).

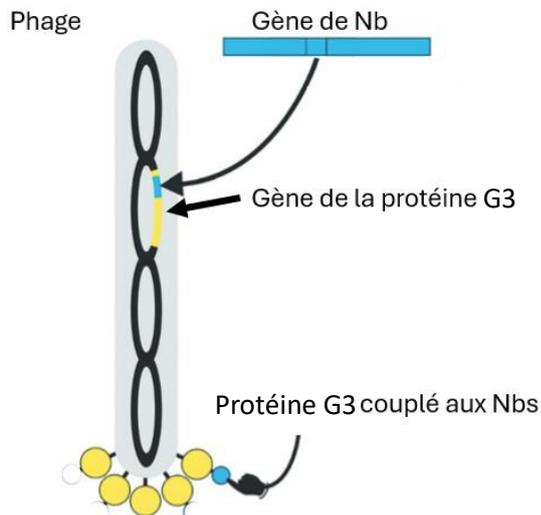


Figure 4 : Représentation schématique du phage et de la liaison entre le génotype et le phénotype. Figure modifiée de Smith, 2019.

Le phage le plus utilisé est le phage M13. C'est un phage filamentueux, non lytique. Le phage est composé de 5 protéines dites de manteau et d'un brin d'ADN simple brin. La séquence du Nb va être couplée au gène de la protéine G3 et donc lorsque la protéine G3 va former l'enveloppe du phage, le Nb va être exposé au milieu extérieur tout en étant attaché au phage (Figure 4) (Ledsgaard et al., 2018; Smith, 2019).

Le phage display est divisé en deux étapes :

- Construction de la banque de phages : Les gènes des Nanobodies®, provenant d'une banque de gènes, sont clonés en amont du gène codant pour la protéine G3 du phage M13. Ensuite, des bactéries (*Escherichia coli*) sont infectées avec les phages (banque de bactéries) et par des phages helper. Les phages helper permettent la multiplication des phages dans la bactérie car ils possèdent tous les gènes nécessaires à la réplication et l'assemblage du phage. Après incubation, les phages sont récupérés et constituent la banque de phages (Muyldermans, 2013; Romao et al., 2016).

- Enrichissement des Nanobodies® par phage display puis sélection par screening : L'enrichissement se fait par tour de panning comprenant plusieurs étapes (Figure 5) : les phages vont être incubés avec l'antigène immobilisé pour ne garder que les phages exposant un Nanobody® liant l'antigène. Les phages non liés sont éliminés par des étapes de lavage, et ceux liant l'antigène sont récupérés et utilisés pour infecter des bactéries « fraîches » (*E. coli*) pour recréer une nouvelle banque (sous-banque) de phages et ainsi recommencer un tour (Muyldermans, 2013; Romao et al., 2016). A chaque tour, la proportion de phages spécifique à la protéine cible augmente et donc enrichit la sous-banque en phages d'intérêt.

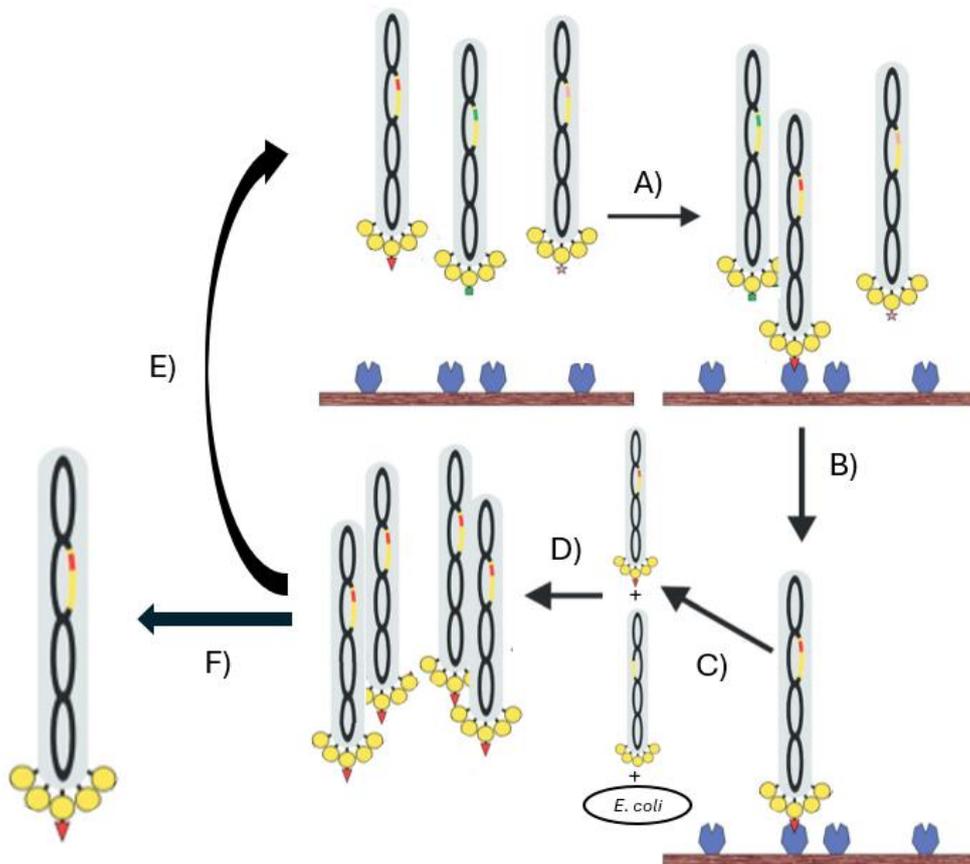


Figure 5 : Panning par phage display. A) Mise en contact des cibles avec la banque de phages, B) Lavage, C) Elution, D) Amplification par infection bactérienne et ajout de phages helper, E) Répétition du tour, F) Screening. Figure modifié modifiée de Smith, 2019.

Le screening permet de sélectionner les Nbs spécifiques à partir des sous-banques enrichies. Un nombre de clones, provenant des sous-banques, va être produit et testé par ELISA afin de sélectionner les clones qui montrent une spécificité à la protéine cible (Georgieva & Konthur, 2011).

2. Objectifs du travail

Lors de ce mémoire, les buts de mon travail étaient de sélectionner et caractériser des Nanobodies® ciblant le G-Patch de la protéine TFIP11 et des Nbs inhibant la métalloprotéase LasB.

- Pour sélectionner et caractériser des Nbs dirigés contre le G-Patch de TFIP11 avec les deux modifications post-traductionnelles (Y162 phosphorylée et R166 méthylée), une immunisation d'un alpaga a été réalisée avec la protéine DM2. Cette protéine est composée d'une partie du G-Patch de TFIP11 avec les deux modifications post-traductionnelles (Figure 1B) couplée, en C-ter, de la protéine KHL. La partie du G-Patch contient le résidu Y162 phosphorylé ainsi que le résidu R166 méthylé. La KHL a été utilisée afin d'augmenter la réponse immunitaire de l'alpaga. Ensuite, une banque de phages exprimant, à leur surface, les Nbs fusionnés à la protéine de manteau G3 a été réalisée. Ces étapes avaient déjà été réalisées avant mon arrivée dans le laboratoire. Il s'agira de réaliser trois tours de sélection par phage display en ciblant la protéine DM2 immobilisée par adsorption sur une plaque 96F Multisorp. Ces tours permettront d'enrichir les sous-banques en Nbs spécifiques de DM2. Après le dernier tour, un tour de contre sélection, visant à ne sélectionner que les phages ciblant la région du G-Patch, sera effectué en ciblant la protéine KHL- α Syn, qui est composée d'un peptide de l' α -synucléine couplée, en C-ter à la protéine KHL. Cette étape est réalisée car l'alpaga a produit des Nbs contre DM2 et par conséquent contre la KHL. Les phages non liés seront, en théorie, spécifiques du G-Patch et seront récupérés. Par la suite un screening va être réalisé afin de sélectionner les Nbs spécifiques. Enfin les Nbs sélectionnés vont être produits et caractérisés via des tests d'affinités.
- Pour sélectionner et caractériser les Nbs inhibiteurs de LasB, une immunisation d'un alpaga a été réalisée avec la protéine LasB. Ensuite, la banque de phages a été réalisée. Ces étapes avaient déjà été réalisées avant mon arrivée dans le laboratoire. Il s'agira de réaliser trois tours de sélection par phage display en ciblant la protéine LasB immobilisée par adsorption sur une plaque 96F Multisorp. Par la suite un screening va être réalisé. Enfin les Nbs sélectionnés vont être produits et caractérisés via des tests d'affinités.

3. Matériel et méthodes

3.1. Milieux, solutions et tampons

3.1.1. Milieux

Milieu 2XTY : 10 g/L d'extrait de levure, 16 g/L de tryptone et 5g/L de NaCl dans de l'eau distillée. Le milieu est autoclavé et conservé à température ambiante.

Milieu LB : 25 g/L de LB (VWR chemicals ;Radnor ;USA) dans de l'eau distillée. Le milieu est autoclavé et conservé à 4°C.

Milieu LB agar : 25 g/L de LB (VWR chemicals) et 15 g/L d'agar dans de l'eau distillée. Le milieu est autoclavé et conservé à 55°C. Avant d'être coulé dans des boîtes de Pétri, 0,1 mg/L d'ampicilline (Amp) et 20 g/L de glucose stérile sont ajoutés. Les boîtes de Pétri sont ensuite conservées à 4°C.

Milieu TB : 26,7 g/L d'extrait de levure, 13,3 g/L de tryptone et 4 mL/L de glycérol 100% dans de l'eau distillée. Le milieu est autoclavé et conservé à 4 °C.

3.1.2. Solutions

Solution TB-salt 10x: 23,1 g/L de KH_2PO_4 et 125,4 g/L de K_2HPO_4 dans de l'eau distillée. La solution est autoclavée et conservée à 4°C. Le TB-salt 10x est dilué 10 fois dans du milieu TB avant l'inoculation de milieu TB avec des bactéries.

Solution de Polyéthylène glycol (PEG) NaCl (5x) : 200 g/L de PEG 6000 et 146 g/L de NaCl dans de l'eau milli-Q. La solution est autoclavée et conservée à température ambiante.

Solution de glycérol 40 % : 400 mL/L de glycérol 99% dans de l'eau milli-Q filtrée (0,22 μm)

Solution de triméthylamine (TEA) : TEA (10 mM) dans de l'eau milli-Q. Cette solution est conservée 1 jour à TA.

Solution de PBS 20x : 160 g/L de NaCl, 4 g/L de KCl, 4,8 g/L de KH_2PO_4 et 35,6 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau milli-Q.

Solution d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 100 mM : 23,8 g/L d'IPTG dans de l'eau milli-Q. Cette solution est filtrée (0,22 μm) et conservée à 4 °C pendant maximum 2 jours.

Solution de PBS-Tween (PBS-T) : 1 mL/L de Tween 20 dans du PBS 1x.

Solution d'anticorps primaire n°1 : 0,5 µg/mL «mouse anti-Hémagglutinine-tag » (« antiHA-tag ») (BioLegend ;San Diego ;USA) dans du PBS 1x. Cette solution est réalisée durant la manipulation.

Solution d'anticorps primaire n°2 : 0,5 µg/mL «mouse anti-histidine-tag » (« antiHIS-tag ») (BioLegend) dans du PBS 1x. Cette solution est réalisée durant la manipulation.

Solution d'anticorps primaire n°3 : 0,5 µg/mL « anti-Alpaca VHH domaine conjugué avec la phosphatase alcaline » (Jackson ImmunaResearch ;West Grove ;USA) dans du PBS 1x. Cette solution est réalisée durant la manipulation.

Solution d'anticorps secondaire : 0,5 µg/mL « anti-mouse conjugué avec la phosphatase alcaline » (BETHYL; Montgomery ;USA) dans du PBS 1x. Cette solution est réalisée durant la manipulation.

Solution du réactif ELISA : 2 g/L de 4-Nitrophényl phosphate disodium salt hexa-hydraté (pNPP) (Figure A 3 A) (Sigma ;Saint-Louis ;USA) dans du tampon AP. Cette solution est réalisée durant la manipulation.

Solution de CaCl₂ 100 mM ou 50 mM : 11,1 g/L ou 5,55 g/L de CaCl₂ dans de l'eau milli-Q. Cette solution est filtrée (0,22 µm) et conservée à 4 °C.

Solution Tris-EDTA-sucrose (TES) : 171,15 g/L de glucose, 0,19 g/L d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), 24,22g/L de trisaminométhane (Tris). Le pH de la solution est ajusté à 8 avec ajout d'HCl. La solution est filtrée (0,22 µm) et conservée à 4 °C.

Solution TES ¼ : 250 mL/L de solution de TES dans de l'eau milli-Q. Cette solution est conservée 1 jour à 4°C.

Solution du réactif Western blot (WB) : 0,16 g/L de 5-bromo-4chloro-3indolylphosphate (BCIP) (Figure A 3 B) (Promega ;Madison ;USA) et 0,33 g/L de bleu nitré de tétrazolium (NBT) (Promega) dans du tampon AP. Cette solution est réalisée durant la manipulation.

Solution de décoloration : 200 mL/L d'éthanol 100%, 100 mL/L d'acide acétique 98% dans de l'eau milli-Q.

Solution de bleu de Coomassie : 1,2 g/L de bleu de Coomassie R250, 225 mL/L d'éthanol 100%, 100 mL/L d'acide acétique 98% dans de l'eau milli-Q. La solution est filtrée sur papier Wattman.

Solution du réactif LasB : 0,07 g/L de Abz-Ala-Gly-Leu-Ala-p-nitro-benzylamide (Figure A 3 C) (Sigma), 10 mL/L de Di-méthyl-formamylde dans du tampon LasB. Cette solution est réalisée durant la manipulation.

3.1.3. Tampons

Tampon de blocage n°1 : 10 g/L de caséine dans du PBS (1x). La solution est conservée à 4°C.

Tampon de blocage n°2 : 10 g/L de BSA dans du PBS (1x). La solution est conservée à 4°C.

Tampon de blocage n°3 : Pierce Protein-Free Blocking Buffer (Thermo scientific; Waltham ;USA). La solution est conservée à 4°C.

Tampon de blocage n°4 : 10 g/L de protéine de lait (lait en poudre) dans du PBS (1x). La solution est conservée à 4°C.

Tampon d'immobilisation: 16,8 g/L de NaHCO₃ dans de l'eau milli-Q. Le pH du tampon est ajusté à 8 avec ajout d'HCl. Le tampon est filtré (membrane avec une porosité de 0,22 µm) et conservé à 4 °C.

Tampon AP : 12,1 g/L de Tris, 8,7 g/L mM de NaCl, 0,1 g/L de MgCl₂ dans de l'eau milli-Q. Le pH du tampon est ajusté à 9 avec ajout d'HCl. Ce tampon est filtré (0,22 µm) et conservé à 4 °C.

Tampon KP pH8 ou pH7 : 24 g/L de KH₂PO₄, 55 g/L K₂HPO₄ dans de l'eau milli-Q. Le pH du tampon est ajusté à 8 ou à 7 avec ajout d'HCl. Ce tampon est filtré (0,22 µm) et conservé à 4 °C.

Tampon d'élution : 34,04 g/L d'imidazole dans du tampon KP. Le pH du tampon est ajusté à 8 avec ajout d'HCl. Ce tampon est filtré (0,22 µm) et conservé à 4 °C.

Tampon LasB : 6 g/L de Tris, 0,28 g/L de CaCl₂ dans de l'eau milli-Q. Le pH du tampon est ajusté à 7,4 avec ajout d'HCl. Ce tampon est filtré (0,22 µm) et conservé à 4 °C.

Tampon KB : 1 g/L de BSA, 0,05 g/L de NaN₃ et 0,05 ml/L de Tween 20 dans du PBS 1x. Ce tampon est conservé à 4 °C

Tampon TGS : 28,8 g/L de glycine, 6 g/L de Tris et 1 g/L de SDS dans de l'eau milli-Q.

Tampon TAE : 4,84 g/L de Tris, 1,14 mL/L d'acétate 100% et 0,148 g/L d'EDTA dans de l'eau milli-Q.

Tampon de chargement 4x : 11,4 g/L de Tris, 21 g/L de SDS, 26 mL/L de glycérol 99%, 50 mL/L beta-2-mercaptoéthanol 99% (Sigma) et 1 g/L de bleu de boromophénol dans de l'eau milli-Q. Le pH du tampon est ajusté à 6,8 avec ajout d'HCl. Ce tampon est conservé à 4 °C.

Tampon de transfert : 3 g/L de Tris, 14,4 g/L de glycine et 200 mL/L de méthanol (99 %) dans de l'eau mili-Q.

3.2. Phagémide pMECS, banques de phages et souches d'*Escherichia coli*

3.2.1. Phagémide pMECS

Les gènes codant pour les Nanobodies® ont été clonés dans le phagémide pMECS (Figure 6A). Le phagémide a une taille de 4510 paires de base (pb) sans le gène du Nb. Il contient un gène de résistance à l'ampicilline (Amp), une origine de réplication bactérienne (ori) et une origine de réplication de phages (f1 ori). En amont du site d'insertion (Figure 6A), se trouve un promoteur/opérateur Lac qui active la transcription du gène du Nb en présence d'IPTG et en absence de glucose ; il y a aussi le site de liaison de l'amorce MP57 (Figure 6B) ainsi que la séquence codant pour le peptide signal PelB qui va permettre la sécrétion du Nb dans le périplasma. En aval du site d'insertion (Figure 6B), se trouve la séquence d'un HA-tag puis un hexa-histidine-tag (HIS₆-tag) qui sont dans le même cadre de lecture que la séquence du Nb. Le HIS₆-tag est suivi d'un codon stop « ambre » : « TAG ». Enfin, il y a le gène de la protéine G3, protéine de manteau du phage M13, contenant le site de liaison de l'amorce G3 (Figure 6 A et B).

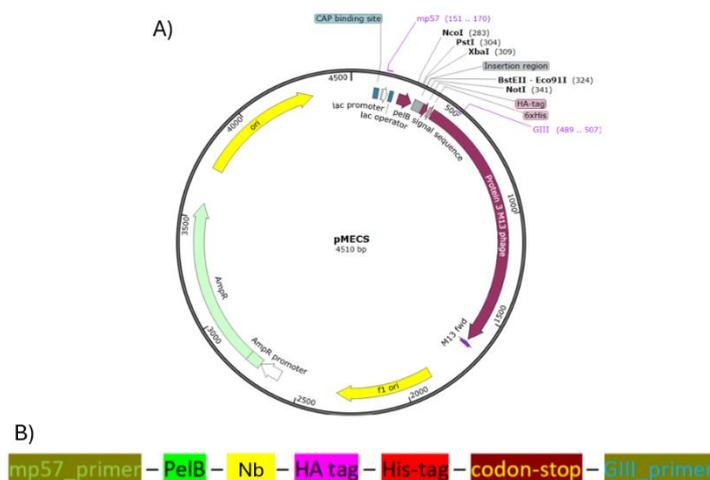


Figure 6 : Phagémide pMECS. A) phagémide pMECS vide, B) Représentation schématique des éléments proches de la séquence du Nb. Figures de Jonathan Vaneyck.

3.2.2. Banques de phages

Deux banques de phages ont été utilisées : la banque Joe 3 et la banque Joe 4b.

- La banque de phages Joe 3 a été créée par Jonathan Vaneyck et Francisco Javier Morales Yànez et provient de l'immunisation de l'alpaga « Joe ». Lors de cette immunisation, l'alpaga a eu six injections contenant 100 µg de protéine DM2 provoquant une réponse immunitaire qui va entraîner la production d'anticorps, dont des anticorps dit à chaînes lourdes ciblant DM2. Par la suite, à partir des lymphocytes B extraits d'un prélèvement sanguin réalisés 5 jours après la dernière injection, les ARN messagers codant pour les anticorps ont été isolés. Enfin, seules les séquences codant des Nbs ont été amplifiées et clonées dans un phagémide ce qui a permis

de créer la banque de phages Joe 3. Des aliquots de 70 µL ont été réalisés contenant 10^{11} phages et seront utilisés lors du panning.

- La Banque Joe 4b a été créée par Jonathan Vaneyck et provient de l'immunisation de l'alpaga « Joe » avec la protéine LasB et a été construite comme la banque Joe 3. Des aliquots de 61 µL ont été réalisés contenant 10^{11} phages et seront utilisés lors du panning.

3.2.3. Souches d'*E. coli*

Deux souches différentes d'*E. coli* ont été utilisées : la souche TG1 et la souche WK6.

- La souche TG1 a été utilisée pour les étapes de panning et de screening car cette bactérie ne reconnaît pas le codon stop « ambre » (TAG). Par conséquent, lorsque le gène du Nb est transcrit, le gène de la protéine de phage G3 l'est aussi. Ce qui permet de réaliser le phage display.
- La souche WK6 a été utilisée pour la production des Nbs car cette bactérie reconnaît le codon stop « ambre » (TAG) et donc seul le gène du Nb et des deux tags (HA-tag et HIS₆-tag) sont transcrits.

3.3. Sélection des Nanobodies® par phage display

3.3.1 Panning

Le panning a pour but d'enrichir la banque en Nanobodies® spécifiques de la protéine cible à partir d'une banque de phages par phage display (1.3.2. Sélection des Nanobodies®).

Pour chaque panning (contre TFIP11 et contre LasB), 3 tours de sélection ont été effectués suivis, pour le 3^{ème} tour de sélection contre TFIP11, d'une contre sélection. La contre sélection consiste à sélectionner les Nanobodies® qui ne se lient pas à la cible contrairement au panning « classique ». Une contre sélection a été effectuée car l'immunisation de l'alpaga a été réalisée avec DM2, composé du G-Patch couplé à la KHL et donc, lors des tours classiques, les Nbs ciblant la KHL ont été sélectionnés et par conséquent, la contre sélection va permettre d'éliminer les Nbs spécifiques de la KHL tout en conservant ceux spécifiques du G-Patch. Les différentes étapes d'un tour de panning sont reprises ci-dessous (Figure 5) :

Préparation d'une culture d'*E. coli* TG1 : Une colonie de *E. coli* TG1, provenant du stock, est mise en culture dans 5 mL de milieu LB et incubée minimum 4 heures à 37°C avec agitation orbitale (180 RPM). Une autre colonie de TG1 a été mise en culture dans 5 mL de milieu LB + Amp (0,1 mg/mL) et incubée 4 heures à 37°C avec agitation, cette culture permet de vérifier que le stock de bactéries n'est pas contaminé, vu que TG1 ne présente pas de résistance à l'ampicilline (Amp).

Immobilisation des protéines cibles : 4 µg de la protéine cible (DM2, qui est composée de la protéine KHL couplée au peptide d'intérêt de TFIP11 (Figure 1B) ou LasB) ont été incubés à 4°C O/N dans un puits d'une plaque 96 puits (Thermo scientific ;96F Multisorp Straight) en présence de 100 µL de tampon d'immobilisation afin de permettre leur adsorption. Ce puits est appelé « puits positif ». Un second, contenant 100 µL de tampon d'immobilisation sans la protéine d'intérêt, servira de puits contrôle ; ce puits est appelé « puits négatif ». Pour la contre sélection, après le 3^{ème} tour contre TFIP11, 4 µg de la protéine KHL-αSyn, qui est composée de la protéine KHL couplée à un peptide de l'α-synucléine, ont été incubés à 4 °C O/N dans un puits d'une plaque 96 puits (96F Multisorp Straight) en présence de 100 µL de tampon d'immobilisation. Ce puits est appelé « puits de contre sélection ». Un second, contenant 100 µL de tampon d'immobilisation sans la protéine d'intérêt, servira de puits contrôle. Ce puits est appelé « puits négatif ».

Mise en contact des protéines cibles avec la banque de phages : Après l'étape d'immobilisation, les deux puits (positif et négatif) ont été lavés 5 fois avec 100 µL de solution de PBS-Tween 20 (PBS-T). Après le lavage, 200 µL de tampon de blocage n°1, pour le 1^{er} tour de sélection (de tampon de blocage n°2 pour le 2^{ème} tour de sélection et de tampon de blocage n°3 pour le 3^{ème} tour de sélection) ont été mis dans les deux puits, le tout suivi d'une incubation d'1 heure à TA afin de neutraliser la surface du puits.

Quinze minutes avant la fin de l'incubation, 2 aliquots de phages contenant 10^{11} phages, de la banque initiale ou de la « sous-banque » du tour de sélection précédent, ont été incubés avec du tampon de blocage n°1, pour le 1^{er} tour de sélection (de tampon de blocage n°2 pour le 2^{ème} tour de sélection et de tampon de blocage n°3 pour le 3^{ème} tour de sélection) pour un volume final de 100 µL. Cette étape permet de neutraliser les Nbs spécifiques de la protéine du tampon de blocage.

A la fin de l'incubation, après avoir lavé les 2 puits 5 fois avec 100 µL de solution de PBS-T, les deux suspensions de phages de 100 µL ont été mises dans les 2 puits (1 aliquot par puits) le tout suivi d'une incubation d'une heure à TA. Durant cette étape, les phages exposant un Nanobody® spécifique de la protéine cible se fixent sur celle-ci.

Pour le 1^{er} et le 2^{ème} tour de sélection du panning contre TFIP11 et pour les trois tours de sélection contre LasB, après l'incubation, les suspensions de phages ont été éliminées et les 2 puits ont

été lavés 10 fois avec du PBS-T, pour le 1^{er} tour de sélection (15 fois pour le 2^{ème} tour de sélection et 20 fois pour le 3^{ème} tour de sélection) afin d'éliminer les phages liés de manières non-spécifiques. L'augmentation du nombre de lavages au cours des tours de sélection permet d'augmenter la spécificité des Nbs sélectionnés.

Les phages qui se sont liés à la protéine cible ont été élués via l'ajout de 100 µL de la solution de TEA. Après une incubation de 10 minutes à TA, les 100 µL de TEA, contenant les phages élués, ont été récupérés et mis dans 100 µL de solution Tris pour neutraliser le pH de la solution de TEA. Les deux suspensions de phages obtenues (la suspension + : phages élués à partir du puits positif et la suspension - : phages élués à partir du puits négatif) vont permettre d'estimer l'enrichissement en bactéries donc en phages et par conséquent en Nanobodies® entre les deux suspensions. De plus, la suspension + va servir à réaliser le screening et l'amplification des phages pour le prochain tour de sélection du panning selon les étapes suivantes :

- Premièrement, pour évaluer l'enrichissement, les deux suspensions (+ et -) ont été diluées 7 fois consécutivement par un facteur de 10 dans du PBS 1x dans une plaque multi puits U-bottom (suspension culture microplate, 96 well, U-bottom ;greiner ; Kremsmünster ;Autriche). Ensuite, 10 µL des 7 dilutions obtenues ont été ajoutés dans 90 µL de solution de TG1 dans une plaque multi puits U-bottom ; cette plaque a été incubée 1 heure à 37°C. Cette étape permet l'infection des bactéries par les phages. Enfin, 7 µL de chaque suspension bactérienne, contenant les TG1 infectées par les phages, ont été déposés et étalés, via inclinaison, sur une boîte de Pétri carrée contenant 50 mL de milieu LB agar supplémenté en 0,1 mg/L d'Amp et en 20 g/L de glucose. La boîte de Pétri a été incubée à 37°C O/N. L'évaluation de l'enrichissement s'effectue en comparant la densité de colonies entre les mêmes dilutions des deux suspensions. L'enrichissement est positif si le nombre de colonies provenant de la suspension + est plus important que celui de la suspension -. L'enrichissement est négatif si le nombre de colonies bactériennes provenant de la suspension + est moins important que celui de la suspension -.
- Deuxièmement, afin de réaliser le screening (qui n'est effectué que pour les dilutions de 10⁻¹ à 10⁻⁶ de suspension bactérienne qui proviennent de la suspension +), 50 µL de chaque dilution des bactéries TG1 infectées ont été étalés sur une boîte de Pétri ronde contenant 25 mL de milieu LB agar supplémenté en 0,1 mg/L d'Amp et en 20 g/L de glucose. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C O/N. Les colonies obtenues serviront à réaliser le screening.

- Troisièmement, pour l'amplification des phages pour le prochain tour de sélection (pas réalisé pour le 3^{ème} tour de sélection), le reste de la suspension + a été mélangé avec le reste de la culture des TG1. La suspension bactérienne obtenue a été incubée 1 heure à 37 °C sans agitation afin que les bactéries soient infectées par les phages. Après incubation, 12 mL de milieu 2XTY supplémentés en 0,1 mg/L d'Amp et en 10 g/L de glucose ont été ajoutés suivis d'une incubation d'1 heure à 37 °C avec agitation (180 RPM). Ensuite, 8×10^3 phages helper/mL de milieu ont été ajoutés suivis d'une incubation de 30 minutes à TA sans agitation. Les phages helper permettent la multiplication des phages (voir 1.3.2. Sélection des Nanobodies®). Après l'incubation, la culture a été centrifugée (2780 g, 15 minutes, 4°C) ; le culot a été re-suspendu avec 1 mL de milieu 2XTY supplémenté en Amp (0,1 mg/mL) et en kanamycine (Kana) (0,1 mg/mL). La résistance à la Kana est apportée par les phages helper. Enfin, le culot re-suspendu a été mis dans 150 mL de milieu 2XTY supplémenté en Amp (0,1 mg/mL) et en Kana (0,1 mg/mL) suivis d'une incubation O/N à 37 °C avec agitation (180 RPM). Durant cette étape, la suspension bactérienne va croître ainsi que la quantité de phages.

La culture a été centrifugée (14000g, 30 minutes, 4 °C) ; le surnageant, contenant les phages, a été récupéré et de la solution de PEG-NaCl 5x a été ajoutée (200 mL/L). Ensuite, après une incubation de 35 minutes sur glace, ce qui permet la précipitation des phages, une centrifugation a été réalisée (3220 g, 30 minutes, 4°C) pour faire culoter les phages. Le PEG-NaCl a pour but de faire précipiter les phages en solution en favorisant indirectement les interactions protéine-protéine et donc leur précipitation. Après la centrifugation, le culot, contenant les phages, a été re-suspendu dans 500 µL de PBS 1x. La concentration en phage de suspension obtenue a été calculée en mesurant l'absorbance (Abs) à 260 nm afin de déterminer le volume à « aliquoter » pour avoir 10^{11} phages par aliquot, car une Abs à 260 nm de 1 est équivalente à 3×10^{10} phages (déterminer expérimentalement). Ces aliquots sont stockés à -80°C et seront utilisés pour le tour de sélection suivante.

Le troisième tour de sélection contre TFIP11 est similaire aux deux premiers tours sauf que la suspension + va servir, en plus de l'estimation de l'enrichissement et du screening, à réaliser la contre sélection. Après avoir réalisé l'estimation de l'enrichissement et le screening du tour n°3, du PBS 1x a été ajouté au reste de la solution + pour obtenir un volume de 200 µL. 100 µL de cette suspension ont été mis dans le puits de contre sélection et les 100 µL restant dans le puits de contrôle, le tout suivi

d'une incubation d'une 1 heure à TA. Préalablement, les deux puits (contre sélection et négatif) ont été lavés 5 fois avec 100 µL de solution de PBS-T, neutralisés pendant 1 heure à TA avec 200 µL de tampon de blocage n°3 et enfin lavés 5 fois avec 100 µL de solution de PBS-T. Après l'incubation, les deux « flow through », les deux solutions de 100 µL qui contiennent les phages qui ne se sont pas attachés, (le « flow through » + : « flow through » à partir du puits de contre sélection ; et le « flow through » - : « flow through » à partir du puits négatif) ont été conservés. Comme pour les tours de panning précédents, 10 µL des deux « flow through » vont être utilisés pour réaliser l'estimation de l'enrichissement et le screening comme décrit précédemment.

3.3.2. Screening

Le screening a pour but de déterminer quels sont les Nanobodies® qui sont spécifiques de la protéine cible. Il est nécessaire car le panning enrichit la banque en Nbs spécifiques mais il faut déterminer ces Nbs.

Le screening a été réalisé en cinq étapes, d'abord la sélection des colonies, puis un ELISA, puis une colonie PCR (cPCR), ensuite une extraction de phagémide et enfin le séquençage.

La sélection aléatoire et le repiquage de 180 colonies : La sélection a été réalisée avec le robot MICROLAB STAR (Hamilton Company ;Reno ;USA) de la plateforme « ROBOTEIN » du CIP ou manuellement. Elle est réalisée à partir de deux boîtes de Pétri rondes, correspondant à une des dilutions de 10^{-1} à 10^{-6} de tours de panning différents, qui doivent contenir au moins 90 colonies chacune et ces colonies doivent être suffisamment isolées. Une fois les colonies sélectionnées, elles ont été prélevées et ont été mises individuellement dans 100 µL de milieu LB supplémenté en 0,1 mg/L d'Amp, en 20 g/L de glucose et en 100 mL/L de glycérol 99% dans deux plaques multi puits U-bottom. Enfin, les plaques ont été incubées O/N à 37°C puis placées à -80°C.

L'ELISA : Afin de réaliser l'ELISA, une culture de 1 mL a été réalisée à partir des 180 cultures réalisées durant la première étape du screening, dans deux plaques 96 puits de type « deepwell », contenant 20 µL de culture et 980 µL de milieu 2XTY supplémentés en 0,1 mg/L d'Amp et en 1 g/L de glucose. Les plaques ont été incubées pendant 4h à 37 °C avec agitation orbitale (500 RPM sur titramax 1000 ;Heidolph ;Schwabach ;Allemagne). Ensuite, 10 µL de solution d'IPTG ont été ajoutés dans chacun des puits, le tout suivi d'une incubation de 4h à 37 °C avec agitation orbitale (500 RPM sur titramax 1000). Ensuite, les cultures ont été centrifugées (2380 g, 15 minutes, 4 °C). Les culots ont été placés O/N à -80 °C. Enfin, les culots ont été décongelés en les plaçant 10 minutes à 37 °C avant d'être re-suspendus dans 100 µL de PBS 1x puis centrifugés (2000 g, 20 minutes, 4 °C). L'étape de

congélation/décongélation permet de lyser les cellules et donc de réaliser une extraction cytoplasmique. Les extraits obtenus vont être utilisés pour réaliser l'ELISA.

L'ELISA est une technique qui permet de détecter la présence de protéines à partir d'une solution dans un puits. La détection est réalisée avec des anticorps, ciblant la protéine, associés à une enzyme qui, après ajout du substrat, va produire un composé détectable dans le puits à une certaine vitesse. Lors d'un ELISA, c'est l'évolution des valeurs d'absorbances qui va être comparée.

Lors de l'ELISA effectuée pour le screening, les Nbs sont couplés à la protéine G3 car la production a eu lieu dans des *E. coli* TG1. De plus, les Nbs n'ont pas été purifiés donc il y a les protéines de la bactérie provenant de l'extrait cytoplasmique.

L'ELISA est réalisé en plusieurs étapes (Figure 7A à F) :

- Immobilisation (A) : 0,1 µg de protéine d'intérêt (DM2 pour le panning contre TFIP11 ou LasB pour le panning contre LasB) ont été immobilisés (par adsorption) dans un puits d'une plaque 96 puits, 96F Multisorp Straight, en présence de 100 µL de tampon d'immobilisation et placé O/N à 4°C. Un autre puits, contenant 100 µL de tampon d'immobilisation, servira de puits contrôle pour chaque clone. De plus (pour le panning contre TFIP11) 0,1 µg de la protéine KHL-αSyn ont été immobilisés dans un autre puits pour chaque clone. Ce puits servira de puits de contre sélection pour sélectionner uniquement les Nbs qui sont spécifiques du G-patch (voir 2. Objectifs du travail). En fonction du nombre de clones testés, une ou plusieurs plaques peuvent être réalisées. (Figure A 2)
- Les plaques ont été lavées 5 fois avec 300 µL de la solution de PBS-T.
- Neutralisation (B) : 200 µL de la solution de tampon de blocage n°4 ont été ajoutés dans chaque puits le tout suivi d'une incubation de minimum 45 minutes à TA (Figure 7B).
- Les puits ont ensuite été lavées 5 fois avec 300 µL de la solution de PBS-T.
- Nbs (C) : 80 µL de PBS 1x ont ensuite été ajoutés dans chaque puits ainsi que 20 µL d'extrait cytoplasmique de la culture de 1 mL (Figure 7C). Pour l'ELISA contre TFIP11, le même surnageant (provenant de la même culture 1 mL) a été placé dans 3 puits : un puits contenant la protéine DM2, un puits contenant la protéine KHL-αSyn et un puits contrôle. Pour l'ELISA contre LasB, le même extrait cytoplasmique (provenant de la même culture 1 mL) a été placé dans 2 puits : un puits contenant la protéine LasB et dans un puits contrôle.

- Après 1 heure d'incubation à TA, les plaques ont été lavées 10 fois avec 300 μ L de la solution de PBS-T.
- Anticorps primaire (D) : 100 μ L de la solution d'anticorps primaire n°1 (mouse antiHA-tag) ont été ajoutés dans chaque puits, le tout suivi d'une incubation d'1 heure à TA (Figure 7D).
- Les plaques ont été lavées 10 fois avec 300 μ L de la solution de PBS-T.
- Anticorps secondaire (E) : 100 μ L de la solution d'anticorps secondaire (antimouse conjugué avec la phosphatase alcaline) ont été ajoutés dans chaque puits, le tout suivi d'une incubation d'1 heure à TA (Figure 7E).
- Les plaques ont été lavées 10 fois avec 300 μ L de la solution de PBS-T et 100 μ L de PBS 1x ont été ajoutés dans chaque puits.
- Substrat (F) : la solution du réactif ELISA (tampon AP + pNPP) a été réalisée puis, rapidement, les 100 μ L de PBS des plaques ont été enlevés et 100 μ L de la solution de réactif ELISA ont été ajoutés (Figure 7F).
- L'Abs a été mesurée à 405 nm après 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 et 240 minutes et O/N pour l'ELISA contre TFIP11 et après 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 et 180 minutes et O/N pour l'ELISA contre LasB. L'Abs a été mesurée sur le lecteur de plaque SpectraMaxM2^e (Molecular Devices ;San José ;USA) avec le logiciel Soft Max Pro (version : 7.0.2).
- Les clones spécifiques ont été déterminés via l'analyse des résultats de l'ELISA. Cette analyse a été effectuée via la comparaison des ratios d'Abs entre les puits des clones et les puits contrôles.

Les clones positifs ont ensuite été mis en culture, à partir des cultures réalisées lors de la première étape du screening, sur une boîte de Pétri dans du milieu LB + agar supplémenté en 0,1 mg/L d'Amp et en 20 g/L de glucose. La boîte a été ensuite incubée O/N à 37 °C puis conservée à 4°C.

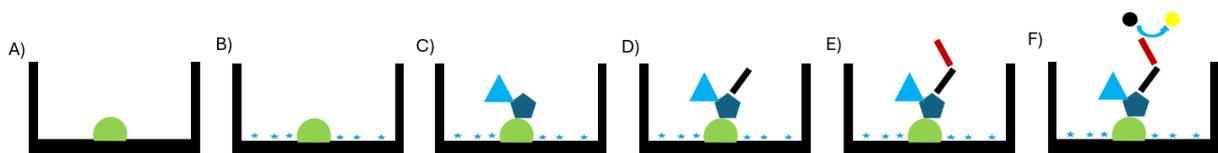


Figure 7 : Représentations schématiques des étapes lors d'un ELISA dans un puits positif. A) Immobilisation de la cible, B) Neutralisation du puits avec le tampon de blocage, C) Ajout du Nb, D) Ajout de l'anticorps primaire, E) Ajout de l'anticorps secondaire conjugué avec la phosphatase alcaline, F) Ajout du substrat. Boule verte : protéine cible, Etoiles bleues : protéine de blocage, Pentagone + triangle bleu : Nb + protéine G3, Rectangle noir : anticorps primaire, Rectangle rouge : anticorps secondaire, Boule noir/jaune : substrat/produit. Pour les puits négatifs, seule l'étape A (immobilisation de la cible) n'est pas réalisée.

PCR sur colonies (cPCR) : La cPCR, a été réalisée sur une colonie pour chacun des clones positifs. Pour la cPCR, un mix de 25 μ L par échantillon, contenant du Q5 Master Mix 1x (BioLabs ;Paris ;France), l'amorce MP57 (0,5 mM) (Tableau A 1), l'amorce G3 (0,5 mM) (Tableau A 1) a été ajouté à une petite quantité de bactéries provenant d'une colonie sélectionnée. Les colonies sélectionnées ont été également mises en culture sur boîte de Pétri, appelée boîte mémoire, dans du milieu LB + agar supplémenté en 0,1 mg/L d'Amp et en 20 g/L de glucose et ont été incubées O/N à 37 °C. Pour réaliser la cPCR, les échantillons ont été soumis au programme repris dans le Tableau A 2 dans la machine T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad ;Hercule ;USA). Le produit de la PCR supplémenté en mauve de chargement 1x (BioLabs) a été déposé dans les puits d'un gel d'agarose contenant du tampon TAE 1x, 10 g/L d'agarose et 0,1 μ g/mL de bromure d'éthidium. Le gel a été placé dans un bain de tampon TAE 1x auquel une différence de potentiel de 100V a été appliquée, voltage constant pendant 30 minutes. Cette étape permet de savoir si le phagémide comporte bien une séquence correspondant à la taille de l'insert, soit \pm 700 pb. A chaque PCR, un blanc est réalisé contenant le mix PCR sans bactérie.

Extraction du phagémide: Avec les clones présentant une bande à \pm 700 pb lors de la cPCR, une extraction du phagémide (pMECS) a été réalisée via le kit d'extraction Plasmid Easy Pure, NucleoSpin® (Macherey-Nagel ;Düren ;Allemagne). Pour ce faire, les colonies, provenant de la boîte mémoire, ont été mises en culture dans 5 mL de milieu LB + Amp (0,1 mg/mL) et ont été incubées O/N à 37°C avec agitation. Après incubation, les cultures ont été centrifugées (3232g, 6°C, 7 minutes) puis, les phagémides ont été extraits des culots en suivant les étapes du kit. Enfin, la concentration en ADN des échantillons ainsi que la pureté en ADN ont été mesurées par Abs en utilisant le NanoDrop™ One (Thermo Fisher SCIENTIFIC ; Waltham ;USA).

Séquençage : Le séquençage du gène des Nanobodies® dans le phagémide pMECS, a été réalisé à partir d'un mix de 10 μ L par échantillon, contenant 500 ng d'ADN et l'amorce MP57 (2,5 mM) (Tableau A 1). Le séquençage est réalisé par l'entreprise Eurofins (Luxembourg) et les résultats sont analysés via le logiciel « SnapGene Viewer » (protocole séquençage). Les séquences correctes obtenues vont être regroupées en famille si le CDR3 est identique et, au sein des familles, en cluster si la séquence complète du Nb est identique.

3.3.4. Transformation par choc thermique d'*E. coli* WK6

Tout d'abord, pour réaliser la transformation par choc thermique des cellules WK6, les bactéries doivent être rendues compétentes. Pour ce faire, une colonie de WK6 a été mise en culture dans 10 mL de milieu LB qui ont été incubées O/N à 37°C avec agitation orbitale (180 RPM). Après incubation, 300 mL de milieu LB ont été ajoutés à cette culture de 10 mL et l'ensemble a été incubé, à 37°C avec agitation orbitale (180 RPM), jusqu'à obtenir une absorbance à 600nm (DO_{600}) comprise entre 0,7 et 0,8. Ensuite, la culture a été centrifugée (3232 g, 10 minutes, 4 °C). Le culot a été re-suspendu dans 60 mL de $CaCl_2$ 50 mM et a été placé sur glace pendant 2 heures. Par la suite, la suspension a été centrifugée (2356g, 10 minutes, 4 °C). Le culot a été re-suspendu dans 4,5 mL de $CaCl_2$ 100 mM et 4,5 mL de solution de glycérol 40 % ont été ajoutés. Après cela, la suspension a été aliquotée et conservée à -80 °C.

Par la suite, pour vérifier la compétence des bactéries WK6, une transformation thermique « test » a été réalisée. Pour ce faire, 300 ng d'ADN du phagémide pMECS « vide » (sans séquence d'insertion) ont été ajoutés à 50 μ L de WK6 compétentes. L'ensemble a été placé 20 minutes sur glace puis 1 minute à 42 °C. Après ce choc thermique, les WK6 ont été placées 5 minutes sur glace. Par la suite, 200 μ L de milieu SOC ont été ajoutés et les suspensions ont été incubées pendant 90 minutes à 37 °C avec agitation orbitale (180 RPM). La suspension obtenue a été diluée 4 fois par un facteur 10 dans du milieu LB. Pour finir, 100 μ L de la suspension non diluée et les 4 dilutions ont été étalées sur des boîtes de Pétri (1 boîte par dilution) contenant du milieu LB + agar supplémenté avec 0,1 mg/L d'Amp et 20 g/L de glucose, le tout suivi d'une incubation O/N à 37 °C. Après l'incubation, 2 colonies, sur l'une des boîtes de Pétri, ont été prélevées et ont été mises en culture dans 5 mL de milieu LB supplémenté en Amp (0,1 mg/mL) et ont été incubées O/N à 37°C avec agitation. Ensuite, les cultures ont été centrifugées (3232g, 6°C, 7 minutes) puis une purification du phagémide, à partir du culot, a été réalisée via le kit d'extraction Plasmid Easy Pure, NucleoSpin®. La concentration en ADN des échantillons de phagémides ainsi que la pureté en ADN ont été ensuite mesurées par Abs en utilisant le NanoDrop™ One. Enfin, un séquençage a été réalisé (voir protocole séquençage). Une fois analysée, si la séquence correspond à celle attendue (phagémide pMECS « vide », sans séquence d'insertion), les bactéries sont considérées compétentes pour la transformation thermique.

Via les WK6 compétentes, la transformation par choc thermique peut être effectuée avec les phagémides d'intérêt (Figure 6B). 450 ng d'ADN de phagémide ont été utilisés pour la transformation. Une fois l'incubation de 90 minutes à 37°C avec agitation orbitale (180 RPM) terminée, 75 μ L de la suspension obtenue ont été étalées sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB + agar supplémenté avec 0,1 mg/L d'Amp et 20 g/L de glucose, le tout suivi d'une incubation O/N à 37 °C. Après incubation,

1 colonie a été prélevée et a été mise en culture dans 10 mL de milieu LB supplémenté en Amp (0,1 mg/mL) et a été incubée O/N à 37°C avec agitation. Ensuite, après incubation, la culture a été divisée en 2 cultures de 5 mL.

- Pour la première, la culture a été centrifugée (3232g, 6°C, 7 minutes) puis comme pour la transformation « test », le phagémide a été extrait du culot et le site d'insertion a été séquencé.
- Pour la seconde, la culture a été centrifugée (3232g, 6°C, 7 minutes) puis, le culot a été re-suspendu dans 3 mL de milieu LB supplémenté en glycérol (10 %) puis 3 aliquots de 1 mL ont été réalisés et ont été placés à - 80°C. Ces aliquots, de WK6 transformées avec le phagémide contenant la séquence du Nb d'intérêt, serviront pour réaliser la production.

3.4. Production des Nanobodies® et extraction périplasmique des Nanobodies®

Pour réaliser la production, une préculture a été réalisée, contenant du milieu LB supplémenté avec 0,1 mg/L d'Amp et 20 g/L de glucose, d'un volume compris entre 15 et 20 mL par litre de culture. Dix µL d'un aliquot de WK6 transformées ont été ajoutés au milieu, le tout suivi d'une incubation O/N à 37°C avec agitation orbitale (180 RPM). Après incubation, la préculture a été ajoutée au milieu TB supplémenté avec la solution TB-salt 10x (110 mL par litre de TB), 0,1 mg/L d'Amp et 1 g/L de glucose. La culture a été ensuite incubée à 37°C avec agitation orbitale (180 RPM). Une fois que la DO_{600} a atteint 2, la production des Nbs est induite grâce à l'addition de la solution IPTG 100 mM (10 mL/L), le tout suivi d'une incubation O/N à 28°C avec agitation orbitale (180 RPM).

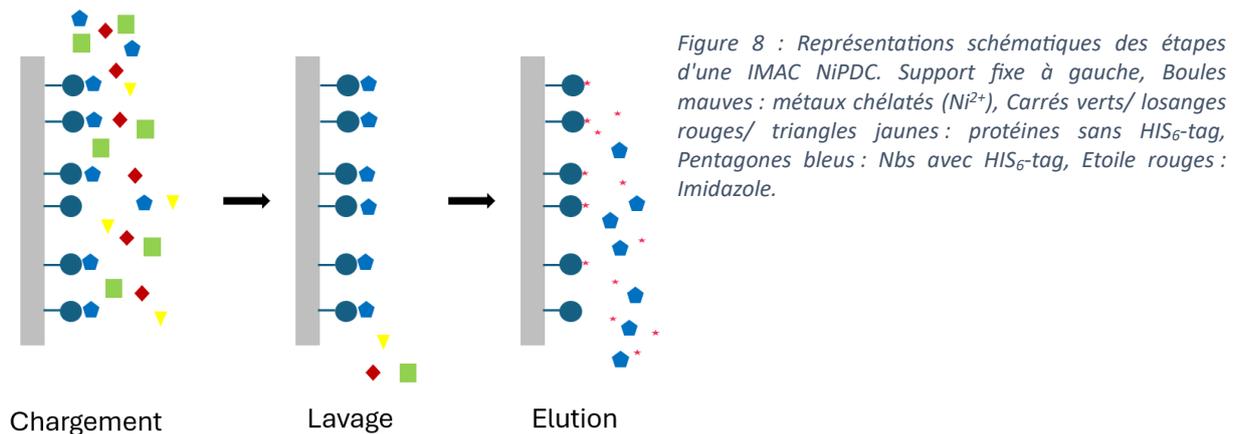
Le lendemain, la culture a été centrifugée (14000g, 4 minutes, 4°C). Le culot a été re-suspendu dans de la solution de TES (10 mL de TES par litre de culture); ensuite, le tout a été placé à 4°C avec agitation pendant 45 minutes. Par la suite, de la solution de TES ¼ (20 mL de TES ¼ par litre de culture) a été ajoutée, le tout suivi d'une incubation à 4°C avec agitation pendant 90 minutes. Après incubation, une centrifugation a été réalisée (14000g, 30 minutes, 4°C). Le surnageant, extrait périplasmique (EP) a été récupéré et sera utilisé pour les étapes de purification.

3.5. Purification des Nanobodies®

Pour la purification, une chromatographie au nickel, chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) NiPDC puis une chromatographie par exclusion de taille (CET) ont été réalisées.

3.5.1. Purification IMAC

L'IMAC est une technique de chromatographie qui est basée sur l'interaction entre un métal chélaté (Ni^{2+}) sur un support fixe (résine) et des histidines. Les protéines contenant un His_6 -tag vont interagir avec les métaux contrairement aux protéines sans His_6 -tag qui ne vont pas être retenues. L'éluion des protéines retenues se réalise via ajout d'imidazole qui va remplacer les histidines dans leurs interactions avec le métal et donc éluer la protéine (Figure 8). Après cela, l'imidazole doit être enlevé car, à concentration élevée, il peut induire la dénaturation/précipitation des protéines.



Une IMAC NiPDC sur colonne NiPDC (Affiland ;Liège ;Belgique), de 5 mL avec un flux de 2 mL/min et une pression maximale de 0,3 MPa, a été effectuée avec l'EP. Pour ce faire, l'EP a été filtré (membrane avec une porosité de 0,45 μm) puis chargé sur la colonne préalablement lavée avec 25 de solution de TES ¼. Ensuite, une chromatographie a été réalisée selon le programme suivant (Tableau 1) en utilisant la machine NGC chromatography system (Bio-Rad) de la plateforme « Protein factory » du CIP. Par la suite, un SDS-PAGE (Mini-PROTEAN™ TGX GEL, Bio-Rad) a été réalisé avec les fractions obtenues (le PE, le « lavage », le « flow through » et les fractions contenant la protéine visualisée par la variation de l'Abs à 280 nm sur le chromatogramme). Pour ce faire, 4 μL de tampon de chargement 4x ont été ajoutés à 12 μL d'échantillon et le tout a été incubé 5 minutes à 95°C. Par la suite, 15 μL de ce mix ont été chargés sur le SDS-PAGE. Le gel a été placé dans un bain de tampon TGS auquel une différence de potentiel de 120V a été appliquée, voltage constant pendant 45 minutes. Une fois la migration finie, le gel a été placé dans un bain de bleu de Coomassie pendant 45 minutes puis décoloré

dans un bain de solution de décolorant 3 fois 20 minutes. Le SDS-PAGE a été imagé sur Gel Doc™ EZ imager (Bio-Rad) avec le logiciel Image Lab (version : 5.0) (protocole SDS-PAGE).

Etapes	Solutions utilisées	Volumes (mL)	Volumes des fractions collectées (mL)
Lavage	TES 1/4	25	/
Chargement	EP	X	5
Lavage	Tampon KP pH8	25	5
Elution 1	Tampon d'élution 70%	15	1
Elution 2	Tampon d'élution 100%	10	1

Tableau 1 : Programme de chromatographie IMAC/NiPDC. Tampon d'élution composé d'imidazole 0,5 M

3.5.2. Purification CET

Une CET a été effectuée avec les fractions contenant la protéine d'intérêt (déterminées avec le chromatogramme et le SDS-PAGE). La CET a été réalisée sur une colonne sephadex G025 HiTrap 5 mL (VWR), avec un flux de 15 mL/min et une pression maximale de 0,3 MPa, en utilisant la machine NGC chromatography system (Bio-Rad) de la plateforme « Protein factory » du CIP. La CET a pour but de séparer, via leur différence de taille, la protéine de l'imidazole. Plus la molécule est petite, plus longtemps elle restera dans la colonne et inversement (Figure 9). De plus, durant la CET, le tampon a été changé (du tampon KP pH8 au tampon KP pH7). Pour ce faire, les fractions ont été rassemblées puis chargées sur la colonne via une boucle, préalablement lavée avec 15 de tampon KP pH7. Après la chromatographie, un SDS-PAGE a été réalisé avec les fractions contenant la protéine sans imidazole (déterminées par la variation de l'Abs à 280 nm et de la conductivité sur le chromatogramme) (voir protocole SDS-PAGE). Enfin, les fractions contenant la protéine ont été rassemblées, et, via une mesure de l'Abs à 280 nm, au spectromètre SPECORD 200 (analytik Jena ;Léna ;Allemagne), la concentration et la quantité de protéines ont été déterminées.

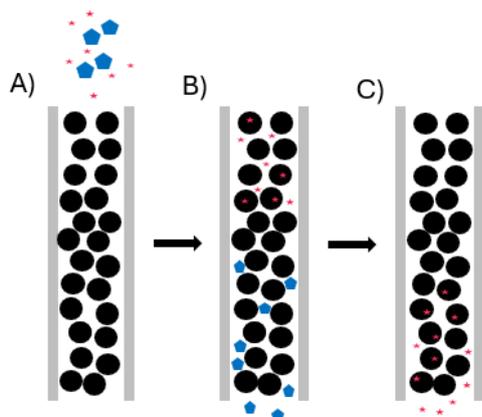


Figure 9 : Représentations schématiques des étapes d'une CET. A) Chargement de 2 composés (protéine et imidazole), B) Elution de la protéine, C) Elution de l'imidazole. Pentagones bleus : Nbs, Etoiles rouges : Imidazole.

3.6. Caractérisation des Nanobodies®

3.6.1. ELISA

L'ELISA pour caractériser des Nbs est fort similaire à celui effectué lors du screening (Figure 7A à Figure 7) hormis quelques étapes :

- Les Nbs ne sont plus couplés à la protéine G3 car la production a eu lieu dans des *E. coli* WK6 (3.2.3. Souches d'*E. coli*). De plus, les Nbs ont été purifiés donc il n'y a plus de protéines de la bactérie provenant de l'extrait cytoplasmique.
- Au lieu de 0,1 µg de protéines immobilisées, 1 µg de protéines DM2 et KHL-αSyn pour les Nbs spécifiques de DM2 ont été immobilisés.
- Au lieu de l'extrait cytoplasmique, les Nbs ont été ajoutés dans chaque puits à une concentration définie pour un volume de 100 µL. Chaque concentration a été placée dans 3 puits pour les Nbs spécifiques de DM2 : un puits contenant la protéine DM2, un puits contenant la protéine KHL-αSyn et un puits contrôle. Chaque concentration a été placée dans 2 puits pour les Nbs spécifiques de LasB : un puits contenant la protéine LasB et un puits contrôle.
- L'Abs a été mesurée à 405 nm chaque minute durant minimum 1 heure sur le lecteur de plaque SpectraMaxM2^e avec le logiciel Soft Max Pro.

Enfin, la vitesse initiale a été calculée en soustrayant l'Abs à t₀ de l'Abs à t₁, le tout divisé par le temps (t₁) (Équation 1). Le temps est déterminé afin de ne prendre que la phase linéaire.

$$\frac{Abs_{t1} - Abs_{t0}}{t1} = V_0$$

Équation 1 : Calcul de la vitesse initiale (V₀).

Cette vitesse (V₀) est proportionnelle aux nombres de phosphatase alcaline et donc plus cette vitesse est importante, plus le nombre d'enzymes est présente. Ce qui implique que le nombre d'anticorps primaires l'est aussi et donc aussi les Nbs, et par conséquent que soit ce Nb a plus d'affinité pour la cible soit ce Nb a été produit en grande quantité.

3.6.2. Bio-layer interferometry (BLI)

Le BLI est une technique qui permet d'analyser les interactions moléculaires en temps réel (mesure de cinétique). Les interactions sont déterminées via la différence de déphasage de deux faisceaux lumineux, l'un de référence et l'autre d'analyse, due à une modification de la surface de la sonde. S'il y a une interaction, il va y avoir un déphasage de la longueur d'onde et donc une variation de la réponse (Figure 10 1 et 2).

Pour réaliser le BLI, la sonde « HIS1K Biosensors » (Sartorius) a été utilisée, cette sonde lie les HIS₆-tag via des anticorps anti HIS-tag et a été préalablement hydratée dans du tampon KB pendant 5 minutes avant utilisation. Les expériences de BLI ont été réalisées avec l'Octet HTX (Sartorius).

Les expériences BLI comprennent plusieurs étapes (Figure 10 1A à E) :

- Lavage n°1/ligne de base (A) : les sondes ont été plongées dans du tampon KB pendant 3 minutes.
- Immobilisation (B): les sondes ont été plongées dans le puits contenant les Nanobodies® (ligand) pendant 3 minutes 20 secondes. La concentration en Nanobodies® utilisée est comprise entre 10 µg/mL et 20 µg/mL.
- Lavage n°2 (C): les sondes ont été plongées dans du tampon KB pour y être lavées pendant 30 secondes.
- Association (D) : les sondes ont été plongées dans la solution contenant la protéine d'intérêt (analyte) pendant 5 minutes. La concentration en DM2 et KHL- α Syn utilisée est de 500 nM. La concentration en LasB utilisée est de 10 nM ou 1µM.
- Dissociation (E) : les sondes ont été plongées dans du tampon KB pendant 10 minutes.

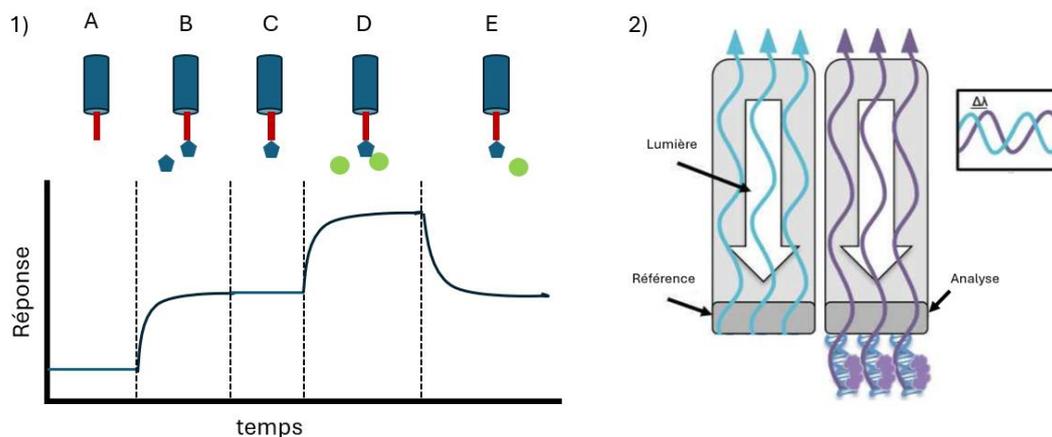


Figure 10 : 1) Représentation schématique d'une expérience de BLI et représentation de la réponse des étapes sur un sensorgramme. A) Lavage n°1/ ligne de base, B) Immobilisation du ligand, C) Lavage n°2, D) Association avec l'analyte, E) Dissociation. Cylindre mauve : sonde, Rectangle rouge : anticorps antiHIS-tag, Pentagones bleus : Nbs avec HIS₆-tag, Boules vertes : protéines cibles. 2) Représentation schématique du déphasage lors d'une expérience de BLI. Figure 2 modifiée de protocole.io.

3.7. Western Blot (WB)

Le WB est une technique qui permet de détecter la présence de protéines à partir d'une solution. Les protéines sont d'abord séparées par électrophorèse (SDS-PAGE) puis transférées sur une membrane, Amersham™ Hybond™ (GE Healthcare ;Chicago ;USA). La présence de la protéine d'intérêt est détectée avec des anticorps spécifiques couplés à une enzyme (phosphatase alcaline) qui va activer un substrat (Figure A 3), qui va, par la suite, précipiter sur la membrane à l'endroit où se situe la cible.

Le Western Blot (WB) est réalisé en plusieurs étapes (Figure 11A à E) :

- Séparation des protéines : un SDS-PAGE a été réalisé avec les échantillons d'intérêt (voir protocole SDS-PAGE).
- Transfert (A) : les protéines sur le SDS-PAGE ont été transférées sur une membrane Amersham™ Hybond™ à 25 volts pendant 30 minutes. La membrane a été préalablement hydratée dans du méthanol. Le transfert a été réalisé en utilisant la machine Trans-Blot Turbo transfert system (Bio-Rad) dans du tampon de transfert.
- La membrane a été lavée 3 fois 5 minutes avec \pm 10 mL de la solution de PBS-T.
- Neutralisation (B) : 10 ml de la solution de tampon de blocage n°4 ont été ajoutés sur la membrane, suivis d'une incubation d'1 heure à TA avec agitation.
- La membrane a été lavée 3 fois 5 minutes avec \pm 10 mL de la solution de PBS-T.
- Anticorps primaire (C) : 10 mL de la solution d'anticorps primaire n°1 (mouse antiHA-tag) ou n°2 (mouse antiHIS-tag) ou n°3 (antiNb domaine conjugué avec l'alcaline Phosphatase) ont été ajoutés sur la membrane, le tout suivi d'une incubation d'1 heure à TA avec agitation.
- La membrane a été lavée 3 fois 5 minutes avec \pm 10 mL de la solution de PBS-T.
- Anticorps secondaire (D) : si le WB nécessite un anticorps secondaire, 10 mL de la solution d'anticorps secondaire (anti-mouse conjugué avec l'alcaline Phosphatase) ont été ajoutés sur la membrane, suivis d'une incubation d'1 heure à TA avec agitation.
- La membrane a été lavée 3 fois 5 minutes avec \pm 10 mL de la solution de PBS-T.
- Substrat (E) : la solution du réactif WB (tampon AP + BCIP + NBT) a été réalisée puis, \pm 3 mL ont été ajoutés sur la membrane.
- Après 5 minutes, la réaction a été arrêtée via ajout d'eau.

- La membrane a été imagée sur Gel Doc™ EZ imager (Bio-Rad).



Figure 11 : Représentations schématiques des étapes lors d'un WB sur la membrane. A) Nb sur la membrane, B) Neutralisation de la membrane avec le tampon de blocage, C) Ajout de l'anticorps primaire, D) Ajout de l'anticorps secondaire, E) Ajout du substrat. Pentagone bleu : Nb, Etoiles bleues : protéines de blocage, Rectangle noir : anticorps primaire, Rectangle rouge : anticorps secondaire, Boule noir/bleu : substrat/produit.

3.8. Test d'activité de LasB

Afin de savoir si LasB est actif ou non lorsqu'elle est immobilisée, un test d'activité a été réalisé, le test est réalisé en plusieurs étapes :

- Immobilisation : 1 µg de protéine LasB ont été immobilisés (par adsorption) dans un puits d'une plaque 96 puits, 96F Multisorp Straight, en présence de 100 µL de tampon d'immobilisation et placé O/N à 4°C. Un autre puits, contenant 1 µg de protéine LasB et du phosphoramidon (ratio molaire de phosphoramidon : LasB de 600:1) en présence de 100 µL de tampon d'immobilisation. Un dernier puits, contenant la même quantité de phosphoramidon en présence de 100 µL servira de puits contrôle.
- Les plaques ont été lavées 5 fois avec 300 µL de la solution de PBS-T.
- Neutralisation : 200 µL de la solution de tampon de blocage n°4 ont été ajoutés dans chaque puits, le tout suivi d'une incubation de minimum 1 heure à TA.
- Les puits ont ensuite été lavées 5 fois avec 300 µL de la solution de PBS-T.
- Substrat : 100 µL de la solution du réactif LasB ont été ajoutés.
- La fluorescence a été mesurée à 415 nm (excitation à 340 nm), à 30 °C, toutes les 30 secondes durant 30 minutes sur le lecteur de plaque SpectraMaxM2^e avec le logiciel Soft Max Pro.

4. Résultats

4.1. Sélection et caractérisation des Nbs contre TFIP11

4.1.1. Panning contre DM2

Le panning dirigé contre DM2 (DM2 est composée de la protéine KHL couplé au peptide d'intérêt de TFIP11) a été réalisé en 3 tours d'enrichissement suivis d'un tour de contre sélection. La contre sélection a été réalisée afin de sélectionner uniquement les Nbs dirigés contre le G-Patch de TFIP11 car l'immunisation ainsi que les 3 tours de panning ont été réalisées avec la protéine DM2 donc les Nbs ciblant la KHL ont été enrichis aussi. La banque initiale de phages utilisée est « Joe 3 » (3.2.2. Banques de phages). Pour chaque tour, deux puits d'une plaque « 96F Multisorp », l'un contenant la protéine d'intérêt (puits +) l'autre ne contenant pas la protéine d'intérêt (puits -) sont utilisés. De plus, à chaque tour une évaluation de l'enrichissement a été réalisée. Pour évaluer l'enrichissement, la densité de colonies bactériennes entre la suspension + provenant de la suspension de phages élués du puits contenant la protéine d'intérêt et la suspension - provenant de la suspension de phages élués du puits ne contenant pas de protéine d'intérêt, est comparée. Il s'agit d'une méthode indirecte pour savoir si la sélection des Nanobodies® contre la protéine cible a bien fonctionné. Cependant, il s'agit juste d'une indication. L'enrichissement est positif si le nombre de colonies provenant de la suspension + est plus important que celui de la suspension -. L'enrichissement est négatif si le nombre de colonies bactériennes provenant de la suspension + est moins important que celui de la suspension -.

Pour le 1^{er} tour, (Figure 12A) un enrichissement positif d'un facteur 10 est observé de même que pour le 2^{ème} tour (Figure 12B). Cependant, pour le 3^{ème} tour (Figure 12C) ainsi que pour l'enrichissement de la contre sélection (Figure 12D), il n'y a ni enrichissement positif ni négatif. Pour les deux premiers tours, le résultat est cohérent car lors d'un tour classique, on s'attend à de l'enrichissement positif. Pour le 3^{ème} tour, il n'y a pas eu d'enrichissement, on s'attendrait à de l'enrichissement positif. Pour la contre sélection, il n'y a pas eu d'enrichissement, on s'attendrait, inversement à un tour classique, à un enrichissement négatif. Ce qui suggère que très peu de Nbs sont spécifiques du G-Patch. Notons cependant que des Nbs ont déjà été sélectionnés contre plusieurs cibles alors qu'aucun enrichissement n'avait été observé lors du panning par phage display.

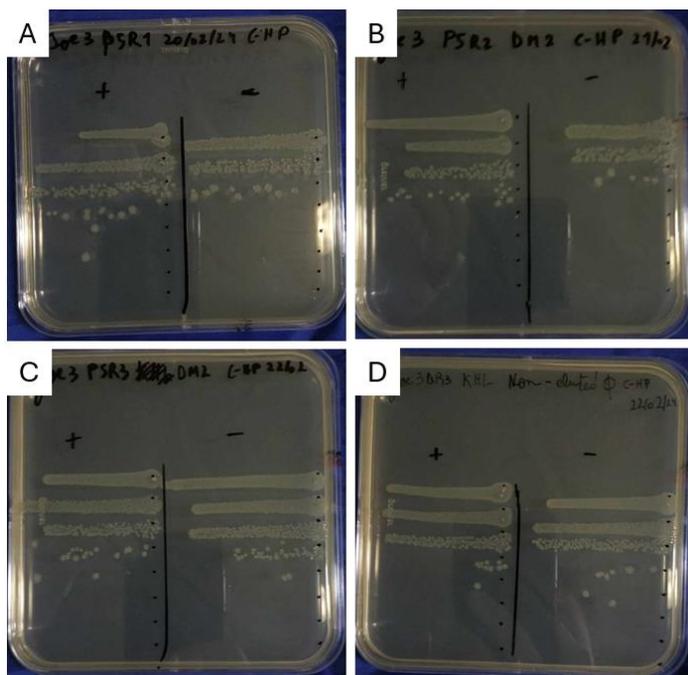


Figure 12 : Boîtes de Pétri pour réaliser l'évaluation de l'enrichissement des clones contre TFIP11. A) 1^{er} tour, B) 2^{ème} tour, C) 3^{ème} tour, D) tour de contre sélection. + : suspension +, - suspension -. Haut en bas : dilution 10^{-1} à 10^{-6} .

4.1.2. Screening contre DM2

La sélection aléatoire de 180 colonies a été effectuée sur deux boîtes de Pétri : 90 colonies sur la boîte dilution 10^{-3} du troisième tour de panning (Figure 13A) et 90 colonies sur la boîte dilution 10^{-3} de la contre sélection (Figure 13B).

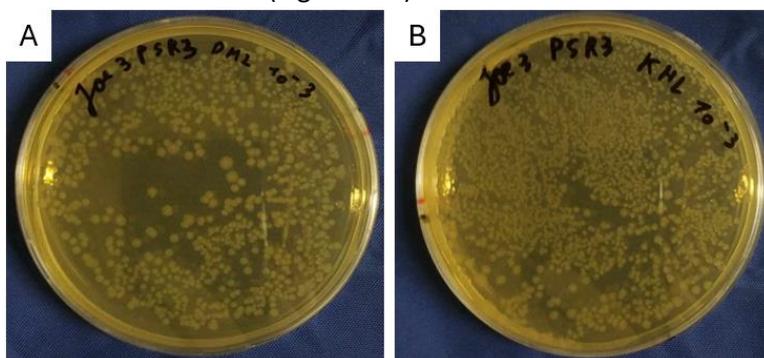


Figure 13 : Boîtes de Pétri utilisées pour le screening. A) 3^{ème} tour dilution 10^{-3} , B) tour de contre sélection dilution 10^{-3} .

Pour la réalisation de l'ELISA, une petite quantité de Nbs a été produit par clone, dans des *E. coli* TG1, qui ont été extraits par congélation-décongélation (extraction cytoplasmique). De plus, trois puits d'une plaque 96 puits, 96F Multisorp Straight, ont été utilisés par clone : l'un contenant 0,1 μ g de DM2 (puits +), l'un contenant 0,1 μ g de KHL- α Syn (puits 0) et le dernier ne contenant pas de protéine (puits -) (Figure A 2). Ensuite, après avoir bloqué la surface des puits avec un tampon de blocage, l'extrait cytoplasmique puis l'anticorps primaire ensuite l'anticorps secondaire et enfin le substrat ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 405 nm à différents temps. Pour déterminer quels sont les clones spécifiques à DM2, quatre tests ont été réalisés sur chaque clone à des temps respectifs, par rapport aux contrôles ne contenant pas d'extrait cytoplasmique, donnant ainsi leur profil de positivité :

- Absorbance 0 (A) : l’Abs du puits - doit être inférieure à la moyenne plus 3 fois l’écart-type de l’Abs des puits - des 6 contrôles (exemple de test :Figure A 1). Ce test permet d’éliminer les clones qui montreraient une trop grande réactivité dans le puits -. Ce qui indiquerait que le Nb est non spécifique.
- Ratio +/- (B) : le rapport d’Abs du puits + sur celle du puits - doit être supérieur à la moyenne plus 3 fois l’écart-type des rapports d’Abs du puits + sur celle du puits - des 6 contrôles. Ce test permet de sélectionner les clones qui sont spécifiques de la protéine DM2.
- Ratio 0/- (C) : le rapport d’Abs du puits 0 sur celle du puits - doit être inférieur à la moyenne plus 3 fois l’écart-type des rapports d’Abs du puits 0 sur celle du puits - des 6 contrôles. Ce test permet d’éliminer les clones qui seraient spécifiques de la KHL- α Syn.
- Ratio +/0 (D) : le rapport d’Abs du puits + sur celle du puits 0 doit être supérieur à la moyenne plus 3 fois l’écart-type des rapports d’Abs du puits + sur celle du puits 0 des 6 contrôles. Ce test permet de sélectionner les clones qui sont spécifiques du peptide de TFIP11.

Huit clones (Nb D102, D104, D108, D116, D130, D201, D202 et le D206) sont au moins une fois positifs pour les 4 tests à un temps donné suggérant qu’ils sont spécifiques de DM2 (Tableau 2).

temps (min)	102				104				108				116				130				201				202				206							
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D				
5	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
20	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
40	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
60	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
120	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
240	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
ON	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1				
	4				1				6				6				8				2				1				1							

Tableau 2 : Profil de positivité des clones. En haut : n° du clones. A) Abs 0, B) ratio +/-, C) ratio 0/-, D) ratio +/-0. Case verte avec un « 1 » : significatif au test, Case rouge avec un « 0 » : non-significatif au test. En bas : nombre de fois où le clone est positif aux 4 tests pour le même temps. ON : toute la nuit.

Une PCR sur colonies a été réalisée sur ces 8 clones afin de vérifier que le phagémide comporte la séquence d’un Nanobody® correspondant à la taille attendue, soit \pm 700 pb. La PCR réalisée avec le couple d’amorces MP57 et G3 (Tableau A 1) ce qui permet d’amplifier le site d’insertion du phagémide ainsi que le PelB et les deux tags.

Les produits de la cPCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 14), une bande, à ± 700 pb, qui est présente pour tous les clones. Donc tous les clones possèdent une séquence dans le site d'insertion du phagémide correspondant à la taille attendue de la région amplifiée.

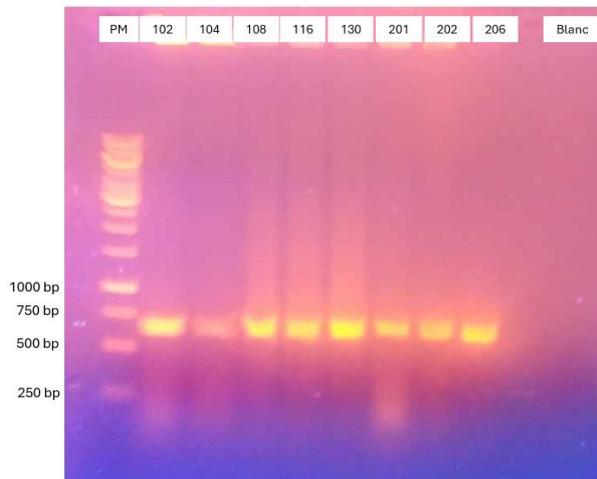


Figure 14 : Gel d'électrophorèse réalisé avec le produit de la cPCR. PM = poids moléculaire. Blanc : mix PCR sans bactérie.

Le phagémide des 8 clones a été purifié et séquencé (Tableau 3).

Nb	Séquences	Familles	clusters	Séquences CDR3
D102	Non correcte	/	/	/
D104	Correcte	1	A	NYRDSGYVAS
D108	Correcte	1	A	NYRDSGYVAS
D116	Correcte	1	A	NYRDSGYVAS
D130	Correcte	1	B	NYRDSGYVAS
D201	Correcte	2	A	AASTRYYGGGFASRYDY
D202	Correcte	3	A	AASTRYYGGGFASRYEY
D206	Correcte	4	A	RTIQAGRDY

Tableau 3 : Résultats du séquençage des Nbs. Familles : même CDR3, Clusters : même séquence. Séquences : correct = PelB-Nb-HAtag-HIStag-stop(TGA), non correct = stop codon dans la séquence.

Sur les 8 clones, 7 présentent un chromatographe de séquençage de bonne qualité avec une séquence correcte (Figure 6B). Le clone D102 possède un codon stop au sein de sa séquence. Les 7 autres clones sont regroupés en 4 familles (Nbs qui ont le même CDR3) (Tableau 3).

La différence entre la séquence du Nb du cluster A et B est due à un acide aminé en position 109 : une glycine pour le cluster A et une sérine pour le cluster B.

Ces résultats suggèrent que le Nb de famille n°1 cluster A est le plus spécifique de DM2 car il possède le plus de clones et donc a été préférentiellement sélectionné durant les tours panning.

4.1.3. Production et purification du Nb D108

Pour sélectionner les Nbs à produire, le profil de positivité (Tableau 2) ainsi que la séquence du Nb ont été analysés. Après analyse, le Nb D108 a été produit dans *E. coli* WK6. Il a été produit car il fait partie du cluster A de la famille n°1 qui compte le plus de représentants. De plus, il a un profil de positivité très élevé (6 fois positif sur 9).

La production a été réalisée dans un volume de culture de 2 litres de milieu TB suivant les mêmes étapes que la production test des Nbs contre DM2.

L'IMAC sur colonne NiPDC (Affiland) a été réalisée sur l'EP (i.e. 60 mL) qui a été extrait par choc osmotique (extraction périplasmique) puis filtré (membrane avec une porosité de 0,45 µm) puis chargé sur la colonne. Ensuite, la chromatographie a été réalisée selon le programme repris sur le Tableau 1. Le chromatogramme obtenu est repris sur la Figure 15.

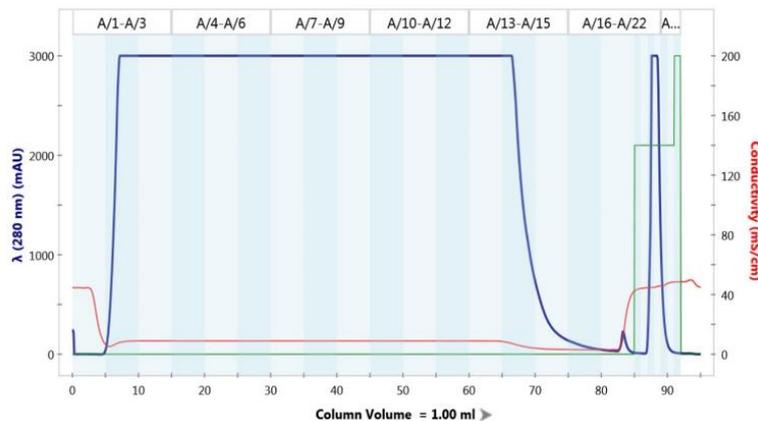


Figure 15 : Chromatogramme de l'IMAC obtenu pour la purification du Nb D108. De 0 à 70 mL : Chargement, de 70 mL à 85 mL : Lavage, après 85 mL : élution. Courbe bleue : Abs à 280 nm, Courbe rouge : conductivité et courbe verte : % de tampon d'élution.

Sur le chromatogramme on constate, en suivant l'absorbance à 280 nm (courbe en bleue), que, lors du chargement (de 0 à 70 mL), les protéines ne contenant pas de HIS-tag ne sont pas retenues sur la colonne. Ensuite, lors du lavage (de 70 à 85 mL), certaines protéines sont éluées. Enfin, lors de l'élution (après 85 mL) visible par l'augmentation du % de la fraction B, 70% du flux (23,8 g/L d'imidazole) contenant la solution d'élution (courbe verte) et la conductivité (courbe rouge) due à l'imidazole, les protéines (Nbs) fixées sur la colonne sont éluées en un pic unique.

Un SDS-PAGE a été réalisé avec les fractions obtenues : le EP, le « flow through », le « lavage » et les fractions correspondant au pic d'élution : fractions 20 à 23 (Figure 16).

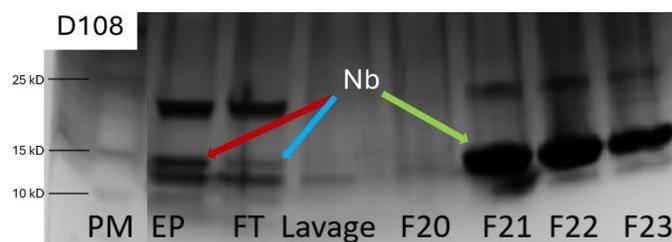


Figure 16 : SDS-PAGE après l'IMAC de la production du Nb D108. PM : poids moléculaire, EP : extrait périplasmique, FT : « flow through », F : fraction d'élution. Flèches : Nb, flèche rouge : Nb dans l'EP, flèche bleue : Nb dans le FT et flèche verte : Nb dans les fractions d'élution.

Sur les SDS-PAGE, on constate que :

Dans l'EP, il y a les protéines propres à la bactérie ainsi qu'une bande à 15 kD (flèche rouge) correspondant au poids moléculaire théorique du Nb D108 (i.e., 15 kD).

Dans le flow through (FT), il y a les protéines sans HIS-tag, correspondant aux protéines propres à la bactérie ainsi qu'une fine bande à 15 kD (flèche bleue) correspondant au Nbs vu qu'il s'agit de la

seule bande qui diminue en intensité par comparaison avec l'EP (flèche rouge). Ce qui veut dire qu'il y a des Nbs qui ne se sont pas attachés sur la colonne dû à un manque de résine.

Dans le « lavage », on retrouve une fine bande à 14 kD qui correspond à une protéine qui s'est fixé de façon non spécifique à la colonne.

Dans les fractions correspondant au pic d'élution, il y a une bande (flèche verte) correspondant au poids moléculaire théorique du Nb D108 (i.e., 15 kD) présente dans les fractions F21 à F23. De plus, il y a des impuretés à 25 kD et à 13 kD mais la protéine majoritaire est bien le Nb.

La CET a été effectuée sur les fractions rassemblées, contenant la protéine d'intérêt (fractions 21 à 23), sur une colonne sephadex G025 HiTrap 5 mL. Le chromatogramme obtenu est repris sur la Figure 17.

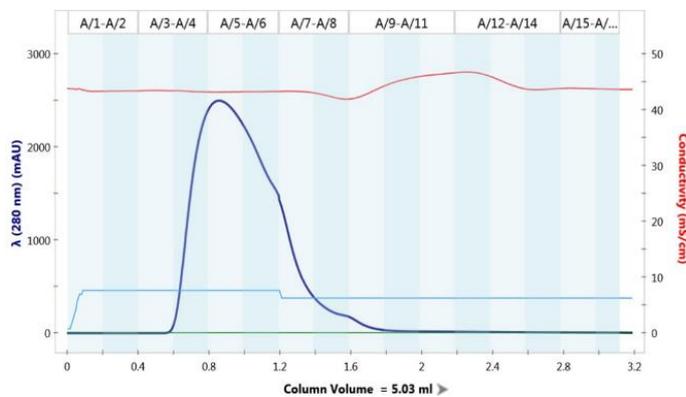


Figure 17 : Chromatogramme de la CET du Nb D108. Courbe bleue : Abs à 280 nm, Courbe rouge : conductivité, courbe verte : % de tampon d'élution et courbe bleu ciel : pression.

Sur le chromatogramme (Figure 17), on relève, en suivant l'Abs (courbe en bleue), que les protéines (Nbs) sont sorties de la colonne en premier. Ensuite, on constate, en suivant la conductivité (courbe rouge), que l'imidazole sort de la colonne. La CET permet donc bien de séparer le Nb de l'imidazole.

Une analyse SDS-PAGE réalisée avec les fractions 4 à 9 (Figure 18) indique que la bande principale correspond bien au poids moléculaire attendu du Nb D108 (i.e., 15 kD). De plus, il y a les mêmes impuretés à 25 kD et à 13 kD mais la protéine majoritaire est le Nb D108.

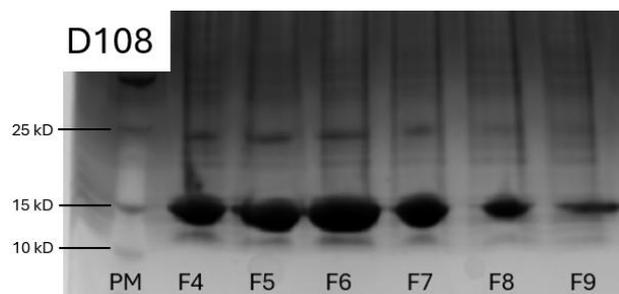


Figure 18 : SDS-PAGE après la CET de la production du Nb D108. PM : poids moléculaire, F : fraction.

Enfin, les fractions contenant la protéine ont été rassemblées : fractions 4 à 9 et la concentration en protéine a été calculée par mesure de l’Abs à 280 nm (Tableau 4). De plus, via le spectre d’Abs (Figure A 4), la présence d’ADN (ratio Abs 260 nm/ 280 nm) ou d’agrégats (Abs à 310) a été vérifiée. La valeur du ration Abs 260 nm/280 nm est plus petite que 0,6, donc il n’y a pas d’ADN.

	Nb D108
Abs à 280 nm	3.36
Abs à 260 nm/ Abs à 280 nm	0,58
Abs à 310 nm	0
Coefficient d’extinction molaire (L*mole⁻¹*cm⁻¹)	24535
Masse moléculaire (g/mole)	13139,66
Concentration (mg/mL)	1,8
Quantité (mg)	9

Tableau 4 : Valeurs d’Abs et concentrations finales après les productions des Nbs D108.

4.1.4. Test de spécificité du Nb D108 par ELISA

Un ELISA a été réalisé à la suite de la production du Nbs D108 afin de le caractériser. Pour ce faire, une quantité de protéines ,DM2 et KHL- α Syn, a été immobilisée (1 μ g) et différentes concentrations en Nbs ont été utilisées comme analytes. La liaison a été détectée via ajout d’un anticorps primaire ciblant le HA-tag (mouse antiHA-tag) puis d’un anticorps secondaire anti-mouse conjugué à la phosphatase alcaline. La phosphatase alcaline va activer le substrat qui va absorber à 405 nm. L’Abs a été mesurée, à 405 nm, chaque minute durant 2 heures et la vitesse initiale a été calculée (Équation 1). Un puits sans protéine sert de contrôle pour chaque concentration en Nb. L’ELISA a été réalisé en triplicata.

Le résultat (Figure 19) montre que le Nb D108 a une vitesse initiale plus importante en présence de KHL- α Syn par rapport à DM2. Ce résultat indique que le Nb D108 serait spécifique de la KHL.

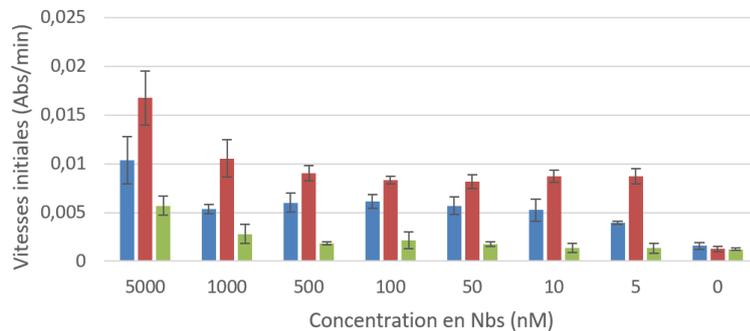


Figure 19 : Résultats de ELISA avec le Nb D108. Comparaison des vitesses initiales (Abs/min) entre le puits contenant la protéine DM2 (barres bleues) et KHL- α Syn (KHL) (barres rouges) et blanc (barres vertes). Barre d'erreur = écart-type de triplicata.

4.1.5. Test de liaison de Nb D108 via des mesures BLI

Un test BLI a été réalisé avec le Nb D108 afin de vérifier la capacité de Nb D108 à se lier à DM2 et/ou KHL (Figure 20). Cette expérience a été réalisée avec des sondes « HIS1K Biosensors» (Sartorius) qui permettent d'immobiliser le Nb *via* son HIS₆-tag. Pour ce faire, la concentration en Nbs (ligand) utilisée est de 10 μ g/mL et la concentration en DM2 et KHL est de 500 nM.

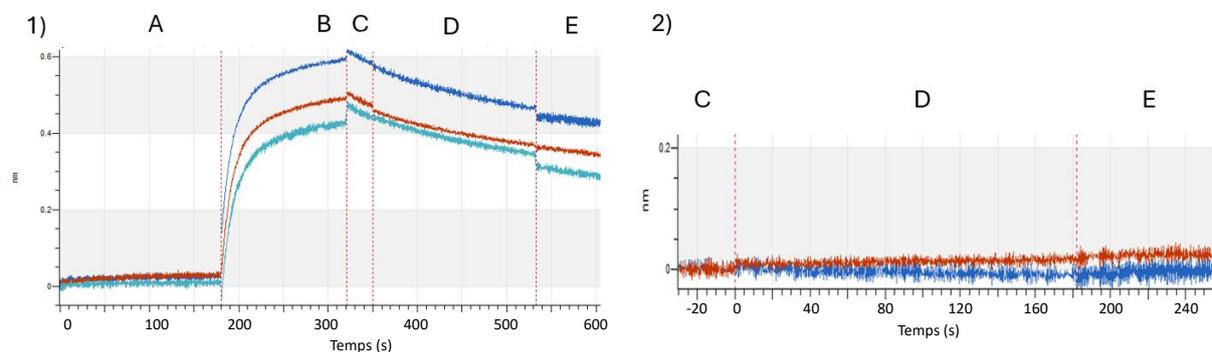


Figure 20 : Résultats du test BLI avec le Nb D108. courbe bleue : sonde incubée avec le Nb (B) puis avec DM2 (D), courbe rouge : sonde incubée avec le Nb (B) puis avec KHL- α Syn (D), courbe verte : sonde incubée avec le Nb (B). A) Lavage n°1/ligne de base, B) Immobilisation du Nb, C) Lavage n°2, D) Association, E) Dissociation. 1) Sensorgramme complet, 2) Sensorgramme différentiel entre les sensorgrammes bleu et vert et entre les sensorgrammes rouge et verte.

Sur le sensorgramme (Figure 20 D108 1), on relève que le Nb s'immobilise sur le capteur (étape B) et on constate qu'une partie des Nbs se dissocie lors du second lavage (étape C). Cette dissociation est équivalente pour les trois capteurs.

Sur le sensorgramme (Figure 20 D108 2), qui représente la courbe bleue (spécificité de DM2) et rouge (spécificité de KHL- α Syn) dont les valeurs ont été soustraites par les valeurs de la courbe verte (le blanc), il n'y a pas d'association entre le Nb D108 et la protéine DM2 ou KHL- α Syn. Ce qui suggère que le Nb D108 n'est pas spécifique à DM2.

4.1.6. Conclusions des Nbs contre DM2

Pour conclure, le Nb testé (D108) n'est malheureusement pas spécifique de DM2. Comme perspectives, une des options aurait été de produire et purifier en petite quantité et caractériser les autres Nbs montrant un signal positif lors du screening appartenant aux autres familles (i.e., D201, D202 et D206) et qui ont été sélectionné lors de la contre sélection. Il est à noter que la KHL est composée de 1660 acides aminés par rapport aux 65 acides aminés du G-Patch donc, en théorie, le nombre potentiel d'anticorps ciblant la KHL est plus important que ceux ciblant le G-Patch. Et une étape de contre sélection n'est probablement pas suffisante pour éliminer tous les Nbs spécifique de la KHL. La suite du projet aurait dû être la réalisation d'un panning uniquement avec le peptide correspondant au G-Patch seul contenant les deux modifications post-traductionnelles biotinylé en C-ter. Ce panning aurait dû permettre d'enrichir efficacement les sous-banques uniquement en Nbs spécifique du G-Patch et pas ceux spécifique de la KHL. La réalisation de ce panning n'a pas été possible car l'entreprise GeneCust à qui nous l'avons commandé n'a pas réussi, malgré plusieurs essais, à produire le peptide modifié sous forme soluble. A la suite de cela, j'ai changé de cible pour la suite de mon mémoire.

4.2. Sélection et caractérisation des Nbs contre LasB

4.2.1. Panning contre LasB

Le panning dirigé contre LasB a été réalisé en 3 tours. La banque initiale de phages utilisée est « Joe 4b » (3.2.2. Banques de phages). Pour chaque tour, une évaluation de l'enrichissement a été réalisée de la même manière que pour le panning contre TFIP11.

Pour le 1^{er} tour (Figure 21A), aucun enrichissement positif ou négatif n'est observé de même que pour le 2^{ème} tour (Figure 21B) et le 3^{ème} tour (Figure 21C). Pour les 3 tours, il n'y a pas eu d'enrichissement alors qu'on s'attendait à de l'enrichissement positif. Cela suggère que l'enrichissement, lors des tours du panning, n'a pas été efficace. Notons cependant que des Nbs ont déjà été sélectionnés contre plusieurs cibles alors qu'aucun enrichissement n'avait été observé lors du panning par phage display.

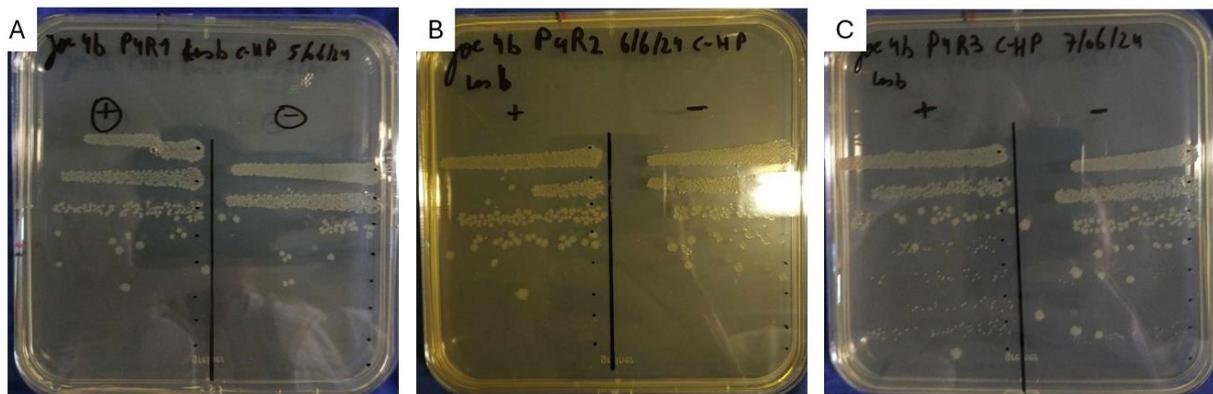


Figure 21 : Boîtes de Pétri pour réaliser l'évaluation de l'enrichissement des clones contre LasB. A) 1er tour, B) 2ème tour, C) 3ème tour. + : suspension +, - suspension -. Haut en bas : dilution 10^{-1} à 10^{-6} .

4.2.2. Screening contre LasB

La sélection aléatoire de 180 colonies a été effectuée sur deux boîtes de Pétri : 90 colonies sur la boîte dilution 10^{-1} du 2^{ème} tour de panning (Figure 22A) et 90 colonies sur la boîte dilution 10^{-1} du 3^{ème} tour de panning (Figure 22B).

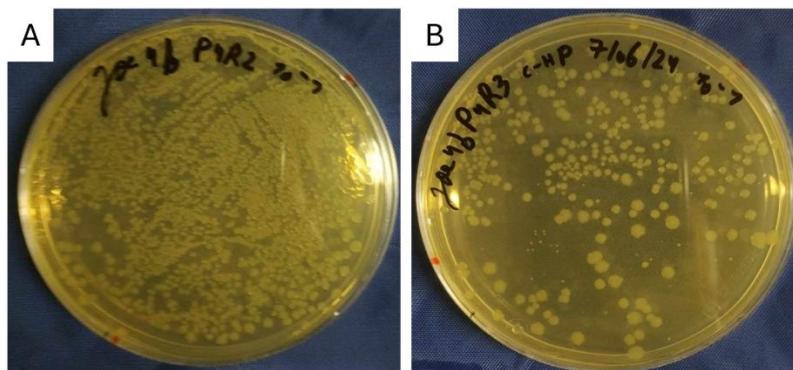


Figure 22 : Boîtes de Pétri utilisées pour le screening. A) 2ème tour dilution 10^{-1} , B) 3ème tour dilution 10^{-1} .

Les produits de la cPCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 23), une bande, à ± 700 pb, qui est présente pour 21 des 33 clones. Donc ces 21 clones possèdent une séquence dans le site d'insertion du phagémide correspondant à la taille attendue d'un Nb.

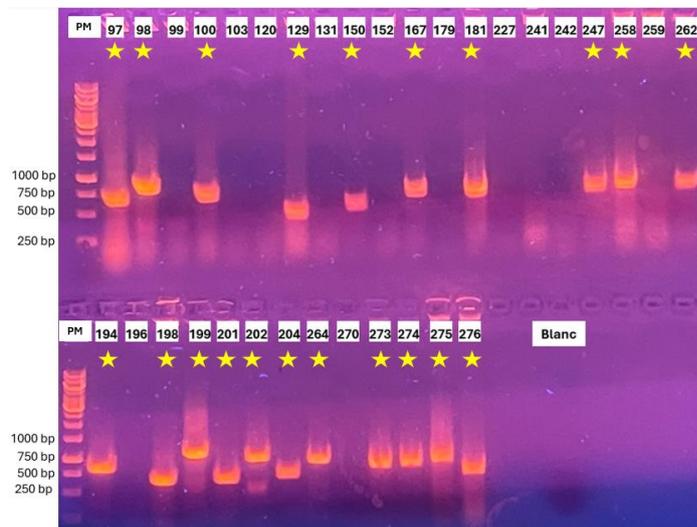


Figure 23 : Gel d'électrophorèse réalisé avec le produit de la PCR. PCR réalisée avec le couple d'amorces MP57 et G3 (voir annexe). PM = poids moléculaire. Etoiles dorées = clones présentant une bande. Blanc : mix PCR sans bactérie.

Pour les 12 clones ne présentant pas de bandes, deux hypothèses peuvent être proposées :

- Une ou plusieurs mutations sont présentes dans un ou dans les deux sites de liaisons aux amorces. De ce fait, l'amorce ne reconnaît pas le site et, par conséquent, il n'y a pas d'amplification pas de la région d'intérêt.
- Le phagémide est vide (sans séquence de Nbs). De ce fait, il y a une amplification de ± 250 bp.

Parmi les 12 clones, 10 ne sont positifs qu'une seule fois et 7 sur les 10 le sont après O/N.

Pour les 21 clones qui présentent une bande, certaines bandes ont une taille de ± 500 bp (Nb L201) ou de ± 1000 bp (Nb L199) alors que la taille attendue est de ± 700 bp. Cependant, il s'agit d'une moyenne et certains Nbs peuvent avoir des CDR plus courts ou plus longs.

Le phagémide des 21 clones a été purifié et séquencé (Tableau 6)

Nb	Séquences	Familles	Séquences CDR3
L97	Non correcte	/	/
L98	/	/	/
L100	Correcte	1	ARGGVTSFPTDY
L129	Non correct	/	/
L150	Non correct	/	/
L167	Non correct	/	/
L181	/	/	/
L194	/	/	/
L198	Non correcte	/	/
L199	/	/	/
L201	Non correcte	/	/
L202	Non correcte	/	/
L204	Correcte	2	NARKPRVPTTGSYGY
L262	Correcte	3	AARRAGRSFEY
L264	/	/	/
L273	Non correcte	/	/
L274	/	/	/
L275	/	/	/
L276	Correcte	4	AAREKVGQWRYLRNWGPSDF

Tableau 6 : Résultats du séquençage des Nbs. Famille : même CDR3. Séquences : correct = PeIB-Nb-HAtag-HIStag-stop(TGA), non correct = manque d'un élément, mutation ou INDEL, / = chromatogramme de mauvaise qualité.

Sur les 21 clones, 4 présentent un chromatographe de séquençage de bonne qualité avec une séquence correcte (Figure 6B). Les 4 clones sont regroupés en 4 familles sur base de la séquence de leur CDR3 (Tableau 6).

Pour les 17 autres clones, 8 présentent une séquence « non correcte », ils ont un ou plusieurs éléments manquants ou des mutations dans leur séquence. Pour les 9 autres, qui présentent un chromatogramme de mauvaise qualité, une nouvelle purification du phagémide a été effectuée ensuite un nouveau séquençage mais le chromatogramme de séquençage est resté de mauvaise qualité.

4.2.3. Production et purification du Nb L276

Pour sélectionner les Nbs à produire, le profil de positivité (Tableau 5) ainsi que la séquence du Nb ont été analysés. Après analyse, le Nb L276 a été produit dans des *E. coli* WK6 en suivant le même protocole que pour le Nb D108. Les trois autres Nbs (L100, L204 et L262) n'ont pas été produits car ils ne sont positifs qu'une seule fois (Tableau 5).

La production a été réalisée dans un volume de culture de 2,2 litres de milieu TB en suivant les mêmes étapes que la production du Nb D108 contre DM2. Lors de la purification IMAC, le chromatogramme n'a pas été enregistré.

Après l'IMAC, un SDS-PAGE (Figure 24) a été réalisé avec les fractions obtenues : le EP, le « flow through », le « lavage » et les fractions d'élution contenant la protéine déterminée par mesure de l'Abs au NanoDrop™ One (fractions 39 à 43) car, comme mentionné, le chromatogramme n'a pas été enregistré.

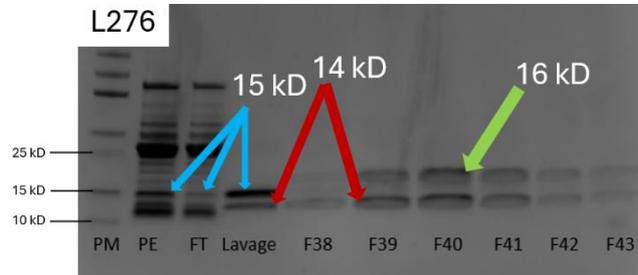


Figure 24 : SDS-PAGE après l'IMAC production du Nb L276. PM : poids moléculaire, PE : extrait périplasmique, FT : « flow through », F : fraction d'élution. Flèches bleues : protéine à ± 15 kD, flèches rouges : protéine à ± 14 kD et flèche verte : protéine à ± 16 kD.

Sur le SDS-PAGE, on constate que :

Dans l'extrait périplasmique (EP), il y a les protéines propres à la bactérie ainsi qu'une bande à ± 15 kD (flèche bleue) ne correspondant pas au poids moléculaire théorique du Nb L276 (i.e., 16 kD).

Dans le « flow through » (FT), il y a les protéines qui n'ont pas d'HIS-tag et qui sont propres à la bactérie et, par rapport à l'EP, l'intensité de la bande à ± 15 kD (flèche bleue) est très faible ce qui signifie que la protéine s'est accrochée sur la colonne et donc pourrait être le Nb.

Dans le « lavage », on retrouve deux bandes, une bande intense à ± 15 kD (flèche bleue) et une bande à ± 14 kD (flèche rouge).

Dans les fractions qui correspondent au pic d'élution, il y a deux bandes, une à ± 16 kD (flèche verte), correspondant au poids moléculaire théorique du Nbs L276 et une autre à ± 14 kD (flèche rouge) identique à celle obtenue dans le « lavage ».

Pour les protéines présentes dans le lavage, une ultracentrifugation a été effectuée sur le « lavage » afin de concentrer les protéines présentes. L'ultrafiltration a été effectuée avec une colonne Vivaspın 4 (Sartorius ;Göttingen ;Allemagne) Amicon 4 mL 5kD-MWCO à vitesse maximale (4000g). Ensuite, une analyse par SDS-PAGE a été réalisée avec les 2 solutions collectées (le filtrat et la fraction résiduelle) (Figure 25).

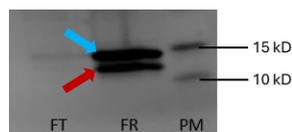


Figure 25 : SDS-PAGE après ultracentrifugation de la production du Nb L276. PM : poids moléculaire, FT : filtrat, FR : fraction résiduelle. Flèche bleue : protéine à ± 15 kD, flèche rouge : protéine à ± 14 kD,

Sur le SDS-PAGE, on constate que les deux mêmes protéines (flèche bleue et rouge) sont observées dans le « lavage » et que les protéines ont été concentrées car le volume du « lavage » a été divisé par 4 passant de ± 20 mL à ± 5 mL. Pour la suite, la fraction résiduelle sera appelée « solution n°1 ».

Pour les protéines dans les fractions d'élution, une CET a été effectuée (Figure 26) sur les fractions contenant la protéine d'intérêt (fraction 38 à 42) et rassemblées, sur une colonne sephadex G025 HiTrap 5 mL.

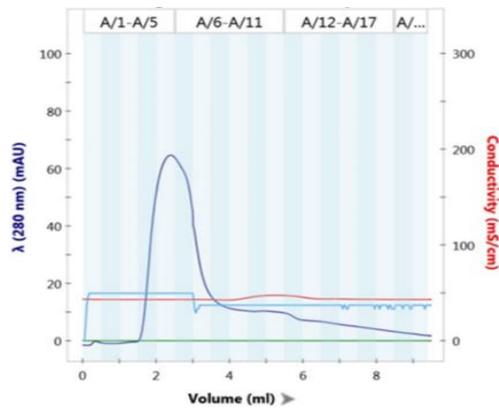


Figure 26 : Chromatogramme de la CET du Nb D276. Courbe bleue : Abs à 280 nm, Courbe rouge : conductivité, courbe verte : % de tampon d'élution et courbe bleu ciel : pression.

Une analyse par SDS-PAGE a été réalisée avec les fractions, contenant les protéines (fraction 4 à 8) (Figure 27).

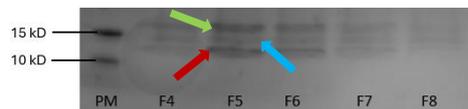


Figure 27 : SDS-PAGE après la CET et ultracentrifugation de la production du Nb L276. PM : poids moléculaire, F : fraction, FT : filtrat, FR : fraction résiduelle. Flèche bleue : protéine à ± 15 kD, flèche rouge : protéine à ± 14 kD et flèche verte : protéine à ± 16 kD.

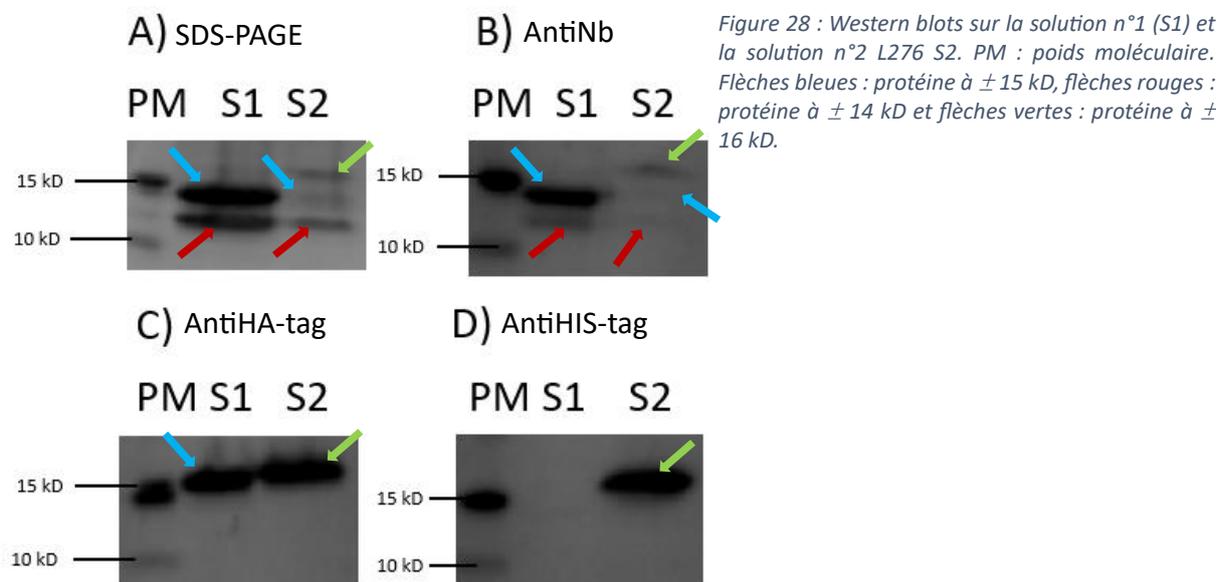
Sur le SDS-PAGE, on constate que :

Dans les fractions, l'intensité des bandes est très faible, ce qui suggère que peu de Nbs ont été produits. De plus, trois bandes sont visibles : l'une à ± 16 kD (flèche verte) qui correspond au poids moléculaire théorique du Nbs L276 (i.e., 16 kD) et les deux autres (flèche bleue et rouge) qui correspondent aux deux mêmes bandes observées dans le « lavage ». Ce qui suggère une dégradation.

Enfin, les fractions contenant la protéine ont été rassemblées (fractions 5 et 6) et la concentration en protéine a été mesurée par Abs à 280 nm et est de 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour un volume de 5 mL (120 μg produit). De plus, via les valeurs du spectre d'absorbance (Figure A 5), la présence d'ADN (ratio Abs 260 nm/ 280 nm = 0,7) ou d'agrégats (Abs à 310 = 0) a été vérifiée. La valeur du ration Abs 260 nm/280 nm est plus grande que 0,6, ce qui suggère la présence d'ADN. Pour la suite, cette solution sera appelée « solution n°2 ».

4.2.4. Analyse par Western Blot du Nb L276 après purification

Afin de savoir laquelle des trois protéines purifiées correspond au Nb L276 (Figure 6B), trois Westerns Blots (WB) ont été effectués (Figure 28) sur les deux solutions (n°1 et n°2) de protéines. L'un pour détecter les Nbs, un autre pour détecter les HA-tag et enfin un dernier pour détecter les HIS-tag. Pour ce faire, trois SDS-PAGE ont été réalisés avec les deux solutions puis, après avoir transférées les protéines sur une membrane Amersham™ Hybond™, celle-ci a été neutralisée avec du tampon de blocage. Ensuite, ont été ajoutés : l'anticorps primaire (mouse antiHA-tag ou mouse antiHIS-tag ou anti-Alpaca VHH domaine conjugué avec phosphatase alcaline) et puis, pour le WB antiHA-tag et antiHIS-tag, l'anticorps secondaire (anti-mouse conjugué avec la Phosphatase alcaline) et enfin, le substrat permettant la détection.



Une analyse par SDS-PAGE (Figure 28A), a été réalisée pour servir de référence et est similaire au résultat obtenu pour les autres SDS-PAGE.

Sur le 1^{er} WB (Figure 28B), l'anticorps primaire utilisé est un antiNb et par conséquent, il détecte quelle bande correspond le Nb. Toutes les bandes (flèches verte, bleues et rouges) sont détectées et donc elles correspondent toutes à des Nbs. L'intensité des bandes est proportionnelle à celle du SDS-PAGE.

Sur le 2^{ème} WB (Figure 28C), l'anticorps primaire utilisé est un antiHA-tag et par conséquent, il détecte quelle bande possède un HA-tag. Seuls les bandes à ± 15 kD (flèche verte, bleue) dans la solution n°1 et à ± 16 kD dans la solution n°2 sont détectées et donc ces Nbs possèdent des HA-tag. L'intensité des bandes n'est pas proportionnelle à celle du SDS-PAGE mais le WB antiHA-tag a été réalisé en utilisant un anticorps primaire et un anticorps secondaire contrairement au WB antiNb.

Sur le 3^{ème} WB (Figure 28D), l'anticorps primaire utilisé est un antiHIS-tag et par conséquent, il détecte quelle bande correspond un HIS-tag. Seule la bande à ± 16 kD (flèche verte) est détectée et donc seule la bande à ± 16 kD correspond au Nb L276 ce qui est cohérent avec son poids moléculaire théorique (i.e., 16 kD).

Pour conclure, la bande à ± 14 kD correspond au Nb L276 sans tag, la bande à ± 15 kD correspond au Nb L276 avec uniquement le HA-tag, la bande à ± 16 kD correspond au Nb L276 avec le HA-tag et le HIS₆-tag (Nb complet).

Ces résultats peuvent s'expliquer par une contamination avec une protéase durant la production.

4.2.5. Test de liaison du Nb L276 via des mesure BLI

À la suite des résultats du WB, un test BLI a été réalisé avec la solution n°2, contenant le Nb L276 complet, afin de savoir s'il se lie à LasB (Figure 29). Cette expérience a été réalisée avec des sondes « HIS1K Biosensors » qui permettent d'immobiliser le Nb *via* son HIS₆-tag. Pour ce faire, la concentration en Nanobodies® (ligand) utilisée est de 15 μ g/mL, une concentration en LasB (analyte) de 10 nM.

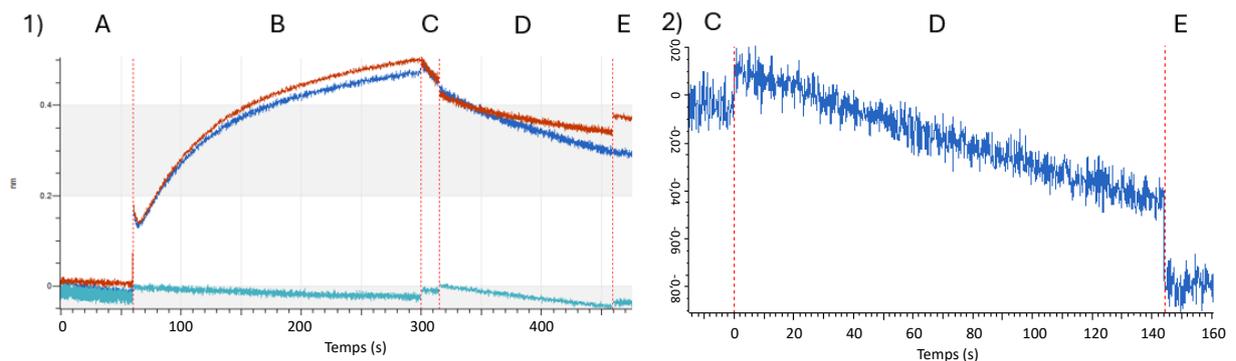


Figure 29 : Résultats du test BLI avec le Nb L276. Courbe bleue : sonde incubée avec le Nb (B) puis avec LasB (D), courbe rouge (blanc d'association) : sonde incubée avec le Nb (B) puis avec le KB (D), courbe verte (blanc de non-spécifié) : sonde qui est incubée avec le KB (B) puis avec LasB (D). A) Lavage n°1/ligne de base, B) Immobilisation du Nb, C) Lavage n°2, D) Association, E) Dissociation. 1) Sensorgramme du BLI, 2) Sensorgramme différentiel entre les sensorgrammes bleu et rouge.

Sur le sensorgramme (Figure 29 1), on relève que le Nb s'immobilise sur les senseurs (étape B courbes bleue et rouge) ce qui confirme que le Nb possède bien un HIS-tag. De plus, on constate qu'une partie des Nbs se dissocie lors du second lavage (étape C). Cette dissociation est équivalente pour les deux senseurs fonctionnalisés avec le Nb (Figure 29 2 C).

Sur le sensorgramme (Figure 29 2), qui représente la courbe bleue (liaison à LasB) dont les valeurs ont été soustraites par les valeurs de la courbe rouge (blanc d'association), il n'y a pas d'association entre le Nb L276 et la protéine LasB (Figure 29 2 D). De plus, le signal diminue (Figure 29 2 D) donc la perte de Nbs sur le senseur incubé avec LasB est plus rapide que le blanc d'association

(courbe rouge) ; ce qui laisse entendre que LasB hydrolyse le senseur (i.e. l'anticorps antiHIS-tag) et/ou le Nb. Une diminution du signal est aussi observée sur le senseur sans Nb (sensorgramme vert) (Figure 29 1 D) ce qui suggère que les anticorps antiHIS-tag sont bien dégradés par LasB. Ceci pourrait expliquer pourquoi aucune liaison est observée entre LasB et le Nb (étape D).

4.2.6. Test de liaison du Nb L276 via des mesure BLI en présence d'un inhibiteur de LasB

Pour savoir si LasB hydrolyse le senseur et/ou le Nb et si le Nb se lie à LasB non active, un test BLI en présence d'un inhibiteur de LasB, le phosphoramidon, a été réalisé (Figure 30). Le BLI a été réalisé avec des sondes « HIS1K Biosensors» qui permettent d'immobiliser le Nb *via* son HIS₆-tag. Pour ce faire, la concentration en Nanobodies® utilisée est de 15 µg/mL, une concentration en LasB de 1 µM avec une concentration en phosphoramidon de 600 µM (ratio molaire de phosphoramidon : LasB de 600:1).

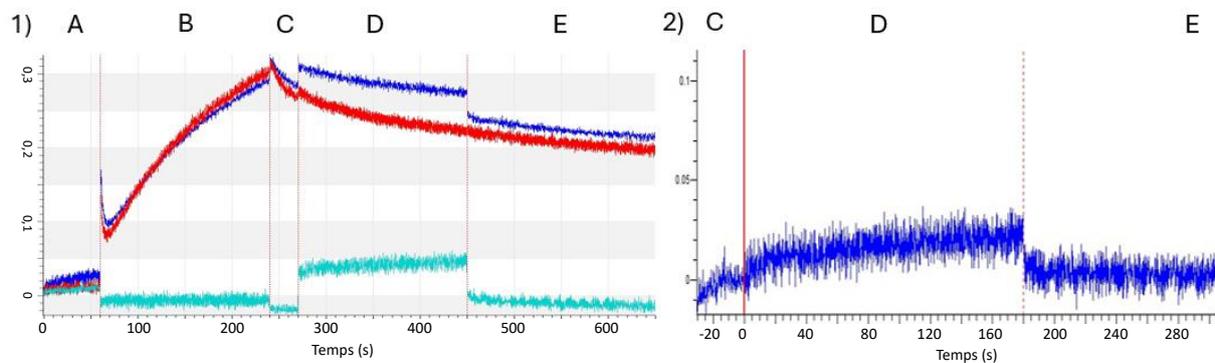


Figure 30 : Résultats du test BLI avec le Nb L276. Courbe bleue : sonde incubée avec le Nb (B) puis avec LasB et phosphoramidon (D), courbe rouge (blanc d'association) : sonde incubée avec le Nb (B) puis avec le KB (D), courbe verte (blanc de non-spécifié) : sonde qui est incubée avec le KB (B) puis avec LasB et phosphoramidon (D). A) Lavage n°1/ligne de base, B) Immobilisation du Nb, C) Lavage n°2, D) Association, E) Dissociation. 1) Sensorgramme du BLI, 2) Sensorgramme différentiel entre les sensorgrammes bleu et rouge.

Sur le sensorgramme (Figure 30 1 B) on relève, comme pour le test BLI précédent que le Nb s'immobilise sur les senseurs (étape B courbes bleue et rouge) et on constate qu'une partie des Nbs se dissocie, sur les deux senseurs fonctionnalisés (courbe bleue et rouge) avec le Nb, lors du second lavage (étape C) de façon équivalente.

Sur le sensorgramme (Figure 30 2), qui représente la courbe bleue (liaison à LasB) dont les valeurs ont été soustraites par les valeurs de la courbe rouge (blanc d'association), le signal reste constant (± 0) donc LasB est inhibé et il n'y a pas d'association entre le Nb 276 et la protéine LasB inhibé. Cependant, le Nb L276 peut se lier au même site que l'inhibiteur. Pour vérifier cette hypothèse, un test de l'activité inhibitrice a été réalisé par Jonathan Vaneyck et les résultats montre que le Nb n'inhibe pas LasB.

4.3. Test d'activité de LasB immobilisée par adsorption sur plaque Multisorp

Une des difficultés pour sélectionner des Nbs contre LasB est le fait qu'il s'agit d'une protéase et qu'elle peut donc dégrader les Nbs à la surface des phages ou la protéine G3 ou le linker entre les deux. Aussi, dans un premier temps un test d'activité de LasB immobilisée par adsorption sur une plaque Multisorp (Figure 31) a été réalisé. Pour ce faire, 1 µg de LasB a été immobilisé par adsorption dans un puits d'une plaque 96 puits, 96F Multisorp Straight, en présence ou non de de phosphoramidon pour un ratio molaire de phosphoramidon : LasB de 600:1. Une fois immobilisée, après avoir bloqué la surface des puits avec un tampon de blocage, le substrat a été ajouté et la fluorescence a été mesurée à 415 nm (excitation à 340 nm) toutes les 30 secondes durant 30 minutes. Le test a été réalisé en triplicata pour les puits contenant LasB et en duplicata pour le puits contenant seulement le phosphoramidon.

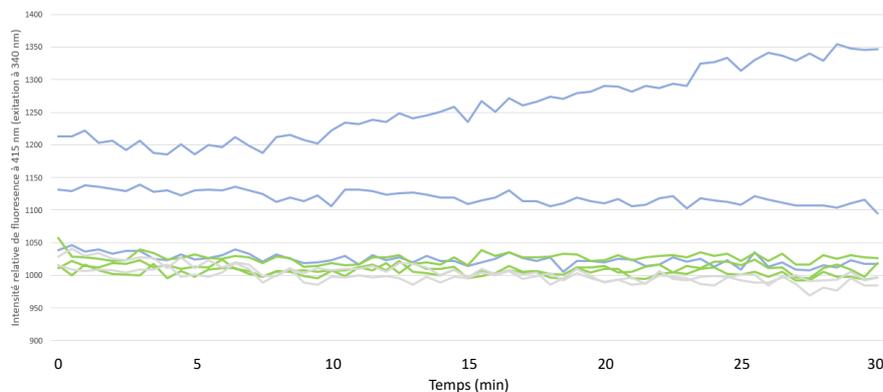


Figure 31 : Evolution des valeurs de fluorescence à 415 nm du test d'activité de LasB. Courbes bleues : LasB, courbes vertes : LasB + phosphoramidon, courbes grises : phosphoramidon .

Les résultats du test d'activité montrent que LasB est active dans un seul des puits lorsqu'elle est immobilisée par adsorption sur une plaque Multisorp et n'est pas active en présence de l'inhibiteur. Ce qui indique que LasB est actif lorsqu'elle est immobilisée. Une hypothèse pour expliquer que LasB ne soit actif que dans un puits sur les 3 puits testé est que lors de l'immobilisation, par adsorption, la plaque (Multisorp) n'immobilise qu'un petit nombre de protéines LasB et que les protéines immobilisées sont dénaturées. Par la suite, il faudra réaliser un test pour savoir si LasB immobilisée peut dégrader les Nbs à la surface des phages ou la protéine G3 ou le linker entre les deux lors du panning et du screening.

5. Discussions et perspectives

Lors de ce mémoire, j'ai réalisé une sélection de Nanobodies® contre deux cibles, l'une dirigée contre le G-Patch de TFIP11 et l'autre dirigée contre la métalloprotéase de *P. aeruginosa*, LasB.

5.1. G-Patch de TFIP11

Le G-Patch de TFIP11 est impliqué dans de nombreuses interactions avec plusieurs composants importants du spliceosome. La proximité de deux zones intrinsèquement désordonnées ainsi qu'un site de phosphorylation (Y162) et un site méthylation (R166) réversibles (Figure 1B) implique que le G-Patch ne peut pas toujours interagir avec les autres protéines, dans ce cas, le spliceosome ne sera pas correctement assemblé et donc l'épissage ne sera pas effectué.

Le but de sélectionner des Nbs contre le G-Patch et plus spécifiquement des Nbs contre le G-Patch possédant les modifications post-traductionnelles permettrait de réaliser différentes expériences telles que de la visualisation *in vivo* et ainsi déterminer la présence ou absence de modifications post-traductionnelles.

Pour sélectionner les Nbs de la banque immune Joe 3, la protéine DM2 a été utilisée, composée d'une partie du G-Patch de TFIP11 avec les deux modifications post-traductionnelles (Figure 1B) couplées, en C-ter, de la protéine KHL. Lors des deux premiers tours du panning, un enrichissement positif a été observé suggérant que la sous banque a été enrichie en Nbs spécifiques de DM2. En revanche, pour le troisième tour aucun enrichissement n'a été observé. Il en est de même pour le tour de contre sélection, effectué pour enrichir la sous banque uniquement en Nbs spécifiques du G-Patch et non spécifiques de la KHL, alors qu'un enrichissement négatif était attendu. Ceci sous-entend que la contre sélection n'a pas fonctionné ou que le nombre de Nbs spécifiques au G-Patch est très faible. Notons cependant que des Nbs ont déjà été sélectionnés contre plusieurs cibles alors qu'aucun enrichissement n'avait été observé lors du panning par phage display.

Après l'ELISA, la cPCR pour ne sélectionner que les clones contenant un insert et le séquençage de ces derniers, 7 clones sur les 180 clones testés correspondent à un Nb correct. Sur les 7 clones, 4 proviennent du 3^{ème} tour de sélection et 3 du tour de contre sélection. Les 4 clones du 3^{ème} tour (Nb D104, D108, D116 et D130) appartiennent à la même famille (même CDR3) et seul le D130 n'a pas la même séquence qui diffère d'un acide aminé à la position 109 (sérine au lieu d'une glycine). Ce qui suggère que les Nbs de cette famille se lient à DM2 vu que le nombre de clones sélectionnés dans la famille est important. Pour la suite, j'ai choisi de produire, purifier et caractériser le Nb D108 car il fait partie de la

famille la plus représentée en nombre de clones (4 clones sur 7) et il possède un profil de positivité élevé (6 fois positif sur 9).

Il a été produit dans un volume de 2 litres de milieu TB puis purifié par IMAC et ensuite par une chromatographie d'exclusion de taille (CET). Neuf mg de protéine ont été obtenus. La capacité de liaison de D108 à DM2 a été étudiée par ELISA et par BLI. Les résultats de l'ELISA (Figure 19) montrent que la vitesse initiale de liaison du Nb D108 à la KHL- α Syn est plus grande que celle mesurée pour la liaison à DM2. Les résultats du BLI (Figure 20) montrent que le Nb D108 ne se lie ni à DM2 ni à la KHL- α Syn.

Une hypothèse pour expliquer pourquoi les Nbs de la famille n°1, contenant le Nb D108, ont pu être sélectionnés est que, lors du panning et de l'ELISA de screening (étape où le Nb est couplé à la protéine G3 car la souche d' *E. coli* utilisé est TG1 qui ne reconnaît pas le codon stop « ambre »), la protéine G3 interagirait avec le Nb D108 et DM2 ce qui conférerait une capacité de liaison à DM2.

La différence entre les résultats de l'ELISA et du BLI peut être expliquée car lors de l'ELISA, les protéines sont immobilisées et par conséquent certaines peuvent être dénaturées, ce qui peut exposer des sites non spécifiques au Nb, contrairement au BLI où les protéines sont en solution.

Il est à noter que la KHL est composée de 1660 acides aminés par rapport aux 65 acides aminés du G-Patch couplés à celle-ci donc, en théorie, le nombre potentiel d'anticorps ciblant la KHL est plus important que ceux ciblant le G-Patch. Et donc il est difficile de sélectionner des Nbs spécifiques du G-Patch en utilisant la protéine DM2 (G-Patch couplé à la KHL).

Comme perspective pour ce projet, il faudrait faire un panning mais immobiliser le G-Patch seul au lieu d'immobiliser la protéine DM2 (G-Patch couplé KHL) cela permettrait de ne pas sélectionner des Nbs spécifiques à la KHL et de ne pas faire un tour de contre sélection. J'aurais dû le faire mais comme indiqué précédemment, l'entreprise GeneCust était dans l'incapacité de produire le peptide avec les modifications post-traductionnelles. Une autre perspective serait de produire les autres Nbs, des trois autres familles, sélectionnés lors du panning afin de vérifier leurs spécificités.

5.2. LasB

LasB est une métalloprotéase à zinc et est l'un des principaux facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*. LasB hydrolyse une large gamme de protéines, ayant pour conséquence des dommages aux tissus de l'hôte et diminuant la réponse immunitaire. Plusieurs inhibiteurs de LasB ont été étudiés mais ont soit une faible activité soit ne sont pas sélectifs. Ce manque d'inhibiteurs efficaces et sélectifs est un problème car LasB est, comme précisé, l'un des principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*.

Le but de sélectionner des Nbs contre LasB et plus spécifiquement des Nbs inhibiteurs permettrait de réduire la virulence de l'infection à *P. aeruginosa* et, par conséquent, de réduire le nombre de décès dû à cette bactérie (plus de 500 000 décès en 2019).

Pour sélectionner les Nbs de la banque immune Joe 4b, 3 tours de panning ont été réalisés en immobilisant LasB par adsorption sur une plaque 96F Multisorp. Lors des trois tours, aucun enrichissement n'a été observé suggérant que la sélection n'a pas été efficace ou que le nombre de Nbs spécifiques à LasB est très faible. Cependant, comme mentionnée précédemment, des Nbs ont déjà été sélectionnés contre plusieurs cibles alors qu'aucun enrichissement n'avait été observé lors du panning par phage display.

Après l'ELISA, la cPCR pour ne sélectionner que les clones contenant un insert et le séquençage de ces derniers, 4 clones (L100, L204, L262 et L276) sur les 180 clones testés correspondent à un Nb correct. Ce qui suggère que très peu de Nbs spécifiques à LasB ont été sélectionnés. Cependant, 9 clones, qui étaient au moins une fois positif à l'ELISA du screening et présentaient une bande à ± 700 pb sur le gel d'agarose à la suite de la cPCR (Figure 23), ont eu un chromatogramme de mauvaise qualité. Ce qui suggère que d'autres Nbs contre LasB ont pu être sélectionnés. Pour la suite, j'ai choisi de produire, purifier et caractériser le Nb L276 car il est positif à tous les temps respectifs (profil de positivité), lors de l'ELISA, ce qui suggère que ce Nb se lie à LasB.

Il a été produit dans 2,2 litres de milieu TB puis purifié par IMAC et ensuite par une CET. Durant la purification, 3 protéines, de poids moléculaires différents, ont été purifiées. Afin de savoir quelle protéine correspondait au Nb L276 complet, un WB a été réalisé. Les résultats indiquent que les 3 protéines correspondent au Nb L276. Cependant, la protéine avec un poids moléculaire de ± 16 kD possède le HA-tag et le HIS₆-tag (Nb complet), la protéine avec un poids moléculaire de ± 15 kD possède uniquement le Ha-tag et enfin la protéine avec un poids moléculaire de ± 14 kD ne possède aucun tag. Ces résultats suggèrent qu'il y a eu une contamination par une protéase lors de la production. La quantité de Nb L276 complet obtenue est faible (110 μ g dans 5 mL).

Ensuite une expérience BLI a été réalisé afin de savoir si le Nb se lie à LasB. Les résultats indiquent que LasB dégrade l'anticorps (antiHIS-tag) du senseur. Donc, une expérience BLI en présence d'inhibiteur, le phosphoramidon, a été réalisée. Les résultats indiquent que le senseur n'est plus dégradé ce qui confirme que LasB dégrade le Nb et/ou l'anticorps antiHIS-tag à la surface du senseur. Par ailleurs, en présence de l'inhibiteur, le Nb L276 ne se lie pas à LasB. Ce qui suggère que soit le Nb ne se lie pas à LasB soit que le Nb se lie là où l'inhibiteur se lie.

Le fait que LasB soit une protéase implique que lors des étapes de panning, de l'ELISA du screening, elle peut cliver les Nbs couplés à la protéine G3, la protéine G3 elle-même ou le peptide linker. De ce fait, aucun Nb ne pourra être sélectionnés. Pour vérifier cette hypothèse, un test d'activité de LasB immobilisée a été réalisé dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'ELISA du screening. Ce test indique que LasB est en effet active. Ce qui, en soit, est essentiel si on veut isoler des Nbs inhibant de manière compétitive LasB ; mais qui pourrait compromettre la sélection comme indiqué au-dessus. Notons que des Nbs ont déjà été sélectionnés par phage display à partir de librairie immune. Par exemple, un Nb inhibant l'élastase de manière compétitive avec un Ki de l'ordre du nanomolaires (Dumoulin, communication personnelle).

Comme perspectives pour ce projet, tout d'abord, il faudrait essayer de séquencer les 9 clones présentant un mauvais chromatogramme de séquençage via un autre type de séquençage (nanopore ou pyroséquençage) (van Dijk et al., 2018) afin de savoir s'ils possèdent une séquence correcte.

Ensuite, une 2^{ème} perspective serait de produire les autres Nbs, issus des trois autres familles, sélectionnés lors du panning afin de vérifier leurs spécificités et capacité à inhiber LasB.

Enfin, comme 3^{ème} perspective, il faudrait réaliser un panning afin de savoir si LasB immobilisée, par adsorption sur une plaque Multisorp, peut cliver le Nb couplé à la protéine G3 composant le phage ou la protéine G3 ou le linker entre les deux. Si LasB est capable de cliver la protéine G3, il faudrait refaire un panning mais en inhibant LasB pour éviter que LasB hydrolyse les Nbs avant de les avoir enrichis. Pour réaliser cela, il faudrait opérer avec un inhibiteur non compétitif afin de sélectionner des Nbs inhibiteurs qui puissent se lier dans le site actif de LasB.

6. Bibliographie

- Banerjee, D., & Stableforth, D. (2000). The treatment of respiratory pseudomonas infection in cystic fibrosis: What drug and which way? *Drugs*, *60*(5), 1053–1064.
<https://doi.org/10.2165/00003495-200060050-00006>
- Bathula, N. V., Bommadevara, H., & Hayes, J. M. (2021). Nanobodies: The Future of Antibody-Based Immune Therapeutics. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, *36*(2), 109–122.
<https://doi.org/10.1089/cbr.2020.3941>
- Bennett, M., Michaud, S., Kingston, J., & Reed, R. (1992). Protein components specifically associated with prespliceosome and spliceosome complexes. *Genes & Development*, *6*(10), 1986–2000.
<https://doi.org/10.1101/gad.6.10.1986>
- Chen, A. Y., Adamek, R. N., Dick, B. L., Credille, C. V., Morrison, C. N., & Cohen, S. M. (2019). Targeting Metalloenzymes for Therapeutic Intervention. *Chemical Reviews*, *119*(2), 1323–1455.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00201>
- Conrath, K., Vincke, C., Stijlemans, B., Schymkowitz, J., Decanniere, K., Wyns, L., Muyldermans, S., & Loris, R. (2005). Antigen Binding and Solubility Effects upon the Veneering of a Camel VHH in Framework-2 to Mimic a VH. *Journal of Molecular Biology*, *350*(1), 112–125.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.04.050>
- Darling, A. L., & Uversky, V. N. (2018). Intrinsic disorder and posttranslational modifications: The darker side of the biological dark matter. *Frontiers in Genetics*, *9*(MAY), 158–158.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00158>
- Duchemin, A., O'Grady, T., Hanache, S., Mereau, A., Thiry, M., Wacheul, L., Michaux, C., Perpète, E., Hervouet, E., Peixoto, P., Ernst, F. G. M., Audic, Y., Dequiedt, F., Lafontaine, D. L. J., & Mottet, D. (2021). DHX15-independent roles for TFIP11 in U6 snRNA modification, U4/U6.U5 tri-snRNP assembly and pre-mRNA splicing fidelity. *Nature Communications*, *12*(1), 6648.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-26932-2>

- Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaeghe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L. G. J.,
Muyldermans, S., Wyns, L., & Matagne, A. (2002). Single-domain antibody fragments with
high conformational stability. *Protein Science*, *11*(3), 500–515.
<https://doi.org/10.1110/ps.34602>
- Everett, M. J., & Davies, D. T. (2021). Pseudomonas aeruginosa elastase (LasB) as a therapeutic target.
Drug Discovery Today, *26*(9), 2108–2123. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.02.026>
- Fleetwood, F., Devoogdt, N., Pellis, M., Wernery, U., Muyldermans, S., Ståhl, S., & Löfblom, J. (2013).
Surface display of a single-domain antibody library on Gram-positive bacteria. *Cellular and
Molecular Life Sciences : CMLS*, *70*(6), 1081–1093. [https://doi.org/10.1007/s00018-012-1179-
y](https://doi.org/10.1007/s00018-012-1179-
y)
- Galdino, A. C. M., de Oliveira, M. P., Ramalho, T. C., de Castro, A. A., Branquinha, M. H., & Santos, A. L.
S. (2019). Anti-virulence strategy against the multidrug-resistant bacterial pathogen
pseudomonas aeruginosa: Pseudolysin (Elastase B) as a potential druggable target. *Current
Protein and Peptide Science*, *20*(5), 471–487. Scopus.
<https://doi.org/10.2174/1389203720666190207100415>
- Georgieva, Y., & Konthur, Z. (2011). Design and screening of M13 phage display cDNA libraries.
Molecules, *16*(2), 1667–1681. <https://doi.org/10.3390/molecules16021667>
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Bajyana Songa, E.,
Bendahman, N., & Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains.
Nature (London), *363*(6428), 446–448. <https://doi.org/10.1038/363446a0>
- Heck, L. W., Morihara, K., McRae, W. B., & Miller, E. J. (1986). Specific cleavage of human type III and
IV collagens by Pseudomonas aeruginosa elastase. *Infection and Immunity*, *51*(1), 115–118.
<https://doi.org/10.1128/iai.51.1.115-118.1986>
- Holliger, P., & Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains.
Nature Biotechnology, *23*(9), 1126–1136. <https://doi.org/10.1038/nbt1142>

- Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Robles Aguilar, G., Sharara, F., Mestrovic, T., Gray, A. P., Davis Weaver, N., Wool, E. E., Han, C., Gershberg Hayoon, A., Aali, A., Abate, S. M., Abbasi-Kangevari, M., Abbasi-Kangevari, Z., Abd-Elsalam, S., Abebe, G., Abedi, A., Abhari, A. P., Abidi, H., ... Naghavi, M. (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, *400*(10369), 2221–2248. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02185-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02185-7)
- Jacquot, J., Tournier, J. M., & Puchelle, E. (1985). In vitro evidence that human airway lysozyme is cleaved and inactivated by *Pseudomonas aeruginosa* elastase and not by human leukocyte elastase. *Infection and Immunity*, *47*(2), 555–560. <https://doi.org/10.1128/iai.47.2.555-560.1985>
- Jumapili, N. A., Zivalj, M., Barthelmess, R. M., Raes, G., De Groof, T. W. M., Devoogdt, N., Stijlemans, B., Vincke, C., & Van Ginderachter, J. A. (2023). A few good reasons to use nanobodies for cancer treatment. *European Journal of Immunology*, *53*(9), e2250024–e2250024. <https://doi.org/10.1002/eji.202250024>
- Jurica, M. S., & Moore, M. J. (2003). Pre-mRNA Splicing: Awash in a Sea of Proteins. *Molecular Cell*, *12*(1), 5–14. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00270-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00270-3)
- Kessler, E., & Spierer, A. (1984). Inhibition by phosphoramidon of *Pseudomonas aeruginosa* elastase injected intracorneally in rabbit eyes. *Current Eye Research*, *3*(8), 1075–1078. <https://doi.org/10.3109/02713688409011755>
- Kinoshita, S., Nakakido, M., Mori, C., Kuroda, D., Caaveiro, J. M. M., & Tsumoto, K. (2022). Molecular basis for thermal stability and affinity in a VHH: Contribution of the framework region and its influence in the conformation of the CDR3. *Protein Science*, *31*(11), e4450-n/a. <https://doi.org/10.1002/pro.4450>
- Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J., & Laustsen, A. H. (2018). Basics of antibody phage display technology. *Toxins*, *10*(6), 236. <https://doi.org/10.3390/toxins10060236>

Li, L., Wu, S., Si, Y., Li, H., Yin, X., & Peng, D. (2022). Single-chain fragment variable produced by phage display technology: Construction, selection, mutation, expression, and recent applications in food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(5), 4354–4377.

<https://doi.org/10.1111/1541-4337.13018>

L'OMS met à jour la liste des bactéries résistantes aux médicaments qui représentent la plus grande menace pour la santé humaine. (n.d.). Retrieved 25 July 2024, from

<https://www.who.int/fr/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>

MORIHARA, K., TSUZUKI, H., OKA, T., INOUE, H., & EBATA, M. (1965). PSEUDOMONAS AERUGINOSA ELASTASE. ISOLATION, CRYSTALLIZATION, AND PRELIMINARY CHARACTERIZATION. *The Journal of Biological Chemistry*, 240, 3295–3304.

Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: Natural single-domain antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 775–797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>

Muyldermans, S. (2021). Applications of Nanobodies. *Annual Review of Animal Biosciences*, 9(1), 401–421. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-083831>

Muyldermans, S., Cambillau, C., & Wyns, L. (2001). Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: The superfluous luxury of paired domains. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(4), 230–235. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01790-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01790-X)

Pillay, T. S., & Muyldermans, S. (2021). Application of single-domain antibodies ('nanobodies') to laboratory diagnosis. *Annals of Laboratory Medicine*, 41(6), 549–558.

<https://doi.org/10.3343/ALM.2021.41.6.549>

Riechmann, L., & Muyldermans, S. (1999). Single domain antibodies: Comparison of camel VH and camelised human VH domains. *Journal of Immunological Methods*, 231(1), 25–38.

[https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00138-6)

Romao, E., Morales Yáñez, F. J., Hu, Y., Crauwels, M., De Pauw, P., Ghassanzadeh Hassanzadeh, G., Devoogdt, N., Ackaert, C., Vincke, C., & Muyldermans, S. (2016). *Identification of Useful*

Nanobodies by Phage Display of Immune Single Domain Libraries Derived from Camelid Heavy Chain Antibodies.

- Saint-Criq, V., Villeret, B., Bastaert, F., Kheir, S., Hatton, A., Cazes, A., Xing, Z., Sermet-Gaudelus, I., Garcia-Verdugo, I., Edelman, A., & Sallenave, J.-M. (2018). Pseudomonas aeruginosa LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator–IL-6–antimicrobial–repair pathway. *Thorax*, *73*(1), 49–61. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210298>
- Schultz, D. R., & Miller, K. D. (1974). Elastase of Pseudomonas aeruginosa: Inactivation of Complement Components and Complement-Derived Chemotactic and Phagocytic Factors. *Infection and Immunity*, *10*(1), 128–135. <https://doi.org/10.1128/IAI.10.1.128-135.1974>
- Shinde, S. H., Sandeep, & Pande, A. H. (2024). Polyvalency: An emerging trend in the development of clinical antibodies. *Drug Discovery Today*, *29*(1), 103846–103846. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103846>
- Smith, G. P. (2019). Phage Display: Simple Evolution in a Petri Dish (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, *58*(41), 14428–14437. <https://doi.org/10.1002/anie.201908308>
- Tannukit, S., Crabb, T. L., Hertel, K. J., Wen, X., Jans, D. A., & Paine, M. L. (2009). Identification of a novel nuclear localization signal and speckle-targeting sequence of tuftelin-interacting protein 11, a splicing factor involved in spliceosome disassembly. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *390*(3), 1044–1050. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.111>
- Thayer, M. M., Flaherty, K. M., & McKay, D. B. (1991). Three-dimensional structure of the elastase of Pseudomonas aeruginosa at 1.5-Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, *266*(5), 2864–2871. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)49927-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)49927-9)
- van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D., & Thermes, C. (2018). The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends in Genetics*, *34*(9), 666–681. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.008>
- Wen, X., Lei, Y. P., Zhou, Y. L., Okamoto, C. T., Snead, M. L., & Paine, M. L. (2005). Structural organization and cellular localization of tuftelin-interacting protein 11 (TFIP11). *Cellular and*

Molecular Life Sciences : CMLS, 62(9), 1038–1046. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-4547->

z

Yang, J., Zhao, H.-L., Ran, L.-Y., Li, C.-Y., Zhang, X.-Y., Su, H.-N., Shi, M., Zhou, B.-C., Chen, X.-L., & Zhang, Y.-Z. (2015). Mechanistic insights into elastin degradation by pseudolysin, the major virulence factor of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 5(1), 9936. <https://doi.org/10.1038/srep09936>

Yoshimoto, R., Kataoka, N., Okawa, K., & Ohno, M. (2009). Isolation and characterization of post-splicing lariat–intron complexes. *Nucleic Acids Research*, 37(3), 891–902. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1002>

Zavrtanik, U., Lukan, J., Loris, R., Lah, J., & Hadži, S. (2018). Structural Basis of Epitope Recognition by Heavy-Chain Camelid Antibodies. *Journal of Molecular Biology*, 430(21), 4369–4386. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.09.002>

7. Annexes

7.1. Amorces

Gène cible	Nom de l'amorce	Séquence	Tm	Taille en bp
Promoteur Lac	MP57	5'-TTATGCTTCCGGCTCGTATG-3'	62°C	20
G3	G3	5'-CCACAGACAGCCCTCATAG-3'	62°C	19

Tableau A 1 : Amorces pour la PCR et le séquençage

7.2. Cycle pour la cPCR

95°C	5 min	20 x
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C	« ∞ »	

Tableau A 2 : Cycle pour la cPCR.

7.3. Exemple de tests lors du screening

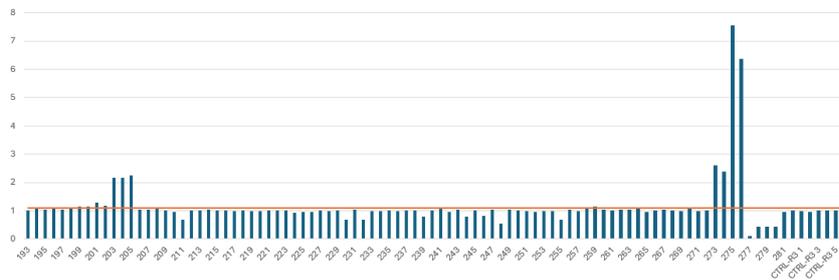


Figure A 1 : Test ratio +/- après 40 minutes sur les clones de LasB. Colonnes bleues : ratio +/- des échantillons, ligne rouge : seuil = moyenne + 3*écart-type des ratio +/- des contrôles.

7.4. Représentation des puits par clone lors d'un ELISA

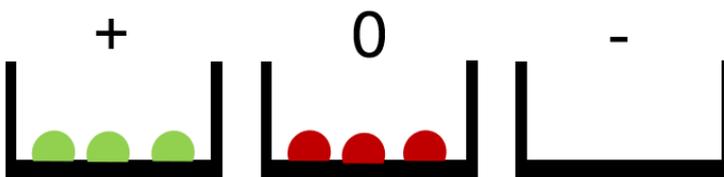
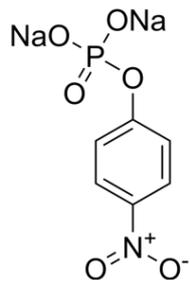


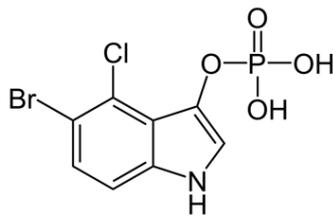
Figure A 2 : Représentation schématique des puits par clone lors d'un ELISA. puits + contient la protéine d'intérêt, puit 0 contient la protéine de contre sélection et puits - ne contient pas de protéine

7.5. Substrats : ELISA, WB et LasB

PNPP



BCIP



Abz-Ala-Gly-Leu-Ala-p-nitro-benzylamide

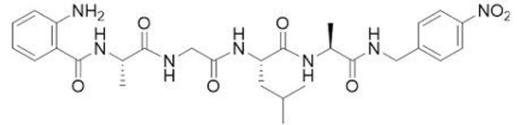


Figure A 3 : Substrats. ELISA : pNPP, WB :BCIP, LasB : Abz-Ala-Gly-Leu-Ala-p-nitro-benzylamide.

7.6. Spectre d'absorbance du Nb D108

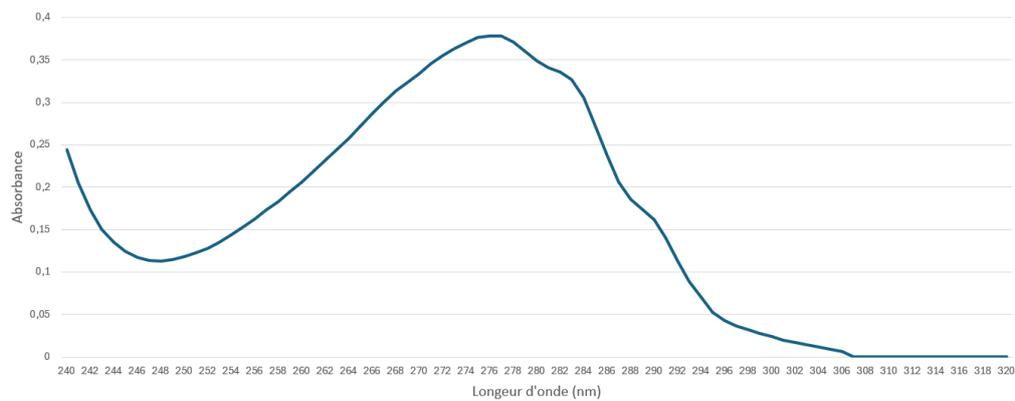


Figure A 4 : Spectre d'Abs du Nb D108 diluée 10 fois

7.7. Spectre d'absorbance du Nb L276

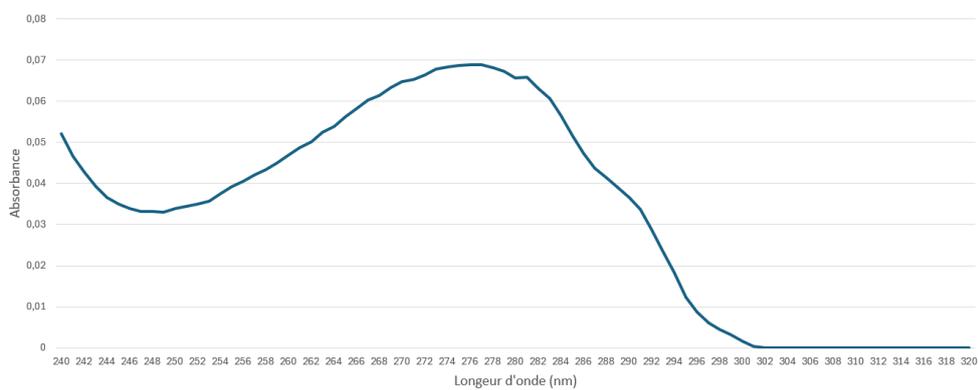


Figure A 5 : Spectre d'Abs du Nb L276