

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Redirection chimiotactique des neutrophiles
pour l'immunothérapie du cancer**

Par
Geneviève Robitaille

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.) en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

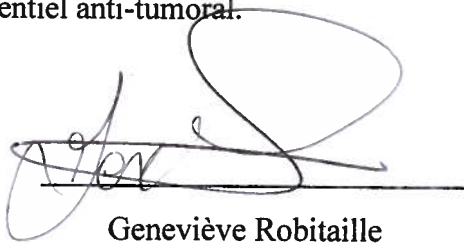
Examineur interne
Examineur externe
Directeur de recherche

François Shareck, INRS-Institut Armand-Frappier
Benoît Leblanc, Université de Sherbrooke
François Denis, INRS-Institut Armand-Frappier

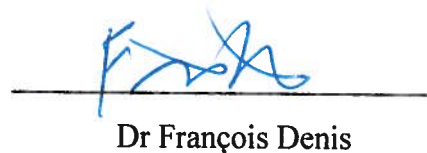
RÉSUMÉ

L'usage des neutrophiles pour l'immunothérapie du cancer est une avenue prometteuse qui est par contre peu explorée. Puisque les neutrophiles possèdent une puissante activité cytotoxique, leur recrutement à des cellules cancéreuses pourrait avoir un potentiel anti-tumoral qui serait plus spécifique que les traitements conventionnels comme la chimiothérapie ou la radiothérapie.

Il a été démontré lors de ce projet que la surexpression d'une protéine étrangère en bactéries permettait de produire des protéines majoritairement formylées. La production de protéines toxiques en bactéries nécessite par contre l'utilisation d'un système d'expression permettant d'exercer un contrôle hautement régulé de la transcription. Plusieurs souches d'expression bactériennes ont été évaluées et seules les BL21-SI et les Top10 F' se sont avérées permissives à la production de protéines toxiques. La souche bactérienne permettant de produire de manière cytoplasmique des scFvs fonctionnels utilise le promoteur *lac* qui est hautement fuyant. La forte toxicité observée lors de l'expression en bactéries de scFvs a démontré que cette souche bactérienne ne pourrait être utilisée. Afin de pallier aux problèmes associés à la production de scFvs formylés fonctionnels en bactéries, l'anticorps anti-CEA T84.66 a été conjugué chimiquement à un peptide synthétique formylé. Des analyses en cytométrie en flux et des tests de chimotactie ont permis de démontrer que les protéines formylées produites en bactéries ou par conjugaison chimique possédaient une forte activité biologique et pourraient être utilisées comme agents chimiotactiques. Certaines analyses restent à faire afin de terminer la validation du modèle *in vitro*. Les molécules générées au cours de ce projet de recherche pourront par la suite être utilisées dans des modèles *in vivo* afin d'évaluer leur potentiel anti-tumoral.



Geneviève Robitaille



Dr François Denis

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr François Denis, pour m'avoir offert la possibilité de réaliser cette maîtrise au sein de son équipe et de m'avoir guidée tout au long de ce projet. Il en est de même pour tous les membres du laboratoire qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet.

Merci à Sylvie Larocque, Louis de Léséleuc et Véronique Allard pour leur support technique ainsi que pour leurs encouragements.

Un merci particulier à Martin Giroux pour son aide et ses précieux conseils en chimiotactie et en cytofluorométrie.

Merci à Manon Lépine pour avoir donné de son temps et de son expertise.

Merci à François Lépine pour son expertise en spectrométrie de masse.

Merci à François Shareck qui a toujours été là pour me proposer et me conseiller des nouvelles techniques.

Je voudrais aussi saluer toute la communauté étudiante de l'IAF. Cela a été un plaisir de collaborer avec eux et de les côtoyer au cours de ces deux dernières années.

Il aurait été impossible de poursuivre mes études graduées sans le soutien financier offert par la Fondation Armand-Frappier, l'INRS, et le Dr Denis.

Les derniers mais non les moindres, j'aimerais exprimer toute ma gratitude ainsi que mes remerciements les plus sincères à tous les membres de ma famille ainsi qu'à mes amis qui me supportent et m'encouragent depuis toutes ces années. Vous avez tous et chacun participé à la réalisation de ce projet. Vous serez toujours pour moi, le soutien le plus important.

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1. Aspect cellulaire des neutrophiles | 6 |
| Figure 2. Cycle de la méthionine bactérien | 8 |
| Figure 3. Structure de la Mucine-1 normale et mutante | 10 |
| Figure 4. Structure d'un anticorps par rapport à un scFv | 11 |
| Figure 5. Structure moléculaire de la GFP..... | 14 |
| Figure 6. Séquence de la GFP5 utilisée | 15 |
| Figure 7. Représentation graphique du vecteur pRSETC..... | 19 |
| Figure 8. Représentation graphique du vecteur pCR4Blunt-TOPO | 19 |
| Figure 9. Représentation schématique de la mutagenèse dirigée par PCR..... | 21 |
| Figure 10. Représentation schématique des vecteurs bicistroniques | 35 |
| Figure 11. Effet de l'expression de la GFP5 sur la croissance bactérienne | 35 |
| Figure 12. Effet de l'expression de la déformylase sur la croissance bactérienne | 36 |
| Figure 13. Effet de l'inhibition de la déformylase sur la croissance bactérienne | 36 |
| Figure 14. Expression de la GFP en présence de déformylase sens ou antisens | 37 |
| Figure 15. Croissance des BL21-SI transformées avec le vecteur pRSETC-GFP | 38 |
| Figure 16. Expression relative de la GFP chez les BL21-SI..... | 39 |
| Figure 17. Analyse par gel SDS-PAGE de 12 % de la GFP formylée | 40 |
| Figure 18. Profil en spectrométrie de masse de la GFP purifiée | 40 |
| Figure 19. Migration de neutrophiles induite par la GFP formylée..... | 41 |
| Figure 20. Liaison de la GFP formylée aux neutrophiles | 42 |
| Figure 21. Analyse SDS-PAGE de l'expression de déformylase | 43 |
| Figure 22. Régions 5' de la déformylase et sa version améliorée | 44 |
| Figure 23. Séquence des oligonucléotides contenant le motif MLF..... | 45 |
| Figure 24. Séquence de la charnière pour clonage de scFvs..... | 46 |
| Figure 25. Mutations chez le scFv C595 parental et de ronde 1 | 48 |
| Figure 26. Mutations chez le scFv C595 de ronde 2 et 3..... | 50 |
| Figure 27. Analyse de l'anticorps T84.66 purifié par SDS-PAGE 8% | 52 |
| Figure 28. Séquence du peptide synthétique utilisé..... | 53 |
| Figure 29. Analyse de la conjugaison de T84.66 par SDS-PAGE 10% | 53 |
| Figure 30. Spécificité antigénique de l'anticorps T84.66 conjugué | 54 |
| Figure 31. Migration induite par l'anticorps T84.66 formylé..... | 55 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau I. Génotype des souches bactériennes utilisées..... | 16 |
| Tableau II. Composition des tampons enzymatiques utilisés | 17 |
| Tableau III. Composition des milieux et tampons utilisés..... | 17 |
| Tableau IV. Séquences des amorces utilisées..... | 18 |

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----|
| REMERCIEMENTS..... | iii |
| LISTE DES FIGURES | iv |
| TABLE DES MATIÈRES | vi |
| INTRODUCTION | 1 |
| 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 3 |
| 1.1 Le cancer..... | 3 |
| 1.2 Immunothérapie..... | 4 |
| 1.3 Cytotoxicité des neutrophiles | 5 |
| 1.4 Chimiotactisme et peptides formylés | 7 |
| 1.5 Ciblage des cellules tumorales | 9 |
| 1.6 Les anticorps simple-chaîne | 10 |
| 1.7 Systèmes d'expression bactériens | 12 |
| 1.8 La GFP en tant que protéine modèle | 14 |
| 2. APPROCHE EXPÉRIMENTALE..... | 16 |
| 2.1 Bactéries, tampons, oligonucléotides et vecteurs utilisés..... | 16 |
| 2.1.1 Souches bactériennes | 16 |
| 2.1.2 Tampons..... | 17 |
| 2.1.3 Oligonucléotides | 18 |
| 2.1.4 Vecteurs | 19 |
| 2.2 Clonage d'acides nucléiques | 20 |
| 2.2.1 Extraction d'ADN génomique bactérien | 20 |
| 2.2.2 Production d'ADN complémentaire | 20 |
| 2.2.4 Amplification et mutagénèse par PCR..... | 21 |
| 2.2.5 Manipulations d'extrémités d'ADN | 22 |
| 2.2.6 Purification et quantification d'ADN..... | 22 |
| 2.2.7 Ligation d'ADN | 23 |
| 2.2.8 Transformation bactérienne | 24 |
| 2.2.9 Analyse des plasmides recombinants..... | 25 |
| 2.2.10 Séquençage d'ADN | 26 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.3 | Manipulations de protéines..... | 27 |
| 2.3.1 | Production et purification de GFP recombinante..... | 27 |
| 2.3.2 | Production et purification d'anticorps | 28 |
| 2.3.3 | Dosage de protéines | 29 |
| 2.3.4 | Conjugaison chimique d'anticorps | 29 |
| 2.3.5 | Analyse par SDS-PAGE | 30 |
| 2.4 | Culture cellulaire et tests de chimiotactie..... | 31 |
| 2.4.1 | Analyse par cytométrie en flux | 31 |
| 2.4.2 | Purification de neutrophiles | 32 |
| 2.4.3 | Migration en chambre de Boyden..... | 32 |
| 3. | RÉSULTATS..... | 34 |
| 3.1 | Construction d'un système d'inhibition transitoire de la déformylase..... | 34 |
| 3.2 | Production et purification de protéines formylées en bactéries..... | 35 |
| 3.3 | Évaluation de l'activité biologique de la GFP formylée | 41 |
| 3.4 | Optimisation du système de déformylation en bactéries | 42 |
| 3.5 | Optimisation du substrat chimiotactique | 44 |
| 3.6 | Introduction d'une charnière pour l'expression de scFvs..... | 46 |
| 3.7 | Clonage du scFv C595 anti-MUC-1 | 47 |
| 3.8 | Clonage du scFv T84.66 anti-CEA | 51 |
| 3.9 | Conjugaison chimique de l'anticorps T84.66..... | 52 |
| 3.10 | Évaluation de l'activité biologique de l'anticorps conjugué | 54 |
| 4. | DISCUSSION..... | 56 |
| 4.1 | Production de protéines formylées en bactéries | 56 |
| 4.2 | Génération de scFvs intra-cellulaires | 58 |
| 4.3 | Production d'anticorps formylés par conjugaison chimique | 61 |
| 5. | CONCLUSION..... | 64 |
| 6. | BIBLIOGRAPHIE..... | 66 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|--------------|--|
| AcMo | Anticorps monoclonal |
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| ADNc | Acide Désoxyribonucléique complémentaire |
| AMPc | Adénosine 5'-monophosphate cyclique |
| ARN | Acide Ribonucléique |
| ARNm | Acide Ribonucléique messenger |
| ARNt | Acide Ribonucléique de transfert |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adénosine Triphosphate |
| BSA | Albumine Sérique Bovine |
| CAP | Protéine activatrice des catabolites |
| CD | Cluster of differentiation |
| CEA | Antigène carcinoembryonnaire |
| CIP | Phosphatase alcaline d'intestin de veau |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| dNTPs | Désoxyribonucléotides Triphosphates |
| DTT | Dithiothréitol |
| EDTA | Acide Éthylènediaminetétraacétique |
| FACS | Trieur de cellules activé par fluorescence |
| fMLP | formyl-Methionine-Leucine-Phénylalanine |
| FPR | Récepteur de peptides formylés |
| FMT | Formyltransférase |
| GFP | Protéine fluorescente verte |
| Ig | Immunoglobuline |
| IPTG | Isopropyl β -D-thiogalactoside |
| kDa | Kilodalton |
| LB | Luria Broth |
| LBP | Protéine de liaison aux LPS |
| LNH | Lymphome Non-Hodgkinien |
| LPS | Lipopolysaccharide |

| | |
|------------------|--|
| MACS | Trieur de cellules magnétique |
| MAP | Aminopeptidase |
| MCS | Site de clonage multiple |
| min | Minutes |
| MMP-8 | Metalloprotéinase-8 de matrice |
| MUC-1 | Mucine-1 |
| MOPS | Acide 3-N-morpholinopropane sulfonique |
| NEB | New England Biolabs |
| NHS-ester | N-Hydroxysuccinimide ester |
| pb | Nombres de paires de bases |
| PBS | Tampon Phosphate Salin |
| PCR | Réaction de polymérisation en chaîne |
| PDF | Peptide déformylase |
| PMN | Cellule polymorphonucléaire |
| pmole | picomoles |
| psi | Livres par pouce carré |
| PVDF | Difluorure de Polyvinylidène |
| RBS | Site de liaison aux ribosomes |
| rpm | Révolutions par minute |
| scFv | Anticorps simple chaîne |
| SDS | Dodécylsulfate de Sodium |
| SVF | Sérum de veau Foetal |
| T4 PNK | Polynucléotide Kinase du phage T4 |
| TAE | Tampon Tris-Acétate-EDTA |
| TBE | Tampon Tris-Borate-EDTA |
| TBS | Tampon Tris-Salin |
| TBST | Tampon Tris-Salin-Tween |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetraméthyléthylènediamine |
| VNTR | Nombre variable de répétitions en tandem |

INTRODUCTION

Le but de la recherche visait à développer une nouvelle approche d'immunothérapie contre le cancer afin de stimuler une réponse anti-tumorale plus spécifique que les traitements comme la chimiothérapie et la radiothérapie. Il a été démontré que l'expression de chimiokines par des cellules cancéreuses pouvait induire une infiltration de neutrophiles et leur destruction subséquente. Ceci suggère que des tumeurs peuvent être éradiquées en induisant l'infiltration sélective de neutrophiles. Parmi les chimiokines pouvant recruter les neutrophiles, le tripeptide fMLP dont la Méthionine en position N-terminale possède un groupement formate est l'un des plus puissants. Ainsi, s'il était possible de cibler des protéines formylées à des cellules cancéreuses, celles-ci seraient éliminées grâce à l'activité cytotoxique naturelle des neutrophiles. Afin de cibler des cellules cancéreuses, les molécules MUC-1 et CEA ont été choisies comme cibles puisqu'elles sont surexprimées dans plusieurs types de cancers. Ainsi, les cellules cancéreuses seront ciblées grâce à des anticorps simple-chaîne (scFv) spécifiques à MUC-1 et CEA dont la méthionine N-terminale serait formylée. Puisque la majorité des protéines bactériennes perdent leur groupement formate de façon post-ou co-translationnelle, il apparaissait nécessaire d'inhiber l'activité de déformylation. Puisque la délétion du gène de la déformylase est létale, un système d'inhibition transitoire par expression d'ARN anti-sens a été mis au point.

L'approche choisie consistait à générer des molécules de ciblage qui étaient spécifiques aux cellules cancéreuses et qui possédaient un groupement formate N-terminal. La première partie du projet visait à démontrer qu'une protéine entière produite en bactéries pouvait être formylée et biologiquement active. Pour ce faire, un gène rapporteur a été cloné dans un système d'expression bicistronique contenant le promoteur de l'ARN polymérase du phage T7. La protéine fluorescente verte (GFP) a été clonée dans un système où la déformylase anti-sens était surexprimée de manière à générer des protéines formylées, ainsi que dans un système de surexpression de la déformylase afin de produire des protéines déformylées.

Ces constructions ont été transformées dans différentes souches bactériennes, soit les BL21[DE3] pLysS et les BL21-SI. Parmi ces deux systèmes d'expression, seule la

souche bactérienne BL21-SI a permis de produire une grande quantité de protéines sans toxicité apparente. La souche BL21[DE3] pLysS utilise le système *lac* pour l'expression de l'ARN polymérase du bactériophage T7, un système fuyant qui n'a pas permis de produire des protéines toxiques, même en utilisant la répression catabolique. De par la toxicité associée à la surexpression de l'ARN anti-sens de la déformylase, l'utilisation de cette souche bactérienne semble être contre-indiquée. Afin de produire des protéines toxiques, il a été nécessaire d'utiliser une souche bactérienne permettant d'exercer un contrôle beaucoup plus efficace du taux d'expression en absence d'inducteurs. Afin de démontrer formellement la présence du groupement formate à l'extrémité N-terminale, la GFP produite en BL21-SI a été purifiée par chromatographie d'affinité et analysée par spectrométrie de masse. Ayant démontré la présence du groupement formate, le pouvoir chimiotactique de la GFP formylée envers les neutrophiles a été évalué en chambre de Boyden modifiée.

La production de scFvs formylés et fonctionnels en bactéries nécessite deux exigences. Les scFvs doivent être produits dans un environnement oxydatif nécessaire à la formation des ponts disulfures intra-chaîne. Par contre, pour conserver le groupement formate à l'extrémité N-terminale des scFvs, ceux-ci doivent être produits dans le cytosol puisque le peptide signal nécessaire à l'expression périplasmique est clivé lors du passage à la membrane. Le cytosol bactérien est un environnement réducteur qui ne permet pas la formation de ponts disulfures nécessaires à la formation de scFvs fonctionnels. Certaines souches bactériennes telles les ORIGAMI B [DE3] permettent la formation de ponts disulfures cytoplasmiques, mais cette souche bactérienne utilise le promoteur *lac* qui ne permet pas de produire de protéines toxiques.

Afin de pallier aux problèmes engendrés par la production en bactéries de scFvs formylés fonctionnels, une approche alternative a été mise au point qui consistait à formyler chimiquement un anticorps. L'anticorps anti-CEA T84.66 a été conjugué à un peptide synthétique contenant le motif MLF en N-terminal à l'aide d'un agent de pontage hétéro-bifonctionnel. L'activité biologique de l'anticorps formylé a été évaluée par des tests de chimiotactie en chambre de Boyden modifiée, et il a été démontré que celui-ci avait la capacité d'induire le recrutement de neutrophiles.

1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Le cancer

Le cancer est la deuxième cause de mortalité en Amérique du nord après les maladies cardio-vasculaires. Au Canada, il est la principale cause de décès prématuré et 41 % des hommes et 38 % des femmes sont susceptibles d'être atteints du cancer. Chaque semaine, 2,690 Canadiens et Canadiennes recevront un diagnostic de cancer et près de la moitié mourront des suites de la maladie. Les cancers du sein et de la prostate demeurent les deux types de cancer les plus diagnostiqués. Le cancer du poumon est la première cause de mortalité, tandis que le cancer colorectal se situe au second rang. Bien qu'environ la moitié des personnes traitées par la médecine conventionnelle survivent à la maladie (tous cancers confondus) et peuvent mener une vie normale, 50 % en décéderont, souvent à cause des effets secondaires associés aux traitements médicaux. Malgré la légère baisse de l'incidence et de la mortalité observée ces dernières années, le pronostic demeure sombre. Pour pallier à ceci, des approches thérapeutiques alternatives sont sous étude, mais ces voies demeurent encore peu exploitées (*Statistiques canadiennes sur le cancer 2003, Société Canadienne du cancer*).

Pour lutter contre le cancer, la médecine actuelle utilise différentes armes qui ont chacune des effets secondaires négatifs. Les trois types de traitement traditionnels sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Les médicaments utilisés en chimiothérapie tuent indistinctement les cellules qui se multiplient rapidement, parmi lesquelles comptent les cellules tumorales. Les cellules saines se reproduisant rapidement sont aussi affectées par ces agents cytotoxiques. Il s'agit surtout des cellules recouvrant l'intérieur du tube digestif, les cellules des follicules pileux de la peau, ainsi que les cellules de la moelle osseuse. Puisque ce traitement ne s'attaque pas exclusivement aux cellules cancéreuses, il est souvent mal toléré et cause plusieurs effets secondaires tels le vomissement, la perte de cheveux et une baisse du nombre de globules blancs et de plaquettes sanguines, augmentant ainsi les risques d'infection et de saignement [101; 126]. La radiothérapie consiste à irradier la tumeur à l'aide de rayons X, de rayons gamma ou d'électrons. Ces rayons affectent principalement les cellules en division en causant des dommages à l'ADN, ce qui bloque leur division cellulaire. Bien qu'efficace,

ce traitement possède des effets secondaires puisque le rayonnement est difficile à cibler et peut affecter les cellules saines, provoquant des brûlures au niveau des zones irradiées [109]. La chirurgie vise d'abord à éliminer une masse tumorale primaire, un traitement qui est efficace si un diagnostic précoce peut être établi. Lorsque des métastases sont présentes, le traitement demeure palliatif et vise essentiellement à soulager la douleur. Dans le cancer du sein, lorsque la tumeur primaire est volumineuse, l'ablation totale préventive engendre aussi des traumatismes psychologiques chez les personnes atteintes [28]. Puisque les thérapies conventionnelles comportent plusieurs limites, surtout dans le cas du cancer métastatique, des approches alternatives comme l'immunothérapie sont sous étude.

1.2 Immunothérapie

Le système immunitaire possède une capacité naturelle d'éliminer les cellules cancéreuses et l'immunothérapie consiste à stimuler les mécanismes de défense innés de l'organisme. Ceci permet de réduire la toxicité associée aux traitements conventionnels et augmente la spécificité de la thérapie. L'usage d'anticorps monoclonaux (AcMo) est une forme d'immunothérapie utilisée pour traiter les lymphomes et autres cancers. Les AcMo possèdent une spécificité unique envers un antigène donné et sont habituellement produits chez la souris. Ceux-ci ont l'inconvénient de pouvoir déclencher une réaction immunitaire contre ces protéines de souris, ce qui a mené au développement d'anticorps humanisés. Les anticorps humanisés sont des immunoglobulines humaines sur lesquelles les régions hyper-variables impliquées dans la reconnaissance antigénique ont été greffées [46]. Les AcMo reconnaissent des épitopes propres aux cellules tumorales et peuvent agir par lyse cellulaire via l'activation du complément et par cytotoxicité dépendante des anticorps [46]. De par leur capacité de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses, les AcMo représentent une arme unique pour la thérapie du cancer.

Quatre anticorps monoclonaux ont été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) pour fins thérapeutiques, la majorité étant des anticorps humanisés. Les succès du Rituximab (anti-CD20) pour le traitement du lymphome [34] et du Trastuzumab (anti-HER2) pour le cancer du sein [21] ont ouvert la voie au développement de nouveaux anticorps thérapeutiques. Le Rituximab (Mabthera, Roche) est le premier AcMo à avoir

été approuvé par la FDA et est l'anticorps monoclonal le plus utilisé. Cet anticorps humanisé est dirigé contre l'antigène CD20 qui est fortement exprimé à la surface des lymphomes B non-Hodgkiniens (LNH). Son utilisation en monothérapie pour le traitement du LNH a été étendue à d'autres lymphomes en combinaison à la chimiothérapie [52; 66]. Le Trastuzumab (Herceptin, Roche) est un AcMo utilisé dans le traitement du cancer du sein métastatique. Cet anticorps se lie au récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) exprimé par les cellules tumorales. Tout comme le Rituximab, il est utilisé en monothérapie ou en association avec la chimiothérapie [21; 26; 122]. D'autres AcMo reconnaissant le CD25 comme le Daclizumab (Zénapax, Roche) [2] et le Basiliximab (Simultec, Novartis) [100] sont utilisés en tant qu'immunosuppresseurs pour contrer le rejet de greffes, notamment dans la transplantation de reins [4]. Une autre approche consiste à faire des fusions génétiques entre un anticorps et des toxines comme la toxine diphtérique ou la ricine pour tuer les cellules tumorales [27; 54]. Alternativement, des immunoconjugués peuvent être préparés chimiquement pour coupler les AcMo à des substances radioactives pour imagerie médicale ou immunothérapie. Le CEA-Scan (Immunomedics) est un anticorps dirigé contre l'antigène tumoral carcino-embryonnaire (CEA) qui, lorsque conjugué au Technétium 99, est utilisé pour l'imagerie du cancer colorectal métastatique ou du cancer du rectum [33]. Les AcMo couplés à l'Yttrium 90 permettent d'effectuer une radiothérapie beaucoup plus ciblée [23; 128]. Finalement, des agents capables de stimuler le système immunitaire telles des cytokines comme IL-2 [64] ou l'exotoxine de *Pseudomonas* [81] peuvent aussi être adjoints aux AcMo.

1.3 Cytotoxicité des neutrophiles

Les AcMo thérapeutiques décrits ci-dessus agissent via la signalisation qu'ils induisent en interagissant avec le récepteur reconnu par l'anticorps ou servent de vecteurs pour l'accumulation de molécules toxiques au niveau des tumeurs. Une approche alternative consiste à induire le recrutement de leucocytes vers les cellules cancéreuses en utilisant des chimiokines. Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants du sang périphérique, représentant de 50 à 75% des leucocytes, mais sont normalement absents des tissus [46]. Les neutrophiles jouent un rôle primordial dans la défense contre les micro-organismes car ils sont les premiers à être recrutés au site d'infection. Leur activité

anti-microbienne dépend de la libération d'un cocktail toxique de radicaux oxygénés, de protéases et de peptides anti-microbiens [127]. Outre ces produits bactéricides, ils sécrètent plusieurs molécules qui induisent le recrutement de cellules de l'immunité adaptative [12]. De part leur puissante activité cytotoxique, le recrutement de neutrophiles vers des cellules cancéreuses pourrait avoir un potentiel anti-tumoral. Plusieurs évidences expérimentales ont démontré que l'expression de chimiokines par des cellules cancéreuses induisait leur rejet dans des modèles *in vivo* [11; 19; 20; 31; 39; 58; 113]. L'expression forcée de la molécule FasL chez des cellules tumorales ou des greffes mène à une inflammation médiée par les neutrophiles et la destruction subséquente de ces tissus [49; 50; 70; 77; 99; 103]. L'usage des neutrophiles en immunothérapie du cancer demeure cependant encore peu exploité.

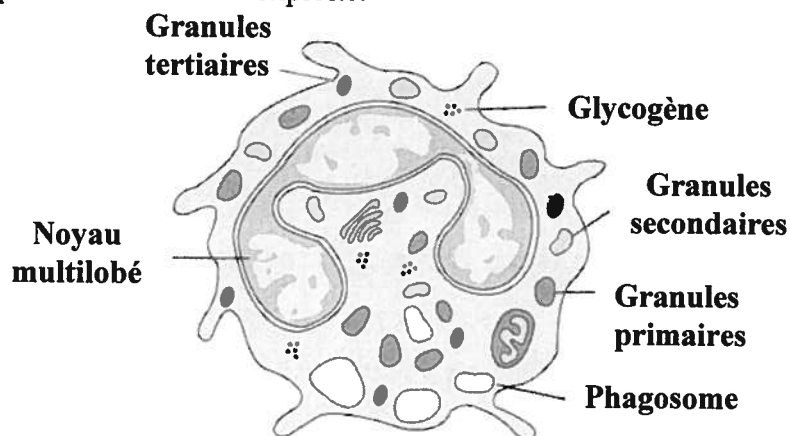


Figure 1. Aspect cellulaire des neutrophiles

Les neutrophiles sont des granulocytes qui possèdent un noyau multilobé, d'où leur appellation de cellules polymorphonucléaires (PMN). Ces cellules contiennent différents granules impliqués dans la destruction de micro-organismes et la propagation de la réponse inflammatoire. Les neutrophiles possèdent trois types de granules, soient les granules primaires (azurophiles), les granules secondaires (spécifiques) et les granules tertiaires [127]. Ces granules renferment plusieurs protéines impliquées dans la lutte contre les micro-organismes et la dégradation de la matrice extracellulaire lors de leur migration vers les sites d'inflammation. Les granules tertiaires sont les premiers à être libérés et contiennent la gélatinase B (MMP-9), les granules spécifiques contiennent entre autres, la MMP-8, le lysozyme et l'élastase, sont libérés en second, puis les granules azurophiles contenant des enzymes hydrolytiques et la myéloperoxydase sont les derniers

à être sécrétés [127]. Le recrutement de neutrophiles vers les sites d'inflammation nécessite l'établissement d'un gradient de molécules chimiotactiques qui sont soit libérées par l'hôte telle l'IL-8 ou la protéine du complément C5a ou proviennent des bactéries comme les LPS ou les peptides formylés. L'IL-8 est une molécule de l'hôte ayant une forte activité chimiotactique envers les neutrophiles [55]. Il a été démontré que la fusion génétique de cette protéine à des anticorps pouvait induire le recrutement de neutrophiles vers des tumeurs [41]. L'utilité clinique de l'IL-8 pour l'immunothérapie du cancer pourrait cependant être limitée car sa forte activité angiogénique pourrait favoriser la croissance de tumeurs et de métastases [41; 96]. L'usage de molécules dépourvues d'activité angiogénique, comme les peptides formylés, serait mieux indiqué pour une immunothérapie basée sur le recrutement de neutrophiles.

1.4 Chimiotactisme et peptides formylés

La migration des PMNs jusqu'aux tissus infectés dépend de diverses molécules chimiotactiques sécrétées par l'hôte ou provenant des micro-organismes. L'un des agents les plus puissants sont des peptides provenant de protéines bactériennes ayant un groupement formate à leur méthionine N-terminale [97]. Les neutrophiles possèdent un récepteur spécifique aux peptides formylés, le FPR (Formyl Peptide Receptor) qui appartient à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. Comme les autres membres de cette famille, le FPR comporte sept domaines transmembranaires [88]. Lorsque les peptides formylés sont présents en faible concentration ($\sim 1 \times 10^{-10}$ M), l'engagement du récepteur FPR provoque la migration des neutrophiles. Par contre, lorsqu'ils sont présents à plus forte dose ($\sim 1 \times 10^{-6}$ M), l'engagement du récepteur déclenche la dégranulation et la libération de molécules cytotoxiques [44]. Des études par synthèse chimique ont démontré que la séquence optimale pour engager le FPR était un tripeptide possédant une méthionine N-terminale et une phénylalanine en position 3. Le tripeptide formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLF) est communément appelé fMLP. La longueur des peptides formylés influence leur pouvoir chimiotactique puisque les peptides plus courts possèdent un pouvoir chimiotactique plus élevé [29].

Puisque l'un des rôles principaux des neutrophiles est la défense anti-bactérienne, il n'est pas étonnant qu'ils se soient adaptés à reconnaître les peptides formylés. En effet,

chez les procaryotes, toutes les protéines néoformées débutent par un résidu méthionine formylé [73]. L'enzyme formyltransférase (FMT) ajoute un groupement formate au méthionyl-ARNt et cet ARNt initie la traduction de manière plus efficace que l'espèce non-formylée [124]. Par contre, chez *Escherichia coli*, seulement 40% des polypeptides conservent leur groupement formate N-terminal, puisque celui-ci est éliminé par la déformylase (PDF) lors de l'élongation de la chaîne polypeptidique [89]. Suite à la déformylation, la méthionyl aminopeptidase (MAP) peut alors cliver la méthionine N-terminale sur certains polypeptides pour générer la protéine mature [7; 106]. Plusieurs protéines déformylées conservent cependant leur méthionine N-terminale puisque que la MAP est peu active lorsque l'acide aminé suivant la méthionine possède une chaîne latérale de grande dimension [7; 38].

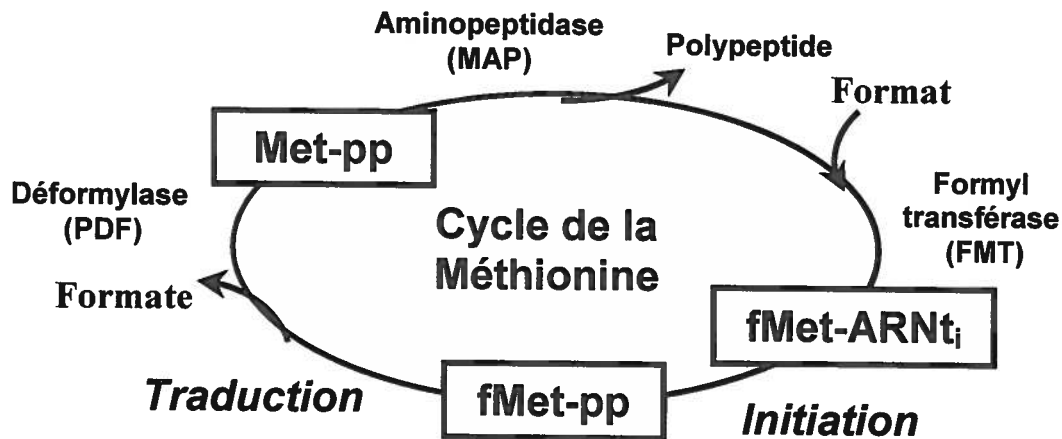


Figure 2. Cycle de la méthionine bactérien

La déformylation de polypeptides semble être essentielle pour la survie des bactéries. Chez *E. coli*, les gènes *def* et *fmt* sont co-transcrits en opéron bicistronique. Alors que l'inactivation du gène *fmt* diminue la croissance bactérienne, la délétion du gène *def* est létale [73]. Les bactéries déficientes pour le gène *def* ne sont viables que si le gène *fmt* est absent, et la double délétion n'affecte que le taux de croissance bactérien [106]. Ceci démontre que la formylation n'est pas essentielle pour initier la synthèse protéique et est une stratégie pour optimiser l'initiation de la traduction. La raison pour laquelle la délétion du gène *def* est létale en présence d'un gène *fmt* fonctionnel est probablement due à l'accumulation de protéines formylées qui sont essentielles et qui doivent être déformylées pour devenir actives. Ainsi, si la formylation des protéines est abolie, la déformylation devient alors un processus superflu et non-essentiel [106].

1.5 Ciblage des cellules tumorales

L'immunothérapie sélective n'est envisageable que si les cellules tumorales expriment des antigènes pouvant être reconnus de manière spécifique. Parmi ces antigènes, deux protéines ont été sélectionnées, soit MUC-1 et CEA. MUC-1 fait partie de la famille des mucines, des glycoprotéines de haut poids moléculaire exprimées à la surface apicale de plusieurs cellules épithéliales. Les mucines sont normalement produites par les cellules spécialisées en production de mucus et agissent comme lubrifiant inter-cellulaire [24]. Toutes les mucines sont des protéines hautement O-glycosylées ce qui inhibe les interactions cellulaires grâce à la charge négative des acides sialiques terminaux [117]. MUC-1 possède un domaine extracellulaire de 1000 à 2200 acides aminés qui est composé d'un nombre variable de répétitions en tandem (VNTR) de 20 acides aminés étant répliquées entre 20 et 125 fois selon les individus [116]. MUC-1 est surexprimé et hypoglycosylé dans la quasi-totalité des adénocarcinomes humains d'origine épithéliale, ce qui représente près de la moitié des tumeurs humaines [24]. La forme hypoglycosylée de MUC-1 est retrouvée dans près de 90% des cancers du sein, des ovaires et du pancréas et dans plus de 60% des cancers du poumon [116]. Chez les cellules cancéreuses, les chaînes d'oligosaccharides sont beaucoup plus courtes et moins complexes que celles retrouvées chez les cellules saines [63; 117]. Ce phénomène d'hypoglycosylation est dû à une diminution significative voir même l'absence totale de la 6-GlcNAc transférase, une enzyme responsable de l'élongation des chaînes d'oligosaccharides [9]. De plus, le niveau de sialyltransférase est de 8 à 10 fois plus importante chez les cellules cancéreuses. Cette enzyme est responsable de l'ajout des acides sialiques terminaux, ce qui empêche l'addition subséquente d'autres sucres. En étant beaucoup plus active chez les cellules cancéreuses, l'enzyme agit comme un terminateur de chaîne ce qui termine donc de manière prématurée l'élongation des chaînes d'oligosaccharides [10]. Cette hypoglycosylation mène à l'exposition d'épitopes antigéniques à la surface des cellules tumorales qui sont normalement masqués par des sucres. Une cellule tumorale présente donc à sa surface plusieurs sites potentiellement susceptibles d'être reconnus par les anticorps [83]. Le motif immunodominant dans chacune des répétitions VNTR est la séquence de 9 a.a APDTRPAPG [83; 116]. Parmi les anticorps spécifiques à la forme hypoglycosylée de MUC-1, on retrouve l'anticorps monoclonal C595 [18; 86]. Cet AcMo

reconnait un tétrapeptide RPAP compris à l'intérieur des VNTRs [87] et a été utilisé avec succès dans plusieurs approches cliniques tel le dépistage du cancer de la vessie [105]. Il semble donc possible d'utiliser le C595 comme agent pour développer une immunothérapie spécifique.

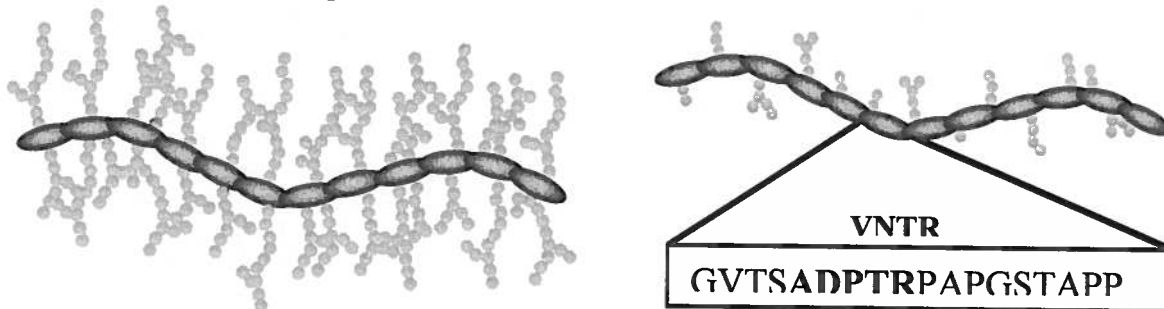


Figure 3. Structure de la Mucine-1 normale et mutante

L'antigène carcino-embryonnaire (CEA) est une glycoprotéine membranaire faisant partie de la famille des immunoglobulines (Ig). Cette protéine possède 7 domaines Ig et est liée à la membrane par un lien lipidique GPI. Contrairement à MUC-1 qui est exprimée chez les cellules saines, le CEA est une protéine oncofoetale qui n'est exprimée que lors du développement embryonnaire [14]. Cette protéine est un composant normal de l'épithélium endodermique embryonnaire de la muqueuse du côlon. Chez l'adulte, l'expression de la protéine est réprimée, alors qu'elle devient abondamment exprimée chez les adénocarcinomes colorectaux [14]. En plus d'être présente dans près de 80% des cancers du côlon, cette protéine est surexprimée dans plus de 50% des cancers du sein [69]. Plusieurs anticorps anti-CEA ont été générés dont l'AcMo T84.66 qui possède une affinité très élevée envers le CEA (10^{-11} M) [129] et qui a été utilisé dans le dépistage du cancer du côlon [51].

1.6 Les anticorps simple-chaîne

Bien que les AcMo soient des outils prometteurs pour le dépistage ou le traitement du cancer, ils comportent certains désavantages. Ils pénètrent peu les tumeurs en raison de leur masse moléculaire élevée (150 kDa), sont souvent immunogènes et mal tolérés par l'hôte [94]. Il est possible de produire en bactéries des anticorps simple-chaîne (scFvs) qui sont constitués des domaines variables des chaînes lourdes et légères d'un AcMo, unis de manière covalente par une charnière flexible [36]. Ces molécules conservent la spécificité antigénique de l'anticorps parental, mais ne possèdent donc pas de région

constante. Ils sont donc peu immunogènes et souvent mieux tolérés que les anticorps complets. Les scFvs ont une masse moléculaire réduite (25 kDa) par rapport aux anticorps complets, ce qui leur confère une meilleure pénétration tumorale [43]. Tout comme les anticorps monoclonaux, les scFvs peuvent être produits sous forme d'immunoconjugués après conjugaison à des radio-isotopes [3], des substances cytotoxiques [72], ou immunomodulatrices [62]. Les scFvs peuvent être exprimés dans une variété d'hôtes dont les bactéries, les levures et les plantes [53].

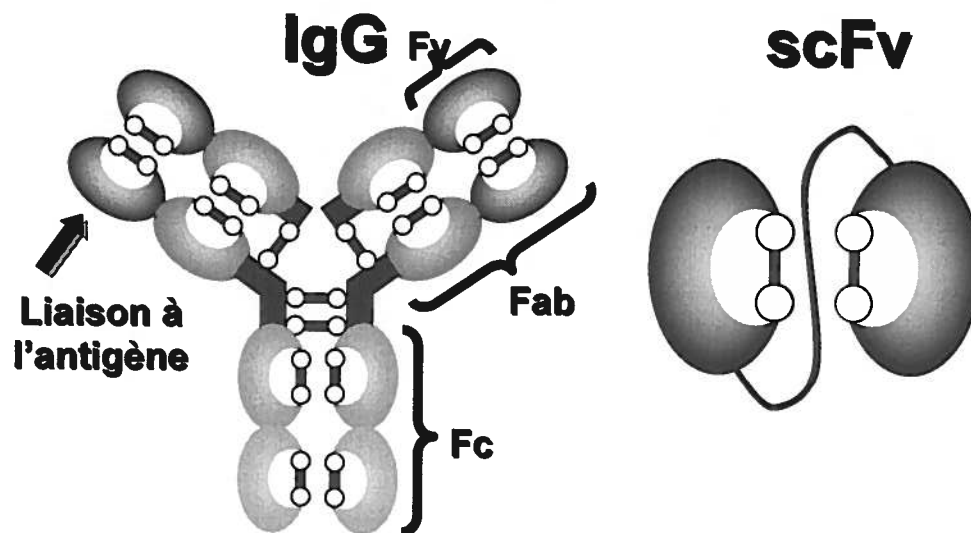


Figure 4. Structure d'un anticorps par rapport à un scFv

Les domaines immunoglobuline sont des structures globulaires stabilisées par des ponts disulfures intra-chaîne. Les régions variables des anticorps contiennent aussi deux cystéines nécessaires à la formation des ponts disulfures intra-chaîne requis pour l'adoption de leur conformation native [130]. Les scFvs produits en bactéries sont généralement produits dans l'espace périplasmique car cet environnement oxydatif permet la formation des ponts disulfures nécessaires à la bonne conformation des régions variables. Les thiol-disulfure oxydoréductases sont responsables de la réduction ou l'oxydation des résidus cystéines, afin d'empêcher ou de favoriser la formation de ponts disulfures. Chez les bactéries Gram-, deux couples d'enzymes d'oxydoréduction, soit DsbA/DsbB et DsbC/DsbD, sont spécialisés dans la formation de ces liens covalents. Ces enzymes périplasmiques sont maintenues sous forme oxydée et provoquent une cascade d'oxydo-réduction des thiols présents sur les protéines [76; 90]. Le cytoplasme bactérien est cependant un environnement réducteur ne permettant pas la formation des ponts

disulfures. Ainsi, les scFvs produits dans le cytoplasme bactérien se retrouvent fréquemment dans des corps d'inclusion sous forme de protéines insolubles [108]. L'état réducteur du cytosol bactérien est maintenu par deux systèmes de réduction, soit la thiorédoxine et la glutarédoxine. Ces deux molécules participent au cycle d'oxydo-réduction et sont maintenues dans un état réduit par la thiorédoxine réductase (*trxB*) et la glutathion réductase (*gor*). L'interruption génique de *trxB* ou *gor* provoque l'accumulation respective de thiorédoxine ou glutarédoxine sous forme oxydée, ce qui permet alors la formation de pont disulfures cytoplasmiques [48]. Des souches bactériennes *gor*-/*trxB*- ont été produites chez *E. coli* B, dont la souche ORIGAMI B [DE3] (Novagen), qui permet la formation de ponts disulfures dans le cytoplasme.

1.7 Systèmes d'expression bactériens

Puisque les bactéries initient naturellement la synthèse protéique par la formyl-méthionine, celles-ci sont des hôtes idéaux pour la production d'anticorps formylés pouvant recruter les neutrophiles vers des cellules tumorales. La bactérie *Escherichia coli* est l'hôte le plus abondamment utilisé pour l'expression à haut niveau de protéines hétérologues. Les facteurs qui influencent le taux d'expression protéique incluent le nombre de copies de vecteur utilisé, la force du promoteur, la stabilité de l'ARN messager, l'usage de codons et l'activité protéolytique bactérienne [6]. La souche bactérienne BL21 a été dérivée d'*E. coli* B et celle-ci est déficiente dans deux systèmes majeurs de protéolyse, les protéases *ompT* et *lon* [112]. Parmi les promoteurs utilisés, le promoteur de l'ARN polymérase du bactériophage T7 est l'un des plus puissants et il ne nécessite pas de cofacteurs protéiques pour son activité [111]. Plusieurs dérivés de la souche BL21 ont été générés dans lesquels le gène de la polymérase de T7 est intégré dans le génome bactérien et son expression est contrôlée par un promoteur inductible [65]. La souche BL21[DE3] est un lysogène qui contient le prophage λ DE3 ayant l'ARN polymérase du bactériophage T7 sous le contrôle du promoteur *lacUV5*, inductible par l'IPTG. Ainsi, lorsque ces souches sont transformées avec un vecteur d'expression à nombre de copies élevé (tels ceux de la famille pRSET) contenant le promoteur du bactériophage T7, la synthèse de la protéine d'intérêt peut atteindre jusqu'à 50% des protéines totales [112]. Cependant, un niveau d'expression basal peut survenir en absence d'inducteur, ce qui peut mener à une instabilité du vecteur et son éventuelle expulsion de

la cellule lorsque la protéine d'intérêt est toxique [74; 107]. Une stratégie utilisée pour pallier à ce problème consiste à exprimer le lysozyme du bactériophage T7, un inhibiteur naturel de l'ARN polymérase du bactériophage T7, ce qui réduit le taux d'expression basal en absence d'inducteur. La souche BL21[DE3] pLysS, a été dérivée de BL21[DE3] et le lysozyme du bactériophage T7 est porté sur un plasmide à faible nombre de copies, le pLysS. Le faible taux de production du lysozyme est insuffisant pour interférer avec l'activité de l'ARN polymérase de T7 suite à son induction par l'IPTG [110]. Malgré la présence de cette répression, un niveau d'expression basal peut survenir même en absence d'inducteur car le promoteur *lacUV5* est fuyant, ce qui mène à un ralentissement de croissance et de l'instabilité plasmidique lorsque la protéine d'intérêt est particulièrement toxique [65].

L'expression à partir du promoteur *lac* est inhibée par le répresseur codé par *lacI*, qui se lie à l'opérateur et empêche l'ARN polymérase d'initier la transcription [22]. Le changement de conformation du répresseur induit par sa liaison à l'inducteur mène à sa dissociation de l'ADN, ce qui permet ainsi la transcription de l'opéron lactose [22]. Cependant, même en absence d'inducteur, l'ARN polymérase peut se fixer au promoteur, ce qui mène à un niveau d'expression basal indésirable dans le cas de protéines toxiques. La fuite du promoteur *lac* peut être contrôlée en modifiant la composition du milieu de culture pour activer la répression catabolique. Normalement, les gènes du catabolisme (incluant ceux de l'utilisation du lactose) ne sont pas actifs lorsqu'une source d'énergie rapidement métabolisable est disponible [114]. Ce phénomène de répression catabolique lorsque du glucose est disponible se traduit par la répression des opérons impliqués dans le catabolisme des autres sucres. En absence de glucose, la concentration de l'AMP cyclique (AMPC) augmente ce qui permet à l'AMPC de se lier au *catabolic activator protein* (CAP) et augmenter l'affinité de l'ARN polymérase envers le promoteur [45]. Ainsi, en augmentant la concentration de glucose disponible, la répression catabolique permet d'exercer un contrôle plus fin de la transcription des gènes sous la dépendance du promoteur *lac* et ainsi réduire le niveau d'expression basal [61]. Le promoteur *lac* demeure cependant fuyant ce qui peut empêcher la production de protéines hautement toxiques. Des souches d'expression alternatives ont été développées qui permettent d'exercer un contrôle plus fin du taux d'expression basal. Parmi ces souches, on retrouve

les BL21-SI chez qui l'expression de l'ARN polymérase de T7 est sous le contrôle du promoteur *proU* inductible par l'osmolarité [32]. Le taux d'expression basal étant nul en absence de NaCl, ceci permet de produire des protéines toxiques [8].

1.8 La GFP en tant que protéine modèle

La GFP (Green Fluorescent Protein) est une protéine fluorescente produite par la méduse *Aequorea victoria*. La GFP possède une masse moléculaire d'environ 27 kDa et se caractérise par sa structure en baril formée de 11 feuillets- β anti-parallèles. Ce baril entoure le chromophore qui est formé par cyclisation spontanée des acides aminés S65-T66-G67 [13] (Figure 5; [120]). La GFP a été utilisée comme marqueur d'expression hétérologue dans des cellules aussi diverses que les bactéries, les levures, et les cellules animales et végétales [120]. De plus, la GFP est hautement résistante à la protéolyse et la dénaturation [15; 125], ce qui en fait un marqueur de choix pour la purification de protéines en conditions dénaturantes. La GFP utilisée lors de ce projet a été dérivée de la GFP S65T, un mutant dont les propriétés spectrales ont été optimisées pour l'analyse au FACS [37]. Cette GFP possède des mutations affectant sa solubilité, sa stabilité à 37°C et son taux d'expression en bactéries (F. Denis, résultats non-publiés). Lors de la mutagenèse, 11 codons non-optimaux pour l'expression chez *E. coli* et les cellules de mammifères ont aussi été remplacés. La GFP5 possède les mutations F64L, F99S, M153T, V163A et I167T et les codons non-optimaux qui ont été remplacés sont soulignés à la Figure 6. La mutation F64L augmente la solubilité de la protéine [16], le triple mutant F99S, M153T et V163A forme le fluorophore plus efficacement à 37°C [17], alors que la mutation I167T augmente la stabilité thermique de la protéine [104].

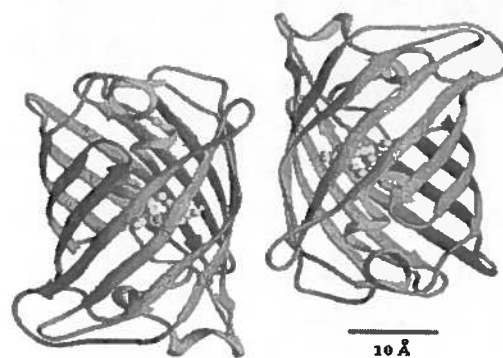


Figure 5. Structure moléculaire de la GFP

M **A** K G E E L F T G V V P I L
ATG GCT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT GGA GTT GTC CCA ATT CTT
V E L D G D V N G H K F S V S
GTT GAA TTA GAT GGT GAT GTT AAT GGG CAC AAA TTT TCT GTC AGT
G E G E G D A T Y G K L T L K
GGA GAG GGT GAA GGT GAT GCA ACA TAC GGA AAA CTT ACC CTT AAA
F I C T T G K L P V P W P T L
TTT ATT TGC ACT ACT GGA AAA CTA CCT GTT CCA TGG CCA ACA CTT

64

V T T **L** T Y G V Q C F S R Y P
GTC ACT ACT CTC ACT TAT GGT GTT CAA TGC TTT TCA AGA TAC CCA
D H M K R H D F F K S A M P E
GAT CAT ATG AAA CGG CAT GAC TTT TTC AAG AGT GCC ATG CCC GAA

99

G Y V Q E R T I **S** F K D D G N
GGT TAT GTG CAG GAG CGC ACC ATC TCT TTC AAA GAT GAC GGG AAC
Y K T R A E V K F E G D T L V
TAC AAG ACA CGT GCT GAA GTC AAG TTT GAA GGT GAT ACC CTT GTT
N R I E L K G I D F K E D G N
AAT AGA ATC GAG TTA AAA GGT ATT GAT TTT AAA GAA GAT GGA AAC

I L G H K L E Y N Y N S H N V
ATT CTT GGA CAC AAA TTG GAA TAC AAC TAT AAC TCA CAC AAC GTC

153 **163**

Y I **T** A D K Q K N G I K **A** N F
TAC ATC ACC GCC GAC AAA CAA AAG AAT GGA ATC AAG GCC AAC TTC

167

K **T** R H N I E D G S V Q L A D
AAG ACC AGA CAC AAC ATT GAA GAT GGA AGC GTT CAA CTA GCA GAC
H Y Q Q N T P I G D G P V L L
CAT TAT CAA CAA AAT ACT CCA ATT GGC GAT GGC CCT GTC CTT TTA
P D N H Y L S T Q S A L S K D
CCA GAC AAC CAT TAC CTG TCC ACA CAA TCT GCC CTT TCG AAA GAT
P N E K R D H M V L L E F V T
CCC AAC GAA AAG AGA GAC CAC ATG GTC CTT CTT GAG TTT GTA ACA

A A G I T H G M D E L Y K **L** *
GCT GCT GGG ATT ACA CAT GGC ATG GAT GAA CTG TAC AAG CTT TAA

Figure 6. Séquence de la GFP5 utilisée

2. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

2.1 Bactéries, tampons, oligonucléotides et vecteurs utilisés

2.1.1 Souches bactériennes

Tableau I. Génotype des souches bactériennes utilisées

| Souche | Génotype | Source |
|-------------------------|--|-------------------------|
| DH5α | F ⁻ , Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> | InVitrogen ¹ |
| Top10 | F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rspL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> | InVitrogen |
| Top10 F' | F' { <i>lacI</i> ^q Tn10(Tet ^R)}, <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rspL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> | InVitrogen |
| BL21-SI | <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , Δ <i>malAp510</i> , <i>malP</i> :: (<i>proUp-T7</i> RNAP), <i>malQ</i> :: <i>lacZhyb11</i> , Δ(<i>zfh-900</i> ::Tn10dTet) | InVitrogen |
| DM1 | F ⁻ <i>dam</i> ¹³ ::Tn9(Cm ^r), <i>dcm</i> , <i>mcrB</i> , <i>hsdR</i> ^{M+} , <i>gal1</i> , <i>gal2</i> , <i>ara</i> , <i>lac</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>ton</i> ^r , <i>tsx</i> ^r , Su ^o λ ⁻ | InVitrogen |
| BL21 [DE3] pLysS | F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3) pLysS (Cam ^R) | InVitrogen |
| ORIGAMI B [DE3] | F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lacY1</i> , <i>aphC</i> , <i>gor522</i> ::(Tn10Tc ^R), <i>trxB</i> ::Kan(DE3) | Novagen ² |

1: InVitrogen, Mississauga, ON

2: Novagen, Madison, WI

2.1.2 Tampons

Tableau II. Composition des tampons enzymatiques utilisés

| Tampon | Composition | Source |
|-----------------|--|------------|
| NEB1 | 10 mM Bis-Tris Propane.HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, (pH 7.0) | NEB |
| NEB2 | 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT,(pH 7.9) | NEB |
| NEB3 | 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, (pH 7.9) | NEB |
| NEB4 | 50 mM KOAc, 20 mM Tris-Acétate, 10 mM MgOAc, 1 mM DTT, (pH 7.9) | NEB |
| Tampon de PCR | 10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 mM MgSO ₄ , 0,1 % Triton X-100, (pH 8.8) | NEB |
| Tampon T4 PNK | 70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 5 mM DTT, (pH 7.6) | InVitrogen |
| T4 ADN Ligase | 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA, (pH 7.5) | InVitrogen |
| 5X First-Strand | 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl ₂ , (pH 8.3) | InVitrogen |

Tableau III. Composition des milieux et tampons utilisés

| | |
|--------------|---|
| LB | 1% Bacto-Tryptone, 0,5% Extrait de levure, 170 mM NaCl |
| LBON | 1% Bacto-Tryptone, 0,5% Extrait de levure |
| TAE 1X | 40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA, (pH 8.3) |
| TBE 1X | 89 mM Tris-Base, 89 mM Acide Borique, 2 mM EDTA, (pH 7.4) |
| Solution I | 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, (pH 8.0) |
| Solution II | 0.2 N NaOH, 1% SDS |
| Solution III | 150 mM Acétate de Potassium, 1% Acide Formique |
| RF1 | 100 mM RbCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 10 mM CaCl ₂ , 30 mM Acétate de Potassium, 15% glycérol, (pH 7.5) |
| RF2 | 10 mM RbCl ₂ , 75 mM CaCl ₂ , 10 mM MOPS, 15% glycérol, (pH 6.8) |
| TBS | 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl |
| TBST | 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.01% Tween-20, (pH 8.0) |
| PBS | 150 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , (pH 7.4) |
| liaison IMAC | 50 mM NaPO ₄ , 500 mM NaCl, 10 mM Imidazole, (pH 8.0) |
| lavage IMAC | 50 mM NaPO ₄ , 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole, (pH 8.0) |
| élution IMAC | 50 mM NaPO ₄ , 500 mM NaCl, 400 mM Imidazole, (pH 8.0) |

2.1.3 Oligonucléotides

Tableau IV. Séquence des amorces utilisées

| Amorce | Séquence (5' → 3') |
|----------------------------------|--|
| 5'Heavy <i>FseI</i> | TTTTTGGGCCGGCCAGGTSMAACTGCAGSAGTCWGG |
| 3'Heavy | AGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGACGGTGACC GTGGTCCC |
| 5'Light Kappa 2 | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGSAAATTGKCTVACCC AGTCTCCA |
| 3'Light Kappa | TTTTGCGGCCGCNCGTTTSAKYTCCAGCTTNGTNCC |
| 3'V_HC595-Δstop | GGTCATGGTGACCTTCTCCCTGGAGATGCAGACATGATTGCTGGA GACTGAGTGAGCACGATGTCCGATCC |
| 5'V_LC595-Δstop | GGATCGGACATCGTGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCAT CTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACC |
| 3'V_LC595-G85S | ACCTGCGGCCGCCCGTTTGATTTTCGAGCTTGGTGCCCCCTCCGAAG |
| 3'V_LC595-ΔG | TTTTGCGGCCGCGCGTTTGATCTCCAGCTTAGTACCCCCTCCGAAC GTGGG |
| 5'V_L C595-ΔPro | GGGACCTCTTACTCGTTAACAATCAGCAGC |
| 3'V_HC595-ΔPro | GCTGCTGATTGTTAACGAGTAAGAGGTCCC |
| 5'-fMLP | ATAATGCTCTTCGGGCCCAAGGAATTTGGGGACAGCCTAT |
| 3'-fMLP | TATTACGAGAAGCCCGGGGTTCTTAAACCCCTGTCGGATA |
| 5'def | GTCTAGAACAGCTGAAATAATCTTTCT |
| 3'def | CACGTAAGCTTGGATCCTTAAGCCCGGGCTTTC |
| 5'RBS def sens | GTTTAGATCTAAGGAGGTATATACATATGTCAGTTTTGCAAGTGC |
| 5'linker <i>FseI</i> | TTTCCTAGGGGGCGGCCGCGGGCCCCCGGCCGGCCCCGAGCTCCC ACCACCACCGCT |
| M13R | AGCGGATAACAATTTACACAGGA |
| M13F | CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC |
| T7 | TAATACGACTCACTATAGGG |
| T7 terminator | TAGTTATTGCTCAGCGGTGG |
| S3 | GGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGG |
| S4 | CCAGAGCCACCTCCGCCTGAACC |
| R2 | CGATCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC |
| B1 | CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC |

K = G/T R = A/G W = A/T M = A/C S = C/G Y = C/T N = A/C/G/T

2.1.4 Vecteurs

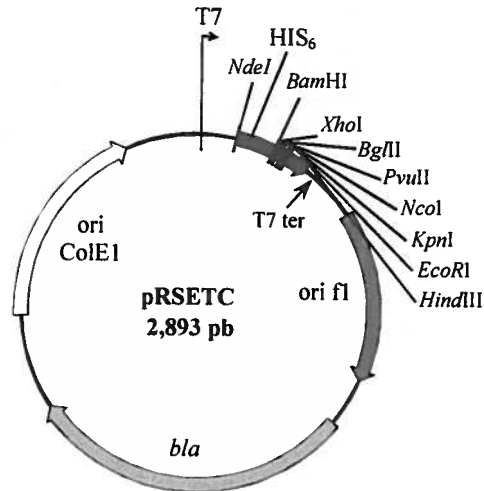


Figure 7. Représentation graphique du vecteur pRSETC

pRSETC est un vecteur d'expression contenant le promoteur du bactériophage T7. L'expression de protéines est induite par la production de l'ARN polymérase du bactériophage T7 contenue dans le génome de souches bactériennes telles les BL21[DE3] ou les BL21-SI. Ce vecteur de 2,893 pb contient une étiquette 6 histidines pour la purification de protéines, l'origine de réplication de ColE1, ainsi que le gène *bla* qui confère la résistance à l'ampicilline

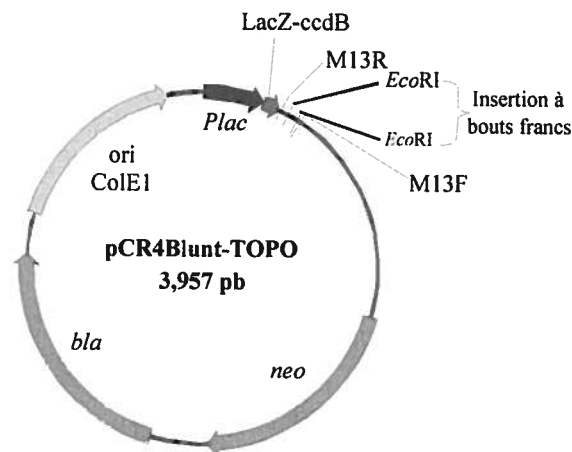


Figure 8. Représentation graphique du vecteur pCR4Blunt-TOPO

Le vecteur pCR4Blunt-TOPO est un système basé sur l'utilisation de la topoisomérase I qui permet l'intégration de produits de PCR possédant des extrémités franches. L'insertion du produit de PCR entre les 2 sites *EcoRI* perturbe le cadre de lecture du gène de fusion toxique *LacZ α -ccdB* permettant la croissance des colonies recombinantes. Ce vecteur de 3,957 pb contient le promoteur *lac*, l'origine de réplication de ColE1, les gènes *neo* et *bla* qui confèrent respectivement la résistance à la kanamycine et à l'ampicilline et le site d'insertion est flanqué des amorces M13R et M13F pour le séquençage.

2.2 Clonage d'acides nucléiques

2.2.1 *Extraction d'ADN génomique bactérien*

Une colonie de *E. coli* DH5 α a été inoculée dans 10 ml de LB et la culture a été incubée à 37°C pendant 16 à 18 heures sous agitation. Un ml de la culture a été centrifugé 10 min à 21 000 x g et le culot a été resuspendu dans 200 μ l de solution I additionnée de 1.5 mg/ml de lysozyme. Après une incubation de 10 minutes à la température de la pièce, 400 μ l de solution II ont été ajoutés. Suite à 3 extractions au phénol-chloroforme, l'ADN a été précipité avec 2.5 volumes d'éthanol. Le culot a été séché 1.5 min à 55°C, puis resuspendu dans une solution contenant 225 μ l d'eau, 25 μ l d'acétate de sodium (3 M pH 5.2) et 0.2 mg/ml de ribonucléase A. L'ARN a été dégradé pendant 15 min à 55°C, puis une extraction au phénol-chloroforme et une précipitation avec 2.5 volumes d'éthanol ont été effectuées. Le culot a été resuspendu dans 50 μ l d'eau stérile et l'ADN a été dosé avec un spectrophotomètre GeneQuant II (Amersham-Pharmacia, Baie d'Urfé, Canada) à 260 nm. 2 μ g d'ADN ont été utilisés pour l'amplification par PCR.

2.2.2 *Production d'ADN complémentaire*

L'extraction d'ARN total de cellules eucaryotes a été effectuée avec le réactif Trizol (InVitrogen, ON, Canada). Les cellules ont été lavées avec du PBS, centrifugées 1 min à 1 500 x g, puis solubilisées dans 1 ml de Trizol pour 4x10⁶ cellules. Suite à une incubation sur glace de 5 min, 1/10 du volume initial de chloroforme a été ajouté et le tube vortexé 2 min. Le mélange a été gardé sur glace 5 min puis centrifugé 5 min à 21 000 x g. La phase aqueuse a été récupérée et transférée dans un tube contenant 1 volume d'isopropanol. Les tubes ont été incubés 15 min à -20°C et l'ARN a été récupéré par une centrifugation de 15 min à 21 000 x g. Le culot d'ARN a été séché 1.5 min à 55°C puis resuspendu dans 10 μ l d'eau stérile par million de cellules. L'ARN a été dosé avec un spectrophotomètre GeneQuant II à 260 nm. Dans un volume final de 20 μ l, 5 μ g d'ARN ont été incubés en présence de 0.5 mM de dNTP et 25 μ g/ml d'oligo-dT et le mélange réactionnel a été chauffé à 65°C pendant 5 min pour dénaturer l'ARN. Après une incubation de 2 min sur glace, 4 μ l du tampon 5X First-Strand ont été ajoutés ainsi que 2

μl de DTT 0.1 M, 1 μl d'inhibiteur de ribonucléase (40 U/ μl) et 1 μl (200 U/ μl) de transcriptase inverse Superscript II (InVitrogen). La réaction a été incubée à 42°C pendant 50 min puis l'enzyme a été inactivée à 70°C pendant 15 min.

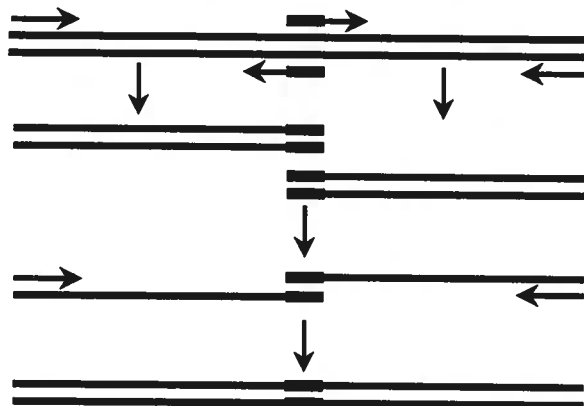


Figure 9. Représentation schématique de la mutagenèse dirigée par PCR

2.2.4 Amplification et mutagenèse par PCR

Des réactions de PCR ont été effectuées avec des amorces spécifiques synthétisées par le service de synthèse d'oligonucléotides de l'INRS-Institut Armand-Frappier ou Alpha DNA (Montréal, Québec) et sont présentées au tableau IV. L'amplification s'est effectuée dans un thermocycleur PTC-200 (MJ Research, ON, Canada) dans un volume final de 50 μl . Les réactions contenaient 5 μl de tampon de PCR, 0.2 mM de dNTPs, 1 unité de Taq polymérase, 0.04 unités de DeepVent (NEB), 10 pmoles de chacune des amorces et entre 50 et 100 ng d'ADN. Les conditions de réactions utilisées ont été les suivantes: Pour le cycle initial, l'ADN a été dénaturé à 94°C pendant 6 min, puis pour les cycles subséquents, les conditions étaient de 1 min de dénaturation à 94°C, 1.5 min d'hybridation à 55°C et 2 min d'élongation à 72°C, pendant 25 cycles. Suite au PCR, une élongation finale de 6 min à 72°C a été effectuée. La mutagenèse par PCR a été effectuée par la technique '*d'overlap extension*' [40]. En bref, deux réactions de PCR ont été effectuées en parallèle en utilisant des amorces complémentaires se chevauchant sur environ 20 nucléotides au niveau de la région à muter. Suite à la purification des deux produits de PCR sur gel, ils ont été combinés selon un rapport molaire 1:1 pour l'assemblage en présence des amorces distales 5' et 3' (Figure 7). L'assemblage final a eu lieu selon les mêmes conditions que pour l'amplification initiale.

2.2.5 Manipulations d'extrémités d'ADN

L'ADN polymérase du phage T4 possède une activité exonucléase 3'→5', ce qui permet de générer des bouts francs à partir d'extrémités 3' saillantes. Les réactions se sont effectuées dans du tampon NEB4 additionné de 10 mM de chaque dNTP et 1 unité d'enzyme par µg d'ADN. Suite à une incubation de 20 min à la température ambiante, l'enzyme a été inactivée à 70°C pendant 20 min. Le polissage des extrémités 5' saillantes d'ADN a été réalisée grâce à l'activité de polymérisation 5'→3' du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli*. Suite à la digestion par enzyme de restriction, le milieu réactionnel a été additionné de 2 mM de dNTPs et de 1 unité de Klenow par µg d'ADN, puis une incubation de 1 heure à 37°C a été effectuée. La phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIP) élimine les groupements phosphate des extrémités 5' d'ADN, ce qui réduit la recircularisation du vecteur lors de la ligation. Les vecteurs digérés ont été précipités à l'éthanol et resuspendus dans du tampon NEB3 contenant 0.5 unité de CIP par µg d'ADN, puis incubés 20 min à 37°C. L'ADN a ensuite été purifié par extraction au phénol-chloroforme ou purification sur gel d'agarose.

2.2.6 Purification et quantification d'ADN

Les fragments d'ADN ont été purifiés à partir de gels d'agarose à basse température de fusion. Les ADN ont été purifiés par la méthode du phénol chaud ou par centrifugation sur filtre Spin-X. Les gels ont été préparés dans du tampon TAE contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium, la migration a eu lieu sous un voltage constant de 6 V/cm et les bandes d'ADN ont été découpées après visualisation sous lampe UV. Dans la méthode au phénol chaud, 1 volume (p/v) d'eau a été ajouté et l'agarose a été fondu par incubation de 5 min à 70°C. 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5.2) et 1 volume de phénol ont été ajoutés, puis le mélange a été incubé 15 min à 70°C. Suite à une centrifugation de 10 min à 21 000 x g, une seconde extraction au phénol et 2 extractions au phénol-chloroforme ont été effectuées. L'ADN a ensuite été précipité avec de l'éthanol 95% et le culot resuspendu dans 10 µl d'eau stérile. Dans la méthode de centrifugation sur filtre Spin-X, les bandes d'ADN finement hachées ont été déposées sur des filtres Spin-X de 0.45 µm (Costar, Milipitas, CA) et deux cycles de gel/dégel de 10 min à -80°C ont été effectués. Suite à deux centrifugations de 10 min à 13 000 x g, 1/10 de volume d'acétate

de sodium 3 M (pH 5.2) et 10 µg d'ARNt ont été ajoutés au filtrat, puis l'ADN a été récupéré par précipitation avec 2.5 volumes d'éthanol 95%. L'ADN a été dosé par densitométrie sur une station d'imagerie AlphaImager System 3400 (Alpha Innotech, San Leandro, CA) en comparant les inconnus à une échelle de poids moléculaire de concentration connue (λ digéré par *Pst*I) grâce au logiciel AlphaEase (Alpha Innotech).

2.2.7 Ligation d'ADN

L'ADN ligase du phage T4 catalyse la formation de liaisons phosphodiester entre les extrémités 3' OH et 5' phosphate d'ADN. Dans un volume final de 10 µl, l'ADN a été dissout dans du tampon de ligation 1X et 1 µl d'ADN ligase (400 U/µl) a été ajouté. La ligation entre insertion et vecteur possédant des extrémités cohésives a eu lieu à une concentration d'ADN de 10 ng/µl avec un rapport molaire insert:vecteur de 3:1. Pour les ligations d'extrémités franches, le vecteur a été déphosphorylé et un rapport insert:vecteur de 1:3 avec une concentration d'ADN de 50 ng/µl ont été utilisés. Le mélange réactionnel a été incubé 30 min à 37°C, puis la ligase a été inactivée 15 min à 65°C. Lorsque possible, une digestion enzymatique post-ligation a été effectuée pour diminuer le nombre de colonies non-recombinantes. À la réaction de ligation, 3 µl de tampon, 3 µl d'enzyme et 14 µl d'eau ont été ajoutés, suivi d'une digestion de 30 min.

Pour le clonage d'oligonucléotides, ils ont d'abord été hybridés en chauffant 3.5 µM d'oligonucléotides complémentaires pendant 10 min à 95°C, suivi d'une incubation de 20 min à 42°C. L'efficacité de l'hybridation a été confirmée sur gel d'agarose 2% NuSieve GTG (FMC Bioproduct, Rockland, ME). Les oligonucléotides hybridés ont ensuite été phosphorylés avec la polynucléotide kinase du phage T4 (T4 PNK). Dans un volume final de 50 µl, 300 pmoles d'ADN ont été phosphorylés en présence de tampon T4 PNK, 1 unité de T4 PNK et 1 mM d'ATP. La réaction s'est effectuée 30 min à 37°C, puis l'ADN a été purifié par extraction au phénol-chloroforme et précipitation à l'éthanol. La ligation d'oligonucléotides a eu lieu avec un rapport molaire insert:vecteur de 10:1.

La majorité des produits de PCR ont été clonés à l'aide de la trousse Zero Blunt TOPO PCR cloning for Sequencing (InVitrogen) selon les recommandations du manufacturier. La ligation a eu lieu dans un volume final de 6 µl avec un rapport vecteur:insert de 1:1.

Le milieu réactionnel contenait 300 mM de NaCl, 15 mM de MgCl₂ et la ligation s'est effectuée à la température ambiante pendant 5 min.

2.2.8 Transformation bactérienne

La préparation des bactéries compétentes a été réalisée comme suit: les souches bactériennes ont été amplifiées à partir de 100 µl de bactéries en glycérol ensemencés dans 100 ml de LB sans antibiotique et incubés à 37°C pendant 16 à 18 heures sous agitation. 1/10 de la pré-culture a été transféré dans 100 ml de LB et incubé à 37°C sous agitation jusqu'à ce que la densité optique à 550 nm atteigne 0.4 à 0.6. La culture bactérienne a été incubée 10 min sur glace, puis centrifugée 10 min à 1 540 x g à 4°C. Le culot a été resuspendu dans 1/3 du volume initial dans le tampon RF1. Suite à une incubation sur glace de 15 min, les bactéries ont été centrifugées 15 min à 1 540 x g à 4°C. Le culot a été resuspendu dans 1/12.5 du volume initial avec le tampon RF2. Après une incubation de 15 min sur glace, les bactéries ont été aliquotées en 50 µl et conservées à -80°C jusqu'à usage. Après décongélation sur glace, 50 µl de bactéries compétentes ont été incubées 20 min sur glace en présence du mélange de ligation. Les bactéries ont été soumises à un choc thermique de 1.5 min à 42°C, placées 1 min sur glace, puis 1 ml de milieu LB a été ajouté. Après 1 heure d'adaptation à 37°C, 10 µl et 100 µl de la culture ont été prélevés et ensemencés sur milieu LB contenant 1.5% d'agar et l'antibiotique approprié. Le reste du mélange de transformation a été centrifugé à 9 300 x g pendant 1.5 min, le culot a été resuspendu dans 100 µl de milieu LB et ensemencé sur gélose. Après une nuit d'incubation à 37°C, des colonies isolées ont été repiquées pour analyse.

La préparation des bactéries compétentes pour l'électroporation a été réalisée comme suit: l'amplification de bactéries s'est effectuée tel que décrit ci-haut. Les bactéries ont été incubées sur glace pendant 20 min, puis centrifugées 20 min à 3 310 x g à 4°C. Les culots ont été resuspendus dans 5 ml d'eau froide stérile, le volume final a été complété à 50 ml, puis les bactéries ont été centrifugées 20 min à 3 310 x g à 4°C. Quatre lavages ont été effectués avant de resuspendre le culot dans 5 ml d'une solution stérile de glycérol 10 % froide. Suite à une centrifugation de 20 min à 3 310 x g à 4°C, les bactéries ont été resuspendues dans 500 µl de glycérol 10% et des aliquots de 50 µl ont été congelés à -80°C. Avant de procéder à l'électroporation des bactéries, l'ADN a été extrait au phénol-

chloroforme et précipité à l'éthanol. Environ 50 ng d'ADN ont été ajoutés aux bactéries électrocompétentes décongelées. Le mélange a été transféré dans des cuvettes pré-refroidies d'électroporation Gene Pulser (BioRad, Richmond, CA) ayant un écart de 1 mm. L'électroporation s'est effectuée avec un électroporateur Gene Pulser de Bio-Rad à 25 μ F et un voltage de 1.6 KV. Les cellules électroporées ont été transférées dans un microtube stérile puis l'adaptation des bactéries et l'étalement sur gélose se sont effectués comme pour les bactéries chimiquement compétentes.

2.2.9 Analyse des plasmides recombinants

Des colonies isolées ont été repiquées sur gélose maîtresse et dans 1 ml de milieu de culture, puis incubées à 37°C pendant une période de 16 à 18 heures. L'extraction d'ADN plasmidique a été effectuée selon la technique de lyse alcaline [67]. Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 21 000 x g pendant 1 min. Le culot a été resuspendu dans 100 μ l de solution I froide, additionnée de 0.5 mg/ml de lysozyme. Deux volumes de solution II ont été ajoutés et les tubes ont été mélangés par inversion, puis 1.5 volumes de solution III froide ont été ajoutés et les tubes ont été brièvement vortexés. Les tubes ont été centrifugés à 21 000 x g pendant 5 min à 4°C, puis le surnageant a été transféré dans un microtube contenant 1 ml d'éthanol 95%, les tubes ont été placés à -20°C pendant 15 min, puis centrifugés pendant 10 min à 21 000 x g. Le culot a été séché 1.5 min à 55°C dans un bain sec et resuspendu dans 30 μ l d'eau. Des 30 μ l d'ADN obtenus, 8 μ l ont été transférés dans un microtube contenant l'enzyme, le tampon de digestion approprié et 0.1 mg/ml de RNase A. Les réactions ont été incubées pendant 1 heure à la température appropriée à chaque enzyme. Le patron de digestion des plasmides recombinants a été analysé sur gel d'agarose à des pourcentages variant de 0.8 à 2% selon la taille des fragments à séparer, contenant du TBE 1X et 1 μ g/ml de bromure d'éthidium. Avant d'être chargés sur gel, 0.4 volume de tampon de dépôt (0.25% bleu de bromophénol, 40% glycérol) a été ajouté aux échantillons d'ADN. L'ADN du phage Lambda digéré avec *Pst* I (1.2 μ g) a été utilisé comme marqueur de masse moléculaire. La séparation de fragments d'ADN s'est effectuée sur des gels de 8 cm x 10.5 cm (50 ml d'agarose) ou sur des gels de 20 cm x 20 cm (300 ml d'agarose) sous un voltage constant de 10 V/cm, jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bas du gel.

2.2.10 Séquençage d'ADN

Avant de procéder au séquençage d'ADN, une purification à grande échelle a été effectuée. Les clones recombinants sélectionnés ont été repiqués à partir de la gélose maîtresse et inoculés dans 100 ml de milieu LB contenant l'antibiotique approprié et incubés à 37°C sous agitation pendant 16 à 18 heures. Pour conservation à long terme, 2 ml de cette culture ont été centrifugés 1.5 min à 9 400 x g, le culot a été resuspendu dans 1 ml de 50% glycérol/LB et conservé à -80°C. Les cultures bactériennes ont été centrifugées 15 min à 2 740 x g à 4°C et le culot a été resuspendu dans 4 ml de solution I froide supplémentée de 1.5 mg/ml de lysozyme. Suite à une incubation de 10 min à la température de la pièce, 8 ml de solution II ont été ajoutés et les solutions ont été mélangées par inversion, puis 6 ml de solution III froide ont été ajoutés et les tubes ont été brièvement vortexés. Après une centrifugation de 15 min à 2 740 x g à 4°C, le surnageant a été filtré sur Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA) et un volume d'isopropanol a été ajouté au filtrat. Suite à une incubation de 15 min à 4°C, les tubes ont été centrifugés 20 min à 4°C à 2 740 x g pour précipiter l'ADN. Le culot a été séché 15 min à 55°C et resuspendu dans une solution contenant 450 µl d'eau, 50 µl d'acétate de sodium 3 M (pH 5.2) et 0.2 mg/ml de ribonucléase A. La dégradation d'ARN a eu lieu à 55°C pendant 15 min, puis des extractions au phénol-chloroforme ont été répétées jusqu'à ce qu'aucun matériel ne soit présent à l'interface des phases aqueuse et organique. L'ADN a été précipité avec 1 ml d'éthanol 95% et le culot resuspendu dans 100 à 300 µl d'eau.

La technique de séquençage utilisée est basée sur la méthode de Sanger [95] sauf que chacun des terminateurs de chaînes (ddNTPs) sont couplés à différents fluorochromes pouvant être détectés avec le séquenceur automatique CEQ 2000XL (Beckman-Coulter, Fullerton, CA). 50 fmol d'ADN ont été dénaturés 1 min à 95°C dans un thermocycleur, puis 3.2 pmol d'amorce et 3.5 µl du mélange réactionnel (CEQ DTCS Kit, Beckman-Coulter) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel contenait 0.5 µl de chacun des quatre ddNTP, 0.25 µl du mélange de dNTP, 0.25 µl de Taq polymérase et 1 µl de tampon de séquençage et le volume final a été complété à 20 µl avec de l'eau. La polymérisation des produits a eu lieu selon les conditions suivantes: 20 secondes de dénaturation à 96°C, 20

secondes d'hybridation à 50°C et 4 min d'élongation à 60°C, pendant 40 cycles. Les produits de séquençage ont ensuite été précipités à l'éthanol 95%, puis un lavage à l'éthanol 70% a été effectué. Les ADN ont été séchés 15 min dans un concentrateur sous vide (Labconco, Kansas City, MO), puis les culots d'ADN ont été resuspendus dans 40 µl de formamide déionisée. L'injection et la séparation des produits dans le séquenceur automatique se sont effectués selon le protocole LFR1 du CEQ 2000XL. Toutes les constructions génétiques ont été au préalable effectuées *in silico* à l'aide du logiciel VectorNTI ver. 6.0 (Informax Inc., Frederick, MD). Les séquences obtenues ont été ensuite inspectées avec le logiciel de visualisation de chromatogramme Chromas ver. 2.23 (Technelysium Ltd., Tewantin, Australie) pour apporter les corrections appropriées, puis les séquences ont été comparées aux séquences théoriques avec le logiciel Blast [115] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>).

2.3 Manipulations de protéines

2.3.1 Production et purification de GFP recombinante

Les souches bactériennes BL21[DE3] pLysS et BL21-SI possèdent le gène de l'ARN polymérase du phage T7 dans leur génome, sous le contrôle respectif des promoteurs *lacUV5* ou *proU*. Les BL21-SI ont été cultivées en milieu de culture LBON, jusqu'à ce que la production de protéines recombinantes soit désirée. Une pré-culture équivalente à 1/5 du volume de culture final a été inoculée dans du milieu contenant 100 µg/ml de carbénicilline. Suite à une incubation de 16 heures sous agitation constante à 30°C, les bactéries ont été centrifugées et transférées dans 1 L de milieu de culture frais supplémenté d'antibiotique. Les cultures de BL21-SI ont été incubées à 30°C jusqu'à ce que la densité optique à 550 nm atteigne 0.5. L'expression des protéines a été induite en ajoutant une concentration finale de 200 mM NaCl. Les cultures ont été incubées à 30°C sous agitation pendant 16 heures. Les cultures de BL21[DE3] pLysS ont quant à elles été induites avec 1 mM d'IPTG au temps zéro. Les cultures bactériennes ont été centrifugées 10 min à 4 000 x g et le culot a été repris dans 40 ml de tampon de liaison IMAC. Après une incubation sur glace de 30 minutes en présence de 8 mg de lysozyme, les suspensions bactériennes ont été soniquées avec une microsonde (5 x 1.5 min à la puissance 5). La fraction soluble a été séparée des débris cellulaires par centrifugation de 15 min à 20 000

x g, puis le surnageant a été filtré sur filtre de 0.45 µm.

La GFP possède une étiquette de polyhistidine permettant d'effectuer une purification par affinité sur résine IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) et la résine IMAC *Nickel-Nitriloacetic acid* (Ni-Nta) a été utilisée (InVitrogen). La résine Ni-NTA est préparée pour purification native tel que suggéré par le manufacturier. La résine a été lavée avec 2.5 volumes d'eau, puis équilibrée avec 2.5 volumes de tampon de liaison IMAC. Après avoir chargé les échantillons sur la colonne, celle-ci a été lavée avec 40 ml de tampon de liaison. Les protéines ont été éluées avec 8 ml de tampon d'éluion IMAC. Les protéines récoltées ont ensuite été dialysées contre 4 L d'eau pendant 18 heures à 4°C sous agitation magnétique constante, puis dosées par la méthode de Bradford. Les endotoxines présentes ont ensuite été éliminées par chromatographie d'affinité sur une colonne de polymyxine B selon les instructions préconisées par le fournisseur (Pierce, Rockford, IL). La colonne a été régénérée avec 5 volumes de désoxycholate de sodium 1%, lavée trois fois avec 5 volumes d'eau pour éliminer le détergent et la colonne a été équilibrée avec 5 volumes de NaCl 500 mM. La concentration en NaCl des échantillons a été ajustée à 500 mM, puis ils ont été chargés sur la colonne de polymyxine B et laissés en contact avec la matrice pendant 1 heure à la température ambiante. Les protéines ont été éluées avec 3 volumes de NaCl 500 mM et dialysées contre de l'eau pendant 18 heures à 4°C. Les protéines ont ensuite été concentrées 5 fois avec des Microcons YM-10 (Millipore, Billerica, MA) et dosées.

2.3.2 *Production et purification d'anticorps*

L'anticorps T84.66 anti-CEA a été produit à partir de l'hybridome T84.66, obtenu d'ATCC (HB-8747; Mannassas, VA). Les cellules ont été mises en culture dans une flasque contenant 1 L de milieu sans sérum pour hybridome Hybridoma-SFM (InVitrogen) supplémenté de 10 µM de β-mercaptoéthanol et 100 µg/ml de pénicilline et streptomycine. Les cellules ont été incubées à 37°C avec 5% CO₂ sous agitation magnétique constante jusqu'à ce que le taux de mortalité atteigne environ 50 %. La culture cellulaire a été centrifugée à 980 x g pendant 15 min et filtrée sur un filtre Stericup de 0.22 µm (Fisher). Le surnageant a été concentré 10 fois avec un appareil

d'ultrafiltration 8200 (Millipore) équipé d'une membrane de 10 kDa sous une pression positive d'azote de 50 psi. Les échantillons concentrés ont été centrifugés 5 min à 3 000 x g et le surnageant a été filtré sur 0.22 µm. L'anticorps a été purifié par chromatographie d'affinité sur protéine A-Sepharose qui se lie à la partie Fc des immunoglobulines de souris. La purification de l'anticorps s'est effectuée à l'aide de la trousse Affi-Prep Protein A MAPS II (Bio-Rad). La préparation des tampons et de la matrice, ainsi que les étapes de purifications se sont effectuées selon les instructions proposées par le manufacturier. Un ml d'Affi-Gel protéine A a été équilibré avec 15 volumes de tampon de liaison. L'échantillon dilué dans le tampon de liaison a été chargé sur la colonne, un lavage avec 15 volumes de tampon de liaison a été effectué, puis l'anticorps a été élué avec 5 volumes de tampon d'éluion à pH 3.0. Des fractions de 1 ml ont été récupérées directement dans 1 ml de tampon de neutralisation (Tris-HCl 1M, pH 9.0), puis dosées au spectrophotomètre à 280 nm. Les fractions contenant les concentrations protéiques les plus élevées ont été combinées et dialysées contre du PBS pendant 18 heures à 4°C. Les protéines obtenues ont ensuite été concentrées à l'aide de Microcon YM-10 (Millipore).

2.3.3 Dosage de protéines

Le dosage des protéines s'est effectué selon la méthode de Bradford. Une courbe étalon a été préparée à partir d'une solution de BSA (NEB) de 50 µg/ml. 100 µl de la solution étalon ou des inconnus ont été placés en duplicata dans un plateau de 96 puits à fond plat. Un volume de colorant *Bio-Rad Protein Reagent* (Bio-Rad) préalablement dilué (40% final) avec de l'eau a été ajouté à chacun des puits. Après mélange délicat à la pipette, les réactions ont été incubées 10 min à la température ambiante et l'absorbance a été mesurée à 600 nm au spectrophotomètre.

2.3.4 Conjugaison chimique d'anticorps

La conjugaison chimique consistait à introduire un peptide formylé sur l'anticorps T84.66 avec l'agent de pontage hétéro-bifonctionnel Sulfo-SMPB (Sulfosuccinimidyl-4-[*p*-maleimidophenyl] Butyrate) (Pierce). Une fois purifié, 5 µM d'anticorps T84.66 ont été concentré à l'aide de Microcon YM-50 afin d'obtenir un volume final de 200 µl. 50 µl de l'agent de pontage Sulfo-SMPB dilué dans le tampon de conjugaison (20 mM

Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 8.0) ont été ajoutés à l'anticorps pour obtenir une concentration finale de 50 µM. Suite à une incubation d'une heure à la température ambiante, l'excès d'agent de pontage a été éliminé par concentration sur Microcon YM-50 et dilution avec du tampon de conjugaison. Cette étape a été répétée 5 fois et l'anticorps concentré a été resuspendu dans 500 µl de tampon de conjugaison. L'anticorps activé à l'agent de pontage a ensuite été conjugué soit au peptide synthétique formylé (Sigma Genosys), soit avec de la cystéine libre. Le peptide ou la cystéine ont été dilués dans 500 µl de tampon de conjugaison à une concentration finale de 500 µM. Suite à une incubation de 2 heures à la température ambiante, les échantillons ont été dialysés contre du PBS.

2.3.5 Analyse par SDS-PAGE

Les protéines ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les gels de polyacrylamide utilisés avaient des dimensions 7.3 cm x 10.2 cm et 1.5 mm d'épaisseur et toutes les solutions ont été préparées selon le système de tampons de Laemmli [57]. Les gels de séparation étaient constitués de 0.375 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.05% APS, et 0.05% TEMED et contenaient une quantité de 30% acrylamide/ 0,8% bisacrylamide variant selon le pourcentage de gel désiré. De cette solution, 4.5 ml ont été prélevés et coulés dans le moule de l'appareil Mini-Protean II de Bio-Rad. Suite à la polymérisation du gel, un gel d'entassement de 4% d'acrylamide/bisacrylamide (30%/0.8%) a été ajouté. Ce gel contenait 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.05% d'APS et 0.1% TEMED. L'électrophorèse s'est effectuée dans une cuve contenant 250 ml de tampon d'électrophorèse (25 mM Tris-Base, pH 8.3, 192 mM glycine, 0.5 % SDS). Les protéines ont été dénaturées par l'addition d'un volume de tampon de dépôt 4X (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% β-mercaptoéthanol, 10% glycérol, 0.05% de bleu de bromophénol) et chauffées à 95°C pendant 5 min, puis les échantillons ont été chargés sur le gel. Cinq µl de *Benchmark Prestained Protein Ladder* (Invitrogen) ont été utilisés comme marqueur de masse moléculaire. La séparation des protéines a été réalisée à la température ambiante à un voltage constant de 20 V/cm pendant 45 min dans une cuve Mini-Protean II. Après avoir détaché le gel d'entassement, le gel de séparation a été incubé 10 minutes sous agitation dans une solution d'imidazole

(200 mM imidazole, 0.1% SDS). Le gel a ensuite été coloré 1 minute dans une solution de zinc (200 mM ZnSO₄) puis rincé à 2 reprises avec de l'eau. Les protéines ont été visualisées avec un transilluminateur à lumière blanche (Alpha Innotech).

2.4 Culture cellulaire et tests de chimiotactie

2.4.1 Analyse par cytométrie en flux

La lignée cellulaire LS 174T (ATCC, CL-188) exprime fortement CEA [92; 132] alors que la lignée cellulaire HEK 293 (ATCC, CRL-1573) n'exprime pas cet antigène [123]. Ces deux lignées cellulaires ont été cultivées dans des flasques de polystyrène de 25 cm² ou de 75 cm² à 37°C en présence de 5 % CO₂. Le milieu de culture utilisé était du DMEM supplémenté de 292 µg/ml glutamine, 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine (InVitrogen) et 10 % SVF inactivé à la chaleur (30 minutes à 55°C). Lorsque les cultures cellulaires étaient confluentes, elles ont été rincées avec du PBS pour éliminer les cellules mortes, puis elles ont été traitées avec 1 ml de trypsine (InVitrogen) pendant 5 min à 37°C en 5 % CO₂. La trypsine a été inactivée par addition de DMEM contenant 10 % de SVF et les cellules ont étéensemencées dans du milieu de culture frais à une dilution de 1:3 pour les LS 174T et de 1:10 pour les HEK 293. Après une incubation de 18 heures à 37°C, le milieu a été aspiré pour éliminer les cellules n'ayant pas adhéré et du milieu de culture frais a été ajouté. L'anticorps purifié et ceux ayant été conjugués chimiquement ont été testés en cytométrie en flux pour évaluer s'ils avaient conservé leur spécificité. Les cellules en culture ont été comptées et resuspendues dans du PBS à une concentration de 10⁶ cellules/ml. 300 000 cellules ont été utilisées pour chaque condition de marquage. Les cellules ont été centrifugées 5 min à 500 x g puis lavées à deux reprises avec 100 µl de PBS. Le culot a ensuite été resuspendu dans un volume final de 100 µl de PBS contenant l'anticorps dilué ou le témoin isotypique (IgG1κ de souris, BD Biosciences). Suite à une incubation de 30 min à 4°C, les cellules ont été lavées deux fois puis le culot a été resuspendu dans 10 µl de PBS contenant 1 µg d'anti-IgG de souris couplé au FITC (eBiosciences, San Diego, CA). Le deuxième marquage s'est effectué pendant 20 min à 4°C et les cellules ont été lavées à 2 reprises avec 100 µl de PBS. Le culot a été resuspendu dans 400 µl de PBS et les cellules ont été analysées par cytométrie en flux.

2.4.2 Purification de neutrophiles

Les neutrophiles ont été isolés à partir de sang périphérique humain obtenu de donneurs sains. Les échantillons ont été récoltés dans des tubes héparinisés de 10 ml (Becton-Dickinson), centrifugés à 400 x g pendant 15 min, puis les lymphocytes présents à la surface des globules rouges ont été récupérés. Les neutrophiles ont ensuite été purifiés par MACS avec des billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD15 (Miltenyi Biotech., Auburn, CA). Un volume de tampon MACS (PBS supplémenté de 2 mM EDTA et 0.5% BSA) a été ajouté ainsi que 75 µl de FCR block (Miltenyi Biotec) afin d'empêcher la liaison non spécifique de cellules exprimant le récepteur Fc. 110 µl de microbilles magnétiques anti-CD15 ont été ajoutés et les cellules ont été incubées 15 min à 4°C. Trois volumes de tampon MACS ont été ajoutés et les cellules ont été centrifugées 10 min à 300 x g pour éliminer les billes non-liées. Le culot a été resuspendu dans 1 ml de tampon MACS, puis les cellules ont été chargées une colonne de séparation LS placée sur un aimant. La colonne a été lavée avec 4 ml de tampon MACS, puis elle a été détachée de l'aimant. Les cellules ont été récupérées avec 8 ml de tampon MACS, ont été centrifugées 10 min à 300 x g, et resuspendus dans 5 ml de tampon MACS. Les neutrophiles ont ensuite été resuspendus à 10^6 cellules/ml dans du RPMI-1640 supplémenté de 1 mg/ml de BSA.

2.4.3 Migration en chambre de Boyden

Les tests de migration ont été effectués en duplicata avec une chambre de Boyden modifiée de 96 puits avec une membrane de polycarbonate de 3 µm (Neuroprobe Inc, Gaithersburg, MD). Les agents chimiotactiques sous étude ainsi que le témoin (fMLP) ont été dilués dans du RPMI-1640 additionné de BSA (1 mg/ml) et de polymyxine B (5 mg/ml) (Calbiochem, San Diego, CA) et placés dans la chambre inférieure à des concentrations variables. Le témoin fMLP (Calbiochem) a été utilisé à des concentrations variant entre 1 pM et 1 µM. Les neutrophiles purifiés ont été incubés 15 min en présence de FCR block (20 µl/ 10^6 cellules) (Beckman-Coulter), puis 250 µl de neutrophiles (10^6 cellules/ml) ont été déposés dans la chambre supérieure. La migration s'est effectuée pendant 90 min à 37°C en présence de 5% CO₂. Les plaques ont ensuite été centrifugées

5 min à 1 000 x g. Les cellules résiduelles dans la chambre supérieure ont été aspirées, puis 100 µl de versène (PBS, 0.53 mM EDTA) ont été ajoutés à la chambre supérieure. Les plaques ont été incubées 10 min à 37°C en présence de 5% CO₂ afin de détacher les cellules ayant adhéré au côté inférieur de la membrane. Les cellules ayant migré dans la chambre inférieure ont été récoltées et leur nombre a été déterminé au FACS.

3. RÉSULTATS

3.1 Construction d'un système d'inhibition transitoire de la déformylase

L'ADN de la déformylase a été amplifié par PCR à partir d'ADN génomique d'*E. coli* DH5 α à l'aide des amorces 5' def et 3' def (Tableau IV). Les extrémités 3' saillantes du produit de PCR ont été polies et la bande d'ADN correspondant à la déformylase a été purifiée sur gel d'agarose à basse température de fusion et dosée. Le fragment purifié a été ligué au vecteur pCR4Blunt-TOPO et transformé dans des bactéries chimiquement compétentes DH5 α . L'extraction d'ADN a été effectuée par mini-préparation et une digestion enzymatique avec *EcoRI* a permis d'identifier les clones positifs. Un clone recombinant a été amplifié et séquencé à l'aide des amorces universelles M13R et M13F (Tableau IV). Les séquences obtenues ont été analysées avec le logiciel Chromas 2 et comparées avec la séquence originale publiée dans NCBI (AE000407). Le gène de la déformylase a été cloné dans le vecteur d'expression pRSETC. L'ADN a été isolé du vecteur pCR4Blunt-TOPO par digestion avec *PvuII* et *HindIII* et la bande correspondant à la déformylase a été purifiée sur gel d'agarose à basse température de fusion et dosée. 5 μ g du vecteur pRSETC ont été digérés, purifiés et dosés. Les fragments purifiés ont été ligués ensemble et transformés dans des bactéries chimiquement compétentes DH5 α . La présence de l'insertion a été vérifiée et un clone recombinant a été amplifié. Le gène de la GFP5 cloné dans le vecteur pRSETC était disponible au laboratoire (F. Denis, résultats non-publiés) et a été utilisé sous sa forme originale. Le gène de la déformylase a été cloné dans les deux polarités pour créer un vecteur d'expression bicistronique. L'ADN de la déformylase a été isolé de pRSETC par digestion avec *BamHI*, purifié sur gel d'agarose à basse température de fusion et dosé. Le fragment purifié a été ligué dans le site *BamHI* du vecteur pRSETC déphosphorylé contenant la GFP5. Le produit de ligation a été transformé dans des bactéries chimiquement compétentes DH5 α et l'orientation des insertions a été déterminée par digestion. Les clones positifs pour le gène de la déformylase sens (Figure 10A) ou anti-sens (Figure 10B) ont été séquencés avec les amorces T7 et T7 terminator (Tableau IV). Un RT-PCR a ensuite été effectué afin de démontrer que les plasmides construits exprimaient la GFP et la déformylase sens et anti-sens en un seul messager (données non-montrées).

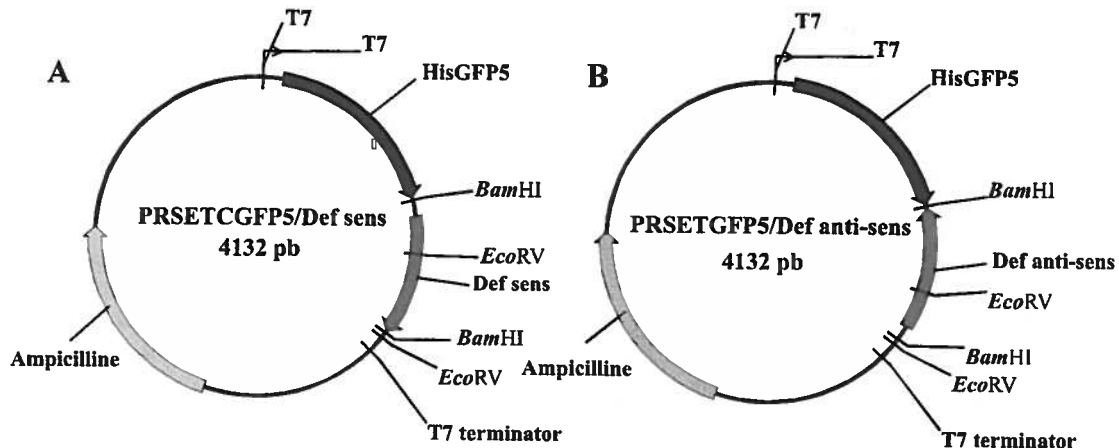


Figure 10. Représentation schématique des vecteurs bicistroniques

3.2 Production et purification de protéines formylées en bactéries

Les vecteurs contenant la GFP seule ainsi que ceux contenant la déformylase sens ou anti-sens ont été transformés dans la souche bactérienne BL21[DE3] pLysS et une cinétique d'induction a été effectuée afin de déterminer la concentration d'inducteur optimale. Ces analyses se sont effectuées sur un intervalle de 8 heures à 3 concentrations d'IPTG (0.1 mM, 1 mM et 10 mM). La croissance bactérienne a été mesurée à chaque heure par densité optique à 600 nm. La Figure 11 montre les courbes de croissance de la souche bactérienne BL21[DE3] pLysS contenant le gène de la GFP seul. Bien qu'un léger retard de croissance (environ 20%) peut être observé à 10 mM d'IPTG entre 7 et 8 heures, il est clair d'après la Figure 11, que l'expression de la GFP ne cause pas de retard de croissance important et ce, peu importe la quantité d'inducteur utilisée. La GFP n'est donc pas toxique en soi.

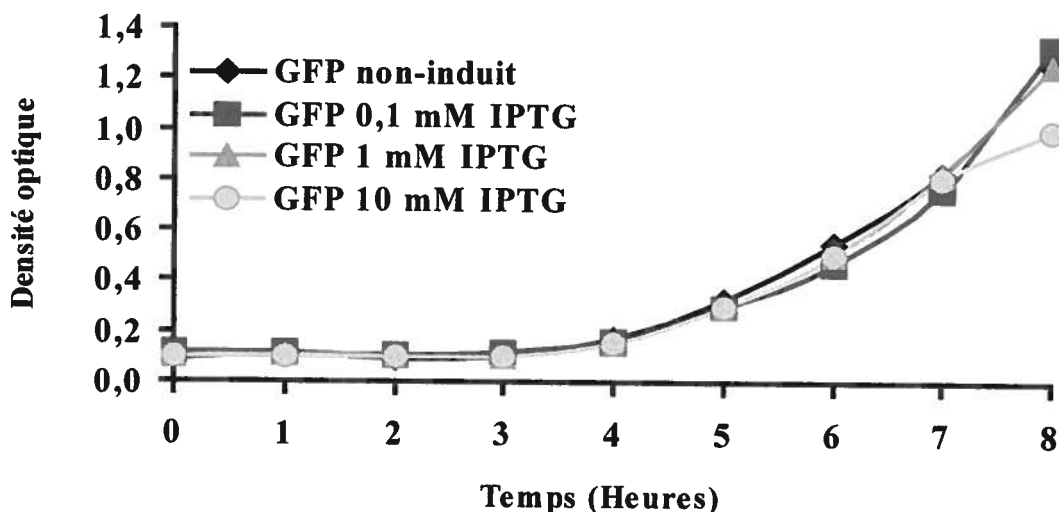


Figure 11. Effet de l'expression de la GFP5 sur la croissance bactérienne

La Figure 12 montre les courbes de croissances obtenues lorsque le gène de la déformylase était surexprimé. Aucune diminution de croissance n'a été observée suite à l'induction, peu importe la concentration d'IPTG utilisée. La Figure 13 montre cependant que la surexpression de l'ARN anti-sens de la déformylase provoque un retard de croissance bactérienne significatif, peu importe la concentration d'inducteur utilisée. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature qui démontrent le rôle essentiel de la déformylase dans la survie des bactéries et démontre que l'inhibition par anti-sens est efficace. La reprise de croissance observée à 8 heures à la Figure 13 était probablement associée à une instabilité plasmidique car une grande proportion de bactéries n'exprimaient plus de GFP par ainsi qu'observé en microscopie à fluorescence (résultats non-présentés).

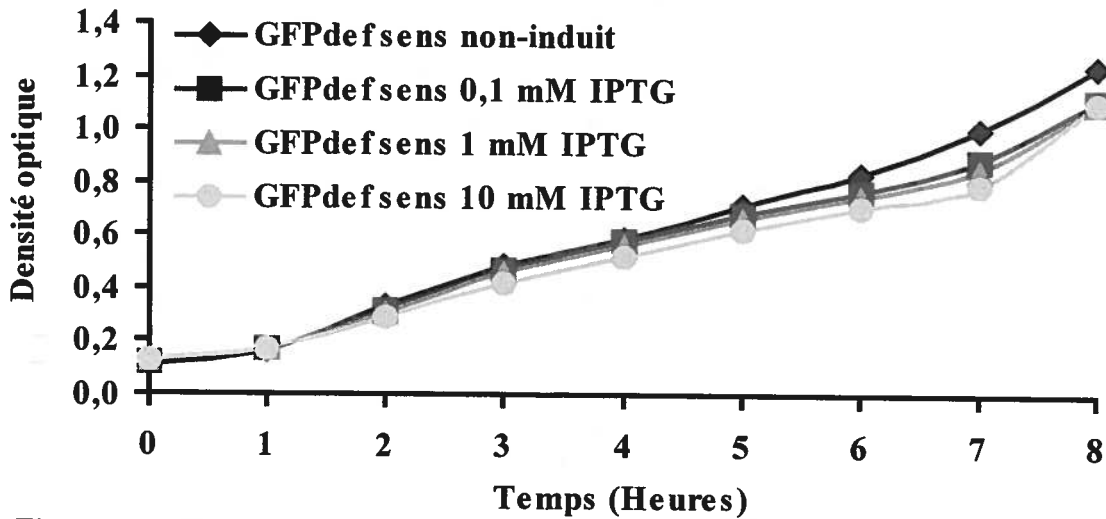


Figure 12. Effet de l'expression de la déformylase sur la croissance bactérienne

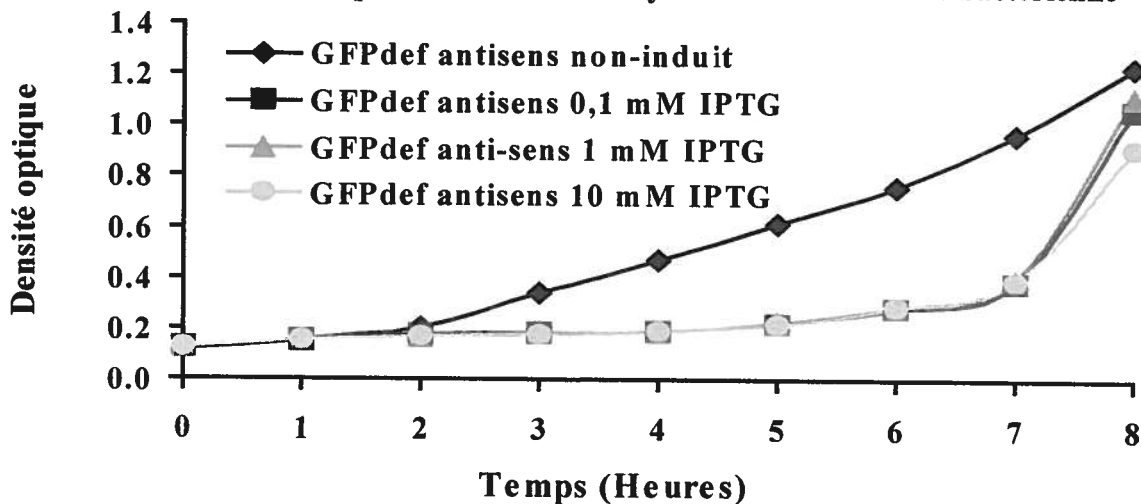


Figure 13. Effet de l'inhibition de la déformylase sur la croissance bactérienne

Afin d'évaluer l'effet de la surexpression ou l'inhibition de la déformylase sur le taux d'expression protéique bactérien, la fluorescence de la GFP a été mesurée sur une cinétique de 8 heures avec une dernière mesure après 16 heures. Une concentration d'IPTG de 1 mM a été utilisée et la fluorescence de la GFP a été déterminée par spectrofluorométrie à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm. La Figure 14 montre une diminution importante de fluorescence de GFP chez les bactéries où la déformylase était surexprimée et une absence presque totale de fluorescence chez les bactéries exprimant l'ARN anti-sens de la déformylase. Après une période d'incubation de 16 heures, la fluorescence observée diminue de près de 50% malgré une augmentation de la masse bactérienne. La faible production de GFP chez les bactéries exprimant la déformylase anti-sens n'est pas surprenante puisque la croissance bactérienne était fortement ralentie chez celles-ci (Figure 13). La surexpression de déformylase, bien qu'ayant un effet marginal sur la croissance des bactéries (Figure 12), a cependant causé un forte réduction d'expression de GFP (Figure 14).

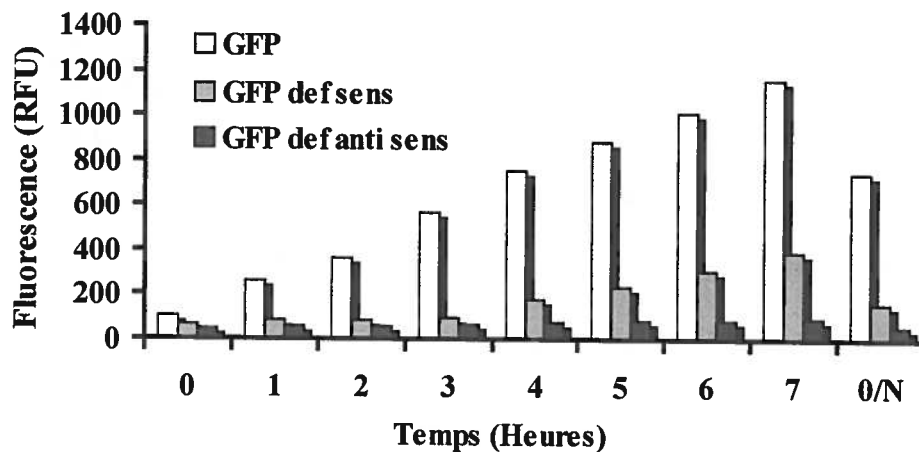


Figure 14. Expression de la GFP en présence de déformylase sens ou antisens

La forte réduction de biomasse (pour la déformylase anti-sens) ou la forte réduction de production de protéines (pour la déformylase sens) rendent ces systèmes peu propices à la production à grande échelle de scFvs chimiotactiques. Afin d'augmenter la production de protéines, un inoculum beaucoup plus important a été utilisé avant l'ajout d'inducteur. La fluorescence totale ainsi obtenue avec la déformylase sens ou anti-sens n'a pas été significativement supérieure et une forte proportion des bactéries de l'inoculum de départ semblaient avoir perdu l'expression de la GFP après la pré-culture d'une nuit. Ceci pourrait s'expliquer par une recombinaison du plasmide de façon à préserver le gène de la

β -lactamase tout en endommageant celui de la GFP. Ceci suggère que les BL21[DE3] pLysS tendent à exprimer les gènes toxiques même en absence d'inducteur ce qui mène à une forte instabilité plasmidique malgré la pression sélective de l'antibiotique. Afin d'augmenter la production de protéines, la souche bactérienne BL21-SI qui permet d'exercer un contrôle hautement régulé de l'expression en absence d'inducteur a été sélectionnée. Les vecteurs d'expression contenant le gène de la GFP ainsi que ceux contenant le gène de la déformylase sens ou anti-sens ont été transformés dans les BL21-SI. Une cinétique d'induction a été effectuée sur un intervalle de 4 heures afin de déterminer la concentration optimale d'inducteur. Encore ici, le dernier point de mesure correspondait à une incubation de 16 heures. Les cultures bactériennes ont d'abord été incubées jusqu'à ce que la densité optique à 550 nm atteigne 0,5. Trois concentrations de NaCl ont été utilisées, soit 100, 200 et 300 mM. La croissance bactérienne a été mesurée à chaque heure par densité optique à 600 nm (Figure 15) et la fluorescence de la GFP a été déterminée par spectrofluorométrie à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm (Figure 16). Les résultats présentés aux Figures 15 et 16, proviennent des échantillons avec la GFP seule, mais le même type de courbe de croissance et de fluorescence a été observé avec les bactéries contenant la déformylase sens ou anti-sens. Les résultats de la Figure 15 montrent que 100 mM d'inducteur permet une croissance maximale et que les concentrations supérieures tendent à inhiber la croissance des bactéries.

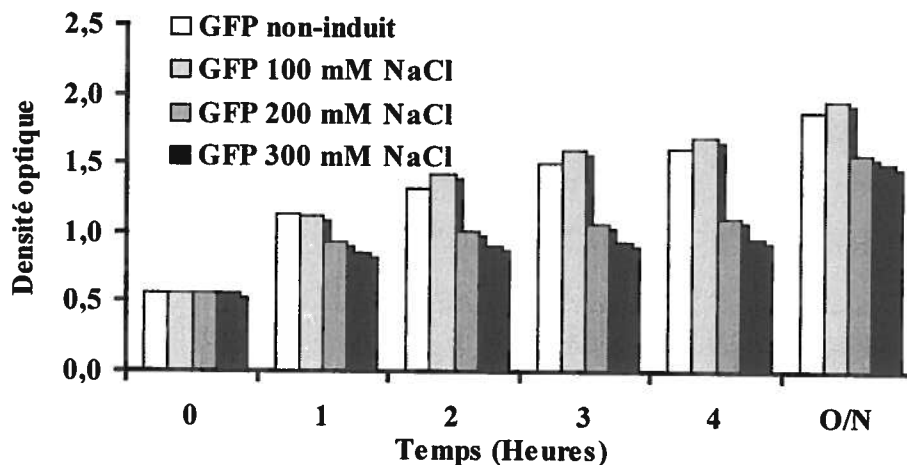


Figure 15. Croissance des BL21-SI transformées avec le vecteur pRSETC-GFP

Les résultats présentés à la Figure 16 montrent le rapport entre la densité optique et la fluorescence selon la concentration d'inducteur. Bien que la croissance bactérienne soit

meilleure à 100 mM de NaCl, le taux de production de GFP est maximal à 200 mM et diminue à une plus forte osmolarité. Ainsi, la concentration d'inducteur permettant la production maximale de GFP se situe à 200 mM. Même avec une induction de 16 heures la quantité de GFP obtenue a augmenté et ce sans instabilité plasmidique apparente.

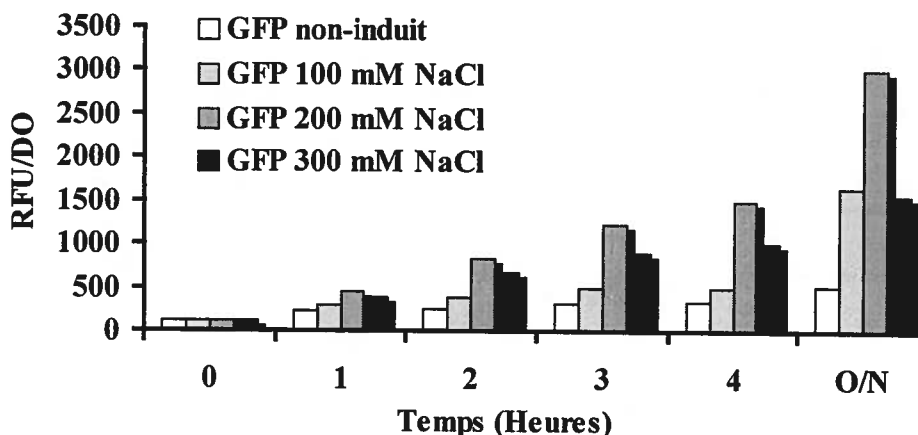


Figure 16. Expression relative de la GFP chez les BL21-SI

Une production à grande échelle des différentes constructions a ensuite été effectuée. Les conditions de croissance et d'induction déterminées à la section précédente (16 heures, 200 mM NaCl) ont été utilisées. Les culots bactériens obtenus ont été soniqués et la GFP a été purifiée par colonne d'affinité Ni-NTA (InVitrogen). La purification a permis d'isoler une quantité de GFP de plus de 400 µg par litre pour chacune des constructions. Afin d'éliminer toute trace d'endotoxines, les protéines ont ensuite été purifiées sur une colonne de polymyxine B (Pierce). Les échantillons ainsi purifiés ont été dialysés contre de l'eau pour diminuer la concentration de NaCl et être compatibles avec l'analyse en spectrométrie de masse.

Les protéines purifiées ont été analysées par SDS-PAGE de 12% pour évaluer la pureté des échantillons obtenus. Les échantillons non-bouillis de GFP ont été visualisés sous UV (Figure 17B), ce qui démontre la stabilité exceptionnelle de cette protéine puisqu'elle reste fluorescente même en présence de SDS. Une coloration négative au zinc a permis de démontrer la présence d'une bande majeure à environ 29 kDa correspondant à la masse moléculaire attendue de la GFP (Figure 17A). La raison pour laquelle la coloration négative au zinc semble montrer la présence d'un doublet plutôt qu'une bande unique est due à la fluorescence de la GFP, qui même à la lumière blanche, masque le signal du colorant. Ces résultats démontrent que la technique de production et de

purification permet d'obtenir une grande quantité de protéines ayant une grande pureté.

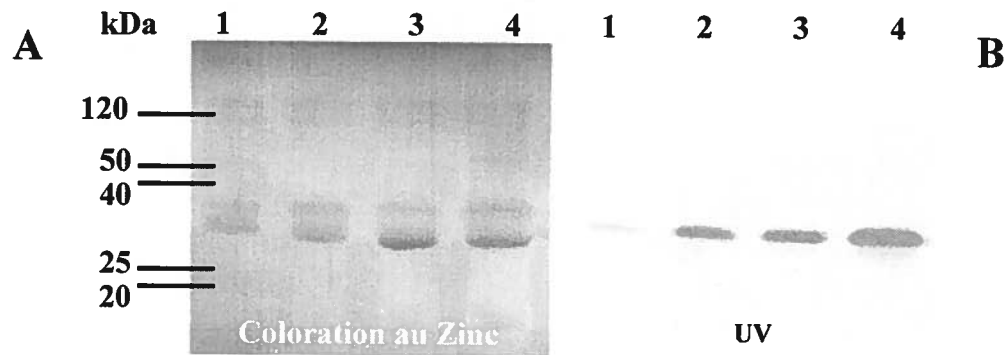


Figure 17. Analyse par gel SDS-PAGE de 12 % de la GFP formylée
1: 100 ng ; 2: 250 ng ; 3: 500 ng; 4: 1 µg

Les échantillons ont été analysés par spectrométrie de masse afin d'en déterminer la masse moléculaire exacte et ainsi évaluer le niveau de formylation. La Figure 18 montre le profil obtenu avec la GFP isolée à partir de bactéries où l'ARN anti-sens de la déformylase a été exprimé. Un pic majeur à 28,740 Da correspondant à la masse moléculaire théorique de la GFP formylée (28,743 Da) est présent. Les pics secondaires qui apparaissent selon des multiples de 22 correspondent à l'ajout d'ions sodium, puisque la purification s'est effectuée à haute concentration de NaCl. Le pic mineur à 26,720 daltons correspond à la GFP déformylée. Les masses moléculaires de la GFP seule et de celle isolée à partir de bactéries où la déformylase était surexprimée étaient identiques à celle-ci (données non-présentées). Ceci démontre que la surexpression de GFP peut saturer le système de déformylation, menant à la production de protéines formylées. Ceci indique aussi que l'activité de la déformylase surexprimée est faible.

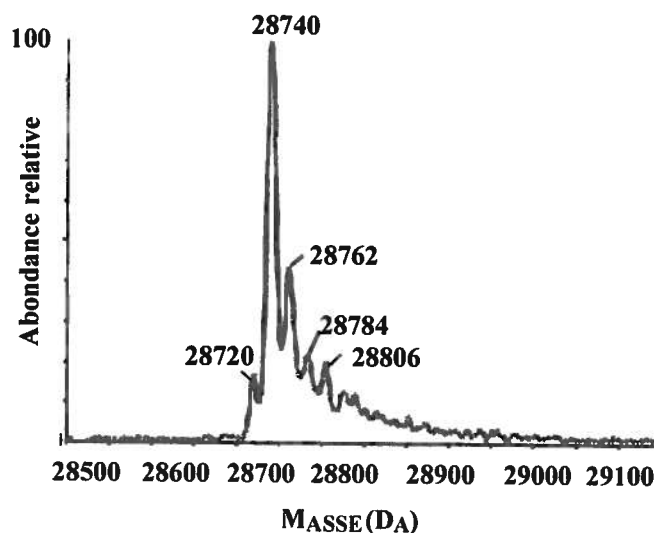


Figure 18. Profil en spectrométrie de masse de la GFP purifiée

3.3 Évaluation de l'activité biologique de la GFP formylée

Des tests de migration ont été effectués à l'aide d'une chambre de Boyden modifiée afin d'évaluer la capacité de la GFP formylée d'induire la migration de neutrophiles. Seuls les résultats obtenus avec la GFP produite dans le système d'inhibition transitoire de déformylase sont présentés à la Figure 19. Une concentration de GFP formylée variant de 0 à 10 μM a été utilisée et 5 $\mu\text{g/ml}$ de polymyxine B ont été ajoutés aux puits. Bien que les protéines aient été purifiées sur colonne de polymyxine B, l'ajout de polymyxine B assure la neutralisation d'endotoxines résiduelles. L'indice de migration est obtenu en divisant le nombre de cellules ayant migré en réponse à l'agent chimiotactique par le nombre de cellules ayant spontanément traversé la membrane poreuse. Ainsi, un indice de migration de 1 signifie un pouvoir chimiotactique nul. La Figure 19 montre que la GFP formylée induit une migration dose-dépendante, avec un profil en forme de cloche typique des chimiokines. La concentration optimale de GFP formylée se situe à 100 μM alors que la dose optimale de fMLP est de 10 μM . Le fait que la GFP soit 10 fois moins efficace que le fMLP pourrait être dû à sa séquence N-terminale non-optimale (fMRG versus fMLP). Pour confirmer que la migration était due à la présence du groupement formate N-terminal, 100 μM d'anticorps 5F1 dirigé contre le récepteur des peptides formylés (FPR) ont été ajoutés aux puits inférieurs. La Figure 19 montre que l'anticorps neutralisant 5F1 bloque complètement la migration induite par la GFP formylée. Ces résultats montrent qu'une protéine complète formylée peut être chimiotactique.

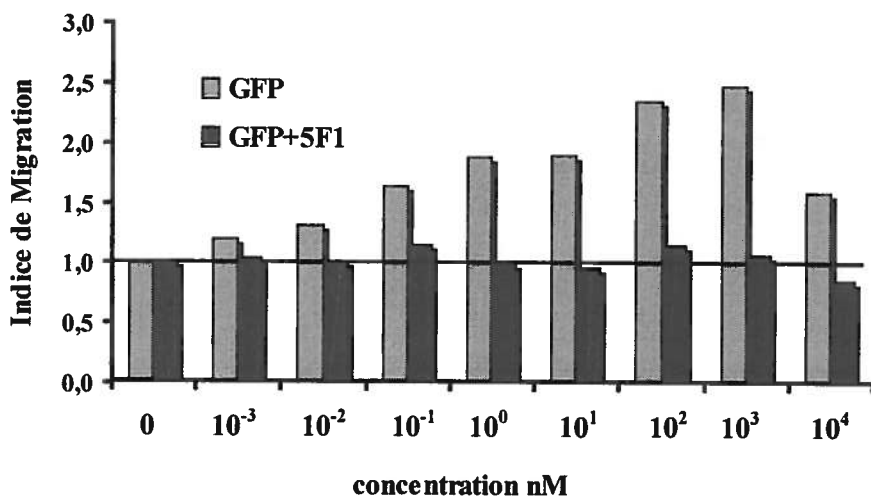


Figure 19. Migration de neutrophiles induite par la GFP formylée

Puisque la GFP possède un spectre d'émission et d'excitation similaire à celui de la fluorescéine (canal FL1), une analyse en cytométrie en flux a été effectuée pour confirmer la liaison de la GFP formylée au FPR (Figure 20). Le profil en noir correspond à l'autofluorescence des cellules et il est clair qu'une augmentation d'intensité de fluorescence est observable selon la concentration de GFP formylée utilisée. Aucun déplacement significatif de fluorescence n'était cependant observable aux doses inférieures à 10 μM . Cette analyse confirme les résultats obtenus dans les tests de migration. La spécificité de liaison au FPR n'a pu être confirmée avec de la GFP déformylée, puis l'analyse en spectrométrie de masse avait démontré que celle-ci conservait son groupement formate malgré la surexpression de la déformylase.

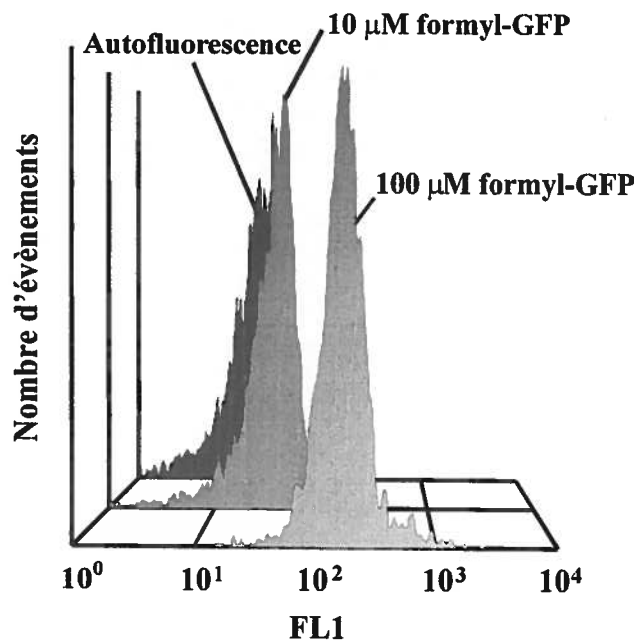


Figure 20. Liaison de la GFP formylée aux neutrophiles

3.4 Optimisation du système de déformylation en bactéries

Les données obtenues en spectrométrie de masse démontrent que la surexpression de la déformylase ne permet pas de produire de protéines déformylées en bactéries. Des analyses ont été effectuées afin de vérifier le niveau d'expression de la déformylase dans les système de surexpression bicistronique. Des bactéries BL21-SI contenant la GFP ainsi que celles contenant la déformylase sens ou anti-sens ont été mises en culture avec ou sans inducteur (200 mM NaCl). 100 μl de culture bactérienne ont été prélevés pour

chacune des conditions et les protéines totales ont été analysées sur gel SDS-PAGE de 12%, après une coloration négative au zinc (Figure 21). Bien qu'une bande majeure correspondant à la masse moléculaire de la GFP soit présente chez les échantillons induits, aucune bande correspondant à la masse attendue de la déformylase (19 kDa) n'était apparente suite à l'induction (puit 4). Ces résultats pourraient expliquer l'absence de déformylation observée lors de l'analyse en spectrométrie de masse.

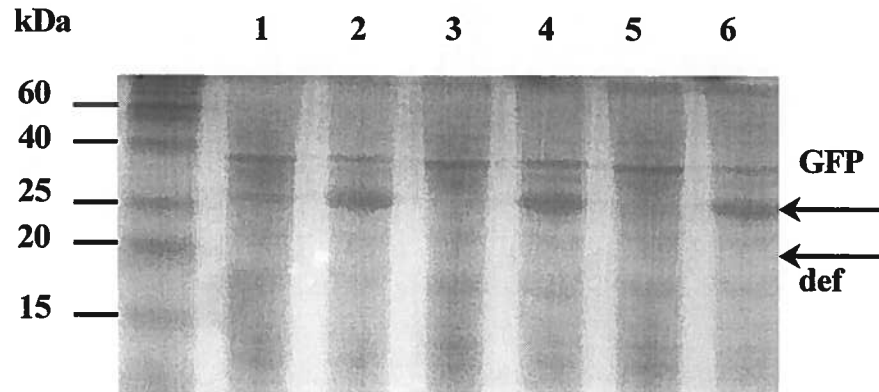


Figure 21. Analyse SDS-PAGE de l'expression de déformylase
 1: GFP non-induite; 2: GFP induite; 3: GFP def+ non-induite
 4: GFP def+ induite; 5: GFP def- non-induite; 6: GFP def- induite

Afin de comprendre la raison de l'absence de production de déformylase, la séquence de l'ARN messager de la déformylase a été inspectée. La déformylase possède une boîte Shine-Dalgarno (RBS) qui diffère du consensus requis pour un pairage efficace à l'ARN ribosomal 16S et sa distance par rapport au codon d'initiation n'est que de 4 nucléotides. Dans le but de maximiser l'expression de la déformylase, une séquence de RBS optimale a été introduite en amont de la déformylase. La déformylase a été amplifiée par PCR avec les amorces 5'RBSdef/sens et T7 terminator (Tableau IV) à partir du vecteur pRSETC contenant le gène de la déformylase sens. Les extrémités 3' saillantes du produit de PCR ont été polies, la bande d'ADN purifiée sur gel d'agarose à basse température de fusion et liguée au vecteur pCR4Blunt-TOPO. Les clones ont été criblés par digestion avec *EcoRI* et un clone recombinant a été amplifié et séquencé à l'aide des amorces universelles M13R et M13F (Tableau IV). Le gène de la déformylase contenant le RBS optimisé a ensuite été isolé de pCR4Blunt-TOPO par digestion avec *BglIII* et *HindIII*. Une fois purifié sur gel d'agarose à basse température de fusion, le fragment d'ADN a été liguée au vecteur d'expression bicistronique contenant la déformylase sens digéré par les mêmes

enzymes. La présence de l'insertion a été déterminée par digestion avec *NdeI*. Un clone recombinant a été amplifié et l'ADN a été transformé en BL21-SI. La Figure 22 montre la comparaison entre la déformylase originale et sa version améliorée. Le codon d'initiation est en caractères gras soulignés, alors que les bases complémentaires à l'ARN ribosomal 16S sont en caractères gras. L'efficacité de production de déformylase avec cette nouvelle construction n'a cependant pas encore été évaluée.

| | |
|--------------|---|
| Déformylase | CTGAACACATCTCT GGAGATTTATG TCAGTTTTGCAAGTG |
| RBS amélioré | <u>AGATCTAAGGAGGTATATACATATG</u> TCAGTTTTGCAAGTG |
| | <i>BglII</i> |

Figure 22. Régions 5' de la déformylase et sa version améliorée

3.5 Optimisation du substrat chimiotactique

Bien qu'ayant démontré que la GFP formylée était capable d'induire la migration *in vitro* de neutrophiles, son efficacité était de 10 fois inférieure au fMLP. Ceci pourrait être causé par une séquence N-terminale non-optimale (fMRG) ou la taille élevée de la molécule formylée. Afin d'améliorer le pouvoir chimiotactique des protéines formylées, le motif MLF a été introduit à l'extrémité N-terminale de la GFP. D'autre part, un site de clivage optimal pour la MMP-8 [79], une enzyme libérée par les neutrophiles lors de leur dégranulation [5], a été introduit après le motif MLF (Figure 23). La raison pour introduire un site de clivage de MMP-8 est de favoriser la libération d'un peptide plus court et plus actif suite à la dégranulation de neutrophiles au niveau des cellules tumorales afin d'amplifier la réponse chimiotactique. Ces séquences ont été obtenues par hybridation de deux oligonucléotides complémentaires ayant des extrémités compatibles avec le site de restriction *NdeI* situé au codon d'initiation de pRSETC. Les oligonucléotides 5'fMLP et 3'fMLP (Tableau IV) ont été hybridés, phosphorylés et ligués au site de restriction *NdeI* de pRSETC déphosphorylé. Puisque l'insertion de l'oligonucléotide détruisait le site de clonage, un traitement post-ligation avec *NdeI* a été effectué pour réduire le nombre de clones sans insertions. L'ADN a été transformé dans des bactéries DH5 α électrocompétentes et des digestions par *ApaI* et *PvuI* ont permis de cribler les clones possédant l'insertion dans la bonne polarité. Un clone a été amplifié et l'ADN a été séquencé avec les amorces T7 et T7 terminator (Tableau IV).

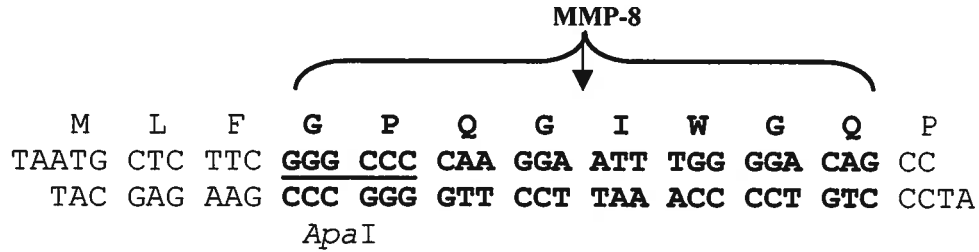


Figure 23. Séquence des oligonucléotides contenant le motif MLF

La GFP a ensuite été transférée dans le vecteur contenant le motif MLF. La GFP a été isolée par digestion *XhoI* et *HindIII*, purifié sur colonne Spin X, et ligué au vecteur pRSETC-MLF digéré par les mêmes enzymes. Un traitement post-ligation a été effectué avec *KpnI*, dont le site est éliminé chez les recombinants. Le produit de ligation a été transformé dans des bactéries chimiquement compétentes DH5 α . Les clones positifs pour la GFP ont été identifiés par digestion avec *NheI* et *PvuII*. L'ADN plasmidique a été transformé dans la souche bactérienne DM1, négative pour les méthylases *dam* et *dcm*, car le site de restriction *ClaI* requis pour l'étape suivante est protégé par la méthylation *dam*. Afin de rétablir le cadre de lecture entre le motif MLF et la GFP, une délétion intramoléculaire a été effectuée par digestion avec *NheI* et *ClaI*, polissage des extrémités 5' saillantes et ligation à haute dilution. Suite à un traitement post-ligation avec l'enzyme *ClaI*, le produit de ligation a été transformé dans des bactéries chimiquement compétentes DM1. Les clones dont la GFP était en phase avec le motif MLF ont été identifiés par séquençage.

La déformylase sens ou anti-sens présente dans les vecteurs bicistroniques a été transférée dans le vecteur d'expression contenant la GFP en phase avec la séquence MLF. La déformylase a été isolée par digestion avec *NcoI* et *HindIII*. Les fragments d'ADN ont été purifiés sur filtre Spin X et ligués au vecteur pRSETC contenant la GFP en phase avec le motif MLF préalablement digérée et purifiée selon les mêmes conditions. Les chimères obtenues ont été transformées dans des bactéries chimiquement compétentes DH5 α et les clones positifs ont été sélectionnés par digestion avec *NheI* et *EcoRV*. Bien que ces molécules aient été construites, des expériences restent à faire pour évaluer leur activité biologique, notamment comparer l'influence de la présence du motif fMLF par rapport au motif fMRG, ainsi qu'évaluer l'influence du clivage par la MMP-8 dans la l'augmentation du pouvoir chimiotactique des protéines formylées.

3.6 Introduction d'une charnière pour l'expression de scFvs

Dans le but de cloner les scFvs dans le vecteur d'expression, une charnière flexible similaire à celle qui unit les chaînes lourdes et légères des scFvs a été introduite. La charnière permettra de distancer les sites de liaison à l'antigène des scFvs de la région N-terminale formylée pour augmenter l'accessibilité au récepteur FPR présent à la surface des neutrophiles. La charnière comportait aussi des sites de restrictions *FseI* et *NotI*, compatibles avec ceux présents aux extrémités 5' et 3' des scFvs, ainsi qu'un codon de terminaison. La charnière a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN du vecteur pRSETC avec les amorces 5'Linker*FseI* et T7 terminator (Tableau IV). Les extrémités 3' saillantes du produit de PCR ont été polies et la bande d'ADN a été purifiée sur gel d'agarose à basse température de fusion et liguée au vecteur pCR4Blunt-TOPO. Le produit de ligation a été transformé dans des bactéries chimiquement compétentes DH5 α et l'extraction de l'ADN plasmidique a été effectuée selon la méthode de mini-préparation. Suite au criblage par digestion *EcoRI*, un clone a été amplifié et séquencé avec les amorces M13R et M13F (Tableau IV). La charnière a ensuite été isolée du vecteur pCR4Blunt-TOPO par digestion avec *NheI* et *PstI*. Le fragment d'ADN a été purifié sur gel d'agarose à basse température de fusion et ligué aux vecteurs pRSETC et pRSETC-MLF, digérés par les mêmes enzymes. Des bactéries chimiquement compétentes DH5 α ont été transformées et les clones positifs ont été identifiés par digestion analytique avec les enzymes *NotI* et *ScaI*. Ces clones ont été amplifiés et les ADN plasmidiques ont été séquencés avec les amorces T7 et T7 terminator (Tableau IV). La Figure 24 montre la structure finale du vecteur d'expression de scFvs intracellulaires.

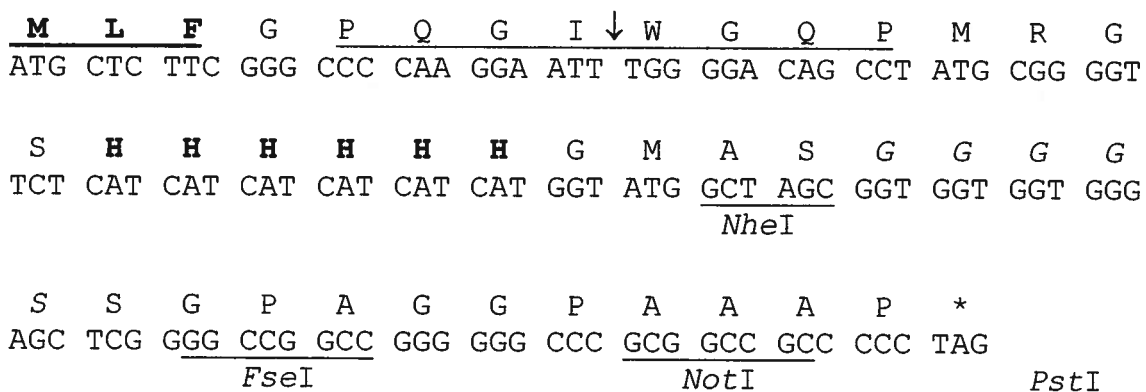


Figure 24. Séquence de la charnière pour clonage de scFvs

3.7 Clonage du scFv C595 anti-MUC-1

Le scFv anti-MUC-1 produit à partir de l'anticorps monoclonal C595 cloné dans le vecteur pCANTAB5E (Amersham-Pharmacia) a été obtenu du Dr. Charles Laughton de l'Université de Nottingham. L'ADN obtenu a été transformé dans des bactéries chimiquement compétentes DH5 α . Le plasmide a été amplifié et séquencé à l'aide des amorces R2 et B1 présentes dans le vecteur pCANTAB5E. La comparaison de la séquence obtenue à celle de la littérature [18] a démontré la présence de trois mutations dans la chaîne légère. Ces mutations étaient G85S, V3 vers un codon de terminaison et K18E (Figure 24). Puisque ce scFv était clairement non-fonctionnel, ces mutations ont été corrigées par mutagenèse dirigée.

Les chaînes lourdes et légères ont été amplifiées individuellement à partir du clone parental. Un PCR a été effectué avec les amorces 5'V_LC595- Δ stop et 3'V_LC595-G85S (Tableau IV) de manière à corriger les mutations. Un autre PCR a été effectué en parallèle avec les amorces 5'Heavy *FseI* et 3'V_HC595- Δ stop (Tableau IV) afin d'introduire un site de restriction *FseI* au début de la chaîne lourde pour être compatible avec la cassette d'expression présentée à la Figure 24. Suite à la purification des deux produits de PCR sur gel d'agarose à basse température de fusion, le scFv a été assemblé avec les amorces 5'Heavy *FseI* et 3'V_LC595-G85S. Le produit de PCR a été purifié sur gel d'agarose à basse température de fusion, les extrémité 3' saillantes ont été polies, et le produit de PCR a été cloné dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO. Le produit de ligation a été transformé dans des bactéries chimiquement compétentes TOP10 et étalé sur milieu solide contenant 0.1 mM d'IPTG afin d'utiliser le système de sélection positive du vecteur pCR4Blunt-TOPO. Le nombre de colonies obtenues était extrêmement bas. Suite à l'analyse des clones obtenus par digestion avec *EcoRI*, un seul clone positif a été obtenu. Celui-ci a été amplifié et séquencé à l'aide des amorces M13R et M13F (Tableau IV). Bien que les mutations G85S, V3* et K18E du clone parental aient été corrigées (résultats non-présentés et Figure 25), deux nouvelles mutations au niveau de la charnière sont apparues, soit S119F et G121S (Figure 25). Puisqu'il était anticipé que la mutation S119F aurait un impact majeur sur la flexibilité de la charnière du scFv, de la mutagenèse dirigée a été effectuée pour corriger ces mutations.

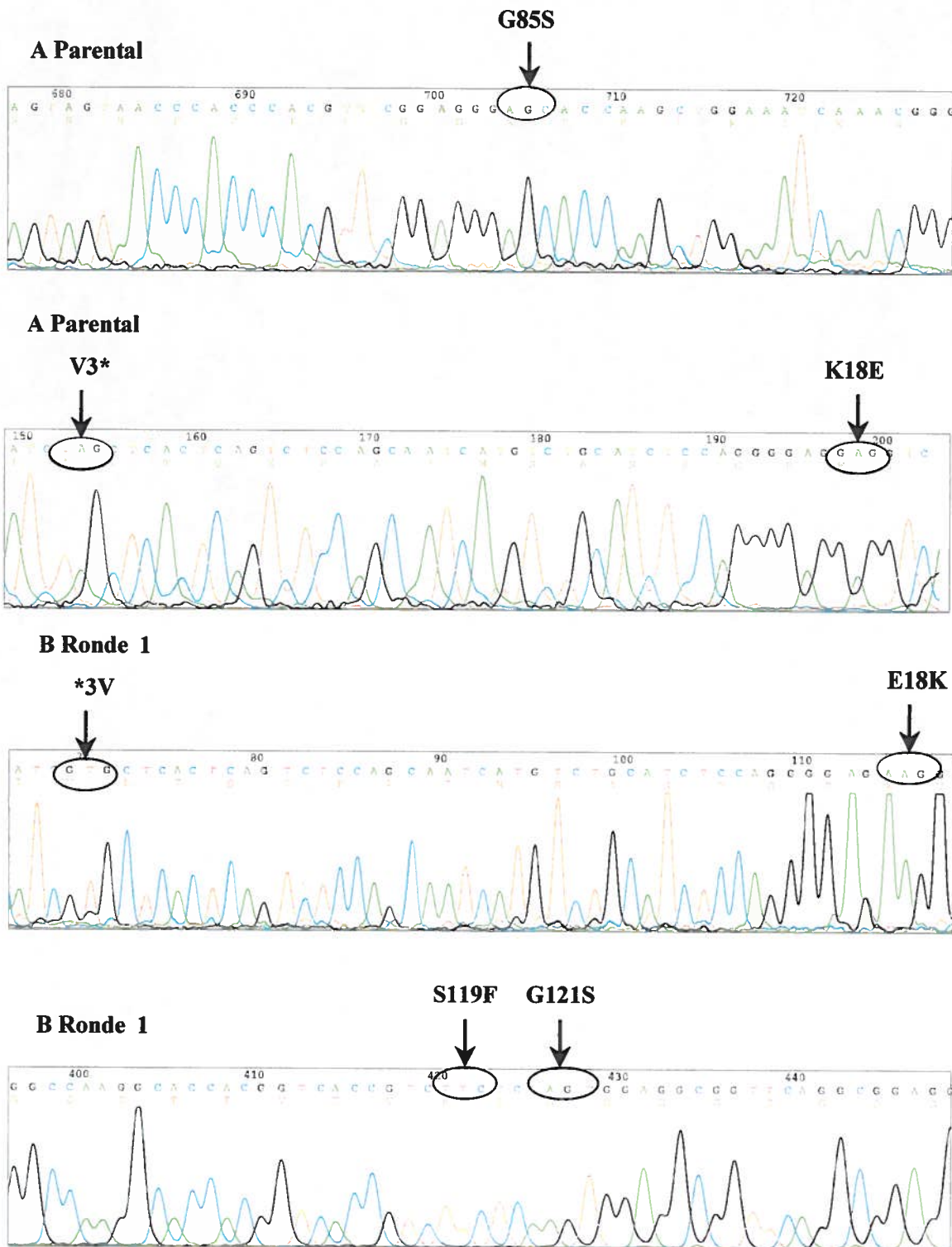


Figure 25. Mutations chez le scFv C595 parental et de ronde 1

La chaîne lourde a été amplifiée avec les amorces 5'Heavy *FseI* et 3'Heavy et la chaîne légère avec les amorces 5'Light Kappa 2 et 3'Light, les amorces 3'Heavy et 3'Light (Tableau IV) permettant de corriger les mutations au niveau de la charnière. Suite à l'assemblage à l'aide des amorces 5'Heavy *FseI* et 3'Light (Tableau IV), le produit de PCR a été cloné dans pCR4Blunt-TOPO, transformé dans des bactéries chimiquement compétentes TOP10 et séquencé avec les amorces M13R et M13F (Tableau IV). Le chromatogramme présenté à la Figure 26 montre que bien que les mutations chez le clone de ronde 1 aient été corrigées, une délétion d'un nucléotide à l'extrémité 3' de la chaîne légère provoquant un changement du cadre de lecture était présente (Figure 26). De la mutagenèse dirigée a été effectuée afin de corriger la séquence du clone de ronde 2.

Un PCR a été effectué avec les amorces 5'Heavy *FseI* et 3'_{V_L}C595-ΔG (Tableau IV) à partir de l'ADN du clone de ronde 2 afin d'amplifier le scFv au complet. Le produit de PCR a été poli, cloné dans pCR4Blunt-TOPO, transformé dans des bactéries chimiquement compétentes TOP10 et séquencé. Le chromatogramme présenté à la Figure 27 indique que la délétion observée à l'extrémité 3' de la chaîne légère du clone 3 a été corrigée. Cependant, les séquences présentées à la Figure 26 montrent l'apparition d'une nouvelle mutation S71P dans la chaîne légère du clone de ronde 3. Puisque cette mutation devait affecter la bonne conformation du scFv, de nouvelles amorces ont été utilisées pour corriger la séquence du scFv anti-MUC-1. Les amorces 5'Heavy *FseI* et 3'_{V_H}C595-ΔP ont permis d'amplifier la chaîne lourde et les amorces 5'_{V_L}C595-ΔP et M13R ont été utilisées pour amplifier la chaîne légère, puis l'assemblage s'est effectué avec les amorces 5'Heavy *FseI* et M13R (Tableau IV). Le produit de PCR a été poli et ligué dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO. Puisque la polymérase utilisée était dotée d'une activité de correction d'épreuve, il était improbable que les mutations observées soient dues au PCR. L'apparition de mutations affectant la conformation du scFv suggérait qu'une faible expression cytoplasmique était toxique aux bactéries. Le produit de ligation a donc été transformé dans les bactéries Top10 F' qui surexpriment le répresseur LacI^q et ont été étalées sur milieu supplémenté de glucose 20 mM. Un clone recombinant a été amplifié et séquencé avec les amorces S3 et S4 (Tableau IV). Ceci a permis d'obtenir un clone sans mutation correspondant à la séquence publiée du scFv C595 anti-MUC-1 (séquence non-montrée). Ceci démontre que ce scFv est toxique pour les bactéries.

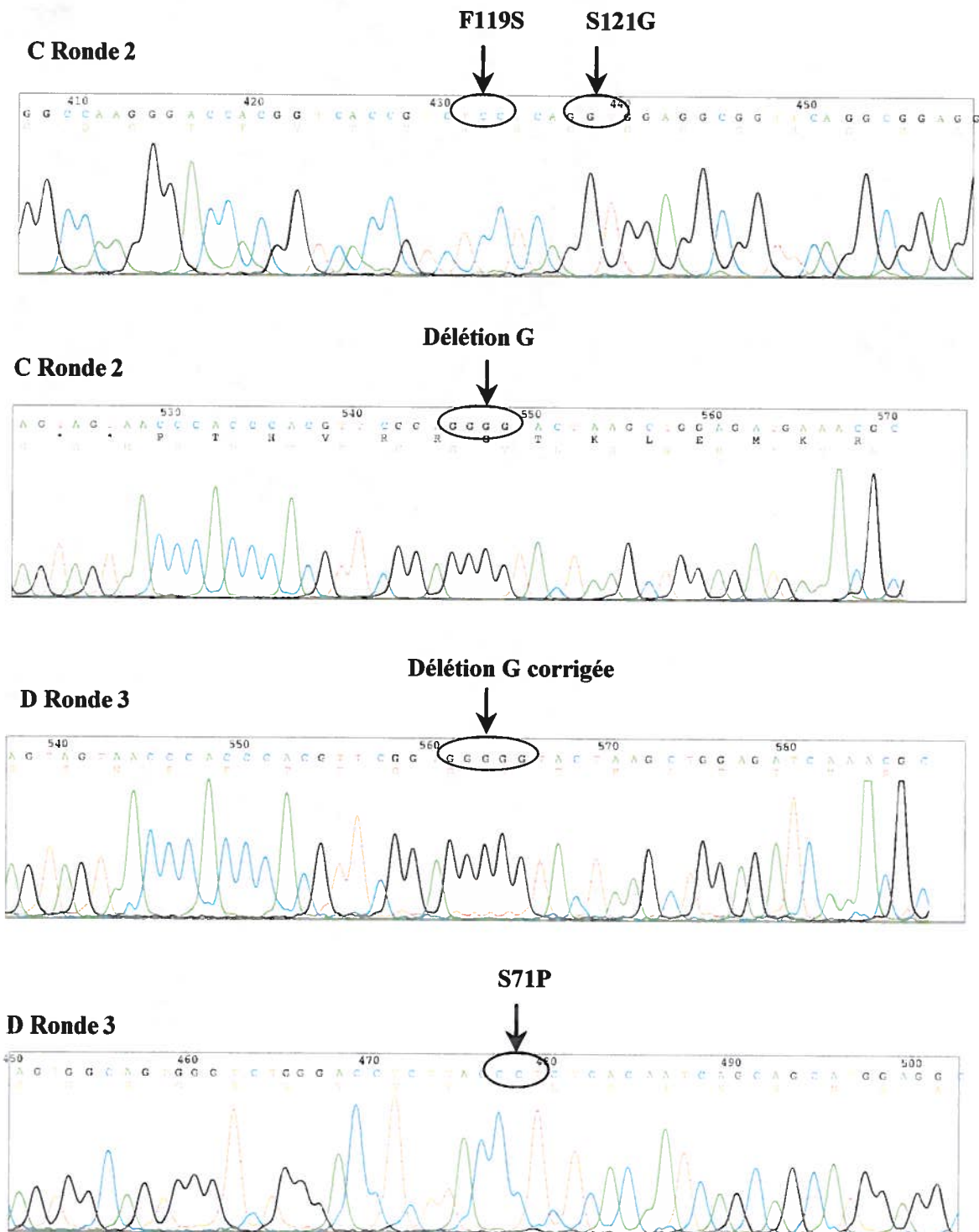


Figure 26. Mutations chez le scFv C595 de ronde 2 et 3

3.8 Clonage du scFv T84.66 anti-CEA

L'extraction d'ARN total à partir de l'hybridome T84.66 s'est effectuée avec du Trizol et l'ADN complémentaire correspondant a ensuite été synthétisé. Deux réactions de PCR ont été réalisées en parallèle: Un PCR avec les amorces 5'Heavy *FseI* et 3'Heavy de manière à amplifier les chaînes lourdes et un autre avec les amorces 5'Light Kappa 2 et 3'Light afin d'amplifier les chaînes légères (Tableau IV). Les produits de PCR ont été purifiés sur gel d'agarose à basse température de fusion et assemblés avec les amorces 5'Heavy *FseI* et 3'Light (Tableau IV). Les extrémités 3' saillantes du produit de PCR ont été polies et la bande d'ADN a été purifiée sur gel d'agarose à basse température de fusion et liguée au vecteur pCR4Blunt-TOPO. Le produit de ligation a été transformé dans des bactéries chimiquement compétentes Top10 F'. L'extraction d'ADN plasmidique a été effectuée par mini-préparation et les clones positifs ont été identifiés par digestion avec *EcoRI*. Un clone recombinant a été sélectionné et amplifié en milieu LB additionné de glucose 20 mM. L'ADN a été séquencé à l'aide des amorces universelles M13R et M13F (Tableau IV) et les séquences obtenues correspondaient à celles publiées dans GeneBank (accession X52768 et X52769).

L'ADN du scFv T84.66 a ensuite été isolé du vecteur pCR4Blunt-TOPO par digestion avec *FseI* et *NotI*, purifié sur gel d'agarose à basse température de fusion et ligué dans les vecteurs d'expression pRSETC et pRSETC-MLF contenant la charnière flexible (Figure 24) et digérés avec les mêmes enzymes. Les produits de ligation ont été transformés dans des bactéries chimiquement compétentes Top10 F'. Les clones positifs ont été identifiés par digestion analytique avec *EcoRI* et *NgoMIV* et des clones recombinants ont été sélectionnés et amplifiés en milieu de culture LB additionné de glucose 20 mM. Les ADN amplifiés ont ensuite été séquencés avec les amorces T7 et T7 terminator (Tableau IV). Bien que les scFvs T84.66 et C595 aient été clonés dans le vecteur d'expression intracellulaire contenant la séquence MLF N-terminale, ils n'ont pas été exprimés en bactéries. En effet, les seules bactéries ayant permis de cloner ces scFvs est la souche TOP10 F' (surexprimant LacI^q) chez lesquelles la répression catabolique avait été activée par ajout de glucose. Étant donné la toxicité élevée associée à l'expression intracellulaire des scFvs, il était anticipé qu'une forte instabilité plasmidique soit observée.

3.9 Conjugaison chimique de l'anticorps T84.66

Afin de pallier à la toxicité associée à la production de scFvs formylés en bactéries, une approche alternative a été utilisée. Celle-ci consiste à conjuguer directement un peptide formylé à un anticorps à l'aide d'un agent hétéro-bifonctionnel. L'anticorps anti-CEA T84.66 a été choisi pour ceci et a été obtenu à partir du surnageant d'hybridome. Une fois purifié par chromatographie d'affinité sur protéine A, l'anticorps a été visualisé sur gel SDS-PAGE de 10%. Suite à une coloration négative au zinc, deux bandes majeures ont été observées, la bande 50 kDa correspondant à la masse moléculaire des deux chaînes lourdes, alors que la bande de 25 kDa correspond aux chaînes légères (Figure 27). Ces résultats démontrent que la technique de purification utilisée permet d'obtenir un anticorps ayant un haut degré de pureté.

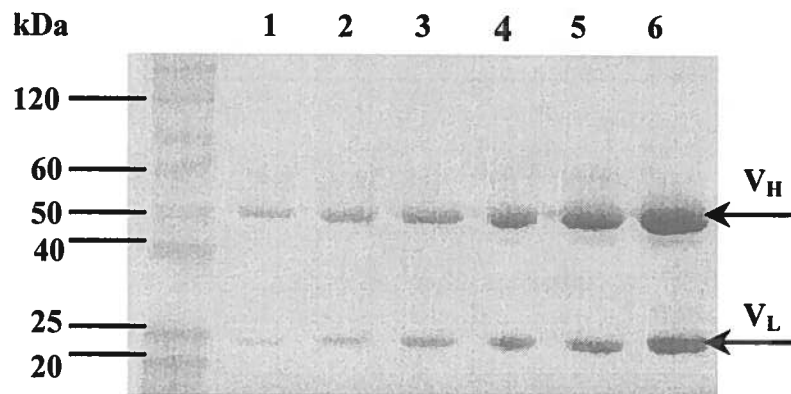


Figure 27. Analyse de l'anticorps T84.66 purifié par SDS-PAGE 8%

1: 100 ng; 2: 250 ng; 3: 500 ng; 4: 1 μ g; 5: 2 μ g; 6: 5 μ g

L'anticorps purifié a ensuite été conjugué avec l'agent hétéro-bifonctionnel Sulfo-succinimidyl-4-[*p*-maleimidophenyl] Butyrate (Sulfo-SMBP). Le groupement réactif NHS-ester réagit avec les amines primaires présentes à la surface de l'anticorps, alors que le groupement maléimide réagit avec la cystéine C-terminale qui a été introduite sur le peptide synthétique formylé. Le Sulfo-SMBP a été sélectionné car l'espacement de 14.5Å entre ses deux extrémités peut favoriser une meilleure interaction avec le FPR. La séquence du peptide synthétique est montrée à la Figure 28. Le motif fMLF a été introduit en position N-terminale, une cystéine a été placée à l'extrémité C-terminale, et un site de clivage de cathepsine B optimal [84] a été placé au centre du peptide. Le site de cathepsine a été introduit pour favoriser la génération de peptides plus courts suite à l'internalisation de l'anticorps dans les endosomes contenant cette enzyme [121].

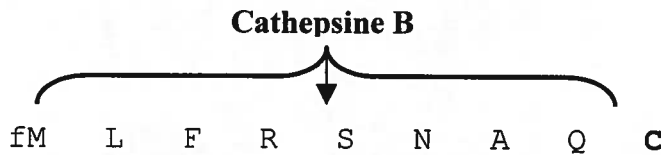


Figure 28. Séquence du peptide synthétique utilisé

Suite à la conjugaison chimique, l'anticorps a été analysé sur gel SDS-PAGE de 10 %. Les patrons de migration présentés à la Figure 28 montrent l'augmentation de masse moléculaire des chaînes lourdes et légères de l'anticorps suite à la conjugaison chimique. La piste 1 montre que les chaînes lourdes et légères de l'anticorps non conjugué ont des masses moléculaires respectives de 50 et 25 kDa. La piste 2 montre que la masse moléculaire des chaînes lourdes et légères de l'anticorps conjugué avec l'agent de pontage dont le groupement maléimide a été bloqué avec de la cystéine libre augmente par rapport à l'anticorps natif. La piste 3 montre le profil des chaînes lourdes et légères de l'anticorps auquel l'agent de pontage et le peptide formylé ont été ajoutés. L'augmentation de masse moléculaire est beaucoup plus importante puisque qu'une augmentation de masse de 1,097 Da est attendue pour chaque peptide conjugué à l'agent de pontage. Ces résultats montrent aussi une augmentation de masse moléculaire plus importante au niveau de la chaîne lourde que de la chaîne légère, ce qui était attendu puisque la première possède plus de groupements aminés primaires pouvant réagir avec le sulfo-SMBP. Les bandes de masse moléculaire plus élevées correspondent probablement à des liens covalents formés entre les anticorps dont les ponts disulfures étaient réduits, donc pouvant réagir avec la maléimide de l'agent de pontage.

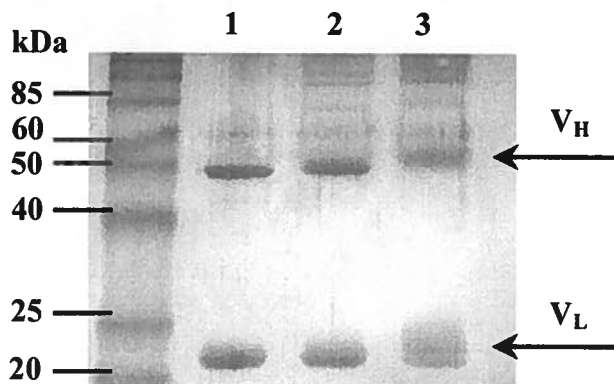


Figure 29. Analyse de la conjugaison de T84.66 par SDS-PAGE 10%

1: T84.66 non-conjugué; 2: T84.66 + SMPB; 3: T84.66 + SMBP et peptide formylé

3.10 Évaluation de l'activité biologique de l'anticorps conjugué

Suite à la conjugaison *in vitro*, la liaison de l'anticorps T84.66 formylé a été testée sur des cellules LS 174T qui expriment le marqueur tumoral CEA ainsi que sur des cellules HEK-293, négatives pour cet antigène. Pour chaque population cellulaire, un marquage témoin a été effectué avec un témoin isotypique IgG1 κ . Le profil de cytométrie de la Figure 30 montre le déplacement le plus significatif, observé avec une concentration finale d'anticorps de 10 μ M. Aucun déplacement n'a été observé avec la lignée HEK-293 peu importe la concentration d'anticorps utilisée (données non présentées). Ces résultats montrent que la conjugaison n'affecte pas la capacité de l'anticorps de lier CEA, puisque le niveau de fluorescence est similaire entre l'anticorps formylé et l'anticorps natif.

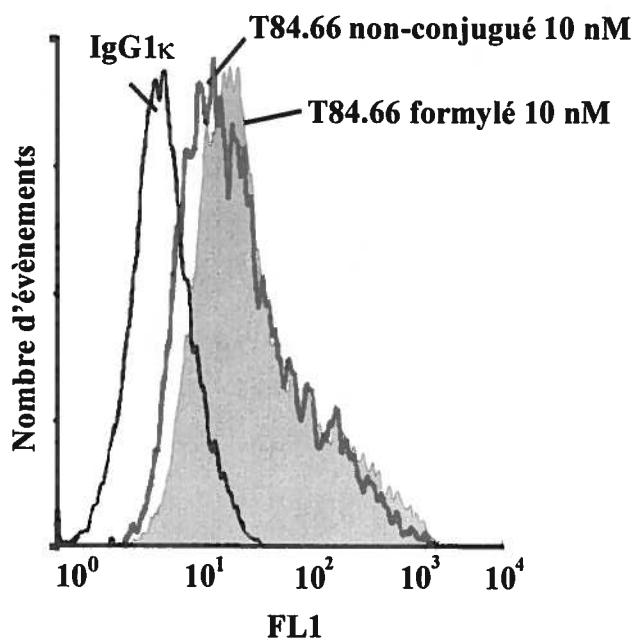


Figure 30. Spécificité antigénique de l'anticorps T84.66 conjugué

Des tests ont été effectués en chambre de Boyden modifiée pour évaluer le potentiel chimiotactique de l'anticorps formylé. Différentes concentrations d'anticorps ont été utilisées et une augmentation d'indice de migration a été observée de manière dose dépendante, avec une courbe en forme de cloche typique de la réponse aux chimiokines (Figure 30). Le pouvoir chimiotactique de l'anticorps formylé était par contre inférieur à celui du témoin fMLP, la concentration optimale d'anticorps formylé se situant à 100 μ M par rapport à 10 μ M pour le fMLP. À cette concentration, l'anticorps formylé a

cependant induit une migration supérieure à celle observée avec le témoin positif à sa dose optimale. Ces résultats confirment l'efficacité de la conjugaison montrée à la Figure 29, puisque l'anticorps non conjugué n'induit aucune migration. Ces résultats permettent de conclure qu'un anticorps chimiquement formylé peut avoir un fort pouvoir chimiotactique envers les neutrophiles. Un des avantages de la conjugaison chimique est la possibilité d'introduire plus d'un groupement formate par anticorps, ce qui pourrait augmenter son potentiel chimiotactique.

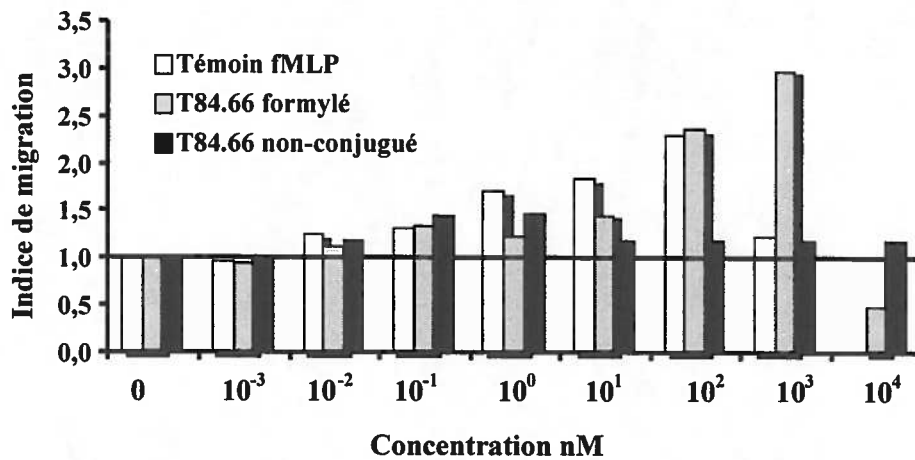


Figure 31. Migration induite par l'anticorps T84.66 formylé

4. DISCUSSION

4.1 Production de protéines formylées en bactéries

La première partie de ce projet visait d'abord à démontrer qu'une protéine entière formylée produite en bactéries pouvait être biologiquement active. Plusieurs systèmes d'expression bactériens ont été explorés et seule la souche BL21-SI s'est avérée permissive à la production de GFP lorsque la déformylase était inhibée ou surexprimée. La toxicité associée au système d'inhibition transitoire de la déformylase était probablement due à un niveau d'expression basal en absence d'inducteur chez la souche BL21[DE3] pLysS, ce qui provoquait une diminution de croissance et une instabilité plasmidique. Cette souche bactérienne utilise le promoteur *lacUV5* qui est fuyant et ne permet pas de produire en grande quantité des protéines toxiques. L'utilisation des BL21-SI au dépend des BL21[DE3] pLysS a ainsi permis de produire une grande quantité de GFP sans toxicité apparente. Cette souche bactérienne permet d'exercer un contrôle hautement régulé du niveau d'expression basal car l'ARN polymérase du phage T7 est placée sous le contrôle du promoteur *proU*. Ce promoteur possède un niveau d'expression basal nul en absence d'inducteur ce qui permet de réduire la toxicité, sans instabilité plasmidique. Il a en plus été proposé que le choc osmotique utilisé pour l'induction des BL21-SI pourrait augmenter la solubilité des protéines [8].

Les analyses en spectrométrie de masse ont permis de démontrer que la GFP produite en bactéries était majoritairement formylée, aussi bien dans les systèmes d'inhibition ou de surexpression de la déformylase. Ces profils ont permis d'identifier un pic majoritaire correspondant à une masse moléculaire calculée pour la GFP formylée, soit 28,743 Da. Puisque la masse moléculaire théorique d'un groupement formate est de 28 daltons, les variations observées ne sont pas assez élevées pour correspondre à l'espèce déformylée de la GFP. Il a été démontré que seulement 10 copies de déformylase sont normalement présentes par cellule chez les bactéries Gram- [68]. Les résultats obtenus suggèrent donc qu'une simple surexpression de la protéine d'intérêt permettrait de saturer le système de déformylation endogène de la bactérie. L'utilisation du système d'inhibition transitoire de la déformylase semblerait donc inutile, ce qui permettrait de diminuer la toxicité associée à l'inhibition de l'enzyme.

Les résultats obtenus en chimiotactie démontrent que la GFP formylée produite en bactéries possède une forte activité biologique envers les neutrophiles. Les données obtenues montrent que la GFP formylée induit un profil de migration en forme de cloche typique de la plupart des chimiokines. La migration observée semble aussi être spécifique au groupement formate présent à l'extrémité N-terminale de la GFP puisque l'ajout d'un anticorps neutralisant anti-FPR inhibe complètement le phénomène de migration observé. Cette inhibition suggère aussi que les procédures de purification utilisées afin d'éliminer les LPS en solution sont efficaces. Cette étape de détoxication est primordiale puisqu'une production de protéine en bactérie Gram-négatif engendre automatiquement une forte contamination par les LPS. Ce type d'endotoxine est un puissant activateur du système immunitaire. Les LPS se lient aux récepteurs membranaires CD14 présents à la surface des leucocytes par l'intermédiaire du complexe LPS-LBP (LPS binding protein) [98]. CD14 est présent sur la majorité des monocytes et sur 20% à 40% des PMNs [91]. L'expression de ce récepteur à la surface des neutrophiles peut être augmentée suite à une stimulation aux fMLP [91; 131]. En déclenchant l'activation des neutrophiles, la présence de ces pyrogènes pourrait facilement biaiser le potentiel chimiotactique de la GFP formylée. Les analyses en cytométrie semblent aussi indiquer que la liaison de la GFP formylée aux neutrophiles est spécifique au FPR puisque la fluorescence observée en FL1 augmente en fonction de la concentration utilisée. Des analyses subséquentes avec l'anticorps anti-FPR devront par contre être effectuées afin de confirmer les résultats obtenus. De par ces résultats, il est clair qu'une protéine formylée générée en bactéries peut être biologiquement active et fonctionnelle comme agent chimiotactique envers les neutrophiles et ce, malgré une séquence N-terminale non-optimale.

Dans le but d'améliorer le pouvoir chimiotactique de la GFP le motif MLF a été introduit à l'extrémité N-terminale de la protéine. De plus, puisqu'il a été démontré que la longueur des peptides influençait directement leur pouvoir chimiotactique [29], un site de clivage pour la collagénase de neutrophiles (MMP-8) a été introduit après le motif MLF. Selon une étude, cette séquence de huit acides aminés (GPQGIWGQ) a été déterminée expérimentalement comme étant le substrat préféré par cette enzyme [78]. Sachant que les neutrophiles libèrent la MMP-8 et dans l'espoir de provoquer une dégranulation localisée au niveau de la tumeur, l'introduction de ce site de clivage pourrait permettre de

généraliser des peptides plus courts possédant ainsi un pouvoir chimiotactique plus élevé. La libération de ces courts fragments peptidiques pourrait aussi favoriser l'établissement d'un gradient de molécules plus chimiotactiques nécessaire au recrutement maximal des neutrophiles. Ces constructions ont été créées, mais des analyses subséquentes devront être effectuées afin d'évaluer leur degré de formylation en bactéries. Le pouvoir chimiotactique de la GFP optimisée devra aussi être évalué et comparé avec les résultats obtenus pour la forme non-optimale. Par des analyses futures, il serait aussi intéressant d'évaluer l'efficacité de dégranulation des neutrophiles en mesurant l'activité enzymatique de la MMP-8. Le pouvoir chimiotactique des courts fragments peptidiques générés suite au clivage de l'enzyme devra aussi être comparé à celui des molécules complètes.

4.2 Génération de scFvs intra-cellulaires

Un autre volet de ce projet consistait à générer, en bactéries, des molécules de ciblage spécifiques aux cellules cancéreuses. Afin de cibler les cellules cancéreuses, les scFvs spécifiques à MUC-1 et CEA ont été choisis. Ces deux scFvs ont été générés à partir des anticorps C595 et T84.66. Les étapes de clonage du scFv T84.66 se sont effectuées selon les conditions optimum utilisées lors du clonage du scFv C595. La répression catabolique par le glucose ainsi que l'utilisation d'une souche bactérienne *lacI^q* ont permis de générer des scFvs fonctionnels sans toxicité apparente. Aucune mutation ponctuelle, substitution ou délétion n'a été observée. Les résultats de séquençage présentés aux Figures 25 et 26 semblent démontrer une forte toxicité associée à la production en bactéries du scFv anti-MUC-1. Des mutants non-fonctionnels de la protéine ont été générés lors des différents clonages chez les souches DH5 α et TOP10. Une des mutations initialement observées au niveau de la chaîne légère du clone parental correspondait à la substitution d'une valine pour un codon de terminaison, empêchant ainsi la traduction du scFv complet. Bien que ces mutations aient été corrigées par mutagenèse dirigée, deux autres substitutions d'acides aminés ont été remarquées au niveau de la charnière flexible. Encore ici, les clones corrigés pour ces deux mutations présentaient une autre anomalie, soit la délétion d'une paire de bases à l'extrémité C-terminale de la chaîne légère. Cette délétion provoquait un changement de cadre de lecture, donc la synthèse d'un scFv non-fonctionnel. La mutagenèse dirigée a permis de corriger cette nouvelle aberration, mais

une autre mutation ponctuelle a provoqué cette fois-ci la substitution d'une sérine pour une proline. Puisque les prolines possèdent la capacité de briser la structure des hélices α et des feuillets β [80], cette mutation pourrait perturber la structure tridimensionnelle de la protéine. Des corrections ont donc été apportées au clone muté afin de restaurer la fonctionnalité du scFv.

L'ADN corrigé a cette fois-ci été transformée dans des Top10 F'. Cette souche surexprime le repressur *lacI^q* porté sur l'épisme F' [22; 30]. En étant présent en plus grand nombre, le repressur *lacI^q* se lie à l'opérateur et empêche l'ARN polymérase d'initier la transcription [30]. Les gènes possédant le promoteur *lac* restent donc silencieux. L'utilisation d'une telle souche bactérienne permet de réguler la transcription des gènes placés sous le contrôle du promoteur *lac* favorisant ainsi la production de protéines toxiques. Cependant, puisque l'ARN polymérase peut se fixer au promoteur même en absence d'inducteur, un niveau d'expression basal peut être observé et peut mener à des effets indésirables dans le cas de protéines toxiques. Cette fuite du promoteur *lac* a donc été contrôlée en ajoutant au milieu de culture une concentration de 20 mM de glucose de manière à activer la répression catabolique et à diminuer l'affinité de l'ARN polymérase envers son promoteur. Ainsi, en utilisant la répression catabolique, il est possible d'exercer un contrôle hautement plus régulé de la transcription des gènes placés sous la dépendance d'un promoteur *lac*. Ceci permet de minimiser le niveau basal d'expression des protéines recombinantes diminuant ainsi la toxicité associée à la production d'une protéine toxique. L'utilisation d'une souche bactérienne *lacI^q* combinée à la répression catabolique a donc permis de générer des scFvs anti-MUC-1 correctement synthétisés et fonctionnels ne présentant aucune mutation ou délétion.

La toxicité associée à la production en bactéries du scFv C595 pourrait s'expliquer par la liaison de l'anticorps à une protéine cytoplasmique essentielle à la survie bactérienne. Ainsi, suite aux différentes pressions de sélection, seules les bactéries ayant généré une forme non-fonctionnelle du scFv seraient viables. Par analyses protéomiques telles, l'immunoprécipitation et la dégradation d'Edman, il serait possible d'identifier la protéine cible reconnue par le C595. Puisque l'AcMo C595 reconnaît le térapeptide RPAP compris à l'intérieur des VNTR exposés au niveau du domaine extracellulaire de

l'espèce hypoglycosylée de MUC-1 [87]. À l'aide du logiciel Blast, le motif RPAP a été comparé aux séquences théoriques du génome d'*E. coli* présentes dans GeneBank. Suite à ces analyses, un candidat potentiel a été sélectionné comme cible du scFv. La méthionine synthase (MetH) possède un domaine ayant 100% d'homologie avec le térapeptide reconnu par l'anticorps. Cette enzyme cytosolique est impliquée dans la biosynthèse de la méthionine [47; 118] et son inactivation pourrait être néfaste pour la survie des bactéries. Malgré une structure tridimensionnelle non-optimale, la liaison du scFv C595 à la MetH pourrait expliquer l'apparition des mutations observées au cours des différents clonages dans une souche ne permettant pas d'exercer un contrôle efficace de la transcription.

La production de scFvs fonctionnels et formylés en bactéries présente de nombreuses difficultés. Puisqu'une forte toxicité est associée à la production de ce type de molécule, l'utilisation d'une souche bactérienne permettant d'exercer un contrôle efficace de la transcription est requise. La souche BL21-SI qui permet d'obtenir un niveau d'expression basal nul en absence d'inducteur ainsi que les Top10 F' qui possèdent le répresseur *lac* pourraient à première vue représenter des candidats potentiels pour la production de scFvs. De manière à conserver le groupement formate à l'extrémité N-terminale, les scFvs doivent obligatoirement prendre leur conformation native à l'intérieur du cytoplasme. Le cytosol bactérien est par contre un environnement réducteur où la formation de ponts disulfures nécessaires pour produire des scFvs fonctionnels est non-optimale. Bien que ces souches permettent la production de scFvs fonctionnels, il apparaît impossible d'utiliser ce type de bactéries pour produire des scFvs formylés. Il existe certaines souches bactériennes permettant de former de ponts disulfures intra-chaîne. La souche ORIGAMI B [DE3] a été utilisée pour produire des protéines contenant plusieurs ponts disulfures [75; 85]. Cette souche est par contre un dérivé des systèmes *lac* et ne permet pas la production de protéines toxiques. Puisque le promoteur *lacUV5* est fuyant, un niveau d'expression basal est observé en absence d'inducteur. Lorsque la protéine d'intérêt présente une forte toxicité, cette fuite provoque une croissance bactérienne fortement ralentie et une instabilité plasmidique. L'utilisation des ORIGAMI B [DE3] semble donc contre-indiquée pour produire des scFvs fonctionnels. Par des techniques de recombinaison génétique, il serait intéressant de dériver une nouvelle souche bactérienne en inactivant les gènes *gor* et *trx* chez les BL21-SI. La

souche résultante permettrait la formation de ponts disulfures cytoplasmiques et une expression hautement régulée. L'utilisation d'une telle souche permettrait ainsi de produire des scFvs formylés fonctionnels sans toxicité.

4.3 Production d'anticorps formylés par conjugaison chimique

Les scFvs possèdent certains avantages cliniques considérables par rapport aux anticorps complets. Ils possèdent entre autres une masse moléculaire réduite ce qui leur confère une meilleure pénétration tumorale [42]. De plus, contrairement aux anticorps, il est possible de les produire en bactéries. Par contre, la nécessité d'exprimer les scFvs à l'intérieur du cytoplasme afin de conserver le groupement formate engendre plusieurs contraintes quant aux choix du système d'expression bactérien. Aucune souche permettant la production de scFvs formylés et fonctionnels n'est disponible.

De manière à contrer les difficultés engendrées par la production de scFvs en bactéries, une approche alternative qui consistait à formyler chimiquement un anticorps complet a été utilisée. Afin d'introduire un groupement formate sur l'anticorps anti-CEA T84.66, un agent de pontage hétéro-bifonctionnel a été utilisé. L'agent de pontage possédait à l'une de ces extrémités, un groupement NHS-ester qui réagit avec les amines primaires (lysine, arginine) présentes à la surface des protéines [35; 56]. Puisque ce type d'acides aminés est abondant sur la plupart des protéines, l'utilisation de cet agent de pontage permet d'obtenir une liaison efficace sur plusieurs types de molécules comme les anticorps. L'agent de pontage contenait à l'autre extrémité, un groupement maléimide qui réagit avec les groupements sulfhydryles. Ainsi, en catalysant la conjugaison des groupements sulfhydryles, l'utilisation de ce type d'agent de pontage permet de lier les cystéines libres [1; 56]. Le peptide synthétique formylé de 9 acides aminés utilisé lors de la conjugaison possédait à son extrémité N-terminale, la séquence MLF optimale au recrutement de neutrophiles. Le site de clivage de la cathepsine B MLFR↓SNAQ [84] qui chevauche le motif MLF a aussi été introduit. Le peptide synthétique possédait une cystéine libre C-terminale lui permettant de réagir avec le groupement maléimide de l'agent de pontage. Les groupements NHS-ester et maléimide situés à chacune des extrémités de l'agent de pontage étaient séparés de 14.5 Å, augmentant ainsi l'accessibilité du peptide formylé au récepteur FPR, situé à la surface des neutrophiles.

Tout comme les complexes ligand-récepteur, la liaison d'un anticorps à son antigène présent à la surface cellulaire provoque une internalisation subséquente du complexe anticorps-antigène [71; 102; 119]. Suite à une déphosphorylation, la plupart des complexes endocytosés sont recyclés vers la membrane plasmique [82]. Bien que de nombreuses molécules soient récupérées à partir des endosomes et réutilisées par la cellule, une partie finit dans les lysosomes, où elles sont dégradées par plusieurs types d'enzymes hydrolytiques, notamment la cathepsine B [59]. La cathepsine B est une protéinase à cystéine lysosomiale impliquée dans l'hétérophagie ainsi que dans la dégradation et le renouvellement intracellulaire de certaines protéines.[93]. Ainsi, suite à l'internalisation de l'anticorps T84.66 formylé, celui-ci serait dégradé dans les lysosomes où la cathepsine B pourrait cliver son substrat. Plusieurs études ont démontré l'internalisation des AcMo anti-CEA chez des lignées cellulaires exprimant un fort niveau de cet antigène [25; 60; 119]. L'expression de la cathepsine B est en plus fortement augmentée dans plusieurs types de tumeurs malignes [93; 133] augmentant ainsi la susceptibilité du peptide à être clivé. L'ajout du site de clivage de cathepsine B après le motif MLF du peptide synthétique pourrait permettre de générer des courts peptides formylés. La libération de ces fragments pourrait ainsi favoriser l'établissement d'un gradient de molécules plus chimiotactiques au niveau de la tumeur permettant le recrutement maximal de neutrophiles et la destruction des cellules tumorales.

Bien que préliminaires, les résultats obtenus quant à l'activité biologique des anticorps formylés chimiquement sont prometteurs. La visualisation sur gel SDS-PAGE des anticorps formylés montre une conjugaison efficace de l'anticorps T84.66. Une augmentation graduelle de la masse moléculaire des chaînes lourdes et légères a été observée selon la présence ou non de l'agent de pontage ainsi que du peptide synthétique. Ces résultats montrent une augmentation de masse moléculaire beaucoup plus importante au niveau des chaînes lourdes qu'au niveau des chaînes légères. Cette différence pourrait s'expliquer par la présence d'un plus grand nombre d'acides aminés basiques sur la partie Fc de l'anticorps sujets à réagir avec le NHS-ester. Des tests de cytométrie en flux ainsi que des tests de chimiotactie ont permis d'évaluer l'activité biologique de l'anticorps formylé. Les tests de liaison de l'anticorps formylé sur la lignée LS 174T permettent d'affirmer que la conjugaison chimique n'influence en rien l'affinité de l'anticorps

puisque le déplacement de la population observé en FL1 est identique à celui observé avec l'anticorps non-conjugué. Les résultats obtenus en chimiotactie indiquent aussi que les anticorps formylés chimiquement possèdent un pouvoir chimiotactique envers les neutrophiles, bien que la concentration requise pour induire une migration optimale soit légèrement supérieure à celle requise par le témoin fMLP. Cette différence pourrait s'expliquer par la taille des molécules chimiotactiques. En étant beaucoup plus court que l'anticorps complet formylé, le témoin posséderait de surcroît un pouvoir chimiotactique plus élevé. La migration observée est nécessairement due à la présence du groupement formate introduit, puisque les anticorps non-conjugués n'induisent aucune migration. Des analyses subséquentes devront être effectuées avec l'anticorps anti-FPR de manière à évaluer la spécificité de la migration.

Bien qu'encourageants, les résultats présentés dans ce mémoire demeurent encore préliminaires. Des études subséquentes devront être effectuées de manière à contrôler rigoureusement le taux de conjugaison. Un contrôle précis de la conjugaison pourrait permettre d'optimiser le pouvoir chimiotactique de l'anticorps sans nuire à son affinité. Il serait intéressant d'évaluer le niveau d'internalisation des anticorps anti-CEA formylés sur différentes lignées cellulaires, ainsi que l'efficacité de la cathepsine B à cliver son substrat.

5. CONCLUSION

Cette étude a permis de démontrer qu'il est possible de produire des protéines formylées en bactéries. Les tests de cytométrie en flux et de chimiotactie ont démontré pour la première fois que des protéines complètes formylées sont des agents chimiotactiques fonctionnels envers les neutrophiles. Bien que l'inhibition de la déformylase soit associée à une toxicité élevée, il a été démontré que l'inhibition n'est pas requise pour produire des protéines formylées, puisque la surexpression sature le système de déformylation.

La production de molécules formylées en bactéries nécessite une expression cytoplasmique. Les résultats démontrent que la production du scFv anti-MUC-1 est hautement toxique pour les bactéries, ce qui requiert un système d'expression régulé. Parmi les systèmes utilisés, seuls ceux ayant un niveau d'expression basal faible en absence d'inducteur ont permis d'obtenir des scFvs sans mutation. Cette forte pression sélective suggère qu'il serait difficile de produire à grande échelle des scFvs cytoplasmiques. La raison de cette toxicité reste cependant à être identifiée, mais la protéine MetH pourrait être l'une des cibles. Des études subséquentes permettraient de valider cette cible comme étant celle associée à la toxicité du scFv C595.

Bien que les résultats obtenus soient prometteurs, plusieurs analyses *in vitro* restent à être effectuées afin d'en valider l'efficacité. Des tests de cytotoxicité *in vitro* devront être effectués pour évaluer le potentiel anti-tumoral pour recruter les neutrophiles et détruire les cellules cancéreuses. Il serait intéressant de conjuguer chimiquement le scFv anti-CEA et comparer son activité biologique à celle de l'anticorps complet.

Suite à la validation du modèle *in vitro*, les anticorps et scFvs formylés devront être utilisés dans des modèles murins afin d'évaluer leur potentiel anti-tumoral. Par immunoscintigraphie, il serait possible de vérifier la localisation tissulaire des molécules de ciblage et évaluer la destruction des tumeurs. Il serait important d'évaluer l'étendue de la réponse inflammatoire non-spécifique, car un stimulus inflammatoire généralisé pourrait mener au choc septique et une défaillance multi-viscérale. Une concentration sanguine trop élevée de molécules formylées pourrait mener à des effets indésirables si l'accumulation des molécules de ciblage envers les tumeurs est peu efficace.

L'usage des neutrophiles en immunothérapie du cancer demeure une avenue prometteuse mais encore peu exploitée. Avec l'essor des connaissances en immunologie et les percées en biotechnologie, il devient envisageable de produire à grande échelle des molécules de ciblage hautement spécifiques. Il apparaît probable que cette nouvelle forme d'immunothérapie pourrait devenir un outil complémentaire à la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie dans la lutte au cancer.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. ABBOTT, R.E., D. SCHACHTER, E.R. BATT et M. FLAMM. 1986. Sulfhydryl substituents of the human erythrocyte hexose transport mechanism. Am J Physiol, vol. 250. no. 6 Pt 1, p. C853-860.
2. ABOU-JAOUDE, M.M., I. GHANTOUS et W.Y. ALMAWI. 2003. Comparison of daclizumab, an interleukin 2 receptor antibody, to anti-thymocyte globulin-Fresenius induction therapy in kidney transplantation. Mol Immunol, vol. 39. no. 17-18, p. 1083-1088.
3. ADAMS, G.P., C.C. SHALLER, L.L. CHAPPELL, C. WU, E.M. HORAK, H.H. SIMMONS, S. LITWIN, J.D. MARKS, L.M. WEINER et M.W. BRECHBIEL. 2000. Delivery of the alpha-emitting radioisotope bismuth-213 to solid tumors via single-chain Fv and diabody molecules. Nucl Med Biol, vol. 27. no. 4, p. 339-346.
4. AHSAN, N. 2003. Induction immunotherapy with IL-2Ra monoclonal antibody in kidney transplantation. Minerva Urol Nefrol, vol. 55. no. 1, p. 67-79.
5. BAGGIOLINI, M., U. BRETZ, B. DEWALD et M.E. FEIGENSON. 1978. The polymorphonuclear leukocyte. Agents Actions, vol. 8. no. 1-2, p. 3-10.
6. BALBAS, P. 2001. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. Mol Biotechnol, vol. 19. no. 3, p. 251-267.
7. BEN-BASSAT, A., K. BAUER, S.Y. CHANG, K. MYAMBO, A. BOOSMAN et S. CHANG. 1987. Processing of the initiation methionine from proteins: properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure. J Bacteriol, vol. 169. no. 2, p. 751-757.
8. BHANDARI, P. et J. GOWRISHANKAR. 1997. An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. J Bacteriol, vol. 179. no. 13, p. 4403-4406.
9. BROCKHAUSEN, I., J.M. YANG, J. BURCHELL, C. WHITEHOUSE et J. TAYLOR-PAPADIMITRIOU. 1995. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. Eur J Biochem, vol. 233. no. 2, p. 607-617.
10. BURCHELL, J., R. POULSOM, A. HANBY, C. WHITEHOUSE, L. COOPER, H. CLAUSEN, D. MILES et J. TAYLOR-PAPADIMITRIOU. 1999. An alpha2,3 sialyltransferase (ST3Gal I) is elevated in primary breast carcinomas. Glycobiology, vol. 9. no. 12, p. 1307-1311.
11. CAIRNS, C.M., J.R. GORDON, F. LI, M.E. BACA-ESTRADA, T. MOYANA et J. XIANG. 2001. Lymphotactin expression by engineered myeloma cells drives tumor regression: mediation by CD4+ and CD8+ T cells and neutrophils expressing XCR1 receptor. J Immunol, vol. 167. no. 1, p. 57-65.

12. CASSATELLA, M.A. 1999. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. Adv Immunol, vol. 73. no., p. 369-509.
13. CHALFIE, M. 1995. Green fluorescent protein. Photochem Photobiol, vol. 62. no. 4, p. 651-656.
14. CHESTER, K.A., A. MAYER, J. BHATIA, L. ROBSON, D.I. SPENCER, S.P. COOKE, A.A. FLYNN, S.K. SHARMA, G. BOXER, R.B. PEDLEY, *et al.* 2000. Recombinant anti-carcinoembryonic antigen antibodies for targeting cancer. Cancer Chemother Pharmacol, vol. 46 Suppl. no., p. S8-12.
15. CHIANG, C.F., D.T. OKOU, T.B. GRIFFIN, C.R. VERRET *et* M.N. WILLIAMS. 2001. Green fluorescent protein rendered susceptible to proteolysis: positions for protease-sensitive insertions. Arch Biochem Biophys, vol. 394. no. 2, p. 229-235.
16. CORMACK, B.P., R.H. VALDIVIA *et* S. FALKOW. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). Gene, vol. 173. no. 1 Spec No, p. 33-38.
17. CRAMERI, A., E.A. WHITEHORN, E. TATE *et* W.P. STEMMER. 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. Nat Biotechnol, vol. 14. no. 3, p. 315-319.
18. DENTON, G., G.M. DAVIES, M.J. SCANLON, S.J. TENDLER *et* M.R. PRICE. 1995. Primary sequence determination and molecular modelling of the variable region of an antiMUC1 mucin monoclonal antibody. Eur J Cancer, vol. 31A. no. 2, p. 214-221.
19. DI CARLO, E., G. FORNI *et* P. MUSIANI. 2003. Neutrophils in the antitumoral immune response. Chem Immunol Allergy, vol. 83. no., p. 182-203.
20. DI CARLO, E., M. IEZZI, T. PANNELLINI, F. ZACCARDI, A. MODESTI, G. FORNI *et* P. MUSIANI. 2001. Neutrophils in anti-cancer immunological strategies: old players in new games. J Hematother Stem Cell Res, vol. 10. no. 6, p. 739-748.
21. DILLMAN, R.O. 1999. Perceptions of Herceptin: a monoclonal antibody for the treatment of breast cancer. Cancer Biother Radiopharm, vol. 14. no. 1, p. 5-10.
22. DUBENDORFF, J.W. *et* F.W. STUDIER. 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. J Mol Biol, vol. 219. no. 1, p. 45-59.
23. EMMANOUILIDES, C. 2003. Radioimmunotherapy for non-Hodgkin's lymphoma. Semin Oncol, vol. 30. no. 4, p. 531-544.

24. FINN, O.J., K.R. JEROME, R.A. HENDERSON, G. PECHER, N. DOMENECH, J. MAGARIAN-BLANDER et S.M. BARRATT-BOYES. 1995. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. Immunol Rev, vol. 145. no., p. 61-89.
25. FORD, C.H., G.C. TSALTAS, P.A. OSBORNE et K. ADDETIA. 1996. Novel flow cytometric analysis of the progress and route of internalization of a monoclonal anti-carcinoembryonic antigen (CEA) antibody. Cytometry, vol. 23. no. 3, p. 228-240.
26. FORNIER, M., F.J. ESTEVA et A.D. SEIDMAN. 2000. Trastuzumab in combination with chemotherapy for the treatment of metastatic breast cancer. Semin Oncol, vol. 27. no. 6 Suppl 11, p. 38-45; discussion 92-100.
27. FRANKEL, A.E., B.L. POWELL et M.B. LILLY. 2002. Diphtheria toxin conjugate therapy of cancer. Cancer Chemother Biol Response Modif, vol. 20. no., p. 301-313.
28. FREDRIKSSON, I., G. LILJEGREN, L.G. ARNESSON, S.O. EMDIN, M. PALM-SJOVALL, T. FORNANDER, M. HOLMQVIST, L. HOLMBERG et J. FRISELL. 2002. Consequences of axillary recurrence after conservative breast surgery. Br J Surg, vol. 89. no. 7, p. 902-908.
29. FREER, R.J., A.R. DAY, J.A. RADDING, E. SCHIFFMANN, S. ASWANIKUMAR, H.J. SHOWELL et E.L. BECKER. 1980. Further studies on the structural requirements for synthetic peptide chemoattractants. Biochemistry, vol. 19. no. 11, p. 2404-2410.
30. GLASCOCK, C.B. et M.J. WEICKERT. 1998. Using chromosomal lacIQ1 to control expression of genes on high-copy-number plasmids in *Escherichia coli*. Gene, vol. 223. no. 1-2, p. 221-231.
31. GOLLNICK, S.O., S.S. EVANS, H. BAUMANN, B. OWCZARCZAK, P. MAIER, L. VAUGHAN, W.C. WANG, E. UNGER et B.W. HENDERSON. 2003. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. Br J Cancer, vol. 88. no. 11, p. 1772-1779.
32. GOWRISHANKAR, J. et D. MANNA. 1996. How is osmotic regulation of transcription of the *Escherichia coli* proU operon achieved? A review and a model. Genetica, vol. 97. no. 3, p. 363-378.
33. GRIFFITHS, G.L., D.M. GOLDENBERG, F. ROESCH et H.J. HANSEN. 1999. Radiolabeling of an anti-carcinoembryonic antigen antibody Fab' fragment (CEA-Scan) with the positron-emitting radionuclide Tc-94m. Clin Cancer Res, vol. 5. no. 10 Suppl, p. 3001s-3003s.

34. GRILLO-LOPEZ, A.J., C.A. WHITE, B.K. DALLAIRE, C.L. VARNIS, C.D. SHEN, A. WEI, J.E. LEONARD, A. MCCLURE, R. WEAVER, S. CAIRELLI, *et al.* 2000. Rituximab: the first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. Curr Pharm Biotechnol, vol. 1. no. 1, p. 1-9.
35. HAMANN, P.R., L.M. HINMAN, C.F. BEYER, D. LINDH, J. UPESLACIS, D.A. FLOWERS *et I.* BERNSTEIN. 2002. An anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. Choice of linker. Bioconjug Chem, vol. 13. no. 1, p. 40-46.
36. HAYDEN, M.S., L.K. GILLILAND *et J.A.* LEDBETTER. 1997. Antibody engineering. Curr Opin Immunol, vol. 9. no. 2, p. 201-212.
37. HEIM, R., D.C. PRASHER *et R.Y.* TSIEN. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 91. no. 26, p. 12501-12504.
38. HIREL, P.H., M.J. SCHMITTER, P. DESSEN, G. FAYAT *et S.* BLANQUET. 1989. Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 86. no. 21, p. 8247-8251.
39. HIROSE, K., M. HAKOZAKI, Y. NYUNOYA, Y. KOBAYASHI, K. MATSUSHITA, T. TAKENOUCI, A. MIKATA, N. MUKAIDA *et K.* MATSUSHIMA. 1995. Chemokine gene transfection into tumour cells reduced tumorigenicity in nude mice in association with neutrophilic infiltration. Br J Cancer, vol. 72. no. 3, p. 708-714.
40. HO, S.N., H.D. HUNT, R.M. HORTON, J.K. PULLEN *et L.R.* PEASE. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene, vol. 77. no. 1, p. 51-59.
41. HOLZER, W., F. PETERSEN, W. STRITTMATTER, S. MATZKU *et I.* VON HOEGEN. 1996. A fusion protein of IL-8 and a Fab antibody fragments binds to IL-8 receptors and induces neutrophil activation. Cytokine, vol. 8. no. 3, p. 214-221.
42. HUDSON, P.J. 1999. Recombinant antibody constructs in cancer therapy. Curr Opin Immunol, vol. 11. no. 5, p. 548-557.
43. HUDSON, P.J. *et A.A.* KORTT. 1999. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. J Immunol Methods, vol. 231. no. 1-2, p. 177-189.
44. IIZAWA, O., H. AKAMATSU *et Y.* NIWA. 1995. Neutrophil chemotaxis, phagocytosis, and generation of reaction oxygen species show a hierarchy of responsiveness to increasing concentrations of N-formyl-Met-Leu-Phe. Biol Signals, vol. 4. no. 1, p. 14-18.

45. ISHIZUKA, H., A. HANAMURA, T. KUNIMURA et H. AIBA. 1993. A lowered concentration of cAMP receptor protein caused by glucose is an important determinant for catabolite repression in *Escherichia coli*. Mol Microbiol, vol. 10. no. 2, p. 341-350.
46. JANEWAY CA, P.T. 1996. Immunobiologie. Paris, De Boeck Université, PP. 582.
47. JARRETT, J.T., S. HUANG et R.G. MATTHEWS. 1998. Methionine synthase exists in two distinct conformations that differ in reactivity toward methyltetrahydrofolate, adenosylmethionine, and flavodoxin. Biochemistry, vol. 37. no. 16, p. 5372-5382.
48. JURADO, P., D. RITZ, J. BECKWITH, V. DE LORENZO et L.A. FERNANDEZ. 2002. Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*. J Mol Biol, vol. 320. no. 1, p. 1-10.
49. KANG, S.M., Z. LIN, N.L. ASCHER et P.G. STOCK. 1998. Fas ligand expression on islets as well as multiple cell lines results in accelerated neutrophilic rejection. Transplant Proc, vol. 30. no. 2, p. 538.
50. KANG, S.M., D.B. SCHNEIDER, Z. LIN, D. HANAHAN, D.A. DICHEK, P.G. STOCK et S. BAEKKESKOV. 1997. Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. Nat Med, vol. 3. no. 7, p. 738-743.
51. KIM, J.C., W.S. KIM, J.S. RYU, S.J. OH, D.H. LEE, K.H. KOO, S.A. ROH, H.C. KIM, C.S. YU, G.H. KANG, *et al.* 2000. Applicability of carcinoembryonic antigen-specific monoclonal antibodies to radioimmunoguided surgery for human colorectal carcinoma. Cancer Res, vol. 60. no. 17, p. 4825-4829.
52. KING, K.M. et A. YOUNES. 2001. Rituximab: review and clinical applications focusing on non-Hodgkin's lymphoma. Expert Rev Anticancer Ther, vol. 1. no. 2, p. 177-186.
53. KORTT, A.A., O. DOLEZAL, B.E. POWER et P.J. HUDSON. 2001. Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer targeting. Biomol Eng, vol. 18. no. 3, p. 95-108.
54. KREITMAN, R.J. 2003. Recombinant toxins for the treatment of cancer. Curr Opin Mol Ther, vol. 5. no. 1, p. 44-51.
55. KUHNS, D.B., E.L. NELSON, W.G. ALVORD et J.I. GALLIN. 2001. Fibrinogen induces IL-8 synthesis in human neutrophils stimulated with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or leukotriene B(4). J Immunol, vol. 167. no. 5, p. 2869-2878.

56. KUSNEZOW, W., A. JACOB, A. WALIJEV, F. DIEHL et J.D. HOHEISEL. 2003. Antibody microarrays: An evaluation of production parameters. Proteomics, vol. 3. no. 3, p. 254-264.
57. LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, vol. 227. no. 259, p. 680-685.
58. LANING, J., H. KAWASAKI, E. TANAKA, Y. LUO et M.E. DORF. 1994. Inhibition of in vivo tumor growth by the beta chemokine, TCA3. J Immunol, vol. 153. no. 10, p. 4625-4635.
59. LEFKOWITZ, R.J., W.P. HAUSDORFF et M.G. CARON. 1990. Role of phosphorylation in desensitization of the beta-adrenoceptor. Trends Pharmacol Sci, vol. 11. no. 5, p. 190-194.
60. LEVIN, L.V. et T.W. GRIFFIN. 1991. Specific adhesion of carcinoembryonic antigen-bearing colorectal cancer cells to immobilized carcinoembryonic antigen. Cancer Lett, vol. 60. no. 2, p. 143-152.
61. LEWIN, B., P. SILICIANO et M. KLOTZ. 1997. Genes VI. London, Oxford University Press, Inc., PP. 1260.
62. LIAO, S., P.D. KHARE, F. ARAKAWA, M. KUROKI, Y. HIROSE, S. FUJIMURA et Y. TOMITA. 2001. Targeting of LAK activity to CEA-expressing tumor cells with an anti-CEA scFv/IL-2 fusion protein. Anticancer Res, vol. 21. no. 3B, p. 1673-1680.
63. LLOYD, K.O., J. BURCHELL, V. KUDRYASHOV, B.W. YIN et J. TAYLOR-PAPADIMITRIOU. 1996. Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells. J Biol Chem, vol. 271. no. 52, p. 33325-33334.
64. LODE, H.N., R. XIANG, S.R. DUNCAN, A.N. THEOFILOPOULOS, S.D. GILLIES et R.A. REISFELD. 1999. Tumor-targeted IL-2 amplifies T cell-mediated immune response induced by gene therapy with single-chain IL-12. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 96. no. 15, p. 8591-8596.
65. MAKRIDES, S.C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol Rev, vol. 60. no. 3, p. 512-538.
66. MALONEY, D.G., A.J. GRILLO-LOPEZ, C.A. WHITE, D. BODKIN, R.J. SCHILDER, J.A. NEIDHART, N. JANAKIRAMAN, K.A. FOON, T.M. LILES, B.K. DALLAIRE, et al. 1997. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. Blood, vol. 90. no. 6, p. 2188-2195.

67. MANIATIS, T., SAMBROOK, J. 1982. Molecular cloning, A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, PP. 545.
68. MARGOLIS, P.S., C.J. HACKBARTH, D.C. YOUNG, W. WANG, D. CHEN, Z. YUAN, R. WHITE et J. TRIAS. 2000. Peptide deformylase in *Staphylococcus aureus*: resistance to inhibition is mediated by mutations in the formyltransferase gene. Antimicrob Agents Chemother, vol. 44. no. 7, p. 1825-1831.
69. MARSHALL, J. 2003. Carcinoembryonic antigen-based vaccines. Semin Oncol, vol. 30. no. 3 Suppl 8, p. 30-36.
70. MARTINEZ, O.M. et S.M. KRAMS. 1999. Involvement of Fas-Fas ligand interactions in graft rejection. Int Rev Immunol, vol. 18. no. 5-6, p. 527-546.
71. MATTES, M.J., G.L. GRIFFITHS, H. DIRIL, D.M. GOLDENBERG, G.L. ONG et L.B. SHIH. 1994. Processing of antibody-radioisotope conjugates after binding to the surface of tumor cells. Cancer, vol. 73. no. 3 Suppl, p. 787-793.
72. MATTHEY, B., A. ENGERT et S. BARTH. 2000. Recombinant immunotoxins for the treatment of Hodgkin's disease (Review). Int J Mol Med, vol. 6. no. 5, p. 509-514.
73. MEINNEL, T., Y. MECHULAM et S. BLANQUET. 1993. Methionine as translation start signal: a review of the enzymes of the pathway in *Escherichia coli*. Biochimie, vol. 75. no. 12, p. 1061-1075.
74. MERTENS, N., E. REMAUT et W. FIERS. 1995. Tight transcriptional control mechanism ensures stable high-level expression from T7 promoter-based expression plasmids. Biotechnology (N Y), vol. 13. no. 2, p. 175-179.
75. MIERTZSCHKE, M. et T. GREINER-STOFFELE. 2003. The xthA gene product of *Archaeoglobus fulgidus* is an unspecific DNase. Eur J Biochem, vol. 270. no. 8, p. 1838-1849.
76. MISSIAKAS, D. et S. RAINA. 1997. Protein folding in the bacterial periplasm. J Bacteriol, vol. 179. no. 8, p. 2465-2471.
77. NELSON, D.P., E. SETSER, D.G. HALL, S.M. SCHWARTZ, T. HEWITT, R. KLEVITSKY, H. OSINSKA, D. BELLGRAU, R.C. DUKE et J. ROBBINS. 2000. Proinflammatory consequences of transgenic Fas ligand expression in the heart. J Clin Invest, vol. 105. no. 9, p. 1199-1208.
78. NETZEL-ARNETT, S., G.B. FIELDS, H. BIRKEDAL-HANSEN, H.E. VAN WART et G. FIELDS. 1991. Sequence specificities of human fibroblast and neutrophil collagenases. J Biol Chem, vol. 266. no. 11, p. 6747-6755.

79. NETZEL-ARNETT, S., G.B. FIELDS, H. BIRKEDAL-HANSEN, H.E. VAN WART et G. FIELDS. 1991. Sequence specificities of human fibroblast and neutrophil collagenases. J Biol Chem, vol. 266. no. 11, p. 6747-6755.
80. NILSSON, I., A. SAAF, P. WHITLEY, G. GAFVELIN, C. WALLER et G. VON HEIJNE. 1998. Proline-induced disruption of a transmembrane alpha-helix in its natural environment. J Mol Biol, vol. 284. no. 4, p. 1165-1175.
81. PAI, L.H., R. WITTES, A. SETSER, M.C. WILLINGHAM et I. PASTAN. 1996. Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: an antibody linked to *Pseudomonas exotoxin*. Nat Med, vol. 2. no. 3, p. 350-353.
82. PAO, C.S. et J.L. BENOVIC. 2002. Phosphorylation-independent desensitization of G protein-coupled receptors? Sci STKE, vol. 2002. no. 153, p. PE42.
83. PETRAKOU, E., A. MURRAY et M.R. PRICE. 1998. Epitope mapping of anti-MUC1 mucin protein core monoclonal antibodies. Tumour Biol, vol. 19 Suppl 1. no., p. 21-29.
84. PORTARO, F.C., A.B. SANTOS, M.H. CEZARI, M.A. JULIANO, L. JULIANO et E. CARMONA. 2000. Probing the specificity of cysteine proteinases at subsites remote from the active site: analysis of P4, P3, P2' and P3' variations in extended substrates. Biochem J, vol. 347 Pt 1. no., p. 123-129.
85. PREMKUMAR, L., U.K. BAGESHWAR, I. GOKHMAN, A. ZAMIR et J.L. SUSSMAN. 2003. An unusual halotolerant alpha-type carbonic anhydrase from the alga *Dunaliella salina* functionally expressed in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif, vol. 28. no. 1, p. 151-157.
86. PRICE, M.R., J.A. PUGH, F. HUDECZ, W. GRIFFITHS, E. JACOBS, I.M. SYMONDS, A.J. CLARKE, W.C. CHAN et R.W. BALDWIN. 1990. C595--a monoclonal antibody against the protein core of human urinary epithelial mucin commonly expressed in breast carcinomas. Br J Cancer, vol. 61. no. 5, p. 681-686.
87. PRICE, M.R., P.D. RYE, E. PETRAKOU, A. MURRAY, K. BRADY, S. IMAI, S. HAGA, Y. KIYOZUKA, D. SCHOL, M.F. MEULENBROEK, *et al.* 1998. Summary report on the ISOBM TD-4 Workshop: analysis of 56 monoclonal antibodies against the MUC1 mucin. San Diego, Calif., November 17-23, 1996. Tumour Biol, vol. 19 Suppl 1. no., p. 1-20.
88. PROSSNITZ, E.R. et R.D. YE. 1997. The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. Pharmacol Ther, vol. 74. no. 1, p. 73-102.

89. RAJAGOPALAN, P.T., A. DATTA et D. PEI. 1997. Purification, characterization, and inhibition of peptide deformylase from *Escherichia coli*. Biochemistry, vol. 36. no. 45, p. 13910-13918.
90. RIETSCH, A. et J. BECKWITH. 1998. The genetics of disulfide bond metabolism. Annu Rev Genet, vol. 32. no., p. 163-184.
91. RODEBERG, D.A., R.E. MORRIS et G.F. BABCOCK. 1997. Azurophilic granules of human neutrophils contain CD14. Infect Immun, vol. 65. no. 11, p. 4747-4753.
92. RODENBURG, C.M., R. MERNAUGH, G. BILBAO et M.B. KHAZAELI. 1998. Production of a single chain anti-CEA antibody from the hybridoma cell line T84.66 using a modified colony-lift selection procedure to detect antigen-positive ScFv bacterial clones. Hybridoma, vol. 17. no. 1, p. 1-8.
93. ROSHY, S., B.F. SLOANE et K. MOIN. 2003. Pericellular cathepsin B and malignant progression. Cancer Metastasis Rev, vol. 22. no. 2-3, p. 271-286.
94. RUSSELL, S.J., M.B. LLEWELYN et R.E. HAWKINS. 1992. Principles of antibody therapy. Bmj, vol. 305. no. 6866, p. 1424-1429.
95. SANGER, F., S. NICKLEN et A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 74. no. 12, p. 5463-5467.
96. SCHAIDER, H., M. OKA, T. BOGENRIEDER, M. NESBIT, K. SATYAMOORTHY, C. BERKING, K. MATSUSHIMA et M. HERLYN. 2003. Differential response of primary and metastatic melanomas to neutrophils attracted by IL-8. Int J Cancer, vol. 103. no. 3, p. 335-343.
97. SCHIFFMANN, E., B.A. CORCORAN et S.M. WAHL. 1975. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 72. no. 3, p. 1059-1062.
98. SCHUMANN, R.R. 1992. Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. Res Immunol, vol. 143. no. 1, p. 11-15.
99. SEINO, K., N. KAYAGAKI, K. OKUMURA et H. YAGITA. 1997. Antitumor effect of locally produced CD95 ligand. Nat Med, vol. 3. no. 2, p. 165-170.
100. SHEASHAA, H.A., M.A. BAKR, A.M. ISMAIL, M.A. SOBH et M.A. GHONEIM. 2003. Basiliximab reduces the incidence of acute cellular rejection in live-related-donor kidney transplantation: a three-year prospective randomized trial. J Nephrol, vol. 16. no. 3, p. 393-398.

101. SHEPHERD, G. 2003. Hypersensitivity reactions to chemotherapeutic drugs. Clin Rev Allergy Immunol, vol. 24. no. 3, p. 253-262.
102. SHIH, L.B., D.M. GOLDENBERG, H. XUAN, H.W. LU, M.J. MATTES et T.C. HALL. 1994. Internalization of an intact doxorubicin immunoconjugate. Cancer Immunol Immunother, vol. 38. no. 2, p. 92-98.
103. SHIMIZU, M., A. FONTANA, Y. TAKEDA, H. YAGITA, T. YOSHIMOTO et A. MATSUZAWA. 1999. Induction of antitumor immunity with Fas/APO-1 ligand (CD95L)- transfected neuroblastoma neuro-2a cells. J Immunol, vol. 162. no. 12, p. 7350-7357.
104. SIEMERING, K.R., R. GOLBIK, R. SEVER et J. HASELOFF. 1996. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. Curr Biol, vol. 6. no. 12, p. 1653-1663.
105. SIMMS, M.S., A.C. PERKINS, M.R. PRICE, D.P. SCHOLFIELD et M.C. BISHOP. 2001. 99mTechnetium-C595 radioimmunoscintigraphy: a potential staging tool for bladder cancer. BJU Int, vol. 88. no. 7, p. 686-691.
106. SOLBIATI, J., A. CHAPMAN-SMITH, J.L. MILLER, C.G. MILLER et J.E. CRONAN, JR. 1999. Processing of the N termini of nascent polypeptide chains requires deformylation prior to methionine removal. J Mol Biol, vol. 290. no. 3, p. 607-614.
107. SPEHR, V., D. FRAHM et T.F. MEYER. 2000. Improvement of the T7 expression system by the use of T7 lysozyme. Gene, vol. 257. no. 2, p. 259-267.
108. STEWART, E.J., F. ASLUND et J. BECKWITH. 1998. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. Embo J, vol. 17. no. 19, p. 5543-5550.
109. STONE, H.B., C.N. COLEMAN, M.S. ANSCHER et W.H. MCBRIDE. 2003. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. Lancet Oncol, vol. 4. no. 9, p. 529-536.
110. STUDIER, F.W. 1991. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. J Mol Biol, vol. 219. no. 1, p. 37-44.
111. STUDIER, F.W. et B.A. MOFFATT. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol, vol. 189. no. 1, p. 113-130.
112. STUDIER, F.W., A.H. ROSENBERG, J.J. DUNN et J.W. DUBENDORFF. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol, vol. 185. no., p. 60-89.

113. SUGIYAMA, Y., M. KATO, F.A. CHEN, S.S. WILLIAMS, Y. KAWAGUCHI, K. MIYA, Y.S. JONG, E. MATHIOWITZ, N.K. EGILMEZ et R.B. BANKERT. 2001. Human inflammatory cells within the tumor microenvironment of lung tumor xenografts mediate tumor growth suppression in situ that depends on and is augmented by interleukin-12. J Immunother, vol. 24. no. 1, p. 37-45.
114. TAGAMI, H., T. INADA, T. KUNIMURA et H. AIBA. 1995. Glucose lowers CRP* levels resulting in repression of the *lac* operon in cells lacking cAMP. Mol Microbiol, vol. 17. no. 2, p. 251-258.
115. TATUSOVA, T.A. et T.L. MADDEN. 1999. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiol Lett, vol. 174. no. 2, p. 247-250.
116. TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J., J. BURCHELL, D.W. MILES et M. DALZIEL. 1999. MUC1 and cancer. Biochim Biophys Acta, vol. 1455. no. 2-3, p. 301-313.
117. TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J., J.M. BURCHELL, T. PLUNKETT, R. GRAHAM, I. CORREA, D. MILES et M. SMITH. 2002. MUC1 and the immunobiology of cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia, vol. 7. no. 2, p. 209-221.
118. THANBICHLER, M., B. NEUHIERL et A. BOCK. 1999. S-methylmethionine metabolism in *Escherichia coli*. J Bacteriol, vol. 181. no. 2, p. 662-665.
119. TSALTAS, G., C.H. FORD et M. GALLANT. 1992. Demonstration of monoclonal anti-carcinoembryonic antigen (CEA) antibody internalization by electron microscopy, western blotting and radioimmunoassay. Anticancer Res, vol. 12. no. 6B, p. 2133-2142.
120. TSIEN, R.Y. 1998. The green fluorescent protein. Annu Rev Biochem, vol. 67. no., p. 509-544.
121. TURK, V., B. TURK et D. TURK. 2001. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. Embo J, vol. 20. no. 17, p. 4629-4633.
122. UNTCH, M., N. DITSCH et K. HERMELINK. 2003. Immunotherapy: new options in breast cancer treatment. Expert Rev Anticancer Ther, vol. 3. no. 3, p. 403-408.
123. VAQUERO, C., M. SACK, F. SCHUSTER, R. FINNERN, J. DROSSARD, D. SCHUMANN, A. REIMANN et R. FISCHER. 2002. A carcinoembryonic antigen-specific diabody produced in tobacco. Faseb J, vol. 16. no. 3, p. 408-410.
124. VARSHNEY, U. et U.L. RAJBHANDARY. 1992. Role of methionine and formylation of initiator tRNA in initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. J Bacteriol, vol. 174. no. 23, p. 7819-7826.

125. WARD, W.W. et S.H. BOKMAN. 1982. Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. Biochemistry, vol. 21. no. 19, p. 4535-4540.
126. WEISS, R.B. et S. BRUNO. 1981. Hypersensitivity reactions to cancer chemotherapeutic agents. Ann Intern Med, vol. 94. no. 1, p. 66-72.
127. WITKO-SARSAT, V., P. RIEU, B. DESCAMPS-LATSCHA, P. LESAVRE et L. HALBWACHS-MECARELLI. 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. Lab Invest, vol. 80. no. 5, p. 617-653.
128. WITZIG, T.E., C.A. WHITE, L.I. GORDON, G.A. WISEMAN, C. EMMANOUILIDES, J.L. MURRAY, J. LISTER et P.S. MULTANI. 2003. Safety of yttrium-90 ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for relapsed low-grade, follicular, or transformed non-hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol, vol. 21. no. 7, p. 1263-1270.
129. WONG, J.Y., D.Z. CHU, D. YAMAUCHI, T.L. ODOM-MARYON, L.E. WILLIAMS, A. LIU, J.M. ESTEBAN, A.M. WU, F.J. PRIMUS, J.D. BEATTY, *et al.* 1998. Dose escalation trial of indium-111-labeled anti-carcinoembryonic antigen chimeric monoclonal antibody (chimeric T84.66) in presurgical colorectal cancer patients. J Nucl Med, vol. 39. no. 12, p. 2097-2104.
130. WORN, A. et A. PLUCKTHUN. 2001. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. J Mol Biol, vol. 305. no. 5, p. 989-1010.
131. WRIGHT, S.D., R.A. RAMOS, A. HERMANOWSKI-VOSATKA, P. ROCKWELL et P.A. DETMERS. 1991. Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. J Exp Med, vol. 173. no. 5, p. 1281-1286.
132. WU, A.M., W. CHEN, A. RAUBITSCHK, L.E. WILLIAMS, M. NEUMAIER, R. FISCHER, S.Z. HU, T. ODOM-MARYON, J.Y. WONG et J.E. SHIVELY. 1996. Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers. Immunotechnology, vol. 2. no. 1, p. 21-36.
133. YAN, S., M. SAMENI et B.F. SLOANE. 1998. Cathepsin B and human tumor progression. Biol Chem, vol. 379. no. 2, p. 113-123.

ADRESSES INTERNET

Statistiques canadiennes sur le cancer 2003, Société Canadienne du cancer

http://www.quebec.cancer.ca/ccs/internet/standard/0,3182,3649_14291_453811_langId-fr,00.html

Alignement de 2 séquences nucléotidiques par Blast

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>