

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION D'UN ANTICORPS À CHAÎNE UNIQUE POUR LA LIGASE
E3 DE L'UBIQUITINE RNF167

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

MARYLOU GRAU

NOVEMBRE 2025

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de recherche, Marc Lussier, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et offert l'opportunité de mener à bien ce travail de recherche.

Je remercie également mes collègues et amis pour leur appui tout au long de ce parcours. Leur disponibilité, leurs conseils et leur énergie positive m'ont été d'une aide précieuse, en particulier Ève C. et Frédérique B.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux Professeurs Laurent Cappadocia et Steve Bourgault, du Département de chimie de l'UQAM, pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire et pour l'attention qu'ils lui accorderont. Je remercie particulièrement le Professeur Bourgault pour m'avoir permis d'utiliser son matériel, notamment son système de FPLC, contribuant ainsi à la qualité de ce projet et facilitant l'avancement de mes expériences.

Enfin, toute ma reconnaissance va à Martine Valiquette et Richard Grau pour leur soutien moral et leurs encouragements constants, sans oublier Louise Thériault pour sa patience inébranlable.

Vos encouragements et votre accompagnement tout au long de ce travail resteront pour moi un précieux souvenir.

Seul, on peut avancer, mais bien accompagné, on va plus loin.

DÉDICACE

Je dédie ce mémoire à mes parents, pour leur amour
incommensurable et leur confiance inébranlable.

À mes grands-parents, pour leur soutien constant et leurs
encouragements, qui m'ont donné la force d'aller de
l'avant.

À la mémoire de ma grand-mère, ma plus grande
admiratrice, dont l'amour et la fierté resteront à jamais
gravés en moi.

Sans vous, ce travail n'aurait jamais vu le jour.

AVANT-PROPOS

Ce travail trouve sa source dans ma profonde curiosité scientifique et mon désir constant d'approfondir mes connaissances. L'étude des VHH, en particulier, a suscité un intérêt marqué de ma part, notamment en raison des nombreuses perspectives innovantes qu'elles offrent dans le domaine de la recherche. C'est donc dans l'objectif d'apporter une contribution significative à la science que j'ai choisi ce sujet, en espérant enrichir la compréhension et ouvrir de nouvelles pistes de recherche.

Ce projet est de grande envergure, bien que certaines limites aient été inévitables, la principale difficulté rencontrée a été d'ordre financier. Le financement a constitué un défi majeur, demandant un engagement personnel constant et ralentissant parfois le progrès des travaux. Néanmoins, ces obstacles ont renforcé ma détermination et m'ont encouragé à poursuivre avec rigueur et persévérance.

Je tiens à remercier toutes les personnes et institutions qui ont, de près ou de loin, soutenu cette démarche.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
DÉDICACE.....	iii
AVANT-PROPOS	iv
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
RÉSUMÉ	xi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	2
1.1 Les modifications post-traductionnelles des protéines.....	2
1.1.1 Fonction des modifications post-traductionnelles	2
1.1.2 L'ubiquitination	3
1.1.2.1 Fonction de l'ubiquitination	3
1.1.2.2 Cascade enzymatique de l'ubiquitination et enzyme de l'ubiquitination	4
1.2 La famille des protéines à doigt RING.....	6
1.2.1 Classification et structure.....	6
1.2.2 Mécanisme de transfert de l'Ub.....	7
1.3 Ligase E3 à domaine RING transmembranaire	7
1.3.1 Fonctionnalité.....	7
1.3.2 Famille PA-TM-RING.....	8
1.3.2.1 Topologie et domaines structuraux	8
1.3.2.2 Rôle du domaine PA et RING.....	8
1.4 RNF167	10
1.4.1 Différente isoforme de RNF167.....	10
1.4.2 Localisation cellulaire de la RNF167	11
1.4.2.1 Localisation à la membrane.....	11
1.4.2.2 Localisation au lysosome et endosome.....	12
1.4.3 Fonction de la RNF167.....	13
1.5 Nécessité d'outils innovants pour l'étude des E3 ligases.	16
1.5.1 Limites des approches classiques	16
1.5.2 Les nanocorps comme technologie alternative	17
1.5.3 Application spécifique à RNF167.....	18
1.6 Présentation du nanocorps RNF167-A5	18
1.6.1 Origine et développement	18
1.6.2 Fonctionnalité.....	19

1.6.3	Spécificité et affinité.....	19
1.6.4	Avantages par rapport aux anticorps traditionnels.....	20
1.6.5	Potentiel d'utilisation	21
1.7	Objectif de l'étude.....	21
CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES.....		23
2.1	Anticorps traditionnels	23
2.2	Construction de l'ADN plasmidique.....	24
2.2.1	Nanocorps RNF167-A5	24
2.2.2	Condition de PCR.....	24
2.2.3	Amorces utilisées pour les PCR	24
2.2.4	Protéine de fusion nanocorps RNF167-A5 avec EGFP et mCherry	25
2.2.5	Purification des produits de digestion sur gel d'agarose	25
2.2.6	Ligation des fragments d'ADN au vecteur digéré.....	26
2.2.7	Amplification d'ADN plasmidique (Mini Prep) et validation	26
2.2.8	Dosage de l'ADN par NanoDrop	27
2.3	Préparation des bactéries chimiocompétentes.....	27
2.4	Transformation bactérienne.....	27
2.5	Production et purification des protéines.....	28
2.5.1	Expression et extraction des protéines recombinantes (<i>E. coli</i>)	28
2.5.2	Chromatographie d'affinité.....	28
2.5.2.1	Purification de 6xHis-TEV-Trx-VHH.....	28
2.5.2.2	Purification de GST-VHH, GST-VHH-EGFP et GST-VHH-mCherry.....	29
2.5.3	Clivage de la GST	29
2.5.4	Chromatographie d'exclusion stérique	29
2.5.5	Dialyse	30
2.6	Dosage des protéines	30
2.7	Marquages des protéines au FITC	30
2.8	Électrophorèse sur gel (SDS-PAGE).....	30
2.9	Immunobuvardage de type western	31
2.10	Culture et transfection cellulaire	31
2.11	Essais de liaison <i>in vitro</i>	32
2.11.1	Lyse des cellules HEK293T/17	32
2.11.2	Essai d'interaction par GST <i>pull-down</i>	32
2.12	Microscopie	32
2.12.1	Immunomarquage.....	33
2.12.2	Essais d'internalisations	33
2.13	Répression génique (knock-down)	34
2.14	Analyse d'images et traitement statistique des données.....	35
CHAPITRE 3 RÉSULTATS		36

3.1	Première stratégie de production du nanocorps RNF167-A5	36
3.1.1	Clonage du VHH (RNF167-A5) dans le vecteur pRSF-Trx.....	36
3.2	Deuxième stratégie de production du nanocorps	38
3.2.1	Clonage du VHH (RNF167-A5) dans le vecteur pGEX-4T1	38
3.2.2	Essais de liaison <i>in vitro</i>	39
3.2.3	Fonctionnalisation du nanocorps RNF167-A5	43
3.3	Analyse non concluante de l'endocytose des nanocorps RNF167-A5 en microscopie d'immunofluorescence.....	51
3.4	Immunomarquage de la ligase RNF167 à l'aide de nanocorps sur cellules fixées et perméabilisées.....	55
3.5	Validation des résultats d'immunofluorescence par répression génique	59
	CHAPITRE 4 DISCUSSION.....	62
4.1	Première stratégie de production du nanocorps RNF167-A5	62
4.1.1	Hypothèses sur l'échec de la purification de 6xHis-Trx-VHH	62
4.2	Deuxième stratégie de production du nanocorps	64
4.2.1	Optimisation des conditions d'élutions.....	65
4.3	Choix du modèle d'expression et validation du nanocorps RNF167-A5.....	66
4.4	Fonctionnalisation réussie du nanocorps RNF167-A5 et validation	69
4.5	Échec de l'étude de l'endocytose de la ligase E3 RNF167 via les VHH monomérique RNF167-A5. ...	72
4.6	Immunomarquage réussi après fixation et perméabilisation des cellules et validation.	74
	CONCLUSION	77
	ANNEXE A Traduction de la séquence codant la protéine 6xHis-Trx-VHH.....	78
	ANNEXE B Stratégie de PCR et de clonage pour la génération de pGEX-4T1-VHH (+ site de restriction)...	79
	ANNEXE C Stratégie de PCR et de clonage pour la génération des plasmides pGEX-4T1-VHH-EGFP et pGEX-4T1-VHH-mCherry.....	80
	APPENDICE A Liste des plasmides utilisés avec leurs caractéristiques et utilisation.	81
	BIBLIOGRAPHIE	82

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Diversité de liaison de l'Ub à la protéine cible.....	4
Figure 1.2 Cascade enzymatique de l'ubiquitination.....	5
Figure 1.3 Classification des sous-familles des protéines RNF.....	6
Figure 1.4 Structure tridimensionnelle d'une protéine PA-TM-RING.	9
Figure 1.5 Isoformes de RNF167.....	11
Figure 1.6 RNF167 active mTORC1 via la dégradation de CASTOR1.....	14
Figure 1.7 Contrôle de recyclage endosomal par RNF167 via l'ubiquitination de VAMP3.....	15
Figure 3.1 Analyse de la purification de 6xHis-Trx-VHH.	37
Figure 3.2 Analyse de la purification de GST-VHH et optimisation du tampon d'élution.....	40
Figure 3.3 Essai de liaison <i>in vitro</i> entre la protéine de fusion GST-VHH (RNF167-A5) et RNF167.....	41
Figure 3.4 Essai liaison <i>in vitro</i> entre la protéine de fusion GST-VHH (RNF167-A5) et la protéine RNF13.....	43
Figure 3.5 Visualisation des protéines marquées FITC par électrophorèse sur gel.	45
Figure 3.6 Analyse de la purification des protéines de fusion GST-VHH-EGFP et GST-VHH-mCherry.	47
Figure 3.7 Optimisation de la réaction de clivage enzymatique par thrombine protéase humaine de l'étiquette GST des protéines recombinantes GST-VHH-EGFP et GST-VHH-mCherry.....	48
Figure 3.8 Analyse de la seconde purification de la protéine de fusion GST-VHH-EGFP.	50
Figure 3.9 Essai d'interaction <i>in vitro</i> par GST <i>pull-down</i> entre les VHH (RNF167-A5) produits et RNF167.	51
Figure 3.10 Analyse par microscopie à fluorescence de l'efficacité de liaison des différents variants de VHH pour RNF167 sur cellules vivantes.	53
Figure 3.11 Isolation du monomère de VHH RNF167-A5 par SEC.	54
Figure 3.12 Évaluation de la concentration en VHH pour la détection de RNF167 par immunofluorescence qualitative.	56
Figure 3.13 Analyse qualitative par microscopie à fluorescence de l'efficacité des différents variants de VHH à détecter RNF167 endogène.	58
Figure 3.14 Validation indirecte par microscopie après fixation et perméabilisation en condition de surexpression.	58

Figure 3.15 Analyse du niveau d'expression de RNF167 dans les cellules HEK293T à différents temps post-transfection avec siRNA.	60
Figure 3.16 Validation de la spécificité du marquage par immunofluorescence après traitement par siRNA.	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Liste des anticorps utilisés avec leurs caractéristiques et applications.....	23
---	----

RÉSUMÉ

RNF167, une ligase E3 de l'ubiquitine, demeure peu étudiée malgré son implication potentielle dans divers processus physiologiques d'intérêt tels que le routage intracellulaire. Ce projet vise à développer un outil à base de nanocorps (VHH) pour détecter et suivre RNF167 en contexte cellulaire par microscopie d'immunofluorescence. Le nanocorps (RNF167-A5), initialement présenté dans l'article de Siepe et al. (2023) comme outil de ciblage multivalent, a été détourné de son utilisation primaire et modifié pour générer plusieurs versions recombinantes monovalentes fusionnées à des fluorophores ou une étiquette d'affinité. Des tests d'interaction de liaison *in vitro* de type GST pull-down ont confirmé la spécificité des nanocorps GST-VHH produits en *Escherichia coli* envers RNF167. La spécificité du nanocorps marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) a également été confirmée *in vitro*. Cependant, aucun essai n'a permis de valider la spécificité des VHH fusionnés en C-terminal avec des protéines fluorescentes, ce qui suggère que la fusion à EGFP ou à mCherry a vraisemblablement perturbé leur fonction. La reconnaissance de RNF167 en microscopie dépendait du contexte d'accessibilité dans les cellules HEK293T. Aucun signal n'a été observé en cellules vivantes, dans un contexte natif ou de surexpression, mais uniquement après perméabilisation, ce qui a empêché l'étude du trafic cellulaire de RNF167 par endocytose des VHH. L'analyse des signaux de fluorescence obtenue en conditions de surexpression de RNF167 sur des cellules perméabilisées était corrélée à une augmentation du signal de GST-VHH, suggérant une certaine spécificité fonctionnelle. Cependant, la répression génique de RNF167 par un petit ARN interférant n'a pas diminué de manière significative le signal de GST-VHH. Ce travail représente une étape préliminaire importante dans le développement d'un outil spécifique pour l'étude fondamentale de la ligase RNF167 et souligne les défis liés à l'utilisation des VHH en imagerie. Il ouvre de nouvelles perspectives et pourrait offrir un modèle applicable à l'étude d'autres ligases E3.

Mots-clés : Ligase E3 RNF167, anticorps à domaine unique (VHH), protéine recombinante, microscopie d'immunofluorescence.

INTRODUCTION

L'état actuel des connaissances révèle que la ligase E3 RNF167 demeure peu étudiée, malgré son implication dans le maintien de la santé humaine. De plus, les outils disponibles pour l'étude fonctionnelle de cette ligase sont limités. Le développement d'un nanocorps ciblant spécifiquement cette ligase représente une solution pertinente à cette lacune.

Ce travail vise à produire et à évaluer l'utilisation de l'anticorps à chaîne unique de type VHH (RNF167-A5) pour l'étude de RNF167. En tirant avantage des propriétés uniques des VHH, ce nanocorps pourrait servir d'outil biologique innovant pour le marquage en microscopie et à l'étude des fonctions de RNF167, une ubiquitine E3 ligase à domaine RING, afin de mieux comprendre sa localisation subcellulaire et son trafic intracellulaire.

L'étude se limite principalement à la production et la caractérisation fonctionnelle du VHH (RNF167-A5), au développement de variantes et à leur évaluation en tant qu'approche expérimentale en microscopie d'immunofluorescence.

Le VHH (RNF167-A5) a été produit et purifié à partir d'un système d'expression bactérien (*E. coli*). Des essais d'interaction *in vitro* par GST pull-down ont confirmé l'interaction entre le VHH produit et la ligase RNF167. Des études de microscopie ont été envisagées pour l'étude du routage intracellulaire de RNF167. Pour valider la spécificité du signal d'immunomarquage après fixation, des expériences de knockdown de RNF167 à l'aide de siRNA spécifique ont été réalisées.

Ce projet contribuera à une meilleure compréhension des défis liés à l'utilisation des VHH en tant qu'outils d'imagerie et ouvrira de nouvelles perspectives pour l'étude des E3 ligases en biologie cellulaire. Ce mémoire se divise en plusieurs sections. Il commence par une revue de littérature, puis présente de manière détaillée les méthodes et matériaux utilisés dans le projet. La section qui suit présente les résultats obtenus avant de laisser la place à la discussion, qui compare ceux-ci avec les connaissances actuelles, en soulignant les points forts et les limites du projet ainsi que les pistes possibles de poursuite.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Les modifications post-traductionnelles des protéines.

Les protéines sont des acteurs clés dans le maintien des fonctions cellulaires et de l'homéostasie cellulaire. Presque toutes les interactions ou processus biologiques au sein des êtres vivants impliquent des protéines (Morris, Black et Stollar, 2022). La synthèse des protéines débute par la transcription de l'ADN en ARN messenger, lequel est ensuite traduit en une séquence polypeptidique qui constituera la future protéine. Toutefois, ce processus ne s'arrête pas là. Une fois traduites, les protéines peuvent subir un ensemble de modifications chimiques et/ou biologiques, appelées modifications post-traductionnelles (PTMs, de l'anglais *post-translational modifications*), qui contribuent à la complexité des organismes en modifiant la structure et la fonction des protéines (Chen *et al.*, 2023). Entre autres, ces modifications joueront un rôle déterminant dans la localisation, la stabilité et l'activité fondamentale des protéines.

Les PTMs sont énormément diversifiées. Elles peuvent être réversibles ou irréversibles et incluent notamment, sans s'y limiter, la phosphorylation, la méthylation, l'acétylation, la glycosylation, la sumoylation et l'ubiquitination (Wang, Peterson et Loring, 2014). À ce jour, plus de 650 types de modifications de protéines ont été décrits, et ce nombre est en constante augmentation (Zhong *et al.*, 2023). Une perturbation des PTMs peut entraîner la dysfonction de processus biologiques vitaux et causer l'apparition de diverses maladies (Ramazi et Zahiri, 2021). La compréhension de ces processus est donc essentielle pour comprendre le comportement cellulaire et le rôle que jouent les PTMs dans divers pathologies.

1.1.1 Fonction des modifications post-traductionnelles

Comme mentionné précédemment, les modifications post-traductionnelles sont des modifications qui surviennent après la traduction des protéines. Les PTMs peuvent contrôler la capacité des protéines en leur introduisant de nouvelles fonctionnalités, comme la régulation de leur activité enzymatique ou de leur stabilité (Muller, 2018). Ce processus permet au système biologique d'ajuster rapidement la fonction des protéines, en fonction des besoins de la cellule, sans nécessiter de nouvelles synthèses protéiques (Keenan, Zachman et Hirsche, 2021). Ainsi, les PTMs augmentent la complexité du protéome et constituent une remarquable adaptation des systèmes biologiques. Par exemple, la phosphorylation des

protéines est l'une des PTMs les plus abondantes chez l'homme et la plus étudiée. La phosphorylation est une altération covalente d'une protéine par l'addition enzymatique d'un groupe phosphate à celle-ci. Ce phénomène joue un rôle essentiel dans l'homéostasie cellulaire et agit souvent comme interrupteur marche/arrêt de l'activité d'une protéine (Zhong *et al.*, 2023). Ainsi, la phosphorylation joue un rôle crucial dans la définition de l'identité d'une protéine, car elle influence sa structure, sa fonction et ses interactions. Cependant, le rôle physiologique de nombreuses PTMs demeure encore inconnu à ce jour.

1.1.2 L'ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle importante dans la régulation des protéines. Cette modification consiste en la conjugaison covalente d'une ou plusieurs petites molécules d'ubiquitine (Ub) à la protéine cible. L'ubiquitine est une protéine eucaryote de faible poids moléculaire, composée de 76 résidus d'acides aminés, qui se retrouve dans les cellules, libre ou liée à de nombreuses protéines, souvent sous la forme de chaînes de poly-ubiquitine, composées de plusieurs Ub (Komander et Rape, 2012; Ozkaynak *et al.*, 1987). La liaison covalente de monomères d'ubiquitine ou de chaînes d'ubiquitine est généralement effectuée sur les résidus de lysine des protéines, mais peut également, dans certains cas, être effectuée sur les chaînes latérales de la sérine, de la thréonine et de la cystéine (McClellan, Laugesen et Ellgaard, 2019). Ce processus est hautement spécifique et réversible. La figure 1.1 présente une version simplifiée des scénarios possibles de liaison de l'ubiquitine à une protéine cible. En réalité, les chaînes d'ubiquitine peuvent être composées de liaisons identiques ou variées entre les molécules d'Ub, être ramifiées ou linéaires, et former différentes conformations et longueurs, ce qui va influencer leur fonction biologique (McClellan, Laugesen et Ellgaard, 2019; Nguyen *et al.*, 2014).

1.1.2.1 Fonction de l'ubiquitination

Ce type de modification peut permettre de cibler des protéines et de les marquer afin de signaler leur dégradation par le protéasome, ce qui élimine les protéines inutiles ou mal repliées. Cependant, l'ubiquitination des protéines peut aussi servir à modifier leur emplacement cellulaire, leur activité fondamentale et leurs interactions, selon le type de conjugaison impliqué (Finley *et al.*, 2012). Par conséquent, cette modification post-traductionnelle joue un rôle polyvalent dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.

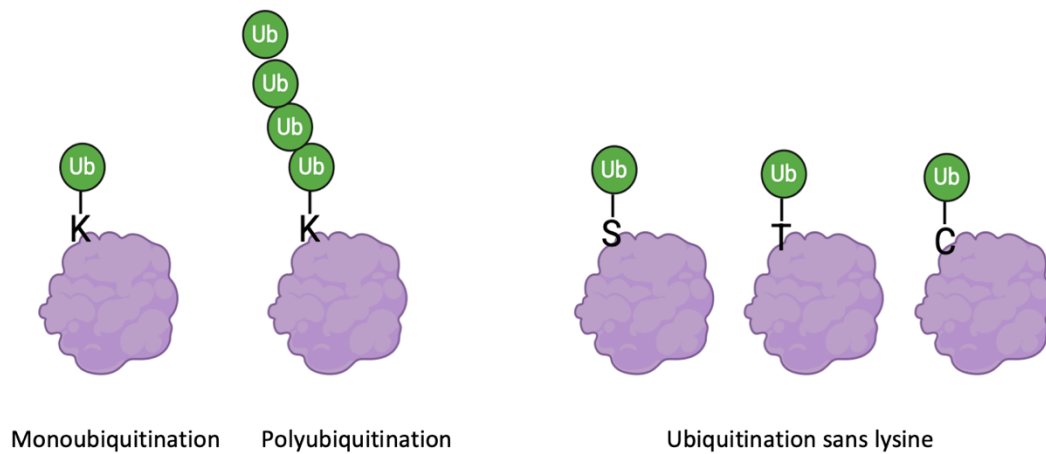


Figure 1.1 Diversité de liaison de l'Ub à la protéine cible.

La monoubiquitination se produit lorsqu'une seule Ub est attachée à la protéine cible, tandis que la polyubiquitination est lorsque plusieurs Ub sont liées à une protéine cible. L'ubiquitine est généralement liée de manière covalente sur les résidus de lysine (K) des protéines, mais elle peut plus rarement se lier sur des résidus de sérine (S), de thréonine (T) ou encore de cystéine (C). Ces modifications sont importantes pour la diversité des fonctions cellulaires et des voies de signalisation. Ub : ubiquitine. Créé avec BioRender.com

1.1.2.2 Cascade enzymatique de l'ubiquitination et enzyme de l'ubiquitination

Le mécanisme d'ubiquitination se déroule en trois étapes lors d'une cascade enzymatique, impliquant successivement trois enzymes clés : une enzyme E1 activatrice de l'ubiquitine, une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2, puis une E3 ligase de l'ubiquitine (figure 1.2). Parmi celles-ci, l'enzyme E3 occupe un rôle déterminant dans ce processus.

Pour commencer, la famille d'enzymes E1 initie la cascade d'ubiquitination en activant l'ubiquitine dans une réaction dépendante de l'ATP. La E1 forme un lien thioester temporaire entre l'Ub et son site actif et coordonne l'utilisation de l'ubiquitine dans les voies en aval spécifiques en chargeant la E2 apparentée (Schulman et Harper, 2009). Ainsi, vient l'étape intermédiaire où l'enzyme de conjugaison E2 se lie à la molécule d'Ub pour former un conjugué E2-Ub intermédiaire pour ensuite former un complexe avec la E3 ligase et le substrat ciblé. La formation du complexe peut entraîner soit le transfert direct de l'ubiquitine à la protéine cible par la E2 ou soit par le transfert de l'ubiquitine à la E3 qui va ensuite effectuer le transfert

sur le substrat. Dans tous les cas, l'E3 ligase est responsable de la coordination de la conjugaison de l'ubiquitine en se liant à la protéine ciblée.

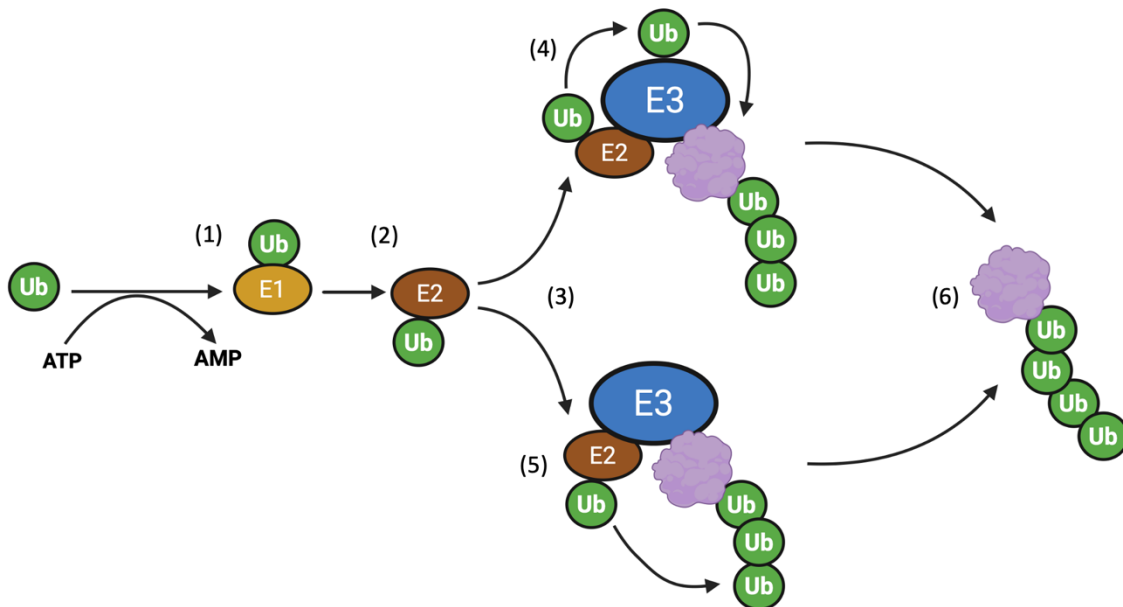


Figure 1.2 Cascade enzymatique de l'ubiquitination.

Représentation schématisée simplifiée illustrant les étapes clés de la cascade enzymatique de l'ubiquitination. (1) La cascade enzymatique implique trois enzymes E1/E2/E3 et commence par l'activation de l'Ub par l'enzyme E1 dans une réaction dépendante de l'ATP. (2) Une fois activée, l'Ub est transférée à l'enzyme E2 pour former un conjugué E2-Ub. (3) Ensuite, le conjugué E2-Ub formera un complexe avec la ligase E3 et l'un de ses substrats protéiques. La formation de ce complexe va entraîner le transfert de l'Ub soit à la E3 puis sur le substrat (4) ou directement à la protéine par la E2 (5). Les Ub peuvent être transférés successivement jusqu'à la formation de chaînes de poly-Ub. (6) Les protéines poly-ubiquitinées peuvent être destinées à la dégradation ou remplir d'autres fonctions cellulaires, comme participer à des voies de signalisation. E1, Enzyme d'activation de l'ubiquitine ; E2, Enzyme de conjugaison de l'ubiquitine ; E3, Ubiquitine ligase ; ATP, adénosine triphosphate ; AMP, Adénosine monophosphate ; Ub, ubiquitine. Créé avec BioRender.com

Le rôle des ligases E3 est primordial dans la cascade d'ubiquitination en raison de leur fonction de reconnaissance spécifique des substrats. Elles assurent le ciblage précis des protéines à modifier en guidant l'ubiquitine vers des résidus lysine spécifiques, garantissant ainsi la spécificité du système d'ubiquitine. La famille des ligases E3 est la plus nombreuse et la plus diversifiée comparativement aux enzymes E1 et E2. Les E3 sont réparties principalement en trois grandes familles, soit la famille RING (*Really*

Interesting New Gene), la famille HECT (*Homologous to the E6-AP Carboxyle terminus*) et la famille U-box. Chez l'humain, 1 à 2 % de l'ensemble des gènes codent pour des ligases de type E3 et en majeure partie pour des ligases E3 à domaine RING (Li *et al.*, 2008).

1.2 La famille des protéines à doigt RING

1.2.1 Classification et structure

Les protéines RNF ont en commun la caractéristique structurale d'avoir un domaine RING. Le domaine RING est un domaine de liaison de zinc, caractérisé par la présence de motifs riches en cystéine et en histidine, qui permettent la coordination de deux ions zinc (Chasapis et Spyroulias, 2009). Ce domaine spécifique confère aux protéines RNF leur fonction d'ubiquitine ligase E3, car il leur permet de recruter les enzymes E2 et de coordonner le transfert de l'ubiquitine vers la protéine ciblée. Les protéines de la famille RING sont classées en cinq sous-familles (figure 1.3).

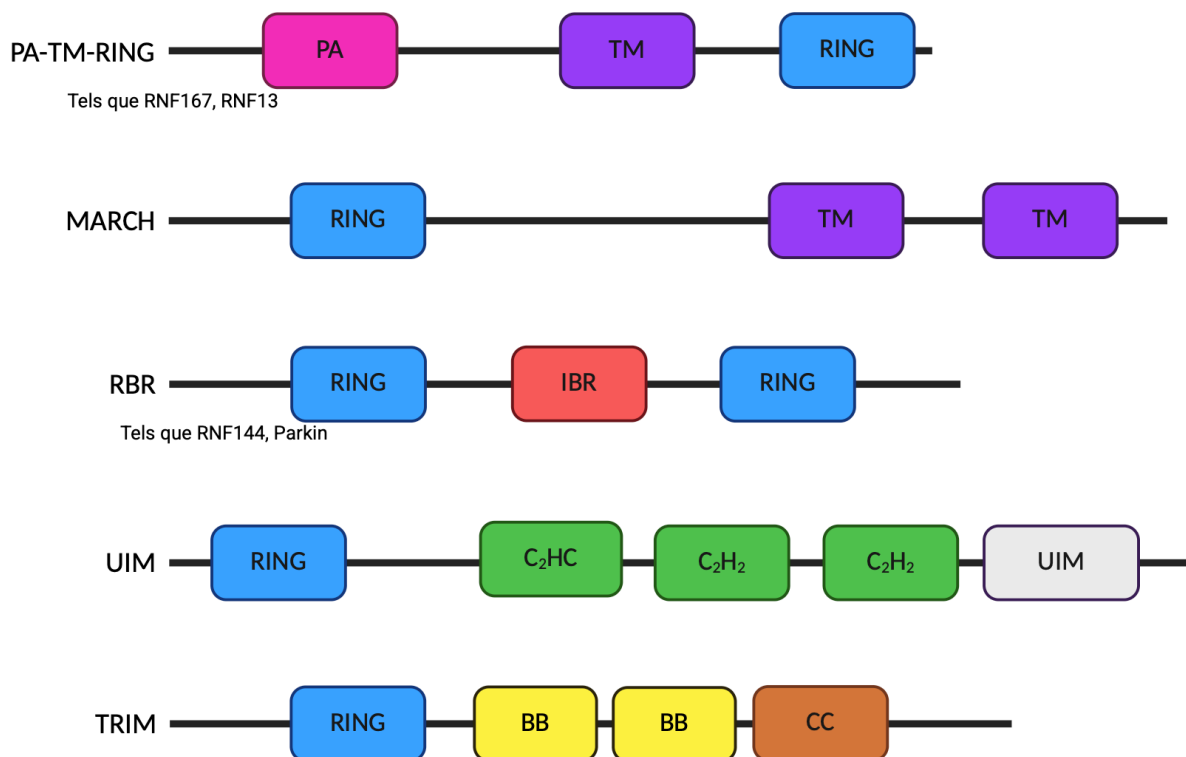


Figure 1.3 Classification des sous-familles des protéines RNF.

Tous les membres de la famille RNF sont caractérisés par la présence d'un domaine RING. Chaque sous-famille possède ses propres domaines, outre le domaine RING conservé, qui permettent leur classification.

Adaptée de Cai, 2022. RING, really interesting new gene ; PA, domaine associé à la protéase ; TM, domaine transmembranaire ; MARCH, membrane-associated RING-CH ; RBR, RING-between-RING ; IBR, in-between RING domain ; UIM, ubiquitin-interacting motif ; TRIM, tripartite motif ; BB, B-Box ; CC, coiled-coil. Créé avec BioRender.com

Chaque sous-famille présente des domaines structuraux particuliers, en plus du domaine RING conservé, qui définissent leur architecture et permettent leur classification.

La sous-famille PA-TM-RING est caractérisée par le domaine associé à la protéase (PA), qui est un domaine d'interaction protéine-protéine, et un domaine transmembranaire (TM) (Erickson, 2011). La sous-famille MARCH (*membrane-associated RING-CH E3 ubiquitin ligases*) est caractérisée par la présence de deux ou plusieurs domaines TM (Lin, Li et Shu, 2019). La sous-famille RBR (*RING-between-RING*) est la plus petite classe de E3 et est caractérisée par un domaine IBR (*in-between RING*) et possède deux domaines RING (Reiter et Klevit, 2018). La sous-famille UIM (*ubiquitin-interacting motif*) est caractérisée par la présence d'un doigt de zinc de type C₂HC, deux doigts de zinc de type C₂H₂ et un domaine UIM (Fan *et al.*, 2024). Finalement, la sous-famille TRIM (*tripartite motif*) est caractérisée par la présence d'un ou deux domaines BB (B-Box), qui sont également des motifs de liaison au zinc, et un domaine CC (*coiled-coil*) (Cai *et al.*, 2022).

1.2.2 Mécanisme de transfert de l'Ub

La plupart des ligases E3 à domaine RING transfèrent l'ubiquitine du complexe E2-Ub directement au substrat, en agissant comme protéine d'échafaudage, à l'exception de la sous-famille RBR (Spratt, Walden et Shaw, 2014). Comme mentionné précédemment, les protéines RNF de cette famille possèdent deux domaines RING, qui occupent des fonctions différentes. Le domaine RING en N-terminal utilise le mécanisme classique de transfert de l'Ub tandis que le domaine RING en C-terminal transfère l'Ub de E2-Ub en formant un complexe intermédiaire E3-Ub avant de conjuguer l'Ub au substrat (Dunkerley et Shaw, 2017). Leur mécanisme hybride d'ubiquitination les distingue des autres E3 RING.

1.3 Ligase E3 à domaine RING transmembranaire

1.3.1 Fonctionnalité

Certaines ligases E3, en particulier celles qui possèdent des domaines transmembranaires, participent activement à la régulation du trafic intracellulaire et du routage vésiculaire. Elles interviennent dans le tri des protéines membranaires, le transport endosomal ou la dégradation lysosomale (Yamazaki *et al.*, 2013).

De plus, ces processus contribuent significativement à la régulation de la signalisation cellulaire. En effet, l'ubiquitination de certains récepteurs activés en surface cellulaire, par des E3 ligases, peut conduire à leur endocytose, leur tri endosomal, puis leur dégradation lysosomale. Ce qui entraîne leur inactivation et l'arrêt de la signalisation cellulaire. Par exemple, la polyubiquitination du récepteur IL-3 α (IL-3R α) à la surface membranaire par l'Ub E3 ligase RNF128, une protéine RING transmembranaire, favorise sa dégradation par la voie lysosomale, régulant ainsi négativement la voie de signalisation IL-3/STAT5, impliquée dans la réponse inflammatoire (Yu *et al.*, 2024). Il est toutefois intéressant de souligner que les fonctions des E3 ligases sont en partie attribuables à leur capacité à catalyser l'ubiquitination de protéines cibles.

1.3.2 Famille PA-TM-RING

1.3.2.1 Topologie et domaines structuraux

La famille PA-TM-RING regroupe les ligases E3 caractérisées par un domaine PA, un domaine TM et un domaine RING. La figure 1.4 montre l'arrangement structural d'une E3 ligase à domaine RING, la RNF167. Dans les cellules, le domaine PA luminal est exposé à l'extérieur des cellules lorsqu'il est situé à la membrane plasmique, ou du côté luminal des vésicules intracellulaires. Le domaine transmembranaire assure l'ancrage des E3 RING dans les membranes, à la fois au niveau de la membrane plasmique ou celle des organites intracellulaires, tels que les endosomes et les lysosomes. Quant à lui, le domaine RING est exposé du côté du cytosol. Ce type d'organisation structurale est conservé chez les mammifères, les Xénopus, une espèce d'amphibien, les végétaux, mais aussi chez certaines espèces d'insectes comme la drosophile (Bocock *et al.*, 2009).

1.3.2.2 Rôle du domaine PA et RING

Comme d'autres ligases E3 à domaine transmembranaire, les protéines PA-TM-RING sont impliquées dans le routage des protéines membranaires, la signalisation cellulaire et le trafic membranaire. En théorie, les domaines PA présentent une séquence conservée entre les différentes protéines et sont fréquemment impliqués dans les interactions protéine-protéine (Luo et Hofmann, 2001). Cependant, le rôle exact de ce domaine au sein de la famille des ligases d'ubiquitine PA-TM-RING demeure encore mal compris. Certaines études ont toutefois identifié un rôle fonctionnel pour le domaine PA, révélant qu'il est nécessaire à la localisation endosomale de certaines E3 RING, comme RNF167 chez l'humain (van Dijk, Yamazaki et Palmer, 2014). Or, la localisation subcellulaire des E3 est un facteur déterminant pour leur fonction. Par conséquent, des études ont démontré que certaines mutations du domaine PA de RNF13 et

RNF167, qui n'affectent pas leur activité de ligase, peuvent perturber leur localisation. De plus, des mutations ont été identifiées dans des tumeurs humaines, ce qui soutient l'idée que le domaine PA occupe

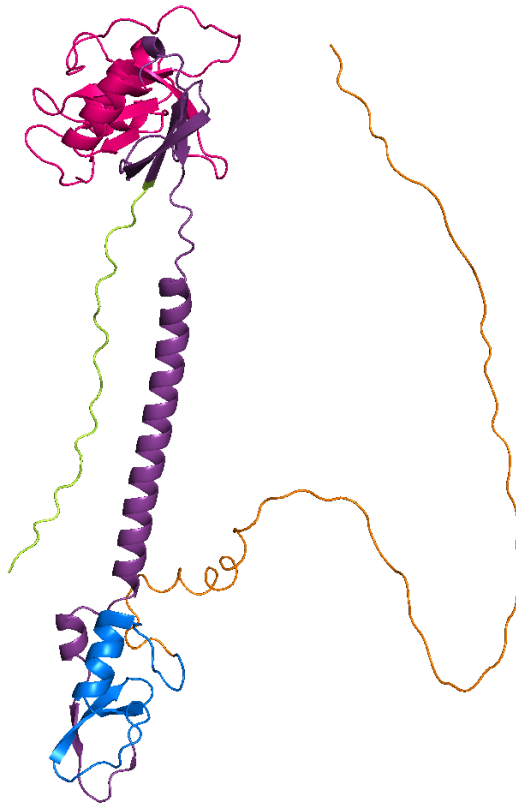


Figure 1.4 Structure tridimensionnelle d'une protéine PA-TM-RING.

Représentation schématique en rubans de la structure multidomaine de la ligase E3 RING 167 (AlphaFoldDB, AF-Q9H6Y7-F1-v4). Les RNF167 sont des protéines PA-TM-RING qui sont des protéines membranaires. Leur principale caractéristique est la présence d'un domaine PA (rose), d'un domaine transmembranaire (mauve) qui sert d'ancrage aux E3 RING dans les membranes, et la présence d'un domaine RING (bleu) qui confère leur activité de ligase. La structure d'une région désordonnée (orange) et un peptide signal (vert) est visible dans la structure de l'isoforme 1 de RNF167. La structure protéique provient de la base de données AlphaFold (AFDB) et a été modélisée sans contrainte membranaire, ce qui limite la fiabilité de son positionnement tridimensionnel *in vivo* (Chasapis et Spyroulias, 2009; Jumper *et al.*, 2021). La représentation graphique a été générée avec PyMOL Molecular Graphics System, version 3 (Schrodinger, 2015).

un rôle non négligeable dans la régulation subcellulaire et fonctionnelle des ligases E3 de type PA-TM-RING (van Dijk, Yamazaki et Palmer, 2014). De plus, le domaine RING confère l'activité de ligase des protéines PA-TM-RING. De même, des mutations du domaine RING de ces protéines, qui affectent

l'activité de l'ubiquitine ligase et sa fonction, ont été identifiées dans des échantillons de tumeur humaine (van Dijk, Yamazaki et Palmer, 2014). Par conséquent, un domaine PA et un domaine RING intact semblent nécessaires pour que les protéines PA-TM-RING puissent cibler et ubiquitiner efficacement leur substrat et remplir leur fonction.

1.4 RNF167

RNF167 est une E3 ubiquitine ligase qui appartient à la sous-famille PA-TM-RING. La structure propre de cette famille lui permet d'exercer son activité d'ubiquitine ligase localisée aux membranes cellulaires externes et intracellulaires, notamment situées au compartiment endo-lysosomiaux, ses principaux sites de localisation subcellulaire (Deshar *et al.*, 2016). Le gène *RNF167*, situé sur le chromosome 17 chez l'humain, code pour cette protéine. En théorie, les protéines PA-TM-RING semblent être exprimées à de faibles niveaux dans tous les tissus et espèces de mammifères (Erickson, 2011). En considérant que l'ARNm de RNF167 a été détecté dans tous les tissus analysés, toutes les données convergent vers l'hypothèse que RNF167 est exprimé dans tous les tissus humains, sans exception documentée (Atlas, 2024c; Karlsson *et al.*, 2021). En considérant cela, il convient de penser que RNF167 remplit une fonction cellulaire fondamentale, voire nécessaire à la survie ou au fonctionnement de nombreux types de cellules. Malgré cela, la protéine RNF167 reste relativement peu étudiée.

1.4.1 Différente isoforme de RNF167

La littérature scientifique a décrit deux isoformes principales de RNF167 chez l'humain. Ces isoformes correspondent à des variants de RNF167 de différentes longueurs (figure 1.5). D'abord, l'isoforme 1, RNF167-a, qui correspond à l'isoforme canonique, est la forme pleine longueur de RNF167 de 350 acides aminés. Ensuite, l'isoforme 2, RNF167-b, la forme courte de la protéine avec 315 acides aminés, serait un variant résultant probablement d'un épissage alternatif. Ce variant est dépourvu des 35 premiers acides aminés qui codent pour le peptide signal présent dans l'isoforme canonique (UniProt, 2024). Un peptide signal agit comme une étiquette d'expédition intracellulaire permettant le transport précis des protéines vers leurs destinations respectives, notamment pour être pris en charge par la machinerie d'insertion membranaire (Owji *et al.*, 2018; Shao et Hegde, 2011). Ainsi, en théorie, en l'absence de peptide signal, la protéine traduite demeure dans le cytosol, car elle ne peut s'insérer dans la membrane de manière autonome.

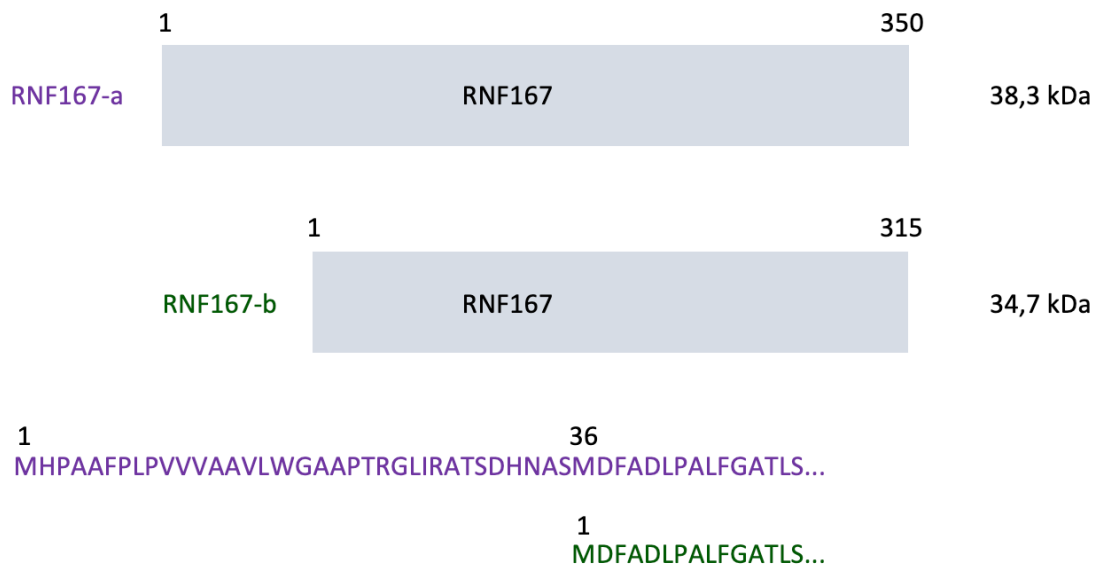


Figure 1.5 Isoformes de RNF167.

Schéma représentant deux isoformes différentes de RNF167. L'isoforme 1, RNF167-a, est la forme pleine longueur de 350 acides aminés avec un poids moléculaire attendu de 38,3 kDa et l'isoforme 2, RNF167-b, est une forme courte de 315 acides aminés dépourvue des 35 premiers acides aminés avec un poids moléculaire attendu de 34,7 kDa. Adaptée de Nair et al., 2020. Créé avec BioRender.com

À l'heure actuelle, il existe peu de preuves expérimentales sur la localisation cellulaire et la fonction de l'isoforme 2. Toutefois, il a été démontré que la version courte naturelle de RNF167 (isoforme RNF167-b) serait principalement localisée dans le cytosol contrairement à la forme de pleine longueur principalement localisée aux endosomes et lysosomes (Nair *et al.*, 2020). Ce qui corrobore l'hypothèse qu'un peptide signal intact est nécessaire à la localisation de RNF167 dans les compartiments endo-lysosomaux. Cela suggère possiblement que RNF167-b pourrait remplir des fonctions différentes de la forme pleine longueur en étant localisé au cytosol. Cependant, aucune distinction ne sera faite entre les différentes isoformes dans la suite de cette étude.

1.4.2 Localisation cellulaire de la RNF167

1.4.2.1 Localisation à la membrane

La protéine RNF167 est une protéine membranaire de type 1, possédant un seul segment qui traverse la membrane (Deshar *et al.*, 2016). Au niveau cellulaire, la protéine RNF167 peut être localisée au niveau de la membrane cellulaire externe ou cytoplasmique. Effectivement, il a été démontré indirectement qu'une

certaine fraction de RNF167 serait exprimée à la surface cellulaire de certaines cellules neuronales afin d'y occuper des fonctions spécifiques (Lussier *et al.*, 2012). Dans la base de données expérimentale présentée par HPA (Human Protein Atlas proteinatlas), les données immunohistochimiques effectuées sur plusieurs lignées cellulaires telles que HEK293, HaCaT et U2OS n'ont pas permis de détecter RNF167 à la membrane plasmique (Atlas, 2024b; Thul *et al.*, 2017). Toutefois, les résultats doivent être interprétés avec prudence, car les anticorps utilisés n'ont pas été validés par des approches de type knockout ou knockdown, ce qui limite l'interprétation des résultats obtenus. Jusqu'à présent, les résultats de microscopie d'immunofluorescence disponibles pour RNF167 semblent démontrer uniquement une localisation cytosolique et vésiculaire. Cela n'exclut toutefois pas la présence de RNF167 à la surface cellulaire, mais pourrait être attribuable à l'absence d'outil spécialisé ou aux méthodes utilisées. RNF167 est impliqué dans des processus de réparation de la membrane plasmique notamment l'exocytose lysosomal (Nair *et al.*, 2020). Étant localisé sur la membrane des lysosomes, il est possible qu'elle soit exposée transitoirement à la membrane plasmique lors de la fusion de ceux-ci dans ce processus. Cependant, cette présence transitoire à la membrane plasmique demeure une hypothèse à confirmer.

1.4.2.2 Localisation au lysosome et endosome

Les endosomes sont des organites cellulaires délimités par une membrane lipidique et situés dans le cytoplasme, à l'instar des lysosomes. Leur fonction principale consiste à trier et à acheminer les molécules vers différentes destinations, notamment le lysosome pour dégradation ou à la membrane cytoplasmique pour recyclage. Les endosomes jouent également un rôle important dans la signalisation cellulaire, notamment par le transport de récepteurs. Trois principaux types d'endosomes sont observés dans la cellule : les endosomes précoces, qui constituent la première station de tri des molécules venant de la membrane plasmique ou du Golgi, les endosomes de recyclage qui servent de transport pour renvoyer certaines composantes, comme les récepteurs, vers la membrane plasmique afin qu'elles puissent être réutilisées, et finalement les endosomes tardifs qui représentent une étape plus avancée qui acheminent les molécules transportées vers leur destination finale, comme les lysosomes (Platta et Stenmark, 2011; Scott, Vacca et Gruenberg, 2014). Les lysosomes sont des organites cellulaires qui contiennent des enzymes hydrolytiques capables de dégrader les composantes obsolètes de la cellule ou ses déchets cellulaires, incluant les protéines, les acides nucléiques, les glucides et même les lipides. Par la voie endosomale, la formation des lysosomes résulte de la fusion de vésicules de transport issu du réseau trans Golgi avec un endosome tardif contenant des molécules internalisées par endocytose à la membrane

plasmique, conduisant à la formation d'un endolysosome qui évoluera ensuite vers un lysosome fonctionnel (Cooper, 2000; Yang et Wang, 2021).

Chez l'humain, la protéine RNF167 semble être principalement localisée sur les endosomes tardifs et les lysosomes, mais pas sur les endosomes précoces. Effectivement, des expériences de microscopie ont montré que RNF167 colocalise avec des marqueurs des endosomes tardifs (Rab7) et des lysosomes (LAMP1, LAMP2), mais pas avec les marqueurs des endosomes précoces (Rab5) (Lussier *et al.*, 2012). Cependant, chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*), la protéine homologue à RNF167, la Godzilla, a été observée sur les endosomes précoces (Yamazaki *et al.*, 2013). Toutefois, dans cette dernière étude, les résultats observés découlent d'expériences de microscopie réalisées dans des conditions expérimentales particulières où la formation d'endosomes élargis a été induite afin de mieux les visualiser. Il est possible que cela ne reflète pas fidèlement la réalité de manière endogène. Néanmoins, cela suggère fortement que RNF167 reste impliqué et occupe un rôle important dans la régulation du trafic vésiculaire.

1.4.3 Fonction de la RNF167

Cette protéine fonctionne comme une ligase d'ubiquitine, ce qui signifie qu'elle joue un rôle dans la fixation de l'ubiquitine à d'autres protéines. RNF167 est impliqué dans plusieurs processus cellulaires, notamment la régulation de certaines voies de signalisation, le trafic protéique et même la transmission synaptique (Lussier *et al.*, 2012; Nair *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022). RNF167 jouerait un rôle clé dans l'activation de la voie mTORC1 en agissant indirectement en ciblant CASTOR1 pour l'ubiquitiner et provoquer sa dégradation par le protéasome (Li *et al.*, 2021). CASTOR1 est un inhibiteur naturel de mTORC1. La voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*) est une voie de signalisation intracellulaire importante qui régule de nombreuses fonctions cellulaires fondamentales telles que la synthèse de protéines, mais aussi la prolifération, la survie et le métabolisme cellulaires (Haissaguerre et Cota, 2015). CASTOR1 est un substrat de RNF167, donc, dans ce contexte, RNF167 agit comme un régulateur positif dans cette voie de signalisation (figure 1.6).

Les différents rôles qu'occupe RNF167 au niveau cellulaire restent encore à explorer. Toutefois, tous les résultats émanant de la littérature semblent s'entendre pour dire que RNF167 joue un rôle clé

dans la machinerie cellulaire, principalement en lien avec le routage vésiculaire et la régulation de la

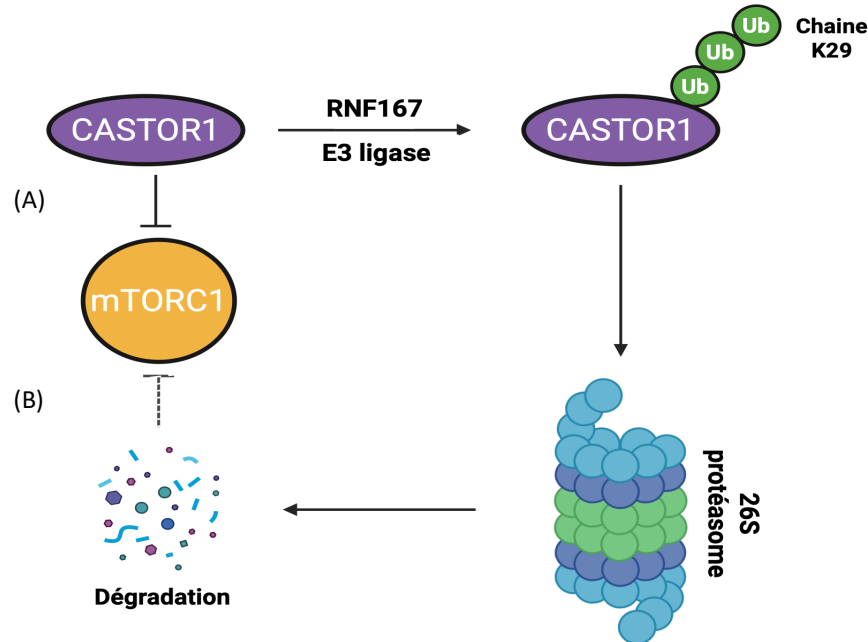


Figure 1.6 RNF167 active mTORC1 via la dégradation de CASTOR1.

Schéma simplifié du mécanisme de régulation de mTORC1 par RNF167 via CASTOR1. A) La protéine CASTOR1 est un inhibiteur endogène de la voie de signalisation mTORC1. La polyubiquitination de type K29 de CASTOR1 par RNF167 va entraîner sa dégradation par le protéasome. B) La protéine CASTOR1 dégradée ne peut réprimer la voie mTORC1. La ligase E3 RNF167 agit comme un régulateur positif dans cette voie de signalisation. Adaptation de Li, 2021. Créé avec BioRender.com

dégradation de protéines membranaires. Par ailleurs, certaines études ont montré que RNF167 affectait significativement le trafic endosomal et la formation des endosomes. Grâce à son activité de ligase d'ubiquitine, elle peut effectuer la modification de protéines cibles impliquées dans le trafic intracellulaire. Par exemple, il a été démontré que RNF167 jouerait un rôle dans la régulation négative du trafic de recyclage des endosomes par l'ubiquitination de la protéine VAMP3 (Vesicle-associated membrane protein 3), qui serait une cible de cette ligase (Yamazaki *et al.*, 2013). VAMP3 est une protéine membranaire endosomale impliquée dans le trafic subcellulaire. Les protéines SNARE telles que VAMP3 sont de petites protéines médiatrices qui jouent un rôle important dans la fusion des membranes

intracellulaires, comme celle des vésicules et des endosomes (Jahn et Scheller, 2006). L'ubiquitination de VAMP3 va bloquer sa fonction normale, empêcher la fusion des vésicules avec la membrane plasmique et perturber le recyclage des protéines et des récepteurs membranaires (figure 1.7). Ce trafic est alors dirigé vers les lysosomes pour dégradation. Par exemple, l'étude de Yamazaki (2013) a montré que RNF167 peut bloquer le recyclage du récepteur de la transferrine en ubiquitinant VAMP3. Cependant, il est intéressant de constater que leurs résultats n'ont pas été obtenus en condition native et que la surexpression d'une protéine, telle que RNF167, peut amplifier ou altérer le comportement natif de celle-ci. Bien que très informatives, les données observées pourraient ne pas refléter fidèlement celles observées en condition basale, où l'observation de ces phénomènes est beaucoup plus difficile.

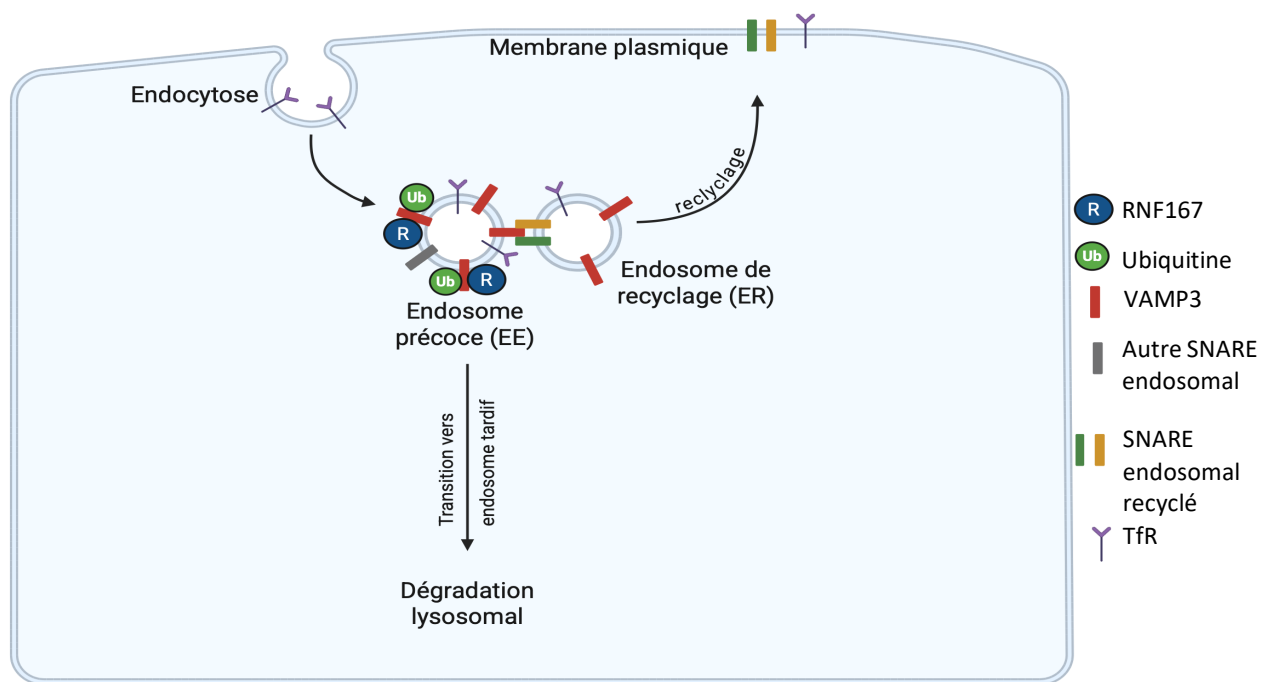


Figure 1.7 Contrôle de recyclage endosomal par RNF167 via l'ubiquitination de VAMP3.

Schéma simplifié de l'action de RNF167 dans le trafic endosomal. En l'absence de RNF167, VAMP3 participe au recyclage endosomal, ce qui conduit à la fusion de ces derniers avec la membrane plasmique. Ce processus permet le recyclage des protéines membranaires et le retour de certains récepteurs, comme celui de la transferrine, à la membrane. RNF167 peut ubiquitiner VAMP3 et bloquer sa fonction. Ce qui inhibe le recyclage du contenu des endosomes qui sera alors redirigé vers la dégradation lysosomale. Ce mécanisme peut affecter le recyclage du récepteur de la transferrine et d'autres protéines comme les SNAREs. Adaptée de Yamazaki, 2023. RNF167, RING finger protein 167 ; VAMP3, vesicle associated membrane protein 3 ; SNARE, soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor ; TfR, transferrin receptor. Créé avec BioRender.com

Ainsi, bien que certaines études aient permis de mieux comprendre certaines fonctions de RNF167, de nombreux aspects de son fonctionnement et de ses mécanismes d'action au niveau cellulaire restent inconnus. De plus, l'identité de ses partenaires d'interaction et de ses substrats potentiels reste largement méconnue.

1.5 Nécessité d'outils innovants pour l'étude des E3 ligases.

Bien que la ligase E3 RNF167 occupe un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, ce rôle reste probablement sous-estimé. En effet, peu d'études ont été menées sur cette enzyme, et encore moins en condition native. L'étude détaillée de RNF167 reste tout de même un défi, notamment en raison de la difficulté à détecter la protéine endogène, de sa structure en tant que protéine membranaire, et principalement par le manque d'outils suffisamment spécifiques et sensibles (Cai *et al.*, 2022; Jardine, 2023).

1.5.1 Limites des approches classiques

Comme mentionné précédemment, l'étude d'une protéine en condition de surpression, ou par l'utilisation de protéines recombinantes, peut apporter des données précieuses pour l'étude de celle-ci. Cependant, la surexpression artificielle d'une protéine peut biaiser les résultats, car les niveaux d'expression dépassent largement ceux naturellement observés (Bolognesi et Lehner, 2018). De même, les protéines recombinantes sont souvent étiquetées pour permettre leur détection, soit par une étiquette reconnue par des anticorps spécifiques de haute affinité, soit par l'ajout d'une molécule fluorescente directement fusionnée à la protéine, ce qui peut perturber la structure et affecter les fonctions de celle-ci (Grosfeld *et al.*, 2023). C'est pourquoi ces approches peuvent parfois ne pas représenter fidèlement le comportement de la protéine dans des conditions naturelles.

L'étude des protéines endogènes, c'est-à-dire dans leur contexte original, sans modification et à des niveaux normaux, représente une méthode de choix pour comprendre les mécanismes cellulaires dans un contexte biologique plus fidèle à la réalité (Schwinn *et al.*, 2020). Toutefois, l'utilisation de méthodes de microscopie pour l'observation des protéines endogènes dans leur contexte physiologique représente un réel défi. En particulier, la disponibilité d'anticorps spécifiques et adaptés à la forme endogène de la protéine est souvent limitée ou inexistante. De plus, les anticorps traditionnels présentent des limites

importantes, notamment en termes de taille et de stabilité, qui peuvent entraver leur utilisation (Beghein et Gettemans, 2017). Avec une taille d'environ 150 kDa, leur pénétration tissulaire pour des études de microscopie peut être compromise (Li, Hoefnagel et Krishnadath, 2023). Leur taille importante peut également les empêcher d'atteindre leur épitope cible dans un contexte biologique. La densité de l'environnement intracellulaire ou la présence d'une membrane cellulaire intacte peuvent constituer des obstacles à l'atteinte de leur cible (Traenkle et Rothbauer, 2017). L'accessibilité de l'épitope est un facteur déterminant pour leur liaison. Enfin, la production d'anticorps spécifiques peut s'avérer longue, coûteuse et peu reproductible.

1.5.2 Les nanocorps comme technologie alternative

Avec l'émergence des nouvelles technologies, des alternatives innovantes sont apparues. Parmi ces innovations, les nanocorps (ou VHH, de l'anglais *variable heavy-chain domain of heavy-chain antibody*) se démarquent en tant que technologie prometteuse. Ces petites molécules, dérivées d'anticorps de lamas, présentent des avantages significatifs pour la recherche fondamentale, notamment pour les études de microscopie comparativement à l'utilisation d'anticorps classiques (Beghein et Gettemans, 2017).

Ils se distinguent d'abord par leur petite taille d'environ 15 kDa, ce qui leur permet d'atteindre des cibles difficilement accessibles (Li, Hoefnagel et Krishnadath, 2023). En comparaison, les nanocorps mesurent près d'un dixième de la taille d'un anticorps classique (Traenkle et Rothbauer, 2017). De plus, les nanocorps sont réputés pour présenter une affinité et une spécificité supérieures à celles des anticorps classiques (Li, Hoefnagel et Krishnadath, 2023). Enfin, ils offrent une stabilité supérieure à celle des anticorps classiques (Bao *et al.*, 2021). Ils peuvent en effet résister à des températures élevées et à des pH acides (Siontorou, 2013).

Des études ont démontré que les nanocorps, après s'être liés à des protéines membranaires à domaine extracellulaire, étaient suffisamment petits pour être internalisés avec celles-ci et être soumis à un trafic intracellulaire (Cong *et al.*, 2024). Effectivement, ces auteurs ont également montré que les nanocorps peuvent être utilisés comme système de livraison de médicament intracellulaire avec une spécificité accrue pour le traitement de certaines maladies comme les tumeurs ou les cancers (Cong *et al.*, 2024). De plus, les nanocorps peuvent être utilisés pour la détection et l'imagerie, notamment en microscopie, en les conjuguant à des molécules fluorescentes pour l'étude des processus biologiques encore mal compris

(Jin *et al.*, 2023). En effet, leurs caractéristiques en font alors des sondes précieuses pour la compréhension des mécanismes biologiques complexes.

En complément, les nanocorps peuvent également être utilisés pour des caractérisations biochimiques. Par exemple, ils peuvent servir de sondes hautement spécifiques pour la détection de protéines dans des analyses d'immunobuvardage de type Western. En effet, des recherches récentes ont développé des nanocorps fusionnés à la peroxydase de raifort (HRP) afin d'éliminer l'utilisation d'anticorps secondaire et de réduire la durée des expériences (Gu *et al.*, 2022). De plus, ils peuvent également être employés pour la purification sélective de complexes protéiques par immunoprécipitation, offrant une spécificité élevée et facilitant ainsi l'identification de partenaire d'interaction (Rothbauer *et al.*, 2008).

1.5.3 Application spécifique à RNF167

Toutes ces caractéristiques font des nanocorps un nouvel outil prometteur qui mériterait d'être exploré pour l'étude de la ligase E3 RNF167. L'utilisation d'un nanocorps fluorescent et spécifique à RNF167 pourrait permettre d'obtenir des données précieuses sur son routage intracellulaire en condition naturelle par des études de microscopie à fluorescence. Une telle approche permettrait d'obtenir des données plus fiables et complémentaires aux méthodes classiques.

En particulier, leur petite taille permet de réduire l'erreur de localisation ou de liaison, ce qui permet d'obtenir une meilleure résolution en microscopie (Beghein et Gettemans, 2017). Leur meilleure pénétration tissulaire peut aussi permettre de détecter des cibles inaccessibles aux anticorps traditionnels (Li, Hoefnagel et Krishnadath, 2023). De même, leurs caractéristiques uniques leur confèrent la capacité, dans certaines conditions, d'être utilisés pour cibler des protéines membranaires, d'être co-intériorisés et de subir un trafic intracellulaire avec celles-ci (Deyme, 2017). Par conséquent, ces propriétés pourraient permettre d'obtenir des données précieuses sur le trafic intracellulaire de RNF167 et améliorer notre compréhension des mécanismes biologiques complexes auxquels cette ligase participe.

1.6 Présentation du nanocorps RNF167-A5

1.6.1 Origine et développement

Parmi les recherches récentes sur les nanocorps comme nouveaux outils émergents, Siepe, Picton et Gracia (2023) ont développé un nanocorps spécifique à la ligase E3 RNF167, le nanocorps RNF167-A5. Leur but étant de profiter du plus petit anticorps fonctionnel connu de nos jours pour l'intégrer dans un système

REULR (de l'anglais, *receptor elimination by E3 ubiquitin ligase recruitment*). Le système REULR agit comme une plateforme de dégradation ciblée de protéines. Pour y parvenir, une plateforme bifonctionnelle est construite en intégrant deux nanocorps : un spécifique à la région extracellulaire des ligases E3 transmembranaires de type PA-TM-RING et l'autre spécifique à la région extracellulaire des récepteurs membranaires tels que EGFR. De cette façon, leur approche visait à concevoir un outil capable de cibler des protéines membranaires spécifiques afin d'exploiter la capacité des ligases à ubiquitiner des substrats et ainsi induire une dégradation forcée à des fins thérapeutiques (Siepe, Picton et Garcia, 2023).

Pour identifier le nanocorps RNF167-A5, une bibliothèque synthétique de nanocorps exprimé en levure a été utilisée, puis criblée par une méthode de présentation d'antigène sur levure (*yeast display*). C'est une technologie de pointe qui permet une sélection rapide des protéines produites présentant une forte affinité pour leur ligand. Ainsi, pour cribler cette bibliothèque, ils ont utilisé des protéines recombinantes du domaine extracellulaire, le domaine PA, de RNF167 pour sélectionner les meilleurs clones de VHH présentant une spécificité pour ce domaine. Ensuite, le meilleur candidat a été séquencé et sa séquence en acides aminés est présentée dans l'article. Le clone A5 (RNF167-A5) dirigé contre RNF167 a été sélectionné, produit en cellules Expi293F et purifié par chromatographie d'affinité sur résine NI-NTA suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille.

1.6.2 Fonctionnalité

L'expérience principale qui montre la fonctionnalité du nanocorps RNF167-A5 du système REULR a été réalisée par cytométrie en flux sur des cellules HEK293T transfectées pour exprimer à haut niveau la protéine recombinante RNF167-HA. Ainsi, ils ont montré qu'après le traitement des cellules avec le système REULR dimérique anti-RNF167 (RNF167-RNF167) à 50 nM, le niveau de la ligase E3 (RNF167-HA) à la surface cellulaire était significativement réduit, par rapport à l'utilisation du monomère seul comme contrôle négatif. Cependant, cela ne signifie pas nécessairement que les monomères ne puissent pas se lier à RNF167 et subir une internalisation, mais seulement qu'ils ne peuvent pas induire une dégradation mesurée par FACS. Toutefois, aucune donnée expérimentale n'a encore été obtenue concernant la liaison du monomère RNF167-A5 à la protéine RNF167 en contexte cellulaire.

1.6.3 Spécificité et affinité

Le principal avantage du nanocorps RNF167-A5 est qu'il est spécifique au domaine PA extracellulaire de la protéine RNF167, donc il peut être utilisé pour cibler RNF167 dans des conditions natives sans avoir à

perméabiliser les cellules. La spécificité de RNF167-A5 pour RNF167 a été testée par immunomarquage de surface, par des essais de cytométrie en flux, sur plusieurs lignées cellulaires humaines telles que HEK293T, CaCo-2, YT1 et UT/7, ainsi que sur des lignées cellulaires de souris comme BaF3, 3T3 et B16. Tous les nanocorps incluant RNF167-A5 ont présenté une réactivité croisée humaine/souris. Ce qui n'est pas étonnant, car les domaines extracellulaires de ces ligases entre les deux espèces sont hautement conservés avec 97,95 % de similarité pour RNF167 (Siepe, Picton et Garcia, 2023). Toutefois, il est à noter que pour les tests de liaison sur cellule par cytométrie, VHH étaient sous forme tétramérisée. Les nanocorps RNF167-A5, biotinylés et purifiés, ont été incubés avec des tétramères de streptavidine conjugués à un fluorophore Alexa647, afin d'exploiter l'affinité de la streptavidine pour la biotine, ce qui a conduit à former les tétramères de VHH (SA-647). La création des VHH tétramérisés à la streptavidine comporte quelques avantages. D'abord, cela augmente l'avidité ou la force globale de liaison, car les tétramères, formés de quatre VHH, permettent une liaison multivalente. Ce qui permet une liaison plus stable et durable. La formation de tels complexes peut montrer une constante d'association jusqu'à 35 fois plus élevée que celle de monomères ou de dimères d'anticorps (Kipriyanov *et al.*, 1996). De plus, cette tétramérisation peut, dans certains cas, augmenter considérablement le pourcentage de liaison directe sur les cellules, passant de moins de 20 % à plus de 80% (Cloutier *et al.*, 2000).

Cependant, afin de déterminer l'affinité de liaison unique du nanocorps RNF167-A5 pour la protéine RNF167, des tests de résonance plasmonique de surface (SPR) ont été effectués avec le monomère non biotinylé. Les résultats ont montré une affinité très élevée dans l'ordre du nanomolaire avec une constante de dissociation à l'équilibre (KD) de 3,0 nM pour le domaine extracellulaire (ECD) de la ligase RNF167 (Siepe, Picton et Garcia, 2023).

1.6.4 Avantages par rapport aux anticorps traditionnels

Comme mentionné précédemment, les nanocorps présentent de nombreux avantages par rapport à l'utilisation d'anticorps traditionnels, notamment en microscopie. Le nanocorps RNF167-A5 démontre particulièrement ces avantages. Sa petite taille (~ 15 kDa) favorise une meilleure pénétration tissulaire, ce qui en fait un candidat de choix comme agent de détection en microscopie d'immunofluorescence et, potentiellement pour une utilisation comme système de livraison intracellulaire. Sa structure simplifiée, dépourvue de chaîne légère, lui confère une stabilité accrue. De plus, RNF167-A5 a été sélectionné rapidement à partir d'une bibliothèque synthétique, donc son développement ne nécessite pas d'immunisation animale prolongée, contrairement à la méthode classique, ce qui reflète la souplesse de

la technologie VHH. De plus, sa production est simplifiée, car elle ne nécessite pas de modification post-traductionnelle pour être assemblée, contrairement aux anticorps traditionnels. Il peut être produit facilement en grande quantité dans des systèmes d'expression simples comme les bactéries, ce qui représente un avantage en termes de coût. Enfin, comme tout nanocorps, RNF167-A5 peut être facilement modifié et lié à d'autres protéines, ainsi qu'à des fluorophores et à d'autres petites molécules, pour une utilisation variée. (Buser *et al.*, 2018; Cong *et al.*, 2024). Ce qui élargit ses applications potentielles et en fait un outil polyvalent et robuste pour l'étude fondamentale, mais aussi pour le développement thérapeutique.

1.6.5 Potentiel d'utilisation

Le nanocorps RNF167-A5 présente un potentiel d'utilisation non négligeable qui va au-delà de l'utilisation dans un système REURL. En considérant que RNF167-A5 peut se lier au domaine extracellulaire de la protéine RNF167, il convient de se demander si ce nanocorps permettrait de suivre et de documenter le trafic intracellulaire de RNF167. Ainsi, mise à part son utilisation en tant qu'outil de dégradation ciblée, il pourrait être utilisé en tant que sonde de visualisation, car il a la capacité d'interagir avec la forme native de la ligase E3 RNF167 à la surface cellulaire. Cette utilisation pourrait fournir des données importantes pour l'avancement des connaissances entourant cette ligase et ainsi combler des lacunes importantes, notamment concernant le routage intracellulaire de RNF167. Par conséquent, le nanocorps RNF167-A5 pourrait servir d'outil de recherche fondamentale.

1.7 Objectif de l'étude

Dans le prolongement des travaux antérieurs ayant mené à la conception et à la validation de la spécificité du nanocorps RNF167-A5 pour la ligase E3 RNF167, ce projet vise à explorer ce VHH à des fins d'imagerie cellulaire. Contrairement à l'étude de Siepe *et al.* où la fonctionnalité de RNF167-A5 a été exclusivement démontrée par une utilisation de celui-ci sous forme dimérique ou multimérique dans des constructions de type REULR, la présente étude propose de développer l'utilisation du monomère de RNF167-A5 conjugué à des fluorophores, pour une application en microscopie d'immunofluorescence visant à visualiser la localisation et le trafic intracellulaire de RNF167 endogène.

L'objectif principal est de développer et de caractériser différentes versions fluorescentes du nanocorps RNF167-A5. Pour le développement des VHH fluorescents, deux stratégies seront employées pour fonctionnaliser le nanocorps par l'ajout de molécules fluorescentes. Premièrement, la conception de

versions recombinantes du VHH fusionné à des protéines fluorescentes, telles que EGFP et mCherry. La protéine fluorescente verte améliorée (EGFP) émet une fluorescence verte lorsqu'elle est excitée. De même, la protéine fluorescente mCherry émet une fluorescence rouge. La deuxième stratégie consiste en un marquage chimique du VHH par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), un colorant fluorescent jaune-vert. Cette dernière méthode présente l'avantage d'être rapide à mettre en œuvre, contrairement à la création de protéines de fusion, un processus plus long, mais qui permet un marquage contrôlé avec le fluorophore. Ces versions fluorescentes du VHH seront destinées à être utilisées sur des cellules humaines HEK293T exprimant naturellement la protéine RNF167.

Le projet comprend plusieurs étapes. La production et la purification du VHH ont été réalisées à partir d'un système d'expression bactérien (*E. coli*). Des essais d'interaction de liaison *in vitro* de type GST pull-down ont été réalisés pour confirmer l'interaction entre notre VHH produit et la ligase E3 RNF167. La création de différentes versions de VHH et leur caractérisation ont été réalisées, incluant l'expression, la purification et l'évaluation de leur interaction avec RNF167. Des expériences de microscopie à fluorescence ont été effectuées afin de documenter le routage intracellulaire de RNF167 via la liaison et l'internalisation des nanocorps. La capacité des VHH à se lier spécifiquement à RNF167 a été évaluée sur des cellules fixées en conditions natives et de surexpression de RNF167. De plus, la liaison du VHH (RNF167-A5) a été testée en microscopie à fluorescence, en comparant les cellules exprimant RNF167 à celles traitées par siRNA pour réduire l'expression de cette ligase, afin d'évaluer la spécificité du signal observé.

Ce travail contribuera à évaluer le potentiel du nanocorps RNF167-A5 comme nouvel outil permettant l'étude de la ligase E3 RNF167 tout en permettant une meilleure compréhension des défis liés à l'utilisation des VHH en tant qu'outils d'imagerie. Les résultats de ces travaux ont ouvert de nouvelles perspectives et ont offert un modèle applicable à l'étude d'autres ligases E3. Somme toute, cette étude met en évidence le potentiel des VHH en tant qu'outil polyvalent pour l'étude fonctionnelle des protéines.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Anticorps traditionnels

L'anticorps anti-Camélidé VHH Cocktail (GenScript, Cat#AA02014) est utilisé avec une dilution 1:5000 dans les immunobuvardage (WB) et à une concentration de 0,5 µg/mL dans les essais d'immunofluorescence (IF). L'anticorps anti-Lapin IgG (Cell Signaling Technology, Cat#7074) et l'anticorps anti-Souris (Cell Signaling Technology, Cat#7076) tous deux conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) sont utilisés avec une dilution 1:10000 dans les WB. L'anticorps anti-Lapin IgG (ThermoFisher, Cat#A21069) est utilisé avec une dilution 1:1000 dans les essais d'IF. Les anticorps anti-V5 (SV5-Pk1) (ThermoFisher, Cat#R960-25) et anti-HA.11 (Biolegend, Cat#9101502) sont utilisés avec une dilution 1:1000 dans les WB. L'anticorps anti-RNF167, polyclonal (Voir Lussier et al., 2012) est utilisé avec une dilution de 1:500 dans les WB. L'anticorps anti-His (GenScript, Cat#A00186S) est utilisé à une concentration de 0,2 µg/mL dans les WB. Les anticorps utilisés dans cette étude sont répertoriés dans le tableau 2.1, avec leurs principales caractéristiques, leurs fournisseurs, leurs utilisations et les dilutions utilisées.

Tableau 2.1 Liste des anticorps utilisés avec leurs caractéristiques et applications.

Anticorps	Hôte/Isotype	Compagnie	Numéro de catalogue	Conjugué	Dilution
Anti-Camélidé VHH Cocktail	Lapin / IgG	GenScript	A02014	Non conjugué	1:5000 (WB) 0.5 µg/ml (IF)
Anti-Lapin IgG	Chèvre / IgG	CST	7074	HRP	1:10000 (WB)
Anti-Lapin IgG	Chèvre / F(ab') ₂ Fragment	ThermoFisher	A21069	Alexa Fluor™ 568	1:1000 (IF)
Anti-V5 (SV5-Pk1)	Souris / IgG2a	ThermoFisher	R960-25	Non conjugué	1:1000 (WB)
Anti-HA.11	Souris / IgG1, κ	ThermoFisher	9101502	Non conjugué	1:1000 (WB)
Anti-souris	Cheval / IgG1	CST	7076	HRP	1:10000 (WB)
Anti-RNF167, polyclonal	Lapin	Voir Lussier et al., 2012	—	Non conjugué	1/500 (WB)
Anti-His	Souris / IgG1, κ	GenScript	A00186S	Non conjugué	0.2 µg/ml (WB)

WB, immunobuvardage ; IF, immunofluorescence ; HRP, peroxydase de raifort ; CST, Cell Signaling Technology

2.2 Construction de l'ADN plasmidique

2.2.1 Nanocorps RNF167-A5

Le nanocorps RNF167-A5 a été développé par Siepe et al. (2023) et la séquence en acides aminés est la suivante : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSI FRLWYMGWYRQAPGKEREFVASIGIGATTNYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVFGWAYSGYHDDFLYWGQGTQVTVSS. La séquence codante a été synthétisée par Integrated DNA Technologies (IDT) et insérée dans le plasmide de clonage pUCIDT-Kan (IDT). La séquence nucléotidique est : 5'-GGATCCCAAGTACAGCTGCAAGAGAGCGGTGGCGGCTTGGTCCAGG CGGGAGGCAGCTTGCGTTTGT CATGCGCCGCGTCAGGAAGCATCTTCCGTCTGTGGTACATGGGCTGGTATCGCCA GGCTCCCGGAAAAGAACGTGAGTTCGTAGCATCCATCGGAATTGGCGCAACTACTAACTACGCGGACAGCGTCAA GGGGCGTTTCACGATCAGCCGTGACAATGCTAAGAATACAGTGTATTTACAAATGAACTCCCTGAAGCCCCGAGGAC ACTGCTGTATACTATTGCGCTGTATTCGGTTGGGCGTATAGCGGATACCACGATGATTTTCTTTACTGGGGCCAGG GTACGCAAGTAACGGTTTCTTCCTAAGTCGAC-3'. Cet ADN codant pour le nanocorps RNF167-A5 a été excisé avec les enzymes de restriction BamHI-HF (New England Biolabs, Cat#R3136S) et Sall-HF (New England Biolabs, Cat#R3138S), puis inséré dans le plasmide pRSF-Trx (vecteur en provenance du laboratoire de Laurent Cappadocia, UQAM) via les sites de restriction BamHI et Sall. La même stratégie de sous-clonage a été utilisée pour introduire la séquence codante de RNF167-A5 dans le vecteur pGEX-4T-1.

2.2.2 Condition de PCR

Les amorces sont utilisées à une concentration de 0,5 μ M chacune pour 100 ng d'ADN matrice dans un volume de réaction de 50 μ L avec une concentration de 50 μ M d'un mélange de dNTPs et 1 μ g/mL de polymérase dans un tampon de réaction dilué à 1 X. Les paramètres de réaction, réalisés à l'aide du thermocycleur T100 de Bio-Rad (Cat#1861096), débutent par une première étape de dénaturation à 95 °C pendant 2 minutes, suivis de 29 cycles qui incluent une dénaturation à 95 °C pour 30 secondes, une étape d'appariment à 55 °C pour 30 secondes, et enfin une extension à 72 °C pour 1 minute.

2.2.3 Amorces utilisées pour les PCR

Les amorces VHH-RNF167-A5 : sens 5' TCCGGATCCCAAGTACAGCTGCAAGAGAGC 3' et antisens : 5' ACGCAAGTAACGGTTTCTTCCGAATTCGTGCGACTAACTCGAGTAA 3'. Les amorces FluoProt ont été utilisés pour amplifier la région codant pour les protéines EGFP et mCherry : sens 5' TTACTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG 3' et antisens : 5' CGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAACTC

GAGTAA 3'. La purification des produits de PCR a été réalisée en utilisant le kit d'extraction sur gel d'ADN Monarch (New England Biolabs, Cat#T1020) en suivant les recommandations du fabricant.

2.2.4 Protéine de fusion nanocorps RNF167-A5 avec EGFP et mCherry

Une réaction de polymérase en chaîne (PCR) a d'abord été effectuée afin d'amplifier le gène du VHH RNF167-A5 à partir du plasmide original pUCIDT-Kan de IDT (voir 2.2.1 Nanocorps RNF167-A5) en suivant la méthode décrite dans la section 2.2.2 pour les réactions de PCR. Le fragment amplifié et purifié du VHH a été coupé à l'aide des enzymes de restriction BamHI-HF (New England Biolabs, Cat#R3136S) et XhoI (New England Biolabs, Cat#R0146S) ainsi que le vecteur pGEX-4T1 puis la ligation a été effectuée selon la méthode de ligation détaillée en 2.2.6 avec les contrôles appropriés pour former la nouvelle construction plasmidique pGEX-4T1-VHH (+ site de restriction) qui a été utilisée en clonage intermédiaire. La construction a été vérifiée par digestion diagnostique avec les enzymes BamHI-HF (New England Biolabs) et EcoRI-HF (New England Biolabs, Cat#R3101S) et par séquençage.

Ensuite, une réaction de PCR a été effectuée pour amplifier l'ADN codant pour EGFP et mCherry, respectivement à partir des plasmides pEGFP-N1 et pmCherry-C1, selon la méthode de PCR et les amorces décrites à la section 2.2.3. Le fragment amplifié de EGFP et mCherry ont été coupés à l'aide des enzymes de restriction EcoRI-HF (New England Biolabs, Cat#R3101S) et XhoI (New England Biolabs, Cat#R0146S) puis purifié par extraction sur gel d'agarose (section 2.2.5). La même stratégie de digestion et purification a été utilisé pour le plasmide pGEX-4T1-VHH (+ site de restriction). La ligation a été effectuée, en suivant la méthode décrite dans la section 2.2.6, avec les contrôles appropriés pour former deux nouvelles constructions plasmidiques : le plasmide pGEX-4T1-VHH-EGFP ainsi que le plasmide pGEX-4T1-VHH-mCherry. Les nouvelles constructions ont été vérifiées par digestion diagnostique avec les enzymes BamHI-HF (New England Biolabs) et XhoI (New England Biolabs) et par séquençage pour valider la construction des protéines de fusion. La méthode d'analyse et validation de l'ADN plasmidique est décrite à la section 2.2.7.

2.2.5 Purification des produits de digestion sur gel d'agarose

Les produits de digestion ont été séparés sur gel d'agarose à 1.2 % (p/v) préparé dans un tampon tris-acétate-EDTA (TAE) 1X (40 mM de Tris, 20 mM d'acide acétique, 1 mM d'EDTA). Pour la visualisation des fragments d'ADN sur le gel, le colorant à acide nucléique GelRed (Biotium, Cat#4103) a été incorporé et dilué à 1X dans le gel d'agarose avant sa polymérisation. La migration des échantillons d'ADN contenant

une concentration finale de 1X le tampon de chargement *Gel Loading Dye Purple* de New England Biolabs (NEB, Cat#B7024A) s'est effectuée dans un système d'électrophorèse horizontale de Bio-Rad à 100 V pendant 1 heure ou jusqu'à ce que les fragments d'ADN aient migré suffisamment. L'échelle d'ADN utilisée est le GeneRuler™ 1 kb DNA (Thermo Fisher Scientific, Cat#SM0311). Les fragments d'ADN d'intérêt ont été purifiés à partir du gel en utilisant le kit d'extraction de l'ADN sur gel Monarch (New England Biolabs, Cat#T1020) en suivant les recommandations du fabricant.

2.2.6 Ligation des fragments d'ADN au vecteur digéré

Les ligations des fragments d'ADN dans les vecteurs digérés ont été réalisées selon le protocole modifié de ligation par New England Biolabs. Les plasmides et les inserts ont été digérés avec les enzymes de restriction appropriées (voir section 2.2 Constructions de l'ADN plasmidiques) puis purifiés avant la ligation. Les réactions de ligation ont été effectuées à la température ambiante pendant la nuit avec un rapport molaire de 1:3 (vecteur : insert) en présence de 200U de T4 DNA ligase (New England Biolabs, Cat#M0202L) dans un tampon de réaction de T4 DNA Ligase à 1X avec 10nM d'ATP (New England Biolabs, Cat#B0202A) dans un volume final de réaction de 10 µL. Le rapport molaire a été calculé à l'aide du calculateur de ligation en ligne NEBioCalculator selon la formule suivante :

masse requise de l'insert (g) = rapport molaire souhaité (insert : vecteur) x masse du vecteur (g) x rapport des longueurs de l'insert et du vecteur.

Des contrôles de ligation appropriés ont été réalisés pour chaque ligation effectuée. Les produits de ligation ont été utilisés pour la transformation bactérienne.

2.2.7 Amplification d'ADN plasmidique (Mini Prep) et validation

Pour chaque transformation bactérienne, trois à six clones bactériens ont été sélectionnés sur gélose de bouillon lysogène Miller (LB) sélectif et cultivés pour amplification et extraction de l'ADN plasmique. L'ADN plasmique a été amplifié à l'aide de l'ensemble de miniprep de New England Biolabs (Monarch Plasmide Miniprep Kit, Cat#T1010G) en suivant les protocoles du fabricant. Les sélections bactériennes ont été cultivées dans 5 mL de milieu LB avec un antibiotique sélectif approprié à 37 °C sous agitation à 200 rpm pendant 15 à 16 heures. Tous les plasmides produits et purifiés ont été validés par digestion diagnostique sur gel d'agarose 1,2 % (p/v) dissout dans un tampon TAE 1X puis par séquençage de type Sanger (Génome Québec, Montréal, QC, Canada) pour confirmer l'intégrité des constructions.

2.2.8 Dosage de l'ADN par NanoDrop

La concentration en acide nucléique des échantillons a été quantifiée à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific). La mesure d'un blanc approprié a été effectuée avant chaque mesure. Des aliquotes de 1 µL d'ADN ont été déposées sur la platine du NanoDrop et mesurées à 260 nm. Le ratio d'absorbance à 260/280 nm a été utilisé pour évaluer la pureté de l'ADN en considérant qu'un ratio proche de 1,8 est considéré comme pur et optimal pour l'ADN (Wilfinger, Mackey et Chomczynski, 1997). Les résultats de concentration ont été automatiquement calculés par la méthode « ADNdb » sélectionnée.

2.3 Préparation des bactéries chimiocompétentes

Une colonie de bactéries *E. coli* de type DH5α ou BL21 a été sélectionnée après isolation par striation sur milieu solide LB-Miller (10 g/L NaCl, 10 g/L peptone, 5 g/L d'extrait de levure, 15 g/L Agar) et ensemencée dans un milieu de culture SOC (20 g/L tryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 5 g/L NaCl, 2 g/L KCl, 20 mM MgSO₄, 20 mM glucose) et incubée à 37 °C avec une agitation constante de 200 rpm dans un incubateur rotatif (Eppendorf Innova 42, 25 mm d'orbite) jusqu'à une densité optique optimale de 0,6. La culture a été ensuite centrifugée à 600 g pour 10 minutes à 4 °C. Le culot bactérien a été resuspendu dans une solution TFBI stérile (30 mM KOAc, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 12 % [v/v] de glycérol) et incubé sur glace 2 heures avant d'être centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Le culot bactérien a été resuspendu dans une solution de TFB2 stérile (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 12 % [v/v] de glycérol) et incubé sur glace 1 heure. Les aliquotes ont été effectuées en chambre froide, puis congelées instantanément dans l'azote liquide et conservées à -80 °C. Le test de compétence des bactéries nouvellement chimiocompétentes a été effectué par dilution limite après transformation.

2.4 Transformation bactérienne

Un volume de 25 µL de bactéries *E. coli* chimiocompétentes, de type DH5α ou BL21, a été mélangé avec 0,5 µL d'ADN plasmique puis incubé sur glace pour 30 minutes. Un choc thermique de 45 secondes dans un bain-marie à 42 °C a été suivi d'une incubation de 2 minutes sur glace. Une étape de recouvrement a été faite par l'ajout de 100 µL de milieux LB (10 g/L NaCl, 10 g/L peptone et 5 g/L d'extrait de levure) avec une incubation à 37 °C pendant 1 heure avant d'ensemencer les bactéries sur des milieux sélectifs solides avec antibiotique de sélection. Selon les transformations effectuées, des géloses de milieu LB contenant 50 µg/mL de kanamycine ont été utilisées pour les vecteurs plasmiques pRSF-Trx, tandis que des géloses

de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline ont été utilisées pour les bactéries transformées avec les vecteurs plasmiques pGEX-4T-1.

2.5 Production et purification des protéines

2.5.1 Expression et extraction des protéines recombinantes (*E. coli*)

Pour la production de la protéine 6xHis-Trx-VHH-RNF167, les souches bactériennes *Escherichia coli* BL21 DE3, transformées avec le vecteur pRSF-Trx-VHH, ont été cultivées dans un milieu de culture LB-Miller-Kan supplémenté avec 2 % de glucose. Les précultures ont été utilisées pour inoculer un milieu frais à une densité optique initiale de 0,2 à 600 nm (DO600), puis incubées à 37 °C avec une agitation de 200 rpm. Lorsque l'absorbance a atteint 0,6 à 600 nm (OD600), l'induction a été initiée par l'ajout de 1 mM d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) à 30°C pendant 2 heures. Les bactéries ont été culottées par centrifugation à 3500 x g pendant 15 minutes à 4 °C. Le culot a été resuspendu dans un tampon de lyse His-Tag (25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 0.5% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 8.0) à raison de 1/5 du volume de culture. La lyse cellulaire a été effectuée par sonication sur glace à l'aide d'un sonicateur (Fisherbrand), en appliquant deux cycles de 30 secondes à 50 % d'amplitude, avec 10 secondes de repos sur glace. Les lysats ont été centrifugés à 10 000 g pour 25 min à 4 °C, puis les protéines solubles ont été utilisées pour la purification par chromatographie d'affinité. Une méthodologie similaire a été utilisée pour les protéines GST, GST-VHH, GST-VHH-EGFP et GST-VHH-mCherry, outre le fait que le tampon de lyse GST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 8.0) a été utilisé pour l'extraction des protéines en système bactérien.

2.5.2 Chromatographie d'affinité

2.5.2.1 Purification de 6xHis-TEV-Trx-VHH

Le surnageant contenant les protéines solubles a été incubé avec de la résine nickel-NTA de haute capacité (Ni-NTA, GenScript, Cat#L00223-10) pré-équilibrée pour une durée de 1-3 heures, à 4 °C, 18 tours/min sur un rotateur d'échantillon (Labnet Revolver, Cat#H5600). La résine a été équilibrée avec quatre lavages avec un volume de tampon de lyse His-Tag équivalent à dix fois le volume de la résine. Après incubation, la résine a été culottée à 800 g pendant 5 min à 4 °C. Pour les lavages au nombre de cinq, la résine a été centrifugée entre chaque lavage et élution pendant 3 min à 800 g à 4 °C. Un volume de tampon d'élution (25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 8.0) égal au volume de résine (rapport 1:1, v/v) a

été ajouté pour chaque élution et homogénéisé doucement par inversion avant d'être centrifugé (3 min, 800 g, 4 °C). Les surnageants ont été collectés individuellement pour analyse.

2.5.2.2 Purification de GST-VHH, GST-VHH-EGFP et GST-VHH-mCherry

Le surnageant contenant les protéines solubles a été incubé pendant 3 heures, à 4 °C, 18 tours/min sur un rotateur d'échantillons Labnet Revolver, avec de la résine pré-équilibrée. Deux types de résine d'affinité ont été utilisés pour les purifications GST, selon leur disponibilité en laboratoire : la résine Glutathione Sepharose 4B (Cytiva, #17075601) et la résine Glutathione (GenScript, #L00206). La résine a été équilibrée selon la même méthode, mais avec le tampon de lyse GST. Après incubation, la résine a été lavée trois fois avec le tampon de lavage GST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0) sauf mention contraire. Les paramètres de centrifugation (force, durée et température) ont été standardisés et maintenus constants pour l'ensemble des purifications. Lors de l'optimisation de l'élution, diverses concentrations de certains composés du tampon d'élution GST ont été testées. La composition retenue pour le tampon d'élution GST (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 30 mM glutathione réduit, 0,1 % Triton X-100, pH 8.5) correspond à la condition jugée optimale. De la même façon, un volume de tampon d'élution égal à celui de la résine (rapport 1:1, v/v) a été ajouté, puis mélangé doucement par inversion avant centrifugation.

2.5.3 Clivage de la GST

Une enzyme de type thrombine protéase a été utilisée. La thrombine humaine étiquetée à la biotine (Sigma-Aldrich, SAE0147-5KU) a été employée pour le clivage enzymatique de l'étiquette d'affinité GST. Dans un tampon PBS 1X, des conditions de clivage ont été évaluées conformément aux recommandations du fabricant. Différentes températures et durées d'incubation ont été testées : 1, 2 ou 3 heures à 30 °C, ainsi qu'une incubation à 4 °C pendant la nuit.

2.5.4 Chromatographie d'exclusion stérique

Un système de chromatographie liquide de protéine à haute performance (FPLC) ÄKTA pure (GE Healthcare) a été utilisé afin de séparer le nanocorps RNF167-A5 des autres composants après purification et digestion enzymatique. Une colonne de chromatographie d'exclusion stérique contenant un gel Superdex 75 Increase 10/300 GL (Cytiva, #29148721) a été utilisée. Une solution saline tamponnée au phosphate (1X PBS) a servi de phase mobile à une vitesse de 0,5 mL/min. Le volume d'élution correspondait à 1,5 fois le volume de colonne (CV). Le suivi de l'élution a été effectué par détection UV à 280 nm et les différentes fractions ont été analysées par SDS-PAGE.

2.5.5 Dialyse

Des cassettes de dialyse Slide-A-Lyzer (2, 3 ou 15 mL ThermoScientific) et un tampon de dialyse (1X PBS) ont été utilisés pour les protéines produites en suivant les recommandations du fabricant.

2.6 Dosage des protéines

Une estimation de la concentration en protéines des échantillons a pu être obtenue par une analyse des gels de SDS-PAGE où une quantité connue d'albumine sérique bovine (BSA) a été chargée parallèlement des échantillons à doser. Pour une estimation valable, la concentration inconnue, devait se situer dans l'intervalle de linéarité de la courbe d'intensité. L'intensité correspond à la quantité de protéines présente dans l'échantillon. Le logiciel d'imagerie ImageLab 6.1 de Bio-Rad a été utilisé pour réaliser les analyses densitométriques, quantifier l'intensité des bandes et estimer la quantité des protéines présentes sur gel.

La concentration protéique a également été mesurée à l'aide du test Pierce BCA (Bicinchoninic Acid Assay) de ThermoFisher Scientifique (Cat# 23227) selon les instructions du fabricant. Pour la quantification, un coefficient de corrélation (R^2) supérieur à 0,98 pour la courbe standard a été considéré comme acceptable. Une courbe standard de 0-2000 $\mu\text{g/mL}$ de BSA a été préparée. Tous les échantillons à doser ainsi que ceux de la courbe étalon ont été préparés en duplicata. La procédure standard a été suivie en microplaque et la lecture a été effectuée à 562 nm.

2.7 Marquages des protéines au FITC

Les protéines marquées ont été diluées à une concentration de 1 mg/mL dans un tampon bicarbonate de sodium (0,1 M) à pH 8,3. Pour chaque millilitre de protéine, un volume de 10,5 μL d'une solution d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) en DMSO anhydre (10 mg/mL) a été ajouté sous agitation. La préparation a ensuite été incubée pendant une heure à température ambiante à l'abri de la lumière puis gelfiltrée sur colonne de désalage (D-Salt, Thermo Scientific, Cat#43230) en suivant les recommandations du fabricant. L'analyse de la purification a été vérifiée par électrophorèse sur gel SDS-PAGE.

2.8 Électrophorèse sur gel (SDS-PAGE)

La migration des protéines a été effectuée à courant constant de 150 V pour 1 heure pour des gels de 12 % ou 15 % d'une épaisseur de 1,5 mm. L'échelle de poids moléculaires utilisée est un mélange des standards Precision Plus dans un rapport de 3:2 de Protein Unstained (Bio-Rad Laboratories, Cat# 1610363) et Protein

All blue (Bio-Rad Laboratories, Cat#1610373). Pour certaines expériences, la détection des protéines a été réalisée via une coloration à l'aide du bleu de Coomassie (InstantBlue Coomassie Protein Stain, ISB1L, Abcam, Cat #ab11921). Alternativement, la présence de 0,5% de 2, 2, 2-trichloroéthanol (TCE) (Sigma, Cat#115-20-8) dans le gel a permis la détection des protéines après activation par exposition au rayon UV pendant 1 minute. L'acquisition des images a été faite à l'aide du ChemiDoc MP (BioRad) et la visualisation des protéines a été faite par l'utilisation du logiciel Image Lab (BioRad).

2.9 Immunobuvardage de type western

Les gels SDS contenant du TCE ayant servi à séparer des échantillons protéiques ont été activés tel que décrit à la section 2.8. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane PVDF (Bio-Rad Laboratories, Cat#10026933) à l'aide d'un système de transfert Trans-Blot Turbo de Bio-Rad avec un courant de 2,5 A et une tension maximale de 25 V pendant 7 minutes. Le tampon de transfert utilisé est le Trans-Blot Turbo 1X (Bio-Rad Laboratories, Cat#10026938) préparé selon les recommandations du fabricant. L'efficacité du transfert des protéines a été vérifiée en utilisant la fonction *Stain-Free* du système ChemiDoc MP. Les membranes ont ensuite été incubées dans une solution de 5% de lait dans du TBS-T (20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl et 0,3% Tween 20) pendant 1 h à température ambiante avant d'être incubées avec les anticorps correspondants. Toutes les incubations d'anticorps sont effectuées pendant 1 h à température pièce et les dilutions sont effectuées dans du TBS-T. Tous les lavages ont été effectués trois fois pendant 5 minutes à température ambiante dans une solution de TBS-T. La révélation des protéines a été effectuée en utilisant le substrat Clarity Western ECL (Bio-Rad Laboratories, Cat#170-5061) selon les directives du fabricant et la détection de la chemiluminescence a été effectuée avec le système d'imagerie ChemiDoc MP (Bio-Rad). Les anticorps, leurs dilutions et leurs conditions d'utilisation sont présentés au tableau 2.1.

2.10 Culture et transfection cellulaire

Les cellules HEK293T/17 (ATCC, Cat# CRL-11268) ont été utilisées comme modèle pour l'étude. Les cellules ont été cultivées à confluence d'environ 70% dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) (ThermoFisher Scientific, Cat#11995-065) avec l'ajout de 10 % de de sérum bovin fœtal (FBS, Wisent, 090150) avec une température de 37 °C, un environnement humidifié et un niveau de dioxyde de carbone (CO₂) maintenu à 5 %. Pour chaque condition de transfection transitoire des cellules HEK293T/17, un premier mélange de 250 µL d'EXTREME MEM (1X, Multicell, Cat# 390-005-CL) avec 2 µL de Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific, Cat#11668027) est préparé et incubé 5 minutes à la température pièce.

Séparément, un deuxième mélange de 250 μ L d'EXTREME MEM avec 1 μ g d'ADN est préparé. Après l'incubation, le premier mélange est ajouté à celui contenant l'ADN. Après l'incubation de 20 minutes à la température pièce, le mélange combiné de 502 μ L est ajouté à 1,5 mL de milieu de culture complet contenant 800 000 cellules. Les cellules sont placées à l'incubateur pour 48h.

2.11 Essais de liaison *in vitro*

2.11.1 Lyse des cellules HEK293T/17

Les cellules HEK293T/17 cultivées en adhérence ont d'abord été lavées trois fois au PBS 1X pour retirer le milieu de culture. Ensuite, les cellules ont été détachées mécaniquement à l'aide d'un grattoir stérile et d'un tampon de lyse HEK293 (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1X PMSF, pH 8.0). Le lysat a été incubé sur glace pendant 20 minutes, puis clarifié par centrifugation (10 000 $\times$ g, 15 minutes, 4 °C). Le surnageant a été utilisé pour l'essai de *pull-down*.

2.11.2 Essai d'interaction par GST *pull-down*

Afin d'évaluer l'interaction entre les protéines, 20 μ L de résine de glutathione portant le nanocorps marqué à la GST, la protéine GST seule, ou 20 μ L de résine vierge comme contrôle négatif ont été incubés avec un lysat cellulaire de cellules HEK293T/17 pendant 2 heures à 4 °C sous rotation douce. Après incubation, les billes ont été lavées à cinq reprises avec le tampon de lavage GST, puis les complexes retenus ont été élués en ajoutant du tampon Laemmli 2X (1:1 v/v), suivi d'une dénaturation à 95 °C pendant 5 min. Les échantillons ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE, puis transférés sur membrane PVDF pour être détectés par immunobuvardage à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine d'intérêt.

2.12 Microscopie

L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope à épifluorescence inversé Olympus IX83 équipé d'un objectif UPlanSApo 60 $\times$ à huile ayant une ouverture numérique de 1,35 (Olympus), d'un système d'éclairage à base de diode électroluminescente (DEL) X-Cite Xylis 365 (Excelitas Technologies Corp.) et d'une caméra monochrome sCMOS Zyla 4.2 Plus (Andor). Le logiciel Olympus CellSens Dimension est utilisé pour l'acquisition alors que la déconvolution des images est réalisée à l'aide de la fonction Olympus 3D Deconvolution du logiciel. Les images ont été acquises avec 10 à 12 tranches optiques (Z-stack) prises à des intervalles de 0,27 μ m avec une résolution fixée à 1080 $\times$ 1080 pixels.

2.12.1 Immunomarquage

Les lamelles de verre (microscope coverglass, #1.5, 12 mm de diamètre, Mercedes Scientific, MER R00121.5) sont prétraitées avec de la poly-D-lysine (0,1 mg/mL) pendant 20 minutes à température ambiante, rincées deux fois à l'eau stérile puis séchées à l'air libre pendant 20 minutes, en conditions stériles, afin de favoriser l'adhérence cellulaire. Les cellules HEK293T/17 cultivées sur ces lamelles de verre ont ensuite été lavées 3 fois avec une solution tamponnée au phosphate (PBS 1X) et fixées à l'aide de paraformaldéhyde à 4 % (PFA) avec 4 % de sucrose dilué dans du PBS (1X final) refroidi sur glace. La fixation s'effectue pour 20 minutes à température ambiante. Entre chaque étape, les cellules sont lavées trois fois au PBS 1X. La perméabilisation des cellules est effectuée avec 0,25 % Triton X-100 préparé dans du PBS 1X pendant 20 minutes. Le blocage des sites non spécifiques est réalisé avec du sérum de chèvre normal à 10 % (NGS), dilué dans du PBS 1X, pendant 1 heure. Les cellules sur lamelles de verre ont été incubées avec les nanocorps non conjugués, ainsi que les contrôles appropriés tels que la GST, à une concentration de 0,9 μ M. Cette étape a été suivie d'une incubation avec l'anti-Camélidé VHH non conjugué (GenScript), puis d'une incubation avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué avec un fluorophore Alexa Fluor 568 nm (ThermoFisher), tous deux dilués à 1:1000. La description détaillée des différents anticorps commerciaux utilisés est présentée dans la section 2.1 anticorps traditionnels.

Pour certaines expériences, les lamelles ont été incubées avec les nanocorps conjugués à une concentration de 0,9 μ M. La protéine GST ou GST-FITC a été ajoutée dans les situations appropriées comme contrôle à une concentration de 0,9 μ M. Toutes les dilutions d'anticorps ont été effectuées dans un tampon de dilution (3% NGS, 1X PBS) et les incubations ont été effectuées 1 heure à température ambiante. Si applicable, un inhibiteur de la thrombine, la benzamidine hydrochloride hydrate (Sigma-Aldrich, Cat#B6506), a été ajouté à 1 mM dans le tampon de dilution. Les noyaux des cellules ont été colorés avec une solution de 2 μ g/mL de DAPI (Life Technologies) dans du PBS 1X pendant 5 minutes. Après une dernière étape de lavage, les lamelles de verre ont été montées à l'aide de ProLong Diamond Antifade (Thermo Fisher Scientific, Cat#P36961) sur des lames de microscope (UltiDent, Cat#170-7107-AS), laissées sécher 24 heures à température pièce avant l'acquisition des images.

2.12.2 Essais d'internalisations

Le milieu de culture des cellules HEK293T/17, cultivées sur les lamelles de verre comme décrit précédemment, est retiré et un milieu frais ou une solution de PBS 1X contenant le nanocorps RNF167-A5 est ajouté. Différentes concentrations (0,1-0,9 μ M), temps (15-120 minutes) et températures d'incubation

(4, 25, 37 °C) ont été testés. Ensuite, les cellules sont lavées 3 fois au PBS 1X et fixées avec une solution de fixation au PFA (4% PFA, 4% sucrose, PBS 1X) refroidi et/ou avec une solution de méthanol 100 % glacé. Entre chaque étape, les cellules sont lavées trois fois au PBS 1X. Si nécessaire, la perméabilisation des cellules a été faite avec du Triton X-100 à différentes concentrations (0,1 % ou 0,25 %). Différents temps de fixation (1, 5, 15, 20, 30 minutes) et de perméabilisation (15, 20, 30 minutes) ont été testés dans l'optimisation du procédé. Le blocage des sites non spécifiques est réalisé avec du sérum de chèvre normal à 10 % (NGS) dilué dans du PBS 1X pendant 1 heure à température pièce.

Pour les immunodétection indirectes, les nanocorps non conjugués, ainsi que les contrôles appropriés, ont été immunodétestés avec l'anticorps anti-Camélidé VHH (GenScript) non conjugué suivi d'une incubation avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué avec un fluorophore Alexa Fluor 568 nm (ThermoFisher) tous deux dilués à 1:1000 pendant 1 heure à température ambiante. La méthode d'immunomarquage reste la même que celle présentée à la section précédente.

2.13 Répression génique (knock-down)

La méthode de transfection est similaire à celle décrite dans la section 2.10 pour les transfections transitoires. L'ADN est substitué par un mélange d'ARN interférents dirigé contre RNF167 humain, acheté chez IDT sous la forme d'un duplex d'ARNi substrat de Dicer (DsiRNA; #1: 5'-rArArCrUrUrGrArCrCrUrCrArArGrGrUrC-3' et 5'-rCrArUrUrUrArGrGrArCrCrUrUrGrArGrGrU-3', #2: 5'-rUrCrGrArCrUrUrArCrCrArArGrArGrCrA-3' et 5'-rUrUrUrCrArGrUrUrGrCrUrCrUrUrGrGrU-3'). Le DsiRNA contrôle négatif (cat. #DSNC1) a été utilisé. Premièrement, les DsiRNA sont dilués dans un milieu d'EXTREME MEM. Par la suite, la Lipofectamine 2000 est diluée dans un milieu d'EXTREME MEM à raison de 0,5 µL/puits pour une plaque de 24 puits, destinée aux essais de microscopie d'immunofluorescence, ou de 2 µL/puits pour une plaque de 6 puits, destinée aux essais d'immunobuvardage. Après 5 minutes d'incubation, le mélange de Lipofectamine est ajouté au mélange contenant les DsiRNA, puis incubé pendant 20 minutes. Après incubation, le mélange est ajouté à 12 500 cellules en suspension dans un volume final de 1 mL par puits (plaque de 24 puits) ou 250 000 cellules dans un volume final de 2 mL par puits (plaque de 6 puits). Chaque DsiRNA est à une concentration finale de 10 nM. L'efficacité de la répression de l'expression de RNF167 a été évaluée à différents jours post-transfection (24 h, 48 h, 72 h). L'expression de RNF167 a été analysée par électrophorèse SDS-PAGE suivie d'un immunobuvardage avec l'anticorps anti-RNF167.

2.14 Analyse d'images et traitement statistique des données

Les images ont été traitées à l'aide du logiciel FIJI (ImageJ) (Schindelin *et al.*, 2012). Un prétraitement a d'abord été effectué pour corriger les variations du signal de fond. La fluorescence moyenne de fond, mesurée en valeur de gris, a été soustraite de la valeur de l'intensité totale cellulaire dans l'analyse séparée des différents canaux. Par la suite, cela a permis de calculer avec précision l'intensité du signal pour les régions d'intérêt (ROI). L'intensité moyenne de chaque cellule entière sélectionnée individuellement a été mesurée à partir des images traitées. Les données brutes ont été traitées et analysées avec le logiciel R (version 4.4.3) en utilisant les packages tidyverse (Wickham *et al.*, 2019) et ggpubr (Kassambara, 2023). Un test t de Welch a été réalisé pour comparer les moyennes entre les deux groupes, car l'hypothèse d'égalité des variances (écart-type au carré) n'était pas respectée. De plus, une analyse par ANOVA à deux facteurs (condition x réplicat) a été réalisée afin d'évaluer les effets du traitement, de la répétition expérimentale et leur interaction. Tous les tests statistiques ont été réalisés avec un seuil de significativité fixé à 0.05 (niveau de confiance de 95%).

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Première stratégie de production du nanocorps RNF167-A5

3.1.1 Clonage du VHH (RNF167-A5) dans le vecteur pRSF-Trx

La construction du plasmide pRSF-Trx-VHH a été réalisée en vue de l'expression du nanocorps RNF167-A5 en tant que protéine recombinante conjuguée à une étiquette d'affinité composée de six résidus d'histidine (6xHis) dans le but de faciliter sa purification. Cette étiquette a la capacité de se lier spécifiquement aux ions métalliques immobilisés tels que le nickel (Ni^{2+}) présent dans la matrice Ni-NTA utilisée dans la chromatographie d'affinité aux ions métalliques immobilisés (IMAC) (Spriestersbach *et al.*, 2015). Le plasmide a été obtenu en insérant la séquence codant le VHH (375 pb) à l'aide des enzymes de restriction BamHI et Sall, dans le site de clonage après la séquence de reconnaissance des protéases TEV. Cette construction plasmidique permet l'expression d'une protéine de fusion composée d'une étiquette d'affinité 6xHis-tag, suivie de la thioredoxine (Trx) et du nanocorps RNF167-A5 (VHH) (voir ANNEXE A). L'utilisation de la thiorédoxine comme partenaire de fusion est une stratégie courante pour exprimer des protéines contenant des liaisons disulfures en système bactérien afin d'augmenter la solubilité des protéines synthétisées et faciliter leurs expressions (Francis et Page, 2010). La particularité d'avoir un site de reconnaissance de la protéase TEV peut permettre de retirer, par clivage enzymatique, l'étiquette d'affinité ainsi que la thioredoxine, afin d'obtenir le VHH seul (Raran-Kurussi *et al.*, 2017). Des bactéries *E. coli* DH5 α ont été transformées avec le produit de ligation et ensemencé sur milieux sélectifs. Six transformants résistants à la kanamycine ont été sélectionnés et, après analyse des plasmides par digestion diagnostique BamHI/Sall, six clones positifs ont été obtenus.

Pour l'expression du VHH recombinant, le plasmide validé correspondant au clone #6 a été transféré par transformation dans des cellules compétentes *E. coli* BL21 (DE3). Cette souche bactérienne est largement utilisée pour l'expression de protéines recombinantes pour sa capacité à produire des niveaux élevés de protéines (Zhang *et al.*, 2015). L'expression de la protéine est contrôlée par l'opéron Lac, qui est inducible en présence de lactose et réprimé en présence de glucose (Swint-Kruse et Matthews, 2004). L'addition de glucose dans le milieu de culture permet réprimer l'expression de la protéine étrangère lors de la croissance bactérienne et limiter la toxicité qu'elle pourrait avoir sur l'hôte. Les cellules *E. coli* BL21 (DE3) sont cultivées dans le bouillon de lysogénie (milieu LB) additionné de glucose et avec kanamycine comme

agents de sélection. À la suite de l'obtention d'une densité optique d'approximativement 0,8 à 600 nm, l'ajout de 1 mM d'isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), un analogue non métabolisable du lactose qui lève la répression par le glucose, permet d'induire la transcription via l'opéron lactose. Cela a permis d'induire l'expression de la protéine 6XHis-Trx-VHH avant de réaliser une étape de purification réalisée en *batch*, à l'aide d'une résine Ni-NTA, afin d'exploiter l'affinité de l'étiquette His-tag. Des échantillons ont été prélevés à partir de cultures lysées après l'induction puis au cours des différentes étapes de purification. Ces échantillons ont été ensuite analysés par SDS-PAGE (figure 3.1). Trois clones BL21 (pRSF-Trx-VHH) ont été sélectionnés pour l'expression et la purification du 6xHis-Trx-VHH. De plus, un clone transformé avec le vecteur vide (pRSF-Trx) a été utilisé comme contrôle négatif de l'expression du VHH et comme témoin pour la validation de la méthode de purification.

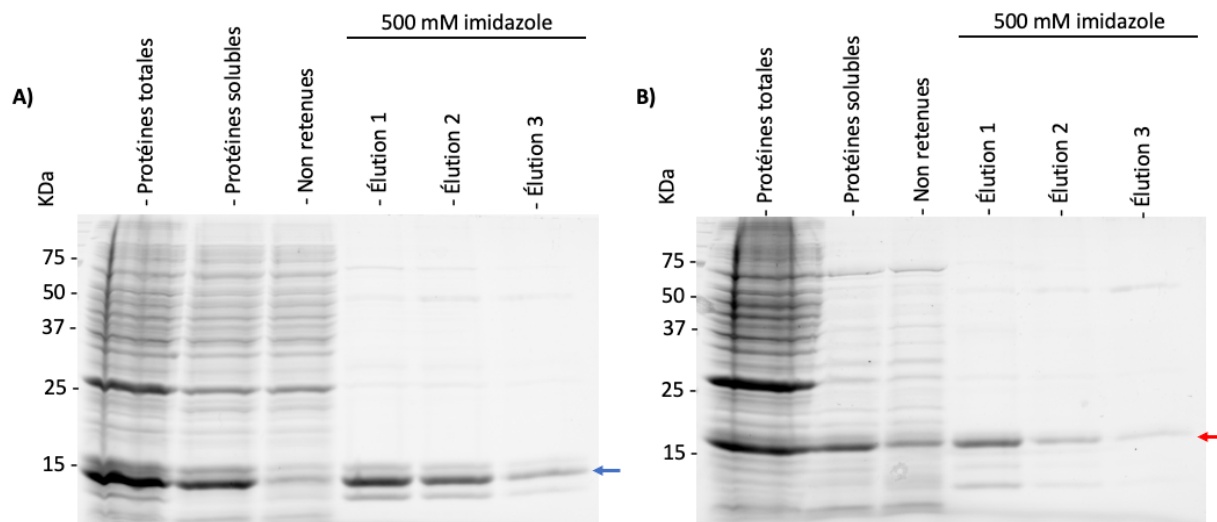


Figure 3.1 Analyse de la purification de 6xHis-Trx-VHH.

Gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12 % révélé par *Stain-Free* représentant les étapes successives d'extraction et de purification des protéines 6xHis-Trx-VHH et 6xHis-Trx exprimée dans *E. coli* (BL21). La purification par lot a été réalisée par chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA. Une concentration de 500 mM d'imidazole a permis l'élution des protéines. A) Purification de la protéine 6xHis-Trx comme contrôle de la méthode d'expression et de purification. Une protéine majoritaire estimée à 14 kDa est visible dans les éluats (flèche bleue). B) Tentative de production de la protéine 6xHis-Trx-VHH. La protéine élue, la plus abondante, a un poids moléculaire estimé à 17 kDa (flèche rouge). Les résultats obtenus ont été similaires pour les trois clones BL21 (pRSF-Trx-VHH) sélectionnés et purifiés indépendamment; un seul exemple est présenté ici à titre représentatif. Les gels représentés dans cette figure sont des images obtenues par densitométrie avec l'appareil ChemiDoc MP et analysées avec le logiciel Image Lab 6.1.

En théorie, le poids moléculaire du VHH RNF167-A5 est estimé à 13,4 kDa sur la base de sa séquence en acide aminé. Toutefois, le peptide en N-terminal contenant l'étiquette de polyhistidine et la protéine de fusion Trx augmente la taille de la protéine de 14,3 kDa. Par conséquent, la protéine exprimée, 6xHis-Trx-VHH, à un poids moléculaire attendu de 27,7 kDa. L'analyse SDS-PAGE de la purification de 6xHis-Trx-VHH n'a montré aucune expression détectable de la protéine au poids moléculaire attendue. Les résultats obtenus ont été similaires pour les trois clones sélectionnés, chacun ayant été soumis indépendamment aux étapes d'expression et de purification (donnée non montrée). Une protéine avec un poids moléculaire de 17 kDa est majoritairement retrouvée dans les éluions (figure 3.1B). D'un autre côté, l'analyse des résultats de la production de la protéine 6xHis-Trx suggère que la protéine contrôle est exprimée et extrait efficacement du lysat avec la méthode de purification employée. Ceci est observable par la déplétion de celle-ci dans l'échantillon « Non retenue » (figure 3.1A). De plus, la protéine majoritairement retrouvée dans les éluions correspond au poids moléculaire attendu. Cette interprétation repose seulement sur la concordance des poids moléculaires théoriques et observés sur gel. La première stratégie de purification par affinité Ni-NTA n'a pas permis de purifier la protéine 6xHis-Trx-VHH.

3.2 Deuxième stratégie de production du nanocorps

3.2.1 Clonage du VHH (RNF167-A5) dans le vecteur pGEX-4T1

Une construction plasmidique intégrant la séquence du nanocorps RNF167-A5 dans le plasmide pGEX-4T1 a été réalisée. Celle-ci, permet l'expression du VHH avec la GST comme étiquette d'affinité, en position N-terminal de la protéine cible, pour faciliter sa purification. L'étiquette de GST comme partenaire de fusion augmente la solubilité de la protéine recombinante et permet sa purification par affinité du glutathion (Schafer *et al.*, 2015). En plus de faciliter sa caractérisation fonctionnelle ultérieure, en particulier dans les études d'interactions protéine-protéine comme les tests de liaison *in vitro* de type GST *pull-down* (Smith et Johnson, 1988). Ce vecteur possède une séquence de clivage protéique par la thrombine après la séquence codant la GST (Guan et Dixon, 1991). Ce qui permettra de retirer l'étiquette de fusion de la protéine d'intérêt par clivage enzymatique. La stratégie de clonage reste la même que celle employée pour la construction du plasmide pRSF-Trx-VHH, ce qui a permis d'obtenir six clones positifs après validation. Le clone plasmidique #3 a été introduit dans des cellules compétentes *E. coli* BL21 (DE3) par transformation. À l'instar du vecteur pRSF-Trx, le vecteur pGEX-4T1 utilise l'opéron Lac pour réguler l'expression de la protéine d'intérêt. Trois colonies positives pour pGEX-4T1-VHH, ainsi qu'un transformant contrôle contenant le vecteur vide pGEX-4T1, ont été cultivées dans du bouillon de lysogénie additionné de glucose et d'ampicilline, utilisé comme agent de sélection, avec la même approche que celle décrite

précédemment pour pRSF-Trx à l'exception de l'antibiotique. L'induction a été effectuée avec 1 mM d'IPTG avant de réaliser une purification en *batch* à l'aide de résine de Glutathione Sepharose 4B de Cytiva, exploitant ainsi l'affinité de l'étiquette GST. Des échantillons issus de cultures lysées après induction, suivis des différentes étapes de purification, ont été analysés par SDS-PAGE. Parmi les trois clones testés, celui présentant la meilleure expression a été retenu pour la purification de GST-VHH, dont les résultats sont présentés dans la figure 3.2. La protéine recombinante GST-VHH a un poids moléculaire théorique estimé à 39,7 kDa en raison de sa séquence en acide aminé. De même, la GST seule a un poids moléculaire estimé à 25,5 kDa. Sur gel, la protéine GST-VHH semble avoir un poids moléculaire apparent de 34 kDa (figure 3.2B) et la protéine GST de 25 kDa (figure 3.2A). L'analyse des gels SDS-PAGE, suggère que les protéines GST-VHH et GST ont été correctement exprimées et capturées par la résine en raison de la présence d'une bande visible et proéminente correspondant au poids moléculaire attendu des protéines visées. Toutefois, malgré une expression visible de la protéine GST-VHH fixée sur résine, les premiers essais d'élution ont échoué en l'absence de conditions optimisées pour cette protéine. Il est intéressant de constater que le premier tampon d'élution (50 mM Tris-HCl, 10 mM glutathione réduit, pH 8.0) a été efficace pour l'élution de la protéine GST, mais inefficace pour la GST-VHH (figures 3.2A et 3.2B). Quelques combinaisons de tampon d'élution ont été testées afin d'optimiser la récupération de la protéine GST-VHH (données non présentées) : il s'est avéré qu'une augmentation seule de la concentration en glutathione réduit, de 10 mM à 50 mM, s'est révélée inefficace pour améliorer l'élution du nanocorps (données non présentées). Des modifications à la composition du tampon d'élution, comme le pH et la force ionique, ont été explorées avec succès. La figure 3.2C montre l'élution obtenue avec le tampon final optimisé (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 30 mM glutathione réduit, 0,1 % Triton X-100, pH 8.5) qui permet une récupération efficace du GST-VHH. De plus, l'analyse de la résine après élution n'a révélé aucune protéine retenue sur la résine par l'absence de bande visible, démontrant de l'élution efficace de la protéine d'intérêt GST-VHH.

3.2.2 Essais de liaison *in vitro*

Afin de valider la spécificité de notre VHH pour la ligase RNF167, des essais de liaison *in vitro* par GST *pull-down* ont été effectués. Dans ce test, la protéine de fusion GST-VHH est immobilisée sur une résine de glutathione afin de servir d'appât dans un lysat cellulaire contenant la protéine cible (figure 3.3A). En conséquence, si le VHH fixé sur résine interagit avec la protéine, l'analyse par immunobuvardage, après séparation par électrophorèse sur gel, permettra d'identifier les protéines capturées par affinités et valider une possible interaction protéine-protéine. La concentration en GST-VHH a été estimée approximativement à 5,7 µg pour 20 µL de résine. Cette quantité de protéine a été normalisée pour toutes

les conditions et le volume de résine ajusté à 20 μ L lorsque nécessaire. Les cellules HEK293T ont été utilisées comme source de RNF167 endogène, car cette protéine y est naturellement exprimée (Lussier *et al.*, 2012). Les cellules ont été lysées, puis le lysat a été incubé avec la protéine GST-VHH ou la GST immobilisée sur la résine de Glutathione Sepharose 4B, ou encore avec la résine sans protéine immobilisée.

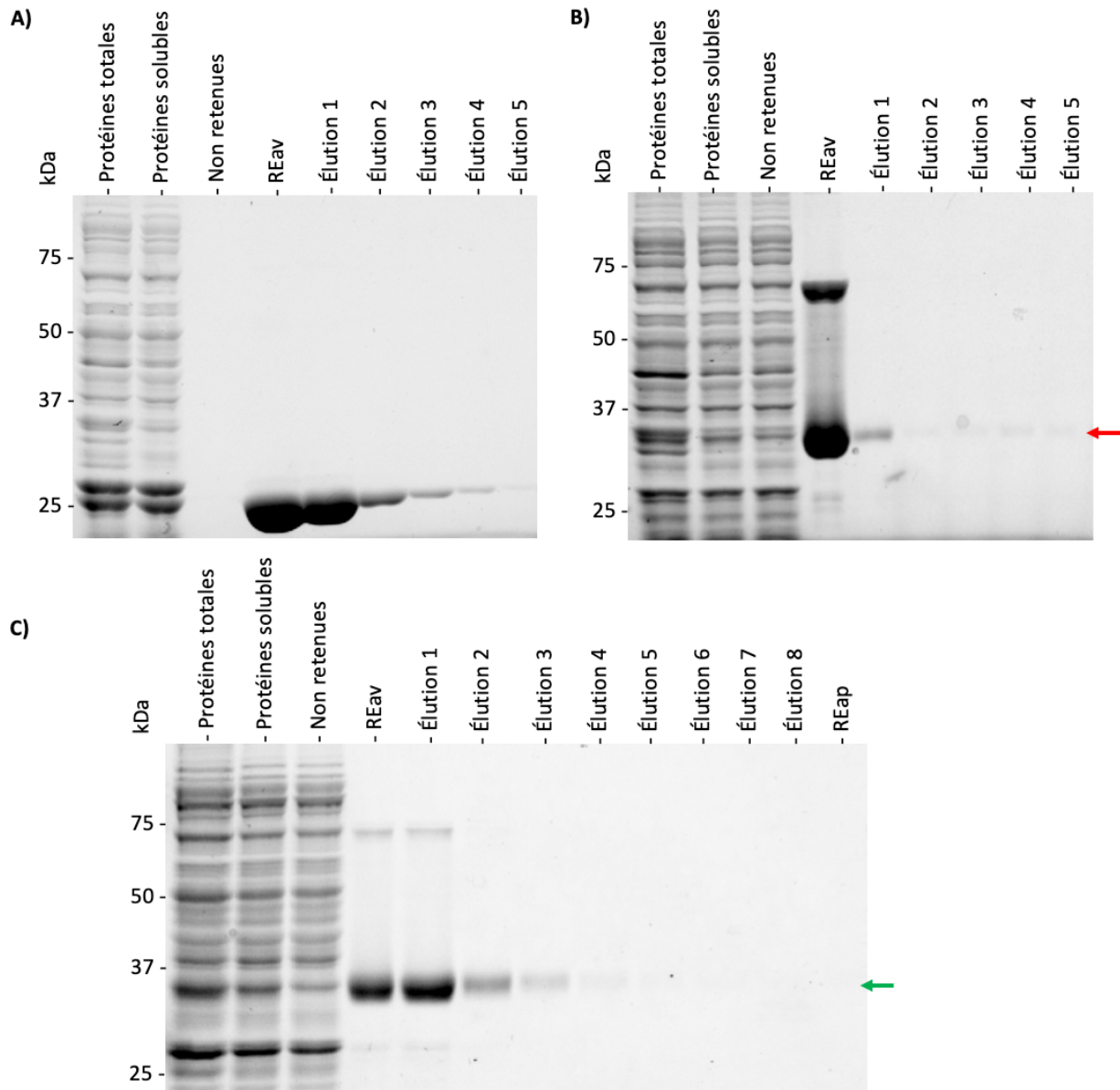


Figure 3.2 Analyse de la purification de GST-VHH et optimisation du tampon d'élution.

Gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12 % révélé par *Stain-Free* représentant les étapes successives d'extraction et de purification des protéines GST-VHH et GST exprimées dans *E. coli*. (BL21). La purification par lot a été réalisée par chromatographie d'affinité sur résine de glutathione sepharose. Une optimisation du tampon d'élution a été effectuée. A) Expression et purification de la protéine GST seule comme contrôle

d'expression. L'échantillon « Non retenue » n'a pas été chargé sur le gel par erreur. La protéine est visible vers 25 kDa sur résine et dans les éluions. B) Première tentative de purification et d'élution de GST-VHH. La protéine est visible vers 34 kDa (flèche rouge). L'élution est inefficace. C) Seconde purification réalisée avec un tampon d'élution optimisé. L'élution de la protéine GST-VHH, ~ 34 kDa, (flèche verte) est réussie. REav, Résine avant élution ; Reap, Résine après élution.

Après 2 heures d'incubation avec agitation douce à 4°C, les complexes ont été lavés pour éliminer les interactions non spécifiques, les protéines retenues sur la résine ont été éluées dans le tampon d'échantillon Laemmli. Les échantillons ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE, puis analysés

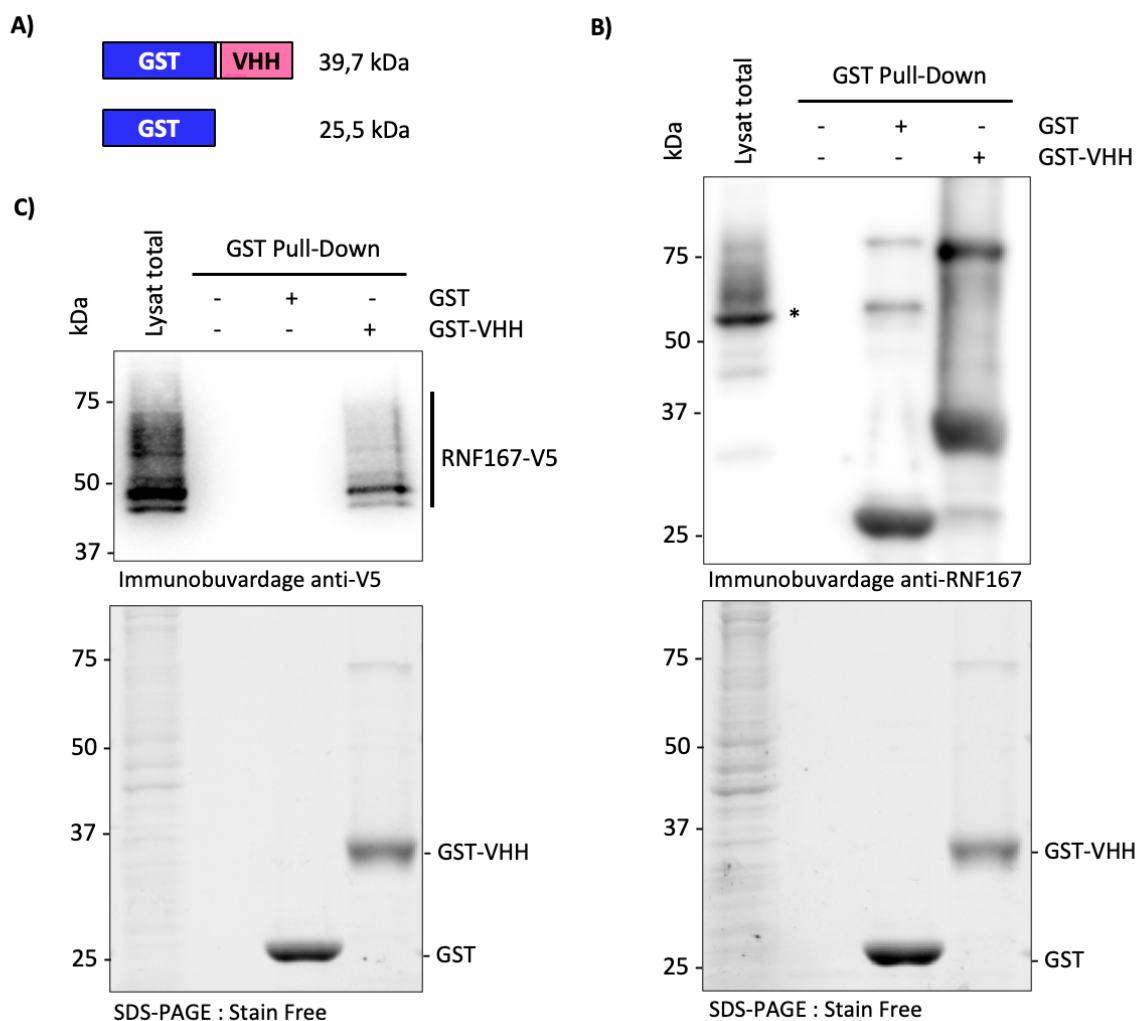


Figure 3.3 Essai de liaison *in vitro* entre la protéine de fusion GST-VHH (RNF167-A5) et RNF167. A) Schéma montrant les protéines utilisées pour le test de GST pull-down, ainsi que leur poids moléculaire théorique. La protéine appât est GST-VHH, tandis que GST sert de protéine témoin et de contrôle négatif.

B) Après incubation des protéines GST-VHH ou GST immobilisées sur la résine, ou avec la résine seule en présence de lysat cellulaire de cellules HEK293T, les échantillons ont été élués puis séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE. Un transfert sur membrane a été réalisé, suivi d'une détection par immunobuvardage avec un anticorps anti-RNF167. L'astérisque (*) représente une bande non spécifique trouvée dans le lysat cellulaire total. C) Des cellules HEK293T ont été préalablement transfectées avec le plasmide codant pour la protéine RNF167-V5-His, puis lysées. De la même manière, après incubation des protéines immobilisées sur la résine, ou avec la résine seule, avec le lysat, les échantillons ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE, suivis d'un immunobuvardage avec un anticorps anti-V5. La protéine RNF167 a été détectée par immunobuvardage dans le lysat cellulaire et dans la piste d'échantillon GST-VHH. Résultats représentatifs d'au moins trois répétitions biologiques indépendantes.

par immunobuvardage. Les résultats ont montré que la protéine RNF167 endogène a été bien exprimée et détectée dans le lysat cellulaire (figure 3.3B). Toutefois, l'anticorps utilisé reconnaît également la GST en raison de son procédé de fabrication, ce qui a complexifié l'analyse des résultats de liaison *in vitro*. De plus, la présence d'interactions non spécifiques a empêché de conclure efficacement à une interaction spécifique entre le VHH et RNF167. Afin de surmonter les limites rencontrées avec l'anticorps anti-RNF167, les tests de liaison *in vitro* ont été effectués de nouveau, mais avec une version recombinante de RNF167. Ainsi, les cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide exprimant la protéine RNF167-V5-His, ce qui a permis la détection de RNF167 à l'aide d'un anticorps anti-V5 commercial. Suivant la lyse cellulaire, le lysat contenant la protéine recombinante RNF167 a été utilisé pour le test de liaison, en utilisant les mêmes conditions expérimentales que précédemment. Les résultats ont montré que la protéine RNF167 recombinante a été bien exprimée et détectée dans le lysat cellulaire, mais aussi dans la piste du lysat incubé avec le GST-VHH et non dans les contrôles négatifs (figure 3.3C). Ce qui suggère que l'interaction entre le VHH et RNF167 est spécifique et non due à une interaction non spécifique entre la GST ou la résine seule. Les résultats ont permis de confirmer rapidement que le VHH produit était fonctionnel et reconnaissait la protéine cible.

La protéine RNF13 exerce des fonctions apparentées à RNF167. De plus, par son homologie de séquence et de structure avec RNF167, RNF13 est un bon candidat afin de vérifier la spécificité du nanocorps RNF167-A5 pour la ligase E3 RNF167 (Jin *et al.*, 2011). Cette fois-ci, les cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide exprimant la protéine RNF13-HA. À la suite de la lyse cellulaire, le lysat contenant la protéine recombinante RNF13 a été utilisé pour le test de liaison *in vitro* où les conditions expérimentales sont restées les mêmes que précédemment. Les résultats d'immunobuvardage ont montré que la protéine RNF13-HA a été bien exprimée et détectée dans le lysat cellulaire (figure 3.4). De plus, RNF13 n'a pas été détectée dans aucun éluat du test de liaison *in vitro* avec la protéine de fusion GST-

VHH. Ce qui suggère que la protéine RNF13 n'interagit pas avec le nanocorps RNF167-A5. Les essais de liaison *in vitro* ont permis de montrer que le nanocorps RNF167-A5 produit a de l'affinité, en plus d'être spécifique à la RNF167, dans les conditions testées.

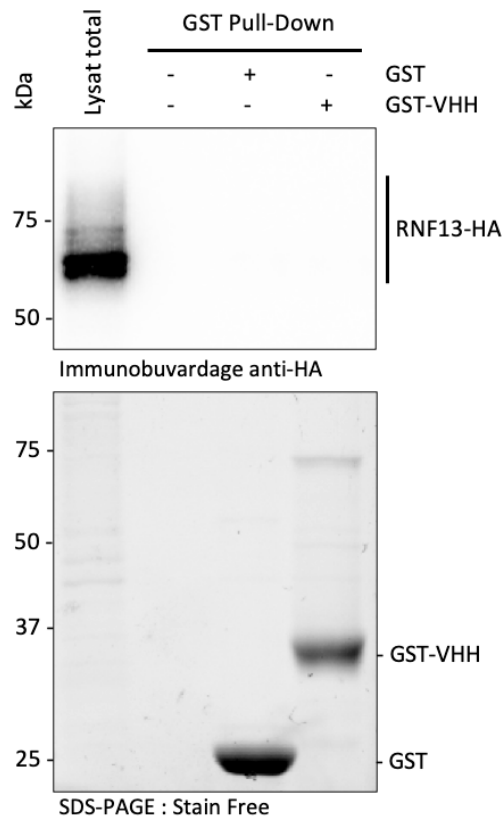


Figure 3.4 Essai liaison *in vitro* entre la protéine de fusion GST-VHH (RNF167-A5) et la protéine RNF13. Après incubation du lysat cellulaire, provenant de cellules HEK293T exprimant la protéine RNF13-HA, avec les protéines GST-VHH ou GST immobilisées sur la résine, ou avec la résine seule, les échantillons ont été élués puis séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE. Un transfert sur membrane a été réalisé, suivi d'une détection par immunobuvardage avec un anticorps anti-HA. Résultats représentatifs d'au moins trois répétitions biologiques indépendantes.

3.2.3 Fonctionnalisation du nanocorps RNF167-A5

Après avoir validé la spécificité du VHH pour la ligase RNF167, l'étape suivante de ce travail est de fonctionnaliser le VHH par l'ajout de molécules fluorescentes afin de l'utiliser comme outil de détection en microscopie à fluorescence. À cette fin, deux stratégies ont été mises en œuvre, chacune présentant des avantages et des inconvénients. Dans un premier temps, la conjugaison chimique du VHH avec de

l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), un fluorophore qui émet une couleur jaune-vert lors de l'excitation, a été effectuée. Le marquage des anticorps au FITC est une méthode couramment utilisée en recherche pour des études de microscopie, car elle a l'avantage d'être rapide à effectuer et peu coûteuse (Lantz, Holmes et Douagi, 2023). Lors de la conjugaison en condition légèrement basique, le groupe isothiocyanate du FITC réagit de manière covalente avec les groupes amines libres de la protéine et crée un marquage stable après conjugaison (Chaganti, Venkatakrishnan et Bose, 2018). Toutefois, le marquage par FITC peut avoir des effets néfastes sur l'affinité de liaison d'un anticorps pour son antigène cible et même occasionner un marquage non spécifique par une perte de spécificité (Takai *et al.*, 2011). Par conséquent, un marquage à l'isothiocyanate de fluorescéine a été réalisé sur la protéine GST-VHH afin d'évaluer sa spécificité après marquage par des essais de liaison *in vitro*, tels que le GST *pull-down*. Dans l'optique d'avoir un contrôle approprié pour les premiers essais de microscopie à fluorescence avec la protéine GST-VHH-FITC, des protéines GST ont également été marquées à l'isothiocyanate de fluorescéine. Après conjugaison, les échantillons protéiques ont été filtrés sur une colonne de dessalage afin d'éliminer les contaminants et le colorant non lié. Le suivi de l'élution des protéines a été surveillé par la visualisation des fractions obtenue par absorbance à 280 nm. Les fractions les plus concentrées en protéines ont été combinées puis vérifiées sur gel SDS-PAGE (figure 3.5). L'analyse des résultats obtenus par électrophorèse sur gel SDS-PAGE confirme que la conjugaison chimique des échantillons au fluorophore a été réussie. Le degré de conjugaison semble efficace d'après la comparaison de l'intensité des bandes d'intérêt observées par coloration *Stain-Free* et celle des bandes fluorescentes observées après excitation à 488 nm, bien que cette évaluation demeure qualitative (figure 3.5). De même, la pureté de l'échantillon sur gel a été jugée satisfaisante, autrement dit, sans contaminant visible. L'essai a permis d'obtenir une protéine GST et une protéine GST-VHH marquées à l'isothiocyanate de fluorescéine, respectivement nommées GST-FITC et GST-VHH-FITC.

La deuxième stratégie pour la fonctionnalisation du nanocorps RNF167-A5 consiste à concevoir des versions recombinantes du VHH couplées à des protéines fluorescentes telles que EGFP et mCherry. Cette stratégie permet de contrôler l'emplacement de l'ajout du fluorophore sur le VHH, de réduire le risque d'altération du site de liaison et possiblement de minimiser l'impact que pourrait avoir cet ajout sur la fonction de la protéine. De plus, les protéines de fusion ont une meilleure résistance à la photodégradation que les colorants tels que FITC (Bajar *et al.*, 2016; Mahmoudian *et al.*, 2011), ce qui est un avantage pour des études de microscopie à fluorescence. La création de protéines de fusion requiert des techniques de génie génétique où des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ont été réalisées. D'abord, une

stratégie de PCR a été mise en place afin d'introduire les sites de restriction EcoRI et Sall, avant le codon d'arrêt en C-terminal, pour permettre l'insertion ultérieure de gène codant, notamment ceux des protéines fluorescentes, en aval de la séquence codant le VHH. L'amplicon ainsi obtenu a été inséré dans le plasmide pGEX-4T1 à l'aide des enzymes de restriction BamHI et XhoI (voir ANNEXE B). Le produit de

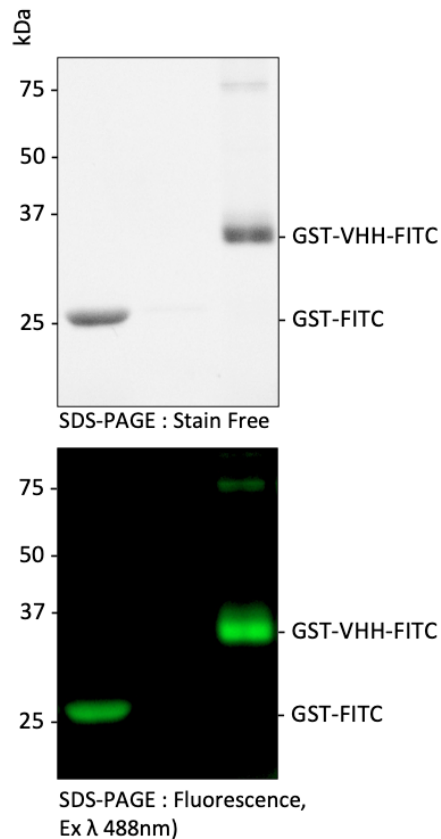


Figure 3.5 Visualisation des protéines marquées FITC par électrophorèse sur gel. Gel SDS-PAGE montrant la séparation des protéines fluorescentes marquées FITC. Les protéines ont été visualisées par la méthode *Stain-Free* (panneau du haut) et à 488 nm (panneau du bas). Les protéines correspondent au poids moléculaire attendu et le signal fluorescent correspond aux protéines visibles par *Stain-Free*.

ligation a été utilisé pour transformer des bactéries *E. coli* DH5α, qui ont été ensemencées sur milieux sélectifs. La présence de l'insert a été vérifiée par digestion diagnostique BamHI/EcoRI, puis une analyse par séquençage de type Sanger a confirmé l'intégrité de la construction plasmique (résultats non présentés). Cette étape de clonage intermédiaire a permis la création du plasmide pGEX-4T1-VHH (+ site de restriction). Ensuite, les gènes codant la protéine EGFP et mCherry ont été amplifiés par PCR. En théorie,

les amorces FluoProt utilisées ont permis de générer des amplicons correspondants à la séquence codante des protéines fluorescentes avec les sites de restriction EcoRI et Sall en amont, ainsi qu'un codon d'arrêt suivi d'un site de restriction XhoI suivi d'un codon d'arrêt, en aval, pour faciliter le clonage et assurer une terminaison correcte de la traduction (voir ANNEXE C). Les amplicons produits ont été introduits dans le plasmide pGEX-4T1-VHH (+ site de restriction) à l'aide des enzymes de restriction EcoRI et XhoI. Le produit de ligation a été utilisé pour transformer des bactéries *E. coli* DH5 α qui ont ensuite été ensemencées sur des milieux sélectifs. La présence de l'insert a été vérifiée par digestion diagnostique BamHI/EcoRI, puis une analyse par séquençage de type Sanger a été effectuée comme précédemment (résultats non présentés). Cette stratégie a permis la création des plasmides pGEX-4T1-VHH-EGFP et pGEX-4T1-VHH-mCherry. Le clonage et la construction des nouveaux plasmides pour l'expression des protéines de fusion recombinante ont permis de générer des protéines telles que le nanocorps RNF167-A5 fusionné à EGFP et le nanocorps RNF167-A5 fusionné à mCherry.

Ces plasmides ont été utilisés pour la transformation de bactéries compétentes BL21 afin d'exprimer le VHH fusionné aux protéines fluorescentes. Trois colonies de chaque transformation ont été sélectionnées et multipliées selon la méthode d'expression et de purification décrite précédemment. Les différentes étapes de purification de la protéine de fusion recombinante GST-VHH-EGFP et GST-VHH-mCherry sont présentées à la figure 3.6. Une coloration au bleu de Coomassie a été effectuée afin de permettre une meilleure visualisation des protéines. Dans les deux cas, une quantité importante de protéines a été retrouvée sur la résine après les étapes de purification. Cependant, un nombre plus élevé de lavages de la résine pourrait être effectué afin d'éliminer les bandes protéiques non spécifiques retrouvées.

Afin de retirer l'étiquette d'affinité GST, un essai de clivage sur résine a été effectué à l'aide de thrombine humaine. Les conditions de clivage ont été effectuées dans le tampon de lavage GST en ajoutant 5 unités enzymatiques (U) de thrombine protéase à 50 μ L de résine, ce qui correspondait à environ 200 μ g de protéine. Différentes températures et temps d'incubation ont été testés. Les résultats de clivage sont présentés à la figure 3.7 pour GST-VHH-EGFP et GST-VHH-mCherry. La protéine GST-VHH-EGFP a un poids moléculaire calculé de 67,0 kDa. Cependant, la bande principale observée sur le gel présente un poids apparent d'environ 57 kDa après capture par affinité. La protéine VHH-EGFP a un poids moléculaire attendu de 41,5 kDa. La bande la plus intense, après clivage pour une période de 1 heure, montre une masse apparente de ~34 kDa et est également visible par fluorescence (figure 3.7A), ce qui suggère qu'il s'agit du VHH-EGFP. Pour la réaction de clivage après une incubation pendant la nuit à 4 °C, aucune

fluorescence n'a été observée suivant la réaction et la protéine GST-VHH-EGFP n'est plus visible sur la résine (panneau du haut). Cela suggère que la réaction de clivage a été efficace, mais l'absence de protéine fluorescente au poids moléculaire attendu indique probablement une dégradation des protéines clivées, incluant la protéine fluorescente EGFP (figure 3.7A). Pour cette protéine, la réaction de clivage la

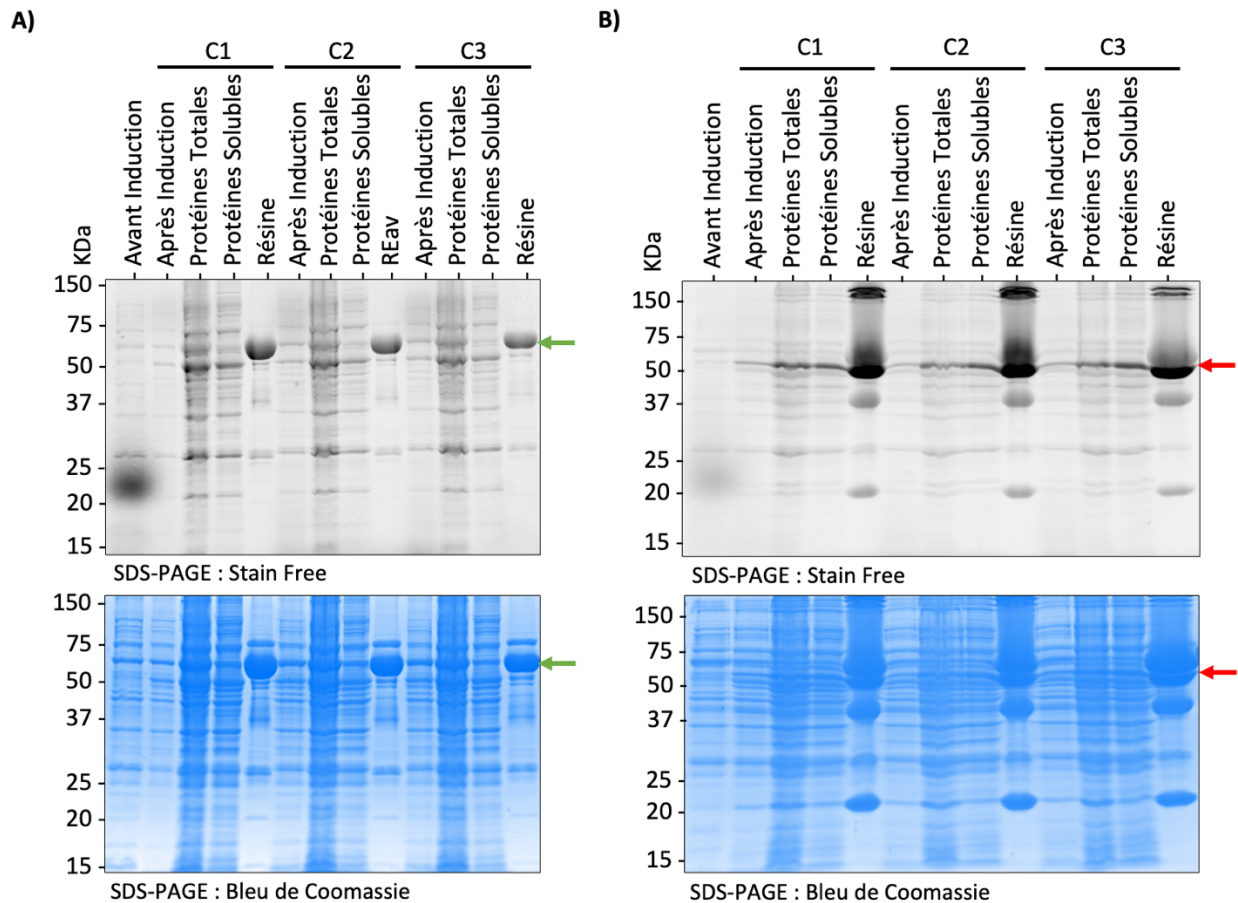


Figure 3.6 Analyse de la purification des protéines de fusion GST-VHH-EGFP et GST-VHH-mCherry. Gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12 %, révélé par *Stain-Free* et coloré au bleu de Coomassie, représentant les étapes successives d'extraction et de purification par lots de la protéine GST-VHH-EGFP (flèche verte) (A) et GST-VHH-mCherry (flèche rouge) (B) exprimée dans *E. coli* de type BL21. Trois colonies distinctes ont été sélectionnées et analysées indépendamment. La purification a été réalisée par chromatographie d'affinité sur résine de glutathione (GSH). Pour chaque colonie, les échantillons correspondent respectivement à : Échantillon bactérien après induction, protéines totales après lyse bactérienne par sonication, fraction soluble après centrifugation et résine après purification par capture d'affinité. L'échantillon bactérien « avant induction » a été chargé uniquement pour la colonie 1 à titre de référence. Les différentes conditions expérimentales sont clairement indiquées sur le gel. C1, C2 et C3 correspondent respectivement aux colonies 1, 2 et 3.

plus efficace, à la concentration testée, semble être pendant 3 heures à 30 °C. Dans un second temps, lors de la réaction de clivage de la protéine GST-VHH-mCherry effectuée selon la même méthode, aucune perte de fluorescence n'a été observée (figure 3.7B). Dans ce cas, la réaction de clivage la plus efficace, à la concentration testée, semble être pendant la nuit (ON) à 4 °C. La protéine GST-VHH-mCherry a un poids

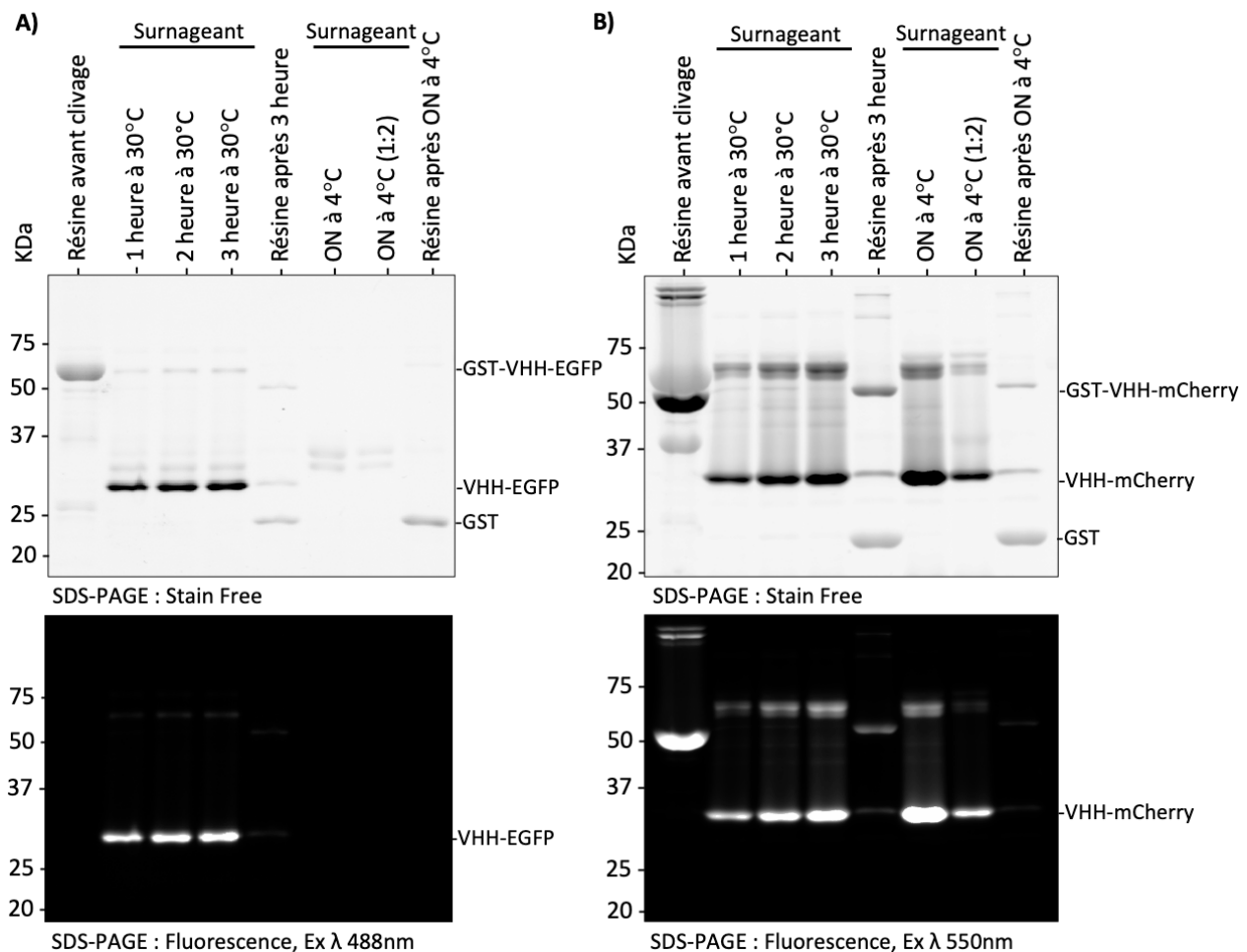


Figure 3.7 Optimisation de la réaction de clivage enzymatique par thrombine protéase humaine de l'étiquette GST des protéines recombinantes GST-VHH-EGFP et GST-VHH-mCherry. Gel d'électrophorèse SDS-PAGE (12 %) révélé par *Stain-Free* et par fluorescence illustrant l'optimisation du clivage de l'étiquette d'affinité GST sur résine Glutathione Sepharose 4B par la protéase humaine, afin de déterminer les conditions optimales. Les échantillons ont été incubés à différentes températures et durées pour évaluer qualitativement l'efficacité du clivage et la libération du fragment VHH-EGFP (A) ou le fragment VHH-mCherry (B). Le clivage a été effectué en ajoutant 5U de thrombine protéase (Sigma-Aldrich, Cat#SAE0147) à 50 μ L de résine. ON (*Overnight*), clivage pendant la nuit ; Ex λ (lambda), longueur d'onde d'excitation.

moléculaire calculé de 66,8 kDa et de 40,5 kDa pour VHH-mCherry. Toutefois, la bande principale observée sur le gel après capture par affinités présente un poids moléculaire apparent de ~ 49 kDa et la bande la plus intense après clivage montre une masse apparente de ~ 32 kDa (figure 3.7B). Ces bandes visibles par *Stain-Free* et par fluorescence ont été identifiées comme étant respectivement GST-VHH-mCherry et VHH-mCherry. Les bandes de poids moléculaire plus élevé visible par fluorescence suggèrent une dimérisation de la protéine recombinante sans toutefois avoir causé une perte de fluorescence. Bien que mCherry ait été développé pour être une protéine uniquement monomérique, certains travaux ont rapporté qu'elle peut présenter une tendance à former des dimères ou des agrégats (Costantini *et al.*, 2015; Landgraf *et al.*, 2012; Shu *et al.*, 2006). Le volume de dépôt des surnageants correspond à un volume de 5 µL et la quantité de protéines semble très élevée sur le gel, ce qui pourrait être la cause de l'agrégation. Les surnageants obtenus ont été dialysés dans le PBS puis conservés à -80 °C.

Une nouvelle production de la protéine GST-VHH-EGFP a été réalisée afin d'obtenir la protéine GST-VHH-EGFP avec fluorescence intacte. La résine Glutathione de GenScript a été utilisée pour cette production. Les conditions d'expression sont demeurées inchangées. Cette expérience a été réalisée avec un protocole modifié, incluant un lavage préalable de la résine avec le tampon de lyse GST, suivi de cinq lavages avec le tampon de lavage GST. La figure 3.8 présente les résultats de la seconde purification de GST-VHH-EGFP, où des ajustements au protocole à petite échelle ont permis d'augmenter la pureté de l'échantillon sur résine, réduisant ainsi la présence de protéines de poids moléculaire variées dans la piste contenant la résine après lavage. La protéine obtenue lors de l'élution 1 a été utilisée pour effectuer des essais de liaison par GST Pull-Down. De plus, le fluorophore semble intact, comme en témoigne la présence de signaux de fluorescence visibles en gel après excitation à 488 nm. Par conséquent, l'échantillon a été dosé, puis utilisé pour les tests de liaison.

Afin de vérifier si la spécificité du VHH fonctionnalisé est conservée après les modifications apportées par l'ajout d'une composante fluorescente, des essais de liaison *in vitro* ont été réalisés avec les protéines GST, GST-VHH, GST-VHH-FITC et GST-VHH-EGFP. Pour atteindre cet objectif, 20 µL de résine, pour chaque condition, ont été incubés en conditions saturantes de protéine, puis lavés. Les protéines immobilisées sur résine, incluant une condition témoin sans protéine (résine seule), ont été incubées avec un lysat de cellules HEK293T préalablement transfectées avec le plasmide codant pour la protéine RNF167-V5-His pendant 24 heures, puis lavées afin d'éliminer les liaisons non spécifiques. La protéine GST-VHH-mCherry n'a pas été incluse lors de ces essais. L'analyse des résultats du test de GST *pull-down* a révélé

qu'uniquement la GST-VHH et sa variante fluorescente obtenue par conjugaison chimique, la GST-VHH-FITC, ont démontré une spécificité pour la protéine RNF167 (figure 3.9). La protéine RNF167 n'a pas été détectée par immunobuvardage, à l'aide de l'anti-V5, en présence de la protéine de fusion GST-VHH-EGFP. Aucune interaction n'a été observée dans cette condition.

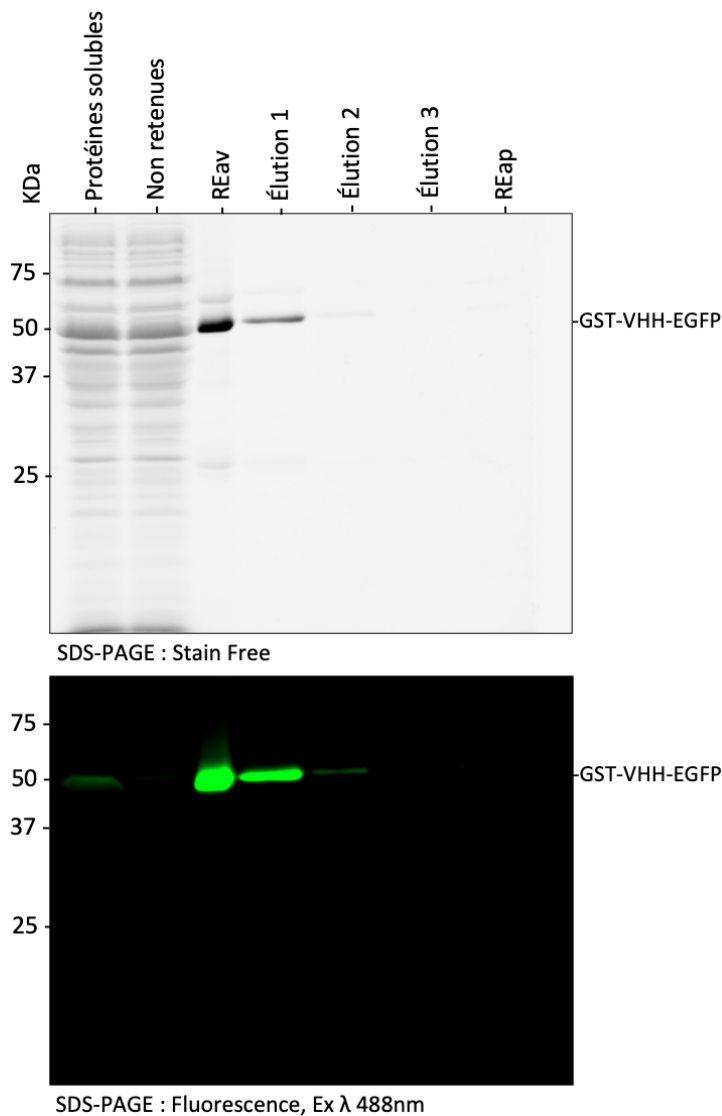


Figure 3.8 Analyse de la seconde purification de la protéine de fusion GST-VHH-EGFP. Gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12 % révélé par *Stain-Free* et par fluorescence représentant les étapes successives d'extraction et de purification de la protéine de fusion GST-VHH-EGFP exprimée dans *E. coli* BL21. La purification par lot a été réalisée par chromatographie d'affinité sur résine de glutathione de GenScript. REav, Résine avant élution ; Reap, Résine après élution ; Ex λ (lambda), longueur d'onde d'excitation.

3.3 Analyse non concluante de l'endocytose des nanocorps RNF167-A5 en microscopie d'immunofluorescence.

Afin d'évaluer la reconnaissance de la protéine cible dans un contexte cellulaire, des expériences de microscopie d'immunofluorescence ont été réalisées. Comme mentionné à l'introduction, le nanocorps RNF167-A5 a spécialement été développé pour cibler le domaine extracellulaire de la E3 ligase RNF167. Cependant, son efficacité en contexte cellulaire n'a pas été évaluée sous sa forme monomérique. Les nanocorps peuvent être utilisés comme outils puissants pour l'étude du transport endocytaire et du routage intracellulaire (Buser *et al.*, 2018). Conséquemment, afin d'évaluer la possibilité de documenter

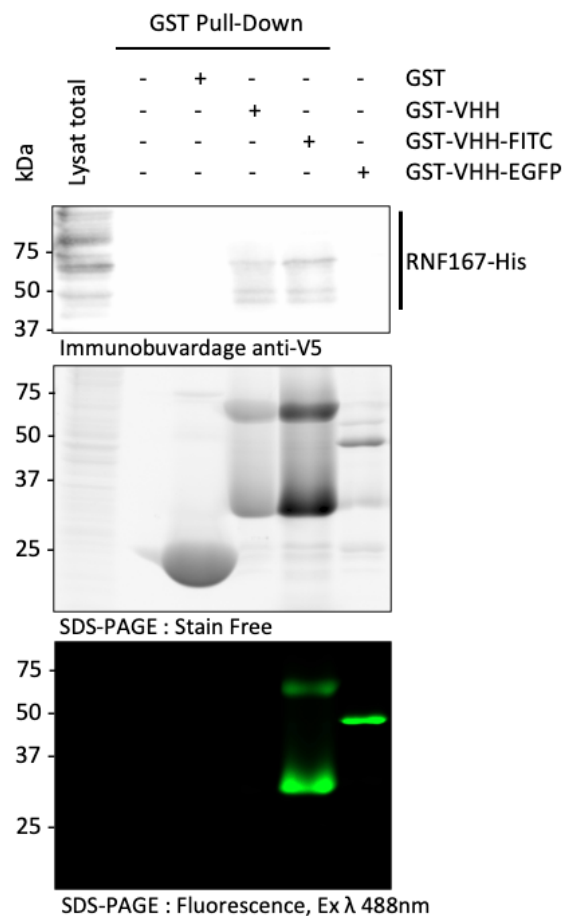


Figure 3.9 Essai d'interaction *in vitro* par GST pull-down entre les VHH (RNF167-A5) produits et RNF167. Les protéines appât sont GST-VHH, GST-VHH-FITC et GST-VHH-EGFP, tandis que GST sert de protéine témoin. Après incubation du lysat cellulaire HEK293T, exprimant la protéine recombinante RNF167-V5-His, avec les protéines immobilisées sur résine, ou avec la résine seule, les échantillons ont été élués puis séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 12%. Le gel a été visualisé par *Stain-Free* (panneau du milieu) et par fluorescence (panneau du bas). Un transfert sur membrane a été réalisé, suivi d'une détection par

immunobuvardage avec un anticorps anti-His (panneau du haut). Résultats représentatifs de deux répétitions biologiques indépendantes. Ex λ (lambda), longueur d'onde d'excitation.

le routage intracellulaire de la protéine RNF167, des essais d'internalisation ont d'abord été effectués avec les VHH monomériques conjugués à des fluorophores. Ainsi, des cellules HEK293T vivantes ont été mises en présence de nanocorps fluorescents selon différentes conditions. Parallèlement, les cellules ont été exposées à de la GST purifiée en tant que contrôle négatif, afin de distinguer les effets non spécifiques susceptibles d'être induits par celle-ci (donnée non présentée). Les glutathion S-transférases (GST) sont des enzymes connues pour leur rôle dans la détoxification cellulaire, mais elles peuvent également moduler des voies de signalisation impliquées dans la prolifération et l'apoptose (Townsend *et al.*, 2009). Plusieurs paramètres expérimentaux ont été testés (concentration en VHH, temps et température d'incubation ainsi que différentes méthodes de fixation) en condition cellulaire native, mais aussi en condition de surexpression de RNF167 afin d'augmenter sa présence au niveau cellulaire. Cependant, ces essais d'optimisation n'ont pas permis d'obtenir un signal détectable en microscopie (données non présentées). En conditions de surexpression, les cellules HEK293T ont été transfectées transitoirement avec un plasmide permettant l'expression de RNF167 recombinante conjuguée à l'EGFP, rendant ainsi la protéine visible en microscopie de fluorescence. En présence de la protéine recombinante RNF167-EGFP exprimée, seul le nanocorps fluorescent, VHH-mCherry, a été testé. En effet, le VHH-EGFP et le GST-VHH-FITC ne sont pas compatibles avec cette expérience, car leur fluorophore émet dans la même plage de longueur d'onde que RNF167-EGFP. Les résultats obtenus démontrent la présence significative de RNF167-EGFP sur certaines cellules, observable par la fluorescence verte émise, tandis qu'aucun signal de fluorescence n'a pu être observé en microscopie pour confirmer la présence du nanocorps fluorescent VHH-mCherry, dans les conditions testées (figure 3.10). Afin d'éliminer l'hypothèse selon laquelle l'absence de fluorescence détectée pour les nanocorps fluorescents utilisés serait liée à l'intégrité des fluorophores, des tentatives d'optimisation ont été effectuées avec le GST-VHH non fluorescent sur cellules vivantes, suivies d'une immunodétection indirecte du VHH après fixation. Aucune amélioration n'a été constatée et les résultats obtenus en microscopie ont révélé l'absence de fluorescence détectée pour le GST-VHH en condition native (données non présentées), mais aussi en condition de surexpression (figure 3.10).

Face à l'absence de signal de fluorescence obtenu, une nouvelle purification du nanocorps RNF167-A5 a été envisagée afin de produire le monomère VHH sans étiquette d'affinité ni autre impureté. Cela avait

notamment pour but d'évaluer toutes les possibilités, y compris les interférences potentielles, telles que l'encombrement stérique causé par la protéine de fusion, l'étiquette d'affinité, ou même la conjugaison à FITC. L'étiquette GST a d'abord été clivée sur résine, puis le surnageant a été purifié par chromatographie d'exclusion de taille (SEC) afin de séparer le VHH clivé des autres impuretés ou des agrégats potentiels. La chromatographie SEC permet une séparation basée sur la taille moléculaire, plus précisément le rayon hydrodynamique des molécules, et non sur leurs propriétés chimiques (Fekete *et al.*, 2014), ce qui peut permettre d'obtenir une solution protéique homogène. La fraction F13, présente une bande intense correspondant au poids moléculaire attendu pour le monomère RNF167 A5 et est dépourvue de bandes supplémentaires détectables, a été retenue et utilisée pour les expériences ultérieures de microscopie sur cellules non fixées (figure 3.11). Ainsi, la purification par SEC a permis d'obtenir le nanocorps RNF167-A5 sous forme monomérique avec un grand niveau de pureté (>95 % visible sur gel). Une fois le monomère obtenu, des essais de liaison et d'internalisation ont été effectués de nouveau. L'efficacité de liaison du

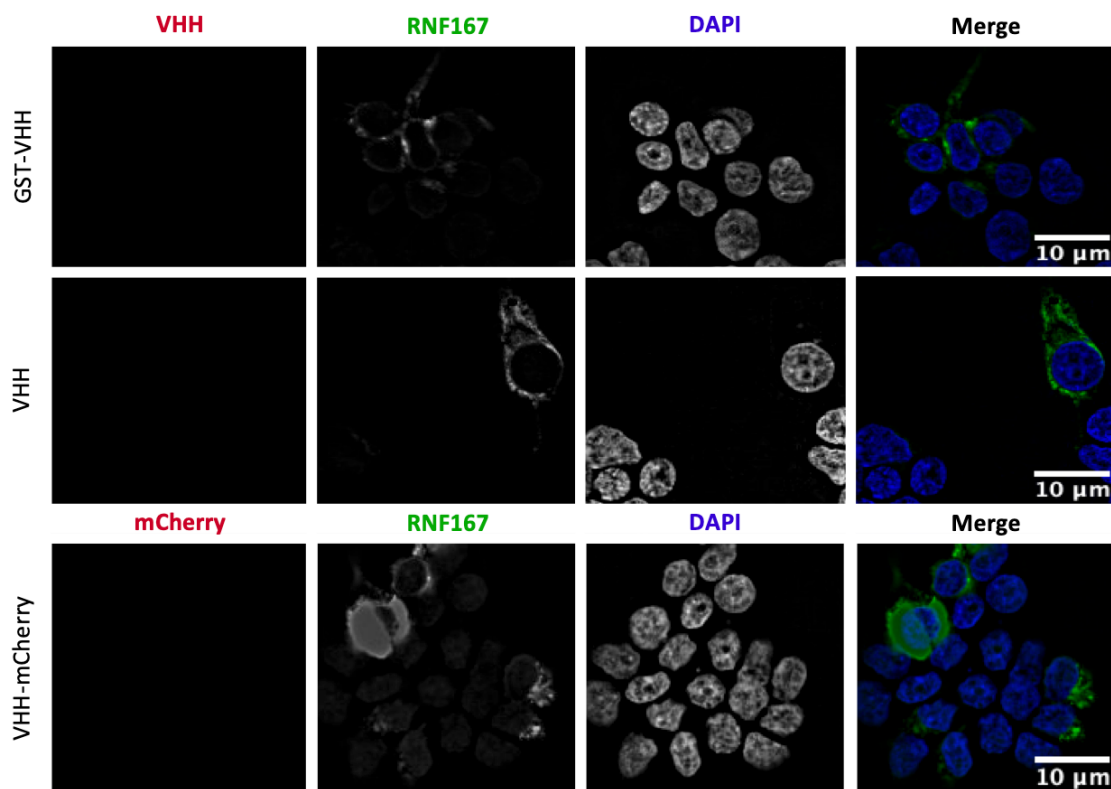


Figure 3.10 Analyse par microscopie à fluorescence de l'efficacité de liaison des différents variants de VHH pour RNF167 sur cellules vivantes.

Images de microscopie représentatives de l'immunodétection et de la fluorescence intrinsèque de la ligase RNF167-EGFP dans la lignée cellulaire HEK293T. Les cellules ont été transfectées pour exprimer la protéine recombinante RNF167 fusionnée avec l'EGFP (vert) et ont été incubées pendant 1 h à

température pièce avec 0,9 μ M GST-VHH, VHH ou VHH-mCherry (rouge). L'immunodétection de GST-VHH et VHH est effectuée avec un anticorps spécifique au VHH, suivi d'une incubation avec un anticorps secondaire conjugué au fluorophore Alexafluor 568 (rouge). Les noyaux cellulaires ont été colorés avec du DAPI (bleu). Les images ont été prises avec un microscope à épifluorescence inversé Olympus IX83 avec un objectif à immersion d'huile 60x. Barre d'échelle, 10 μ m.

VHH pour RNF167 sur cellules vivante a été testée. Après fixation, le monomère de VHH est immunodéecté avec un anticorps spécifique, selon la méthode d'immunomarquage décrite précédemment. Malgré les optimisations tentées, aucun signal de fluorescence n'a pu être obtenu avec l'utilisation du monomère de VHH en microscopie en conditions natives (données non présentées), mais aussi en conditions de surexpression de RNF167 (figure 3.10). En somme, l'immunodétection de la ligase RNF167 dans des cellules vivantes non fixées n'a pas permis de générer un signal de fluorescence détectable, que ce soit à la surface cellulaire ou à l'intérieur des cellules après internalisation, et ce pour chacune des conditions expérimentales de microscopie appliquées.

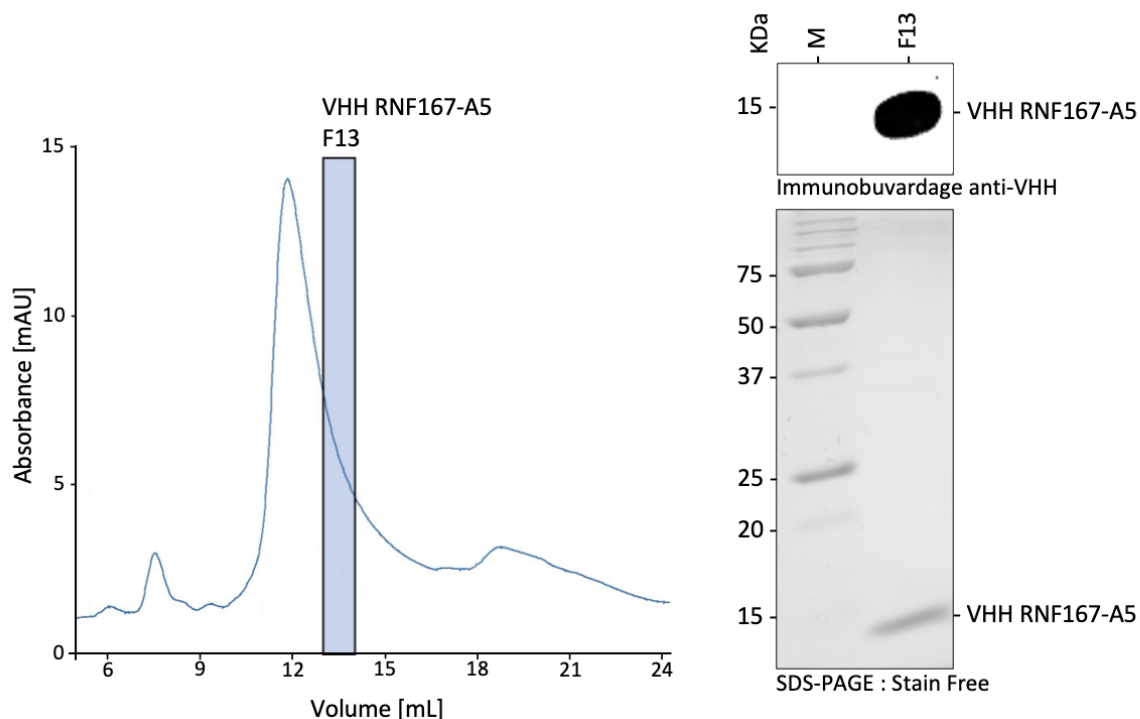


Figure 3.11 Isolation du monomère de VHH RNF167-A5 par SEC.

Chromatogramme d'exclusion stérique du nanocorps RNF167-A5 et analyse par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 15% suivie d'un immunobuvardage spécifique. M, échelle de poids moléculaire ; Anti-VHH, Anti-Camélidé.

3.4 Immunomarquage de la ligase RNF167 à l'aide de nanocorps sur cellules fixées et perméabilisées.

Les premiers essais de microscopie n'ont pas permis de démontrer la possibilité d'utiliser le nanocorps pour étudier l'endocytose de RNF167. Face à cette limitation, une autre approche a été envisagée afin de déterminer si les différentes versions produites du VHH spécifique à RNF167 pouvaient permettre la détection de cette ligase en condition native, sur des échantillons fixés et perméabilisés.

Dans un premier temps, l'optimisation de la concentration à utiliser a été effectuée avec le nanocorps GST-VHH. Ce choix s'explique par sa grande pureté et par sa taille, plus représentative de celle des conjugués finaux, tels que GST-VHH-FITC, VHH-EGFP et VHH-mCherry. Différentes concentrations ont été utilisées pour la détection de la protéine RNF167 endogène dans la lignée cellulaire HEK293T. L'analyse des images obtenues a permis d'établir que la concentration à 0,9 μ M offrait un excellent rapport signal/bruit dans les conditions testées (figure 3.12). Cette concentration optimale a ensuite été appliquée pour les autres variants incluant ceux portant des étiquettes fluorescentes afin d'évaluer qualitativement leur efficacité à permettre la détection de la protéine RNF167 endogène (figure 3.13). Les résultats démontrent que la majorité des variantes du VHH ont permis une certaine détection de la cible, bien que des différences qualitatives aient été observées. Le VHH fusionné à mCherry a démontré un marquage peu concluant, notamment en raison de la fluorescence non spécifique détectée principalement au niveau nucléaire. En revanche, les versions non fluorescentes, GST-VHH et VHH, révélées par immunodétection indirecte, ont donné les meilleurs signaux de fluorescence avec un faible bruit de fond. Le VHH fusionné à l'EGFP présente un marquage cytoplasmique de moindre intensité et plus diffus comparativement aux variants précédents, et similaire à celui obtenu avec le variant fluorescent, GST-VHH-FITC, qui a donné des résultats lui aussi peu convaincants. En effet, bien que les résultats démontrent une fluorescence au niveau du cytoplasme cellulaire compatible avec la localisation rapportée pour RNF167 (Nair *et al.*, 2020), le signal observé reste diffus et d'une intensité comparable à celui détecté au niveau nucléaire, ce qui suggère une efficacité limitée et non-spécifique.

Suite aux résultats obtenus en conditions endogènes après fixation et perméabilisation des cellules, un test complémentaire a été réalisé dans les mêmes conditions, mais cette fois dans un contexte de surexpression de RNF167. Cette expérience visait à évaluer qualitativement si une augmentation du niveau de la ligase RNF167 était corrélée à une hausse du signal détecté par le nanocorps RNF167-A5. Pour ce faire, des cellules HEK293T ont été transfectées, comme précédemment, avec un plasmide codant pour RNF167 fusionné à EGFP. Le variant GST-VHH, plus proche des conjugués finaux, et VHH-mCherry ont été

utilisés en raison de leur compatibilité avec ce test. Les résultats de microscopie à fluorescence ont montré une augmentation considérable de la présence de GST-VHH, visible par la fluorescence rouge émise, dans les cellules exprimant à haut niveau RNF167-EGFP, identifiable par les signaux de fluorescence verte (figure 3.14). Cette observation est compatible avec l'hypothèse suggérant une spécificité du signal observé pour la liaison entre GST-VHH et RNF167. En revanche, l'augmentation de RNF167 au niveau cellulaire ne semble pas avoir été corrélée à une augmentation du signal du VHH-mCherry, ce qui suggère

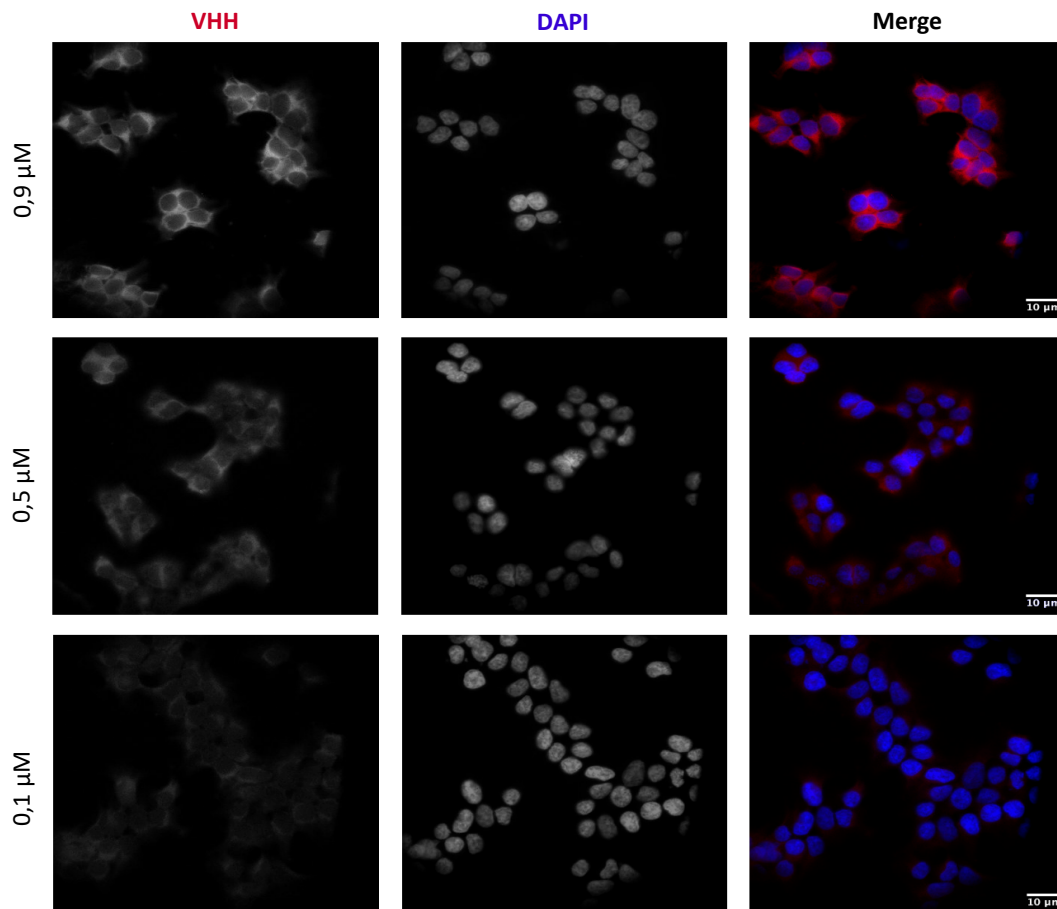


Figure 3.12 Évaluation de la concentration en VHH pour la détection de RNF167 par immunofluorescence qualitative.

Images de microscopie représentatives de l'immuno-détection de GST-VHH ciblant la E3 ligase RNF167 dans la lignée cellulaire HEK293T exprimant nativement la protéine d'intérêt. Les cellules ont été incubées pendant 1 h à température pièce avec des concentrations variables de GST-VHH. L'immuno-détection de GST-VHH est effectuée avec un anticorps spécifique au VHH, suivi d'une incubation avec un anticorps secondaire conjugué au fluorophore Alexafluor 568 (rouge). Les noyaux cellulaires ont été colorés avec du DAPI (bleu). Les images ont été prises avec un microscope à épifluorescence inversé Olympus IX83, doté d'un objectif à immersion d'huile 60x. Barre d'échelle, 10 μ m.

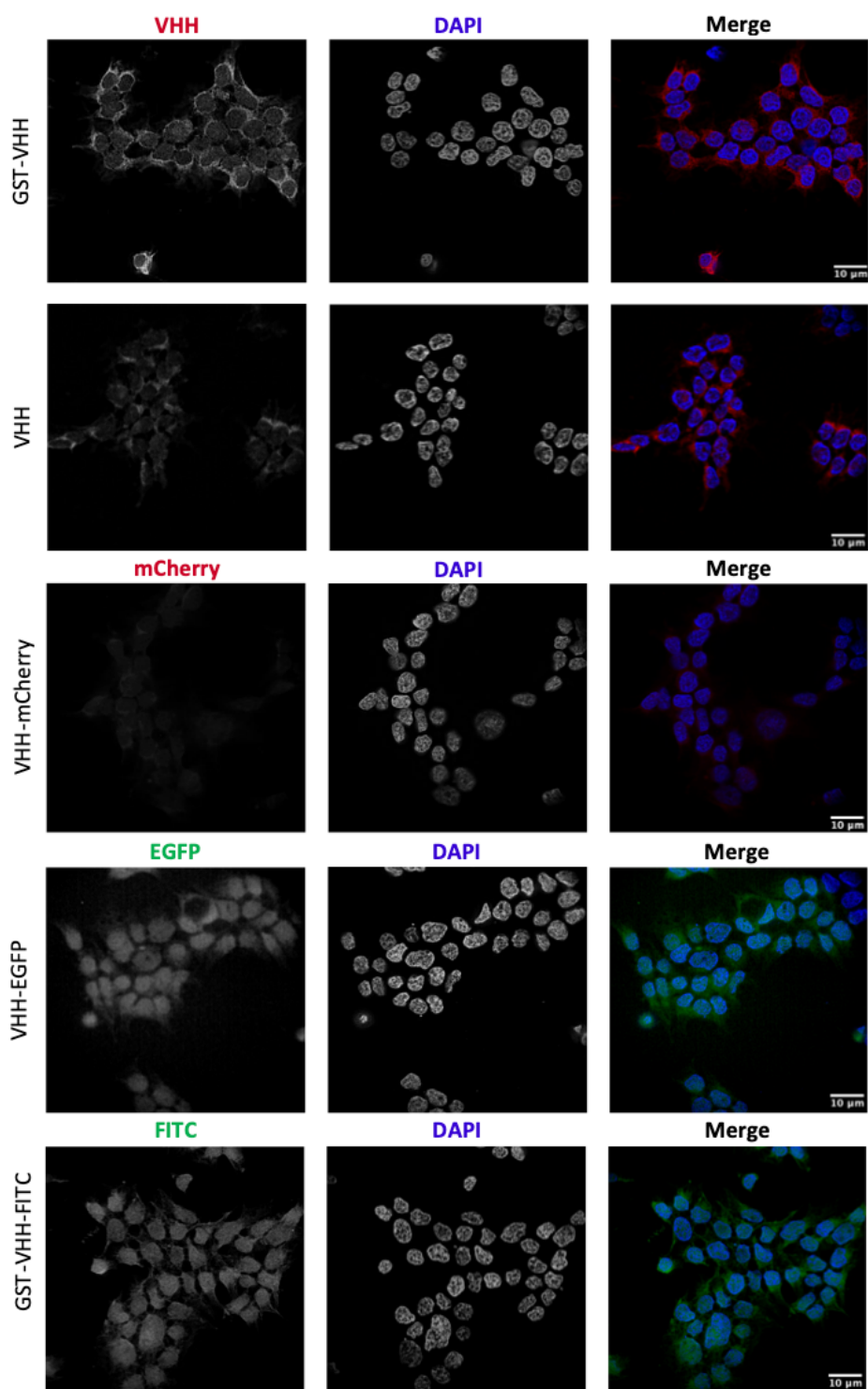


Figure 3.13 Analyse qualitative par microscopie à fluorescence de l'efficacité des différents variants de VHH à détecter RNF167 endogène.

Les cellules exprimant naturellement la E3 ligase RNF167 ont été incubées pendant 1 h à température pièce avec 0,9 μ M de VHH pour chaque condition. L'immunodétection de GST-VHH et VHH a été effectuée avec un anticorps spécifique au VHH, suivi d'une incubation avec un anticorps secondaire conjugué au fluorophore Alexafluor 568 (rouge). Les noyaux cellulaires ont été colorés avec du DAPI. Les images ont été prises avec un microscope à épifluorescence inversé Olympus IX83 avec un objectif à immersion d'huile 60x. Images représentatives du signal immunodétekté à l'aide des différents VHH. 3 expérience indépendante. Barre d'échelle, 10 μ m.

que le signal observé est non spécifique. Les résultats constituent une validation indirecte de la spécificité du nanocorps GST-VHH pour RNF167. Des expériences complémentaires plus rigoureuses sont nécessaires afin de confirmer la spécificité de la liaison de GST-VHH pour la ligase RNF167. Pour ce faire, des essais de répression génique de RNF167 ont ensuite été effectués. Le variant le plus performant, GST-VHH, a été utilisé pour les expériences de microscopie subséquentes.

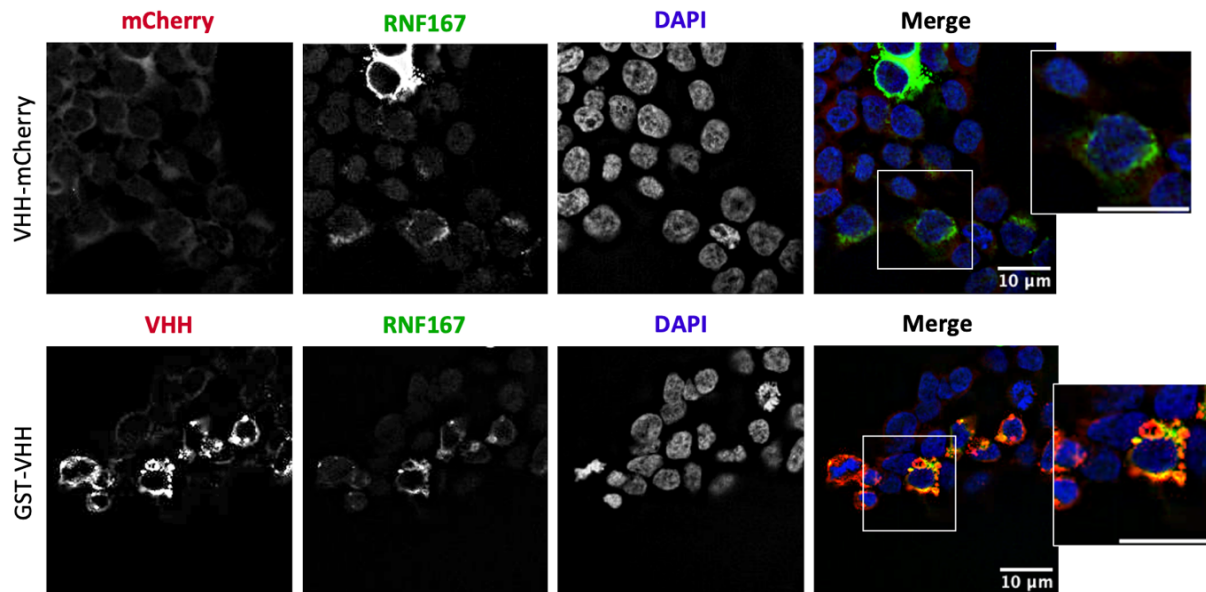


Figure 3.14 Validation indirecte par microscopie après fixation et perméabilisation en condition de surexpression.

Les cellules, exprimant la protéine recombinante RNF167 marquée avec l'EGFP (vert), ont incubé pendant 1 h à température pièce avec 0,9 μ M GST-VHH, VHH ou VHH-mCherry (rouge). L'immunodétection de GST-VHH est effectuée avec un anticorps spécifique au VHH, suivi d'une incubation avec un anticorps secondaire conjugué au fluorophore Alexafluor 568 (rouge). Les noyaux cellulaires ont été colorés avec du

DAPI (bleu). Les images ont été prises avec un microscope à épifluorescence inversé Olympus IX83 avec un objectif à immersion d'huile 60x. Barre d'échelle, 10 μ m.

3.5 Validation des résultats d'immunofluorescence par répression génique

Afin de confirmer que les signaux de fluorescence observés en microscopie reflètent bien une reconnaissance spécifique de la ligase RNF167, une répression génique (knock-down) a été réalisée dans des cellules HEK293T en utilisant la technologie de l'ARN interférant (siRNA). Cette approche visait à réduire au maximum l'expression de RNF167, en dégradant son ARN messager, avant de répéter les essais d'immunofluorescence. L'objectif de cette démarche vise à évaluer si le signal immunodéecté par microscopie est également réduit, ce qui confirmerait indirectement la spécificité du signal observé.

Tout d'abord, la cinétique du knock-down a été évaluée par l'immunobuvardage des lysats cellulaires à différents jours post-transfection, afin de déterminer les conditions optimales pour la répression génique de RNF167. Les résultats ont montré qu'une réduction maximale de l'abondance protéique de la RNF167 était observée 48 h suivant la transfection (figure 3.15), donc ce temps a été retenu pour les prochaines étapes en microscopie.

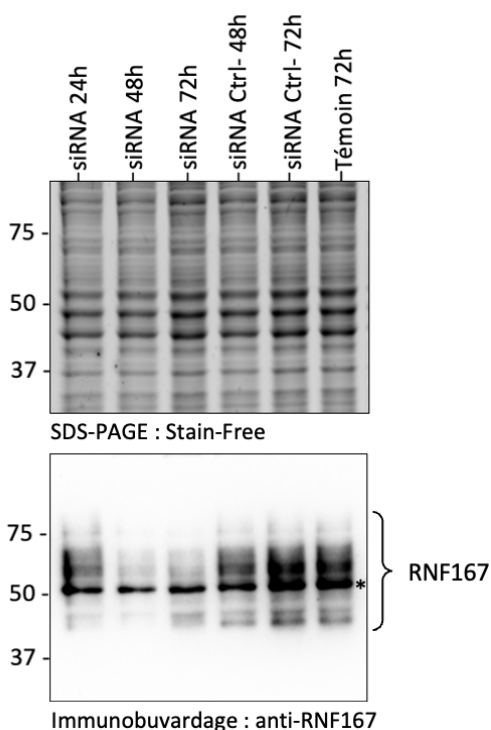


Figure 3.15 Analyse du niveau d'expression de RNF167 dans les cellules HEK293T à différents temps post-transfection avec siRNA.

Pour chaque condition, 15 µg de lysat total ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE, suivis d'un immunobuvardage à l'aide des anticorps indiqués. L'astérisque (*) représente une bande non spécifique vers ~50 kDa. n=2. siRNA, siRNF167 ; siRNA Ctrl-, siRNA de contrôle négatif ; Témoin, cellules sans aucun traitement.

Afin d'évaluer la spécificité des signaux de fluorescence observés, les essais d'immunofluorescence ont été réalisés sur les cellules HEK293T suivant la répression génique de RNF167 par l'utilisation des siRNAs (figure 3.16A). Afin de comparer les valeurs moyennes d'intensité de fluorescences observée pour le marquage en cellule avec GST-VHH, un test t de Welch été effectué pour comparer les moyennes des deux conditions. Les graphiques en boîte à moustache présentent la distribution des valeurs obtenues (figure 3.16B). Chaque point correspond à l'intensité moyenne de fluorescence par cellule entière sélectionnée. Les moyennes par groupe sont respectivement 25,6 pour siRNF167 et 26,4 pour la condition contrôle, siControl. Une diminution de la fluorescence est observée dans la condition siRNF167. Par contre, le résultat du test t a révélé que la différence entre les deux conditions n'est pas statistiquement significative ($t=1.0903$, $df=205.1$, $p\text{-value}=0.28$). Aussi, une plus grande dispersion des valeurs est observable dans le groupe siRNF167. Afin de vérifier la reproductibilité des résultats, une ANOVA à deux facteurs a été effectuée (figure 3.16C).

L'analyse des résultats a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les conditions ($p=0.279$), ni entre les réplicats ($p=0.941$), ce qui témoigne d'une bonne reproductibilité du test. De plus, l'effet d'interaction est non significatif ($p=0.832$), ce qui signifie que l'effet de la condition est stable et ne dépend pas du réplicat. En somme, les résultats suggèrent que le traitement par siRNA ciblant RNF167 n'a pas entraîné de modification significative de la mesure de la fluorescence observée avec GST-VHH dans les conditions testées.

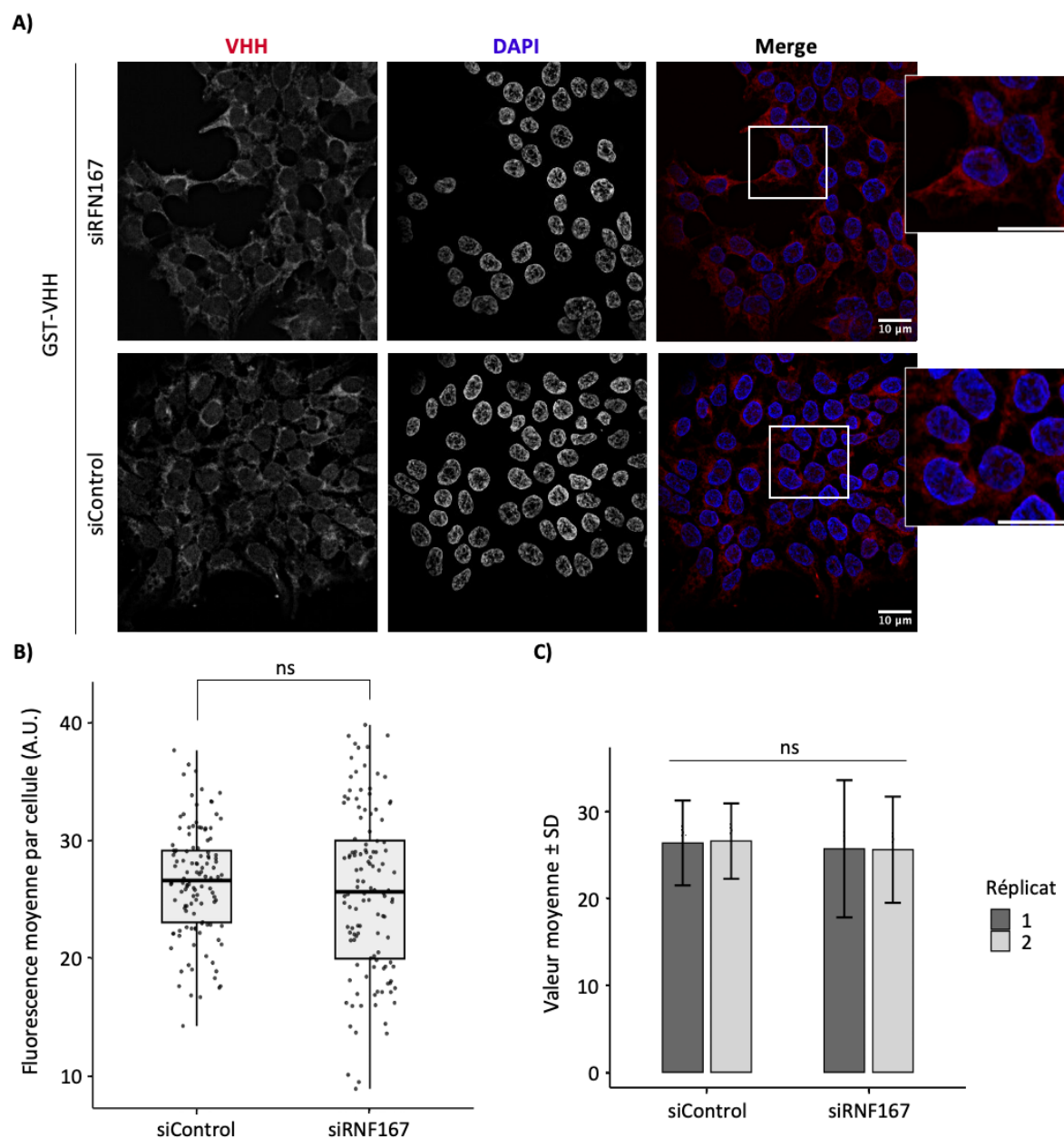


Figure 3.16 Validation de la spécificité du marquage par immunofluorescence après traitement par siRNA. A) Image représentative de l'immunodétection de GST-VHH ciblant RNF167 dans les cellules HEK293T traitées avec siRNA. Incubation 1h à température pièce avec 0,9 μ M de GST-VHH. Détection avec un anticorps anti-VHH suivi d'un anticorps secondaire Alexafluor 568 (rouge). Noyaux colorés avec du DAPI (bleu). Microscope à épifluorescence inversé Olympus IX83, objectif 60x. Barre d'échelle, 10 μ m. B) Quantification des intensités moyennes par cellule selon les conditions. Aucun effet significatif n'a été observé entre les deux groupes ($n=2$, 240 cellules), $p>0,05$. C) La signification statistique a été évaluée à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs. L'analyse n'a montré aucun effet significatif du traitement (siRNF167 vs siControl) ($p=0.279$), du réplicat ($p=0.941$) ou d'interaction (condition vs réplicat) ($p=0.832$). A.U., unité arbitraire ; SD (standard deviation), écart-type ; ns, non significatives.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 Première stratégie de production du nanocorps RNF167-A5

La première stratégie de production du nanocorps visait à le produire sous forme de protéine recombinante 6xHis-Trx-VHH, conjuguée à une étiquette d'affinité composée de six résidus d'histidine (6xHis-tag), en système bactérien. Cette approche a été privilégiée afin de faciliter sa purification par chromatographie d'affinité aux ions métalliques immobilisés (IMAC). Comme évoqué précédemment, cette stratégie est fréquemment employée pour la production de protéines en système procaryote. De plus, le plasmide utilisé est adapté, voire préférable, pour l'expression de protéines contenant des ponts disulfures, telles que les nanocorps, grâce à la thioredoxine comme partenaire de fusion (Francis et Page, 2010). Toutefois, bien qu'une protéine ait été détectée après induction par IPTG et purification sur résine NI-NTA, celle-ci ne correspondait pas au poids moléculaire attendu de 27,7 kDa pour le 6xHis-Trx-VHH. Les résultats ont montré la présence d'une bande dominante à environ 17 kDa et ça de façon reproductible sur plusieurs clones testés. Ces observations conduisent à dire qu'un problème compromettant l'expression ou la purification de la protéine est survenu. Cette observation n'est valable que pour la protéine recombinante 6xHis-Trx-VHH.

4.1.1 Hypothèses sur l'échec de la purification de 6xHis-Trx-VHH

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'absence de la protéine recombinante attendue, 6xHis-Trx-VHH, dans les échantillons purifiés. D'abord, l'hypothèse qu'une erreur serait survenue lors de l'élaboration plasmique est à exclure, car tous les clones ont été vérifiés par digestion diagnostique, ainsi que par un séquençage qui a permis de confirmer l'intégrité des constructions plasmiques. Cependant, il peut être envisageable que la protéine recombinante ait été dégradée lors des étapes successives de purification ou même possiblement durant son expression.

Avant de poursuivre notre analyse, il convient de s'interroger sur le choix du plasmide et de la souche bactérienne utilisés pour l'expression du VHH recombinant. Or, la souche bactérienne utilisée est de type *E. coli* (BL21). Cette souche est l'un des organismes de choix pour la production de protéines recombinantes et son utilisation est bien établie. La souche BL21 présente un intérêt particulier en raison de l'absence de certaines protéases, notamment en protéase de Lon (cytoplasme) et en protéase d'OmpT

(membrane externe), habituellement présentes en grande quantité dans la souche *E. coli* (Biolabs, 2016). Cette caractéristique est intéressante, car l'inactivation de la protéase Lon, par exemple, prévient la dégradation intracellulaire des protéines exogènes, y compris celles mal repliées dans le cytoplasme. Par conséquent, il est peu probable que le VHH recombinant ait été dégradé au cours de son expression. Dans le même ordre d'idée, le fait que l'expérimentation ait été réalisée avec un minimum de trois répétitions biologiquement indépendantes, sur des journées distinctes, pour les étapes d'expression et de purification, avec des résultats reproductibles, diminue la probabilité que la dégradation des protéines soit due à une erreur de manipulation isolée.

Concernant la compatibilité du plasmide utilisé avec la souche bactérienne, le plasmide utilisé, pRSF-Trx, est compatible pour une utilisation avec la souche BL21 (DE3), car il possède un promoteur T7 qui est reconnu par l'ARN polymérase T7 exprimée dans cette souche et l'ajout d'IPTG a été utilisé pour l'induction (Biolabs, 2016). L'expression de nanocorps en *E. coli* présente certaines difficultés, notamment à cause de l'environnement réducteur du cytoplasme qui est défavorable à la formation de ponts disulfure (Kong et Guo, 2014). Les nanocorps possèdent au moins un pont disulfure intradomaine entre deux cystéines conservées qui stabilise la structure du domaine variable et est crucial pour leur fonction (Dumoulin *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2000). Le nanocorps RNF167-A5 ne fait pas exception à cette règle et présente un pont disulfure unique entre les cystéines C22 et C95. Le nanocorps RNF167-A5 avait été produit initialement en système d'expression eucaryote à l'aide de cellules EXP1293F qui favorisent naturellement la formation de ponts disulfure et le bon repliement des protéines (Siepe, Picton et Garcia, 2023). En considérant que la formation de liaisons disulfure erronées peut conduire à un repliement inadéquat et à une agrégation des protéines, l'utilisation de la thiorédoxine comme partenaire de fusion a constitué une stratégie adéquate à notre approche pour l'expression en bactérie de RNF167-A5, car elle permet d'augmenter la solubilité des protéines synthétisées et facilite l'expression des protéines présentant des ponts disulfures sans interférer avec leur repliement (Francis et Page, 2010; Lu et Holmgren, 2014). Pour cette raison, notre première stratégie d'expression en système bactérien, *E. coli* BL21, avec l'utilisation pRSF-Trx comme vecteur semblait adaptée. Toutefois, en considérant l'ensemble des résultats de purifications obtenues, il est possible de dire que la présence de thiorédoxine, comme partenaire de fusion, ne semble pas essentielle au bon repliement du nanocorps, car celui-ci s'est bien exprimé dans la deuxième stratégie de production avec uniquement la glutathion S-transférase (GST) comme partenaire de fusion. Notamment parce qu'une grande quantité de VHH a été extraite de la fraction soluble et retrouvée dans les éluions lors de l'analyse de la purification de GST-VHH (figure 3.2). En théorie, la GST

n'est pas reconnue pour favoriser le repliement d'une protéine contenant des ponts disulfures. De plus, des études ont démontré que la GST présente la plus faible capacité d'amélioration de la solubilité, contrairement à la thiorédoxine, qui est particulièrement efficace dans des conditions similaires (Costa *et al.*, 2013; Hammarstrom *et al.*, 2006). Tous ces éléments théoriques permettent d'appuyer fortement l'hypothèse selon laquelle le nanocorps RNF167-A5 est déjà suffisamment soluble et n'a pas besoin de partenaire d'expression pour favoriser son repliement en système bactérien. Il est à noter que le contrôle de purification, réalisé avec le vecteur pRSF-Trx vide, a permis de confirmer que la méthode de purification fonctionne pour la protéine Trx seule, car la protéine majoritairement retrouvée dans les éluions correspond au poids moléculaire attendu (figure 3.1A). Ce résultat suggère que la méthode d'expression et de purification est efficace dans ce cas et que la résine semble fonctionnelle. Il est donc peu probable que le problème rencontré, lors de la purification de 6His-Trx-VHH, provienne d'une déféctuosité technique de la résine utilisée. Ce qui renforce l'hypothèse que l'ajout du VHH dans le plasmide compromet probablement l'expression et/ou la purification. Il est peu probable que la protéine majoritairement retrouvée dans les éluions vers 17 kDa corresponde à notre protéine cible 6xHis-Trx-VHH (figure 3.1B). Cela dit, il est possible que la fusion 6xHis-Trx-VHH soit instable ou mal repliée dans le cytoplasme bactérien. Les protéines mal repliées tendent à s'agréger, ce qui peut conduire à la formation de complexes insolubles ou au masquage de l'étiquette 6xHis, qui se retrouve alors enfoui dans la protéine et empêche ainsi sa purification par affinité (Rosano et Ceccarelli, 2014; Spriestersbach *et al.*, 2015). Cette hypothèse semble la plus probable concernant l'échec de la purification de 6xHis-Trx-VHH. Des analyses subséquentes auraient pu confirmer cette hypothèse, notamment par l'analyse des culots bactériens et par l'utilisation d'anticorps spécifique au VHH, indisponible à ce moment. Cependant, la deuxième stratégie, avec l'utilisation du vecteur d'expression pGex-4T1, effectuée parallèlement s'est révélée particulièrement efficace.

4.2 Deuxième stratégie de production du nanocorps

Contrairement à la stratégie précédente, la construction plasmique intégrant la séquence codant le nanocorps RNF167-A5 dans le vecteur pGEX-4T1 a permis une expression efficace de la protéine recombinante et une capture efficace par la résine (figure 3.2), car la présence d'une bande visible intense, correspondant approximativement au poids moléculaire attendu, est observable sur le gel SDS-PAGE. Une analyse par immunobuvardage de type western aurait constitué un complément d'information pertinent à l'analyse, mais aucun anticorps spécifique n'était disponible à ce moment. Toutefois, les tests de liaison

in vitro par GST *pull-down* avec la protéine purifiée ont permis l'identification et la confirmation indirecte de la présence du VHH.

4.2.1 Optimisation des conditions d'élutions

Malgré une fixation efficace de la protéine GST-VHH lors de la première purification, des problèmes sont survenus lors de son élution. Le premier tampon d'élution (50 mM Tris-HCl, 10 mM glutathion réduit, pH 8,0) s'est avéré inefficace pour l'élution de la protéine d'intérêt GST-VHH (figure 3.2B). En revanche, l'élution de la GST seule s'est révélée efficace avec le premier tampon d'élution mentionné précédemment. Cela a été constaté par la présence de la GST en quantité importante dans l'élution 1, visible sur gel SDS-PAGE (figure 3.2A). L'élaboration du premier tampon d'élution repose sur des recommandations générales bien documentées dans la littérature méthodologique, bien que la composition optimale des tampons de purification dépende en grande partie des caractéristiques des protéines cibles (Harper et Speicher, 2011). Pour améliorer l'élution de la protéine GST-VHH, le tampon d'élution a été optimisé en tenant compte des recommandations de dépannage lors de la purification de protéines étiquetées GST, telles que rapportées dans la littérature scientifique et les guides techniques (GenScript, 2010; Harper et Speicher, 2011; MilliporeSigma). D'abord, l'augmentation du glutathion réduit de 10 mM à 50 mM, comme première tentative d'amélioration de l'élution compétitive, s'est révélée inefficace pour l'élution de GST-VHH. Ce qui a conduit à croire que l'inefficacité du tampon d'élution n'était pas due uniquement à une concentration trop faible de ligand pour la GST. Ensuite, le tampon a été modifié en augmentant légèrement le pH afin de permettre une meilleure récupération des protéines marquées à la GST sans recourir à une concentration très élevée de glutathione, puis l'ajout d'un détergent non ionique a été effectué afin d'accroître la solubilité du GST-VHH, réduire les interactions hydrophobes non spécifiques et minimiser toute agrégation qui pourrait avoir lieu (GenScript, 2010; Harper et Speicher, 2011; Schafer *et al.*, 2015). De plus, une augmentation de la force ionique a été réalisée pour diminuer les interactions électrostatiques et limiter les liaisons non spécifiques et une légère augmentation du pouvoir tampon de la solution par l'augmentation de la concentration en Tris-HCl a été effectué (GenScript, 2010; Harper et Speicher, 2011; Schafer *et al.*, 2015). Chacune de ces modifications a contribué à l'élaboration du tampon d'élution optimal utilisé pour l'élution efficace et une pureté accrue de la protéine GST-VHH présentée à la figure 3.2C. Les effets observés sont cohérents avec plusieurs observations documentées et avec les recommandations méthodologiques fondées sur des principes biochimiques établis (GenScript, 2010; Harper et Speicher, 2011; MilliporeSigma; Schafer *et al.*, 2015).

4.3 Choix du modèle d'expression et validation du nanocorps RNF167-A5

Dans l'article de Siepe et al., il a été démontré par résonance plasmonique de surface (SPR) que le nanocorps RNF167-A5 agit comme un ligand de haute affinité pour le domaine extracellulaire (ECD) de la ligase RNF167 (Siepe, Picton et Garcia, 2023). Contrairement aux auteurs qui ont produit le VHH en cellule de mammifère (Expi293F), le VHH dans ce travail a été produit en système bactérien (*E. coli*). Les cellules EXPI293F, de source humaine, sont une lignée cellulaire en suspension dérivée des cellules HEK293 et optimisées pour l'expression de protéines (Bobrovsky *et al.*, 2024). Elles sont donc aptes à effectuer des modifications post-traductionnelles qui, comme souligné dans l'introduction, peuvent être essentielles à une protéine pour conserver son identité ou sa fonction. De même, elles peuvent permettre une augmentation du rendement en protéines jusqu'à 11 fois supérieure par rapport à d'autres cellules à haute expression dérivées de la lignée cellulaire 293 (Jones, 2021). Ce qui a permis de produire en quantité suffisamment le nanocorps RNF167-A5 pour effectuer plusieurs essais, tels que les essais *in vitro* pour la dégradation de récepteur, en plus des tests de liaison par cytométrie et SPR. De plus, l'utilisation de cellules en suspension capables de produire en grande quantité des protéines recombinantes telles que la ligase RNF167, nécessitant des PTMs comme la glycosylation, a été un des critères dans la sélection de leur modèle de validation, notamment pour les essais de liaison par cytométrie (FACS). Ces critères ont guidé le choix de leur modèle cellulaire. En revanche, compte tenu du fait que les VHH ne nécessitent pas de modifications post-traductionnelles complexes, mais uniquement une réaction chimique comprenant l'oxydation de deux cystéines pour la formation de leur unique pont disulfure, il est possible de les produire en système bactérien (Chao *et al.*, 2022; de Marco, 2020; Dumoulin *et al.*, 2002).

L'expression du monomère RNF167-A5 a été privilégiée dans *E. coli* dans ce projet. Ce choix s'explique notamment en raison d'un coût de production moins élevé, bien que cela puisse entraîner une production plus faible, mais acceptable pour les besoins de l'étude. La production de VHH en système procaryote, notamment *Escherichia coli*, reste bien documentée (Chao *et al.*, 2022; Deyme, 2017; Hartmann *et al.*, 2019). Toutefois, l'expression en système procaryote peut comporter quelques désavantages. Comme mentionné à l'introduction, l'environnement réducteur du cytoplasme reste défavorable à la formation de ponts disulfure (Kong et Guo, 2014). Les VHH sont de petites protéines simples qui comprennent généralement un seul pont disulfure dans leur structure, qui en raison de leur nature physicochimique, peut se reformer spontanément lorsque les deux cystéines qui le composent se retrouvent en conditions

oxydantes après extraction bactérienne, créant ainsi un repliement stable du VHH (Lafaye, 2009). Toutefois, cette formation spontanée est moins contrôlée que celle qui se produirait naturellement en système eucaryote au niveau du réticulum endoplasmique, avec la présence d'enzymes spécialisées qui permettent une formation et une isomérisation très précises des ponts (Oka et Bulleid, 2013). L'expression en système procaryote ne permet généralement pas l'expression d'un lot de VHH homogène et une formation totale des ponts disulfure (Hartmann *et al.*, 2019). La littérature portant sur les stratégies de production et la caractérisation fine des VHH rapporte que l'expression cytoplasmique de certains VHH peut être obtenue en grande quantité avec le système *E. coli*, mais que les VHH purifiés étaient composés d'un mélange de formes oxydées et réduites avec un ratio de VHH fonctionnel de 85%, contrairement à la production synthétique des VHH où l'échantillon final était le plus homogène avec 100% de pont disulfure formé et un ratio de VHH actif de 96% (Hartmann *et al.*, 2019). Cette dernière méthode pourrait être une option à considérer comme substitut de l'utilisation d'un modèle eucaryote pour l'obtention d'un lot de VHH homogène. Bien que l'affinité du nanocorps RNF167-A5 ait déjà été validée dans l'article de Siepe *et al.*, sa production dans un système procaryote nécessite une nouvelle validation par des tests de liaison *in vitro*. En effet, il existe des différences importantes, notamment entre les mécanismes de repliement des protéines et la formation de ponts disulfure entre ces organismes. Ce qui pourrait affecter la structure finale du nanocorps et sa fonction. Ce type de problématique est bien documenté dans la littérature scientifique portant sur la production de protéines recombinantes en bactérie, en raison des contraintes du cytoplasme qui contribue à un repliement incorrect des protéines, notamment par l'inhibition de la formation de ponts disulfure et par l'absence de chaperons moléculaires appropriés présents dans certaines voies de repliement eucaryotes (Sandomenico, Sivaccumar et Ruvo, 2020). Des études ont également démontré que l'affinité d'un même VHH pour sa cible pouvait varier en fonction du système d'expression choisi, par exemple fongique versus bactérien, et atteindre parfois une affinité pour sa cible jusqu'à 18,3 fois supérieure (Karaman *et al.*, 2023). Ce qui souligne l'importance de réévaluer la performance d'un VHH produit dans un système d'expression différent. Ainsi, la validation de la spécificité du nanocorps RNF167-A5, produit en système bactérien, envers RNF167 est demeurée une étape cruciale pour garantir la fiabilité des résultats.

Les essais de liaison *in vitro* par GST pull-down ont permis de confirmer la spécificité du nanocorps RNF167-A5 pour la ligase E3 RNF167 (figure 3.3). Cependant, dans le premier essai de capture d'affinité de RNF167 endogène, immunodétectée avec l'anticorps polyclonal anti-RNF167, il n'a pas été possible de confirmer l'interaction de RNF167 avec le VHH en raison de la nature de l'anticorps et de son procédé de fabrication.

(figure 3.3B). D'abord, parce qu'il reconnaît également la GST et parce que des liaisons non spécifiques dominantes ont compliqué l'analyse des résultats. Cette situation est fréquemment observée avec l'utilisation d'anticorps polyclonaux contenant un mélange d'anticorps dirigé contre différents épitopes de l'antigène, mais parfois aussi contre l'étiquette de fusion utilisée pour la production d'antigène, telle que la GST utilisée dans ce cas pour l'anti-RNF167, et autres cibles non spécifiques (Kramberger-Kaplan, Austerlitz et Bohlmann, 2020). Toutefois, celui-ci a permis de détecter la présence de la protéine RNF167 endogène dans le lysat cellulaire, comme rapporté dans des études précédentes, par la présence visible de bandes diffuses avec un poids moléculaire supérieur à ses 38 kDa théorique, mais inférieur à 75 kDa (Lussier *et al.*, 2012). Ce phénomène documenté s'explique par les modifications post-traductionnelles que subit RNF167, notamment la N-glycosylation liée sur les résidus Asn33 et Asn79, principale cause du motif diffus de plus haut poids moléculaire observé par immunobuvardage, comme démontré par Lussier *et al.* Par conséquent, le profil de bandes observées par l'immunodétection de RNF167 concorde avec le résultat attendu, tel que rapporté dans la littérature.

Par la suite, l'analyse des résultats des essais de liaison réalisés en présence de RNF167-V5-His recombinante, afin de la détecter à l'aide d'un anticorps anti-V5 commercial, a permis d'obtenir des résultats concluants. Par ailleurs, compte tenu de la différence de poids moléculaire théorique d'environ 2 kDa due à l'ajout des étiquettes d'affinité, il est attendu que le profil d'immunodétection de la protéine RNF167 recombinante soit similaire à la détection de RNF167 endogène. Les résultats observés coïncident avec cette hypothèse et viennent confirmer la validité de nos observations sur la spécificité du nanocorps RNF167-A5 pour la ligase RNF167. Effectivement, l'analyse de l'immunobuvardage a permis de détecter la présence de la protéine RNF167 dans le lysat cellulaire, mais aussi dans la piste du lysat incubé avec le nanocorps (figure 3.3C). De plus, l'absence de détection dans les pistes de contrôle négatif confirme que les interactions observées ne sont pas attribuables à une interaction non spécifique avec la GST ou la résine seule, confirmant ainsi la validité du test effectué. Par conséquent, il a été possible de conclure que le nanocorps RNF167-A5 produit possède une affinité suffisante pour la ligase E3 RNF167 afin de se lier à celle-ci et de l'extraire d'un lysat cellulaire. Ainsi, le VHH produit en bactérie a été jugé fonctionnel. La technique de *pull-down* demeure une méthode fiable et bien documentée pour l'étude et la validation des interactions protéine-protéine (Kim et Hakoshima, 2019). Des études réussies utilisant des essais de type pull-down avec des VHH pour valider leur spécificité envers la protéine cible, en tant qu'étape préliminaire, en font la démonstration (Karaman *et al.*, 2023).

Afin de pousser notre analyse, les essais de liaison *in vitro* ont été poursuivis de la même façon, mais avec un lysat contenant la protéine recombinante RNF13-HA. Le but étant de confirmer la spécificité du nanocorps RNF167-A5. Il est à noter qu'aucun test de spécificité incluant des tests de croisement direct avec d'autres ligases n'a été présenté dans l'article de Siepe et al. (Siepe, Picton et Garcia, 2023). Toutefois, selon leurs essais d'internalisation, les résultats montrés suggèrent indirectement une certaine spécificité, car les nanocorps utilisés, dans les complexes REULR, induisent une internalisation ciblée selon leur cible. Comme mentionné précédemment, la protéine RNF13 a été sélectionnée et représente un candidat prometteur pour le test de spécificité, car il s'agit d'une E3 ligase de type PA-TM-RING, tout comme la ligase RNF167 et que ces deux protéines homologues présentent des similarités de séquence significatives et occupent des fonctions apparentées (Jin *et al.*, 2011). L'analyse des résultats obtenues par immunobuvardage a permis de conclure que le nanocorps RNF167-A5 n'a aucune spécificité pour RNF13 dans les conditions testées, car RNF13 n'a pu être immunodétectée dans la piste du lysat incubé avec GST-VHH (figure 3.4). Somme toute, l'ensemble des résultats de liaison *in vitro* a permis de confirmer que le monomère RNF167-A5, produit en système bactérien dans le cadre de notre étude, était fonctionnel. En effet, il présente une reconnaissance de la protéine cible ainsi qu'une spécificité envers la ligase RNF167, dans les limites expérimentales.

4.4 Fonctionnalisation réussie du nanocorps RNF167-A5 et validation

Dans le cadre de ce projet, la fonctionnalisation du nanocorps RNF167-A5 par l'ajout de molécule fluorescente constitue une étape essentielle pour en faire un outil de détection utilisable en microscopie. Ainsi, suivant la validation du monomère RNF167-A5 par les essais de liaison, deux stratégies ont été comparées : la conjugaison chimique avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et la création de versions recombinantes du VHH avec des protéines de fusion fluorescentes telles que EGFP et mCherry.

Premièrement, le marquage fluorescent par l'utilisation d'isothiocyanate de fluorescéine est la méthode la plus couramment utilisée pour le marquage d'anticorps ou de fragments d'anticorps tels que les VHH, car il s'agit d'une technique simple et relativement rapide (Chaganti, Venkatakrishnan et Bose, 2018). Notre étude a démontré que la conjugaison chimique a permis un marquage rapide et efficace du VHH, ainsi que de la GST (figure 3.5). Ce type de marquage est fréquemment utilisé pour le suivi direct d'anticorps ou de VHH et il s'agit d'une technique extrêmement précieuse pour l'identification de molécules de surface en contexte biologique, notamment par microscopie de fluorescence (Lantz, Holmes et Douagi, 2023). Ce qui a motivé son application dans le cadre de ce travail. En suivant cette approche,

l'analyse du gel SDS-PAGE montrant la séparation des protéines fluorescentes, GST-VHH-FITC et GST-FITC, a permis d'évaluer qualitativement l'efficacité de marquage. L'isothiocyanate de fluorescéine a la propriété d'être excitable à 488 nm, mais présente une longueur d'onde d'excitation optimale à 490 nm, ce qui entraîne une émission de fluorescence optimale vers 525 nm dans le spectre de lumière vert (Lantz, Holmes et Douagi, 2023). La visualisation du gel après excitation à 488 nm a été comparée au signal obtenu par la méthode de visualisation *Stain-Free*. Par conséquent, les paramètres cinétiques du marquage ont été jugés efficaces pour obtenir des protéines marquées grâce à la comparaison qualitative de l'intensité des bandes d'intérêt. En effet, les protéines marquées à l'FITC ont montré une fluorescence nette et bien observable, malgré que la longueur d'onde d'excitation utilisé reste en dessous du maximum d'excitation de la FITC. Toutefois, cette observation reste en accord avec la littérature scientifique, qui montre que l'excitation à 488 nm permet une fluorescence efficace pour l'analyse des protéines marquées (Emonts *et al.*, 2021). Le marquage par FITC est un marquage non spécifique qui se produit aléatoirement sur les résidus lysine des protéines, ce qui peut altérer l'affinité ou la fonction d'un anticorps (Kirley et Norman, 2023). En effet, des études récentes ont montré que la conjugaison fluorescente de nanocorps au FITC a permis un marquage et une détection efficaces de leur cible, mais que certains VHH marqués à l'FITC ont présenté une liaison réduite ou abolie dans les tests cellulaires et ont suggéré que la conjugaison aléatoire du FITC aux résidus de lysine avait probablement interféré avec la reconnaissance de l'antigène (Maltseva *et al.*, 2025). Par conséquent, les tests de liaison *in vitro* ont été répétés. Les résultats d'interaction obtenus ont démontré que le nanocorps marqué a conservé sa spécificité pour la ligase RNF167, comme en témoigne la présence de cette dernière dans la piste de GST-VHH-FITC, ce qui indique la capture par affinité de RNF167 à partir d'un lysat cellulaire (figure 3.9). De plus, ces résultats suggèrent que la conjugaison par FITC n'a pas entraîné d'encombrement ou d'interférence qui a affecté visiblement l'interaction du VHH avec RNF167.

Deuxièmement, dans la stratégie de fusion du VHH avec des protéines fluorescentes, de nouveaux plasmides ont été obtenus avec succès. Comme mentionné précédemment, cette méthode visait à offrir un contrôle plus rigoureux du positionnement du fluorophore et une meilleure photostabilité de celui-ci (Bajar *et al.*, 2016; Mahmoudian *et al.*, 2011). Les protéines fluorescentes, GST-VHH-EGFP et GST-VHH-mCherry, ont été produites avec succès (figure 3.6). De plus, l'analyse des gels SDS-PAGE, des protéines capturées par affinité, a permis de confirmer leur identité. La protéine fluorescente verte améliorée (EGFP) de 26,9 kDa émet une fluorescence verte vers 507 nm lorsqu'elle est excitée à 488 nm (Cormack, Valdivia et Falkow, 1996; FPbase, 2025a). Après clivage enzymatique, la bande principale observée à 488 nm

correspond approximativement à la taille attendue pour VHH-EGFP (figure 3.7A). Cependant, certains résultats obtenus ont été inattendus. Aucune fluorescence n'a été visible pour GST-VHH-EGFP avant clivage, ce qui a mis en doute l'intégrité de la protéine GST-VHH-EGFP. L'agrégation de la protéine GST-VHH-EGFP avant clivage semble pouvoir être exclue comme cause de la non-fluorescence, car aucune bande d'agrégation présentant un poids moléculaire supérieur n'est visible (figure 3.7A). En théorie, la protéine EGFP a besoin d'être correctement repliée pour que son chromophore soit fluorescent (Jackson, Craggs et Huang, 2006). De plus, certaines études ont rapporté que le repliement approprié du GFP, comme protéine de fusion en C-terminal de la protéine cible, dépend du repliement correct de cette dernière (Geertsma *et al.*, 2008; Waldo *et al.*, 1999). En effet, des travaux antérieurs ont suggéré que ces observations peuvent constituer une approche simple utilisant une protéine fluorescente verte, telle que EGFP, comme indicateur de repliement pour détecter simultanément les protéines bien pliées et agrégées (Geertsma *et al.*, 2008). Par conséquent, la bande majoritaire avant clivage correspond probablement à la protéine GST-VHH-EGFP présentant un VHH mal replié, possiblement dû à sa production en système bactérien et à la formation de pont disulfure, comme abordé précédemment. En théorie, la formation de pont disulfure spontané *in vitro*, en conditions oxydantes, est un processus extrêmement lent (Lafaye, 2009; Peters, 1982). De plus, les protéines fluorescentes vertes peuvent se replier spontanément et favoriser la restauration de la fluorescence (Romei et Boxer, 2019). Ce qui pourrait expliquer pourquoi la fluorescence a été retrouvée après quelques heures d'incubation contrairement à l'échantillon au temps zéro, avant clivage, conservé immédiatement dans un tampon de chargement contenant des agents réducteurs puissants. Cette observation reste cohérente avec la théorie selon laquelle le repliement correct du VHH, suite à la formation spontanée de son pont disulfure, a ensuite favorisé le repliement correct de l'EGFP et le rétablissement de la fluorescence. Pour ce qui est de la perte de fluorescence des échantillons incubés après une nuit, elle résulte probablement d'une agrégation protéique, visible par les doublets de plus haut poids moléculaire après clivage, et par une dégradation (figure 3.7A). Une seconde purification a été effectuée afin d'obtenir une protéine GST-VHH-EGFP intègre, présentant un chromophore fonctionnel. En conséquence, l'analyse du gel SDS-PAGE par fluorescence a permis de confirmer l'obtention de la protéine GST-VHH-EGFP avec un chromophore fonctionnel et probablement bien replié (figure 3.8). En revanche, la fusion mCherry a montré une meilleure stabilité. Dans les mêmes conditions, aucune perte de fluorescence n'a été observée (figure 3.7B). La protéine fluorescente mCherry de 26,7 kDa émet une fluorescence rouge à 610 nm lorsqu'elle est excitée à 550 nm (FPbase, 2025b; Shaner *et al.*, 2004). De même, après clivage enzymatique, la bande principale observée à 550 nm correspond à la taille attendue pour VHH-mCherry.

Ensuite, lors des essais de liaisons, une perte d'affinité du nanocorps RNF167 sous sa forme GST-VHH-EGFP a été observée, malgré la préservation de son intégrité apparente sur gel (figure 3.9). Comme mentionné précédemment, la perte d'affinité du VHH pourrait être attribuable à un encombrement stérique causé par sa fusion avec l'EGFP. Ainsi, non seulement l'intégrité d'une protéine est importante pour la conservation de sa fonction, mais aussi la géométrie globale de sa construction. Des tests de liaison complémentaires, tels que la microscopie, peuvent permettre d'évaluer la spécificité des constructions fluorescentes protéiques sans étiquette GST, envers leur cible. Étant donné la similarité structurelle entre la construction GST-VHH-mCherry et la construction GST-VHH-EGFP, et compte tenu des résultats négatifs reproductibles obtenus avec cette dernière, les essais de liaison par GST *pull-down* n'ont pas été entrepris pour la construction GST-VHH-mCherry. Somme toute, ces expériences ont permis de développer et de caractériser différentes versions fluorescentes du nanocorps RNF167-A5.

4.5 Échec de l'étude de l'endocytose de la ligase E3 RNF167 via les VHH monomérique RNF167-A5.

L'ambition principale de cette étude était de développer l'utilisation du nanocorps RNF167-A5 pour déterminer par microscopie à fluorescence l'internalisation et le trafic intracellulaire de RNF167 dans un contexte natif. L'avantage principal de l'utilisation de nanocorps conjugués par rapport aux anticorps classiques en microscopie est qu'en raison de leur petite taille, ils minimisent l'erreur de localisation entre la cible et le fluorophore, ce qui entraîne une meilleure résolution, comme rapporté dans la littérature (de Beer et Giepmans, 2020). Ces avantages ont déjà été exploités dans des études comparables où des nanocorps fonctionnalisés ont permis d'étudier le trafic intracellulaire de protéines, de la surface cellulaire aux compartiments intracellulaires, tels que les endosomes et le réseau trans-Golgi, par des études de microscopie de fluorescence et d'imagerie vivante (Buser *et al.*, 2018). Ceci souligne le potentiel du nanocorps RNF167-A5 en tant que sonde en contexte biologique. Jusqu'à présent, il n'existe aucun anticorps monoclonal ou VHH spécifique au domaine extracellulaire de la ligase RNF167 commercialement disponible pour des applications de microscopie d'immunofluorescence (IF) ou autres applications expérimentales.

Bien que la fonctionnalisation du nanocorps RNF167-A5 ait permis d'obtenir différentes versions de celui-ci (GST-VHH-FITC, VHH-EGFP, VHH-mCherry), aucun signal de fluorescence n'a pu être obtenu lors des essais d'internalisation y compris avec l'utilisation de GST-VHH, qui a démontré une spécificité pour la protéine RNF167 à plusieurs reprises lors des essais de liaison *in vitro* par GST *pull-down*. Malgré plusieurs tentatives infructueuses d'optimisation, aucune liaison à la surface cellulaire ou à l'intérieur des cellules,

lors des essais d'internalisation n'a pu être observée sur cellule non perméabilisée. De même, aucune amélioration n'a été observée lors des essais d'immunomarquage avec le nanocorps RNF167-A5 purifié par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) après clivage enzymatique de l'étiquette GST, ce qui a permis d'obtenir celui-ci dépourvu d'encombrement stérique et sous sa forme la plus pure possible.

Enfin, les essais de liaison en surface cellulaire et d'internalisation sur cellules vivantes ont été effectués en conditions de surpression de RNF167-EGFP (figure 3.10). Ce test visait à vérifier l'hypothèse selon laquelle l'abondance naturelle de RNF167 était potentiellement insuffisante en conditions natives pour être détectée par notre méthode. Cela n'excluait pas la possibilité de sa présence à la surface cellulaire, mais que les signaux obtenus étaient peut-être inférieurs à la limite de détection expérimentale. Les essais de liaison sur cellules vivantes avec la surexpression de RNF167-EGFP n'ont été effectués qu'avec GST-VHH, VHH purifié par exclusion stérique et VHH-mCherry, car leur fluorescence émise et détectée n'interférait pas avec la fluorescence verte de la ligase RNF167 recombinante marquée à l'EGFP excitable à 488 nm. Effectivement, les marqueurs fluorescents des nanocorps VHH-EGFP et GST-VHH-FITC sont excitables dans la même plage de longueur d'onde. Par conséquent, ils ne pouvaient être utilisés avec la présence de la protéine recombinante RNF167-EGFP. Malgré tout, aucune liaison en surface cellulaire ni internalisation n'a pu être observée, et ce, même en condition de surpression de RNF167-EGFP (figure 3.10) sur cellules non perméabilisées.

Toutes les données obtenues portent à croire que les nanocorps produits dans cette étude, quelle que soit leur forme, ne permettent pas de détecter efficacement la ligase E3 RNF167 à la surface cellulaire par microscopie d'immunofluorescence, notamment avec notre modèle cellulaire HEK293T. Selon les études antérieures, aucune validation cellulaire n'a été effectuée avec le monomère RNF167-A5. Cependant, il a été démontré que sous sa forme tétramérique, avec une concentration de 200 nM, il peut lier la ligase E3 RNF167 à la surface de plusieurs types cellulaires, notamment les cellules HEK293T, sur des cellules vivantes non perméabilisées en condition natives, par des analyse en cytométrie en flux, mais avec une intensité de liaison inégale selon le type cellulaire (Siepe, Picton et Garcia, 2023). D'abord, une forte détection sur les cellules humaines YT1 et UT/7 avec une valeur d'intensité moyenne de fluorescence (MFI) normalisé de 1,00. Cela signifie que le nanocorps RNF167-A5 présente un fort taux de liaison pour RNF167. Cela peut aussi suggérer une expression et une accessibilité élevées de RNF167 à la surface de ses cellules. Ensuite, une faible liaison a été détectée sur les lignées cellulaires humaines HEK293T et CaCo-2, avec respectivement un MFI normalisé de 0,07 et 0,08 (Siepe, Picton et Garcia, 2023). Cette valeur très faible

de MFI normalisé signifie qu'un très faible taux de liaison est détecté. Cela peut aussi indiquer que la ligase RNF167 est inaccessible ou trop faiblement exprimée à la surface cellulaire des cellules HEK293T pour générer un fort signal. Ces données issues de la littérature scientifique fournissent des indices probables quant au facteur qui a pu contribuer à l'absence de résultats obtenus pour l'immunomarquage sur cellule vivante dans ce travail, mais offrent également une piste pour envisager un autre modèle cellulaire. En effet, les cellules humaines YT1 et UT/7 semblent être des candidats de choix pour la détection du RNF167 à la surface cellulaire. Cette analyse peut être approfondie en considérant également la conformation du nanocorps utilisé dans ce travail. Certaines études ont rapporté que les dimères de VHH peuvent se lier environ 3,3 fois plus fortement à leur cible et permettre une visualisation adéquate de celle-ci, contrairement au monomère qui présentait une coloration très faible, dans les mêmes conditions (Rashidian *et al.*, 2015). La différence entre nos résultats et ceux de Siepe *et al.* (2023) met en évidence les limitations rencontrées avec le type cellulaire et l'importance de la conformation du nanocorps RNF167-A5, monomère versus multimère, ainsi que la limite de détection de la méthode utilisée, qui sont des facteurs non négligeables à prendre en compte.

4.6 Immunomarquage réussi après fixation et perméabilisation des cellules et validation.

Face à l'impossibilité de détecter RNF167 de surface avec les VHH produits, les essais ont été poursuivis avec un protocole classique d'immunomarquage. De manière surprenante, ces expériences ont permis une détection de la ligase RNF167 avec tous les variants de VHH, de façon plus ou moins efficace (figure 3.13). Il est toutefois à noter que les résultats d'immunodétection pour une même protéine obtenue à l'aide d'un VHH peuvent révéler une distribution subcellulaire différente de celle obtenue avec des anticorps classiques, notamment en raison de leur petite taille qui leur confère une meilleure pénétration tissulaire (de Beer *et al.*, 2018). L'absence de données de microscopie pour l'immunomarquage de RNF167 à l'aide de VHH spécifique exige une comparaison prudente des résultats. L'analyse comparative des signaux de fluorescence obtenus dans les mêmes conditions a montré que GST-VHH offrait le meilleur rapport signal/bruit, suivi de près par la forme monomérique de VHH. Le variant GST-VHH-FITC a donné des résultats similaires. La fluorescence observée est principalement localisée au niveau du cytoplasme cellulaire, ce qui concorde avec la littérature sur la localisation de la protéine RNF167 (Nair *et al.*, 2020). Cependant, un marquage cytoplasmique de moindre intensité a été obtenu avec VHH-EGFP. De plus, des résultats moins concluants ont été obtenus avec VHH-mCherry, car les signaux de fluorescence, possiblement attribuables à un artefact de fluorescence, sont visibles

principalement aux noyaux cellulaires. La ligase E3 RNF167 n'est pas reconnue pour être présente au noyau (Atlas, 2024a; Thul *et al.*, 2017).

Afin de poursuivre notre analyse, les essais de liaison en conditions de surexpression ont été répétés sur des cellules perméabilisées avec GST-VHH et VHH-mCherry (figure 3.14). Ce test visait à déterminer si l'augmentation de la présence de RNF167-EGFP, observée par l'intensification de son signal fluorescent, était corrélée à une augmentation du signal de fluorescence des VHH. Les résultats ont montré que l'immunodétection de GST-VHH produisait un signal plus intense en présence de cellules surexprimant RNF167-EGFP, ce qui suggère une certaine spécificité fonctionnelle. En revanche, la variante protéique VHH-mCherry ne présente pas de différence significative en présence de cellules exprimant à de hauts niveaux RNF167-EGFP qui sont observables par une fluorescence verte intense. Ceci suggère que la détection de la fluorescence au cytoplasme pourrait être attribuable à un marquage non spécifique par VHH-mCherry. Par conséquent, l'hypothèse est que la conjugaison d'une protéine de fusion en C-terminal de la séquence codant le nanocorps semble affecter sa fonction. Des études similaires ont rapporté que la capacité de liaison d'un VHH anti-EGFR bien caractérisé avait été perdue lors de l'ajout d'un composant en C-terminal de celui-ci, mais que sa capacité pouvait être retrouvée lorsque conjugué en N-terminal (de Beer *et al.*, 2018; Roovers *et al.*, 2011). Ce qui souligne l'importance de la position des protéines dans les constructions de protéines de fusion et que les effets d'encombrement stérique peuvent avoir un impact non négligeable sur les fonctions des VHH.

Globalement, la fusion du VHH avec les protéines fluorescentes EGFP et mCherry n'a pas été une stratégie efficace pour cibler la ligase RNF167, car aucun résultat concluant n'a été obtenu. Le VHH fonctionnalisé présentant le meilleur profil reste le variant GST-VHH-FITC. Bien qu'il ait démontré sa spécificité pour RNF167 lors de tests de liaison par GST pull-down, son utilisation pour des essais de microscopie dans un contexte cellulaire complexe demeure à confirmer. Le variant GST-VHH a démontré une spécificité pour la ligase RNF167 lors de multiples essais. Afin de vérifier que les résultats observés en microscopie reflétaient bien une reconnaissance spécifique de RNF167, une approche utilisant l'ARN interférent a été effectuée avec GST-VHH comme approche complémentaire en microscopie. Cette méthode de validation reste largement décrite dans la littérature scientifique, notamment pour la validation d'anticorps lorsque de vraies lignées cellulaires négatifs pour l'antigène cible sont indisponibles (Bordeaux *et al.*, 2010).

L'évaluation préliminaire de la cinétique de réduction de la protéine par analyse par immunobuvardage des lysats cellulaires à différents jours post-transfection a permis de confirmer que la condition optimale pour la diminution de l'expression de la RNF167 est observée 48 heures post-transfection (figure 3.15). Cette condition a ensuite été utilisée lors d'essais de microscopie afin de déterminer si la diminution de l'expression de RNF167 était corrélée à une diminution du signal de fluorescence obtenu avec GST-VHH, ce qui permettrait de valider indirectement sa spécificité (figure 3.16A). Malgré une légère diminution du signal en condition siRNF167 comparativement à la condition de contrôle négatif, les analyses statistiques n'ont pas révélé de différence significative (figures 3.16B et 3.16C). Ces résultats suggèrent que la réduction de RNF167 par l'utilisation de siARN spécifique n'a pas été suffisante pour affecter significativement son immunodétection par GST-VHH dans les conditions expérimentales. Ce qui remet en doute la spécificité du marquage de RNF167 par GST-VHH. Cependant, une importante variabilité de l'intensité moyenne de fluorescence par cellule est observable dans la condition de répression génique par siRNF167, contrairement à la condition contrôle (figure 3.16B). Cette observation pourrait indiquer une efficacité hétérogène de la transfection. Ce phénomène potentiel pourrait constituer une source de biais importante dans cette analyse. Une approche plus approfondie, utilisant une stratégie de knock-out (KO), pourrait permettre une analyse fonctionnelle plus robuste. Une telle approche pourrait permettre une suppression stable et complète de RNF167, ce qui éliminerait les biais liés à l'efficacité de transfection variable avec les siRNA. Cette stratégie demeure une approche complémentaire qui pourrait renforcer la robustesse des conclusions quant à la spécificité du nanocorps RNF167-A5 monovalent, applicable à des études de microscopie.

CONCLUSION

Les résultats dans cette étude ont permis de mettre en évidence les limites techniques de l'utilisation d'un nanocorps monovalent pour l'étude fonctionnelle d'une protéine endogène peu abondante. Pour surmonter ces obstacles, plusieurs pistes peuvent être envisagées à l'avenir. Premièrement, la création d'un format bivalent ou multivalent fonctionnalisé du nanocorps semble une piste intéressante à explorer pour obtenir un signal de fluorescence plus intense dans les mêmes conditions (Rashidian *et al.*, 2015). Pour y parvenir, une approche pertinente serait de reproduire la stratégie de tétramérisation du nanocorps RNF167-A5 dans l'article de Siepe, Picton et Garcia (2023) afin de l'utiliser en microscopie à fluorescence. Le tétramère, 4X-VHH-Streptavidine-AlexaFluor647, permet une liaison multivalente. En raison des liaisons individuelles cumulées possibles, il possède une meilleure avidité. Par conséquent, l'augmentation du signal de fluorescence et de l'avidité du nanocorps RNF167-A5 semble constituer des paramètres déterminants pour améliorer la détection de la ligase E3 RNF167 et la performance de l'outil biologique de détection pour des études de microscopie. Deuxièmement, l'utilisation d'un autre modèle cellulaire pourrait être plus pertinente et rendre l'étude du routage intracellulaire de la ligase E3 RNF167, dans un contexte natif, plus accessible. Comme mentionné précédemment, les cellules humaines YT1 et UT/7 semblent être des candidats de choix pour la détection du RNF167 à la surface cellulaire. Dernièrement, une approche de validation par knock-out pourrait permettre une analyse fonctionnelle plus robuste pour la validation de l'utilisation du nanocorps RNF167-A5 en microscopie d'immunofluorescence. L'ensemble de ces pistes d'amélioration oriente vers le développement d'un outil de détection plus sensible et plus spécifique, tout en améliorant la robustesse expérimentale des approches utilisées.

En conclusion, ce projet de maîtrise constitue l'un des premiers travaux visant à développer l'utilisation du nanocorps RNF167-A5 en tant qu'outil pour l'étude fonctionnelle de la ligase E3 de l'ubiquitine RNF167. Pour finir, le GST-VHH demeure actuellement le variant le plus prometteur, mais dont la spécificité reste à confirmer par des approches complémentaires. De même, ce projet contribue à une meilleure compréhension des défis liés à l'utilisation des VHH en tant qu'outils d'imagerie et ouvre la porte à de nouvelles perspectives pour l'étude des E3 ligases en biologie cellulaire.

ANNEXE A

Traduction de la séquence codant la protéine 6xHis-Trx-VHH.

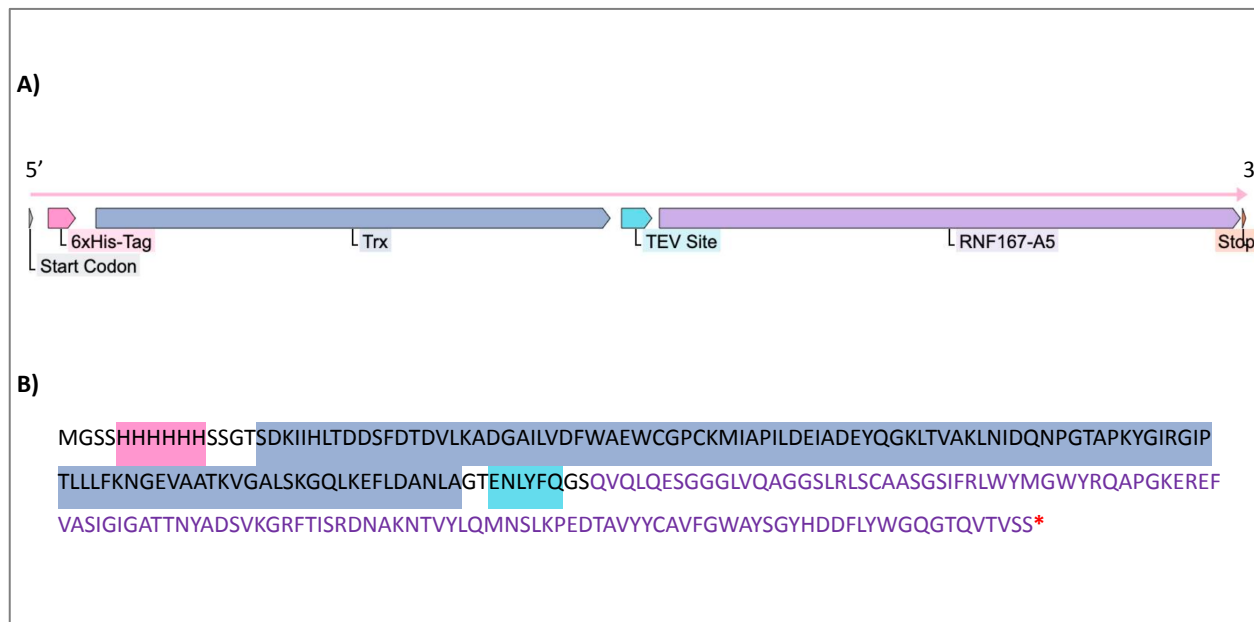


Figure A.1. Traduction de la séquence codant la protéine 6xHis-Trx-VHH. Cette figure montre le sens de la traduction du plasmide pRSF-Trx-VHH, avec la séquence d'acides aminés résultants à la protéine traduite affichée en dessous. A) Région codante du plasmide pRSF-Trx-VHH de 5' en 3' : le codon de départ (start codon), la séquence codant l'étiquette d'affinité composée de six résidus d'histidine (6xHis-Tag), gène de la thioredoxine (Trx), gène du nanocorps (RNF167-A5) suivi d'un codon d'arrêt (Stop). B) Les différentes régions de la séquence protéique sont présentées comme suit : 6xHis-Tag, Trx, site de clivage de la TEV, VHH et le codon d'arrêt (*). La protéine produite à un poids moléculaire estimé à 27,7 kDa.

ANNEXE B

Stratégie de PCR et de clonage pour la génération de pGEX-4T1-VHH (+ site de restriction).

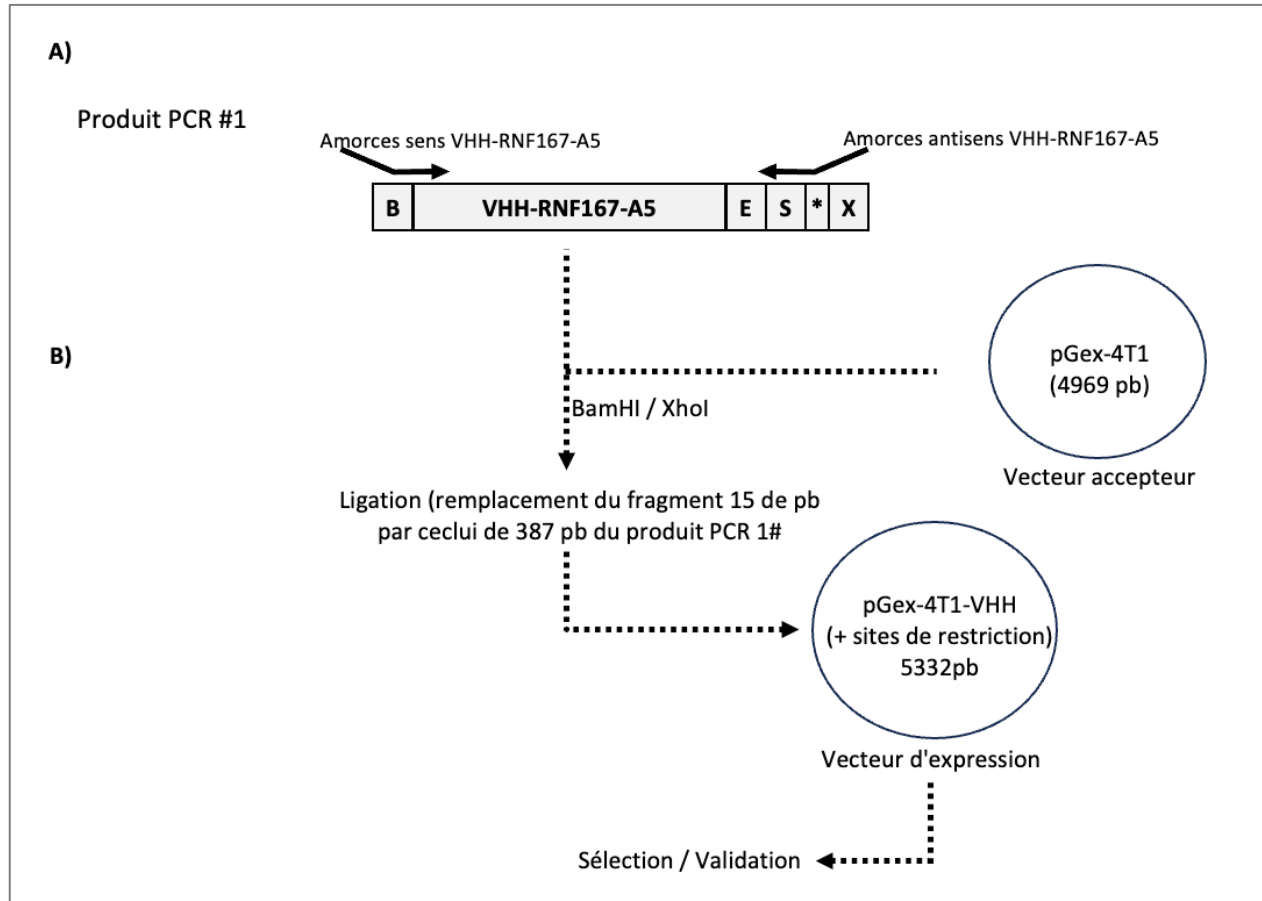


Figure B.1. Stratégie de PCR et de clonage pour la génération de pGEX-4T1-VHH (+ site de restriction). A) Une étape de PCR a été utilisée pour générer l'amplicon de la séquence codant le VHH plus sites de restriction. L'astérisque représente un codon d'arrêt. B) Cet amplicon a été cloné dans le site BamHI-XhoI de pGEX-4T1 pour générer le vecteur pGEX-4T1-VHH (+site de restriction). pb; paire de bases. Abréviations des sites de restriction : B, BamHI ; E, EcoRI ; S, Sall ; X, XhoI. La figure n'est pas à l'échelle.

ANNEXE C

Stratégie de PCR et de clonage pour la génération des plasmides pGEX-4T1-VHH-EGFP et pGEX-4T1-VHH-mCherry.

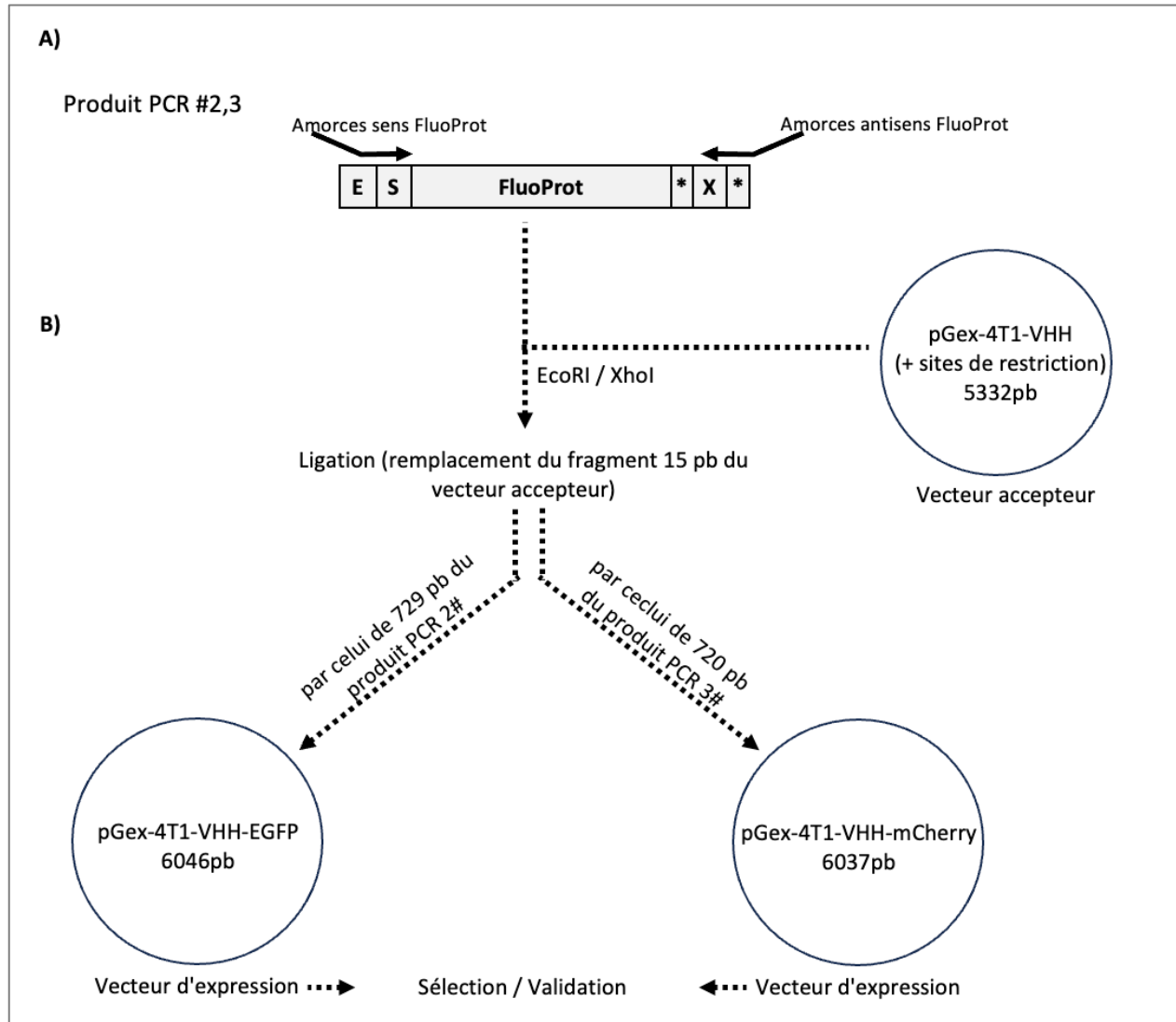


Figure C.1 Stratégie de PCR et de clonage pour la génération des plasmides pGEX-4T1-VHH-EGFP et pGEX-4T1-VHH-mCherry. A) Une étape de PCR a été utilisée pour générer les amplicons de la séquence codant les protéine EGFP et mCherry plus sites de restriction. L'astérisque représente des codons d'arrêt. B) Ces amplicons ont été cloné chacun par EcoRI-XhoI dans le plasmide pGEX-4T1-VHH (+site de restriction). pb; paire de bases. Abréviations des sites de restriction : E, EcoRI ; S, Sall ; X, XhoI. La figure n'est pas à l'échelle.

APPENDICE A

Liste des plasmides utilisés avec leurs caractéristiques et utilisation.

Nom du plasmide	Système d'expression	Gène inséré / Fusion	Étiquette	Résistance antibiotique	Utilisation
pEGFP-N1	Mammalian	—	EGFP	Néomycine / Kanamycine	Source de EGFP pour clonage en bactérie
pmCherry-C1	Mammalian	—	mCherry	Néomycine / Kanamycine	Source de mCherry pour clonage en bactérie
pRSF-Trx	Bactérien (<i>E. coli</i>)	—	6xHis-TEV-Trx	Kanamycine	Vecteur d'expression
pRSF-Trx-VHH	Bactérien (<i>E. coli</i>)	RNF167-A5	6xHis-TEV-Trx	Kanamycine	Expression & purification de Trx-VHH
pGEX-4T1	Bactérien (<i>E. coli</i>)	—	GST (N-Term)	Ampicilline	Vecteur d'expression
pGEX-4T1-VHH	Bactérien (<i>E. coli</i>)	RNF167-A5	GST (N-Term)	Ampicilline	Expression & purification de GST-VHH
pGEX-4T1-VHH (+ site de restriction)	Bactérien (<i>E. coli</i>)	RNF167-A5	GST (N-Term)	Ampicilline	Clonage intermédiaire
pGEX-4T1-VHH-EGFP	Bactérien (<i>E. coli</i>)	RNF167-A5-EGFP	GST (N-Term), EGFP (C-Term)	Ampicilline	Expression & purification de GST-VHH-EGFP
pGEX-4T1-VHH-mCherry	Bactérien (<i>E. coli</i>)	RNF167-A5-mCherry	GST (N-Term), mCherry (C-Term)	Ampicilline	Expression & purification de GST-VHH-mCherry
pALICE02	Nicotiana tabacum cv. BY-2 (Sans cellule)	—	StreptII (N-Term), 6xHis (C-Term)	Ampicilline	Vecteur d'expression
pCAGGS-RNF13-HA	Mammalian	RNF13-HA	HA (C-Term)	—	Expression & purification par affinité (essais de liaison)
pEGFP-N1-RNF167-WT	Mammalian	RNF167-EGFP	EGFP (C-Term)	—	Microscopie d'immunofluorescence (IF)

BIBLIOGRAPHIE

Human Protein Atlas. (2024a) Dans RNF167 - Subcellular localization. Récupéré le 2025, July 25 de <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108523-RNF167/subcellular>.

Human Protein Atlas. (2024b) Dans RNF167 - Subcellular localization. Récupéré le 2025, 11 juillet de <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108523-RNF167/subcellular>.

Human Protein Atlas. (2024c) Dans RNF167 - Tissue expression. Récupéré le 2025, 10 juillet de <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108523-RNF167/tissue>.

Bajar BT, Wang ES, Lam AJ, Kim BB, Jacobs CL, Howe ES, Davidson MW, Lin MZ et Chu J (2016) Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting. *Sci Rep* 6: 20889.

Bao G, Tang M, Zhao J et Zhu X (2021) Nanobody: a promising toolkit for molecular imaging and disease therapy. *EJNMMI Res* 11: 6.

Beghein E et Gettemans J (2017) Nanobody Technology: A Versatile Toolkit for Microscopic Imaging, Protein-Protein Interaction Analysis, and Protein Function Exploration. *Front Immunol* 8: 771.

New England Biolabs. (2016) Dans What is the difference between BL21 and BL21(DE3) competent E. coli cells? Récupéré le 2025-07-18 de <https://www.neb.com/en-ca/faqs/2016/01/11/what-is-the-difference-between-bl21-and-bl21-de3-competent-e-coli-cells>.

Bobrovsky PA, Grafkaia EN, Kharlampieva DD, Manuvera VA et Lazarev VN (2024) Specific Activation of the Expression of Growth Factor Genes in Expi293F Human Cells Using CRISPR/Cas9-SAM Technology Increases Their Proliferation. *Acta Naturae* 16: 25-37.

Bocock JP, Carmicle S, Chhotani S, Ruffolo MR, Chu H et Erickson AH (2009) The PA-TM-RING protein RING finger protein 13 is an endosomal integral membrane E3 ubiquitin ligase whose RING finger domain is released to the cytoplasm by proteolysis. *FEBS J* 276: 1860-1877.

Bolognesi B et Lehner B (2018) Reaching the limit. *Elife* 7:

Bordeaux J, Welsh A, Agarwal S, Killiam E, Baquero M, Hanna J, Anagnostou V et Rimm D (2010) Antibody validation. *Biotechniques* 48: 197-209.

Buser DP, Schleicher KD, Prescianotto-Baschong C et Spiess M (2018) A versatile nanobody-based toolkit to analyze retrograde transport from the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: E6227-E6236.

Cai C, Tang YD, Zhai J et Zheng C (2022) The RING finger protein family in health and disease. *Signal Transduct Target Ther* 7: 300.

Chaganti LK, Venkatakrishnan N et Bose K (2018) An efficient method for FITC labelling of proteins using tandem affinity purification. *Biosci Rep* 38:

Chao S, Liu Y, Ding N, Lin Y, Wang Q, Tan J, Li W, Zheng Y, Hu X et Li J (2022) Highly Expressed Soluble Recombinant Anti-GFP VHHs in Escherichia coli via Optimized Signal Peptides, Strains, and Inducers. *Front Mol Biosci* 9: 848829.

Chasapis CT et Spyroulias GA (2009) RING finger E3 ubiquitin ligases: structure and drug discovery. *Curr Pharm Des* 15: 3716-3731.

Chen Y, Jiang Z, Yang Y, Zhang C, Liu H et Wan J (2023) The functions and mechanisms of post-translational modification in protein regulators of RNA methylation: Current status and future perspectives. *Int J Biol Macromol* 253: 126773.

Cloutier SM, Couty S, Tersikh A, Marguerat L, Crivelli V, Pugnieres M, Mani JC, Leisinger HJ, Mach JP et Deperthes D (2000) Streptabody, a high avidity molecule made by tetramerization of in vivo biotinylated, phage display-selected scFv fragments on streptavidin. *Mol Immunol* 37: 1067-1077.

Cong Y, Devoogdt N, Lambin P, Dubois LJ et Yaromina A (2024) Promising Diagnostic and Therapeutic Approaches Based on VHHs for Cancer Management. *Cancers (Basel)* 16:

Cooper GM (2000) *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Cormack BP, Valdivia RH et Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33-38.

Costa SJ, Almeida A, Castro A, Domingues L et Besir H (2013) The novel Fh8 and H fusion partners for soluble protein expression in *Escherichia coli*: a comparison with the traditional gene fusion technology. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 6779-6791.

Costantini LM, Balaban M, Markwardt ML, Rizzo MA, Guo F, Verkhusha VV et Snapp EL (2015) A palette of fluorescent proteins optimized for diverse cellular environments. *Nat Commun* 6: 7670.

de Beer MA et Giepmans BNG (2020) Nanobody-Based Probes for Subcellular Protein Identification and Visualization. *Front Cell Neurosci* 14: 573278.

de Beer MA, Kuipers J, van Bergen en Henegouwen PMP et Giepmans BNG (2018) A small protein probe for correlated microscopy of endogenous proteins. *Histochemistry and Cell Biology* 149: 261-268.

de Marco A (2020) Recombinant expression of nanobodies and nanobody-derived immunoreagents. *Protein Expr Purif* 172: 105645.

Deshar R, Moon S, Yoo W, Cho EB, Yoon SK et Yoon JB (2016) RNF167 targets Arl8B for degradation to regulate lysosome positioning and endocytic trafficking. *FEBS J* 283: 4583-4599.

Deyme L (2017) *Développement et caractérisation de VHH anti-transferrine*. Université d'Aix-Marseille,

Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, Meersman F, Heremans K, Frenken LG, Muyldermans S, Wyns L et Matagne A (2002) Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci* 11: 500-515.

- Dunkerley KM et Shaw GS (2017) RBR Ubiquitin Transfer: Not Simply an "Open" and "Closed" Case? *Structure* 25: 817-819.
- Emonts P, Avohou HT, Hubert P, Ziemons E, Fillet M et Dispas A (2021) Optimization of a robust and reliable FITC labeling process for CE-LIF analysis of pharmaceutical compounds using design of experiments strategy. *J Pharm Biomed Anal* 205: 114304.
- Erickson AH (2011) PA-TM-RING proteins: a new family of endosomal membrane proteins. *FEBS J* 278: 46.
- Fan X, Zhang R, Xu G, Fan P, Luo W, Cai C et Ge RL (2024) Role of ubiquitination in the occurrence and development of osteoporosis (Review). *Int J Mol Med* 54:
- Fekete S, Beck A, Veuthey JL et Guillaume D (2014) Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *J Pharm Biomed Anal* 101: 161-173.
- Finley D, Ulrich HD, Sommer T et Kaiser P (2012) The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 192: 319-360.
- (2025a) Dans R9NL8 - EGFP in FPbase. Récupéré le 2025, July 20 de <https://www.fpbse.org/protein/R9NL8/>.
- (2025b) Dans ZERB6 - mCherry in FPbase. Récupéré le 2025, July 20 de <https://www.fpbse.org/protein/mcherry/>.
- Francis DM et Page R (2010) Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 5*: 5.24.21–25.24.29.
- Geertsma ER, Groeneveld M, Slotboom DJ et Poolman B (2008) Quality control of overexpressed membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5722-5727.

GenScript (2010) *Glutathione Resin Cat. No. L00206 – Technical Manual No. TM0185 Version 07132010*.

Grosfeld EV, Beizer AY, Dergalev AA, Agaphonov MO et Alexandrov AI (2023) Fusion of Hsp70 to GFP Impairs Its Function and Causes Formation of Misfolded Protein Deposits under Mild Stress in Yeast. *Int J Mol Sci* 24:

Gu K, Song Z, Zhou C, Ma P, Li C, Lu Q, Liao Z, Huang Z, Tang Y, Li H, et al. (2022) Development of nanobody-horseradish peroxidase-based sandwich ELISA to detect Salmonella Enteritidis in milk and in vivo colonization in chicken. *J Nanobiotechnology* 20: 167.

Guan KL et Dixon JE (1991) Eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli: An improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Analytical Biochemistry* 192: 262-267.

Haissaguerre M et Cota D (2015) [Role of the mTOR pathway in the central regulation of energy balance]. *Biol Aujourd'hui* 209: 295-307.

Hammarstrom M, Woestenenk EA, Hellgren N, Hard T et Berglund H (2006) Effect of N-terminal solubility enhancing fusion proteins on yield of purified target protein. *J Struct Funct Genomics* 7: 1-14.

Harper S et Speicher DW (2011) Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol Biol* 681: 259-280.

Hartmann L, Botzanowski T, Galibert M, Jullian M, Chabrol E, Zeder-Lutz G, Kugler V, Stojko J, Strub JM, Ferry G, et al. (2019) VHH characterization. Comparison of recombinant with chemically synthesized anti-HER2 VHH. *Protein Sci* 28: 1865-1879.

Jackson SE, Craggs TD et Huang JR (2006) Understanding the folding of GFP using biophysical techniques. *Expert Rev Proteomics* 3: 545-559.

Jahn R et Scheller RH (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 631-643.

Jardine KC (2023) *The Role of RNF167 in Lysosomal Regulation within Neurons*. University of Otago, New Zealand.

Jin BK, Odongo S, Radwanska M et Magez S (2023) NANOBODIES(R): A Review of Diagnostic and Therapeutic Applications. *Int J Mol Sci* 24:

Jin X, Cheng H, Chen J et Zhu D (2011) RNF13: an emerging RING finger ubiquitin ligase important in cell proliferation. *FEBS J* 278: 78-84.

Jones MBaL, Chao Yan and Vasu, Sanjay and Cisneros, Isabel and Chiou, Henry and Zmuda, Jonathan F. (2021) Mammalian Transient Transfection System: Novel approach produces gram-per-liter expression levels of biologically active proteins. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 32:

Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Zidek A, Potapenko A, et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596: 583-589.

Karaman E, Eyupoglu AE, Mahmoudi Azar L et Uysal S (2023) Large-Scale Production of Anti-RNase A VHH Expressed in pyrG Auxotrophic *Aspergillus oryzae*. *Curr Issues Mol Biol* 45: 4778-4795.

Karlsson M, Zhang C, Mear L, Zhong W, Digre A, Katona B, Sjostedt E, Butler L, Odeberg J, Dusart P, et al. (2021) A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci Adv* 7:

Kassambara A (2023) *ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots*.

Keenan EK, Zachman DK et Hirschey MD (2021) Discovering the landscape of protein modifications. *Mol Cell* 81: 1868-1878.

Kim SY et Hakoshima T (2019) GST Pull-Down Assay to Measure Complex Formations. *Methods Mol Biol* 1893: 273-280.

- Kipriyanov SM, Little M, Kropshofer H, Breitling F, Gotter S et Dubel S (1996) Affinity enhancement of a recombinant antibody: formation of complexes with multiple valency by a single-chain Fv fragment-core streptavidin fusion. *Protein Eng* 9: 203-211.
- Kirley TL et Norman AB (2023) Characterization and optimization of fluorescein isothiocyanate labeling of humanized h2E2 anti-cocaine mAb. *Biochem Biophys Rep* 35: 101520.
- Komander D et Rape M (2012) The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 81: 203-229.
- Kong B et Guo GL (2014) Soluble expression of disulfide bond containing proteins FGF15 and FGF19 in the cytoplasm of Escherichia coli. *PLoS One* 9: e85890.
- Kramberger-Kaplan L, Austerlitz T et Bohlmann H (2020) Positive Selection of Specific Antibodies Produced against Fusion Proteins. *Methods Protoc* 3:
- Lafaye C (2009) *Biochemical and Structural Study of DsbA1, DsbA2 and DsbA3, the three homologues of the Thiol–Disulfide Oxidoreductase DsbA in Neisseria meningitidis*
- Etudes Biochimique et Structurale de DsbA1, DsbA2 et DsbA3 : les trois homologues à l'oxydoréductase de Thiol-disulfure DsbA chez Neisseria meningitidis*. Université Joseph-Fourier - Grenoble I,
- Landgraf D, Okumus B, Chien P, Baker TA et Paulsson J (2012) Segregation of molecules at cell division reveals native protein localization. *Nat Methods* 9: 480-482.
- Lantz L, Holmes K et Douagi I (2023) Conjugation of Fluorochromes to Monoclonal Antibodies. *Curr Protoc* 3: e795.
- Li S, Hoefnagel SJM et Krishnadath KK (2023) Single domain Camelid antibody fragments for molecular imaging and therapy of cancer. *Front Oncol* 13: 1257175.

- Li T, Wang X, Ju E, da Silva SR, Chen L, Zhang X, Wei S et Gao SJ (2021) RNF167 activates mTORC1 and promotes tumorigenesis by targeting CASTOR1 for ubiquitination and degradation. *Nat Commun* 12: 1055.
- Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA, Orth A, Chanda SK, Batalov S et Joazeiro CA (2008) Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* 3: e1487.
- Lin H, Li S et Shu HB (2019) The Membrane-Associated MARCH E3 Ligase Family: Emerging Roles in Immune Regulation. *Front Immunol* 10: 1751.
- Lu J et Holmgren A (2014) The thioredoxin superfamily in oxidative protein folding. *Antioxid Redox Signal* 21: 457-470.
- Luo X et Hofmann K (2001) The protease-associated domain: a homology domain associated with multiple classes of proteases. *Trends in Biochemical Sciences* 26: 147-148.
- Lussier MP, Herring BE, Nasu-Nishimura Y, Neutzner A, Karbowski M, Youle RJ, Nicoll RA et Roche KW (2012) Ubiquitin ligase RNF167 regulates AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 19426-19431.
- Mahmoudian J, Hadavi R, Jeddi-Tehrani M, Mahmoudi AR, Bayat AA, Shaban E, Vafakhah M, Darzi M, Tarahomi M et Ghods R (2011) Comparison of the Photobleaching and Photostability Traits of Alexa Fluor 568- and Fluorescein Isothiocyanate- conjugated Antibody. *Cell J* 13: 169-172.
- Maltseva M, Rossotti MA, Tanha J et Langlois MA (2025) Characterization of Nanobody Binding to Distinct Regions of the SARS-CoV-2 Spike Protein by Flow Virometry. *Viruses* 17:
- McClellan AJ, Laugesen SH et Ellgaard L (2019) Cellular functions and molecular mechanisms of non-lysine ubiquitination. *Open Biol* 9: 190147.

Dans Troubleshooting strategies in GST-tagged protein purification. Récupéré le 2024, 15 Janvier de https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-purification/troubleshooting-strategies-in-purification?srsId=AfmBOor9Aod_FL9CgB55HdrcbP2RtKW7Xj_dPX3KkaU0eXtzweol1Rs2.

Morris R, Black KA et Stollar EJ (2022) Uncovering protein function: from classification to complexes. *Essays Biochem* 66: 255-285.

Muller MM (2018) Post-Translational Modifications of Protein Backbones: Unique Functions, Mechanisms, and Challenges. *Biochemistry* 57: 177-185.

Nair SV, Narendradev ND, Nambiar RP, Kumar R et Srinivasula SM (2020) Naturally occurring and tumor-associated variants of RNF167 promote lysosomal exocytosis and plasma membrane resealing. *J Cell Sci* 133:

Nguyen LK, Dobrzynski M, Fey D et Kholodenko BN (2014) Polyubiquitin chain assembly and organization determine the dynamics of protein activation and degradation. *Front Physiol* 5: 4.

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

Oka OB et Bulleid NJ (2013) Forming disulfides in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1833: 2425-2429.

Owji H, Nezafat N, Negahdaripour M, Hajiebrahimi A et Ghasemi Y (2018) A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. *Eur J Cell Biol* 97: 422-441.

Ozkaynak E, Finley D, Solomon MJ et Varshavsky A (1987) The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J* 6: 1429-1439.

Peters T, Jr.; Davidson, L. K. (1982) The biosynthesis of rat serum albumin. In vivo studies on the formation of the disulfide bonds. *The Journal of Biological Chemistry* 257: 8847–8853.

Platta HW et Stenmark H (2011) Endocytosis and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 23: 393-403.

Ramazi S et Zahiri J (2021) Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database (Oxford)* 2021:

Raran-Kurussi S, Cherry S, Zhang D et Waugh DS (2017) Removal of Affinity Tags with TEV Protease. *Methods Mol Biol* 1586: 221-230.

Rashidian M, Wang L, Edens JG, Jacobsen JT, Hossain I, Wang Q, Victora GD, Vasdev N, Ploegh H et Liang SH (2015) Enzyme - Mediated Modification of Single - Domain Antibodies for Imaging Modalities with Different Characteristics. *Angewandte Chemie International Edition* 55: 528-533.

Reiter KH et Klevit RE (2018) Characterization of RING-Between-RING E3 Ubiquitin Transfer Mechanisms. *Methods Mol Biol* 1844: 3-17.

Romei MG et Boxer SG (2019) Split Green Fluorescent Proteins: Scope, Limitations, and Outlook. *Annu Rev Biophys* 48: 19-44.

Roovers RC, Vosjan MJ, Laeremans T, el Khoulati R, de Bruin RC, Ferguson KM, Verkleij AJ, van Dongen GA et van Bergen en Henegouwen PM (2011) A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth. *Int J Cancer* 129: 2013-2024.

Rosano GL et Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Front Microbiol* 5: 172.

Rothbauer U, Zolghadr K, Muyldermans S, Schepers A, Cardoso MC et Leonhardt H (2008) A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol Cell Proteomics* 7: 282-289.

Sandomenico A, Sivaccumar JP et Ruvo M (2020) Evolution of Escherichia coli Expression System in Producing Antibody Recombinant Fragments. *Int J Mol Sci* 21:

Schafer F, Seip N, Maertens B, Block H et Kubicek J (2015) Purification of GST-Tagged Proteins. *Methods Enzymol* 559: 127-139.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9: 676-682.

Schrodinger, LLC (2015) *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3*.

Schulman BA et Harper JW (2009) Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 319-331.

Schwinn MK, Steffen LS, Zimmerman K, Wood KV et Machleidt T (2020) A Simple and Scalable Strategy for Analysis of Endogenous Protein Dynamics. *Sci Rep* 10: 8953.

Scott CC, Vacca F et Gruenberg J (2014) Endosome maturation, transport and functions. *Semin Cell Dev Biol* 31: 2-10.

Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE et Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22: 1567-1572.

Shao S et Hegde RS (2011) Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 25-56.

Shu X, Shaner NC, Yarbrough CA, Tsien RY et Remington SJ (2006) Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry* 45: 9639-9647.

Siepe DH, Picton LK et Garcia KC (2023) Receptor Elimination by E3 Ubiquitin Ligase Recruitment (REULR): A Targeted Protein Degradation Toolbox. *ACS Synth Biol* 12: 1081-1093.

- Siontorou CG (2013) Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. *Int J Nanomedicine* 8: 4215-4227.
- Smith DB et Johnson KS (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31-40.
- Spratt DE, Walden H et Shaw GS (2014) RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions. *Biochem J* 458: 421-437.
- Spriestersbach A, Kubicek J, Schafer F, Block H et Maertens B (2015) Purification of His-Tagged Proteins. *Methods Enzymol* 559: 1-15.
- Swint-Kruse L et Matthews KS (2004) lac Operon. Dans *Encyclopedia of Biological Chemistry*. William JL et Lane MD, eds. Elsevier. New York.
- Takai H, Kato A, Nakamura T, Tachibana T, Sakurai T, Nanami M et Suzuki M (2011) The importance of characterization of FITC-labeled antibodies used in tissue cross-reactivity studies. *Acta Histochem* 113: 472-476.
- Thul PJ, Akesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, Alm T, Asplund A, Bjork L, Breckels LM, et al. (2017) A subcellular map of the human proteome. *Science* 356:
- Townsend DM, Manevich Y, He L, Hutchens S, Pazoles CJ et Tew KD (2009) Novel role for glutathione S-transferase pi. Regulator of protein S-Glutathionylation following oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem* 284: 436-445.
- Traenkle B et Rothbauer U (2017) Under the Microscope: Single-Domain Antibodies for Live-Cell Imaging and Super-Resolution Microscopy. *Front Immunol* 8: 1030.
- UniProt. (2024) Dans RNF167 – Sequences and isoforms. Récupéré le 2025, July 10 de <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9H6Y7/entry#function>.

- van Dijk JR, Yamazaki Y et Palmer RH (2014) Tumour-associated mutations of PA-TM-RING ubiquitin ligases RNF167/RNF13 identify the PA domain as a determinant for endosomal localization. *Biochem J* 459: 27-36.
- Waldo GS, Standish BM, Berendzen J et Terwilliger TC (1999) Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 17: 691-695.
- Wang D, Xu C, Yang W, Chen J, Ou Y, Guan Y, Guan J et Liu Y (2022) E3 ligase RNF167 and deubiquitinase STAMBPL1 modulate mTOR and cancer progression. *Mol Cell* 82: 770-784 e779.
- Wang YC, Peterson SE et Loring JF (2014) Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Res* 24: 143-160.
- Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan L, François R, Grolemond G, Hayes A, Henry L, Hester J, et al. (2019) Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software* 4:
- Yamazaki Y, Schonherr C, Varshney GK, Dogru M, Hallberg B et Palmer RH (2013) Goliath family E3 ligases regulate the recycling endosome pathway via VAMP3 ubiquitylation. *EMBO J* 32: 524-537.
- Yang C et Wang X (2021) Lysosome biogenesis: Regulation and functions. *J Cell Biol* 220:
- Yu J, Li J, Shen A, Liu Z et He TS (2024) E3 ubiquitin ligase RNF128 negatively regulates the IL-3/STAT5 signaling pathway by facilitating K27-linked polyubiquitination of IL-3Ralpha. *Cell Commun Signal* 22: 254.
- Zhang Z, Kuipers G, Niemiec L, Baumgarten T, Slotboom DJ, de Gier JW et Hjelm A (2015) High-level production of membrane proteins in E. coli BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG. *Microb Cell Fact* 14: 142.
- Zhong Q, Xiao X, Qiu Y, Xu Z, Chen C, Chong B, Zhao X, Hai S, Li S, An Z et Dai L (2023) Protein posttranslational modifications in health and diseases: Functions, regulatory mechanisms, and therapeutic implications. *MedComm* (2020) 4: e261.